

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 208**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/506** (2006.01) **C07D 498/04** (2006.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07D 401/12** (2006.01)

**C07D 403/12** (2006.01)

**C07D 405/12** (2006.01)

**C07D 407/12** (2006.01)

**C07D 413/12** (2006.01)

**C07D 413/14** (2006.01)

**C07D 471/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2003 E 10010732 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2316459**

54 Título: **Compuestos de 2,4-pirimidindiamina para uso en métodos para tratar o prevenir enfermedades autoinmunitarias**

30 Prioridad:

**29.07.2002 US 399673 P**

**31.01.2003 US 443949 P**

**06.03.2003 US 452339 P**

**29.07.2003 US 631029**

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

**28.02.2014**

73 Titular/es:

**RIGEL PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**

**1180 Veterans Boulevard**

**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**SINGH, RAJINDER;**

**ARGADE, ANKUSH;**

**PAYAN, DONALD G.;**

**CLOUGH, JEFFREY;**

**KEIM, HOLGER;**

**SYLVAIN, CATHERINE;**

**LI, HUI y**

**BHAMIDIPATI, SOMASEKHAR**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 445 208 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos de 2,4-pirimidindiamina para uso en métodos para tratar o prevenir enfermedades autoinmunitarias

## 1. REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud Serie nº 60/399.673, presentada el 29 de julio 2002; Serie nº 60/443.949, presentada el 31 de enero de 2003; y Serie nº 60/452.339, presentada el 6 de marzo de 2003.

## 2. CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere generalmente a compuestos de 2,4-pirimidindiamina, a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, a intermedios y a métodos sintéticos para obtener los compuestos, y a los compuestos y composiciones para uso en una variedad de contextos, tal como en el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunitarias y/o los síntomas asociados con ellas.

## 3. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La reticulación de los receptores Fc, tales como el receptor de elevada afinidad por IgE (FcεRI) y/o el receptor de elevada afinidad por IgG (FcγRI), activa una cascada de señalización en mastocitos, basófilos y otras células inmunitarias que da como resultado la liberación de mediadores químicos responsables de numerosos sucesos adversos. Por ejemplo, tal reticulación conduce a la liberación de mediadores preformados de reacciones de hipersensibilidad anafiláctica de tipo I (inmediata), tales como histamina, desde los sitios de almacenamiento en gránulos *vía* la desgranulación. También conduce a la síntesis y liberación de otros mediadores, incluyendo leucotrienos, prostaglandinas y factores activadores de plaquetas (PAF), que desempeñan papeles importantes en reacciones inflamatorias. Mediadores adicionales que se sintetizan y se liberan con la reticulación de receptores Fc incluyen citocinas y óxido nítrico.

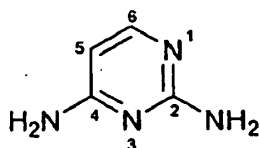
20 La cascada o cascadas de señalización activadas por la reticulación de receptores Fc tales como FcεRI y/o FcγRI comprenden un conjunto de proteínas celulares. Entre los propagadores de señales intracelulares más importantes están las tirosina cinasas. Y, una tirosina cinasa importante implicada en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

25 Puesto que los mediadores liberados como resultado de la reticulación de los receptores FcεRI y FcγRI son responsables de, o desempeñan papeles importantes en, la manifestación de numerosos sucesos adversos, sería muy deseable la disponibilidad de compuestos capaces de inhibir la cascada o cascadas de señalización responsables de su liberación. Además, dado el papel crítico que Syk cinasa desempeña en esta(s) y en otra(s) cascada(s) de señalización de receptores, también sería muy deseable la disponibilidad de compuestos capaces de inhibir Syk cinasa.

El documento WO 01/600.816 describe inhibidores de cinasas.

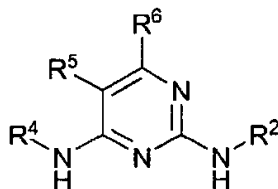
## 1. SUMARIO DE LA INVENCION

35 Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina, como se discutirá con más detalle más abajo, tienen una miríada de actividades biológicas. Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina comprenden un "núcleo" de 2,4-pirimidindiamina que tiene la siguiente estructura y convención numérica:



40 Los compuestos de la invención tienen la fórmula (1a) como se define más abajo, y están sustituidos en los nitrógenos de C2 y C4 (N2 y N4) para formar aminas secundarias, y además están opcionalmente sustituidos en una o más de las siguientes posiciones: la posición C5 y/o la posición C6.

La presente invención proporciona compuestos de fórmula (1a)



o una sal del mismo, en la que

5  $R^5$  se selecciona del grupo que consiste en halógeno,  $-OR^d$ ,  $-SR^d$ , haloalquiloxi (C1-C3), perhaloalquiloxi (C1-C3),  $-NR^cR^c$ , haloalquilo (C1-C3), perhaloalquilo (C1-C3),  $-CN$ ,  $-NC$ ,  $-OCN$ ,  $-SCN$ ,  $-NO$ ,  $-NO_2$ ,  $-N_3$ ,  $-S(O)R^d$ ,  $-S(O)_2R^d$ ,  $-S(O)_2OR^d$ ,  $-S(O)NR^cR^c$ ,  $-S(O)_2NR^cR^c$ ,  $-OS(O)R^d$ ,  $-OS(O)_2R^d$ ,  $-OS(O)_2OR^d$ ,  $-OS(O)NR^cR^c$ ,  $-OS(O)_2NR^cR^c$ ,  $-C(O)R^d$ ,  $-C(O)OR^d$ ,  $-C(O)NR^cR^c$ ,  $-C(NH)NR^cR^c$ ,  $-OC(O)R^d$ ,  $-SC(O)R^d$ ,  $-OC(O)OR^d$ ,  $-SC(O)NR^cR^c$ ,  $-SC(O)NR^cR^c$ ,  $-OC(NH)NR^cR^c$ ,  $-SC(NH)NR^cR^c$ ,  $-[NHC(O)]_nR^d$ ,  $-[NHC(O)]_nOR^d$ ,  $-[NHC(O)]_nNR^cR^c$  y  $-[NHC(NH)]_nNR^cR^c$ , arilo (C5-C10) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, arilalquilo (C6-C16) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, y heteroarilalquilo de 6-16 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, alquilo (C1-C6) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, alcanilo (C1-C4) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, alqueno (C2-C4) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, y alquino (C2-C4) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes;

15 cada  $R^6$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno,  $-OR^d$ ,  $-SR^d$ , haloalquiloxi (C1-C3), perhaloalquiloxi (C1-C3),  $-NR^cR^c$ , haloalquilo (C1-C3), perhaloalquilo (C1-C3),  $-CN$ ,  $-NC$ ,  $-OCN$ ,  $-SCN$ ,  $-NO$ ,  $-NO_2$ ,  $-N_3$ ,  $-S(O)R^d$ ,  $-S(O)_2R^d$ ,  $-S(O)_2OR^d$ ,  $-S(O)NR^cR^c$ ,  $-S(O)_2NR^cR^c$ ,  $-OS(O)R^d$ ,  $-OS(O)_2R^d$ ,  $-OS(O)_2OR^d$ ,  $-OS(O)NR^cR^c$ ,  $-OS(O)_2NR^cR^c$ ,  $-C(O)R^d$ ,  $-C(O)OR^d$ ,  $-C(O)NR^cR^c$ ,  $-C(NH)NR^cR^c$ ,  $-OC(O)R^d$ ,  $-SC(O)R^d$ ,  $-OC(O)OR^d$ ,  $-SC(O)NR^cR^c$ ,  $-SC(O)NR^cR^c$ ,  $-OC(NH)NR^cR^c$ ,  $-SC(NH)NR^cR^c$ ,  $-[NHC(O)]_nR^d$ ,  $-[NHC(O)]_nOR^d$ ,  $-[NHC(O)]_nNR^cR^c$  y  $-[NHC(NH)]_nNR^cR^c$ , arilo (C5-C10) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, arilalquilo (C6-C16) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, y heteroarilalquilo de 6-16 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes

25  $R^8$  se selecciona del grupo que consiste en  $R^a$ ,  $R^a$  sustituido con uno o más del mismo o diferente  $R^a$  o  $R^b$ ,  $R^b$ ,  $-OR^a$  sustituidos con uno o más del mismo o diferente  $R^a$  o  $R^b$ ,  $-B(OR^a)_2$ ,  $-B(NR^cR^c)_2$ ,  $-(CH_2)_mR^b$ ,  $-(CHR^a)_mR^b$ ,  $-O-(CH_2)_mR^b$ ,  $-S-(CH_2)_mR^b$ ,  $-O-CHR^aR^b$ ,  $-O-CR^a(R^b)_2$ ,  $-O-(CHR^a)_mR^b$ ,  $-O-(CH_2)_mCH[(CH_2)_mR^b]R^b$ ,  $-S-(CHR^a)_mR^b$ ,  $-C(O)NH-(CH_2)_mR^b$ ,  $-C(O)NH-(CHR^a)_mR^b$ ,  $-O-(CH_2)_mC(O)NH-(CH_2)_mR^b$ ,  $-S-(CH_2)_mC(O)NH-(CH_2)_mR^b$ ,  $-O-(CHR^a)_mC(O)NH-(CHR^a)_mR^b$ ,  $-S-(CHR^a)_mC(O)NH-(CHR^a)_mR^b$ ,  $-NH-(CH_2)_mR^b$ ,  $-NH-(CHR^a)_mR^b$ ,  $-NH[(CH_2)_mR^b]$ ,  $-N[(CH_2)_mR^b]_2$ ,  $-NH-C(O)-NH-(CH_2)_mR^b$ ,  $-NH-C(O)-(CH_2)_m-CHR^bR^b$  y  $-NH-(CH_2)_m-C(O)-NH-(CH_2)_mR^b$ ;

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

35 cada  $R^b$  es un grupo adecuado seleccionado independientemente del grupo que consiste en  $-C(O)R^d$ ,  $-C(O)OR^d$ ,  $=O$ ,  $-OR^d$ , haloalquiloxi (C1-C3),  $-OCF_3$ ,  $=S$ ,  $-SR^d$ ,  $=NR^d$ ,  $=NOR^d$ ,  $-NR^cR^c$ , halógeno,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-NC$ ,  $-OCN$ ,  $-SCN$ ,  $-NO$ ,  $-NO_2$ ,  $=N_2$ ,  $-N_3$ ,  $-S(O)R^d$ ,  $-S(O)_2R^d$ ,  $-S(O)_2OR^d$ ,  $-S(O)NR^cR^c$ ,  $-S(O)_2NR^cR^c$ ,  $-OS(O)R^d$ ,  $-OS(O)_2R^d$ ,  $-OS(O)_2OR^d$ ,  $-OS(O)_2NR^cR^c$ ,  $-C(O)NR^cR^c$ ,  $-C(NH)NR^cR^c$ ,  $-C(NR^a)NR^cR^c$ ,  $-C(NOH)R^a$ ,  $-C(NOH)NR^cR^c$ ,  $-OC(O)R^d$ ,  $-OC(O)OR^d$ ,  $-OC(O)NR^cR^c$ ,  $-OC(NH)NR^cR^c$ ,  $-OC(NR^a)NR^cR^c$ ,  $-[NHC(O)]_nR^d$ ,  $-[NR^aC(O)]_nR^d$ ,  $-[NHC(O)]_nOR^d$ ,  $-[NR^aC(O)]_nOR^d$ ,  $-[NHC(O)]_nNR^cR^c$ ,  $-[NR^aC(O)]_nNR^cR^c$ ,  $-[NHC(NH)]_nNR^cR^c$  y  $-[NR^aC(NR^a)]_nNR^cR^c$ ;

40 cada  $R^c$  es independientemente un grupo de protección o cada  $R^a$ , o, como alternativa,  $R^c$  se toma junto con el átomo de nitrógeno al que está enlazado para formar un cicloheteroalquilo o heteroarilo de 5 a 8 miembros que puede incluir opcionalmente uno o más de los mismos o diferentes heteroátomos adicionales, y que puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes  $R^a$  o grupos  $R^b$  adecuados;

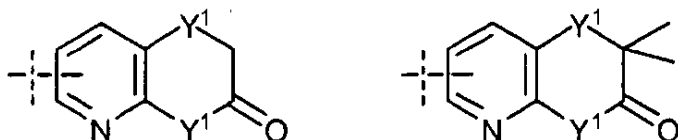
cada  $R^d$  es independientemente un  $R^a$  o un grupo de protección;

cada  $m$  es independientemente un número entero de 1 a 3; y

45 cada  $n$  es independientemente un número entero de 0 a 3.

$R^2$  se selecciona del grupo que consiste en alquilo (C1-C6) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, cicloalquilo (C3-C8) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, cicloheteroalquilo de 3-8 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, arilo (C5-C15) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, y heteroarilo de 5-15 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes;

$R^4$  es



en la que:

cada  $Y^1$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en O,  $NR^{37}$ , S, SO,  $SO_2$ ,  $SONR^{36}$  y NH;

$R^{36}$  es hidrógeno o alquilo; y

5  $R^{37}$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno o un progrupo seleccionado del grupo que consiste en  $-CH_2-PO(OR^8)_2$ , arilo, arilalquilo, heteroarilo,  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $-CR^aR^b-O-C(O)R^8$ ,  $-CR^aR^b-O-PO(OR^8)_2$ ,  $-CH_2-O-PO(OR^8)_2$ ,  $-C(O)-CR^aR^b-N(CH_3)_2$ ,  $-CR^aR^b-O-C(O)-CR^aR^b-N(CH_3)_2$ ,  $-C(O)R^8$ , y  $-C(O)-NR^8-C(O)R^8$ .

Cuando  $R^5$  es haloalquilo (C1-C3), en una realización puede ser  $-CF^3$ ,  $-CH^2CF^3$ , o  $-CF^2CF^3$ .

Cuando  $R^5$  es arilo (C5-C10) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, en una realización puede ser fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes.

10 Cuando  $R^6$  es haloalquilo (C1-C3), en una realización puede ser  $-CF^3$ ,  $-CH^2CF^3$ , o  $-CF^2CF^3$ .

Cuando  $R^6$  es arilo (C5-C10) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, en una realización puede ser fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes.

Cuando  $R^a$  es cicloheteroalquilo de 3-8 miembros, en una realización puede ser morfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, o piperidinilo.

15 Cuando  $R^a$  es arilo (C5-C10), en una realización puede ser fenilo.

Cuando  $R^a$  es arilalquilo (C6-C16), en una realización puede ser bencilo.

Cuando  $R^2$  es arilo (C5-C15) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, en una realización puede ser fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes.

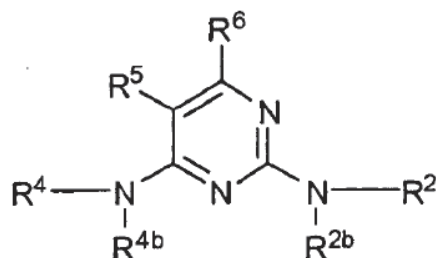
20 Cuando  $R^2$  es cicloalquilo (C3-C8) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, en una realización puede ser ciclohexilo opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes.

Cuando  $R^{37}$  es  $-C(O)R^8$ , en una realización puede ser  $-C(O)CF_3$ .

25 También se describen profármacos de los compuestos de fórmula (Ia). Tales profármacos pueden ser activos en su forma de profármaco, o pueden ser inactivos hasta que se convierten en condiciones fisiológicas u otras condiciones de uso en una forma de fármaco activo. En los profármacos, uno o más grupos funcionales de los compuestos de fórmula (Ia) están incluidos en prorrastos que se escinden de la molécula en las condiciones de uso, típicamente mediante hidrólisis, escisión enzimática o algún otro mecanismo de escisión, para producir los grupos funcionales. Por ejemplo, se pueden incluir grupos amino primario o secundario en un prorrasto de amida que se escinde en condiciones de uso para generar el grupo amino primario o secundario. De este modo, los profármacos incluyen tipos especiales de grupos protectores, denominados "progrupos", que enmascaran uno o más grupos funcionales de los compuestos de fórmula (Ia) que se escinden en las condiciones de uso para dar un compuesto farmacéutico de fórmula (Ia) activo. Los grupos funcionales en los compuestos de fórmula (Ia) que se pueden enmascarar con grupos para la inclusión en un prorrasto incluyen, pero no se limitan a, aminas (primarias y secundarias), hidroxilos, sulfanilos (tioles), carboxilos, carbonilos, fenoles, catecoles, dioles, alquinos, fosfatos, etc. En la técnica se conocen miríadas de grupos adecuados para enmascarar tales grupos funcionales para producir prorrastos que son escindibles en las condiciones deseadas de uso. Todos estos grupos, solos o en combinaciones, pueden estar incluidas en los profármacos. Ejemplos específicos de prorrastos que producen grupos amina primaria o secundaria que se pueden incluir en los profármacos incluyen, pero no se limitan a, amidas, carbamatos, iminas, ureas, fosfenilos, fosforilos y sulfenilos. Los ejemplos específicos de prorrastos que producen grupos sulfanilo que se pueden incluir en los profármacos incluyen, pero no se limitan a, tioésteres, por ejemplo derivados S-metílicos (monotio-, ditio-, oxitio-, aminotioacetales), sililtioésteres, tioésteres, tiocarbonatos, tiocarbamatos, disulfuros asimétricos, etc. Los ejemplos específicos de prorrastos que se escinden para producir grupos hidroxilo que se pueden incluir en los profármacos incluyen, pero no se limitan a, sulfonatos, ésteres y carbonatos. Ejemplos específicos de prorrastos que producen grupos carboxilo que se pueden incluir en los profármacos incluyen, pero no se limitan a, ésteres (incluyendo ésteres de sililo, ésteres y tioésteres de ácido oxámico), amidas e hidrazidas.

45 Los profármacos descritos aquí incluyen compuestos según la fórmula estructural (Ia) en la que  $R^c$  y  $R^d$  están sustituidos por un progrupo.

50 La sustitución de los hidrógenos unidos a N2 y N4 en las 2,4-pirimidindiaminas de fórmula estructural (Ia) por sustituyentes afecta adversamente a la actividad de los compuestos. Sin embargo, como apreciarán los expertos, estos nitrógenos se pueden incluir en prorrastos que, en condiciones de uso, se escinden para producir 2,4-pirimidindiaminas según la fórmula estructural (Ia). De este modo, los profármacos incluyen compuestos según la fórmula estructural (II):

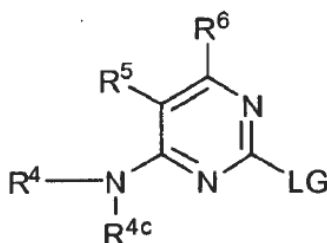


incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos del mismo, en la que:

$R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son como se define previamente para la fórmula estructural (Ia); y

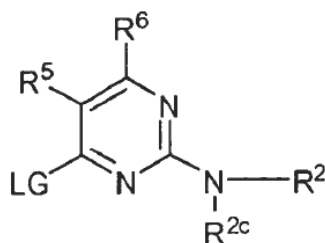
$R^{2b}$  y  $R^{4b}$  son cada uno, independientemente entre sí, un progrupo.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones comprendiendo uno o más compuestos de la invención y un vehículo, excipiente o diluyente apropiado. La naturaleza exacta del vehículo, excipiente o diluyente dependerá del uso deseado para la composición, y puede oscilar desde adecuada o aceptable para usos veterinarios a adecuada o aceptable para uso humano.
- 10 También se describen aquí intermedios útiles para sintetizar los compuestos de fórmula (Ia) y sus profármacos. Los intermedios incluyen 4-pirimidinaminas según la fórmula estructural (III):



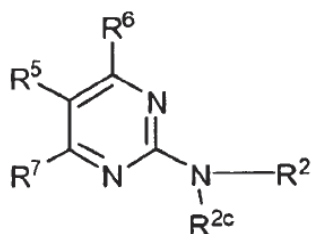
incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos del mismo, en la que  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son como se define anteriormente para la fórmula estructural (Ia); LG es un grupo saliente tal como, por ejemplo,  $-S(O)_2Me$ ,  $-SMe$  o halo (por ejemplo, F, Cl, Br, I); y  $R^{4c}$  es hidrógeno o un progrupo.

- 15 Los intermedios incluyen 2-pirimidinaminas según la fórmula estructural (IV):



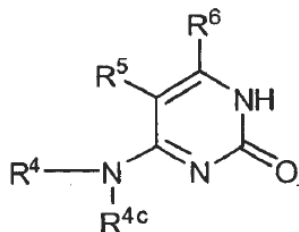
incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de las mismas, en la que  $R^2$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son como se define previamente para la fórmula estructural (Ia); LG es un grupo saliente, tal como, por ejemplo,  $-S(O)_2Me$ ,  $-SMe$  o halo (por ejemplo, P, Cl, Br, I) y  $R^{2c}$  es hidrógeno o un progrupo.

- 20 Los intermedios también incluyen 4-amino- o 4-hidroxi-2-pirimidinaminas según la fórmula estructural (V):



incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de las mismas, en la que  $R^2$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son como se define previamente para la fórmula estructural (Ia),  $R^7$  es un grupo amino o hidroxilo, y  $R^{2c}$  es hidrógeno o un progrupo.

Los intermedios también incluyen citosinas N4-sustituidas según la fórmula estructural (VI):



5 incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de las mismas, en la que  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son como se define previamente para la fórmula estructural (Ia), y  $R^{4c}$  es hidrógeno o un progrupo.

También se describen aquí métodos para sintetizar los compuestos de fórmula (Ia) y sus profármacos. El método puede implicar hacer reaccionar una 4-pirimidinamina según la fórmula estructural (III) con una amina de la fórmula  $HR^{2c}N-R^2$ , en la que  $R^2$  y  $R^{2c}$  son como se define previamente para la fórmula estructural (IV), para producir una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (Ia) o un profármaco según la fórmula estructural (II).

El método puede implicar hacer reaccionar una 2-pirimidinamina según la fórmula estructural (IV) con una amina de la fórmula  $R^4-NHR^{4c}$ , en la que  $R^4$  y  $R^{4c}$  son como se define previamente para la fórmula estructural (III), para producir una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (Ia) o un profármaco según la fórmula estructural (II).

15 El método puede implicar hacer reaccionar una 4-amino-2-pirimidinamina según la fórmula estructural (V) (en la que  $R^7$  es un grupo amino) con una amina de la fórmula  $R^4-NHR^{4c}$ , en la que  $R^4$  y  $R^{4c}$  son como se define para la fórmula estructural (III), para producir una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (Ia) o un profármaco según la fórmula estructural (II). Como alternativa, la 4-amino-2-pirimidinamina se puede hacer reaccionar con un compuesto de fórmula  $R^4-LG$ , en la que  $R^4$  es como se define previamente para la fórmula estructural (Ia), y LG es un grupo saliente.

20 El método puede implicar halogenar una 4-hidroxi-2-pirimidinamina según la fórmula estructural (V) ( $R^7$  es un grupo hidroxilo) para producir una 2-pirimidinamina según la fórmula estructural (IV), y hacer reaccionar esta pirimidinamina con una amina apropiada, como se describe anteriormente.

El método puede implicar halogenar una citosina sustituida en N4 según la fórmula estructural (VI) para producir una 4-pirimidinamina según la fórmula estructural (III), y hacer reaccionar esta pirimidinamina con una amina apropiada, como se describe anteriormente.

25 Los compuestos de fórmula (Ia) usados en la invención son potentes inhibidores de la desgranulación de inmunocitos, tales como mastocitos, basófilos, neutrófilos y/o eosinófilos. De este modo, también se describen aquí los compuestos de la invención para uso en métodos para regular, y en particular inhibir, la desgranulación de tales células. El método implica generalmente poner en contacto una célula que se desgranula con una cantidad de un compuesto de fórmula (Ia) o su profármaco, o una sal aceptable, hidrato, solvato, N-óxido y/o composición del mismo, eficaz para regular o inhibir la desgranulación de la célula. El método se puede poner en práctica en contextos *in vitro* o en contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico para el tratamiento o prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la desgranulación celular.

35 Aunque no se pretende estar atados por ninguna teoría de operación, los datos bioquímicos confirman que los compuestos de 2,4-pirimidindiamina ejercen su efecto inhibitorio de la desgranulación, al menos en parte, bloqueando o inhibiendo la cascada o cascadas de transducción de señales iniciada por la reticulación de los receptores Fc de elevada afinidad para IgE ("Fc $\epsilon$ RI") y/o IgG ("Fc $\gamma$ RI"). De hecho, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina son potentes inhibidores de la desgranulación mediada tanto por Fc $\epsilon$ RI como por Fc $\gamma$ RI. Como consecuencia, los compuestos de fórmula (Ia) se pueden usar para inhibir estas cascadas de señalización de los receptores Fc en cualquier tipo de célula que exprese tales receptores Fc $\epsilon$ RI y/o Fc $\gamma$ RI, incluyendo, pero sin limitarse a, macrófagos, mastocitos, basófilos, neutrófilos y/o eosinófilos.

45 Los métodos descritos aquí también permiten la regulación de, y en particular la inhibición de, procesos aguas abajo que resultan como consecuencia de activar tal cascada o cascadas de señalización del receptor de Fc. Tales procesos aguas abajo incluyen, pero no se limitan a, la desgranulación mediada por Fc $\epsilon$ RI y/o mediada por Fc $\gamma$ RI, la producción de citocinas y/o la producción y/o la liberación de mediadores lipídicos tales como leucotrienos y prostaglandinas. El método implica generalmente poner en contacto una célula que expresa un receptor de Fc, tal como aquella de los tipos celulares discutidos anteriormente, con una cantidad de un compuesto de fórmula (Ia) o su profármaco, o una sal aceptable, hidrato, disolvente, N-óxido y/o composición del mismo, eficaz para regular o inhibir la cascada de señalización del receptor de Fc y/o un proceso aguas abajo efectuado mediante la activación de esta cascada de

señalización. El método se puede poner en práctica en contextos *in vitro* o en contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico dirigido al tratamiento o prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la cascada de señalización del receptor Fc, tales como enfermedades afectadas por la liberación de mediadores químicos específicos de los gránulos con la desgranulación, la liberación y/o síntesis de citocinas, y/o la liberación y/o síntesis de mediadores lipídicos tales como leucotrienos y prostaglandinas.

También se describen aquí los compuestos de la invención para uso en métodos para tratar y/o prevenir enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la liberación de mediadores químicos como consecuencia de activar cascadas de señalización del receptor de Fc, tales como las cascadas de señalización de Fc $\epsilon$ RI y/o Fc $\gamma$ RI. Los métodos se pueden poner en práctica en animales en los contextos veterinarios, o en seres humanos. Los métodos implican generalmente administrar a un sujeto animal o a un ser humano una cantidad de un compuesto de fórmula (Ia), o su profármaco, o una sal aceptable, hidrato, solvato, N-óxido y/o composición del mismo, eficaz para tratar o prevenir la enfermedad. Como se explica previamente, la activación de la cascada de señalización de los receptores Fc $\epsilon$ RI y Fc $\gamma$ RI en ciertas células inmunitarias conduce a la liberación y/o síntesis de una variedad de sustancias químicas que son mediadores farmacológicos de una amplia variedad de enfermedades.

Cualquiera de las enfermedades se puede tratar o prevenir según los métodos descritos aquí.

Por ejemplo, en mastocitos y basófilos, la activación de la cascada de señalización de Fc $\epsilon$ RI o Fc $\gamma$ RI conduce a la liberación inmediata (es decir, en 1-3 min. de la activación del receptor) de mediadores preformados de reacciones de hipersensibilidad atópica y/o de tipo I (por ejemplo, histamina, proteasas tales como triptasa, etc.) vía el proceso de desgranulación. Tales reacciones de hipersensibilidad atópica o de tipo I incluyen, pero no se limitan a, reacciones anafilácticas al medio ambiente y a otros alérgenos (por ejemplo, pólenes, venenos de insectos y/o animales, alimentos, fármacos, colorantes de contraste, etc.), reacciones anafilactoides, fiebre del heno, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, asma alérgica, dermatitis atópica, eccema, urticaria, trastornos de la mucosa, trastornos de los tejidos, y ciertos trastornos gastrointestinales.

La liberación inmediata de los mediadores preformados vía la desgranulación es seguida de la liberación y/o síntesis de una variedad de otros mediadores químicos, incluyendo, entre otros, el factor activador de plaquetas (PAF), prostaglandinas y leucotrienos (por ejemplo, LTC<sub>4</sub>), y la síntesis *de novo* y la liberación de citocinas tales como TNF $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, etc. El primero de estos dos procesos se produce aproximadamente 3-30 min. tras la activación del receptor; el último, aproximadamente 30 min-7 h tras la activación del receptor. Se piensa que estos mediadores de "etapa tardía" son responsables en parte de los síntomas crónicos de las reacciones de hipersensibilidad atópica y de tipo I enumeradas anteriormente, y además son mediadores químicos de la inflamación y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria idiopática del intestino, síndrome de intestino irritable, colon espástico, etc.), cicatrización de bajo grado (por ejemplo, esclerodermia, fibrosis incrementada, queloides, cicatrices post-quirúrgicas, fibrosis pulmonar, espasmos vasculares, migraña, lesión por reperfusión y postinfarto del miocardio), y complejo o síndrome seco. Todas estas enfermedades se pueden tratar o prevenir según los métodos descritos aquí.

Enfermedades adicionales que se pueden tratar o prevenir según los métodos descritos aquí incluyen enfermedades asociadas con patología de basófilos y/o mastocitos. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades de la piel tales como esclerodermia, cardiopatías tales como postinfarto de miocardio, enfermedades pulmonares tales como cambios o remodelación del músculo pulmonar y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y enfermedades del intestino tales como síndrome inflamatorio del intestino (colon espástico).

Los compuestos de fórmula (Ia) son también potentes inhibidores de la tirosina cinasa Syk cinasa. De este modo, también se describen aquí métodos para regular, y en particular inhibir, la actividad de Syk cinasa. El método generalmente implica poner en contacto una Syk cinasa, o una célula que comprende una Syk cinasa, con una cantidad de un compuesto de fórmula (Ia) o su profármaco, o una sal aceptable, hidrato, solvato, N-óxido y/o composición del mismo, eficaz para regular o inhibir la actividad de Syk cinasa. La Syk cinasa puede ser una Syk cinasa aislada o recombinante. Como alternativa, la Syk cinasa puede ser una Syk cinasa endógena o recombinante expresada por una célula, por ejemplo un mastocito o un basófilo. El método se puede poner en práctica en contextos *in vitro* o en contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico para el tratamiento o prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la actividad de Syk cinasa.

Aunque no se pretende estar atados por ninguna teoría particular de operación, se cree que los compuestos de fórmula (Ia) inhiben la desgranulación celular y/o la liberación de otros mediadores químicos principalmente inhibiendo Syk cinasa que es activada a través del homodímero de la cadena gamma de Fc $\epsilon$ RI (véase, por ejemplo, FIG. 2). Este homodímero de la cadena gamma es compartido por otros receptores Fc, incluyendo Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII y Fc $\alpha$ RI. Para todos estos receptores, la transducción de señal intracelular está mediada por el homodímero de la cadena gamma común. La unión y la agregación de esos receptores da como resultado el reclutamiento y activación de tirosina cinasas tales como Syk cinasa. Como consecuencia de estas actividades de señalización común, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina descritos aquí que se metabolizan en tales compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos se pueden usar para regular, y en particular inhibir, las cascadas de señalización de receptores Fc que tienen este homodímero de la cadena gamma, tales como Fc $\epsilon$ RI, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII y Fc $\alpha$ RI, así como las respuestas celulares provocadas a través de estos receptores.

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

De este modo, también se describen aquí los compuestos de la invención para uso en métodos para regular, y en particular inhibir, cascadas de transducción de señales en las que Syk desempeña un papel. El método implica generalmente poner en contacto un receptor dependiente de Syk, o una célula que expresa un receptor dependiente de Syk, con una cantidad de un compuesto de fórmula (Ia) o su profármaco, o una sal aceptable, hidrato, solvato, N-óxido y/o composición del mismo, eficaz para regular o inhibir la cascada de transducción de señales. Los métodos también se pueden usar para regular, y en particular inhibir, procesos aguas abajo o respuestas celulares provocadas por la activación de la cascada de transducción de señales dependiente de Syk particular. Los métodos se pueden poner en práctica para regular cualquier cascada de transducción de señales en la que no se sabe o se ha descubierto posteriormente que Syk desempeña un papel. Los métodos se pueden poner en práctica en contextos *in vitro* o en contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico para el tratamiento o prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la activación de la cascada de transducción de señales dependiente de Syk. Los ejemplos no limitados de tales enfermedades incluyen las explicadas anteriormente.

Los datos celulares y de animales también confirman que los compuestos de fórmula (Ia) también se pueden usar para tratar o prevenir enfermedades autoinmunitarias y/o síntomas de tales enfermedades. De este modo, en otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (Ia) para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad autoinmunitaria y/o uno o más síntomas asociados con ella en un mamífero. Los métodos implican generalmente administrar a un sujeto que sufre una enfermedad autoinmunitaria, o en riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria, una cantidad de un compuesto de fórmula (Ia) o composición del mismo, eficaz para tratar o prevenir la enfermedad autoinmunitaria y/o sus síntomas asociados. Las enfermedades autoinmunitarias que se pueden tratar o prevenir con los compuestos de fórmula (Ia) incluyen aquellas enfermedades que están asociadas habitualmente con reacciones de hipersensibilidad no anafiláctica (reacciones de hipersensibilidad de tipo II, tipo III y/o tipo IV), y/o aquellas enfermedades que están mediadas, al menos en parte, por la activación de la cascada de señalización de FcγR en monocitos. Tal enfermedad autoinmunitaria incluye, pero no se limita a, aquellas enfermedades autoinmunitarias que se denominan frecuentemente como trastornos autoinmunitarios de órgano individual o de tipo celular individual, y aquella enfermedad autoinmunitaria que se denomina frecuentemente como trastorno autoinmunitario sistémico. Los ejemplos no limitantes de enfermedades denominadas frecuentemente como trastornos autoinmunitarios de órgano individual o de tipo celular individual incluyen: tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de anemia perniciosa, encefalomiелitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmia simpática, miastenia grave, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, hepatitis agresiva crónica, colitis ulcerosa y glomerulopatía membranosa. Los ejemplos no limitantes de enfermedades denominadas a menudo como trastorno autoinmunitario sistémico incluyen: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, panarteritis nudosa, esclerosis múltiple y penfigoide ampoloso.

## 5. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 proporciona un dibujo que ilustra la producción de IgE inducida por alérgenos, y la liberación consiguiente de mediadores preformados y otros mediadores químicos a partir de mastocitos;

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

la FIG. 3 proporciona un dibujo que ilustra los puntos de acción putativos de compuestos que inhiben selectivamente aguas arriba la desgranulación mediada por FcεRI, y compuestos que inhiben la desgranulación tanto mediada por FcεRI como inducida por ionomicina;

la FIG. 4 proporciona gráficas que ilustran los efectos de ciertos compuestos de 2,4-pirimidindiamina, DMSO (control) y ionomicina sobre el flujo de Ca<sup>2+</sup> en células CHMC;

la FIG. 5 proporciona datos que muestran la inhibición, sensible a la dosis, de la fosforilación de Syk cinasa de un sustrato endógeno (LAT) y un sustrato peptídico en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos R921218 (X), R921219 (Y) y R921304 (Z);



## 6. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

### 6.1 Definiciones

Como se usan aquí, los siguientes términos están destinados a tener los siguientes significados:

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

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

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

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

35 “Alquildiilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo hidrocarbonado divalente ramificado, de cadena lineal o cíclico, saturado o insaturado, que tiene el número señalado de átomos de carbono (*es decir*, C1-C6 significa de uno a seis átomos de carbono), derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes de un alcano, alqueno o alquino progenitor, o mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alcano, alqueno o alquino progenitor. Los dos centros radicálicos monovalentes, o cada valencia del centro radical divalente, pueden formar enlaces con los mismos átomos o con átomos diferentes. Los grupos alquildiilo típicos incluyen, pero no se limitan a, metandiilo; etildiilos tales como etan-1,1-diilo, etan-1,2-diilo, eten-1,1-diilo, eten-1,2-diilo; propildiilos tales como propan-1,1-diilo, propan-1,2-diilo, propan-2,2-diilo, propan-1,3-diilo, ciclopropan-1,1-diilo, ciclopropan-1,2-diilo, prop-1-en-1,1-diilo, prop-1-en-1,2-diilo, prop-2-en-1,2-diilo, prop-1-en-1,3-diilo, cicloprop-1-en-1,2-diilo, cicloprop-2-en-1,2-diilo, cicloprop-2-en-1,1-diilo, prop-1-in-1,3-diilo, etc.; butildiilos tales como butan-1,1-diilo, butan-1,2-diilo, butan-1,3-diilo, butan-1,4-diilo, butan-2,2-diilo, 2-metil-propan-1,1-diilo, 2-metil-propan-1,2-diilo, ciclobutan-1,1-diilo, ciclobutan-1,2-diilo, ciclobutan-1,3-diilo, but-1-en-1,1-diilo, but-1-en-1,2-diilo, but-1-en-1,3-diilo, but-1-en-1,4-diilo, 2-metil-prop-1-en-1,1-diilo, 2-metaniliden-propan-1,1-diilo, buta-1,3-dien-1,1-diilo, buta-1,3-dien-1,2-diilo, buta-1,3-dien-1,3-diilo, buta-1,3-dien-1,4-diilo, ciclobut-1-en-1,2-diilo, ciclobut-1-en-1,3-diilo, ciclobut-2-en-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dien-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dien-1,3-diilo, but-1-in-1,3-diilo, but-1-in-1,4-diilo, buta-1,3-diin-1,4-diilo, etc.; y similares. Cuando se pretenden niveles específicos de saturación, se usa la nomenclatura alcanildiilo, alquenildiilo y/o alquindiilo. Cuando se pretende específicamente que las dos valencias estén en el mismo átomo de carbono, se usa la nomenclatura “alquilideno”. En algunas realizaciones, el grupo alquildiilo es alquildiilo (C1-C6). También se prefieren grupos alcanildiilo acíclicos saturados en los que los centros radicálicos están en los carbonos terminales, *por ejemplo* metandiilo (metano); etan-1,2-diilo (etano); propan-1,3-diilo (propano); butan-1,4-diilo (butano); y similares (también denominados como alquilenos, definidos *más abajo*).

55 “Alquilenos”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo alquildiilo saturado o insaturado, de cadena lineal, que tiene dos centros radicálicos monovalentes terminales derivados de la eliminación de un átomo de hidrógeno de cada uno de los dos átomos de carbono terminales de un alcano, alqueno o alquino progenitor de cadena lineal. El localizador de un doble enlace o un triple enlace, si está presente, en un alquilenos particular, se indica entre corchetes. Los grupos alquilenos típicos incluyen, pero no se limitan a, metano; etilenos tales como etano, eteno, etino;

propilenos tales como propano, prop[1]eno, propa[1,2]dieno, prop[1]ino, etc.; butilenos tales como butano, but[1]eno, but[2]eno, buta[1,3]dieno, but[1]ino, but[2]ino, buta[1,3]diino, etc.; y similares. Cuando se pretenden niveles específicos de saturación, se usa la nomenclatura alcano, alqueno y/o alquino. En realizaciones preferidas, el grupo alquileo es alquileo (C1-C6) o (C1-C3). También se prefieren grupos alcano saturados de cadena lineal, *por ejemplo* metano, etano, propano, butano, y similares.

“Heteroalquilo”, “heteroalcanilo”, “heteroalqueno”, “heteroalquino”, “heteroalquidilo” y “heteroalquileo”, por sí mismos o como parte de otro sustituyente, se refieren a grupos alquilo, alcanilo, alqueno, alquino, alquidilo y alquileo, respectivamente, en los que uno o más de los átomos de carbono están sustituidos cada uno independientemente con los mismos heteroátomos o grupos heteroatómicos, o diferentes. Los heteroátomos y/o grupos heteroatómicos típicos que pueden sustituir a los átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, -O-, -S-, -S-O-, -NR'-, -PH-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)NR'-, -S(O)<sub>2</sub>NR'-, y similares, incluyendo sus combinaciones, en los que cada R' es independientemente hidrógeno o alquilo (C1-C6).

“Cicloalquilo” y “Heterocicloalquilo”, por sí mismos o como parte de otro sustituyente, se refieren a versiones cíclicas de grupos “alquilo” y “heteroalquilo”, respectivamente. Para grupos heteroalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición que está unida al resto de la molécula. Los grupos cicloalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo; ciclobutilos tales como ciclobutanilo y ciclobutenilo; ciclopentilos tales como ciclopentanilo y ciclopentenilo; ciclohexilos tales como ciclohexanilo y ciclohexenilo; y similares. Los grupos heterocicloalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, tetrahidrofuranilo (*por ejemplo*, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, etc.), piperidinilo (*por ejemplo*, piperidin-1-ilo, piperidin-2-ilo, etc.), morfolinilo (*por ejemplo*, morfolin-3-ilo, morfolin-4-ilo, etc.), piperazinilo (*por ejemplo*, piperazin-1-ilo, piperazin-2-ilo, etc.), y similares.

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

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

“Ariilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo hidrocarbonado aromático monovalente que tiene el número señalado de átomos de carbono (*es decir*, CS-C15 significa de 5 a 15 átomos de carbono), derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático progenitor. Los grupos ariilo típicos incluyen, pero no se limitan a, grupos derivados de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, criseneno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleyadeno, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno, y similares, así como sus diversos hidroisómeros. En realizaciones preferidas, el grupo ariilo es ariilo (CS-C15), siendo incluso más preferido (CS-C10). Ariilos particularmente preferidos son ciclopentadienilo, fenilo y naftilo.

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

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

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

10 “Sistema de anillo aromático progenitor” se refiere a un sistema de anillo aromático progenitor en el que uno o más átomos de carbono se sustituyen cada uno independientemente por el mismo o diferentes heteroátomos o grupos heteroatómicos. Los heteroátomos o grupos heteroatómicos típicos para sustituir a los átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, N, NH, P, O, S, S(O), S(O)<sub>2</sub>, Si, etc. Se incluyen específicamente en la definición de “sistemas de anillos heteroaromáticos progenitores” sistemas de anillos condensados en los que uno o más de los anillos son aromáticos, y uno o más de los anillos están saturados o insaturados, tales como, por ejemplo, benzodioxano, benzofurano, cromano, cromeno, indol, indolina, xanteno, etc. También se incluyen en la definición de “sistema de anillo heteroaromático progenitor” aquellos anillos reconocidos que incluyen sustituyentes habituales, tales como, por ejemplo, benzopirona y 1-metil-1,2,3,4-tetrazol. Se excluyen específicamente de la definición de “sistema de anillo heteroaromático progenitor” anillos bencénicos condensados con polialquilenglicoles cíclicos tales como polietilenglicoles cíclicos. Los sistemas de anillos heteroaromáticos progenitores típicos incluyen, pero no se limitan a, acridina, bencimidazol, bencisoxazol, benzodioxano, benzodioxol, benzofurano, benzopirona, benzotiadiazol, benzotiazol, benzotriazol, benzoxacina, benzoxazol, benzoxazolina, carbazol, β-carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolicina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalacina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolicina, quinazolina, quinolina, quinolicina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno, y similares.

30 “Heteroarilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo heteroaromático monovalente que tiene el número señalado de átomos anulares (*por ejemplo*, “5-14 miembros” significa de 5 a 14 átomos anulares), derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de un sistema de anillo heteroaromático progenitor. Grupos heteroarilo típicos incluyen, pero no se limitan a, grupos derivados de acridina, bencimidazol, bencisoxazol, benzodioxano, benzodiazol, benzofurano, benzopirona, benzotiadiazol, benzotiazol, benzotriazol, benzoxacina, benzoxazol, benzoxazolina, carbazol, β-carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolicina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalacina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolicina, quinazolina, quinolina, quinolicina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno, y similares, así como sus diversos hidroisómeros. En realizaciones preferidas, el grupo heteroarilo es un heteroarilo de 5-14 miembros, siendo particularmente preferido heteroarilo de 5-10 miembros.

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

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

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

“Halógeno” o “halo”, por sí mismos o como parte de otro sustituyente, excepto que se establezca de otro modo, se refiere a fluoro, cloro, bromo y yodo.

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

Los grupos definidos anteriormente pueden incluir prefijos y/o sufijos que se usan habitualmente en la técnica para crear grupos sustituyentes adicionales bien reconocidos. Como ejemplos, “alquiloxi” o “alcoxi” se refiere a un grupo de la fórmula –OR”, “alquilamina” se refiere a un grupo de la fórmula –NHR”, y “dialquilamina” se refiere a un grupo de la fórmula –NR”R”, en las que cada R” es independientemente un alquilo. Como otro ejemplo, “haloalcoxi” o “haloalquiloxi” se refiere a un grupo de la fórmula –OR”, en la que R” es un haloalquilo.

“Grupo protector” se refiere a un grupo de átomos que, cuando se une a un grupo funcional reactivo en una molécula, enmascara, reduce o evita la reactividad del grupo funcional. Típicamente, un grupo protector se puede eliminar selectivamente según se desee durante el transcurso de una síntesis. Ejemplos de grupos protectores se pueden encontrar en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Chemistry, 3ª Ed., 1999, John Wiley & Sons, NY, y Harrison et al., Compendium of Synthetic Organic Methods, Vols. 1-8, 1971-1996, John Wiley & Sons, NY. Grupos protectores de amino representativos incluyen, pero no se limitan a, formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo (“CBZ”), terc-butoxicarbonilo (“Boc”), trimetilsililo (“TMS”), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo (“TES”), tritilo y grupos tritilo sustituidos, aliloxicarbonilo, 9-fluorenil-metiloxicarbonilo (“Fmoc”), nitroveratrilocarbonilo (“Nvoc”), y similares. Grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen, pero no se limitan a, aquellos en los que el grupo hidroxilo está acilado o alquilado, tales como bencilo y ésteres de tritilo, así como éteres de alquilo, éteres de tetrahidropirano, éteres de trialkilsililo (por ejemplo, grupos TMS o TIPPS) y éteres de alilo.

“Profármaco” se refiere a un derivado de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina activo (fármaco) que requiere una transformación en las condiciones de uso, tal como dentro del cuerpo, para liberar el fármaco de 2,4-pirimidindiamina activo. Los profármacos son frecuentemente, aunque no necesariamente, farmacológicamente inactivos hasta que se convierten en el fármaco activo. Los profármacos se obtienen típicamente enmascarando un grupo funcional en el fármaco de 2,4-pirimidindiamina, que se cree que se requiere en parte para la actividad, con un progrupo (definido más abajo) para formar un proresto que sufre una transformación, tal como una escisión, en las condiciones específicas de uso para liberar el grupo funcional, y por tanto el fármaco de 2,4-pirimidindiamina activo. La escisión del proresto puede transcurrir espontáneamente, tal como mediante una reacción de hidrólisis, o puede estar catalizada o inducida por otro agente, tal como mediante una enzima, mediante luz, mediante ácido o base, o mediante un cambio de o exposición a un parámetro físico o medioambiental, tal como un cambio de temperatura. El agente puede ser endógeno a las condiciones de uso, tal como una enzima presente en las células a las que se administra el profármaco, o las condiciones ácidas del estómago, o se puede suministrar de forma exógena.

En la técnica se conoce una amplia variedad de profármacos, así como los prorestos resultantes, adecuados para enmascarar grupos funcionales en los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos para producir profármacos. Por ejemplo, un grupo funcional hidroxilo se puede enmascarar como un proresto de sulfonato, éster o carbonato, que se puede hidrolizar *in vivo* para proporcionar el grupo hidroxilo. Un grupo funcional amino se puede enmascarar como un proresto de amida, carbamato, imina, urea, fosfenilo, fosforilo o sulfenilo, que se puede hidrolizar *in vivo* para proporcionar el grupo amino. Un grupo carboxilo se puede enmascarar como un proresto de éster (incluyendo ésteres y tioésteres de sililo), amida o hidrazida, que se puede hidrolizar *in vivo* para proporcionar el grupo carboxilo. Otros ejemplos específicos de progrupos adecuados y sus prorestos respectivos serán manifiestos para los expertos en la técnica.

“Progrupo” se refiere a un tipo de grupo protector que, cuando se usa para enmascarar un grupo funcional en un fármaco de 2,4-pirimidindiamina activo para formar un proresto, convierte el fármaco en un profármaco. Los progrupos están unidos típicamente al grupo funcional del fármaco *vía* enlaces que son escindibles en condiciones específicas de uso. De este modo, un profármaco es aquella porción de un proresto que se escinde para liberar el grupo funcional en las condiciones específicas de uso. Como un ejemplo específico, un proresto de amida de la fórmula –NH–C(O)CH<sub>3</sub> comprende el progrupo –C(O)CH<sub>3</sub>.

“Receptor Fc” se refiere a un miembro de la familia de moléculas de la superficie celular que se une a la porción Fc (que contiene la región constante específica) de una inmunoglobulina. Cada receptor Fc se une a inmunoglobulinas de un tipo específico. Por ejemplo, el receptor Fc $\alpha$  (“Fc $\alpha$ R”) se une a IgA, el Fc $\epsilon$ R se une a IgE, y el Fc $\gamma$ R se une a IgG.

La familia de Fc $\alpha$ R incluye el receptor polimérico de Ig implicado en el transporte epitelial de IgA/IgM, el receptor R $\alpha$ RI específico de la estirpe mieloide (también denominado CD89), el Fc $\alpha$ / $\mu$ R y al menos dos receptores de IgA alternativos (para un repaso reciente, véase Monteiro y van de Winkel, 2003, Annu. Rev. Immunol., publicación electrónica avanzada). El Fc $\alpha$ RI es expresado en neutrófilos, eosinófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células de Kupfer. El Fc $\alpha$ RI incluye una cadena alfa y el homodímero gamma de FcR que tiene un motivo de activación (ITAM) en el dominio citoplásmico y fosforila Syk cinasa.

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

La familia de  $Fc\gamma R$  incluye tres tipos, denominados  $Fc\gamma RI$  (también conocido como CD64),  $Fc\gamma RII$  (también conocido como CD32) y  $Fc\gamma RIII$  (también conocido como CD16).  $Fc\gamma RI$  es un receptor de alta afinidad (se une a IgG1 con una afinidad de  $10^8 M^{-1}$ ) encontrado en mastocitos, basófilos, células mononucleares, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y fagocitos, que ancla IgG monomérica a la superficie celular. El  $Fc\gamma RI$  incluye una cadena alfa y el dímero de la cadena gamma compartido por  $Fc\alpha RI$  y  $Fc\epsilon RI$ .

El  $Fc\gamma RII$  es un receptor de baja afinidad expresado en neutrófilos, monocitos, eosinófilos, plaquetas y linfocitos B. El  $Fc\gamma RII$  incluye una cadena alfa, y no incluye el homodímero de la cadena gamma explicado anteriormente.

El  $Fc\gamma RIII$  es un receptor de baja afinidad (se une a IgG1 con una afinidad de  $5 \times 10^5 M^{-1}$ ) expresado en NK, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y mastocitos. Comprende una cadena alfa y el homodímero gamma compartido por  $Fc\alpha RI$ ,  $Fc\epsilon RI$  y  $Fc\gamma RI$ .

Los expertos reconocerán que la estructura de la subunidad y las propiedades de unión de estos diversos receptores Fc, así como los tipos celulares que los expresan, no están completamente caracterizados. La explicación anterior refleja simplemente el estado actual de la técnica con relación a estos receptores (véase, por ejemplo, Immunobiology: The Immune System in Health & Disease, 5ª Edición, Janeway et al., Eds, 2001, ISBN 0-8153-3642-x, Figura 9.30 en la página 371), y no pretende ser limitante con respecto a la miríada de cascadas de señalización de receptores que se puede regular con los compuestos descritos aquí.

“Desgranulación mediada por el receptor Fc” o “desgranulación inducida por el receptor Fc” se refiere a la desgranulación que transcurre *vía* una cascada de transducción de señales del receptor Fc iniciada por la reticulación de un receptor Fc.

“Desgranulación inducida por IgE” o “desgranulación mediada por  $Fc\epsilon RI$ ” se refiere a la desgranulación que transcurre *vía* la cascada de transducción de señales del receptor IgE iniciada por la reticulación de IgE unido a  $Fc\epsilon RI$ . La reticulación se puede inducir mediante un alérgeno específico de IgE, o mediante otro agente de unión multivalente, tal como un anticuerpo anti-IgE. Haciendo referencia a la FIG. 2, en mastocitos y/o basófilos, la cascada de señalización de  $Fc\epsilon RI$  que conduce a la desgranulación se puede dividir en dos etapas: aguas arriba y aguas abajo. La etapa aguas arriba incluye todos los procesos que ocurren antes de la movilización del ion calcio (ilustrado como “ $Ca^{2+}$ ” en la FIG. 2; véase también la FIG. 3). La etapa aguas abajo incluye la movilización del ion calcio y todos sus procesos aguas abajo. Los compuestos que inhiben la desgranulación mediada por  $Fc\epsilon RI$  pueden actuar en cualquier punto a lo largo de la cascada de transducción de señales mediada por  $Fc\epsilon RI$ . Los compuestos que inhiben selectivamente aguas arriba la desgranulación mediada por  $Fc\epsilon RI$  actúan para inhibir esa porción de la cascada de señalización de  $Fc\epsilon RI$  aguas arriba del punto en el que se induce la movilización del ion calcio. En ensayos basados en células, los compuestos que inhiben selectivamente la desgranulación mediada por  $Fc\epsilon RI$  aguas arriba inhiben la desgranulación de células tales como mastocitos o basófilos que son activados o estimulados con un alérgeno específico de IgE o con un agente de unión (tal como un anticuerpo anti-IgE), pero no inhiben apreciablemente la desgranulación de células que son activadas o estimuladas con agentes desgranulantes que evitan la ruta de señalización de  $Fc\epsilon RI$ , tales como, por ejemplo, los ionóforos de calcio ionomicina y A23187.

“Desgranulación inducida por IgG” o “desgranulación mediada por  $Fc\gamma RI$ ” se refiere a la desgranulación que transcurre *vía* la cascada de transducción de señales de  $Fc\gamma RI$  iniciada mediante la reticulación de IgG unida a  $Fc\gamma RI$ . La reticulación se puede inducir mediante un alérgeno específico de IgG o mediante otro agente de unión multivalente, tal como un anticuerpo anti-IgG o un fragmento de anticuerpo. Al igual que la cascada de señalización de  $Fc\epsilon RI$ , en mastocitos y basófilos la cascada de señalización de  $Fc\gamma RI$  también conduce a la desgranulación, que se puede dividir en las mismas dos etapas: aguas arriba y aguas abajo. Similar a la desgranulación mediada por  $Fc\epsilon RI$ , los compuestos que inhiben selectivamente aguas arriba la desgranulación mediada por  $Fc\gamma RI$  actúan aguas arriba del punto en el que se induce la movilización del ion calcio. En ensayos basados en células, los compuestos que inhiben selectivamente aguas arriba la desgranulación mediada por  $Fc\gamma RI$  inhiben la desgranulación de células tales como mastocitos o basófilos que son activados o estimulados por un alérgeno específico de IgG o con un agente de unión (tal como un anticuerpo anti-IgG o fragmento), pero no inhiben apreciablemente la desgranulación de células que son activadas o estimuladas con agentes desgranulantes que evitan la ruta de señalización de  $Fc\gamma RI$ , tales como, por ejemplo, los ionóforos de calcio ionomicina y A23187.

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

“Syk cinasa” se refiere a la tirosina cinasa proteínica del bazo no receptora (citoplásmica) de 72 kDa bien conocida, expresada en células B y en otras células hematopoyéticas. Syk cinasa incluye dos dominios de homología tipo 2 con Src (SH2) de consenso en tándem, que se unen a motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (“ITAM”) fosforilados, un dominio “enlazador” y un dominio catalítico (para un repaso de la estructura y función de Syk cinasa, véase Sada et al., 2001, J. Biochem. (Tokyo) 130:177-186); véase también Turner et al., 2000, Immunology Today 21:148-154). La Syk cinasa se ha estudiado ampliamente como un efector de la señalización del receptor de células B (BCR) (Turner et al., 2000, *más arriba*). La Syk cinasa también es crítica para la fosforilación de tirosina de múltiples proteínas que regulan importantes rutas que parten de inmunorreceptores, tales como las cascadas de movilización de  $Ca^{2+}$  y de proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (véase, por ejemplo, la FIG. 2) y la desgranulación. La Syk cinasa también desempeña un papel crítico en la señalización de integrina en neutrófilos (véase, por ejemplo, Mocsai et al. 2002, Immunity 16:547-558).

Como se usa aquí, Syk cinasa incluye cinasas de cualquier especie animal, incluyendo, pero sin limitarse a, hominosapiens, simio, bovina, porcina, roedor, etc., reconocida por pertenecer a la familia de Syk. Se incluyen específicamente isoformas, variantes de corte y empalme, variantes alélicas, mutantes, tanto de origen natural como hechas por el hombre. Las secuencias de aminoácidos de tales Syk cinasas son bien conocidas, y están disponibles en GENBANK. Los ejemplos específicos de ARNm que codifican diferentes isoformas de Syk cinasa humana se pueden encontrar en el número de acceso de GENBANK gi|21361552[ref|NM\_003177.2], gi|496899[emb|Z29630.1|HSSYKPTK[496899] y gi|15030258[gb|BC011399.1|BC011399[15030258].

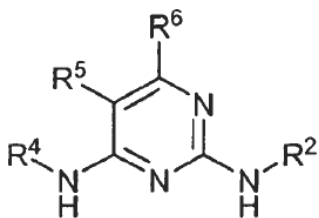
Los expertos apreciarán que las tirosina cinasas que pertenecen a otras familias pueden tener sitios activos o bolsillos de unión que son similares en estructura tridimensional a la de Syk. Como consecuencia de esta similitud estructural, se espera que tales cinasas, denominadas aquí como “imitadores de Syk”, catalicen la fosforilación de sustratos fosforilados por Syk. De este modo, se apreciará que tales imitadores de Syk, en cuyas cascadas de transducción de señales tales imitadores de Syk desempeñan un papel, y las respuestas biológicas provocadas por tales imitadores de Syk y las cascadas de señalización dependientes de los imitadores de Syk se pueden regular, y en particular inhibir, con los compuestos de 2,4-pirimidindiamina descritos aquí.

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

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

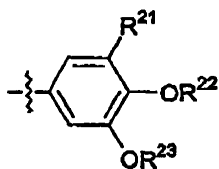
## 6.2 Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina

Los compuestos de la invención son compuestos según la fórmula estructural (Ia):



incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de los mismos, en la que  $R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son como se define anteriormente. Más abajo se describen realizaciones específicas adicionales de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención.

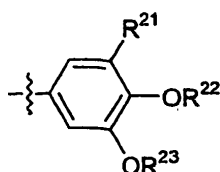
En una primera realización de los compuestos de fórmula estructural (Ia),  $R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son como se define anteriormente para (Ia), con la condición de que  $R^2$  no sea 3,4,5-trimetoxifenilo, 3,4,5-trialcoxifenilo (C1-C6) ni



5 en la que  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  y  $R^{23}$  son como se define para  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$ , respectivamente en la patente U.S. n° 6,235,746. En una realización específica de esta primera realización,  $R^{21}$  es hidrógeno, halo, alquilo (C1-C6) de cadena lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos  $R^{25}$ , hidroxilo, alcoxi (C1-C6) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos fenilo o  $R^{25}$ , tiol (-SH), alquiltio (C1-C6) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos fenilo o  $R^{25}$ , amino (-NH<sub>2</sub>), -NHR<sup>26</sup> o -NR<sup>26</sup>R<sup>26</sup>;  $R^{22}$  y  $R^{23}$  son cada uno, independientemente entre sí, un alquilo (C1-C6) de cadena lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos  $R^{25}$ ;  $R^{25}$  se selecciona del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alcoxi (C1-C6), tiol, alquiltio (C1-C6), alquilamino (C1-C6) y dialquilamino (C1-C6); y cada  $R^{26}$  es independientemente un alquilo (C1-C6) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos fenilo o  $R^{25}$ , o un -C(O)R<sup>27</sup>, en el que  $R^{27}$  es un alquilo (C1-C6) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos fenilo o  $R^{25}$ .

En otra realización específica de esta primera realización,  $R^{21}$  es metoxi opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos halo, y/o  $R^{22}$  y  $R^{23}$  son cada uno, independientemente entre sí, un metilo o etilo opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos halo.

15 En una segunda realización de los compuestos de fórmula estructural (Ia),  $R^2$ ,  $R^4$  y  $R^5$  son como se describe previamente para (Ia) y  $R^6$  es hidrógeno, con la condición de que  $R^2$  no sea 3,4,5-trimetoxifenilo, 3,4,5-tri-alcoxifenilo (C1-C6) ni



en la que  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  y  $R^{23}$  son como se define anteriormente en relación con la primera realización.

20 En una tercera realización, los compuestos de fórmula estructural (Ia) excluyen los compuestos descritos en los Ejemplos 1-141 de la patente U.S. n° 6.235.746.

En una cuarta realización, los compuestos de fórmula estructural (Ia) excluyen compuestos definidos por la fórmula (1) o fórmula 1(a) de esta patente U.S. n° 6.235.746 (véase, por ejemplo, la descripción en la Col. 1, línea 48 a Col. 7, línea 49 y Col. 8, líneas 9-36).

25 En una quinta realización, los compuestos de fórmula estructural (Ia) excluyen los compuestos definidos por las fórmulas (I) y (X) del documento WO 02/04429 o cualquier compuesto descrito en el documento WO 02/04429.

En una sexta realización de los compuestos de fórmula estructural (Ia), cuando la que  $R^5$  es ciano o -C(O)NHR, en el que R es hidrógeno o alquilo (C1-C6); y  $R^6$  es hidrógeno, entonces  $R^2$  es distinto de un grupo fenilo sustituido.

30 En una séptima realización, los compuestos de fórmula estructural (Ia) excluyen compuestos definidos por las fórmulas (I) y (IV) de la patente U.S. n° 4.983.608 o cualquier compuesto descrito en la patente U.S. n° 4.983.608.

35 Los expertos en la técnica apreciarán que, en los compuestos de fórmula (Ia),  $R^2$  y  $R^4$  pueden ser iguales o diferentes, y pueden variar ampliamente. En  $R^4$  (y/o  $R^2$  cuando  $R^2$  es un anillo opcionalmente sustituido, tal como cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos), el anillo puede estar unido al resto de la molécula a través de cualquier carbono o heteroátomo disponible. Los sustituyentes opcionales pueden unirse a cualesquiera átomos de carbono y/o heteroátomos disponibles.

40 En una octava realización de los compuestos de fórmula estructural (Ia),  $R^2$  es un fenilo opcionalmente sustituido o un arilo (C5-C15) opcionalmente sustituido, sujeto a las condiciones de que (1) cuando  $R^6$  es hidrógeno, entonces  $R^2$  no es 3,4,5-trimetoxifenilo o 3,4,5-trialcoxi (C1-C6) fenilo; (2) cuando  $R^2$  es un fenilo 3,4,5-trisustituido, entonces los sustituyentes en las posiciones 3 y 4 no son simultáneamente metoxi o alcoxi (C1-C6); o (3) cuando  $R^6$  es hidrógeno entonces  $R^5$  es distinto de ciano. Como alternativa,  $R^2$  está sujeto a las condiciones descritas en relación con las realizaciones primera o segunda. El grupo arilo o fenilo opcionalmente sustituido puede estar unido al resto de la molécula a través de cualquier átomo de carbono disponible. Ejemplos específicos de fenilos opcionalmente sustituidos incluyen fenilos que están opcionalmente mono-, di- o trisustituidos con los mismos o diferentes grupos  $R^8$ , en los que  $R^8$  es como se define previamente para la fórmula estructural (I), y sometidos a las condiciones anteriores. Cuando el fenilo está monosustituido, el sustituyente  $R^8$  puede estar situado en la posición *orto*, *meta* o *para*. Cuando está situado en la posición *orto*, *meta* o *para*,  $R^8$  se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en alquilo (C1-C10), alquilo ramificado (C1-C10), -OR<sup>a</sup> opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos  $R^b$ , -O-C(O)OR<sup>a</sup>, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR<sup>a</sup>, -C(O)OR<sup>a</sup>, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>, -O-C(O)NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>, -O-C(NH)NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(NH)NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup> y -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>, en los que *m*,  $R^a$  y  $R^c$  son como se define previamente para la fórmula estructural (I).

50 En una realización de estos compuestos, -NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup> es un heteroarilo de 5-6 miembros que incluye opcionalmente uno o

más de los mismos o diferentes heteroátomos adicionales. Ejemplos específicos de tales heteroarilos de 5-6 miembros incluyen, pero no se limitan a, oxadiazolilo, triazolilo, tiazolilo, oxazolilo, tetrazolilo e isoxazolilo.

5 En otra realización de estos compuestos,  $-NR^cR^c$  es un anillo cicloheteroalquílico de 5-6 miembros saturado que incluye opcionalmente uno o más de los mismos o diferentes heteroátomos. Ejemplos específicos de tales cicloheteroalquilos incluyen, pero no se limitan a, pirrolidinilo, pirazolidinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo y morfolinilo.

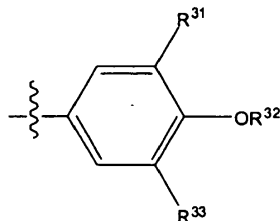
En todavía otra realización de estos compuestos, cada  $R^a$  es independientemente un alquilo (C1-C6), y/o cada  $-NR^cR^c$  es  $NHR^a$ , en el que  $R^a$  es un alquilo (C1-C6). En una realización específica,  $R^b$  es  $-O-CH_2-C(O)NHCH_3$ . En otra realización específica,  $R^b$  es  $-OH$ .

10 Cuando el fenilo está disustituido o trisustituido, los sustituyentes  $R^b$  se pueden situar en cualquier combinación de posiciones. Por ejemplo, los sustituyentes  $R^b$  se pueden situar en las posiciones 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 3,4, 3,5, 2,3,4, 2,3,5, 2,3,6, 2,4,5, 2,4,6, 2,5,6 o 3,4,5. En una realización de compuestos que incluyen un fenilo disustituido, los sustituyentes están situados en una posición distinta de 3,4. En otra realización, están situados en 3,4. En una realización de compuestos que incluyen un fenilo trisustituido, los sustituyentes están situados en una posición distinta de 3,4,5, o, como alternativa, ninguno de dos de los sustituyentes está situado en 3,4. En otra realización, los sustituyentes están situados en 3,4,5.

Ejemplos específicos de sustituyentes  $R^b$  en tales fenilos di- y trisustituidos incluyen los diversos sustituyentes  $R^b$  descritos anteriormente en relación con los fenilos sustituidos en *orto*, *meta* y *para*.

20 En otra realización específica, los sustituyentes  $R^b$  útiles para sustituir tales fenilos di- y trisustituidos incluyen alquilo (C1-C6), alcoxi (C1-C6), metoxi, halo, cloro, perhaloalquilo (C1-C6),  $-CF_3$ , perhaloalcoxi (C1-C6) y  $-OCF_3$ . En una realización preferida, tales sustituyentes  $R^b$  están situados en 3,4 o 3,5. Ejemplos específicos de anillos fenólicos disustituidos preferidos incluyen 3-cloro-4-metoxi-fenilo, 3-metoxi-4-clorofenilo, 3-cloro-4-trifluorometoxi-fenilo, 3-trifluorometoxi-4-cloro-fenilo, 3,4-dicloro-fenilo, 3,4-dimetoxifenilo y 3,5-dimetoxifenilo.

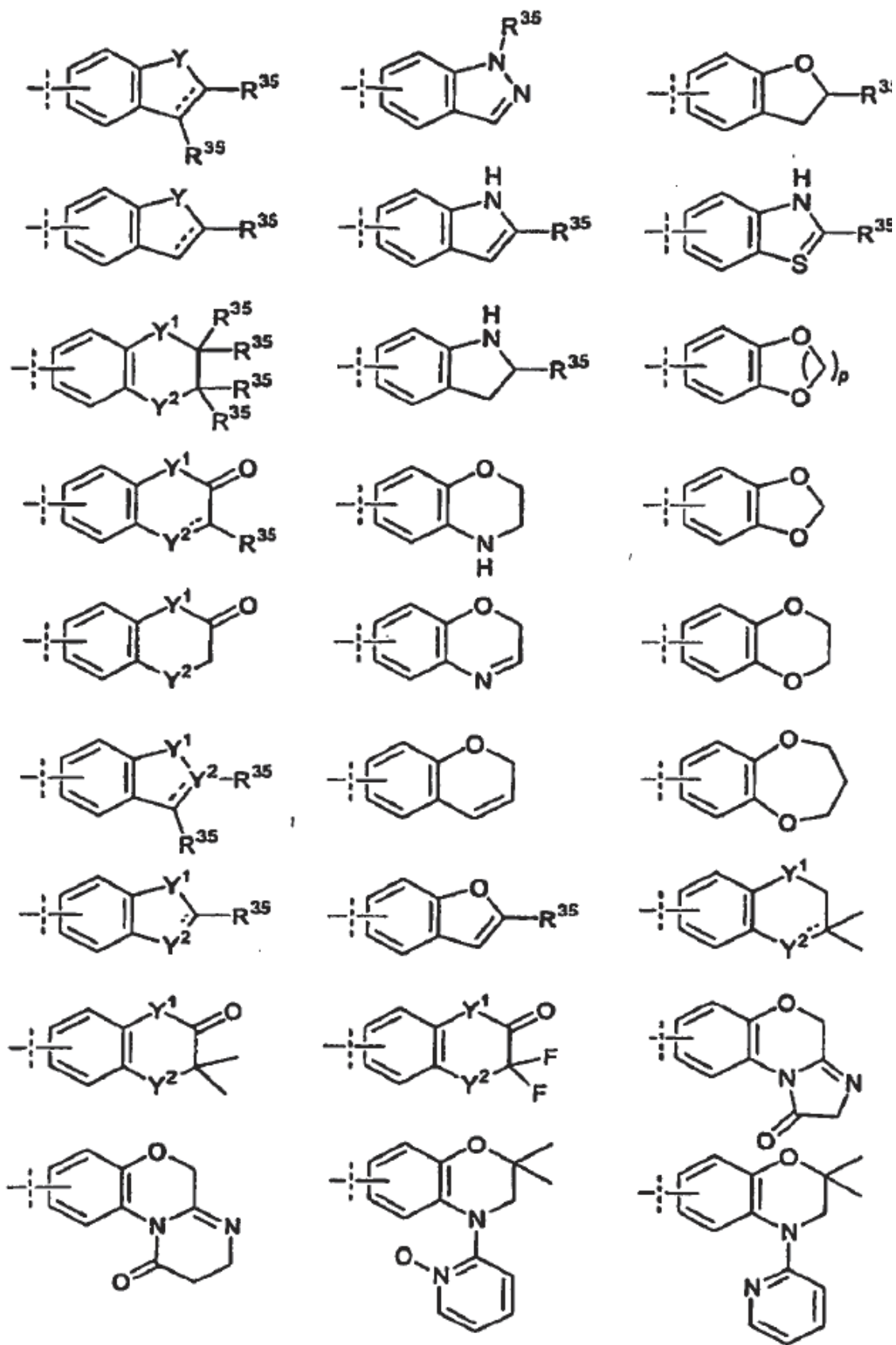
En otra realización de compuestos que incluyen un fenilo trisustituido, el fenilo trisustituido tiene la fórmula:

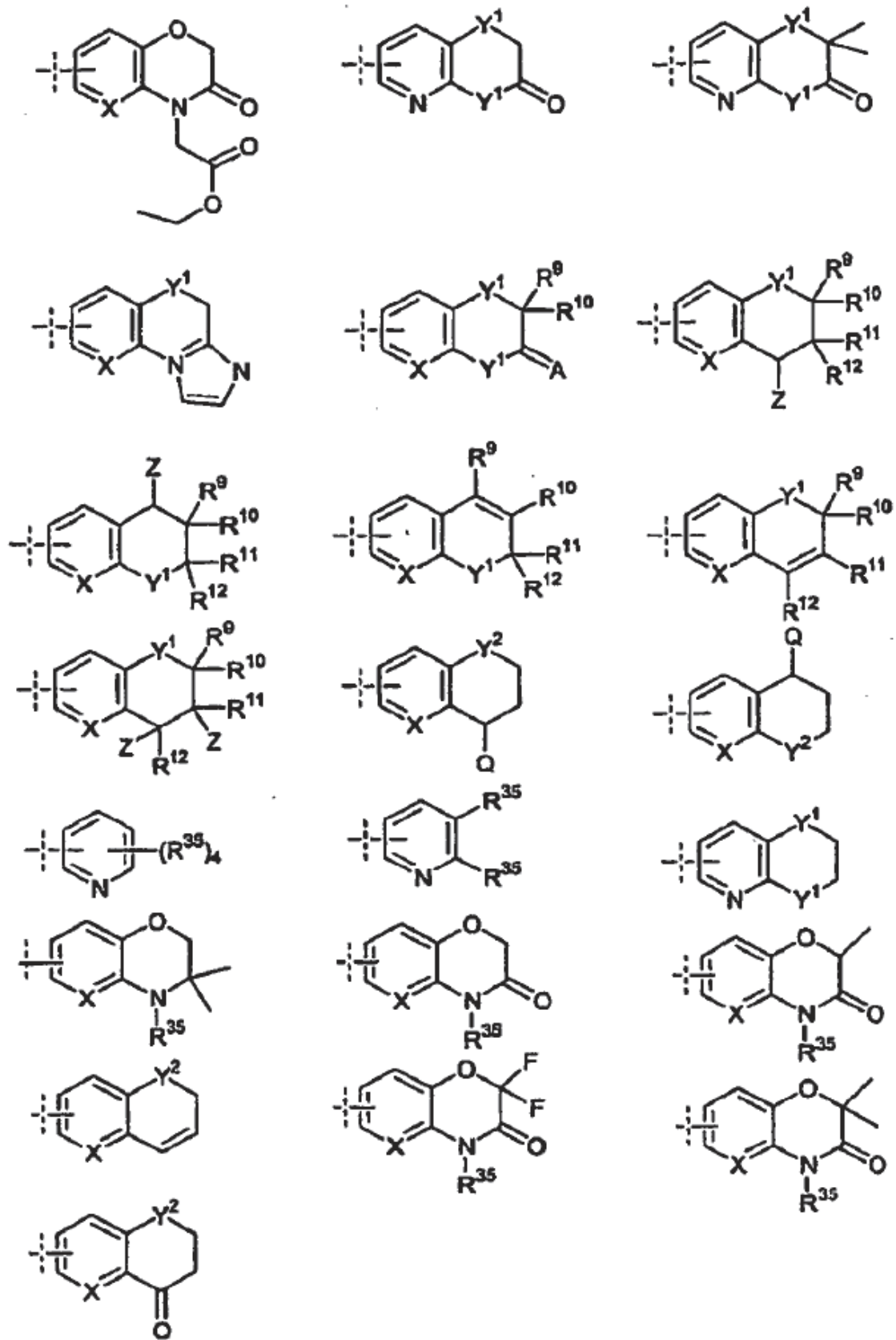


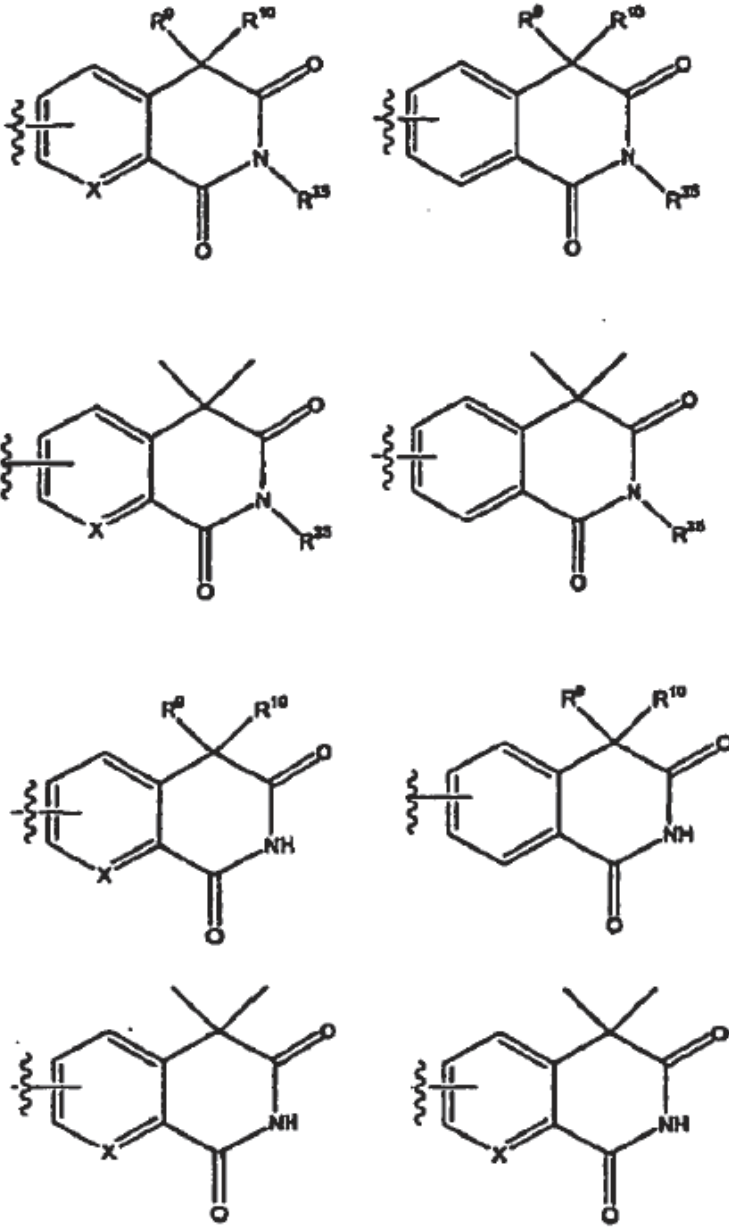
25 en la que:  $R^{31}$  es metilo o alquilo (C1-C6);  $R^{32}$  es hidrógeno, metilo o alquilo (C1-C6); y  $R^{33}$  es un grupo halo.

30 En una novena realización de los compuestos de fórmula estructural (Ia),  $R^2$  es un heteroarilo opcionalmente sustituido. Grupos heteroarilo típicos según esta decimotercera realización comprenden de 5 a 15, y más típicamente de 5 a 11 átomos anulares, e incluyen uno, dos, tres o cuatro de los mismos o diferentes heteroátomos o grupos heteroatómicos seleccionados del grupo que consiste en N, NH, O, S, S(O) y S(O)<sub>2</sub>. El heteroarilo opcionalmente sustituido se puede unir a su átomo de nitrógeno en C2 a través de cualquier átomo de carbono o heteroátomo disponible, pero típicamente se une vía un átomo de carbono. Los sustituyentes opcionales pueden ser iguales o diferentes, y pueden estar unidos a cualquier átomo de carbono o heteroátomo disponible. En una realización de estos compuestos,  $R^5$  es distinto de bromo, nitro, trifluorometilo, ciano o  $-C(O)NHR$ , en el que R es hidrógeno o alquilo (C1-C6). En todavía otra realización de compuestos que incluyen un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido como el sustituyente  $R^2$ , el heteroarilo no está sustituido o está sustituido con de uno a cuatro de los mismos grupos  $R^b$  o diferentes, en el que  $R^b$  es como se define previamente para la fórmula estructural (Ia). Los ejemplos específicos de tales heteroarilos opcionalmente sustituidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes grupos heteroarilo:









en las que:

p es un número entero de uno a tres;

cada --- representa independientemente un enlace sencillo o un doble enlace;

5  $R^{35}$  es hidrógeno o  $R^8$ , en el que  $R^8$  es como se define anteriormente para la fórmula estructural (I);

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

cada Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S y NH;

cada  $Y^1$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, SO,  $SO_2$ ,  $SONR^{36}$ , NH y  $NR^{37}$ ;

cada  $Y^2$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en CH,  $CH_2$ , O, S, N, NH y  $NR^{37}$ ;

10  $R^{36}$  es hidrógeno o alquilo;

R<sup>37</sup> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y un progrupo, preferiblemente hidrógeno o un progrupo seleccionado del grupo que consiste en arilo, arilalquilo, heteroarilo, R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-O-C(O)R<sup>8</sup>, -CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-O-PO(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-O-PO(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-PO(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-O-C(O)-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(O)R<sup>8</sup>, -C(O)CF<sub>3</sub> y -C(O)-NR<sup>8</sup>-C(O)R<sup>8</sup>;

5 A se selecciona del grupo que consiste en O, NH y NR<sup>38</sup>;

R<sup>38</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquilo y arilo;

R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> se selecciona cada uno, independientemente entre sí, del grupo que consiste en alquilo, alcoxi, halógeno, haloalcoxi, aminoalquilo e hidroxialquilo, o, como alternativa, R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> y/o R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> se toman juntos para formar un cetál;

10 cada Z se selecciona del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, ariloxi, éster, carbamato y sulfonilo;

Q se selecciona del grupo que consiste en -OH, OR<sup>8</sup>, -NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>, -NHR<sup>39</sup>-C(O)R<sup>8</sup>, -NHR<sup>39</sup>-C(O)OR<sup>8</sup>, -NR<sup>39</sup>-CHR<sup>40</sup>-R<sup>b</sup>, -NR<sup>39</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>b</sup> y -NR<sup>39</sup>-C(O)-CHR<sup>40</sup>-NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>;

R<sup>39</sup> y R<sup>40</sup> se seleccionan cada uno, independientemente entre sí, del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo y NHR<sup>8</sup>; y

15 R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup> y R<sup>c</sup> son como se define previamente para la fórmula estructural (I). Sustituyentes R<sup>b</sup> preferidos para Q se seleccionan de -C(O)OR<sup>8</sup>, -O-C(O)R<sup>8</sup>, -O-P(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub> y -P(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>.

En una realización de los heteroarilos representados anteriormente, así como otros heteroarilos de 5-15 miembros según esta realización de la invención, cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en R<sup>d</sup>, -NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>, -C(O)NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>, -C(O)OR<sup>d</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR<sup>d</sup> y -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OR<sup>d</sup>, en los que m, R<sup>c</sup> y R<sup>d</sup> son como se define previamente para la fórmula estructural (I).

20

En una realización específica, R<sup>d</sup> y/o R<sup>c</sup> se seleccionan del grupo que consiste en R<sup>a</sup> y cicloalquilo (C3-C8) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos hidroxilo, amino o carboxilo.

En otra realización de los heteroarilos representados anteriormente, cada R<sup>35</sup> es un átomo de hidrógeno, una cadena carbonada de (C1-C6), incluyendo metilo, etilo, isopropilo, un grupo cicloalquilo, incluyendo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, un

25



en el que x = 1-8, -CH<sub>2</sub>CONHMe, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHMe, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONHMe, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHMe o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>.

Todavía en otra realización de los heteroarilos representados anteriormente, la conectividad del anillo aromático está en la posición 5 ó 6.

30 En una décima realización de los compuestos de fórmula estructural (Ia), R<sup>2</sup> es un fenilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, con la condición de que: (1) cuando R<sup>6</sup> y opcionalmente R<sup>5</sup> es hidrógeno, entonces R<sup>2</sup> es distinto de 3,4,5-trimetoxifenilo o 3,4,5-trialcoxifenilo (C1-C6); (3) cuando R<sup>4</sup> es 3-metoxifenilo o 3-alcoxi (C1-C6)-fenilo, y R<sup>2</sup> es un fenilo 3,4,5-trisustituido, los sustituyentes situados en las posiciones 3 y 4 no son ambos simultáneamente metoxi ni alcoxi (C1-C6); (4) cuando R<sup>2</sup> es un fenilo sustituido y R<sup>6</sup> es hidrógeno, entonces R<sup>5</sup> es distinto de ciano o -C(O)NHR, en el que R es hidrógeno o alquilo (C1-C6); y/o (5) cuando R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno independientemente un pirrol o un indol sustituido o no sustituido, entonces el pirrol o el indol se une al resto de la molécula vía un átomo de carbono anular. Como alternativa, R<sup>2</sup> está sometido a las condiciones descritas en relación con la realización primera o segunda.

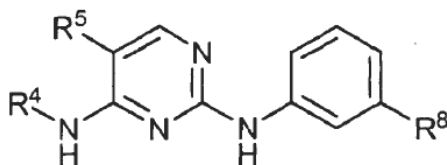
35

40 En esta décima realización de la invención, los sustituyentes R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> pueden ser iguales o diferentes. Los fenilo, arilo y/o heteroarilos opcionalmente sustituido específicos incluyen los ilustrados anteriormente en relación con la octava y novena realización.

45 En una undécima realización de los compuestos de fórmulas estructurales (I) y (Ia), incluyendo sus realizaciones primera a decimocuarta descritas anteriormente, R<sup>6</sup> es hidrógeno y R<sup>5</sup> representa un grupo como se define para la fórmula (Ia) anterior, que es un grupo electronegativo. Como reconocerán los expertos, los grupos electronegativos son átomos o grupos de átomos que tienen una tendencia relativamente grande a atraer electrones hacia ellos. Ejemplos específicos de grupos electronegativos según esta undécima realización incluyen, pero no se limitan a, -CN, -NC, -NO<sub>2</sub>, halo, bromo, cloro, fluoro, haloalquilo (C1-C3), perhaloalquilo (C1-C3), fluoroalquilo (C1-C3), perfluoroalquilo (C1-C3), -CF<sub>3</sub>, haloalcoxi (C1-C3), perhaloalcoxi (C1-C3), fluoroalcoxi (C1-C3), perfluoroalcoxi (C1-C3), -OCF<sub>3</sub>, -C(O)R<sup>a</sup>, -

C(O)OR<sup>a</sup>, -C(O)CF<sub>3</sub> y -C(O)OCF<sub>3</sub>. En una realización específica, el grupo electronegativo es un grupo electronegativo que contiene halógeno, tal como -OCF<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, bromo, cloro o flúoro. En otra realización específica, R<sup>5</sup> es flúoro.

En una duodécima realización, los compuestos de fórmula estructural (Ia) son compuestos según la fórmula estructural (Ic):



5

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

R<sup>4</sup> es como se define para la fórmula (Ia) anterior;

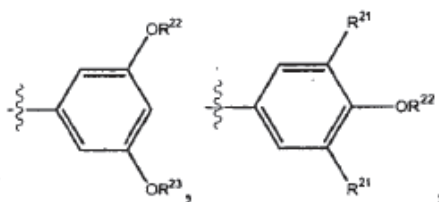
R<sup>5</sup> es F o -CF<sub>3</sub>; y

10 R<sup>8</sup> es -O(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>b</sup>, en el que *m* y R<sup>b</sup> son como se define previamente para la fórmula estructural (I). En una realización específica, R<sup>8</sup> es -O-CH<sub>2</sub>-C(O)NH-CH<sub>3</sub> y/o R<sup>4</sup> es un heteroarilo según la realización decimotercera.

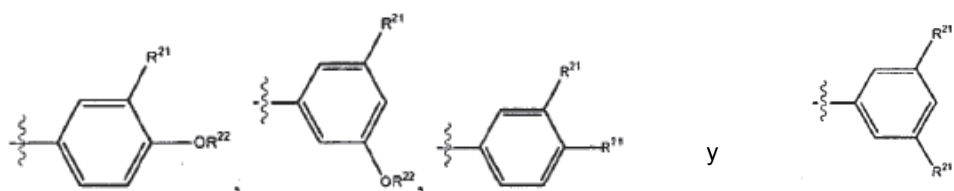
15 En una decimotercera realización, los compuestos de fórmula estructural (Ia) incluyen cualquier compuesto seleccionado de la TABLA 1 que inhibe una cascada de transducción de señales de receptores Fc, una actividad de Syk cinasa, una cascada de transducción de señales de receptores dependientes de Syk cinasa, o la desgranulación celular como se mide en un ensayo *in vitro*, opcionalmente sujeto a la condición de que el compuesto no sea un compuesto excluido por la realización descrita anteriormente. En una realización específica, tales compuestos tienen una IC<sub>50</sub> de alrededor de 20 μM o menos, según se mide en un ensayo de desgranulación *in vitro*, tal como uno de los ensayos de desgranulación descritos en la sección de Ejemplos.

20 En una decimocuarta realización, los compuestos de fórmula estructural (Ia) incluyen cualquier compuesto seleccionado de la TABLA 1 que inhibe la cascada de los receptores FcγR1 o FcεR1 con una IC<sub>50</sub> de alrededor de 20 μM o menos según se mide en un ensayo *in vitro*, tal como uno de los ensayos *in vitro* proporcionados en la sección de Ejemplos, opcionalmente sujeto a la condición de que el compuesto no sea un compuesto excluido por las realizaciones descritas anteriormente.

En una decimoquinta realización, los compuestos de fórmula estructural (Ia) son aquellos en los que R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en



25



30 R<sup>4</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup> son como se describe anteriormente, R<sup>5</sup> es un átomo de flúor; R<sup>6</sup> es un átomo de hidrógeno y cada R<sup>21</sup> son independientemente un átomo de halógeno o un alquilo opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos halo, R<sup>22</sup> y R<sup>23</sup> son cada uno, independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno, metilo o etilo opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos halo, cada *m* es independientemente un número entero de 1 a 3, y cada *n* es independientemente un número entero de 0 a 3.

En una decimosexta realización, aplicable a las realizaciones primera a decimoquinta, R<sup>5</sup> es un átomo de halógeno, tal como flúor, y R<sup>6</sup> es un átomo de hidrógeno.

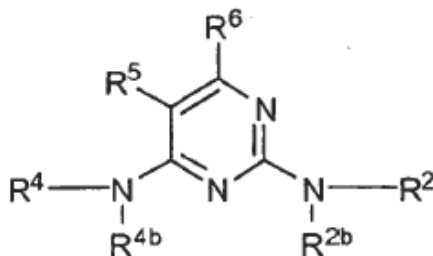
También se describen específicamente combinaciones de las realizaciones primera a decimosexta anteriores.

Los expertos en la técnica apreciarán que los compuestos de 2,4-pirimidindiamina descritos aquí pueden incluir grupos funcionales que se pueden enmascarar con progrupos para crear profármacos. Los profármacos de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina definidos en las reivindicaciones anejas no son parte de la presente invención. Tales progrupos son habitualmente, aunque no necesariamente, farmacológicamente inactivos hasta que se convierten en su forma farmacéutica activa. De hecho, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos de fórmula (Ia) descritos en la TABLA 1, más abajo, pueden incluir prorrastos que son hidrolizables o de otro modo escindibles en las condiciones de uso. Por ejemplo, los grupos éster habitualmente sufren hidrólisis catalizada por ácidos para producir el ácido carboxílico progenitor cuando se exponen a las condiciones ácidas del estómago, o la hidrólisis catalizada por bases cuando se exponen a las condiciones básicas del intestino o la sangre. De este modo, cuando se administran oralmente a un sujeto, las 2,4-pirimidindiaminas que incluyen restos de éster se pueden considerar profármacos de su ácido carboxílico correspondiente, independientemente de si la forma de éster es farmacológicamente activa. Haciendo referencia a la TABLA 1, numerosas 2,4-pirimidindiaminas que contienen éster de la invención son activas en su forma de "profármaco" de éster.

En los profármacos descritos aquí, cualquier resto funcional disponible puede estar enmascarado con un progrupo para producir un profármaco. Los grupos funcionales en los compuestos de 2,4-pirimidindiamina que se pueden enmascarar con progrupos para inclusión en un prorrasto incluyen, pero no se limitan a, aminas (primarias y secundarias), hidroxilos, sulfanilos (tioles), carboxilos, etc. En la técnica se conoce una miríada de progrupos adecuados para enmascarar tales grupos funcionales para producir prorrastos que son escindibles en las condiciones de uso deseadas. Todos estos progrupos, solos o en combinaciones, pueden estar incluidos en los profármacos descritos aquí.

En una realización ilustrativa, los profármacos descritos aquí son compuestos según la fórmula estructural (Ia) en la que  $R^c$  y  $R^d$  pueden ser, además de sus alternativas definidas previamente, un progrupo.

La sustitución de los hidrógenos unidos a N2 y N4 en las 2,4-pirimidindiaminas de fórmula estructural (Ia) por sustituyentes afecta adversamente a la actividad de los compuestos. Sin embargo, como apreciarán los expertos, estos nitrógenos se pueden incluir en prorrastos que, en condiciones de uso, se escinden para producir 2,4-pirimidindiaminas según la fórmula estructural (Ia). De este modo, los profármacos incluyen compuestos según la fórmula estructural (II):



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

$R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son como se define previamente para la fórmula estructural (Ia); y

$R^{2b}$  y  $R^{4b}$  son cada uno, independientemente entre sí, un progrupo. Ejemplos específicos de tales progrupos incluyen, pero no se limitan a, alquilo (C1-C6),  $-C(O)CH_3$ ,  $-C(O)NHR^{36}$  y  $-S(O)_2R^{36}$ , en los que  $R^{36}$  es alquilo (C1-C6), arilo (C5-C15) y cicloalquilo (C3-C8).

En los profármacos de fórmula estructural (II), los diversos sustituyentes pueden ser como se describe para las diversas realizaciones primera a decimoquinta previamente descritas para los compuestos de fórmula estructural (Ia), o combinaciones de tales realizaciones.

Los expertos en la técnica apreciarán que muchos de los compuestos de la invención y sus profármacos, así como las diversas especies de compuestos descritas y/o ilustradas específicamente aquí, pueden mostrar el fenómeno de tautomería, isomería conformacional, isomería geométrica y/o isomería óptica. Por ejemplo, los compuestos de la invención y sus profármacos pueden incluir uno o más centros quirales y/o dobles enlaces, y, como consecuencia, pueden existir como estereoisómeros, tales como isómeros de dobles enlaces (es decir, isómeros geométricos), enantiómeros y diastereómeros y sus mezclas, tales como mezclas racémicas. Como otro ejemplo, los compuestos y profármacos de la invención pueden existir en varias formas tautómeras, incluyendo la forma enólica, la forma ceto y sus mezclas. Puesto que los diversos nombres, fórmulas y dibujos de los compuestos en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones sólo pueden representar una de las posibles formas tautómeras, de isómero conformacional, de isómero óptico o de isómero geométrico, se debería entender que la invención engloba cualquiera de las formas tautómera, de isómero conformacional, de isómero óptico y/o de isómero geométrico de los compuestos o profármacos que tienen una o más de las utilidades descritas aquí, así como mezclas de estas diversas formas isómeras diferentes. En casos de rotación limitada alrededor de la estructura central de 2,4-pirimidindiamina, también son posibles atropisómeros, y también se incluyen específicamente en los compuestos de la invención.

Además, los expertos apreciarán que cuando listas de sustituyentes alternativos incluyen miembros que, dado los requisitos de valencia u otras razones, no se pueden usar para sustituir un grupo particular, la lista está destinada a ser leída en el contexto de que incluya aquellos miembros de la lista que sean adecuados para sustituir el grupo particular. Por ejemplo, los expertos apreciarán que aunque se pueden usar todas las alternativas enumeradas para R<sup>b</sup> para sustituir un grupo alquilo, algunas alternativas, tales como =O, no se pueden usar para sustituir un grupo fenilo. Se entenderá que sólo se proponen combinaciones posibles de los pares de grupos sustituyentes.

Los compuestos de la invención y/o sus profármacos se pueden identificar mediante su estructura química o su nombre químico. Cuando la estructura química y el nombre químico entran en conflicto, la estructura química es determinante de la identidad del compuesto específico.

Dependiendo de la naturaleza de los diversos sustituyentes, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención y sus profármacos pueden estar en forma de sales. Tales sales incluyen sales adecuadas para usos farmacéuticos (“sales farmacéuticamente aceptables”), sales adecuadas para usos veterinarios, etc. Tales sales pueden derivar de ácidos o bases, como es bien conocido en la técnica.

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

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

Los compuestos y profármacos de 2,4-pirimidindiamina de la invención, así como sus sales, también pueden estar en forma de hidratos, solvatos y N-óxidos, como son bien conocidos en la técnica.

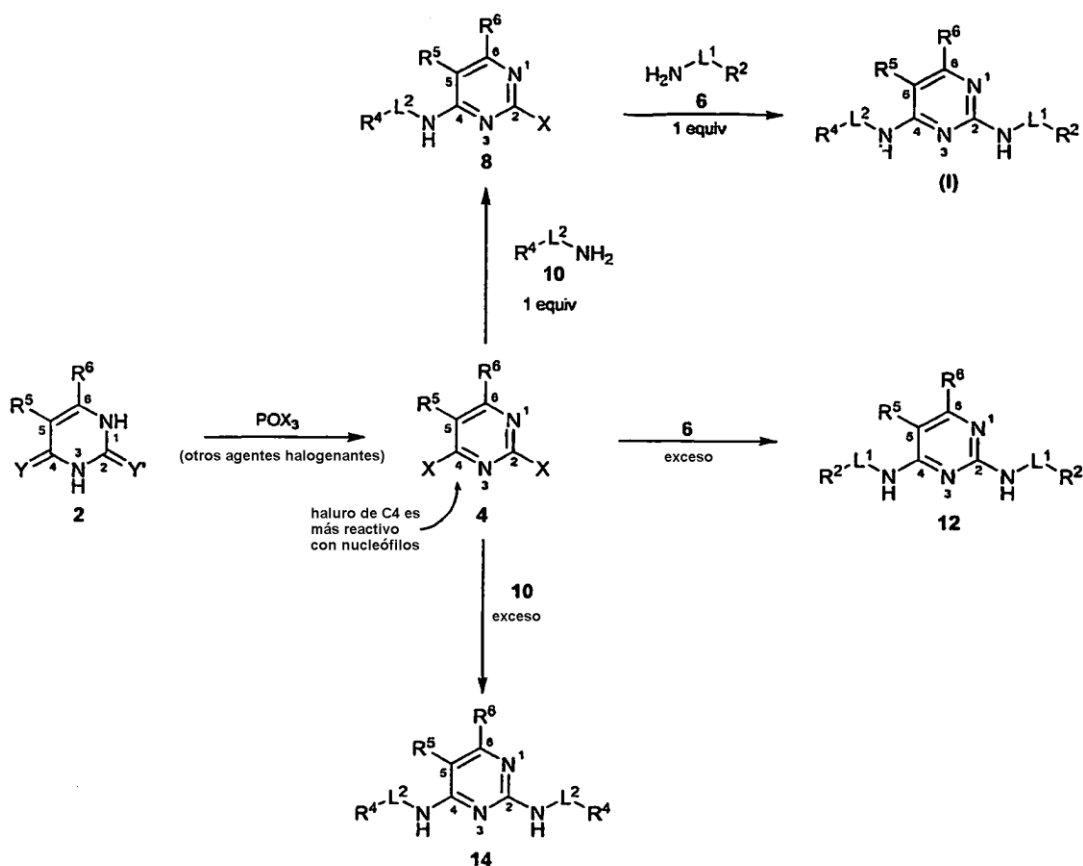
### 6.3 Métodos de Síntesis

Los compuestos de la invención y sus profármacos se pueden sintetizar vía una variedad de rutas sintéticas diferentes usando materiales de partida comercialmente disponibles y/o materiales de partida preparados por métodos sintéticos convencionales. Los métodos ejemplares adecuados que se pueden adaptar habitualmente para sintetizar los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención y sus profármacos se encuentran en la patente U.S. nº 5.958.935. En la sección de Ejemplos se proporcionan ejemplos específicos que describen la síntesis de numerosos compuestos de la invención y sus profármacos, así como intermedios para ellos. Todos los compuestos de fórmula estructural (Ia) y (II) se pueden preparar mediante adaptación normal de estos métodos.

En los Esquemas (I)-(XI), a continuación, se describe una variedad de rutas sintéticas ejemplares que se pueden usar para sintetizar los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención. En los Esquemas (I)-(XI), compuestos con números similares tienen estructuras similares. Estos métodos se pueden adaptar de forma normal para sintetizar los profármacos según la fórmula estructural (II).

En una realización ejemplar, los compuestos se pueden sintetizar a partir de uracilos o tiouracilos sustituidos o no sustituidos como se ilustra en el Esquema (I), a continuación:

Esquema (I)



En el Esquema (I), R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> son como se define previamente para la fórmula estructural (Ia), X es halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I) e Y e Y' se seleccionan cada uno, independientemente entre sí, del grupo que consiste en O y S. Haciendo referencia al Esquema (I), el uracilo o tiouracilo 2 se dihalogena en las posiciones 2 y 4 usando un agente halogenante estándar POX<sub>3</sub> (u otro agente halogenante estándar) en condiciones estándar para producir la 2,4-bishalopirimidina 4. Dependiendo del sustituyente R<sup>5</sup>, en la pirimidina 4, el haluro en la posición C4 es más reactivo con nucleófilos que el haluro en la posición C2. Esta reactividad diferencial se puede explotar para sintetizar 2,4-pirimidindiaminas según la fórmula estructural (Ia) haciendo reaccionar en primer lugar la 2,4-bishalopirimidina 4 con un equivalente de amina 10, produciendo la 4N-sustituida-2-halo-4-pirimidinamina 8, seguido de la amina 6 para producir una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (I). Las 2N,4N-bis(sustituidas)-2,4-pirimidindiaminas 12 y 14 se pueden obtener haciendo reaccionar la 2,4-bishalopirimidina 4 con 6 ó 10 en exceso, respectivamente.

En la mayoría de las situaciones, el haluro de C4 es más reactivo con nucleófilos, como se ilustra en el Esquema. Sin embargo, como reconocerán los expertos, la identidad del sustituyente R<sup>5</sup> puede alterar esta reactividad. Por ejemplo, cuando R<sup>5</sup> es trifluorometilo, se obtiene una mezcla 50:50 de 4N-sustituida-4-pirimidinamina 8 y la 2N-sustituida-2-pirimidinamina correspondiente. Independientemente de la identidad del sustituyente R<sup>5</sup>, la regioselectividad de la reacción se puede controlar ajustando el disolvente y otras condiciones sintéticas (tales como la temperatura), como es bien conocido en la técnica.

Las reacciones representadas en el Esquema (I) pueden transcurrir más rápidamente cuando las mezclas de reacción se calientan vía microondas. Cuando se calienta de esta manera, se pueden usar las siguientes condiciones: calentamiento hasta 175°C en etanol durante 5-20 min. en un reactor Smith (Personal Chemistry) en un tubo cerrado herméticamente (a una presión de 20 bares).

Los materiales de partida de uracilo o tiouracilo 2 se pueden adquirir de fuentes comerciales, o se pueden preparar usando técnicas estándar de química orgánica. Los uracilos y tiouracilos comercialmente disponibles que se pueden usar como materiales de partida en el Esquema (I) incluyen, a título de ejemplo y no de limitación, uracilo (Aldrich #13,078-8; Registro CAS 66-22-8); 2-tio-uracilo (Aldrich #11,558-4; Registro CAS 141-90-2); 2,4-ditiouracilo (Aldrich #15,846-1; Registro CAS 2001-93-6); 5-acetouracilo (Chem. Sources Int'12000; Registro CAS 6214-65-9); 5-azidouracilo; 5-aminouracilo (Aldrich #85,528-6; Registro CAS 932-52-5); 5-bromouracilo (Aldrich #85,247-3; Registro CAS 51-20-7); 5-(trans-2-bromovinil)-uracilo (Aldrich #45,744-2; Registro CAS 69304-49-0); 5-(trans-2-clorovinil)-uracilo (Registro CAS 81751-48-2); 5-(trans-2-carboxivinil)-uracilo; ácido uracil-5-carboxílico (hidrato del ácido 2,4-



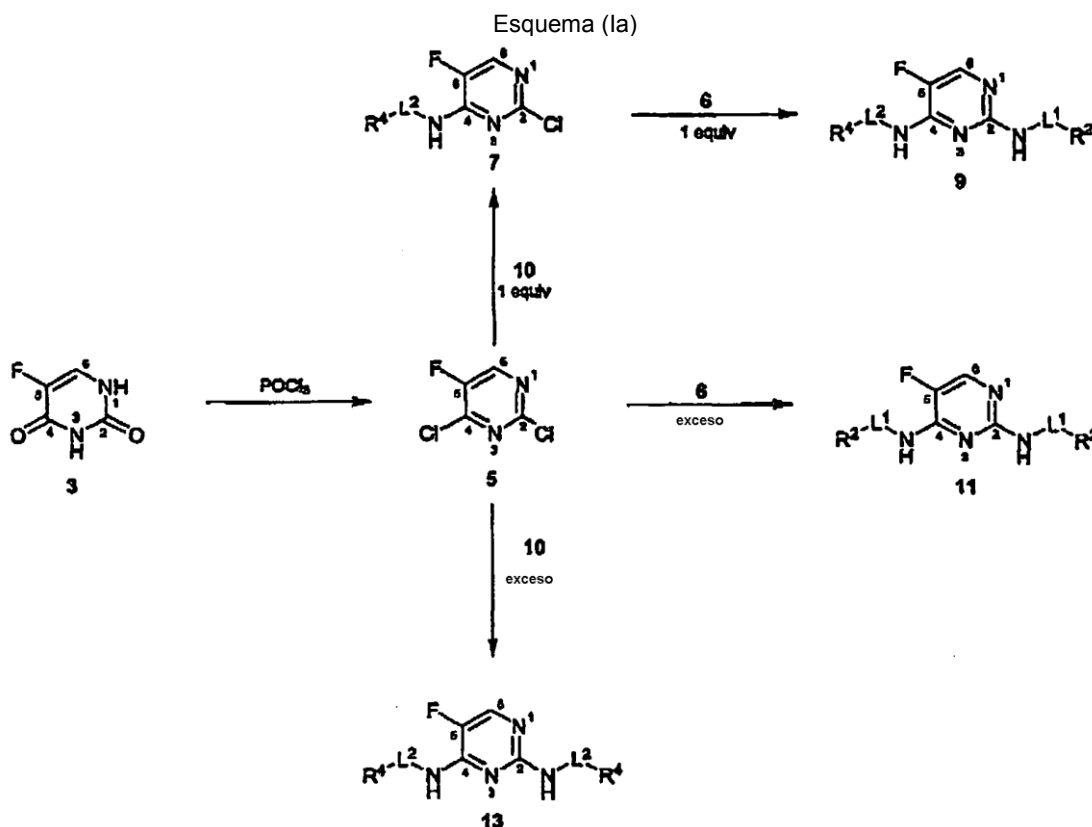
dihidroxipirimidin-5-carboxílico; Aldrich #27,770-3; Registro CAS 23945-44-0); 5-clorouracilo (Aldrich #22,458-8; Registro CAS 1820-81-1); 5-cianouracilo (Chem. Sources Int'12000; Registro CAS 4425-56-3); 5-etiluracilo (Aldrich #23,044-8; Registro CAS 4212-49-1); 5-eteniluracilo (Registro CAS 37107-81-6); 5-fluorouracilo (Aldrich #85,847-1; Registro CAS 51-21-8); 5-yodouracilo (Aldrich #85,785-8; Registro CAS 696-07-1); 5-metiluracilo (timina; Aldrich #13,199-7; Registro CAS 65-71-4); 5-nitouracilo (Aldrich #85,276-7; Registro CAS 611-08-5); ácido uracil-5-sulfámico (Chem. Sources Int'12000; Registro CAS 5435-16-5); 5-(trifluorometil)-uracilo (Aldrich #22,327-1; Registro CAS 54-20-6); 5-(2,2,2-trifluoroetil)-uracilo (Registro CAS 155143-31-6); 5-(pentafluoroetil)-uracilo (Registro CAS 60007-38-3); 6-aminouracilo (Aldrich #A5060-6; Registro CAS 873-83-6); ácido uracil-6-carboxílico (ácido orótico; Aldrich #0-840-2; Registro CAS 50887-69-9); 6-metiluracilo (Aldrich #D11,520-7; Registro CAS 626-48-2); ácido uracil-5-amino-6-carboxílico (ácido 5-aminoorótico; Aldrich #19,121-3; Registro CAS #7164-43-4); 6-amino-5-nitrosouracilo (6-amino-2,4-dihidroxi-5-nitrosopirimidina; Aldrich #27,689-8; Registro CAS 5442-24-0); ácido uracil-5-fluoro-6-carboxílico (ácido 5-fluoroorótico; Aldrich #42,513-3; Registro CAS 00000-00-0); y ácido uracil-5-nitro-6-carboxílico (ácido 5-nitroorótico; Aldrich #18,528-0; Registro CAS 600779-49-9). Uracilos y/o tiouracilos sustituidos en 5, en 6 y 5,6-sustituidos adicionales están disponibles en General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA ([www.generalintermediates.com](http://www.generalintermediates.com)) y/o Interchim, Francia ([www.interchim.com](http://www.interchim.com)), o se pueden preparar usando técnicas estándar. Más abajo se proporciona una miríada de referencias de libros de texto que enseñan métodos sintéticos adecuados.

Las aminas 6 y 10 se pueden adquirir de fuentes comerciales, o, como alternativa, se pueden sintetizar utilizando técnicas estándar. Por ejemplo, las aminas adecuadas se pueden sintetizar a partir de nitroprecusores usando química estándar. En la sección de Ejemplos se proporcionan reacciones ejemplares específicas. Véase también Vogel, 1989, Practical Organic Chemistry, Addison Wesley Longman, Ltd. y John Wiley & Sons, Inc.

Los expertos reconocerán que, en algunos casos, las aminas 6 y 10 y/o los sustituyentes R<sup>5</sup> y/o R<sup>6</sup> en el uracilo o tiouracilo 2 pueden incluir grupos funcionales que requieran protección durante la síntesis. La identidad exacta de cualquier o cualquiera de los grupos protectores usados dependerá de la identidad del grupo funcional a proteger, y será manifiesta para los expertos en la técnica. Por ejemplo, en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., New York (1999), y las referencias citadas allí (en lo sucesivo "Greene y Wuts"), se puede encontrar una guía para seleccionar grupos protectores adecuados, así como estrategias sintéticas para su unión y eliminación.

En el Esquema (Ia), a continuación, se ilustra una realización específica del Esquema (I) que utiliza 5-fluorouracilo (Aldrich #32,937-1) como material de partida:

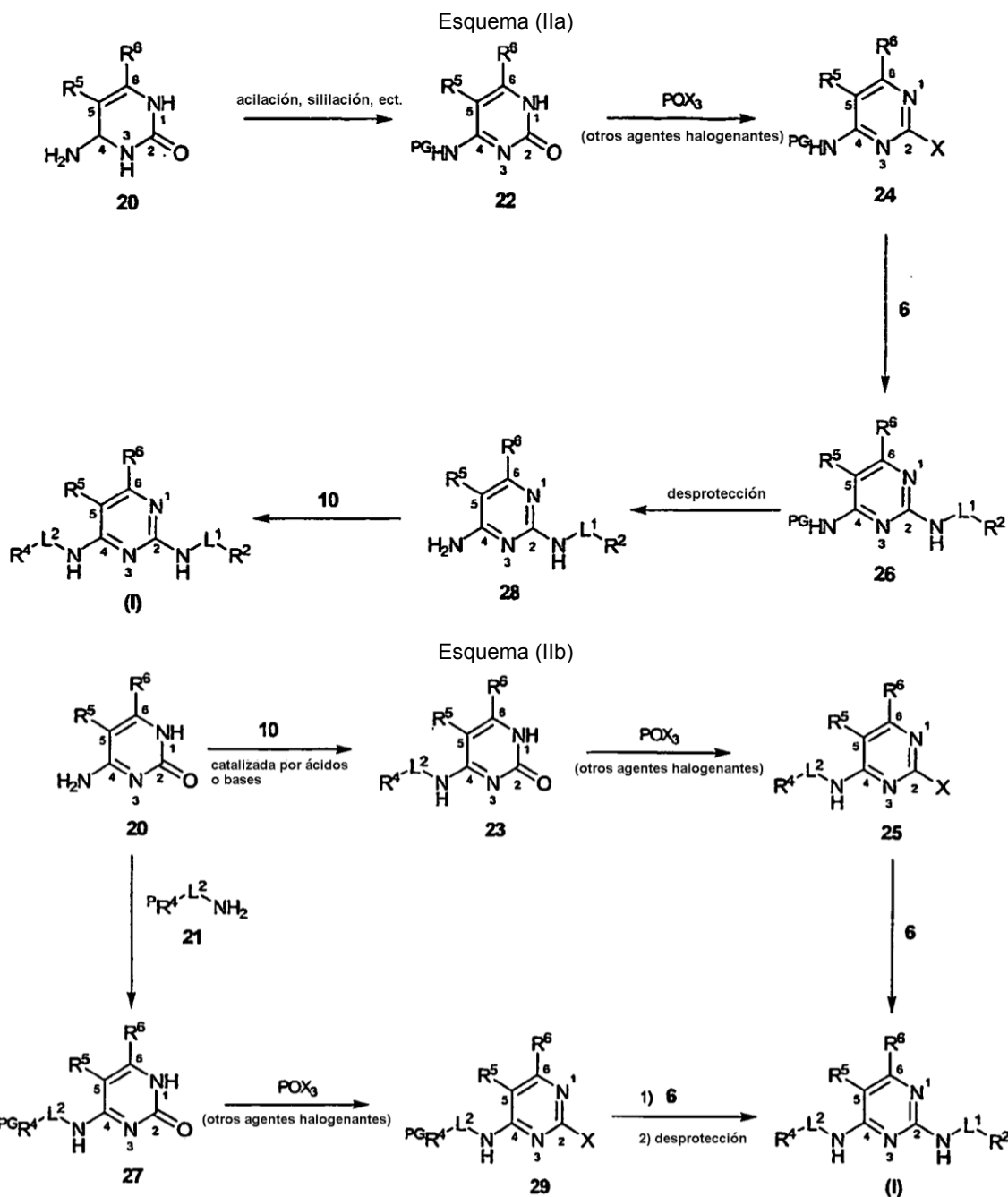
30



En el Esquema (Ia), R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> son como se define previamente para el Esquema (I). Según el Esquema (Ia), el 5-fluorouracilo 3 se halogena con POCl<sub>3</sub> para producir 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina 5, que entonces se hace reaccionar

con amina 6 ó 10 en exceso para producir N2,N4-bis-sustituida-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina 11 ó 13, respectivamente. Como alternativa, la 2N,4N-disustituida-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina 9 asimétrica se puede obtener haciendo reaccionar 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina 5 con un equivalente de amina 10 (para producir 2-chloro-N4-sustituida-5-fluoro-4-pirimidinamina 7) seguido de uno o más equivalentes de amina 6.

5 En otra realización ejemplar, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención se pueden sintetizar a partir de citosinas sustituidas o no sustituidas como se ilustra en los Esquemas (IIa) y (IIb), a continuación:



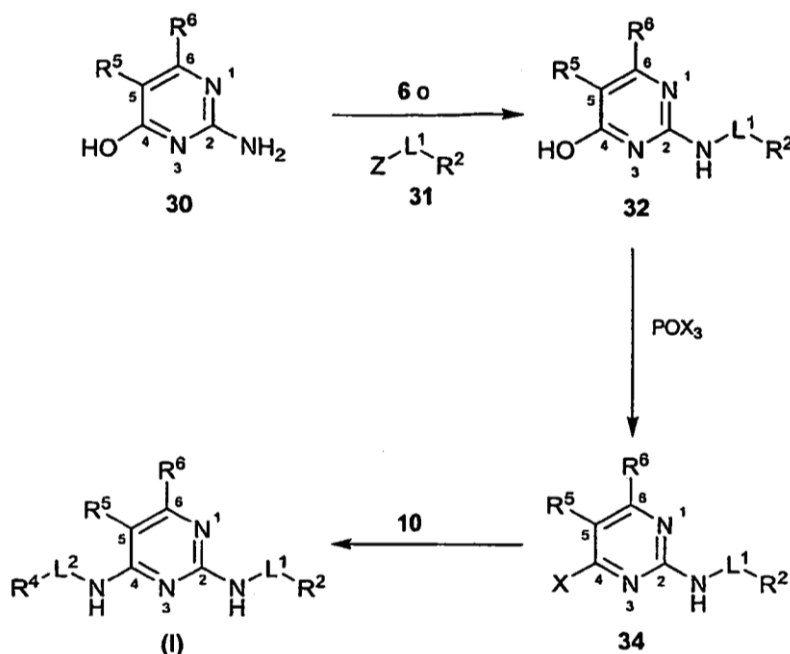
10 En los Esquemas (IIa) y (IIb), R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y X son como se define previamente para el Esquema (I), y PG representa un grupo protector. Haciendo referencia al Esquema (IIa), la amina exocíclica en C<sub>4</sub> de la citosina 20 se protege en primer lugar con un grupo protector PG adecuado, para producir la citosina N4-protegida 22. Para una guía específica con respecto a grupos protectores útiles en este contexto, véase Vorbrüggen y Ruh-Pohlentz, 2001, Handbook of Nucleoside Synthesis, John Wiley & Sons, NY, p. 1-631 ("Vorbrüggen"). La citosina protegida 22 se halogena en la posición C2 usando un reactivo de halogenación estándar para producir 2-cloro-N4-protegida-4-pirimidinamina 24. La reacción con la amina 6, seguido de la desprotección de la amina exocíclica en C4 y la reacción con la amina 10 produce una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (Ia).

Como alternativa, haciendo referencia al Esquema (IIb), la citosina **20** se puede hacer reaccionar con la amina **10** o con la amina protegida **21** para producir la citosina N4-sustituida **23** ó **27**, respectivamente. Estas citosinas sustituidas se pueden halogenar entonces como se describe previamente, se pueden desproteger (en el caso de la citosina N4-sustituida **27**) y se pueden hacer reaccionar con la amina **6** para producir una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural **(Ia)**.

Las citosinas comercialmente disponibles que se pueden usar como materiales de partida en los Esquemas (IIa) y (IIb) incluyen, pero no se limitan a, citosina (Aldrich #14,201-8; Registro CAS 71-30-7); N<sup>4</sup>-acetilcitosina (Aldrich #37,791-0; Registro CAS 14631-20-0); 5-fluorocitosina (Aldrich #27,159-4; Registro CAS 2022-85-7); y 5-(trifluorometil)-citosina. Otras citosinas adecuadas, útiles como materiales de partida en los Esquemas (IIa), están disponibles en General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA ([www.generalintermediates.com](http://www.generalintermediates.com)) y/o Interchim, Francia ([www.interchim.com](http://www.interchim.com)), o se pueden preparar usando técnicas estándar. Más abajo se proporciona una miríada de referencias de libros de texto que enseñan métodos sintéticos adecuados.

Todavía en otra realización ejemplar, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención se pueden sintetizar a partir de 2-amino-4-pirimidinoles sustituidos o no sustituidos como se ilustra en el Esquema (III), a continuación:

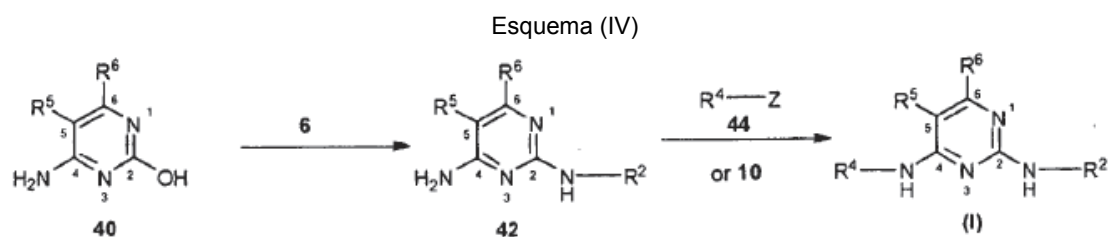
Esquema (III)



En el Esquema (III), R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y X son como se define previamente para el Esquema (I), y Z es un grupo saliente como se explica con más detalle en relación con el Esquema IV, más abajo. Haciendo referencia al Esquema (III), se hace reaccionar 2-amino-4-pirimidinol **30** con una amina **6** (o una amina opcionalmente protegida **21**) para producir N2-sustituido-4-pirimidinol **32**, que entonces se halogena como se describe previamente para producir N2-sustituida-4-halo-2-pirimidinamina **34**. La desprotección opcional (por ejemplo, si se usó la amina protegida **21** en la primera etapa), seguido de la reacción con la amina **10**, da una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural **(Ia)**. Como alternativa, el pirimidinol **30** se puede hacer reaccionar con un agente acilante **31**.

Los 2-amino-4-pirimidinoles **30** comercialmente disponibles adecuados que se pueden usar como materiales de partida en el Esquema (III), incluyen, pero no se limitan a, hidrato de 2-amino-6-cloro-4-pirimidinol (Aldrich #A4702-8; Registro CAS 00000-00-0) y 2-amino-6-hidroxi-4-pirimidinol (Aldrich #A5040-1; Registro CAS 56-09-7). Otros 2-amino-4-pirimidinoles **30** útiles como materiales de partida en el Esquema (III) están disponibles en General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA ([www.generalintermediates.com](http://www.generalintermediates.com)) y/o Interchim, Francia ([www.interchim.com](http://www.interchim.com)), o se pueden preparar usando técnicas estándar. Más abajo se proporciona una miríada de referencias de libros de texto que enseñan métodos sintéticos adecuados.

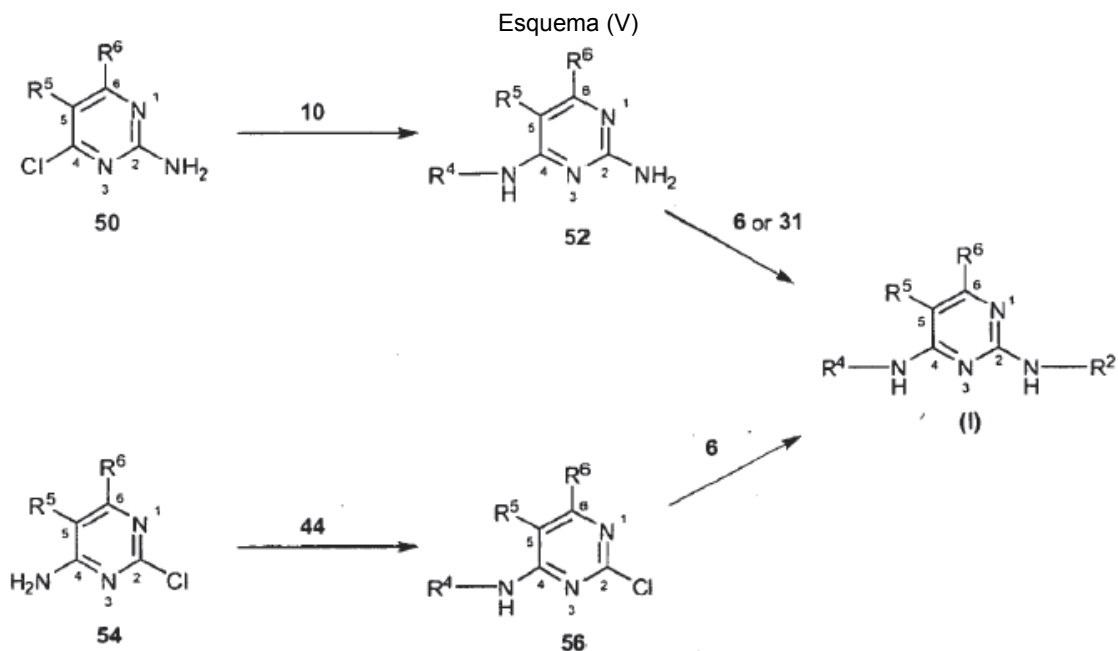
Como alternativa, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención se pueden preparar a partir de 4-amino-2-pirimidinoles sustituidos o no sustituidos como se ilustra en el Esquema (IV), más abajo:



En el Esquema (IV),  $R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  son como se define previamente para el Esquema (I), y Z representa un grupo saliente. Haciendo referencia al Esquema (IV), el hidroxilo en C2 del 4-amino-2-pirimidinol **40** es más reactivo con nucleófilos que el amino en C4, de forma que la reacción con la amina **6** produce N2-sustituida-2,4-pirimidindiamina **42**. La reacción subsiguiente con el compuesto **44**, que incluye un buen grupo saliente Z, o con la amina **10** produce una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (I). El compuesto **44** puede incluir virtualmente cualquier grupo saliente que se pueda sustituir por el amino en C4 de la N2-sustituida-2,4-pirimidindiamina **42**. Los grupos salientes Z adecuados incluyen, pero no se limita a, halógenos, metanosulfoniloxi (mesiloxi, "OMs"), trifluorometanosulfoniloxi ("OTf"), y *p*-toluenosulfoniloxi (tosiloxi; "OTs"), bencenosulfoniloxi ("besilato") y metanitrobenenosulfoniloxi ("nosilato"). Otros grupos salientes adecuados serán manifiestos para los expertos en la técnica.

Los materiales de partida de 4-amino-2-pirimidinol sustituido se pueden obtener comercialmente, o se pueden sintetizar usando técnicas estándar. *Más abajo* se proporciona una miríada de referencia de libros de texto que enseñan métodos sintéticos adecuados.

Todavía en otra realización ejemplar, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención se pueden preparar a partir de 2-cloro-4-aminopiridinas o 2-amino-4-cloropiridinas como se ilustra en el Esquema (V), a continuación:

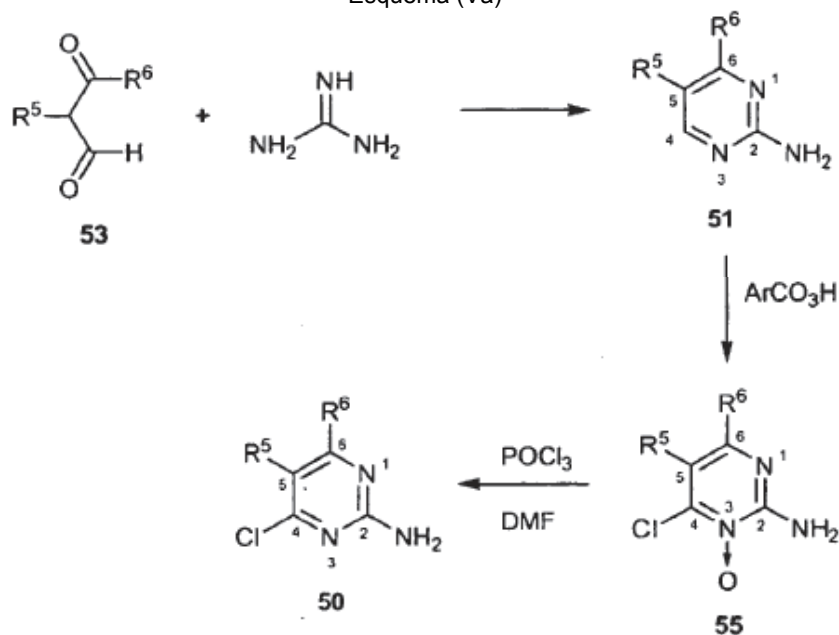


En el Esquema (V),  $R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y X son como se define para el Esquema (I), y Z es como se define para el Esquema (IV). Haciendo referencia al Esquema (V), la 2-amino-4-cloropiridina **50** se hace reaccionar con la amina **10** para producir 4N-sustituida-2-pirimidinamina **52** que, tras la reacción con el compuesto **31** o con la amina **6**, produce una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (I). Como alternativa, la 2-cloro-4-aminopiridina **54** se puede hacer reaccionar con el compuesto **44** seguido de la amina **6** para producir un compuesto según la fórmula estructural (I).

Hay comercialmente una variedad de pirimidinas **50** y **54**, adecuadas para uso como materiales de partida en el Esquema (V), incluyendo, a título de ejemplo y no de limitación, 2-amino-4,6-dicloropiridina (Aldrich #A4860-1; Registro CAS 56-05-3); 2-amino-4-cloro-6-metoxi-pirimidina (Aldrich #51,864-6; Registro CAS 5734-64-5); 2-amino-4-cloro-6-metilpirimidina (Aldrich #12,288-2; Registro CAS 5600-21-5); y 2-amino-4-cloro-6-metilpirimidina (Aldrich #A4600-5; Registro CAS 1005-38-5). Materiales de partida de pirimidina adicionales están disponibles en General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA ([www.generalintermediates.com](http://www.generalintermediates.com)) y/o Interchim, Francia ([www.interchim.com](http://www.interchim.com)), o se pueden preparar usando técnicas estándar. *Más abajo* se proporciona una miríada de referencias de libros de texto que enseñan métodos sintéticos adecuados.

Como alternativa, las 4-cloro-2-pirimidinaminas **50** se pueden preparar como se ilustra en el Esquema (Va):

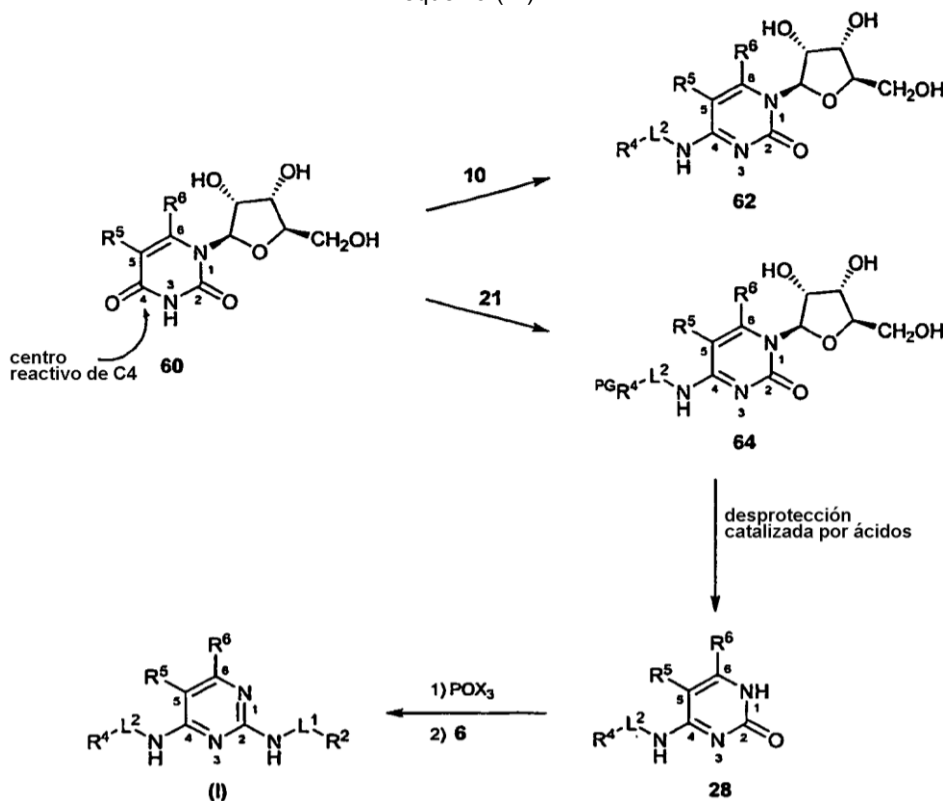
Esquema (Va)



5 En el Esquema (Va),  $\text{R}^5$  y  $\text{R}^6$  son como se define previamente para la fórmula estructural (Ia). En el Esquema (Va), el dicarbonilo **53** se hace reaccionar con guanidina para producir 2-pirimidinamina **51**. La reacción con perácidos como ácido m-cloroperbenzoico, ácido trifluoroperacético o complejo de urea-peróxido de hidrógeno produce el N-óxido **55**, que entonces se halogena para dar 4-cloro-2-pirimidinamina **50**. Las 4-halo-2-pirimidinaminas correspondientes se pueden obtener usando reactivos de halogenación adecuados.

10 Todavía en otra realización ejemplar, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención se pueden preparar a partir de uridinas sustituidas o no sustituidas como se ilustra en el Esquema (VI), a continuación:

Esquema (VI)

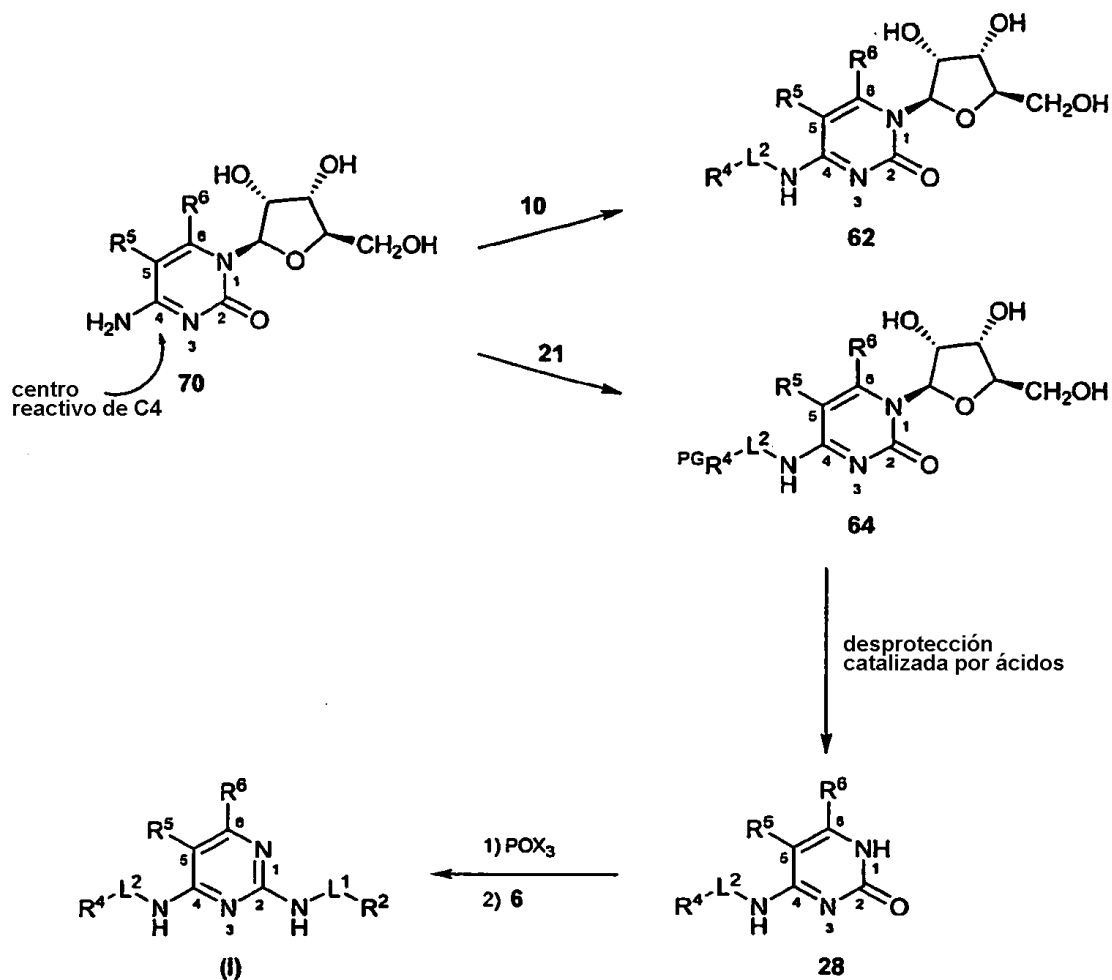


En el Esquema (VI),  $R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y X son como se define previamente para el Esquema (I), y el superíndice PG representa un grupo protector, como se explica en relación con el Esquema (IIb). Según el Esquema (VI), la uridina **60** tiene un centro reactivo en C4, de forma que la reacción con la amina **10** o la amina protegida **21** produce citidina N4-sustituida **62** ó **64**, respectivamente. La desprotección catalizada por ácidos de **62** ó **64** N4-sustituida (cuando "PG" representa un grupo protector lábil a ácidos) produce la citosina N4-sustituida **28**, que se puede halogenar subsiguientemente en la posición C2 y se puede hacer reaccionar con la amina **6** para producir una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (**Ia**).

Las citidinas también se pueden usar como materiales de partida de una manera análoga, como se ilustra en el Esquema (VII), a continuación:

10

Esquema (VII)



15

En el Esquema (VII),  $R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y X son como se define previamente en el Esquema (I), y el superíndice PG representa un grupo protector como se explica anteriormente. Haciendo referencia al Esquema (VII), al igual que la uridina **60**, la citidina **70** tiene un centro reactivo en C4, de forma que la reacción con la amina **10** o la amina protegida **21** produce la citidina N4-sustituida **62** ó **64**, respectivamente. Estas citidinas **62** y **64** se tratan entonces como se describe previamente para el Esquema (VI) para producir una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (**Ia**).

Aunque los Esquemas (VI) y (VII) se ejemplifican con ribosilnucleósidos, los expertos apreciarán que también funcionarán los 2'-desoxirribo- y 2',3'-didesoxirribonucleósidos correspondientes, así como nucleósidos que incluyen azúcares o análogos de azúcares distintos de la ribosa.

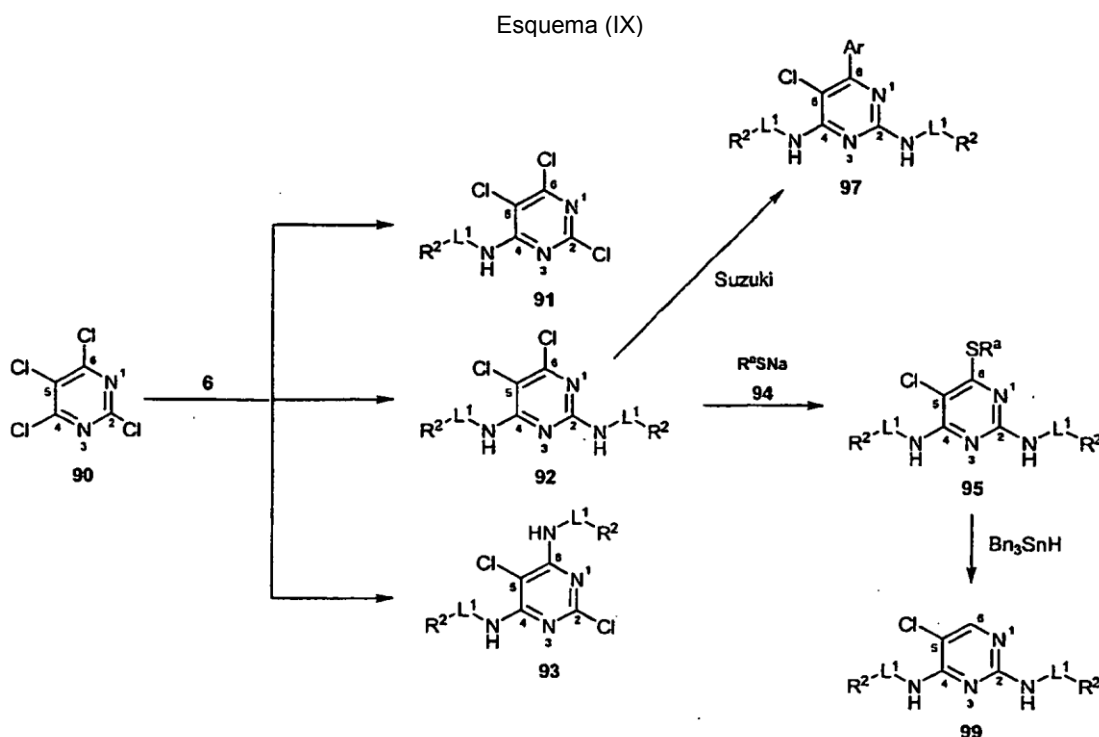
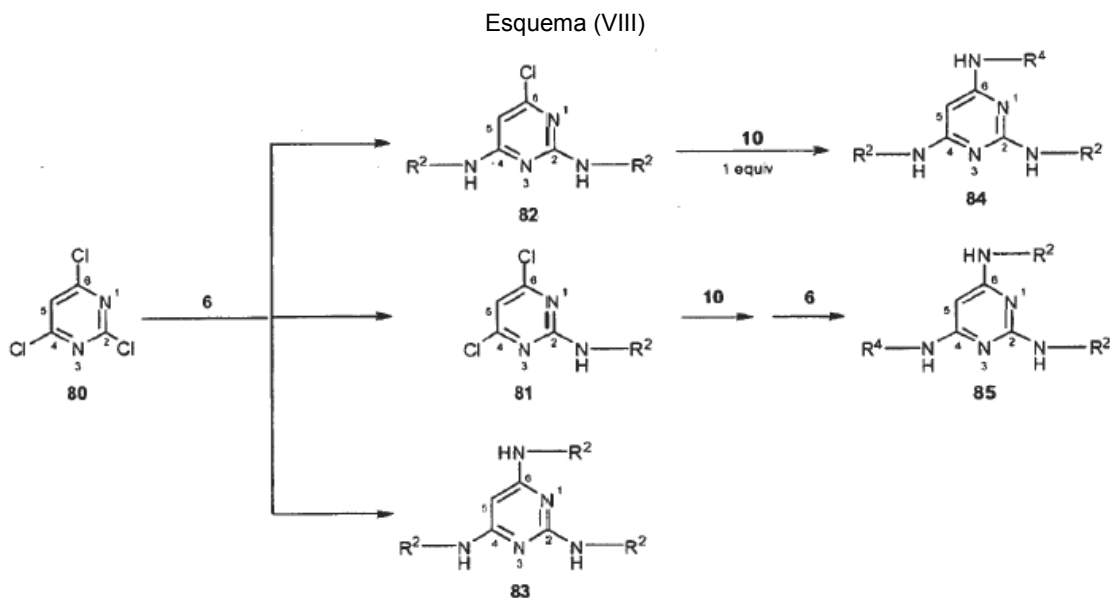
20

En la técnica se conocen numerosas uridinas y citidinas útiles como materiales de partida en los Esquemas (VI) y (VII), e incluyen, a título de ejemplo y no de limitación, 5-trifluorometil-2'-desoxicitidina (Chem. Sources #ABCR F07669; Registro CAS 66,384-66-5); 5-bromouridina (Chem. Sources Int'l 2000; Registro CAS 957-75-5); 5-yodo-2'-desoxiuridina (Aldrich #1-775-6; Registro CAS 54-42-2); 5-fluorouridina (Aldrich #32,937-1; Registro CAS 316-46-1); 5-yodomidina (Aldrich #85,259-7; Registro CAS 1024-99-3); 5-(trifluorometil)uridina (Chem Sources Int'l 2000; Registro CAS 70-00-8), 5-trifluorometil-2'-desoxiuridina (Chem. Sources Int'l 2000; Registro CAS 70-00-8). Las uridinas y citidinas adicionales que se pueden usar como materiales de partida en los Esquemas (VI) y (VII) están disponibles en General Intermediates of

25

Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA ([www.generalintermediates.com](http://www.generalintermediates.com)) y/o Interchim, Francia ([www.interchim.com](http://www.interchim.com)), o se pueden preparar usando técnicas estándar. Más abajo se proporciona una miríada de referencias de libros de texto que enseñan métodos sintéticos adecuados.

5 Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención también se pueden sintetizar a partir de pirimidinas sustituidas, tales como pirimidinas clorosustituidas, como se ilustra en los Esquemas (VIII) y (IX), más abajo:



10 En los Esquemas (VIII) y (IX), R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>a</sup> son como se define previamente para la fórmula estructural (I), y "Ar" representa un grupo arilo. Haciendo referencia al Esquema (VIII), la reacción de 2,4,6-tricloropirimidina 80 (Aldrich #T5,620-0; CAS#3764-01-0) con la amina 6 produce una mezcla de tres compuestos: pirimidin-mono-, di- y triaminas sustituidas 81, 82 y 83, que se pueden separar y aislar usando HPLC u otras técnicas convencionales. Las mono- y diaminas 81 y 82 se pueden hacer reaccionar adicionalmente con las aminas 6 y/o 10 para producir N<sup>2</sup>,N<sup>4</sup>,N<sup>6</sup>-trisustituidas-2,4,6-pirimidinotriaminas 84 y 85, respectivamente.

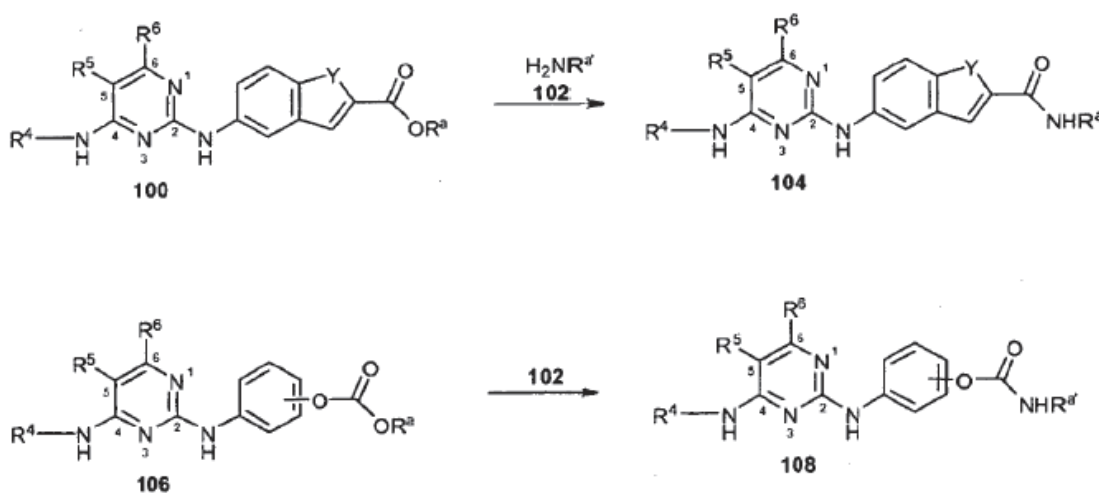
15

Las N<sup>2</sup>,N<sup>4</sup>-bis-sustituidas-2,4-pirimidindiaminas se pueden preparar de manera análoga al Esquema (VIII) empleando como materiales de partida 2,4-dicloro-5-metilpirimidina o 2,4-dicloro-pirimidina. En este caso, no se obtiene la

pirimidinamina monosustituída que corresponde al compuesto **81**. En su lugar, la reacción transcurre para producir directamente la N2,N4-bis-sustituída-2,4-pirimidindiamina.

- 5 Haciendo referencia al Esquema (IX), se hace reaccionar 2,4,5,6-tetracloropirimidina **90** (Aldrich #24,671-9; CAS#1780-40-1) con amina **6** en exceso para producir una mezcla de tres compuestos: **91**, **92**, y **93**, que se pueden separar y aislar usando HPLC u otras técnicas convencionales. Como se ilustra, la N2,N4-bis-sustituída-5,6-dicloro-2,4-pirimidindiamina **92** se puede hacer reaccionar entonces en el haluro de C6 con, por ejemplo, un agente nucleófilo **94** para producir el compuesto **95**. Como alternativa, el compuesto **92** se puede convertir en la N2,N4-bis-sustituída-5-cloro-6-aril-2,4-pirimidindiamina **97** *vía* una reacción de Suzuki. La 2,4-pirimidindiamina **95** se puede convertir en la 2,4-pirimidindiamina **99** mediante reacción con  $\text{Bn}_3\text{SnH}$ .
- 10 Como reconocerán los expertos, las 2,4-pirimidindiaminas según la invención, sintetizadas *vía* los métodos ejemplares descritos anteriormente o por otros medios bien conocidos, también se pueden utilizar como materiales de partida y/o intermedios para sintetizar compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención adicionales. En el Esquema (X), a continuación, se ilustra un ejemplo específico:

Esquema (X)



15

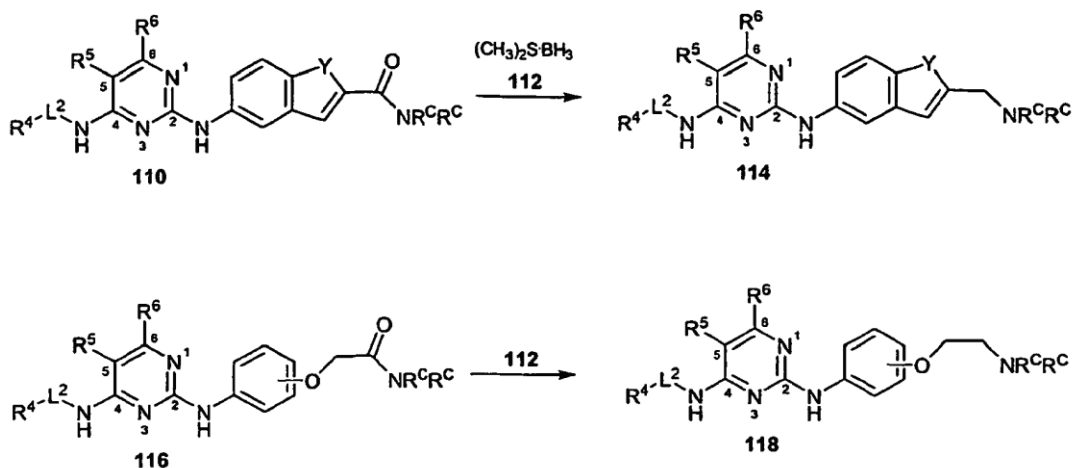
En el Esquema (X),  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^a$  son como se define previamente para la fórmula estructural (Ia). Cada  $R^a$  es independientemente un  $R^a$ , y puede ser el mismo o diferente del  $R^a$  ilustrado. Haciendo referencia al Esquema (X), el ácido carboxílico o el éster **100** se puede convertir en la amida **104** mediante reacción con la amina **102**. En la amina **102**,  $R^a$  puede ser igual o diferente de  $R^a$  del ácido o éster **100**. De forma similar, el éster de carbonato **106** se puede convertir en carbamato **108**.

20

20

En el Esquema (XI), a continuación, se ilustra un segundo ejemplo específico:

Esquema (XI)



En el Esquema (XI),  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^c$  son como se define previamente para la fórmula estructural (Ia). Haciendo referencia al Esquema (XI), la amida **110** ó **116** se puede convertir en la amina **114** ó **118**, respectivamente, mediante



reducción boránica con complejo **112** de borano-sulfuro de metilo. Otras reacciones adecuadas para sintetizar compuestos de 2,4-pirimidindiamina a partir de materiales de partida de 2,4-pirimidindiamina serán manifiestas para los expertos en la técnica.

- 5 Aunque muchos de los esquemas sintéticos explicados anteriormente no ilustran el uso de grupos protectores, los expertos reconocerán que, en algunos casos, los sustituyentes  $R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y/o  $R^6$  pueden incluir grupos funcionales que requieran protección. La identidad exacta del grupo protector usado dependerá, entre otros, de la identidad del grupo funcional que se protege y de las condiciones de reacción usadas en el esquema sintético particular, y será manifiesta para los expertos en la técnica. Por ejemplo, en Greene y Wuts, *más arriba*, se puede encontrar una guía para seleccionar grupos protectores y químicas para su unión y eliminación adecuados para una aplicación particular.
- 10 Los profármacos según la fórmula estructural (II) se pueden preparar mediante modificación normal de los métodos descritos anteriormente. Como alternativa, tales profármacos se pueden preparar haciendo reaccionar una 2,4-pirimidindiamina adecuadamente protegida de fórmula estructural (Ia) con un progrupo adecuado. Las condiciones para llevar a cabo tales reacciones y para desproteger el producto para producir un profármaco de fórmula (II) son bien conocidas.
- 15 En la técnica se conoce una miríada de referencias que enseñan métodos útiles para sintetizar de forma general pirimidinas, así como materiales de partida descritos en los Esquemas (I)-(IX). Para una guía específica, refiérase el lector a Brown, D. J., "The Pyrimidines", en *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Volumen 16 (Weissberger, A., Ed.), 1962, Interscience Publishers, (una División de John Wiley & Sons), Nueva York ("Brown I"); Brown, D. J., "The Pyrimidines", en *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Volumen 16, Suplemento I (Weissberger, A. y Taylor, E. C., Ed.), 1970, Wiley-Interscience, (una División de John Wiley & Sons), Nueva York ("Brown II"); Brown, D. J., "The Pyrimidines", en *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Volumen 16, Suplemento II (Weissberger, A. y Taylor, E. C., Ed.), 1985, An Interscience Publication (John Wiley & Sons), Nueva York ("Brown III"); Brown, D. J., "The Pyrimidines" en *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Volumen 52 (Weissberger, A. y Taylor, E. C., Ed.), 1994, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, p. 1-1509 ("Brown IV"); Kenner, G. W. y Todd, A., en *Heterocyclic Compounds*, Volumen 6, (Elderfield, R C., Ed.), 1957, John Wiley, Nueva York, Capítulo 7 (pirimidinas); Paquette, L. A., *Principles of Modern Heterocyclic Chemistry*, 1968, W. A. Benjamin, Inc., Nueva York, p. 1-401 (síntesis de uracilos p. 313, 315; síntesis de pirimidinas p. 313-316; síntesis de aminopirimidinas p. 315); Joule, J. A., Mills, K y Smith, G. F., *Heterocyclic Chemistry*, 3ª edición, 1995, Chapman and Hall, Londres, UK, p. 1-516; Vorbrüggen, H. y Ruh-Pohlenz, C., *Handbook of Nucleoside Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 2001, p. 1-631 (protección de pirimidinas mediante acilación p. 90-91; siliación de pirimidinas p. 91-93); Joule, J. A., Mills, K. y Smith, G. F., *Heterocyclic Chemistry*, 4ª edición, 2000, Blackwell Science, Ltd, Oxford, UK, p. 1-589; y *Comprehensive Organic Synthesis*, Volúmenes 1-9 (Trost, B. M. y Fleming, I., Ed.), 1991, Pergamon Press, Oxford, UK.

#### 6.4 Inhibición de las Cascadas de Señalización de Receptores Fc

- 35 Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos de la invención inhiben las cascadas de señalización de receptores Fc que conducen, entre otros, a la desgranulación de las células. Como un ejemplo específico, los compuestos inhiben las cascadas de señalización de  $Fc\epsilon RI$  y/o  $Fc\gamma RI$  que conducen a la desgranulación de células inmunitarias tales como neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y/o basófilos. Tanto los mastocitos como los basófilos desempeñan un papel central en trastornos inducidos por alérgenos, incluyendo, por ejemplo, rinitis alérgica y asma. Haciendo referencia a la FIG. 1, con la exposición a alérgenos, que pueden ser, entre otros, polen o parásitos, se sintetizan anticuerpos IgE específicos de alérgenos mediante células B activadas por IL-4 (o IL-13) u otros mensajeros para cambiar a la síntesis de anticuerpos específicos de la clase IgE. Estos IgEs específicos de alérgenos se unen al  $Fc\epsilon RI$  de alta afinidad. Al unirse al antígeno, los IgE unidos a  $Fc\epsilon RI$  se reticular y se activa la ruta de transducción de señales del receptor de IgEs, lo que conduce a la desgranulación de las células y a la liberación y/o síntesis consiguiente de un hospedante de mediadores químicos, incluyendo histamina, proteasas (por ejemplo, tripsina y quimasa), mediadores lipídicos tales como leucotrienos (por ejemplo, LTC<sub>4</sub>), factor activador de plaquetas (PAF) y prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>) y una serie de citocinas, incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, VEGF y TGF- $\beta$ . La liberación y/o síntesis de estos mediadores desde mastocitos y/o basófilos da cuenta de las respuestas de etapa temprana y tardía inducidas por alérgenos, y están directamente ligadas a sucesos aguas abajo que conducen a un estado inflamatorio sostenido.

- 50 Los sucesos moleculares en la ruta de transducción de señales de  $Fc\epsilon RI$  que conducen a la liberación de mediadores preformados *vía* la desgranulación y liberación y/o síntesis de otros mediadores químicos son bien conocidos y se ilustran en la FIG. 2. Haciendo referencia a la FIG. 2, el  $Fc\epsilon RI$  es un receptor heterotetramero compuesto de una subunidad alfa que se une a IgE, una subunidad beta, y dos subunidades gamma (homodímero gamma). La reticulación de IgE unido a  $Fc\epsilon RI$  mediante agentes de unión multivalentes (incluyendo, por ejemplo, alérgenos específicos de IgE o anticuerpos anti-IgE o fragmentos) induce la rápida asociación y activación de la cinasa Lyn relacionada con Src. Lyn fosforila motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM) en las subunidades beta y gamma intracelulares, lo que conduce al reclutamiento de Lyn adicional hacia la subunidad beta y Syk cinasa hacia el homodímero gamma. Estas cinasas asociadas a receptores, que son activadas mediante fosforilación intra- e intermolecular, fosforilan otros componentes de la ruta, tales como la Btk cinasa, LAT, y la fosfolipasa C-gamma (PLC-gamma). La PLC-gamma activada inicia rutas que conducen a la activación de la proteína cinasa C y a la movilización de  $Ca^{2+}$ , acciones las cuales son necesarias para la desgranulación. La reticulación de  $Fc\epsilon RI$  también activa las tres

clases principales de proteína cinasas activadas por mitógenos (MAP), es decir, ERK1/2, JNK1/2, y p38. La activación de estas rutas es importante en la regulación transcripcional de mediadores proinflamatorios, tales como TNF- $\alpha$  e IL-6, así como el mediador lipídico leucotrieno C4 (LTC4).

5 Aunque no se ilustra, se cree que la cascada de señalización de Fc $\gamma$ RI comparte algunos elementos comunes con la cascada de señalización de Fc $\epsilon$ RI. De forma importante, al igual que Fc $\epsilon$ RI, el Fc $\gamma$ RI incluye un homodímero gamma que es fosforilado y recluta Syk, y, al igual que Fc $\epsilon$ RI, la activación de la cascada de señalización de Fc $\gamma$ RI conduce, entre otros, a la desgranulación. Otros receptores Fc que comparten el homodímero gamma, y que pueden ser regulados mediante los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos incluyen, pero no se limitan a, Fc $\alpha$ RI y Fc $\gamma$ RIII.

10 La capacidad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención para inhibir las cascadas de señalización de los receptores Fc se puede determinar o confirmar de forma simple en ensayos in vitro. En la sección de Ejemplos se proporcionan ensayos adecuados para confirmar la inhibición de la desgranulación mediada por Fc $\epsilon$ RI. En un ensayo típico, las células capaces de sufrir la desgranulación mediada por Fc $\epsilon$ RI, tales como mastocitos o basófilos, se hacen crecer en primer lugar en presencia de IL-4, Factor de Células Madre (SCF), IL-6 e IgB para incrementar la expresión del Fc $\epsilon$ RI, se exponen a un compuesto de ensayo de 2,4-pirimidindiamina de la invención y se estimulan con anticuerpos anti-IgE (o, como alternativa, un alérgeno específico de IgE). Tras la incubación, la cantidad de un mediador químico u otro agente químico liberado y/o sintetizado como consecuencia de la activación de la cascada de señalización de Fc $\epsilon$ RI se puede cuantificar usando técnicas estándar, y se puede comparar con la cantidad del mediador o agente liberado a partir de células de control (es decir, células que son estimuladas pero que no se exponen a compuesto de ensayo). La concentración de compuesto de ensayo que produce una reducción de 50% en la cantidad del mediador o agente, medida en comparación con células de control, es la IC<sub>50</sub> del compuesto de ensayo. El origen de los mastocitos o basófilos usados en el ensayo dependerá, en parte, del uso deseado de los compuestos, y será manifiesto para los expertos en la técnica. Por ejemplo, si los compuestos se usarán para tratar o prevenir una enfermedad particular en seres humanos, una fuente conveniente de mastocitos o basófilos es un ser humano u otro animal que constituye un modelo clínico aceptado o conocido para la enfermedad particular. De este modo, dependiendo de la aplicación particular, los mastocitos o basófilos pueden derivar de una amplia variedad de fuentes animales, oscilando desde, por ejemplo, mamíferos inferiores tales como ratones y ratas, a perros, ovejas y otros mamíferos empleados habitualmente en pruebas clínicas, hasta mamíferos superiores tales como monos, chimpancés y simios, hasta seres humanos. Los ejemplos específicos de células adecuadas para llevar a cabo los ensayos *in vitro* incluyen, pero no se limitan a, basófilos de roedores o de seres humanos, estirpes celulares de leucemia de basófilos de rata, mastocitos primarios de ratón (tales como mastocitos de ratón derivados de médula ósea "BMMC") y mastocitos primarios de seres humanos aislados de sangre del cordón umbilical ("CHMC") u otros tejidos tales como pulmón. En la sección de Ejemplos (véase, por ejemplo, Demo et al., 1999, Cytometry 36(4):340-348 y la Solicitud Serie nº 10/053.355, presentada el 8 de noviembre de 2001, en trámite junto con la presente) se proporcionan o son bien conocidos métodos para aislar y cultivar estos tipos celulares. Por supuesto, también se pueden usar otros tipos de inmunocitos que se desgranulan con la activación de la cascada de señalización de Fc $\epsilon$ RI, incluyendo, por ejemplo, eosinófilos.

Como reconocerán los expertos, el mediador o agente cuantificado no es crítico. El único requisito es que sea un mediador o agente liberado y/o sintetizado como consecuencia de la iniciación o activación de la cascada de señalización de receptores Fc. Por ejemplo, haciendo referencia a la FIG. 1, la activación de la cascada de señalización de Fc $\epsilon$ RI en mastocitos y/o basófilos conduce a numerosos sucesos aguas abajo. Por ejemplo, la activación de la cascada de señalización de Fc $\epsilon$ RI conduce a la liberación inmediata (es decir, en 1-3 min. tras la activación del receptor) de una variedad de mediadores químicos preformados y agentes *vía* la desgranulación. De este modo, en una realización, el mediador o agente cuantificado puede ser específico para gránulos (es decir, presente en gránulos pero no en el citoplasma celular de forma general). Ejemplos de mediadores o agentes específicos de gránulos que se pueden cuantificar para determinar y/o confirmar la actividad de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina de la invención incluyen, pero no se limitan a, enzimas específicas de gránulos tales como hexosaminidasa y triptasa, y componentes específicos de gránulos tales como histamina y serotonina. Los ensayos para cuantificar tales factores son bien conocidos, y en muchos casos están comercialmente disponibles. Por ejemplo, la liberación de triptasa y/o hexosaminidasa se puede cuantificar incubando las células con sustratos escindibles que fluorescen al escindirse, y cuantificando la cantidad de fluorescencia producida, usando técnicas convencionales. Tales sustratos fluorógenos escindibles están comercialmente disponibles. Por ejemplo, para cuantificar la cantidad de triptasa liberada, se pueden usar los sustratos fluorógenos Z-Gly-Pro-Arg-AMC (Z=benciloxicarbonilo; AMC=7-amino-4-metilcumarina; BIOMOL Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA 19462, número de catálogo P-142) y Z-Ala-Lys-Arg-AMC (Enzyme Systems Products, una división de ICN Biomedicals, Inc., Livermore, CA 94550, número de catálogo AMC-246). El sustrato fluorógeno 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (Sigma, St. Louis, MO, Catálogo #69585) se puede usar para cuantificar la cantidad de hexosaminidasa liberada. La liberación de histamina se puede cuantificar usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) comercialmente disponible, tal como el ensayo ELISA #IM2015 de histamina de Immunotech (Beckman-Coulter, Inc.). En la sección de Ejemplos se proporcionan métodos específicos para cuantificar la liberación de triptasa, hexosaminidasa e histamina. Cualquiera de estos ensayos se puede usar para determinar o confirmar la actividad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención.

Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 1, la desgranulación es solamente una de varias respuestas iniciadas por la cascada de señalización de Fc $\epsilon$ RI. Además, la activación de esta ruta de señalización conduce a la síntesis de novo y

liberación de citocinas y quimiocinas tales como IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-13 y MIP1- $\alpha$ , y la liberación de mediadores lipídicos tales como leucotrienos (por ejemplo, LTC<sub>4</sub>), factor activador de plaquetas (PAF) y prostaglandinas. En consecuencia, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención también se pueden evaluar para determinar la actividad cuantificando la cantidad de uno o más de estos mediadores liberados y/o sintetizados por células activadas.

5 A diferencia de los componentes específicos de gránulos explicados anteriormente, estos mediadores de “etapa tardía” no se liberan inmediatamente tras la activación de la cascada de señalización de Fc $\epsilon$ RI. En consecuencia, cuando se cuantifican estos mediadores de etapa tardía, se debería tener cuidado para asegurarse de que el cultivo celular activado se incubaba durante un tiempo suficiente para dar como resultado la síntesis (si es necesario) y liberación del mediador que se está cuantificando. Generalmente, PAF y los mediadores lipídicos tales como leucotrieno C<sub>4</sub> se liberan  
10 3-30 min. tras la activación de Fc $\epsilon$ RI. Las citocinas y otros mediadores de etapa tardía se liberan aprox. 4-8 h tras la activación de Fc $\epsilon$ RI. Los tiempos de incubación adecuados para un mediador específico serán manifiestos para los expertos en la técnica. En la sección de Ejemplos se proporciona una guía específica y ensayos.

La cantidad de un mediador particular de etapa tardía liberado se puede cuantificar usando cualquier técnica estándar. En una realización, la cantidad o cantidades se pueden cuantificar usando ensayos ELISA. Los kits de ensayo ELISA  
15 adecuados para cuantificar la cantidad de TNF $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6 y/o IL-13 liberados están disponibles en, por ejemplo, Biosource International, Inc., Camarillo, CA 93012 (véase, por ejemplo, los números de catálogo KHC3011, KHC0042, KHC0052, KHC0061 y KHC0132). Los kits de ensayo ELISA adecuados para cuantificar la cantidad de leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) liberado de las células están disponibles en Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI 48108 (véase, por ejemplo, número de catálogo 520211).

20 Típicamente, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos de la invención presentarán IC<sub>50</sub> con respecto a la desgranulación mediada por Fc $\epsilon$ RI y/o la liberación o síntesis de mediadores de alrededor de 20  $\mu$ M o menor, según se mide en un ensayo *in vitro*, tal como uno de los ensayos *in vitro* descritos anteriormente o en la sección de Ejemplos. Por supuesto, los expertos apreciarán que compuestos que presentan IC<sub>50</sub> menores, por ejemplo del orden de 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, o incluso menores, son particularmente útiles.

25 Los expertos también apreciarán que los diversos mediadores explicados anteriormente pueden inducir diferentes efectos adversos o mostrar diferentes potencias con respecto al mismo efecto adverso. Por ejemplo, el mediador lipídico LTC<sub>4</sub> es un potente vasoconstrictor – es aproximadamente 1000 veces más potente induciendo la vasoconstricción que la histamina. Como otro ejemplo, además de mediar reacciones de hipersensibilidad atópica o de tipo I, las citocinas también pueden provocar remodelación tisular y proliferación celular. De este modo, aunque los compuestos que  
30 inhiben la liberación y/o síntesis de uno cualquiera de los mediadores químicos explicados previamente son útiles, los expertos apreciarán que los compuestos que inhiben la liberación y/o la síntesis de una pluralidad de, o de incluso todos, los mediadores previamente descritos encuentran uso particular, ya que tales compuestos son útiles para mejorar o evitar completamente una pluralidad de, o incluso todos, los efectos adversos inducidos por los mediadores particulares. Por ejemplo, los compuestos que inhiben la liberación de los tres tipos de mediadores –específicos de  
35 gránulos, lipídicos y de citocinas- son útiles para tratar o prevenir reacciones de hipersensibilidad de tipo I inmediata, así como los síntomas crónicos asociados con ellas.

Los compuestos de la invención capaces de inhibir la liberación de más de un tipo de mediador (*por ejemplo*, específico de gránulos o de etapa tardía) se pueden identificar determinando la IC<sub>50</sub> con respecto a un mediador representante de cada clase usando los diversos ensayos *in vitro* descritos anteriormente (u otros ensayos *in vitro* equivalentes). Los  
40 compuestos de la invención que son capaces de inhibir la liberación de más de un tipo de mediador mostrarán típicamente una IC<sub>50</sub> para cada tipo de mediador ensayado de menos de alrededor de 20  $\mu$ M. Por ejemplo, un compuesto que muestra una IC<sub>50</sub> de 1  $\mu$ M con respecto a la liberación de histamina (IC<sub>50</sub><sup>histamina</sup>) y una IC<sub>50</sub> de 1 nM con respecto a la síntesis y/o liberación de LTC<sub>4</sub> (IC<sub>50</sub><sup>LTC<sub>4</sub></sup>) inhibe la liberación de mediadores tanto inmediatos (específicos de gránulos) como de etapa tardía. Como otro ejemplo específico, un compuesto que muestra una IC<sub>50</sub><sup>triptasa</sup> de 10  $\mu$ M,  
45 una IC<sub>50</sub><sup>LTC<sub>4</sub></sup> de 1  $\mu$ M y una IC<sub>50</sub><sup>IL-4</sup> de 1  $\mu$ M inhibe la liberación de mediadores inmediatos (específicos de gránulos), lipídicos y de citocinas. Aunque los ejemplos específicos anteriores utilizan las IC<sub>50</sub> de un mediador representante de cada clase, los expertos apreciarán que se pueden obtener las IC<sub>50</sub> de una pluralidad, o incluso de todos, los mediadores que comprenden una o más de las clases. La cantidad o cantidades e identidad o identidades de mediadores para los cuales se deberían de averiguar los datos de IC<sub>50</sub> para un compuesto y aplicación particulares  
50 serán manifiestas para los expertos en la técnica.

Se pueden utilizar ensayos similares para confirmar la inhibición de cascadas de transducción de señales iniciadas por otros receptores Fc, tales como la señalización de Fc $\alpha$ RI, Fc $\gamma$ RI y/o Fc $\gamma$ RIII, con modificación habitual. Por ejemplo, la capacidad de los compuestos para inhibir la transducción de señales de Fc $\gamma$ RI se puede confirmar en ensayos similares a los descritos anteriormente, con la excepción de que la cascada de señalización de Fc $\gamma$ RI se activa, por ejemplo,  
55 incubando las células con IgG y un alérgeno o anticuerpo específico de IgG, en lugar de IgE y un alérgeno o anticuerpo específico de IgE. Los tipos celulares adecuados, agentes activantes y agentes para cuantificar y confirmar la inhibición de otros receptores Fc, tales como receptores Fc que comprenden un homodímero gamma, serán manifiestos para los expertos en la técnica.

Una clase particularmente útil de compuestos incluye aquellos compuestos de 2,4-pirimidindiamina que inhiben la liberación de mediadores inmediatos específicos de gránulos y mediadores de etapa tardía con  $IC_{50}^s$  aproximadamente equivalentes. Por aproximadamente equivalente se quiere decir que las  $IC_{50}^s$  para cada tipo de mediador están dentro de alrededor de un intervalo de 10 veces uno del otro. Otra clase particularmente útil de compuestos incluye aquellos compuestos de 2,4-pirimidindiamina que inhiben la liberación de mediadores inmediatos específicos de gránulos, mediadores lipídicos y mediadores de citocinas con  $IC_{50}^s$  aproximadamente equivalentes. En una realización específica, tales compuestos inhiben la liberación de los siguientes mediadores con  $IC_{50}^s$  aproximadamente equivalentes: histamina, triptasa, hexosaminidasa, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13,  $TNF\alpha$  y LTC4. Tales compuestos son particularmente útiles para, entre otros, mejorar o evitar completamente las respuestas tanto de etapa temprana como de etapa tardía asociadas con reacciones de hipersensibilidad atópica o inmediata de tipo I.

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

Además de las rutas de desgranulación de  $Fc\epsilon RI$  o  $Fc\gamma RI$  explicadas anteriormente, la desgranulación de mastocitos y/o basófilos puede ser inducida por otros agentes. Por ejemplo, la ionomicina, un ionóforo del calcio que evita la maquinaria de transducción de señales de  $Fc\epsilon RI$  o  $Fc\gamma RI$  temprana de la célula, induce directamente un flujo de calcio que dispara la desgranulación. Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 2,  $PLC\gamma$  activada inicia rutas que conducen, entre otros, a la movilización del ión calcio y la desgranulación subsiguiente. Como se ilustra, esta movilización de  $Ca^{2+}$  es disparada tardíamente en la ruta de transducción de señales de  $Fc\epsilon RI$ . Como se mencionó anteriormente, y como se ilustra en la FIG. 3, la ionomicina induce directamente la movilización de  $Ca^{2+}$  y un flujo de  $Ca^{2+}$  que conduce a la desgranulación. Otros ionóforos que inducen la desgranulación de esta manera incluyen A23187. La capacidad de los ionóforos inductores de la granulación, tales como la ionomicina, para evitar las etapas tempranas de las cascadas de señalización de  $Fc\epsilon RI$  y/o  $Fc\gamma RI$  se puede usar como una contraidentificación para identificar compuestos activos de la invención que ejercen específicamente su actividad inhibidora de la desgranulación bloqueando o inhibiendo las cascadas de señalización de  $Fc\epsilon RI$  o  $Fc\gamma RI$  tempranas, como se explica anteriormente. Los compuestos que inhiben específicamente tal desgranulación temprana mediada por  $Fc\epsilon RI$  o  $Fc\gamma RI$  inhiben no sólo la desgranulación y la subsiguiente liberación rápida de histamina, triptasa y otros contenidos de gránulos, sino también inhiben las rutas de activación proinflamatorias que provocan la liberación de  $TNF\alpha$ , IL-4, IL-13 y los mediadores lipídicos tales como LTC4. De este modo, los compuestos que inhiben específicamente tal desgranulación temprana mediada por  $Fc\epsilon RI$  y/o  $Fc\gamma RI$  bloquean o inhiben no sólo reacciones agudas de hipersensibilidad atópica o de tipo I, sino también las respuestas tardías que implican múltiples mediadores inflamatorios.

Los compuestos de la invención que inhiben específicamente la desgranulación temprana mediada por  $Fc\epsilon RI$  y/o  $Fc\gamma RI$  son aquellos compuestos que inhiben la desgranulación mediada por  $Fc\epsilon RI$  y/o  $Fc\gamma RI$  (por ejemplo, tienen una  $IC_{50}$  menor que alrededor de  $20\ \mu M$  con respecto a la liberación de un mediador o componente específico de gránulos según se mide en un ensayo *in vitro* con células estimuladas con un agente de unión a IgE o IgG) pero que no inhiben apreciablemente la desgranulación inducida por ionóforos. En una realización, se considera que los compuestos no inhiben apreciablemente la desgranulación inducida por ionóforos si muestran una  $IC_{50}$  de la desgranulación inducida por ionóforos mayor que alrededor de  $20\ \mu M$ , según se mide en un ensayo *in vitro*. Por supuesto, los compuestos activos que muestran  $IC_{50}^s$  incluso mayores de la desgranulación inducida por ionóforos, o que no inhiben en absoluto la desgranulación inducida por ionóforos, son particularmente útiles. En otra realización, se considera que los compuestos no inhiben apreciablemente la desgranulación inducida por ionóforos si muestran una diferencia mayor de 10 veces en sus  $IC_{50}^s$  de la desgranulación mediada por  $Fc\epsilon RI$  y/o  $Fc\gamma RI$  y la desgranulación inducida por ionóforos, según se mide en un ensayo *in vitro*. Los ensayos adecuados para determinar la  $IC_{50}$  de la desgranulación inducida por ionóforos incluyen cualquiera de los ensayos de desgranulación descritos previamente, con la modificación de que las células son estimuladas o activadas con un ionóforo del calcio inductor de la desgranulación, tal como ionomicina o A23187 (A.G. Scientific, San Diego, CA) en lugar de anticuerpos anti-IgE o un alérgeno específico de IgE. En la sección de Ejemplos se proporcionan ensayos específicos para evaluar la capacidad de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina particular de la invención para inhibir la desgranulación inducida por ionóforos.

Como reconocerán los expertos, los compuestos que muestran un grado elevado de selectividad por la desgranulación mediada por  $Fc\epsilon RI$  encuentran uso particular, puesto que tales compuestos se dirigen selectivamente hacia la cascada de  $Fc\epsilon RI$  y no interfieren con otros mecanismos de la desgranulación. De forma similar, los compuestos que muestran un grado elevado de selectividad por la desgranulación mediada por  $Fc\gamma RI$  encuentran uso particular, puesto que tales compuestos seleccionan selectivamente la cascada de  $Fc\gamma RI$  y no interfieren con otros mecanismos de la desgranulación. Los compuestos que muestran un grado elevado de selectividad son generalmente 10 veces o más selectivos para la desgranulación mediada por  $Fc\epsilon RI$  o  $Fc\gamma RI$  con respecto a la desgranulación inducida por ionóforos, tal como la desgranulación inducida por ionomicina.

Los datos bioquímicos y otros datos confirman que los compuestos de 2,4-pirimidindiamina descritos aquí son potentes inhibidores de la actividad de Syk cinasa. Por ejemplo, en experimentos con una Syk cinasa aislada, de veinticuatro compuestos de 2,4-pirimidindiamina ensayados, todos menos dos inhibieron la fosforilación, catalizada por Syk cinasa,

de un sustrato peptídico, con IC<sub>50</sub>s en el intervalo submicromolar. Los compuestos restantes inhibieron la fosforilación en el intervalo micromolar. Además, de dieciséis compuestos ensayados en un ensayo *in vitro* con mastocitos, todos inhibieron la fosforilación de sustratos de Syk cinasa (*por ejemplo*, PLC-gammal, LAT) y proteínas aguas abajo de Syk cinasa (*por ejemplo*, JNK, p38, Erk1/2 y PKB, cuando se ensayaron), pero no proteínas aguas arriba de Syk cinasa en la cascada (*por ejemplo*, Lyn). La fosforilación de los sustratos de Lyn no se inhibió por los compuestos de 2,4-pirimidindiamina ensayados. Además, para los siguientes compuestos, se observó una elevada correlación entre su inhibición de la actividad de Syk cinasa en ensayos bioquímicos (IC<sub>50</sub> en el intervalo de 3 a 1850 nM) y su inhibición de la desgranulación mediada por FcεRI en mastocitos (IC<sub>50</sub> en el intervalo de 30 a 1650 nM): R940347.

En consecuencia, la actividad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención también se puede confirmar en ensayos bioquímicos o celulares de la actividad de Syk cinasa. Haciendo referencia nuevamente a la FIG.2, en la cascada de señalización de FcεRI en mastocitos y/o basófilos, Syk cinasa fosforila LAT y PLC-gammal, lo que conduce, entre otros, a la desgranulación. Cualquiera de estas actividades se puede usar para confirmar la actividad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención. En una realización, la actividad se confirma poniendo en contacto una Syk cinasa aislada, o un fragmento activo de la misma, con un compuesto de 2,4 pirimidindiamina en presencia de un sustrato de Syk cinasa (*por ejemplo*, un péptido sintético o una proteína que se sabe que es fosforilada por Syk en una cascada de señalización) y evaluando si la Syk cinasa fosforiló el sustrato. Como alternativa, el ensayo se puede llevar a cabo con células que expresan una Syk cinasa. Las células pueden expresar endógenamente la Syk cinasa, o se pueden manipular mediante ingeniería genética para que expresen una Syk cinasa recombinante. Las células pueden opcionalmente expresar también el sustrato de Syk cinasa. Las células adecuadas para llevar a cabo tales ensayos de confirmación, así como los métodos de manipulación mediante ingeniería genética de células adecuadas, serán manifiestos para los expertos en la técnica. En la sección de Ejemplos se proporcionan ejemplos específicos de ensayos bioquímicos y celulares adecuados para confirmar la actividad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina.

Generalmente, los compuestos que son inhibidores de Syk cinasa mostrarán una IC<sub>50</sub> con respecto a una actividad de Syk cinasa, tal como la capacidad de Syk cinasa para fosforilar un sustrato sintético o endógeno, en un ensayo *in vitro* o celular en el intervalo de alrededor de 20 μM o menos. Los expertos apreciarán que los compuestos que muestran IC<sub>50</sub> menores, tales como en el intervalo de 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, o incluso menores, son particularmente útiles.

#### 6.4 Usos y Composiciones

Como se ha explicado previamente, los compuestos activos de la invención inhiben las cascadas de señalización de los receptores Fc, especialmente aquellos receptores Fc que incluyen un homodímero gamma, tales como las cascadas de señalización de FcεRI y/o FcγRI, que conducen, entre otros, a la liberación y/o síntesis de mediadores químicos desde las células, ya sea *vía* desgranulación u otros procesos. Como también se ha explicado, los compuestos activos también son inhibidores potentes de Syk cinasa. Como una consecuencia de estas actividades, los compuestos activos de la invención pueden ser para uso en una variedad de contextos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* para regular o inhibir Syk cinasa, en cuyas cascadas de señalización la Syk cinasa desempeña un papel, cascadas de señalización del receptor de Fc y las respuestas biológicas efectuadas por tales cascadas de señalización. Por ejemplo, en una realización, los compuestos pueden ser para uso en la inhibición de Syk cinasa, ya sea *in vitro* o *in vivo*, en virtualmente cualquier tipo celular que exprese Syk cinasa. También pueden ser para uso en la regulación de las cascadas de transducción de señales, en las que Syk cinasa desempeña un papel. Tales cascadas de transducción de señales dependientes de Syk incluyen, pero no se limitan a, las cascadas de transducción de señales de FcεRI, FcγRI, FcγRIII, BCR e integrina. Los compuestos pueden ser también para uso *in vitro* o *in vivo* para regular, y en particular inhibir, respuestas celulares o biológicas efectuadas por tales cascadas de transducción de señales dependientes de Syk. Tales respuestas celulares o biológicas incluyen, pero no se limitan a, estallido respiratorio, adhesión celular, desgranulación celular, diseminación celular, migración celular, agregación celular, fagocitosis, síntesis y liberación de citocinas, maduración celular y flujo de Ca<sup>2+</sup>. De forma importante, los compuestos pueden ser para uso en la inhibición de Syk *in vivo* como un enfoque terapéutico para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas, ya sea totalmente o en parte, por una actividad de Syk cinasa. Los ejemplos no limitantes de enfermedades mediadas por Syk cinasa que se pueden tratar o prevenir con los compuestos son aquellas explicadas con más detalle a continuación.

En otra realización, los compuestos activos pueden ser para uso en la regulación o inhibición de las cascadas de señalización del receptor de Fc y/o la desgranulación mediada por FcεRI y/o FcγRI, como un enfoque terapéutico para el tratamiento o prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por y/o asociadas con la liberación o síntesis de mediadores químicos de tales cascadas de señalización del receptor de Fc o de tal desgranulación. Tales tratamientos se pueden administrar a animales en contextos veterinarios, o a seres humanos. Las enfermedades que se caracterizan por, que están provocadas por o que están asociadas con tal liberación, síntesis o desgranulación de mediadores, y que por lo tanto se pueden tratar o prevenir con los compuestos activos, incluyen, a título de ejemplo y no de limitación, reacciones alérgicas o de hipersensibilidad anafiláctica o atópicas, alergias (*por ejemplo*, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, asma atópica, dermatitis atópica y alergias a alimentos), cicatrización de bajo grado (*por ejemplo*, de esclerodermia, fibrosis incrementada, queloides, cicatrices post-quirúrgicas, fibrosis pulmonar, espasmos vasculares, migraña, lesión por reperusión y post-infarto de miocardio), enfermedades asociadas con destrucción de tejido (*por ejemplo*, COPD, cardiobronquitis y post-infarto de miocardio), enfermedades asociadas con inflamación

tisular (*por ejemplo*, síndrome irritable del intestino, colon espástico y enfermedad inflamatoria del intestino), inflamación y cicatrización.

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

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

15 Las reacciones de hipersensibilidad de tipo II (también denominadas como reacciones de hipersensibilidad citotóxica, citolítica dependiente del complemento o estimulante de células) se producen cuando las inmunoglobulinas reaccionan con componentes antigénicos de células o tejido, o con un antígeno o hapteno que se ha acoplado íntimamente a las células o tejido. Las enfermedades que están asociadas habitualmente con reacciones de hipersensibilidad de tipo II incluyen, pero no se limitan a, anemia hemolítica autoinmunitaria, eritroblastosis fetal y enfermedad de Goodpasture.

20 Las reacciones de hipersensibilidad de tipo III (también denominadas como reacciones de hipersensibilidad a complejos tóxicos, a complejos solubles, o a complejos inmunitarios) resultan de la deposición de complejos circulantes solubles de antígeno-inmunoglobulina en vasos o en tejidos, con reacciones inflamatorias agudas concomitantes en el sitio de la deposición del complejo inmunitario. Los ejemplos no limitantes de enfermedades de reacción de tipo III prototípicas incluyen la reacción de Arthus, artritis reumatoide, enfermedad del suero, lupus eritematoso sistémico, ciertos tipos de glomerulonefritis, esclerosis múltiple, y penfigoide ampolloso.

25 Las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV (frecuentemente denominadas reacciones de hipersensibilidad celular, mediada por células, retrasada, o de tipo tuberculina) son provocadas por linfocitos T sensibilizados que resultan del contacto con un antígeno específico. Los ejemplos no limitantes de enfermedades citadas que impliquen reacciones de tipo IV son dermatitis de contacto y rechazo de aloinjerto.

30 Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención pueden ser para uso en el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunitarias asociadas con cualquiera de las reacciones de hipersensibilidad no anafiláticas. En particular, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención pueden ser para uso en el tratamiento o prevención de aquellas enfermedades autoinmunitarias caracterizadas frecuentemente como trastornos autoinmunitarios de un solo órgano o de un solo tipo celular, incluyendo, pero sin limitarse a: tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de anemia perniciosa, encefalomiелitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmia simpática, miastenia grave, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, hepatitis agresiva crónica, colitis ulcerosa y glomerulopatía membranosa, así como aquellas enfermedades autoinmunitarias caracterizadas frecuentemente por implicar un trastorno autoinmunitario sistémico, que incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, panarteritis nudosa, esclerosis múltiple y penfigoide ampolloso.

35 Los expertos en la técnica apreciarán que muchas de las enfermedades autoinmunitarias enumeradas anteriormente están asociadas con síntomas graves, cuya mejora proporciona un beneficio terapéutico significativo incluso en casos en los que la enfermedad autoinmunitaria subyacente no se puede mejorar. Muchos de estos síntomas, así como sus estados mórbidos subyacentes, resultan como consecuencia de la activación de la cascada de señalización de Fc $\gamma$ R en monocitos. Puesto que los compuestos de 2,4-pirimidindiamina descritos aquí son inhibidores potentes de tal señalización de Fc $\gamma$ R en monocitos y otras células, pueden ser para uso en el tratamiento y/o prevención de una miríada de síntomas adversos asociados con las enfermedades autoinmunitarias enumeradas anteriormente.

40 Como un ejemplo específico, la artritis reumatoide (RA) típicamente da como resultado hinchamiento, dolor, pérdida de movimiento y dolor por palpación de las articulaciones diana por todo el cuerpo. La RA se caracteriza por un sinovio crónicamente inflamado que está densamente poblado con linfocitos. La membrana sinovial, que es típicamente una gruesa capa celular, se hace enormemente celular y toma una forma similar a tejido linfoide, incluyendo células dendríticas, células T, B y NK, macrófagos y racimos de células plasmáticas. Este proceso, así como una plétora de mecanismos inmunopatológicos que incluyen la formación de complejos de antígeno-inmunoglobulina, eventualmente da como resultado la destrucción de la integridad de la articulación, dando como resultado deformidad, pérdida permanente de función y/o erosión ósea en o cerca de la articulación. Los compuestos de la invención pueden ser para uso en el tratamiento o mejora de uno cualquiera, varios o todos de estos síntomas de RA. De este modo, en el contexto de RA, se proporciona beneficio terapéutico (discutido más generalmente, más abajo) cuando se logra una reducción o mejora de cualquiera de los síntomas asociados habitualmente con RA, independientemente de si el

tratamiento da como resultado un tratamiento concomitante de la RA subyacente y/o una reducción en la cantidad de factor reumatoide circulante ("RF").

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

10 Como otro ejemplo específico, la esclerosis múltiple ("MS") deja lisiado al paciente perturbando la agudeza visual; estimulando la doble visión; perturbando las funciones motoras que afectan al andar y al uso de las manos; produciendo incontinencia del intestino y de la vejiga; espasticidad; y carencias sensoriales (tacto, dolor y sensibilidad a la temperatura). En el contexto de MS, el beneficio terapéutico se proporciona cuando se logra una mejora o una reducción en la progresión de uno cualquiera o más de los efectos incapacitantes asociados habitualmente con MS, independientemente de si el tratamiento da como resultado un tratamiento concomitante de la MS subyacente.

15 Cuando se usan en el tratamiento o prevención de tales enfermedades, los compuestos activos pueden ser para la administración individualmente, como mezclas de uno o más compuestos activos, o en mezcla o combinación con otros agentes útiles para tratar tales enfermedades y/o los síntomas asociados con tales enfermedades. Los compuestos activos también pueden ser para administración en mezcla o en combinación con agentes útiles para tratar otros trastornos o males, tales como esteroides, estabilizantes de membranas, inhibidores de 5LO, inhibidores de la síntesis y receptores de leucotrienes, inhibidores de intercambio del isotipo IgE o de la síntesis de IgE, intercambio de isotipo IgG o 20 síntesis de IgG, agonistas  $\beta$ , inhibidores de triptasa, aspirina, inhibidores de COX, metotrexat, fármacos anti-TNF, retuxina, inhibidores de PD4, inhibidores de p38, inhibidores de PDE4, y antihistaminas, por nombrar unos pocos. Los compuestos activos pueden ser para administración per se en forma de profármacos o como composiciones farmacéuticas, que comprenden un compuesto activo o profármaco.

25 Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos activos de la invención (o sus profármacos) se pueden fabricar por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, levigación obteniendo una gragea, emulsionamiento, encapsulamiento, atrapamiento o liofilización. Las composiciones se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se puedan usar farmacéuticamente.

30 El compuesto activo o profármaco se puede formular en la composición farmacéutica *per se*, o en forma de un hidrato, solvato, N-óxido o sal farmacéuticamente aceptable, como se describe previamente. Típicamente, tales sales son más solubles en disoluciones acuosas que los ácidos y bases libres correspondientes, pero también se pueden formar sales que tienen una solubilidad menor que los ácidos y bases libres correspondientes.

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

Para administración tópica, el (o los) compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) se puede(n) formular como disoluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, etc., como es bien conocido en la técnica.

40 Las formulaciones sistémicas incluyen aquellas diseñadas para la administración mediante inyección, *por ejemplo* inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como aquellas diseñadas para la administración transdérmica, transmucosal, oral o pulmonar.

45 Las preparaciones inyectables útiles incluyen suspensiones, disoluciones o emulsiones estériles del compuesto o compuestos activos en vehículos acuosos u oleosos. Las composiciones también pueden contener agentes de formulación, tales como un agente de suspensión, un agente estabilizante y/o un agente dispersante. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma farmacéutica unitaria, *por ejemplo* en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, y pueden contener conservantes añadidos.

Como alternativa, la formulación inyectable se puede proporcionar en forma de polvo para la reconstitución con un vehículo adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a, agua estéril libre de pirógenos, tampón, disolución de dextrosa, etc., antes del uso. Para este fin, el compuesto o compuestos activos se pueden secar mediante cualquier técnica conocida en la técnica, tal como liofilización, y se pueden reconstituir antes del uso.

50 Para la administración transmucosal, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales penetrantes son conocidos en la técnica.

55 Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, tabletas, comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); agentes disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o

glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir mediante métodos bien conocidos en la técnica con, por ejemplo, azúcares, películas o revestimientos entéricos.

5 Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, elixires, disoluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico, cremophore™ o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo, o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener tampones, sales, conservantes, saborizantes, colorantes y agentes edulcorantes, según sea apropiado.

Las preparaciones para administración oral se pueden formular de forma adecuada para dar una liberación controlada del compuesto activo o profármaco, como es bien conocido.

15 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o tabletas formulados de manera convencional.

Para las rutas de administración rectal y vaginal, el compuesto o compuestos activos se pueden formular como disoluciones (para enemas de retención), supositorios o ungüentos que contienen bases convencionales para supositorios, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

20 Para la administración nasal o la administración mediante inhalación o insuflamiento, el (o los) compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) se puede(n) suministrar convenientemente en forma de una pulverización en aerosol a partir de envases a presión o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, fluorocarbonos, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la dosis unitaria se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos para uso en un inhalador o insuflador (por ejemplo, cápsulas y cartuchos compuestos de gelatina) que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

30 Un ejemplo específico de una formulación de suspensión acuosa adecuada para la administración nasal que usa dispositivos de pulverización nasal comercialmente disponibles incluye los siguientes ingredientes: compuesto activo o profármaco (0,5-20 mg/ml); cloruro de benzalconio (0,1-0,2 mg/ml); Polisorbato 80 (TWEEN® 80; 0,5-5 mg/ml); carboximetilcelulosa sódica o celulosa microcristalina (1-15 mg/ml); feniletanol (1-4 mg/ml); y dextrosa (20-50 mg/ml). El pH de la suspensión final se puede ajustar a un intervalo de alrededor de pH 5 a pH 7, siendo típico un pH de alrededor de pH 5,5.

35 Otro ejemplo específico de una suspensión acuosa adecuada para la administración de los compuestos vía inhalación contiene 1-20 mg/ml de Compuesto o profármaco, 0,1-1% (v/v) de Polisorbato 80 (TWEEN® 80), 50 mM de citrato y/o 0,9% de cloruro de sodio.

40 Para la administración ocular, el (o los) compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) se puede(n) formular como una disolución, emulsión, suspensión, etc., adecuada para la administración al ojo. En la técnica se conoce una variedad de vehículos adecuados para administrar compuestos al ojo. Los ejemplos no limitantes específicos se describen en la patente U.S. n° 6.261.547; la patente U.S. n° 6.197.934; la patente U.S. n° 6.056.950; la patente U.S. n° 5.800.807; la patente U.S. n° 5.776.445; la patente U.S. n° 5.698.219; la patente U.S. n° 5.521.222; la patente U.S. n° 5.403.841; la patente U.S. n° 5.077.033; la patente U.S. n° 4.882.150; y la patente U.S. n° 4.738.851.

45 Para el suministro prolongado, el (o los) compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) se puede(n) formular como una preparación de depósito para la administración mediante implante o inyección intramuscular. El ingrediente activo se puede formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados apenas solubles, por ejemplo como una sal apenas soluble. Como alternativa, se pueden usar sistemas de suministro transdérmico fabricados como un disco o parche adhesivo que libera lentamente el (o los) compuesto(s) activo(s) para absorción percutánea. Para esto, se pueden usar potenciadores de la permeación, para facilitar la penetración transdérmica del (o de los) compuesto(s) activo(s). Los parches transdérmicos adecuados se describen, por ejemplo, en la patente U.S. n° 5.407.713; la patente U.S. n° 5.352.456; la patente U.S. n° 5.332.213; la patente U.S. n° 5.336.168; la patente U.S. n° 5.290.561; la patente U.S. n° 5.254.346; la patente U.S. n° 5.164.189; la patente U.S. n° 5.163.899; la patente U.S. n° 5.088.977; la patente U.S. n° 5.087.240; la patente U.S. n° 5.008.110; y la patente U.S. n° 4.921.475.

55 Como alternativa, se pueden emplear otros sistemas de suministro farmacéutico. Los liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de suministro que se pueden usar para suministrar compuesto(s) activo(s) o profármaco(s). También se pueden emplear ciertos disolventes orgánicos, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), aunque habitualmente al coste de una mayor toxicidad.



Si se desea, las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en un envase o un dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen el (o los) compuesto(s) activo(s). El envase puede comprender, por ejemplo, una hoja de papel metálico o plástica, tal como un envase de blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado por instrucciones para la administración.

## 5 6.5 Dosis Eficaces

El (o los) compuesto(s) activo(s) de la invención, o sus composiciones, generalmente se usarán en una cantidad eficaz para lograr el resultado pretendido, por ejemplo en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad particular que se esté tratando. El compuesto o compuestos pueden ser para administración terapéuticamente para lograr beneficio terapéutico, o profilácticamente para lograr beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se quiere decir la erradicación o mejora del trastorno subyacente que se está tratando, y/o la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas asociados con el trastorno subyacente, de forma que el paciente informa de una mejora de la sensación o estado, a pesar de que el paciente todavía puede estar padeciendo el trastorno subyacente. Por ejemplo, la administración de un compuesto a un paciente que sufre una alergia proporciona beneficio terapéutico no sólo cuando se erradica o se mejora la respuesta alérgica subyacente, sino también cuando el paciente informa de una disminución de la gravedad o duración de los síntomas asociados con la alergia tras la exposición al alérgeno. Como otro ejemplo, el beneficio terapéutico en el contexto de asma incluye una mejora de la respiración tras el comienzo de un ataque asmático, o una reducción en la frecuencia o gravedad de los episodios asmáticos. El beneficio terapéutico también incluye generalmente detener o ralentizar la progresión de la enfermedad, independientemente de si se obtiene una mejora.

Para administración profiláctica, el compuesto puede ser para la administración a un paciente con riesgo de desarrollar una de las enfermedades previamente descritas. Por ejemplo, si se desconoce si un paciente es alérgico a un fármaco particular, el compuesto puede ser para la administración antes de la administración del fármaco, para evitar o mejorar una respuesta alérgica frente al fármaco. Como alternativa, se puede aplicar la administración profiláctica, para evitar el comienzo de síntomas en un paciente diagnosticado con el trastorno subyacente. Por ejemplo, un compuesto puede ser para la administración a una persona que sufre alergia, antes de la exposición esperada al alérgeno. Los compuestos también pueden ser para la administración de forma profiláctica a individuos sanos que están expuestos repetidamente a agentes conocidos por una de las enfermedades descritas anteriormente, para evitar el comienzo del trastorno. Por ejemplo, un compuesto puede ser para la administración a un individuo sano que está expuesto repetidamente a un alérgeno que se sabe que induce alergias, tal como látex, en un esfuerzo por prevenir que el individuo desarrolle una alergia. Como alternativa, un compuesto puede ser para la administración a un paciente que sufre asma antes de tomar parte en actividades que disparan los ataques de asma, para reducir la gravedad de, o en general evitar, un episodio asmático.

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

Las dosis eficaces se pueden estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, se podría formular una dosis inicial para uso en animales para lograr una concentración circulante en sangre o en suero del compuesto activo que sea o que esté por encima de una  $IC_{50}$  del compuesto particular según se mide en un ensayo *in vitro*, tal como los ensayos de CHMC o BMCC *in vitro* y otros ensayos *in vitro* descritos en la sección de Ejemplos. El cálculo de las dosis para lograr tales concentraciones sanguíneas o séricas circulantes, teniendo en cuenta la biodisponibilidad del compuesto particular, está dentro de las capacidades del experto. Para una guía, refiérase el lector a Fingl y Woodbury, "Principios Generales" en: Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Capítulo 1, p. 1-46, última edición, Pergamon Press, y las referencias citadas allí.

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

expertos normales pueden adaptar de forma habitual tal información para determinar las dosis adecuadas para la administración a seres humanos. En la Sección de Ejemplos se describen modelos animales adecuados adicionales.

5 Las cantidades de las dosis estarán típicamente en el intervalo de alrededor de 0,0001 ó 0,001 ó 0,01 mg/kg/día a  
alrededor de 100 mg/kg/día, pero pueden ser mayores o menores, dependiendo, entre otros factores, de la actividad del  
compuesto, de su biodisponibilidad, del modo de administración y otros diversos factores explicados anteriormente. La  
cantidad e intervalo de la dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del (o de  
los) compuesto(s) que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico o profiláctico. Por ejemplo, los compuestos  
se pueden administrar una vez por semana, varias veces por semana (por ejemplo, en días alternos), una vez por día o  
múltiples veces por día, dependiendo, entre otros, del modo de administración, de la indicación específica tratada y de  
10 la valoración del médico. En casos de administración local o absorción selectiva, tal como administración tópica local, la  
concentración local eficaz de (de los) compuesto(s) activo(s) puede no estar relacionada con la concentración  
plasmática. Los expertos serán capaces de optimizar las dosis locales eficaces sin experimentación excesiva.

Preferiblemente, el (los) compuesto(s) proporcionará(n) beneficio terapéutico o profiláctico son provocar toxicidad  
sustancial. La toxicidad del (de los) compuesto(s) se puede determinar usando procedimientos farmacéuticos estándar.  
15 La relación de la dosis entre el efecto tóxico y el terapéutico (o profiláctico) es el índice terapéutico. Se prefiere(n)  
compuesto(s) que muestre(n) índices terapéuticos elevados.

Habiéndose descrito la invención, se ofrecen los siguientes ejemplos a título ilustrativo y no limitativo.

## 7. EJEMPLOS

### 20 7.1 Síntesis de Materiales de Partida e Intermedios Útiles para Sintetizar los Compuestos de 2,4- Pirimidindiamina según los Esquemas (I)-(V)

Se preparó como se describe a continuación una variedad de materiales de partida y N4-monosustituida-2-  
pirimidinaminas y N2-monosustituida-4-pirimidindiaminas [productos de reacción de mono-sustitución nucleófila  
aromática (SNAR)] útiles para sintetizar los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención según los Esquemas (I)-  
(V). Las condiciones adecuadas para sintetizar los productos mono-SNAR se ejemplifican con la 2-cloro-N4-(3,4-  
25 etilendiofenil)-5-fluoro-4-pirimidinamina (**R926087**).

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.1	Síntesis de materiales de partida e intermedios útiles para sintetizar los compuestos de 2,4-pirimidindiamina según los Esquemas (I)-(V)	Se preparó como se describe más abajo una variedad de materiales de partida y N4-monosustituidas-2-pirimidinaminas y N2-monosustituidas-4-pirimidindiaminas [productos de reacción de monosustitución nucleófila aromática (SNAR)] útiles para sintetizar los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención según los Esquemas (I)-(V). Las condiciones adecuadas para sintetizar los productos de la mono-SNAR se ejemplifican con 2-cloro-N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-4-pirimidinamina ( <b>R926087</b> )
7.1.1	2,4-dicloro-5-fluoropirimidina	En un matraz de reacción seco, equipado con una barra agitadora y un condensador de reflujo, se colocó 5-fluorouracilo (0,65 g, 5 mmoles) seguido de oxocloruro de fósforo (POCl <sub>3</sub> ) (1,53 g, 10 mmoles). La mezcla resultante se calentó a 110°C durante 8 horas en una atmósfera de nitrógeno. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se añadió pentacloruro de fósforo (PCl <sub>5</sub> ) (3,12 g, 15 mmoles) y se calentó hasta 110°C durante un período de 12 horas. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, la mezcla se vertió en agua con hielo, se saturó con cloruro de sodio y se dejó durante 1 hora a 0°C para completar la descomposición de POCl <sub>3</sub> y PCl <sub>5</sub> . El sólido de 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina se recogió mediante filtración rápida, se secó usando papel secante y se almacenó a baja temperatura. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,47 (s, 1H); RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ): δ 155,42, 151,87, 147,43 y 147,13; RMN <sup>19</sup> F (CDCl <sub>3</sub> ): - 38149.
7.1.2	2,4-dicloro-5-nitropirimidina (Aldrich D6, 930-0)	Una suspensión de 5-nitrouracilo (10 g, 63 mmoles) en POCl <sub>3</sub> (100 ml) se puso a reflujo durante 5 h en presencia de N,N-dimetilanilina (10 ml), se enfrió hasta la temperatura ambiente y se vertió sobre hielo machacado, con agitación vigorosa. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO <sub>4</sub> , y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (hexano/acetato de etilo; 1/1; v/v) para dar la 2,4-dicloro-5-nitropirimidina deseada. LCMS: tiempo de ret.: 23,26 min.; pureza: 95%; RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 9,16 (1H, s).
7.1.3	2,4-dicloro-5-cianopirimidina	De la misma manera que para la preparación de 2,4-dicloro-5-nitropirimidina, la reacción de 5-cianouracilo con POCl <sub>3</sub> y N,N-dimetilanilina dio 2,4-dicloro-5-cianopirimidina. LCMS: tiempo de ret.: 13,75 min.; pureza: 95%.
7.1.4	2,4-dicloro-5-trifluorometilpirimidina	De la misma manera que para la preparación de 2,4-dicloro-5-nitropirimidina, la reacción de 5-cianouracilo con POCl <sub>3</sub> y N,N-dimetilanilina dio 2,4-dicloro-5-cianopirimidina. RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD): δ 9,07; LCMS: tiempo de ret.: 16,98 min. (método rápido); pureza: 70%.
7.1.114	2-cloro-N4-[(2,2-dimetil-4H-5-pirido[1,4]oxazin-3-on)-7-il]-5-fluoro-4-pirimidinamina (R940344)	De la misma manera que para la preparación de 2-cloro-5-fluoro-N4-(3-metiloxicarbonil-4-metoxifenil)-4-pirimidinamina, se hicieron reaccionar 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina y 7-amino-2,2-dimetil-4H-5-pirido[1,4]oxazin-3-ona para dar 2-cloro-N4-[(2,2-dimetil-4H-5-pirido[1,4]oxazin-3-on)-7-il]-5-fluoro-4-pirimidinamina R940344. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,32 (1H, s), 10,20 (1H, s),

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.1.116	2-cloro-5-fluoro-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-on-6-yl]-4-pirimidinamina (R945298)	8,45 (1H, d, J = 3,6 Hz), 8,33 (1H, d, J = 2,1 Hz), 7,84 (1H, d, J = 2,1 Hz), 1,54 (6H, s); pureza 90,8%; MS (m/e): 324 (MH <sup>+</sup> ).
7.2	Síntesis de aminas y precursores de aminas	De manera similar a la preparación de 2-cloro-N4-(3,4-etilendioxiifenil)-5-fluoro-4-pirimidinamina, se hicieron reaccionar 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina y 6-amino-2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona para dar 2-cloro-5-fluoro-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-on-6-yl]-4-pirimidinamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 4,63 (s, 2H), 7,34 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,33 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 10,14 (s, 1H, NH), 11,19 (s, 1H, NH); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 152,35; LCMS: tiempo de ret.: 26,74 min.; pureza: 85,90%; MS (m/e): 296, 13 (MH <sup>+</sup> ).
7.2.1	5-Amino-2-(2-hidroxi-etileno)piridina	Una disolución metanólica (50 ml) de 2-(2-hidroxi-etileno)-5-nitropiridina (0,5 g) se hidrogenó en presencia de Pd/C (10%; 0,05 g) usando un balón lleno de hidrógeno durante 2 h. Después de filtrar a través de una almohadilla de celite y lavar con metanol, la disolución se concentró para dar la 5-amino-2-(2-hidroxi-etileno)piridina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,58 (d, 1H, J = 3 Hz), 7,05 (dd, 1H, J = 2,7 y 8,1 Hz), 6,64 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 4,36 (m, 2H), 3,89 (m, 2H).
7.2.2	4-cloro-3-metoxianilina	De la misma manera que para la preparación de 5-amino-2-(2-hidroxi-etileno)piridina, la hidrogenación de 4-cloro-3-metoxinitrobenzoceno dio 4-cloro-3-metoxianilina. LCMS: pureza: 98%; MS: 199 (M+ acetónitrilo).
7.2.3	2-[5-Amino-2-oxo-1,3-benzoxazol-3(2H)-il]acetamida	De la misma manera que para la preparación de 5-amino-2-(2-hidroxi-etileno)piridina, la hidrogenación de 2-[1,3-benzoxazol-2-oxo-5-nitro-3(2H)-il]acetamida dio 2-[5-amino-2-oxo-1,3-benzoxazol-3(2H)-il]acetamida. LCMS: pureza: 96%; MS: 208 (MH <sup>+</sup> ).
7.2.4	7-nitro-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina	La 7-nitro-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina se preparó mediante nitración de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina según la siguiente referencia: Grunewald, Gary L.; Dahanukar, Vilas H.; Caldwell, Timothy M.; Criscione, Kevin R.; Journal of Medicinal Chemistry (1997), 40(25), 3997-4005.
7.2.5	2-(t-Butoxicarbonil)-7-nitro-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina	Una mezcla de 7-nitro-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (0,55g, 3,1 mmoles), bicarbonato de di-t-butilo (0,70 g, 3,2 mmoles), trietilamina (1,0 ml, 7,7 mmoles) en diclorometano (8 ml) se agitó a rt durante 8 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (50 ml) y se agitó durante 1 h. La fase orgánica se separó y se lavó con salmuera. La concentración de la fase orgánica dio 2-(t-butoxicarbonil)-7-nitro-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,03-7,95 (m, 2H), 7,28 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 4,66 (s, 2H), 3,68 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 2,92 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 1,49 (s, 9H).
7.2.6	2,3-Dihidro-6-nitro-4-bencipiranona	Se disolvió ácido 3-(p-nitrofenil)-propiónico en ácido sulfúrico concentrado y se trató con P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> . La mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y se vertió sobre hielo. La filtración dio

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.2.7	3,4-Dihidro-4-hidroxi-6-amino-2H-1-benzopirano	2,3-dihidro-6-nitro-4-bencipiranona como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup> H (DMSO): δ 8,47 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 8,35 (dd, J = 3,0, 9,0 Hz, 1H), 7,29 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 4,70 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 2,90 (t, J = 7,2 Hz, 1H).
7.2.9	3-(N-morfolinocarbonil)anilina	Una mezcla de 2,3-dihidro-6-nitro-4-bencipiranona y Pd/C (10%) en MeOH se hidrogenó a 22°C durante 3 horas (40 psi). La mezcla se filtró y se concentró hasta sequedad para dar 3,4-dihidro-4-hidroxi-6-amino-2H-1-benzopirano como un aceite marrón. RMN <sup>1</sup> H (DMSO): δ 6,40-6,56 (m, 3H), 5,05 (bs, 1H), 4,45 (bs, 1H), 3,94-4,09 (m, 2H), 1,76-1,98 (m, 2H). A una disolución a 0°C de cloruro de 3-nitrobenzoilo (0,50 g, 2,7 mmoles) y piridina (0,27 ml, 3,2 mmoles) en diclorometano anhidro (15 ml) se añadió morfolina (0,28 ml, 3,2 mmoles). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta rt y se agitó durante 20 h. Los disolventes se eliminaron a vacío, y el residuo se suspendió en acetato de etilo y se lavó con HCl 1N. La capa orgánica se lavó con una disolución saturada de NaHCO <sub>3</sub> y salmuera. La eliminación de los disolventes a vacío proporcionó 1-(N-morfolinocarbonil)-3-nitrobenzoceno, que se usó sin purificación adicional.
7.2.10	3-(N-propilcarbonil)anilina	Una mezcla de 1-(N-morfolinocarbonil)-3-nitrobenzoceno (0,64 g) y Pd al 10% sobre carbón activado (60 mg) en metanol desgasificado (65 ml) se agitó en un balón de H <sub>2</sub> durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró a través de un auxiliar de la filtración de Celite® y después se concentró a presión reducida para dar 3-(N-morfolinocarbonil)anilina con rendimiento cuantitativo. <sup>1</sup> H NMR (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,19-7,14 (m, 1H), 6,75-6,69 (m, 3H), 3,58-3,71 (m, 10H). De la misma manera que para la preparación de 3-(N-morfolinocarbonil)anilina, se hicieron reaccionar cloruro de 3-nitrobenzoilo y n-propilamina para preparar 1-[(N-propilamino)carbonil]-3-nitrobenzoceno, que sufrió hidrogenación para dar 3-(N-propilcarbonil)anilina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,18 (t, 1H, J = 7,5 Hz), 7,13 (t, 1H, J = 1,8 Hz), 7,05-7,01 (m, 1H), 6,78 (ddd, 1H, J = 1,2, 2,4, y 7,5 Hz), 6,10 (bs, 1H), 3,58-3,53 (bs, 2H), 3,43-3,34 (m, 2H), 1,68-1,57 (m, 2H), 0,97 (t, 3H, J = 7,2 Hz).
7.2.11	3-[4-(Etoxicarbonil)-piperidinocarbonil]anilina	De la misma manera que para la preparación de 3-(N-morfolinocarbonil)anilina, se hicieron reaccionar cloruro de 3-nitrobenzoilo e isonipicotato de etilo para preparar 1-[4-(etoxicarbonil)piperidinocarbonil]-3-nitrobenzoceno, que sufrió hidrogenación para dar 3-[4-(etoxicarbonil)piperidinocarbonil]anilina.
7.2.12	3-(N-metilcarbonil)anilina	De la misma manera que para la preparación de 3-(N-morfolinocarbonil)anilina, se hicieron reaccionar cloruro de 3-nitrobenzoilo e hidrocloreto de metilamina para preparar 1-[(N-metilamino)carbonil]-3-nitrobenzoceno, que sufrió hidrogenación para dar 3-(N-metilcarbonil)anilina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,18 (t, 1H, J = 7,5 Hz), 7,13 (t, 1H, J = 1,8 Hz), 7,04-

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.2.13	7-Amino-1-tetralona	6,99 (m, 1H), 6,81-6,75 (m, 1H), 6,05 (bs, 1H), 3,84 (bs, 2H), 2,99 (d, 3H, J = 4,8 Hz). De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de 7-nitro-1-tetralona para preparar 7-amino-1-tetralona. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,32 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,05 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 6,82 (dd, 1H, J = 2,4 y 8,1 Hz), 2,85 (t, 2H, J = 6,6 Hz), 2,61 (t, 2H, J = 6,6 Hz), 2,14-2,04 (m, 2H).
7.2.14	7-Amino-2-(t-butoxicarbonil)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina	De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de 2-(t-butoxicarbonil)-7-nitro-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina para preparar 7-amino-2-(t-butoxicarbonil)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 6,92 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 6,52 (dd, 1H, J = 2,4 y 8,4 Hz), 6,44 (bs, 1H), 4,47 (s, 2H), 3,63-3,48 (m, 2H), 2,71 (t, 2H, J = 5,1 Hz), 1,45 (s, 9H).
7.2.15	7-Amino-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina	De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de 7-nitro-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina para preparar 7-amino-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 9,35 (bs, 1H), 6,82 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 6,45 (dd, 1H, J = 2,4 y 8,4 Hz), 6,30 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 5,05 (s, 2H), 4,05 (s, 2H), 3,24 (t, 2H, J = 6,6 Hz), 2,78 (t, 2H, J = 6,6 Hz).
7.2.16	2-(3-aminofenoxi)-N,2-dimetilpropanamida	De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de N,2-dimetil-2-(3-nitrofenoxi)propanamida para preparar 2-(3-aminofenoxi)-N,2-dimetilpropanamida. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,03 (t, 1H, J = 7,8 Hz), 6,71 (bs, 1H), 6,39 (dd, 1H, J = 1,2 y 6,9 Hz), 6,29 (dd, 1H, J = 2,4 y 9,6 Hz), 6,25-6,22 (m, 1H), 2,86 (d, 3H, J = 4,2 Hz), 2,86 (d, 3H, J = 4,2 Hz), 1,50 (s, 6H).
7.2.17	2-(3-aminofenoxi)-2-metilpropanato de etilo	De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)propanato de etilo para preparar 2-(3-aminofenoxi)-2-metilpropanato de etilo. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 6,99 (t, 2H, J = 8,7 Hz), 6,32 (dt, 1H, J = 1,2 y 7,2 Hz), 6,24-6,18 (m, 2H), 4,23 (q, 2H, J = 7,2 Hz), 1,58 (s, 6H), 1,24 (t, 3H, J = 6,9 Hz).
7.2.18	N-metil-2-(5-amino-2-metilfenoxi)acetamida	De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de N-metil-2-(2-metil-5-nitrofenoxi)acetamida para preparar N-metil-2-(5-amino-2-metilfenoxi)acetamida. RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD): δ 6,86 (d, 1H, J = 7,5 Hz), 6,32-6,25 (m, 2H), 4,43 (s, 2H), 2,82 (s, 3H), 2,14 (s, 3H).
7.2.19	6-Amino-2-(metoxicarbonil)-(1H)-indol	El 6-amino-2-(metoxicarbonil)-(1H)-indol se preparó según la siguiente referencias: 1. Adams, Richard E.; Press, Jeffery B.; Deegan, Edward G.; Synthetic Communications (1991), 12 (5), 675-681.

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.2.20	Preparación de 3-hidroxi-5-(metoxicarbonilmetileno)anilina y 3,5-bis(metoxicarbonilmetileno)anilina	<p>2. Boger, Dale L.; Yun, Weiya; Han, Nianhe; Johnson, Douglas S.; Biorganic &amp; Medicinal Chemistry (1995), 3(6), 611-621</p> <p>N-(3,5-dihidroxifenil)carbarnato de bencilo</p> <p>A una mezcla de 5-aminobenceno-1,3-diol (0,60 g, 3,7 mmoles) e hidrogenocarbonato de sodio (1,4 g, 16 mmoles) en THF/agua (15 ml, 1:1 v/v) se añadió gota a gota cloroformato de bencilo (1,6 ml, 11 mmoles). Después de 3 h a rt, el THF se eliminó a vacío y la capa acuosa que queda se extrajo con acetato de etilo. La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice proporcionó N-(3,5-dihidroxifenil)carbarnato de bencilo. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): δ 7,42-7,25 (m, 5H), 6,46 (d, 2H, J = 2,4 Hz), 5,97-5,94 (m, 1H), 5,14 (s, 2H).</p> <p>N-[3-hidroxi-5-(metoxicarbonilmetileno)fenil]carbarnato de bencilo y N-[3,5-bis(metoxicarbonilmetileno)fenil]carbarnato de bencilo.</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 4-nitrofenoxiacetato de etilo, se hicieron reaccionar N-(3,5-dihidroxifenil)carbarnato de bencilo y bromoacetato de metilo para dar una mezcla de N-[3-hidroxi-5-(metoxicarbonilmetileno)fenil]carbarnato de bencilo. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9,62 (s, 1H), 9,44 (s, 1H), 7,42-7,31 (m, 5H), 6,63 (s, 1H), 6,50 (t, 1H, J = 2,4 Hz), 5,93 (t, 1H, J = 2,4 Hz), 5,10 (s, 2H), 4,63 (s, 2H), 3,67 (s, 3H), y N-[3,5-bis(metoxicarbonilmetileno)fenil]carbarnato de bencilo, RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,38-7,32 (m, 5H), 6,86 (s, 1H), 6,67 (d, 2H, J = 1,8 Hz), 6,19 (t, 1H, J = 2,4 Hz), 5,16 (s, 2H), 4,57 (s, 4H), 3,78 (s, 6H), que se separaron mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice.</p> <p>3-Hidroxi-5-(metoxicarbonilmetileno)anilina</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de N-[3-hidroxi-5-(metoxicarbonilmetileno)fenil]carbarnato de bencilo para preparar 3-hidroxi-5-(metoxicarbonilmetileno)anilina. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): δ 5,87-5,80 (m, 2H), 5,78-5,72 (m, 1H), 4,56 (s, 2H), 3,76 (s, 3H).</p> <p>3,5-Bis(metoxicarbonilmetileno)anilina</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de N-[3,5-bis(metoxicarbonilmetileno)fenil]carbarnato de bencilo para preparar 3,5-bis(metoxicarbonilmetileno)anilina. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): δ 5,92 (d, 2H, J = 2,4 Hz), 5,83 (t, 1H, J = 2,4 Hz), 4,58 (s, 4H), 3,78 (s, 6H).</p>
7.2.22	Etil 6-Nitro-3-carboxi-4H-imidazo[5,1-c]-1,4-	Se preparó según J. of Heterocyclic Chemistry, <b>26</b> , 205, (1989)

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.2.23	<p>benzoxazina</p> <p>Etil 6-Amino-3-carboxi-4H-imidazol[5,1-c]-1,4-benzoxazina</p>	<p>Etil 6-Nitro-3-carboxi-4H-imidazol[5,1-c]-1,4-benzoxazina se redujo mediante agitación en MeOH a 40 p.s.i. de H<sub>2</sub> con 20 por ciento en peso de Pd al 10%/C (Degussa) durante 1 h, después se filtró y el disolvente se evaporó. El compuesto se purificó directamente mediante cromatografía en columna (EtOAc/hexano) para dar Etil 6-Amino-3-carboxi-4H-imidazol[5,1-c]-1,4-benzoxazina. <sup>1</sup>H (DMSO-d6) 8,41 (s, 1H), 6,98 (m, 1H), 6,82 (m, 1H), 6,43 (m, 1H), 5,28 (s, 2H), 4,23 (q, 2H, J=6,2 Hz), 1,27 (t, 2H, J=6,2 Hz) pureza 92% MS (m/e): 232 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.2.24	6-Amino-3,3-dimetil-1,4-benzoxazina	<p>Una mezcla de 15 g de 2-amino-4-nitrofenol y 40 g de Boc<sub>2</sub>O en 300 ml de CHCl<sub>3</sub> se puso a reflujo toda la noche, se filtró, y el filtrado se evaporó hasta casi sequedad. El residuo se trituró con hexanos, se recogió mediante filtración por succión, y se secó para dar 2-N-Boc-amino-4-nitrofenol. El 2-N-Boc-amino-4-nitrofenol se puso a reflujo en acetona con 15,6 ml de 1-cloro-2-metilpropeno y 25 g de carbonato de potasio toda la noche. La mezcla de reacción se vertió en hielo derretido, el sólido se recogió mediante filtración por succión y se lavó con agua. El sólido se disolvió en EtOAc, y la parte orgánica se lavó con disolución al 10% de NaOH, con agua, después con salmuera, y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. El orgánico se filtró para eliminar el agente secante y se evaporó para dar 18 g de 1-(2-N-Boc-amino-4-nitrofenoxi)-2-metil-2-propeno. Se agitaron 7,8 g de 1-(2-N-Boc-amino-4-nitrofenoxi)-2-metil-2-propeno toda la noche en HCl metanólico en un matraz de fondo redondo con un tabique, y después se calentaron a 80°C con un condensador de reflujo adyacente, durante 10 minutos. La reacción se enfrió, y el metanol se eliminó mediante evaporación giratoria. El residuo se disolvió en 30 ml de HCl 4N, se transfirió a una nueva vasija para dejar atrás cualquier sólido no disuelto y se enfrió hasta 0°C. Se añadieron gota a gota 1,83 g de NaNO<sub>2</sub> en 5 ml de agua, y la disolución se neutralizó con bicarbonato de sodio sólido. Se añadió lentamente, gota a gota, una disolución de 1,64 g de NaN<sub>3</sub> en 17 ml de agua, y la reacción se agitó 30 minutos. El precipitado se recogió mediante filtración por succión, se lavó bien con agua y se secó en el embudo para dar 5,7 g de 1-(2-azido-4-nitrofenoxi)-2-metil-2-propeno. Se pusieron a reflujo 7 g de 1-(2-azido-4-nitrofenoxi)-2-metil-2-propeno en 300 ml de benceno toda la noche, se enfriaron y después se evaporaron. El producto bruto se recristalizó en EtOAc/Hexanos para dar 3-metil-6-nitro-azirino[2,1-c]-1,4-benzoxazina en dos cosechas con una masa combinada de 5,1. Se disolvió 1 g de 3-metil-6-nitro-azirino[2,1-c]-1,4-benzoxazina en 500 ml de MeOH/5% de THF, se añadieron 200 mg de Pd al 10%/C (Degussa), y la mezcla resultante se agitó a una atmósfera de 30 p.s.i. de H<sub>2</sub> durante 8 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite, y el disolvente se evaporó. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de DCM/THF/MeOH y se cargó sobre una columna de SiO<sub>2</sub> de 5 cm por 20 cm con 3% de MeOH/DCM, y el compuesto se eluyó isocráticamente con una pequeña cantidad de presión positiva. Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron para dar 590 mg de 6-amino-3,3-dimetil-1,4-benzoxazina. <sup>1</sup>H (DMSO-d6) 6,30 (d, 1H), 5,75 (d, 1H), 5,65 (dd, 1H), 3,58 (s, 2H), 1,08 (s, 6H) pureza 99% MS</p>



Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.2.25	4-aminofenoxiacetato de etilo	<p>(m/e): 179 (MH<sup>+</sup>).</p> <p>4-Nitrofenoxiacetato de etilo</p> <p>Un matraz de reacción seco, equipado con un condensador de reflujo, una entrada de N<sub>2</sub> y una barra magnética agitadora, se cargó con 3-nitrofenol (76,45 g, 550 mmoles), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (76,45 g, 550 mmoles) y acetona seca (500 ml) en una atmósfera de N<sub>2</sub>. A esto se añadió a temperatura ambiente bromoacetato de etilo (55,44 ml, 500 mmoles) a lo largo de un periodo de 15 min. La mezcla de reacción se puso a reflujo durante 16 h, se enfrió y se vertió sobre agua con hielo (4 Kg). La disolución acuosa resultante se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 500 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y el disolvente se eliminó para obtener 103 g (92%) del 4-nitrofenoxiacetato de etilo deseado. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,20 (d, 2H, J = 8,2 Hz), 6,95 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 4,72 (s, 2H), 4,25 (q, 2H), 1,23 (t, 3H); LCMS: tiempo de ret.: 27,07 min.; pureza: 100%; MS: 267 (M+ acetonitrilo).</p> <p>4-Aminofenoxiacetato de etilo.</p> <p>Una disolución de 4-nitrofenoxiacetato de etilo (15 g) en EtOH (400 ml) se hidrogenó a 40 PSI durante 40 minutos en presencia de Pd al 10%/C (1,5 g, 10% en peso). Después de filtrar a través de celite, el disolvente se eliminó a presión reducida para obtener 4-aminofenoxiacetato de etilo. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 6,77 (d, 2H, 8,1 Hz), 6,60 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 4,50 (s, 2H), 4,24 (q, 2H), 1,24 (t, 3H); LCMS: tiempo de ret.: 12,00 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 196 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.2.26	4-Aminofenoxiacetato de <i>terc</i> -butilo	<p>4-Nitrofenoxiacetato de <i>terc</i>-butilo.</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 4-nitrofenoxiacetato de etilo, se hicieron reaccionar 4-nitrofenol y bromoacetato de <i>terc</i>-butilo para preparar 4-nitrofenoxiacetato de <i>terc</i>-butilo. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,2 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 6,95 (d, 2H, J = 8,2 Hz), 4,60 (s, 2H), 1,42 (s, 9H).</p> <p>4-aminofenoxiacetato de <i>terc</i>-butilo.</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de 4-nitrofenoxiacetato de <i>terc</i>-butilo para preparar 4-aminofenoxiacetato de <i>terc</i>-butilo. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 6,74 (d, 2H, J = 9 Hz), 6,62 (d, 2H, J = 9 Hz), 4,42 (s, 2H), 1,42 (s, 9H); LCMS: tiempo de ret.: 16,35 min.; pureza: 94%; MS (m/e): 224 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.2.27	3-Aminofenoxiacetato de etilo	<p>3-Nitrofenoxiacetato de etilo</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 4-nitrofenoxiacetato de etilo, se hicieron reaccionar 3-nitrofenol y bromoacetato de etilo para preparar 3-nitrofenoxiacetato de etilo. RMN</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
		<p><math>^1\text{H}</math> (CDCl<sub>3</sub>): <math>\delta</math> 7,88 (dt, 1H, J = 1,2 y 8,7 Hz), 7,71 (t, 1H, J = 2,4 Hz), 7,45 (t, 1H, J = 8,4 Hz), 7,27 (dt, 1H, J = 2,4 y 8,4 Hz), 4,70 (s, 2H), 4,29 (q, 2H, J = 6,9 Hz), 1,30 (t, 3H, J = 6,9 Hz); LCMS: tiempo de ret.: 27,28 min.; pureza: 96%.</p> <p>3-Aminofenoxiacetato de etilo</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de 3-nitrofenoxiacetato de etilo para preparar 3-aminofenoxiacetato de etilo. RMN <math>^1\text{H}</math> (CDCl<sub>3</sub>): <math>\delta</math> 7,05 (t, 1H, J = 7,2 Hz), 6,30 (m, 3H), 4,56 (s, 2H), 4,25 (q, 2H, J = 7,2 Hz), 1,29 (t, 3H, J = 6,9 Hz); LCMS: tiempo de ret.: 10,69 min.; pureza: 96%; MS (m/e): 196 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.2.28	2-(4-Aminofenoxi)propionato de (+)-etilo	<p>De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de (+)-2-(4-nitrofenoxi)propionato de etilo para preparar (+)-2-(4-aminofenoxi)propionato de etilo. RMN <math>^1\text{H}</math> (CDCl<sub>3</sub>): <math>\delta</math> 6,70 (d, 2H), 6,58 (d, 2H), 4,60 (m, 1H), 4,20 (q, 2H), 3,2 (bs, 2H), 1,45 (d, 3H), 1,22 (t, 3H).</p>
7.2.29	3-Aminofenoxiacetamida de N-metilo	<p>N-Metil-3-Nitrofenoxiacetamida</p> <p>Una mezcla de 3-nitrofenoxiacetato de etilo (9,12 g, 40 mmoles), hidrocloreuro de metilamina (26,8 g, 400 mmoles) y diisopropilamina (35,5 ml, 200 ml) en MeOH (100 ml) se agitó en un vial de presión a 90°C durante 6 h. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con agua (1 litro), el sólido formado se filtró, se lavó con agua y se secó para obtener la N-metil-3-nitrofenoxiacetamida deseada (8 g, 95%). RMN <math>^1\text{H}</math> (CDCl<sub>3</sub>): <math>\delta</math> 7,91 (dd, 1H, J = 1,8 y 8,1 Hz), 7,78 (t, 1H, J = 2,4 Hz), 7,50 (t, 1H, J = 8,7 Hz), 7,29 (dd, 1H, J = 1,8 y 8,4 Hz), 6,50 (bs, 2H), 4,57 (s, 2H), 2,95 y 2,93 (2s, 3H); LCMS: tiempo de ret.: 17,54 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 211 (MH<sup>+</sup>).</p> <p>N-metil-3-aminofenoxiacetamida</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de N-metil-3-nitrofenoxiacetamida (8 g, 39 mmoles) para dar la N-metil-3-aminofenoxiacetamida deseada (6 g, 86%). RMN <math>^1\text{H}</math> (CD<sub>3</sub>OD): <math>\delta</math> 6,99 (t, 1H, J = 8,1 Hz), 6,37-6,25 (m, 3H), 4,41 (s, 2H), 2,80 (s, 3H); LCMS: tiempo de ret.: 19,80 min.; pureza: 100%.</p>
7.2.30.	2-Metoxycarbonil-5-aminobenzofurano (R926610)	<p>2-Metoxycarbonil-5-nitrobenzofurano (R926609)</p> <p>A una suspensión de ácido 5-nitro-2-benzofurancarboxílico (5 g, 24,15 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 ml) a 0°C se añadió DMF (0,100 ml) seguido de (COCl)<sub>2</sub> (2M en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 36,23 ml, 72,46 ml) a lo largo de un periodo de 10 min. La reacción se agitó a 0°C durante 1 h, y después a temperatura ambiente durante 30 min. El disolvente de la reacción se eliminó a presión reducida, se secó a</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
		<p>alfo vacío y se suspendió nuevamente en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 ml). La disolución se enfrió hasta 0°C, se añadió piridina (4,8 ml, 48,03 mmoles) seguido de MeOH (10 ml, exceso) y se agitó toda la noche. El tratamiento de extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dio el 2-metoxicarbonil-5-nitrobenzofurano esperado (R926609). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,66 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 8,36 (dd, 1H, J = 2,4 y 9,6 Hz), 7,71 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 7,65 (s, 1H), 4,01 (s, 3H); LCMS: tiempo de ret.: 26,94 min.</p> <p>2-Metoxicarbonil-5-aminobenzofurano (R926610)</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoacetato de etilo, la hidrogenación de 2-metoxicarbonil-5-nitrobenzofurano (2 g) en MeOH dio 2-metoxicarbonil-5-aminobenzofurano. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,38 (bt, 2H), 6,90 (bd, 1H), 6,85 (bdd, 1H), 3,98 (s, 3H).</p>
7.2.31	2-(2-Metil-5-nitrofenoxi)acetato de metilo	De la misma manera que para la preparación de 4-nitrofenoxiacetato de etilo, se hicieron reaccionar 2-metil-5-nitrofenol y bromoacetato de metilo para preparar 2-(2-metil-5-nitrofenoxi)acetato de metilo. RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD): δ 7,80 (dd, 1H, J = 2,4 y 8,1 Hz), 7,65 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,38 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 4,90 (s, 2H), 3,80 (s, 3H), 2,36 (s, 3H).
7.2.32	2-Metil-2-(3-nitrofenoxi)propanato de etilo	Una mezcla de 3-nitrofenol (0,50 g, 3,6 mmoles), bromodiacetato de etilo de etilo (0,64 g, 3,3 mmoles), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,3 g, 9,4 mmoles), yoduro de potasio (catalítico) en etanol absoluto (8 ml) se calentó a 70°C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió, se vertió en una disolución saturada de NaHCO <sub>3</sub> , y se extrajo con diclorometano. El producto, 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)propanato de etilo, se obtuvo después de la purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,85 (dt, 1H, J = 1,2 y 8,1 Hz), 7,68 (t, 1H, J = 2,4 Hz), 7,40 (t, 1H, J = 8,4 Hz), 7,19-7,13 (m, 1H), 4,26 (q, 2H, J = 7,2 Hz), 1,64 (s, 6H), 1,26 (t, 3H, J = 7,21).
7.2.33	N-Metil-2-(2-metil-5-nitrofenoxi)acetamida	De la misma manera que para la preparación de N-metil-3-nitrofenoxiacetamida, se hicieron reaccionar 2-metil-5-nitrofenoxiacetato de metilo e hidrocloreto de metilamina para preparar N-metil-2-(2-metil-5-nitrofenoxi)acetamida. RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD): δ 7,82 (dd, 1H, J = 2,4 y 8,1 Hz), 7,69 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,40 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 4,66 (s, 2H), 2,83 (s, 3H), 2,40 (s, 3H).
7.2.34	N,2-Dimetil-2-(3-nitrofenoxi)propanamida	De la misma manera que para la preparación de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)propanato de etilo, se hicieron reaccionar 3-nitrofenol y N,2-dimetil-2-bromopropanamida (preparada según la siguiente referencia: Guziec, Frank S., Jr.; Torres, Felix F. Journal of Organic Chemistry (1993), 58(6), 1604-6) para preparar N,2-dimetil-2-(3-nitrofenoxi)propanamida. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,94 (dt, 1H, J = 1,2 y 8,1 Hz), 7,78 (t, 1H, J = 2,4 Hz), 7,45 (t, 1H, J = 8,4 Hz), 7,22 (ddd, 1H, J = 1,2, 2,4, y 8,1 Hz), 6,61 (bs, 1H), 2,89 (d, 3H, J = 5,1 Hz), 1,55 (s, 6H).
7.2.35	4-Amino-[(1H, 1,2,3,4-tetrazolil)metileno]benceno	4-Nitro-[(1H, 1,2,3,4-tetrazol-5-il)metileno]benceno

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
		<p>Una mezcla de 2-cianometoxi-4-nitrofenilo (5,8 g, 32,6 mmoles), azida sódica (6,3 g, 98,0 mmoles) y cloruro de amonio (8,5 g, 163,3 mmoles) se suspendió en DMF (100 ml) que contiene ácido acético (1 ml), y la mezcla se calentó a 70°C. Después de 17 h, la reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, y se añadió ácido clorhídrico acuoso 2 N (100 ml). El sólido, que precipitó de la mezcla de reacción, se recogió mediante filtración, se lavó con agua (2 x 20 ml) y después con hexano (30 ml), dando el compuesto 4-nitro-[(1H,1,2,3,4-tetrazol-5-ii)metileno]benceno (6,7 g, 99%) como un sólido naranja: RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) δ 8,25 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,29 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 5,68 (s, 2H); ESI MS <i>m/z</i> 220 [C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> - H]<sup>+</sup>.</p> <p>4-Amino-[(1H,1,2,3,4-tetrazolii)metileno]benceno</p> <p>Una mezcla de 4-nitro-[(1,2,3,4-tetrazol-5-ii)metileno]benceno (6,7 g, 30,4 mmoles) y 5% en peso de paladio sobre carbón (700 mg) suspendido en etanol/ácido clorhídrico concentrado (14:1, 150 ml) se hidrogenó en una vasija cerrada herméticamente, a 50 psi. La mezcla se agitó hasta que no se observó más captación de hidrógeno, después de lo cual la reacción se filtró a través de tierra de diatomeas con cloroformo, y el filtrado se concentró para dar producto bruto. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida (7:2,5:0,5 CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH) dio 4-amino-[(1H,1,2,3,4-tetrazolii)metileno]benceno como un sólido marrón: RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) δ 6,76 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 6,52 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 5,07 (s, 2H); ESI MS <i>m/z</i> 190 [C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O - H]<sup>+</sup>.</p>
7.2.36	4-Amino-[(1-metil-1,2,3,4-tetrazol-5-ii)metileno]benceno	<p>4-Nitro-[(1-metil-1,2,3,4-tetrazol-5-ii)metileno]benceno y 4-Nitro-[(2-metil-1,2,3,4-tetrazol-5-ii)metileno]benceno</p> <p>Una mezcla de 4-nitro-[(1H,1,2,3,4-tetrazolii)metileno]benceno (10,00 g, 45,2 mmoles), carbonato de cesio (22,09 g, 67,8 mmoles) y yoduro de metilo (7,70 g, 54,3 mmoles) en DMF (200 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de reacción se concentró para eliminar la mayoría de la DMF, y el residuo bruto se repartió entre cloroformo (100 ml) y agua (50 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para dar producto bruto como un sólido naranja. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida (cloroformo) dio 4-nitro-[(1-metil-1,2,3,4-tetrazol-5-ii)metileno]benceno: RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) δ 8,26 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,31 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 5,72 (s, 2H), 4,15 (s, 3H); y 4-nitro-(2-metil-1,2,3,4-tetrazol-5-ii)metileno]benceno: RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) δ 8,24 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 7,29 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 5,58 (s, 2H), 4,41 (s, 3H).</p> <p>4-Amino-[(1-metil-1,2,3,4-tetrazol-5-ii)metileno]benceno</p> <p>Una mezcla de 4-nitro-[(1-metil-1,2,3,4-tetrazol-5-ii)metileno]benceno (3,60 g, 15,3 mmoles) y Pd al 5%/C (0,40 g) en 14:1 etanol/ácido clorhídrico concentrado (75 ml) se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de hidrógeno a 50 psi. Después de 4 h, no se observó captación</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.2.37	4-Amino-[(2-metil-1,2,3,4-tetrazol-5-il)metileno]benceno	<p>adicional de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró a través de tierra de diatomeas. Los sólidos se lavaron con una disolución 6:3:1 de cloroformo/metanol/hidróxido de amonio concentrado, y el filtrado se concentró para dar 4-amino-[(1-metil-1,2,3,4-tetrazol-5-il)metileno]benceno bruto, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (95:5 cloroformo/metanol): RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,48 (br s, 2H), 6,79 (d, J = 6,9 Hz, 2H), 6,55 (d, J = 6,9 Hz, 2H), 5,36 (s, 2H), 4,10 (s, 3H).</p> <p>Una mezcla de 4-nitro-[(2-metil-1,2,3,4-tetrazol-5-il)metileno]benceno (3,60 g, 15,3 mmoles) y Pd al 5%/C (0,40 g) en 14:1 etanol/ácido clorhídrico concentrado (75 ml) se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de hidrógeno a 50 psi. Después de 3 h no se observó captación adicional de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró a través de tierra de diatomeas, los sólidos se lavaron con 6:3:1 de cloroformo/metanol/disolución de hidróxido de amonio concentrado, y el filtrado se concentró para dar 4-amino-[(2-metil-1,2,3,4-tetrazol-5-il)metileno]benceno bruto, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (95:5 cloroformo/metanol): RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6,80 (br s, 2H), 6,75 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 6,50 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 5,17 (s, 2H), 4,37 (s, 3H).</p>
7.2.38	2-Etoxicarbonil-5-aminoindol (R926611)	<p>De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, la hidrogenación de 2-etoxicarbonil-5-nitroindol dio el 2-etoxicarbonil-5-aminoindol. LCMS: tiempo de ret.: 13,44 min.; pureza: 93%; MS (m/e): 205 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.2.39	5-[(4-Aminofenoxi)metil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol	<p>Preparación de 5-[(4-(nitrofenoxi)metil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol</p> <p>Se disolvieron 4-nitrofenol (0,36 g, 2,56 mmoles), 5-(clorometil)-3-fenil-1,2,4-oxadiazol (0,5 g, 2,56 mmoles) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhídrido (0,39 g, 2,82 mmoles) en acetona anhídrido (20 ml), y se calentó a reflujo durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió, y el disolvente se eliminó a vacío. El sólido bruto formado se recogió mediante filtración, se lavó con agua y se secó a vacío para dar 5-[(4-nitrofenoxi)metil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol (0,70 g, 92%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,25 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 8,08 (dd, 2H, J = 8,2 Hz), 7,52-7,49 (m, 3H), 7,13 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 5,45 (s, 2H).</p> <p>Preparación de 5-[(4-aminofenoxi)metil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol</p> <p>El 5-[(4-nitrofenoxi)metil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol (0,5 g, 1,68 mmoles) se disolvió en metanol:cloruro de metileno (1:1) (120 ml). Se añadió gota a gota disolución acuosa de (15 ml) hidrosulfito de sodio (0,88 g, 5,05 mmoles) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,70 g, 5,06 mmole) en nitrógeno durante 10 min. Se dejó agitar los contenidos a temperatura ambiente. Después de consumir el material de partida, la mezcla de reacción se concentró, se diluyó con agua hasta que se formó la capa homogénea. La capa acuosa se extrajo varias veces con acetato de etilo y cloruro de metileno. Las capas orgánicas turbias se combinaron, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrido y se concentraron. La purificación del concentrado sólido mediante cromatografía en gel de sílice proporcionó 5-[(4-</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
		<p>aminofenoxi)metil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol (0,23g, 51%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,11 (m, 2H), 7,52-7,46 (m, 3H), 6,87 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 6,64 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 5,26 (s, 2H), 3,49 (br s, 2H).</p> <p>Preparación de 5-[(4-Nitrofenoxi)metil]-3-metil-1,2,4-oxadiazol</p> <p>Una mezcla de ácido 4-nitrofenoxiacético (2,25 g, 11,4 mmoles), oxima de la acetamida, hidrocloreto de trietilamina (3,85 g, 27,62 mmoles), EDCI.HCl (4,37 g, 22,79 mmoles) y diisopropiletilamina (7,42 g, 57,40 mmoles) en THF anhidro (250 ml) se puso a reflujo durante 18 h. La mezcla de reacción no homogénea de color marrón se paralizó con agua, y se extrajo con EtOAc (3 x 300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con NaHCO<sub>3</sub> acuoso, con salmuera y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La eliminación del disolvente y la purificación mediante purificación cromatográfica proporcionó 5-[(4-nitrofenoxi)metil]-3-metil-1,2,4-oxadiazol (1,62 g, 60%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,24 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 7,08 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 5,36 (s, 2H), 2,44 (s, 3H).</p> <p>Preparación de 5-[(4-aminofenoxi)metil]-3-metil-1,2,4-oxadiazol</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 5-[(4-aminofenoxi)metil]-3-fenil-1,2,4-oxadiazol, se hizo reaccionar 5-(4-nitrofenoximetil)-3-metil-1,2,4-oxadiazol con disolución acuosa de hidrosulfito de sodio y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para preparar 5-[(4-aminofenoxi)metil]-3-metil-1,2,4-oxadiazol. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 6,82 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 6,63 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 5,15 (s, 2H), 3,38 (br s, 2H), 2,41 (s, 3H).</p>
7.2.40	2-(4-Aminofenil)-2-metilpropionato de etilo	<p>2-Metil-2-(4-nitrofenil)propionato de etilo</p> <p>Un matraz de reacción seco cargado con 4-nitrofenilacetato de etilo (5,0 g, 23,89 mmoles), yodometano (8,48 g, 3,72 ml, 59,74 mmoles), 18-corona-6 (1,57 g, 5,93 mmoles) en THF seco (200 ml) se enfrió hasta -78°C en atmósfera de nitrógeno. Mientras se agita los contenidos, se añadió <i>t</i>-BuOK (5,90 g, 52,57 mmoles) en porciones. El precipitado violeta resultante se agitó a -78°C durante 2 h, y se permitió que los contenidos se calentasen hasta la temperatura ambiente. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. En este tiempo, nuevamente los contenidos se enfriaron hasta -78°C, se añadió sucesivamente otra porción de yodometano, <i>t</i>-BuOK, y 18-corona-6, y se agitó a la misma temperatura durante 2 h. La reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, y se agitó toda la noche. La reacción se paralizó con NH<sub>4</sub>Cl saturado ac. (75 ml), la mezcla homogénea resultante se extrajo con éter (4 x 200 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se concentró. El concentrado se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con 1% de EtOAc/hexanos para dar 2-metil-2-(4-nitrofenil)propionato de etilo como un aceite amarillo pálido (2,38, 42%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,17 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 7,49 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 4,12 (qt, 2H, J = 7,0 Hz), 1,60 (s, 6H), 1,17 (t, 3H, J</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
		<p>2-(4-aminofenil)-2-metilpropionato de etilo</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoacetato de etilo, la hidrogenación de 2-metil-2-(4-nitrofenil)propionato de etilo proporcionó 2-(4-aminofenil)-2-metilpropionato de etilo. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,16 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 6,63 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 4,09 (qt, 2H, J = 7,0 Hz), 3,62 (br s, 2H), 1,52 (s, 6H), 1,17 (t, 3H, J = 7,0 Hz).</p>
7.2.41	Anilinas sustituidas con restos de 1,3,4-oxadiazol	<p>N<sup>1</sup>-(3-Clorobenzoi)-3-nitrobenceno-1-carbohidrazida</p> <p>A una disolución de 3-clorobenzohidrazida (1 equivalente) y piridina (2 equivalentes) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0°C se añadió a disolución en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de cloruro de 3-nitrobenzoi (1 equivalente), y se agitó a 0°C durante 1 h, y después a temperatura ambiente toda la noche. La disolución resultante se concentró y se diluyó con agua, se basificó con NaHCO<sub>3</sub>, el sólido se filtró, se lavó con agua, se secó y se analizó para obtener N<sup>1</sup>-(3-clorobenzoi)-3-nitrobenceno-1-carbohidrazida. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10,99 (s, 1H), 10,79 (s, 1H), 8,73 (bs, 1H), 8,43 (bdd, 1H, J = 1,2 y 8,1 Hz), 8,33 (bdd, 1J, J = 8,4 Hz), 7,95 (s, 1H), 7,87 (m, 2H), 7,67 (bdd, 1H, J = 1,2 y 8,1 Hz), 7,57 (t, 1H, J = 7,8 Hz); LCMS: pureza: 85%; MS (m/e): 320 (MH<sup>+</sup>).</p> <p>[2-(3-Clorofenil)-1,3,4-oxadiazol-5-il]-3-nitrobenceno</p> <p>Una suspensión de N<sup>1</sup>-(3-clorobenzoi)-3-nitrobenceno-1-carbohidrazida (0,321 g) en POCl<sub>3</sub> (3 ml) se agitó a 90°C durante 24 h. La disolución transparente resultante se paralizó con agua con hielo, el sólido btenido se filtró, se lavó con agua, se secó y se analizó para dar [2-(3-clorofenil)-1,3,4-oxadiazol-5-il]-3-nitrobenceno. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,86 (t, 1H, J = 1,8 Hz), 8,59 (dt, 1H, J = 1,8 y 8,4 Hz), 8,48 (m, 1H), 8,25 (t, 1H, J = 1,8 Hz), 8,16 (dt, 1H, J = 1,2 y 7,5 Hz), 7,93 (t, 1H, J = 8,1 Hz), 7,75 (m, 1H), 7,66 (t, 1H, J = 7,5 Hz), LCMS: pureza: 86%; MS (m/e): 302 (MH<sup>+</sup>).</p> <p>Reducción de [2-(3-clorofenil)-1,3,4-oxadiazol-5-il]-3-nitrobenceno</p> <p>La hidrogenación de [2-(3-clorofenil)-1,3,4-oxadiazol-5-il]-3-nitrobenceno (0,2 g) usando Pd al 10%/C (0,04 g) en MeOH (200 ml) a 15 PSI durante 1 h dio una mezcla de dos productos, a saber, 3-amino-[2-(3-clorofenil)-1,3,4-oxadiazol-5-il]benceno y 3-amino-(2-fenil-1,3,4-oxadiazol-5-il)benceno, que se separaron mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice usando n-hexanos y después n-hexanos: 5-10% de EtOAc como sistema disolvente. 3-Amino-[2-(3-clorofenil)-1,3,4-oxadiazol-5-il]benceno: RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,08 (m, 2H), 7,64 (m, 4H), 7,42 (m, 1H), 7,10 (m, 1H); LCMS: pureza: 82%; MS (m/e): 272 (MH<sup>+</sup>). 3-Amino-(2-fenil-1,3,4-oxadiazol-5-il)benceno: RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,13 (m, 1H), 7,54 (m, 5H), 7,30 (m, 1H), 6,86</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
		<p>(dd, 1H, J = 1,5 y 8,1 Hz); LCMS: pureza: 93%; MS (m/e): 238 (MH<sup>+</sup>).</p> <p>N<sup>1</sup>-(Etoxycarbonilmetilencabonil)-3-nitrobenceno-1-carbohidrazida</p> <p>De la misma manera que para la preparación de N<sup>1</sup>-(3-clorobenzoi)-3-nitrobenceno-1-carbohidrazida, la reacción de cloruro de 3-nitrobenceno con etoxycarbonilmetilencarbohidrazida dio N<sup>1</sup>-(etoxycarbonilmetilencabonil)-3-nitrobenceno-1-carbohidrazida. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): δ 8,74 (m, 1H), 8,44 (dd, 1H, 1,8 y 8,1 Hz), 8,25 (bd, 1H, J = 8,4 Hz), 7,76 (t, 1H, J = 8,4 Hz), 4,22 (q, 2H, J = 6,9 Hz), 3,44 (bs, 2H), 1,29 (t, 3H, J = 6,8 Hz); LCMS: pureza: 93%; MS (m/e): 296 (MH<sup>+</sup>).</p> <p>[2-(Etoxycarbonilmetilencabonil)-1,3,4-oxadiazol-5-il]-3-nitrobenceno</p> <p>De la misma manera que para la preparación de [2-(3-clorofenil)-1,3,4-oxadiazol-5-il]-3-nitrobenceno, la reacción de POC13 con N<sup>1</sup>-(etoxycarbonilmetilencabonil)-3-nitrobenceno-1-carbohidrazida dio [2-(etoxycarbonilmetilencabonil)-1,3,4-oxadiazol-5-il]-3-nitrobenceno. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,88 (t, 1H, J = 1,8 Hz), 8,42 (m, 2H), 7,74 (t, 1H, J = 7,5 Hz), 4,27 (q, 2H, J = 7,2 Hz), 4,08 (s, 2H), 1,31 (t, 3H, J = 7,2 Hz); LCMS: pureza: 95%; MS (m/e): 278 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.2.42	Síntesis de (+)-5-Amino-(2,3-dihidro-2-metoxicarbonil)benzofurano	<p>2-Metoxicarbonil-5-nitrobenzofurano</p> <p>Una mezcla de 2-carboxi-5-nitrobenzofurano (2,0 g), MeOH (10 ml) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (2,1 ml) se calentó en un tubo cerrado herméticamente a 60°C durante 3 h. Al enfriar hasta la temperatura ambiente, se paralizó con agua con hielo y se basificó con cuidado con adición de NaHCO<sub>3</sub>. El sólido obtenido se filtró, se lavó con agua, se secó y se analizó para dar 2-metoxicarbonil-5-nitrobenzofurano. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,66 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 8,36 (dd, 1H, J = 2,4 y 9,6 Hz), 7,71 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 7,65 (s, 1H), 4,01 (s, 3H); LCMS: pureza: 97%; MS (m/e): 222 (MH<sup>+</sup>).</p> <p>(+)-5-Amino-(2,3-dihidro-2-metoxicarbonil)benzofurano</p> <p>Una suspensión de 2-metoxicarbonil-5-nitrobenzofurano (2,0 g), Pd al 10%/C (2,0 g), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,0 g) en MeOH (500 ml) se hidrogenó a 55 PSI durante 3 días. La disolución resultante se filtró a través de una almohadilla de celite, se concentró y se cromatografió usando n-hexanos y después 10%, 20% de EtOAc/n-hexanos para dar (+)-5-amino-(2,3-dihidro-2-metoxicarbonil)benzofurano. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 6,69 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 6,56 (d, 1H, J = 1,2 Hz), 6,48 (dd, 1H, J = 1,8 y 7,5 Hz), 5,14 (dd, 1H, J = 6,6 y 7,2 Hz), 3,79 (s, 3H), 3,47 (dd, 1H, J = 10,5 y 10,8 Hz), 3,26 (dd, 1H, J = 7,2 y 6,6 Hz); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 194 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.2.43	3-[1-Bis(etoxicarbonil)etoxi]anilina	Preparación de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo

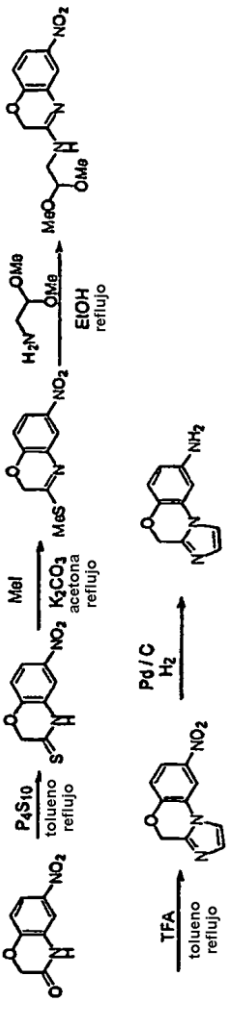


Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
		<p>Se añadió 2-bromo-2-metilmalonato de dietilo (1,0 g, 3,95 mmoles) a una suspensión agitada de fluoruro de potasio (0,57 g, 9,8 mmoles) en DMF seca (5 ml). Después de agitar durante 20 min a temperatura ambiente, se añadió 3-nitrofenol (0,55 g, 3,95 mmoles). La mezcla resultante se agitó a 60°C durante 6 h, se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con agua (30 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 X 200 ml). La capa orgánica se lavó con NaOH 1N ac. (2 X 75 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó a vacío para dar 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo (0,89 g, 80%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,92 (dd, 1H, J = 2,3 y 8,2 Hz), 7,82 (t, 1H, J = 2,3 Hz), 7,41 (t, 1H, J = 8,2 Hz), 7,30 (dd, 1H, J = 2,3 y 8,2 Hz), 4,28 (qt, 4H, J = 7,0 Hz), 1,81 (s, 3H), 1,26 (t, 6H, J = 7,0 Hz).</p> <p>Preparación de 3-[1-Bis(etoxicarbonil)etoxi]anilina</p> <p>Se disolvió 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo (0,75 g, 2,40 mmoles) en tolueno:etanol (1:1, 100 ml), se transfirió a una botella de agitación Parr que contiene Pd/C (0,15 g) y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro (5,0 g) en presencia de atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se trató con hidrógeno (30 PSI) hasta la desaparición del 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo (2 h). La mezcla se filtró a través de celite, se cubrió con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, seguido del lavado de la almohadilla de celite con EtOAc. El filtrado se concentró y se secó a vacío para dar 3-[1-bis(etoxicarbonil)etoxi]anilina con rendimiento cuantitativo. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 6,98 (t, 1H, J = 8,2 Hz), 6,37-6,28 (m, 3H), 4,26 (qt, 4H, J = 7,0 Hz), 3,65 (br s, 2H), 1,72 (s, 3H), 1,24 (t, 6H, J = 7,0 Hz).</p>
7.2.44	Preparación de 4-(4-aminofenoximetil)-2-metoxicarbonil-furano	<p>Preparación de 4-(4-nitrofenoximetil)-2-metoxicarbonil-furano</p> <p>Se puso a reflujo 3-nitrofenol (1,0 g, 7,19 mmoles), 5-(clorometil)-2-furoato de metilo (1,38 g, 7,90 mmoles) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (1,19 g, 8,60 mmoles) en acetona (30 ml) durante 8 h. La mezcla de reacción se enfrió y se diluyó con agua. El sólido blanco resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al aire toda la noche para dar 1,81 g (90%) del producto deseado. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,86 (dd, 1H, J = 2,3 y 8,2 Hz), 7,80 (t, 1H, J = 2,3 Hz), 7,45 (t, 1H, J = 8,2 Hz), 7,27 (dd, 1H, J = 2,3 y 8,2 Hz), 7,17 (d, 1H, J = 3,5 Hz), 6,58 (d, 1H, J = 3,5 Hz), 5,13 (s, 2H), 3,90 (s, 3H).</p> <p>Preparación de 4-(4-aminofenoximetil)-2-metoxicarbonil-furano</p> <p>De la misma manera que para la reducción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, se redujo 4-(4-nitrofenoximetil)-2-metoxicarbonil-furano para proporcionar 4-(4-aminofenoximetil)-2-metoxicarbonil-furano. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,15 (d, 1H, J = 3,5 Hz), 7,05 (t, 1H, J = 8,2 Hz), 6,50 (d, 1H, J = 3,5 Hz), 6,37-6,27 (m, 3H), 5,01 (s, 2H), 3,89 (s, 3H).</p>
7.2.45	Preparación de 6-amino-1-	Preparación de 1-(metoxicarbonil)metil-6-nitroindazolina

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
	(metoxicarbonil)metilindazolina	<p>A una disolución de 6-nitroindazolina (2,0 g, 12,25 mmoles) en DMF seca se añadió <math>K_2CO_3</math> anhídrido (1,84 g, 13,31 mmoles) y 2-bromoacetato de metilo (2,04 g, 13,33 mmoles). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla de reacción se paralizó con agua, y el sólido resultante se recogió mediante filtración, se lavó con agua en exceso, y se secó al aire. El sólido amarillo recogido se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice usando un sistema de disolventes en gradiente para producir dos productos. Se recogió el producto deseado (1,12 g, 41%) con un valor de <math>R_f</math> elevado en la TLC en 30% de EtOAc : hexanos.</p> <p>De la misma manera que para la reducción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, se redujo 1-(metoxicarbonil)metil-6-nitro-indazolina para dar 6-amino-1-(metoxicarbonil)metilindazolina. RMN <math>^1H</math> (<math>CDCl_3</math>): <math>\delta</math> 7,73 (d, 1H, J = 1,1 Hz), 7,35 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 6,49 (dd, 1H, J = 1,8 y 8,8 Hz), 6,39 (s, 1H), 5,34 (br s, 2H), 5,10 (s, 2H), 3,64 (s, 3H).</p> <p>Preparación de 1-(metoxicarbonil)metil-5-nitroindazolina</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 1-(metoxicarbonil)metil-6-nitroindazolina, se preparó 1-(metoxicarbonil)metil-5-nitroindazolina mediante alquilación de 5-nitroindazolina con 2-bromoacetato de metilo en presencia de <math>K_2CO_3</math>. El producto deseado (1,34 g, 46%) con valor de <math>R_f</math> elevado en la TLC en 30% de EtOAc : hexanos se recogió mediante purificación cromatográfica en columna sobre gel de sílice. RMN <math>^1H</math> (<math>CDCl_3</math>): <math>\delta</math> 8,75 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 8,30 (dd, 1H, J = 2,3 y 8,2 Hz), 8,26 (s, 1H), 7,40 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 5,22 (s, 2H), 3,78 (s, 3H).</p> <p>Preparación de 5-amino-1-(metoxicarbonil)metilindazolina</p> <p>De la misma manera que para la reducción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, se redujo 1-(metoxicarbonil)metil-5-nitro-indazolina para proporcionar 5-amino-1-(metoxicarbonil)metilindazolina. RMN <math>^1H</math> (<math>CDCl_3</math>): <math>\delta</math> 7,84 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 7,15 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,95 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,88 (dd, 1H, J = 2,3 y 8,8 Hz), 5,09 (s, 2H), 3,73 (s, 3H).</p> <p>Preparación de 1-(2-etoxicarbonil)metil-6-nitroindazolina</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 1-(metoxicarbonil)metil-6-nitroindazolina, se preparó 1-(etoxicarbonil)metil-6-nitroindazolina mediante alquilación de 6-nitroindazolina con 3-bromopropionato de etilo en presencia de <math>K_2CO_3</math>. El producto deseado (58%) con valor de <math>R_f</math> elevado en la TLC en 30% de EtOAc : Hexanos se recogió mediante purificación cromatográfica en columna sobre gel de sílice. RMN <math>^1H</math> (<math>CDCl_3</math>): <math>\delta</math> 8,49 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 8,01 (dd, 1H, J = 1,7 y 8,8 Hz), 7,82 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 4,74 (t, 2H, J = 6,4 Hz), 4,09 (qt, 2H, J = 7,0 Hz), 3,03 (t, 2H, J = 6,4 Hz), 1,18 (t, 3H, J = 7,0 Hz).</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
		<p>Preparación de 6-amino-1-(2-etoxicarboniletil)indazolina</p> <p>De la misma manera que para la reducción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, se redujo 1-(2-etoxicarboniletil)-6-nitroindazolina para proporcionar 6-amino-1-(2-etoxicarboniletil)indazolina. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,81 (s, 1H), 7,46 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,60 (app s, 1H), 6,55 (dd, 1H, J = 2,3 y 8,8 Hz), 4,51 (t, 2H, J = 7,0 Hz), 4,11 (qt, 2H, J = 7,0 Hz), 3,52 (br s, 2H), 2,91 (t, 2H, J = 7,0 Hz), 1,18 (t, 3H, J = 7,0 Hz).</p> <p>Preparación de 1-(2-etoxicarboniletil)-5-nitroindazolina</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 1-(metoxicarbonil)metil-5-nitroindazolina, se preparó 1-(etoxicarbonil)etil-5-nitroindazolina mediante alquilación de 5-nitroindazolina con 3-bromopropionato de etilo en presencia de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. El producto deseado (43%) con valor de Rf elevado en la TLC en 30% de EtOAc : Hexanos se recogió mediante purificación cromatográfica en columna sobre gel de sílice. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,70 (d, 1H, J = 1,7 Hz), 8,27 (dd, 1H, J = 2,3 y 8,8 Hz), 8,20 (d, 1H, J = 1,7 Hz), 7,59 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 4,70 (t, 2H, J = 6,4 Hz), 4,07 (qt, 2H, J = 7,0 Hz), 3,01 (t, 2H, J = 6,4 Hz), 1,16 (t, 3H, J = 7,0 Hz).</p> <p>Preparación de 5-amino-1-(2-etoxicarboniletil)indazolina</p> <p>De la misma manera que para la reducción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, se redujo 1-(2-etoxicarboniletil)-5-nitroindazolina para proporcionar 5-amino-1-(2-etoxicarboniletil)indazolina. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,78 (s, 1H), 7,30 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,91 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,87 (dd, 1H, J = 2,3 y 8,8 Hz), 4,59 (t, 2H, J = 6,4 Hz), 4,08 (qt, 2H, J = 7,0 Hz), 3,02 (br s, 2H), 2,92 (t, 2H, J = 7,0 Hz), 1,16 (t, 3H, J = 7,0 Hz).</p> <p>Preparación de 5-amino-2-metilindazolina</p> <p>De la misma manera que para la reducción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, se redujo 2-metil-5-nitroindazolina comercialmente disponible para proporcionar 5-amino-2-metilindazolina. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,61 (s, 1H), 7,53 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,81 (dd, 1H, J = 2,3 y 8,8 Hz), 6,75 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 4,13 (s, 3H), 3,85 (br s, 2H).</p>
7.2.46	Preparación de 3-metoxi-4-[(6-nitroindazol-1-il)metil]benzoato de metilo	<p>De la misma manera que para la reducción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, se redujo 3-metoxi-4-[(6-nitroindazol-1-il)metil]benzoato de metilo para proporcionar 4-[(6-aminoindazol-1-il)metil]benzoato de metilo. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,88 (s, 1H), 7,53 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,51 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,50 (d, 1H, J = 1,7 Hz), 6,67 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,56 (dd, 1H, J = 1,7 y 8,8 Hz), 6,45 (d, 1H, J = 1,2 Hz), 5,50 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,79 (br s, 2H).</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
		<p>Preparación de 4-[(6-aminoindazol-2-il)metil]benzoato de metilo</p> <p>De la misma manera que para la reducción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, se redujo 3-metoxi-4-[(6-nitroindazol-2-il)metil]benzoato de metilo para proporcionar 4-[(6-aminoindazol-2-il)metil]benzoato de metilo. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,78 (s, 1H), 7,56-7,53 (m, 2H), 7,43 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,98 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 6,81 (app s, 1H), 6,58 (dd, 1H, J = 1,8 y 8,8 Hz), 5,53 (s, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,89 (s, 3H).</p>
7.2.47	Preparación de 6-amino-1-[2-metoxi-4-(o-toluisulfonamidocarboxi)-bencil]indazolina	<p>Preparación de 6-nitro-1-[2-metoxi-4-(o-toluisulfonamidocarboxi)-bencil]indazolina</p> <p>La hidrólisis del éster de 3-metoxi-4-[(6-nitroindazol-1-il)metil]benzoato de metilo en presencia de LiOH:H<sub>2</sub>O produjo el ácido correspondiente. El ácido (1,65 g, 5,04 mmoles) así formado se convirtió en el cloruro de ácido haciéndolo reaccionar con SOCl<sub>2</sub> (3,68 ml, 50,45 mmoles) a la temperatura de reflujo durante 5 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró a vacío. Al concentrado de cloruro de ácido disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (75 ml), se añadieron sucesivamente o-toluilbencenosulfonamida (0,95 g, 5,54 mmoles) y 4-(dimetilamino)-piridina (0,67 g, 5,54 mmoles) a temperatura ambiente, y se agitó durante 12 h. La mezcla de reacción se concentró, se disolvió en EtOAc (700 ml) y se trató sucesivamente con HCl 2 N (2 X 100 ml), agua (150 ml) y salmuera (100 ml). El tratamiento habitual y la purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice proporcionó el producto (1,57 g, 64%). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,75 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,00 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,95-7,91 (m, 2H), 7,50 (d, 1H, J = 1,2 Hz), 7,46-7,27 (m, 4H), 6,92 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 5,76 (s, 2H), 3,81 (s, 3H), 2,54 (s, 3H).</p> <p>Preparación de 6-amino-1-[2-metoxi-4-(o-toluisulfonamidocarboxi)-bencil]indazolina</p> <p>De la misma manera que para la reducción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, se redujo 6-nitro-1-[2-metoxi-4-(o-toluisulfonamidocarboxi)bencil]indazolina para proporcionar 6-amino-1-[2-metoxi-4-(o-toluisulfonamidocarboxi)bencil]indazolina. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,96 (dd, 1H, J = 1,2 y 8,2 Hz), 7,76 (s, 1H), 7,51 (d, 1H, J = 1,2 Hz), 7,49-7,44 (m, 1H), 7,37 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 7,34-7,32 (m, 1H), 7,30 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,51-6,47 (m, 2H), 6,35 (s, 1H), 5,35 (s, 2H), 3,89 (s, 3H), 2,54 (s, 3H).</p> <p>Preparación de 3-metoxi-4-[(5-nitroindazol-1-il)metil]benzoato de metilo</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 3-metoxi-4-[(6-nitroindazol-1-il)metil]benzoato de metilo, se preparó 3-metoxi-4-[(5-nitroindazol-1-il)metil]benzoato de metilo mediante alquilación de 5-nitroindazolina con (4-bromometil)-3-metoxibenzoato de metilo en presencia de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. El producto deseado (47%) con valor de R<sub>f</sub> elevado en la TLC en 30% de EtOAc : Hexanos como eluyente se recogió mediante purificación cromatográfica en columna sobre gel</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
		<p>de sílice. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,73 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 8,26-8,22 (m, 2H), 7,56 (s, 1H), 7,54 (dd, 1H, J = 1,8 y 8,2 Hz), 7,49 (d, 1H, J = 9,4 Hz), 6,98 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 5,66 (s, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,89 (s, 3H). R<sub>f</sub> bajo: 3-metoxi-4-[(5-nitroindazol-2-il)metil]benzoato de metilo.</p> <p>Preparación de 5-nitro-1-[2-metoxi-4-(<i>o</i>-toluilsulfonamidocarboxi)-bencil]indazolina</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 6-nitro-1-[2-metoxi-4-(<i>o</i>-toluilsulfonamidocarboxi)bencil]indazolina, se preparó 5-nitro-1-[2-metoxi-4-(<i>o</i>-toluilsulfonamidocarboxi)bencil]indazolina a partir de 3-metoxi-4-[(5-nitroindazol-1-il)metil]benzoato de metilo. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>): δ 8,81 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,39 (s, 1H), 8,21 (dd, 1H, J = 1,8 y 8,8 Hz), 7,87 (dd, 2H, J = 3,6 y 8,8 Hz), 7,48 (d, 1H, J = 1,2 Hz), 7,39 (dd, 1H, J = 1,2 y 8,2 Hz), 7,33-7,15 (m, 3H), 6,85 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 5,65 (s, 2H), 3,76 (s, 3H), 2,49 (s, 3H).</p> <p>Preparación de 5-amino-1-[2-metoxi-4-(<i>o</i>-toluilsulfonamidocarboxi)bencil]indazolina</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 6-amino-1-[2-metoxi-4-(<i>o</i>-toluilsulfonamidocarboxi)bencil]indazolina, se preparó 5-amino-1-[2-metoxi-4-(<i>o</i>-toluilsulfonamidocarboxi)bencil]indazolina mediante reducción de 5-nitro-1-[2-metoxi-4-(<i>o</i>-toluilsulfonamidocarboxi)bencil]indazolina. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>): δ 7,87 (dd, 1H, J = 1,2 y 7,7 Hz), 7,73 (s, 1H), 7,50 (s, 1H), 7,35-7,14 (m, 5H), 6,78 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 6,75 (s, 1H), 6,53 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 5,44 (s, 2H), 3,82 (s, 3H), 2,50 (s, 3H).</p>
7.2.48	Preparación de 8-amino-4 <i>H</i> -imidazo[2,1- <i>c</i> ][1,4]-benzoxazina	
7.3	Síntesis de 2,4-pirimidindiaminas	<p>Se sintetizó una variedad de 2,4-pirimidindiaminas de la invención a partir de los materiales de partida e intermedios anteriores y otros reactivos comercialmente disponibles. Las condiciones adecuadas para sintetizar compuestos de N2,N4-bis-sustituida-2,4-pirimidindiamina (condiciones de reacción "SNAR general"; Reacción de Sustitución Nucleófila Aromática) se ejemplifican con N2,N4-bis(4-etoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (<b>R926069</b>) y N2,N4-bis(3-hidroxifenil)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina (<b>R921218</b>). Las condiciones adecuadas para sintetizar N2,N4-disustituidas-2,4-pirimidindiaminas asimétricas se ejemplifican mediante N4-(3,4-</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.3.908	N4-[(2,2-Dimetil-4H-5-pirido[1,4]oxazin-3-ona)-7-il]-5-fluoro-N2-[3-(metilaminocarbonilmetileno)fenil]-2,4-pirimidinamina (R940345)	<p>etilendioxifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxi)fenil)-2,4-pirimidinamina (<b>R926210</b>).</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 5-fluoro-N2-[3-(metilaminocarbonilmetileno)fenil]-N4-(3-aminocarbonilfenil)-2,4-pirimidinamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-[(2,2-dimetil-4H-5-pirido[1,4]oxazin-3-ona)-7-il]-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3-(metilaminocarbonilmetileno)anilina para dar N4-[(2,2-dimetil-4H-5-pirido[1,4]oxazin-3-ona)-7-il]-5-fluoro-N2-[3-(metilaminocarbonilmetileno)fenil]-2,4-pirimidinamina <b>R940345</b>. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d6): δ 11,23 (1H, s), 9,69 (1H, s), 9,54 (1H, s), 8,50 (1H, s), 8,25 (1H, d, J = 3,3 Hz), 8,06 (1H, m), 7,96 (1H, t, J = 2,5 Hz), 7,41-7,36 (2H, m), 7,24 (1H, t, J = 8,25 Hz), 6,34 (1H, d, J = 8,7 Hz), 4,47 (2H, s), 2,74 (3H, d, J = 3,3 Hz), 1,53 (6H, s); pureza: 98,4%; MS (m/e): 468 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.3.910	N4-[(2,2-Dimetil-4H-5-pirido[1,4]oxazin-3-ona)-6-il]-5-fluoro-N2-[3-(metilaminocarbonilmetileno)fenil]-2,4-pirimidinamina (R940347)	<p>De la misma manera que para la preparación de 5-fluoro-N2-[3-(metilaminocarbonilmetileno)fenil]-N4-(3-aminocarbonilfenil)-2,4-pirimidinamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-[(2,2-dimetil-4H-5-pirido[1,4]oxazin-3-ona)-6-il]-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3-(metilaminocarbonilmetileno)anilina para dar N4-[(2,2-dimetil-4H-5-pirido[1,4]oxazin-3-ona)-6-il]-5-fluoro-N2-[3-(metilaminocarbonilmetileno)fenil]-2,4-pirimidinamina <b>R940347</b>. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d6): δ 11,20 (1H, s), 9,46 (1H, s), 8,26 (1H, d, J = 3,6 Hz), 8,06 (1H, s), 7,71 (1H, m), 7,49 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,45 (1H, s), 7,38 (1H, d, J = 9 Hz), 7,21 (1H, t, J = 8,1 Hz), 6,61 (1H, d, J = 8,7 Hz), 4,47 (2H, s), 2,74 (3H, s), 1,52 (6H, s); pureza: 100%; MS (m/e): 468 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.3.964	5-Fluoro-N2-(3-metilaminocarbonilmetileno)fenil)-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona-7-il]-2,4-pirimidinamina (R945242)	<p>Se trató 2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona (500 mg) con ácido nítrico (5 ml) y ácido sulfúrico (5 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta 70°C durante 30 min, y después se vertió en agua con hielo. La disolución se neutralizó con bicarbonato de sodio hasta pH 6. La precipitación amarilla se recogió mediante filtración, se lavó con agua y se secó para dar una mezcla de productos nitrados (regio-isómeros).</p> <p>La mezcla de compuesto nitrados se redujo en condiciones de hidrogenolisis usando Pd al 10%-C en metanol, a 40 psi durante 30 min. El catalizador se separó por filtración. El filtrado se evaporó y se trató con 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina (200 mg) en metanol (5 ml), agua (5 ml). La mezcla de reacción se calentó a 70°C toda la noche, después se evaporó. El residuo se hizo reaccionar con 3-metilaminocarbonilmetilenoanilina (300 mg) en metanol (5 ml) y agua (1 ml) a 100°C toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con disolución de HCl 1N (60 ml). La precipitación marrón se recogió mediante filtración, se lavó con agua y se secó para dar 5-fluoro-N2-(3-metilaminocarbonilmetileno)fenil)-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona-7-il]-2,4-pirimidinamina. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d6): δ 2,62 (d, J = 4,8 Hz, 3H), 4,33 (s, 2H), 4,63 (s, 2H), 6,48 (dd, J = 2,4 y 7,5 Hz, 1H), 7,11 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,27 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,86 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,97 (m, 1H), 8,12 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 8,38 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 9,33 (s, 1H), 9,46 (s, 1H), 11,18 (s, 1H); RMN <sup>19</sup>F (282 MHz, DMSO-d6): δ - 164,49; LCMS: tiempo de ret.: 13,16</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.3.965	5-Fluoro-N2-(3-metilaminocarbonilmetilenoifenil)-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-7-il]-2,4-pirimidindiamina (R945263)	<p>min.; pureza: 79,30%; MS (m/e): 440,16 (MH<sup>+</sup>).</p> <p>2H-Pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona (1 g, 6,66 mmoles) se puso a reflujo con complejo de hidruro de boro-sulfuro de metilo (2 ml) en THF (10 ml) durante 30 min para dar 2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazina. De manera análoga a la preparación de 5-fluoro-N2-(3-metilaminocarbonilmetilenoifenil)-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona-7-il]-2,4-pirimidindiamina, la 2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazina se nitro, se redujo y se hizo reaccionar con 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina (400 mg) y 3-metilaminocarbonilmetilenoifenil-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-7-il]-2,4-fluoro-N2-(3-metilaminocarbonilmetilenoifenil)-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona-7-il]-2,4-pirimidindiamina como un sólido gris. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,91 (d, J = 4,8 Hz, 3H), 3,55 (t, J = 4,2 Hz, 2H), 4,24 (t, J = 4,5 Hz, 2H), 4,49 (s, 2H), 4,90 (br, 1H), 6,51 (dd, J = 2,7 y 8,1 Hz, 1H), 6,64 (s, 1H), 6,90 (dd, J = 2,1 y 8,1 Hz, 1H), 7,08 (s, 1H), 7,14 (br, 1H), 7,18 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,28 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,51 (t, J = 2,1 Hz, 1H), 7,93 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 7,95 (d, J = 2,4 Hz, 1H); LCMS: tiempo de ret.: 1,91 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 426,12 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.3.966	5-Fluoro-N2-(3-metilaminocarbonilmetilenoifenil)-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona-6-il]-2,4-pirimidindiamina (R921304)	<p>2H-Pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona (2,5 g) se disolvió en ácido acético (6 ml) y anhídrido acético (30 ml). A la disolución de la reacción se añadió gota a gota ácido nítrico fumante (3 ml), en un baño de hielo. La disolución de la reacción se agitó en un baño de hielo toda la noche. La disolución se vertió en hielo machacado. La precipitación amarilla clara se recogió mediante filtración, se lavó con agua y se secó para dar una mezcla de productos nitrados (regiosímeros). La mezcla se cristalizó en diclorometano para dar 6-nitro-2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona (1 g) como un sólido amarillo claro.</p> <p>6-Nitro-2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona (1 g) se redujo en condiciones de hidrogenólisis usando Pd al 10%-C en metanol (50 ml) y disolución de HCl 1N (10 ml) a 50 psi durante 2 h. El catalizador se separó por filtración y se lavó con metanol y Disolución de HCl 1N. El filtrado se evaporó para dar 6-amino-2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona.</p> <p>De manera análoga a la preparación de 5-fluoro-N2-(3-metilaminocarbonilmetilenoifenil)-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona-7-il]-2,4-pirimidindiamina, se hizo reaccionar 6-amino-2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona con 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina (500 mg) y 3-metilaminocarbonilmetilenoifenil-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona-6-il]-2,4-pirimidindiamina como un sólido beige. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,63 (d, J = 4,5 Hz, 3H), 4,35 (s, 2H), 4,62 (s, 2H), 6,47 (dd, J = 1,8 y 8,1 Hz, 1H), 7,10 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,25 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,37 (m, 2H), 7,59 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,96 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,13 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,26 (s, 1H), 9,29 (s, 1H), 11,13 (s, 1H); RMN <sup>19</sup>F (282 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ - 163,20; LCMS: tiempo de ret.: 25,22 min.; pureza: 97,55%; MS (m/e): 440,25 (MH<sup>+</sup>).</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.3.967	5-Fluoro-N2-(3-metilaminocarbonilmetilenoifenil)-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-6-il]-2,4-pirimidindiamina (R945299)	6-Nitro-2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona (500 mg) se puso a reflujo con complejo de hidruro de boro-sulfuro de metilo (1 ml) en THF (10 ml) durante 30 min para dar 6-nitro-2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazina. De manera análoga a la preparación de 5-fluoro-N2-(3-metilaminocarbonilmetilenoifenil)-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona-7-il]-2,4-pirimidindiamina, la 6-nitro-2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazina se redujo y se hizo reaccionar con 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina (500 mg) y 3-metilaminocarbonilmetilenoifenil-N4-[2H-pirido[3,2-b]-1,4-oxazin-6-il]-2,4-pirimidindiamina como un sólido gris. RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD): δ 2,81 (s, 3H), 3,48 (t, J = 4,5 Hz, 2H), 4,14 (t, J = 4,5 Hz, 2H), 4,44 (s, 2H), 6,60 (ddd, J = 1,5 y 2,7 y 7,5 Hz, 1H), 6,94 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,14 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 7,17 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,42 (t, J = 2,1 Hz, 1H), 7,92 (d, J = 3,3 Hz, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, CD <sub>3</sub> OD): δ - 168,20; LCMS: tiempo de ret.: 25,49 min.; pureza: 97,56%; MS (m/e): 426,23 (MH <sup>+</sup> ).
7.3.1100	Síntesis de intermedios, 2,4-pirimidindiaminas y 2,4,6-pirimidinatriaminas según los Esquemas VIII y IX	Se sintetizó una variedad de intermedios y compuestos de 2,4-pirimidindiamina según los Esquemas VIII y IX. El Esquema VIII se ejemplifica mediante la reacción de 2,4,6-tricloropirimidina con 3-hidroxianilina para formar una mezcla de tres compuestos, que se separaron y se purificaron mediante cromatografía. El Esquema IX se ejemplifica mediante la reacción de 2,4,5,6-tetracloropirimidina con 3,4-etilendioxi-anilina para formar una mezcla de tres compuestos, que se separaron y se purificaron mediante cromatografía.
7.3.1101	Reacción de 2,4,6-tricloropirimidina con 3-hidroxianilina 4,6-Dicloro-N2-(3-hidroxiifenil)-2-pirimidinamina (R926407) N2,N4-Bis(3-hidroxiifenil)-6-cloro-2,4-pirimidindiamina (R926408) y N2,N4,N6-Tris(3-hidroxiifenil)-2,4,6-pirimidintriamina (R926409)	Una mezcla de 2,4,6-tricloroanilina (0.183g, 1 mmol) y 3-hidroxianilina (0.327g, 3 mmoles) en 5 ml de MeOH se calentó a 100 oC en un vial cerrado durante 24h. La mezcla de reacción se diluyó con H <sub>2</sub> O, se acidificó con HCl 2N y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Con la eliminación del disolvente, el residuo se purificó mediante cromatografía (así como TLC preparativa) para dar tres productos, principalmente el mono-SNAr, 4,6-dicloro-N2-(3-hidroxiifenil)-2-pirimidinamina (R926407); RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): □ 7,16 (t, 1H, J = 8,1 Hz), 6,78 (m, 2H), 6,64 (dd, 1H, J = 1,2 y 8,1 Hz), 6,58 (s, 1H); LCMS: tiempo de ret.: 25,08 min.; pureza: 99%; MS (m/e): 256 (M <sup>+</sup> ); producto bis-SNAr, N2,N4-bis(3-hidroxiifenil)-6-cloro-2,4-pirimidindiamina (R926408), RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD): □ 7,21 (m, 1H), 7,14-7,03 (m, 5H), 6,50 (m, 1H), 6,44 (m, 1H), 6,16 (s, 1H); LCMS: tiempo de ret.: 25,14 min.; pureza: 99%; MS (m/e): 329 (M <sup>+</sup> ); y producto tris-SNAr, N2,N4,N6-tris(3-hidroxiifenil)-2,4,6-pirimidintriamina (R926409), RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD): □ 7,29 (m, 1H), 7,12-7,05 (m, 5H), 7,02 (m, 2H), 6,88 (dd, 2H, J = 1,2 y 8,1 Hz), 6,46 (dd, 1H, J = 1,5 y 8,1 Hz), 6,41 (dt, 1H); LCMS: tiempo de ret.: 20,49 min.; pureza: 94%; MS(m/e): 402 (MH <sup>+</sup> ).
7.3.1102	N2,N4-Bis(4-metoxicarbonilmetilenoifenil)-6-cloro-2,4-pirimidindiamina (R926411)	De manera similar a la reacción de 2,4,6-tricloropirimidina con 3-hidroxianilina, la reacción de 2,4,6-tricloropirimidina con 4-aminofenoacetato de metilo dio N2,N4-bis(4-metoxicarbonilmetilenoifenil)-6-cloro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD): □ 7,65 (bs, 1H), 7,40 (bd, 4H), 6,82 (bd, 4H), 6,00 (s, 1H), 6,62 (bs, 4H), 3,78 (bs, 6H); LCMS: tiempo de ret.:



Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.3.1103	Reacción de 2,4,6-tricloropirimidina con 3,4-etilendioxianilina 4,6-Dicloro-N2-(3,4-etilendioxifenil)-2-pirimidinamina (R926515) N2,N4-Bis(3,4-etilendioxifenil)-6-cloro-2,4-pirimidinamina (R926245) N2,N4,N6-Tris(3,4-etilendioxifenil)-2,4,6-pirimidinotriamina (R926516)	29,87 min.; pureza: 98%; MS (m/e): 473 (MH+). Una mezcla de 2,4,6-tricloroanilina (1 mmol) y 3,4-etilendioxianilina (3 mmol) en 5 ml de MeOH se calentó a 100 °C en un vial cerrado durante 24h. La mezcla de reacción se diluyó con H <sub>2</sub> O, se acidificó con HCl 2N y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Con la eliminación del disolvente, el residuo se purificó mediante cromatografía (así como TLC preparativa) para dar tres productos, principalmente el producto Mono-SNAr, 4,6-dicloro-N2-(3,4-etilendioxifenil)-2-pirimidinamina (R926515). RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ 7,05 (s, 1H), 6,83 (m, 2H), 6,45 (bs, 1H), 4,20 (bs, 4H); LCMS: tiempo de ret.: 29,75 min.; pureza: 96%; MS (m/e): 298 (M+); producto Bis-SNAr, N2,N4-bis(3,4-etilendioxifenil)-6-cloro-2,4-pirimidinamina (R926245): RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 7,23 (d, 1H, J= 3 Hz), 6,90-6,70 (m, 6H), 6,02 (s, 1H), 4,26 (bs, 4H), 4,23 (m, 4H); LCMS: tiempo de ret.: 31,34 min.; pureza: 95%; MS (m/e): 413 (MH+) y producto Tris-SNAr, N2,N4,N6-tris(3,4-etilendioxifenil)-2,4,6-pirimidinotriamina (R926516) RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ 7,16 (d, 1H, J= 3Hz), 7,05 (bd, 1H), 6,99-6,90 (m, 3H), 6,80-6,70 (m, 4H), 6,03 (s, 1H), 4,22 (s, 4H), 4,20 (s, 8H); LCMS: tiempo de ret.: 27,72 min.; pureza: 61%; MS (m/e): 528 (M+).
7.3.1104	Reacción de 2,4,6-tricloropirimidina con 4-aminofenoxiacetato de etilo 4,6-dicloro-N2-(4-etoxicarbonilmetil)-4,6-dicloro-2-pirimidinamina (R926549) 2,6-dicloro-N4-(etoxicarbonilmetil)-4-pirimidinamina (R926550)	Una mezcla de 2,4,6-tricloroanilina (1 mmoles) y 2-aminoacetato de etilo (3 mmoles) en 5 ml de MeOH se calentó a 100°C en un vial cerrado herméticamente, durante 24h. La mezcla de reacción se diluyó con H <sub>2</sub> O, se acidificó con HCl 2N y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Al eliminar el disolvente, el residuo se purificó mediante cromatografía (así como TLC preparativa) para dar tres productos, principalmente el producto de la mono-SNAr, 4,6-dicloro-N2-(4-etoxicarbonilmetil)-4,6-dicloro-2-pirimidinamina (R926549). RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 6,67 (s, 1H), 5,85 (bs, 1H), 4,23 (q, 2H, J = 7,2 Hz), 4,19 (s, 2H), 1,29 (t, 3H, J = 7,2 Hz); LCMS: tiempo de ret.: 26,18 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 250 (MH <sup>+</sup> ); y Mono-SNAr product, 2,6-dicloro-N4-(etoxicarbonilmetil)-4-pirimidinamina (R926550): RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 6,37 (bs, 1H), 4,28 (q, 2H, J = 6,9 Hz), 4,19 (bs, 2H), 1,31 (t, 3H, J = 7,2 Hz)
7.3.1105	6-Cloro-N2-(4-etoxicarbonilmetileno)fenil)-N4-(metoxicarbonilmetil)-2,4-pirimidinamina (R926555)	De manera similar a la preparación de 4-féster etílico de N-(L)-fenilalanina]-N2-(3-hidroxifenil)-5-etoxicarbonil-2-pirimidinamina, la reacción de 4-aminofenoxiacetato de etilo con 2-aminoacetato de metilo 6-cloro-N2-(4-etoxicarbonilmetileno)fenil)-N4-(metoxicarbonilmetil)-2,4-pirimidinamina. RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ 7,40 (d, 2H, J= 8,7 Hz), 6,86 (d, 2H, J= 9,3 Hz), 5,97 (s, 1H), 4,64 (s, 2H), 4,26 (q, 2H, J= 7,2 Hz), 4,14 (q, 2H, J= 6,9 Hz), 4,05 (s, 2H), 1,25 (m, 6H); LCMS: tiempo de ret.: 26,21 min.; pureza: 93%; MS (m/e): 409 (MH+).
7.3.1106	Reacción de 3,4-etilendioxianilina con 2,4,5,6-tetracloropirimidina N4-(3,4-Etilendioxifenil)-2,5,6-tricloro-4-pirimidinamina (R926466) N2,N4-Bis(3,4-etilendioxifenil)-5,6-dicloro-2,4-pirimidinamina (R926467) y N4,N6-Bis(3,4-etilendioxifenil)-2,5-	Una mezcla de 3,4-etilendioxianilina (0.775 g, 5 mmoles) y 2,4,5,6-tetracloropirimidina (0.434 g, 2 mmoles) en presencia de DIPEA (1,043 ml, 6 mmoles) en EtOAc (10 ml) se calentó a 80 °C durante 3 días. La reacción se diluyó con agua (50 ml), se acidificó (HCl 2N) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). El residuo obtenido tras la eliminación se cromatografió usando 5-30% EtOAc/hexanos para obtener tres productos, a saber, N4-(3,4-Etilendioxifenil)-2,5,6-tricloro-4-

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
	dicloro-4,6-pirimidindiamina (R926468)	pirimidinamina (R926466): RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 7,18 (d, 1H, J = 2,7 Hz), 6,92 (dd, 1H, J = 2,1 and 8,7 Hz), 6,87 (d, 1H, J = 9 Hz); LCMS: tiempo de ret.: 33,53 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 292 (MH <sup>+</sup> ); N2,N4-Bis(3,4-etilendioxfenil)-5,6-dicloro-2,4-pirimidindiamina (R926467): RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 7,11 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,06 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,04 (s, 1 HO, 6,94 (m, 2H), 6,84 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 6,76 (bd, 2H, J = 8,7 Hz), 4,27 (bs, 4H), 4,24 (bs, 1H); LCMS: tiempo de ret.: 26,54 min.; pureza: 87%; MS (m/e): 364 (MH <sup>+</sup> ); y N4,N6-Bis(3,4-etilendioxfenil)-2,5-dicloro-4,6-pirimidindiamina (R926468): RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 7,07 (t, 1H, J = 2,4 Hz), 6,99 (s, 2H), 6,83 (dd, 2H, J = 2,4 y 8,7 Hz), 6,75 (dd, 2H, J = 1,8 y 9 Hz), 4,19 (bs, 4H); LCMS: tiempo de ret.: 34,70 min.; pureza: 99%; MS (m/e): 365 (MH <sup>+</sup> ).
7.3.1107	Reacción de 2,4,5,6-tetracloropirimidina con 4-aminofenoxiacetato de etilo N4-(4-etoxicarbonilmetileno)fenil)-2,5,6-tricloro-4-pirimidinamina (R926568) N2,N4-Bis(4-etoxicarbonilmetileno)fenil)-5,6-dicloro-2,4-pirimidindiamina (R926569) N2,N5-Bis(4-etoxicarbonilmetileno)fenil)-2,5-pirimidindiamina (R926570)	De manera similar a la reacción de 2,4,6-tricloropirimidina con 3,4-etilendioxiacetato de etilo dio una mezcla de producto de 2,4,5,6-tetracloropirimidina con 4-aminofenoxiacetato de etilo dio una mezcla de producto mono-SNAr, N4-(4-etoxicarbonilmetileno)fenil)-2,5,6-tricloro-4-pirimidinamina (R926568): RMN 1H NMR (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 7,46 (dd, 2H, J = 2,4 y 6,9 Hz), 7,3 (s, 1H), 6,95 (dd, 2H, J = 2,4 y 6,9 Hz), 4,63 (s, 2H), 4,28 (q, 2H, J = 7,2 Hz), 1,30 (t, 3H, J = 7,2 Hz); LCMS: tiempo de ret.: 30,62 min.; pureza: 99%; MS (m/e): 378 (MH <sup>+</sup> ); producto Bis-SNAr, N2,N4-bis(4-etoxicarbonilmetileno)fenil)-5,6-dicloro-2,4-pirimidindiamina (R926569): RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 7,42 (d, 2H, J = 9 Hz), 7,35 (d, 2H, J = 8,7 Hz), 6,90 (d, 2H, J = 9 Hz), 6,83 (d, 2H, J = 8,7 Hz), 4,67 (s, 2H), 4,60 (s, 2H), 4,28 (2q, 4H, J = 4,8 Hz), 1,31 (2t, 6H, J = 6,3 Hz); LCMS: tiempo de ret.: 33,09 min.; pureza: 85%; MS (m/e): 537 (MH <sup>+</sup> ) y producto Bis-SNAr, N2,N5-bis(4-etoxicarbonilmetileno)fenil)-2,5-pirimidindiamina (R926570): RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 7,45 (d, 4H, J = 8,7 Hz), 6,92 (d, 4H, J = 9 Hz), 6,85 (s, 1H), 4,61 (s, 4H), 4,26 (q, 4H, J = 6,9 Hz), 1,30 (t, 6H, J = 7,2 Hz); LCMS: tiempo de ret.: 31,66 min.; pureza: 97%; MS (m/e): 535 (MH <sup>+</sup> ).
7.3.1108	Reacción de 2,4,5,6-tetracloropirimidina con 4-aminofenoxiacetato de terc-butilo, N4-(4-terc-butoxicarbonilmetileno)fenil)-2,5,6-tricloro-4-pirimidinamina (R926575), N2,N4-Bis(4-terc-butoxicarbonilmetileno)fenil)-5,6-dicloro-2,4-pirimidindiamina (R926576) y N4,N6-Bis(4-terc-butoxicarbonilmetileno)fenil)-2,5-dicloro-4,6-pirimidindiamina (R926577)	De manera similar a la reacción de 2,4,6-tricloropirimidina con 3,4-etilendioxiacetato de etilo dio una mezcla de 2,4,5,6-tetracloropirimidina con 4-aminofenoxiacetato de terc-butilo dio una mezcla de producto mono-SNAr, N4-(4-terc-butoxicarbonilmetileno)fenil)-2,5,6-tricloro-4-pirimidinamina (R926575): RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 7,45 (dd, 2H, J = 2,4 y 7,2 Hz), 6,93 (dd, 2H, J = 2,4 and 7,2 Hz), 4,52 (s, 2H); LCMS: tiempo de ret.: 32,56 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 402 (MH <sup>+</sup> ); producto Bis-SNAr, N2,N4-bis(4-terc-butoxicarbonilmetileno)fenil)-5,6-dicloro-2,4-pirimidindiamina (R926576): RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 7,42 (d, 2H, J = 9 Hz), 7,35 (d, 2H, J = 9,3 Hz), 7,08 (s, 1H), 6,90 (d, 2H, J = 9,3 Hz), 6,82 (d, 2H, J = 8,7 Hz), 4,53 (s, 2H), 4,49 (s, 2H), 1,50 (s, 9H), 1,49 (s, 9H); LCMS: tiempo de ret.: 36,04 min.; pureza: 92%; MS (m/e): 591 (MH <sup>+</sup> ) y producto Bis-SNAr, N4,N6-bis(4-terc-butoxicarbonilmetileno)fenil)-2,5-dicloro-4,6-pirimidindiamina (R926577): RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 7,43 (d, 4H, J = 8,7 Hz), 6,90 (dd, 4H, J = 9,3 Hz), 4,50 (s, 2H), 1,49 (s, 18H); LCMS: tiempo de ret.: 35,31 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 591 (MH <sup>+</sup> ).
7.3.1109	Reacción de 2,4,5,6-tetracloropirimidina con 3-hidroxianilina, N4-(3-Hidroxifenil)-2,5,6-tricloro-4-	De manera similar a la reacción de 2,4,6-tricloropirimidina con 3,4-etilendioxiacetato de etilo dio una mezcla de 2,4,5,6-tetracloropirimidina con 4-aminofenoxiacetato de terc-butilo dio una mezcla de

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
	pirimidinamina (R926590), N2,N4- Bis(3-hidroxifenil)-5,6-dicloro-2,4-pirimidindiamina (R926591) y N4,N6-Bis(3-hidroxifenil)-2,5-dicloro-4,6-pirimidindiamina (R926592)	producto mono-SNAr, N4-(3-hidroxifenil)-2,5,6-tricloro-4-pirimidinamina (R926590): RMN 1H (CDCl3): $\delta$ 7,38 (bs, 1H), 7,32 (t, 1H, J=2,4 Hz), 7,22 (s, 1H), 7,01 (dd, 1H, J= 1,2 y 8,1 Hz), 6,68 (dd, 1H, J= 1,8 y 8,1 Hz); LCMS: tiempo de ret.: 26,09 min.; pureza: 99%; MS (m/e): 292 (MH+); producto Bis-SNAr, N2,N4-bis(3-hidroxifenil)-5,6-dicloro-2,4-pirimidindiamina (R926591): RMN 1H (CDCl3): $\delta$ 7,45 (s, 1H), 7,30 (t, 1H, J= 2,4 Hz), 7,18 (t, 1H, J= 2,4 Hz), 7,07 (t, 1H, J= 6,6 Hz), 6,98 (t, 1H, J= 8,1 Hz), 6,75 (m, 2H), 6,54 (dd, 1H, J= 2,4 y 8,1 Hz); LCMS: tiempo de ret.: 26,54 min.; pureza: 87%; MS (m/e): 364 (MH+); y producto Bis-SNAr, N4,N6-bis(3-hidroxifenil)-2,5-dicloro-4,6-pirimidindiamina (R926592): RMN 1H (CDCl3): $\delta$ 7,34 (t, 2H, J= 2,4 Hz), 7,21 (t, 2H, J= 7,5 Hz), 6,98 (m, 4H), 6,60 (m, 2H); LCMS: tiempo de ret.: 25,38 min.; pureza: 73%; MS (m/e): 364 (MH+).
	Síntesis de anilinas	
7.4.6	3-cloro-4-(metoxicarbonilmetileno)nitrobenzo	Un matraz de reacción seco equipado con una barra de agitación magnética, condensador de reflujo y una entrada de N <sub>2</sub> se cargó con un 2-cloro-4-nitrofenol comercialmente disponible (3,48 g, 20 mmoles), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3,03 g, 21,81 mmoles) y acetona seca (100 ml) en una atmósfera de N <sub>2</sub> . Se añadió bromoacetato de metilo (1,72 ml, 18,18 mmoles) y se puso a reflujo durante 6 horas. Al enfriar, la mezcla de reacción se diluyó con agua con hielo (1 litro), el sólido obtenido se filtró, se lavó con agua (2 x 50 ml), y se secó para dar 3-cloro-4-(metoxicarbonilmetileno)nitrobenzo. RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 8,33 (d, 1H, J = 3 Hz), 8,13 (dd, 1H, J = 2,7 y 9,3 Hz), 6,87 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 4,84 (s, 2H), 3,83 (s, 3H); LCMS: pureza: 87%; MS (m/e): 287 (M+ acetónitrilo).
7.4.7	3-cloro-4-(metoxicarbonilmetileno)anilina	A una disolución de 3-cloro-4-(metoxicarbonilmetileno)nitrobenzo (1,00 g) en MeOH (50 ml) se añadió 0,050 g de Pd al 10%/C, se desgasificó y se hidrogenó con un balón lleno de hidrógeno (aprox. 1 atmósfera) durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite, se concentró, y el residuo resultante se sometió entonces a ultrasonidos con acetato de etilo y se filtró. El filtrado, al concentrarlo y secarlo a alto vacío, dio la 3-cloro-4-(metoxicarbonilmetileno)anilina. RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ 6,79 (d, 1H, J = 9 Hz), 6,73 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 6,50 (dd, 1H, J = 2,7 y 9,3 Hz), 4,60 (s, 2H), 3,80 (s, 3H); LCMS: pureza: 87%; MS (m/e): 216 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.8	3-cloro-4-(2-hidroxietileno)nitrobenzo	Un matraz de reacción seco equipado con una barra de agitación magnética, una entrada de N <sub>2</sub> y un tabique de caucho se cargó con 3-cloro-4-(metoxicarbonilmetileno)nitrobenzo (1,23 g, 5 mmoles) y CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (50 ml) en una atmósfera de N <sub>2</sub> . La disolución de la reacción se enfrió hasta -78°C y se añadió hidruro de diisobutilaluminio (1,0 M en tolueno, 15 ml, 15 mmoles) a lo largo de un período de 15 minutos. La mezcla de reacción se agitó a -78°C durante 2 horas y a temperatura ambiente durante 1 hora, se paralizó con disolución saturada de sal de Rochelle y nuevamente se agitó durante 2 horas. La extracción con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , secando sobre Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anhidro

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.9	3-cloro-4-(2-hidroxietileno)anilina	y la evaporación del disolvente dio 3-cloro-4-(2-hidroxietileno)nitrobenzoceno. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,30 (d, 1H, J = 3 Hz), 8,15 (dd, 1H, J = 2,4 y 9 Hz), 7,02 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 4,25 (t, 2H, J = 4,8 Hz), 4,07 (m, 2H); LCMS: pureza: 92%.
7.4.10	2-(N-Metilaminocarbonil)-5-nitrobenzofurano	De la misma manera que para la preparación de 3-cloro-4-(metoxicarbonilmetileno)anilina, la hidrogenación de 3-cloro-4-(2-hidroxietileno)nitrobenzoceno con balón lleno de hidrógeno (aprox. 1 atmósfera) en presencia de Pd al 10%/C como catalizador dio 3-cloro-4-[2-hidroxietileno]anilina. LCMS: MS (m/e): 187 (M <sup>+</sup> )
7.4.11	(+)5-Amino-[2-(N-metilaminocarbonil)-2,3-dihidro]benzofurano	Un matraz de reacción seco equipado con una barra de agitación magnética, un tabique de caucho y una entrada de N <sub>2</sub> se cargó con 2-carboxi-5-nitrobenzofurano (2,07 g, 10 mmoles), N,N-dimetilformamida (DMF) (0,100 ml) y CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (50 ml) en una atmósfera de N <sub>2</sub> . La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, y se le añadió cloruro de oxalilo [(COCl) <sub>2</sub> ] (2,65 ml, 30 mmoles) a lo largo de un periodo de 10 minutos. La mezcla resultante se agitó durante 2 horas en el momento en que la temperatura de 0°C se convirtió en la temperatura ambiente y también la reacción se convirtió en una disolución transparente. Se concentró y se secó a alto vacío para dar el cloruro de ácido intermedio. El cloruro de ácido se enfrió hasta 0° se le añadieron CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (50 ml), piridina (2,96 ml, 30 mmoles) seguido de sal de hidrocloreuro de metilamina (1,34 g, 20 mmoles). Al agitar durante 24 horas a temperatura ambiente, el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se suspendió en agua (200 ml). El sólido formado se filtró, se lavó bien con agua y se secó para dar 2-(N-metilaminocarbonil)-5-nitrobenzofurano. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,63 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 8,33 (dd, 1H, J = 2,4 y 9,3 Hz), 7,60 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,59 (s, 1H), 3,07 (d, 3H, J = 4,8 Hz); LCMS: pureza: 98%; MS (m/e): 221 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.12	2-(N,N-Dimetilaminocarbonil)-5-nitrobenzofurano	Una suspensión de 2-(N-metilaminocarbonil)-5-nitrobenzofurano (1,5 g), Pd al 10%/C (1,5 g), Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1,5 g) en MeOH (200 ml) se hidrogenó a 55 PSI durante 3 días. La disolución resultante se filtró a través de una almohadilla de celite, se concentró para dar (+)-5-amino-[2-(N-metilaminocarbonil)-2,3-dihidro]benzofurano. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 6,65 (m, 2H), 6,53 (m, 1H), 5,01 (dd, 1H, J = 6,0 y 6,6 Hz), 3,46 (dd, 1H, J = 9,9 y 10,2 Hz), 3,18 (dd, 1H, J = 6,0 y 4,2 Hz), 2,75 (d, 3H).
7.4.13	(+)5-Amino-[2-(N,N-dimetilaminocarbonil)-2,3-dihidro]benzofurano	De la misma manera que para la preparación de 2-(N-metilaminocarbonil)-5-nitrobenzofurano, la reacción de 2-carboxi-5-nitrobenzofurano con cloruro de oxalilo seguido de la sal de dihidrocloreuro de metilamina dio 2-(N,N-dimetilaminocarbonil)-5-nitrobenzofurano. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,61 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 8,31 (dd, 1H, J = 2,4 y 9,3 Hz), 7,63 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 7,40 (s, 1H), 3,35 (s, 3H), 3,17 (s, 3H); LCMS: pureza: 97%; MS (m/e): 235 (MH <sup>+</sup> ).
		De la misma manera que para la preparación de (+)-5-amino-[2-(N-metilaminocarbonil)-2,3-dihidro]benzofurano, la hidrogenación de 2-(N,N-dimetilaminocarbonil)-5-nitrobenzofurano

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.14	2-[(1R,2S,5R)-Mentiloxicarbonil]-5-nitrobenzofurano	<p>producto (+)-5-amino-[2-(N,N-dimetilaminocarbonil)-2,3-dihidro]benzofurano. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 6,44 (m, 2H), 6,27 (dd, 1H, J = 2,1 y 8,7 Hz), 5,42 (dd, 1H, J = 6,5 y 7,5 Hz), 4,54 (bd, J = 5,4 Hz), 3,23 (m, 2H), 2,83 (s, 3H), 2,82 (s, 3H); LCMS: pureza: 70%; MS (m/e): 207 (MH<sup>+</sup>).</p> <p>De la misma manera que para la preparación de 2-(N-metilaminocarbonil)-5-nitrobenzofurano, la reacción de 2-carboxi-5-nitrobenzofurano con cloruro de oxalilo, seguido del tratamiento con (1R,2S,5R)-(-)-mentol dio 2-[(1R,2S,5R)-mentiloxicarbonil]-5-nitrobenzofurano. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,63 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 8,35 (dd, J = 2,4 y 8,7 Hz), 7,69 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 7,62 (s, 1H), 5,00 (dt, 1H, J = 4,8 y 10,5 Hz), 2,14 (bd, 1H, J = 9,3 Hz), 1,95 (m, 1H), 1,76 (m, 2H), 1,56 (m, 3H), 1,11 (m, 2H), 0,94 (d, 3H), 0,93 (d, 3H), 0,82 (d, 3H, J = 7,2 Hz); LCMS: pureza: 99,67%.</p>
7.4.15	5-Amino-[2(R)-(1R,2S,5R)-mentiloxicarbonil]-2,3-dihidro]benzofurano	<p>De la misma manera que para la preparación de (+)-5-amino-[2-(N-metilamino)carbonil]-2,3-dihidrobenzofurano, la hidrogenación de 2-[(1R,2S,5R)-mentiloxicarbonil]-5-nitrobenzofurano produjo una mezcla diastereómera de 5-amino-[2-(1R,2S,5R)-mentiloxicarbonil]-2,3-dihidro]benzofurano, a partir de la cual se aisló el 5-amino-[2(R)-(1R,2S,5R)-mentiloxicarbonil]-2,3-dihidro]benzofurano como un diastereómero cristalino usando el método de cristalización de difusión en disolvente* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:n-hexanos). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 6,77 (bd, (1H), 6,73 (bs, 1H), 6,68 (dd, 1H, J = 2,4 y 8,7 Hz), 5,11 (dd, 1H, J = 6,9 y 7,5 Hz), 4,76 (dt, 4,5 y 11,1 Hz), 3,49 (dd, 1H, J = 9,9 y 10,5 Hz), 3,25 (dd, 1H, J = 7,2 y 7,8 Hz), 1,99 (bd, 1H), 1,86 (dpent, 1H, J = 3,0 y 6,9 Hz), 1,70 (m, 1H), 1,66 (m, 1H), 1,46 (m, 2H), 1,02 (m, 1H), 0,90 (d, 3H, 7,2 Hz), 0,89 (d, 3H, J = 6,6 Hz), 0,75 (d, 3H, J = 6,9 Hz); MS (m/e): 318 (MH<sup>+</sup>).</p> <p>* Método de difusión en disolvente: La molécula orgánica se disolvió en una cantidad mínima de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y el recipiente se colocó en un tarro que contiene anti-disolvente (n-hexanos), se colocó la tapa para evitar una pérdida de disolvente y se les dejó equilibrar hasta que se observó cristalización. Los cristales resultantes se aislaron mediante decantación del disolvente.</p>
7.4.16	3,5-dicloro-4-metoxianilina	<p>A una disolución de 3,5-dicloro-4-metoxinitrobenzeno comercialmente disponible (1,00 g, 4,5 mmoles) en MeOH (100 ml) se añadió Pd al 10%/C (0,100 g), se desgasificó y se hidrogenó usando un balón lleno de hidrógeno (aprox. 1 atmósfera) durante 2 horas. Con la filtración a través de celite y la concentración dio 3,5-dicloro-4-metoxianilina, que se aisló como la sal de hidrocloreto de 3,5-dicloro-4-metoxianilina mediante acidificación con una cantidad equivalente de HCl (4M, dioxano). Como alternativa, esta transformación también se logró agitando 3,5-dicloro-4-metoxinitrobenzeno (1,00 g, 4,5 mmoles) con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (3,91 g, 22,5 mmoles) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,12 g, 22,5 mmoles) en MeOH:H<sub>2</sub>O (50 ml, cada uno) a temperatura ambiente durante 24 horas. La extracción con acetato de etilo, seguido de la eliminación del disolvente dio 3,5-dicloro-4-metoxianilina. LCMS: pureza: 87%; MS (m/e): 233 (M+ acetónitrilo).</p>
7.4.17	4-cloro-3-metoxianilina	<p>A una disolución de 3,5-dicloro-4-metoxinitrobenzeno comercialmente disponible (1,00 g, 4,5 mmoles) en MeOH (100 ml) se añadió Pd al 10%/C (0,100 g), se desgasificó y se hidrogenó</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.18	4-cloro-3,5-dimetilanilina	usando un balón lleno de hidrógeno (aprox. 1 atmósfera) durante 2 horas. Con la filtración a través de celite y la concentración dio 3,5-dicloro-4-metoxianilina, que se aisló como la sal de hidrocloruro de 3,5-dicloro-4-metoxianilina mediante acidificación con una cantidad equivalente de HCl (4M, dioxano). Como alternativa, esta transformación también se logró agitando 3,5-dicloro-4-metoxinitrobenzoceno (1,00 g, 4,5 mmoles) con Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (3,91 g, 22,5 mmoles) y K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3,12 g, 22,5 mmoles) en MeOH:H <sub>2</sub> O (50 ml, cada uno) a temperatura ambiente durante 24 horas. La extracción con acetato de etilo seguido de la eliminación del disolvente dio 3,5-dicloro-4-metoxianilina. LCMS: pureza: 87%; MS (m/e): 233 (M+ acetónitrilo).
7.4.19	3,4,5-Trimetilanilina	A una suspensión de 4-cloro-3,5-dimetinitrobenzoceno comercialmente disponible (0,185 g, 1 mmol) en EtOH: H <sub>2</sub> O (5 ml, each) a temperatura ambiente se añadió cloruro de amonio (0,265 g, 5 mmoles) y polvo de hierro (0,280 g, 5 mmoles), se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente seguido de 10 minutos a 60°C. Al enfriar hasta la temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite, se lavó con etanol y el filtrado se concentró. El residuo resultante se diluyó con agua, se saturó con cloruro de sodio y se extrajo con acetato de etilo. El disolvente orgánico se eliminó a presión reducida para dar la 4-cloro-3,5-dimetilanilina deseada. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 6,34 (s, 2H), 3,42 (bs, 2H), 2,20 (s, 6H); LCMS: pureza: 82%; MS: 156 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.91	Síntesis de anilinas y productos mono SNAr	De la misma manera que para la hidrogenación de 3-(metoxicarbonilmetileno)anilina, la hidrogenación de 3,4,5-trimetinitrobenzoceno comercialmente disponible dio 3,4,5-trimetilanilina. LCMS: pureza: 91%; MS (m/e): 136 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.92	2-Isopropoxi-5-nitropiridina	Una disolución de 2-bromo-5-nitropiridina (1,0 g, 4,9 mmoles), t-butoxido de potasio (6,9 ml, 6,9 mmoles, disolución 1N en THF), y alcohol isopropílico (75 ml) se calentó a 75°C durante 2 días. La mezcla de reacción se concentró a vacío, y el residuo se suspendió en agua y se sometió a ultrasonidos a temperatura ambiente durante varios minutos. El producto se recogió como un sólido bronceado mediante filtración. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 9,06 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 8,31 (dd, J = 3,0 y 9,3 Hz, 1H), 6,73 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 5,43 (quintete, J = 5,7 Hz, 1H), y 1,37 (d, J = 6,3 Hz, 1H).
7.4.94	5-Amino-2-isopropoxipiridina	De la misma manera que para la preparación de 4-aminofenoxiacetato de etilo, se llevó a cabo la hidrogenación de 2-isopropoxi-5-nitropiridina para preparar 5-amino-2-isopropoxipiridina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,65 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 7,01 (dd, J = 3,0 y 8,7 Hz, 1H), 6,54 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 5,13 (quintete, J = 6,6 Hz, 1H), 3,20 (bs, 2H), y 1,32 (d, J = 6,6 Hz, 6H).
7.4.94	3-cloro-4-(N-morfolino)nitrobenzoceno	Una mezcla de 2-cloro-4-fluoronitrobenzoceno (1,36 g, 7,72 mmoles) y morfolina (8,0 ml, 90

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.95	3-cloro-4-(N-morfolino)anilina	mmoles) se calentó a 80°C durante 3 horas. La mezcla de reacción se vertió en agua (150 ml) y el producto se recogió como un sólido amarillo tras la filtración. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,26 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 8,11 (dd, J = 3,0 ad 9,3 Hz, 1H), 7,05 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 3,91-3,87 (m, 4H), y 3,23-3,19 (m, 4H).
7.4.97	3-cloro-4-isopropoxinitrobenzoceno	A una disolución de 3-cloro-4-(N-morfolino)nitrobenzoceno (1,0g, 4,1 mmoles) en etanol/agua (70 ml, 2:1) se añadió polvo de hierro (1,4 g, 25 mmoles) seguido de NH <sub>4</sub> Cl (0,46 g, 8,6 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y después se calentó a 70°C durante 1,5 h. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró a través de celite, y la torta del filtro se lavó con metanol. La concentración del filtrado a vacío dio un sólido blanco, que se disolvió en acetato de etilo y se lavó con NaHCO <sub>3</sub> (aq) y salmuera. La capa orgánica se secó entonces (MgSO <sub>4</sub> ), se filtró, y se concentró a vacío para dar el producto como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 6,98-6,91 (m, H), 6,82 (bs, 1H), 6,67-6,61 (m, 1H), 3,90-3,82 (m, 4H), y 3,02-2,90 (m, 4H).
7.4.98	3-cloro-4-isopropoxianilina	De la misma manera que para la preparación de 2-isopropoxi-5-nitropiridina, se hizo reaccionar 3-cloro-4-fluoronitrobenzoceno con isopropanol y t-butoxido de potasio para dar 3-cloro-4-isopropoxinitrobenzoceno. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,26 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 8,11 (dd, J = 3,0 y 8,7 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 4,71 (quintete, J = 6,0 Hz, 1H), y 1,43 (d, J = 6,0 Hz, 6H).
7.4.100	5-Amino-2-(N,N-dimetilaminometil)benzofurano	De la misma manera que para la preparación de 3-cloro-4-(N-morfolino)anilina, se redujo 3-cloro-4-isopropoxinitrobenzoceno para dar 3-cloro-4-isopropoxianilina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 6,80 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 6,59 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,43 (dd, J = 3,0, 8,7 Hz, 1H), 4,92 (bs, 2H), 4,24 (quintete, J = 5,7 Hz, 1H), y 1,18 (d, J = 5,7 Hz, 6H).
7.4.100	5-Amino-2-(N,N-dimetilaminometil)benzofurano	Se añadió complejo de borano-sulfuro de metilo (4,0 ml, 43 mmoles) a una suspensión de 2-[(N,N-dimetilamino)carbonil]-5-nitrobenzofurano (1,0 g, 43 mmoles) en THF anhídrido (10 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 3h. Al enfriar, el disolvente se eliminó a vacío para dar un sólido parecido a un gel. Se añadió gota a gota con cuidado metanol (50 ml) frío (0°C), y la mezcla resultante se calentó a 80°C durante 30 min proporcionando una disolución amarilla transparente. El disolvente se eliminó a vacío, y el sólido resultante se suspendió en metanol (50 ml), y se añadió HCl (1,5 ml, 4N en dioxano). Tras calentar a 80°C durante 30 min, el disolvente se eliminó a presión reducida para dar un sólido amorfo. El sólido se disolvió en metanol (20 ml), y se añadió amoniaco (2N en metanol) hasta que se puso básico. Se formó un precipitado tras la dilución con diclorometano (50 ml). La filtración y la concentración dieron 2-(N,N-dimetilaminometil)-5-nitrobenzofurano bruto como un aceite amarillo (1,0 g), que se usó sin purificación adicional. A una suspensión de 2-(N,N-dimetilaminometil)-5-nitrobenzofurano bruto (1,0 g) en metanol (desgasificado, 60 ml) se añadió Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (0,50 g) y Pd al 10%/C (100 mg). La mezcla de reacción se agitó en un atmósfera de H <sub>2</sub> durante 10 h. Los sólidos se eliminaron

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
		mediante filtración a través de auxiliar de filtración de Celite®, y la torta del filtro se lavó varias veces con metanol. La concentración dio un aceite amarillo oscuro. El producto, 5-amino-2-(N,N-dimetilaminometil)benzofurano, se obtuvo después de la purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (fase móvil: 0% a 5% metanol (que contiene 2N NH <sub>3</sub> )/dichlorometano). RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD): δ 7,24 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 6,91 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6,76 (dd, 1H, J = 2,4 y 8,7 Hz), 6,65 (s, 1H), 3,87 (s, 2H), 2,48 (s, 6H).
	Bis-SNAr y reacciones subsiguientes	
	Síntesis de anilinas	
7.4.139	2-cloro-6-metil-4-nitrofenol	A una suspensión de 6-metil-4-nitrofenol comercialmente disponible (5 g, 32,6 mmoles) en agua (300 ml) a temperatura ambiente se añadió N-clorosuccinimida (8,7 g, 32,6 mmoles) seguido de una disolución acuosa hidróxido de potasio 5N (13 ml, 65,2 mmoles). Después de agitarla a temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción resultante se acidificó con HCl 2N (pH >2) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), se concentró, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc:n-hexanos 15 : 85; v/v) para dar 2-cloro-6-metil-4-nitrofenol (3,7 g, 60%). RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 10,84 (1H, s), 8,20 (1H, d, J = 3,3 Hz), 8,13 (1H, dt, J = 2,7 Hz, J = 0,6 Hz), 2,39 (3H, s); LCMS: pureza: 96,69%.
7.4.140	4-Amino-2-cloro-6-metilfenol	Se disolvió 2-cloro-6-metil-4-nitrofenol (2,5 g, 13,32 mmoles) en AcOH glacial (22 ml), y se añadió polvo de hierro (2,23 g, 40 mmoles). La mezcla se calentó a 90°C con agitación mecánica durante 2 horas, después se enfrió hasta la temperatura ambiente y se diluyó con EtOAc (200 ml). La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se lavó con salmuera, se secó (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) y se concentró a vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> para dar 4-amino-2-cloro-6-metilfenol (1,03 g, 50%). RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 8,02 (1H, d, J = 0,9 Hz), 6,47 (1H, d, J = 2,1 Hz), 6,38 (1H, d, J = 2,4 Hz), 4,74 (2H, s), 2,16 (3H, s).
7.4.141	3-cloro-4-metoxi-5-metilnitrobenzoceno	A una disolución de 2-cloro-6-metil-4-nitrofenol (1,2 g, 6,5 mmoles) en acetona (10 ml) se añadió carbonato de potasio (1,34 g, 9,75 mmoles) seguido de sulfato de dimetilo (1,33 ml, 7,8 mmoles). La mezcla se agitó a reflujo durante 2 horas. Se añadió hidróxido de amonio (1 ml), y la mezcla se calentó a reflujo durante 30 minutos. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente, y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se vertió en agua, se saturó con cloruro de sodio, y el sólido resultante se filtró para dar el 3-cloro-4-metoxi-5-metilnitrobenzoceno deseado (1,1 g, 84%). RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 8,28 (1H, d, J = 2,7 Hz), 8,24 (1H, dt, J = 2,7 Hz, J = 0,75 Hz), 3,95 (3H, d, J = 0,9 Hz), 2,48 (3H, d, J = 0,9 Hz); LCMS: pureza: 98%.



Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.142	3-cloro-4-metoxi-5-metilaniлина	Se disolvió 3-cloro-4-metoxi-5-metilnitrobenzoceno (1,1 g, 5,4 mmoles) en AcOH glacial (9 ml), y se añadió polvo de hierro (0,917 g, 16,4 mmoles). La mezcla se calentó a 90°C bajo una agitación mecánica durante 2 horas, después se enfrió hasta la temperatura ambiente y se diluyó con EtOAc (200 ml). La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se lavó con salmuera, se secó (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> para dar 3-cloro-4-metoxi-5-metilaniлина. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 6,51 (1H, d, J = 2,7 Hz), 6,41 (1H, dd, J = 1,8 Hz, J = 0,9 Hz), 5,11 (2H, s), 3,68 (3H, d, J = 0,9 Hz), 2,21 (3H, s); LCMS: pureza: 95%.
7.4.143	(+)-2-Etoxycarbonil-2-metil-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina	Una mezcla de fluoruro de potasio (KF) (1,8 g, 32,4 mmoles), DMF (10 ml), 2-bromo-2-metilmalonato de dietilo (3,2 g, 12,9 mmoles), y 4-nitro-2-aminofenol (2 g, 12,9 mmoles) se agitó durante 16 horas, después se vertió en agua, y se extrajo con EtOAc. El extracto se lavó con salmuera, se secó, y se concentró para dar (+)-2-etoxycarbonil-2-metil-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina deseada, que se recristalizó en EtOH (2,2 g, 62%). RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,47 (1H, s), 7,99 (1H, dd, J = 9 Hz, J = 2,7 Hz), 7,85 (1H, d, J = 2,7 Hz), 7,36 (1H, d, J = 8,7 Hz), 4,23 (2H, q, J = 7 Hz), 1,85 (3H, s), 1,17 (3H, t, J = 7,2 Hz); LCMS: pureza: 98%; MS (m/e): 281 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.144	(+)-6-Amino-2-etoxycarbonil-2-metil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina	Una disolución de (+)-2-etoxycarbonil-2-metil-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina (0,5 g, 1,78 mmoles) en metanol se hidrogenó a 30 PSI durante 1 hora en presencia de Pd al 10%/C (0,05 g, 10% en peso). Después de filtrar a través de una almohadilla de Celite, el disolvente se eliminó a presión reducida para obtener (+)-6-amino-2-etoxycarbonil-2-metil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 10,73 (1H, s), 6,76 (1H, d, J = 12 Hz), 6,23-6,20 (2H, m), 5,0 (2H, s), 4,16 (2H, q, J = 6,9 Hz), 1,69 (3H, s), 1,15 (3H, t, J = 6,9 Hz); LCMS: pureza: 99%; MS (m/e): 251 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.145	3,5-Dimetil-4-metoxinitrobenzoceno	A una disolución de 2,6-dimetil-4-nitrofenol (1 g, 5,9 mmoles) en acetona (9 ml) se añadió carbonato de potasio (1,22 g, 8,85 mmoles) seguido de sulfato de dimetilo (0,68 ml, 7,1 mmoles). La mezcla se agitó a reflujo durante 2 horas. Se añadió hidróxido de amonio (1 ml), y la mezcla se calentó a reflujo durante 30 minutos adicionales. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente, y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se vertió en agua, se saturó con cloruro de sodio y el sólido resultante se filtró para dar el 3,5-dimetil-4-metoxinitrobenzoceno deseado. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 8,06 (2H, s), 3,84 (3H, s), 2,42 (6H, s); LCMS: pureza: 91%.
7.4.146	3,5-Dimetil-4-metoxianilina	Una disolución de 3,5-dimetil-4-metoxinitrobenzoceno (0,83 g, 4,5 mmoles) en metanol se hidrogenó a 30 PSI durante 1 hora en presencia de Pd al 10%/C (0,1 g, 10% en peso). Después de filtrar a través de una almohadilla de Celite, el disolvente se eliminó a presión reducida para obtener 3,5-dimetil-4-metoxianilina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 6,28 (2H, s), 4,69 (2H, anchos), 3,60

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.157	N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-N2-(3-cloro-4-metoxifenil)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina R940371	(3H, d, J = 0,9 Hz), 2,16 (6H, s); LCMS: pureza: 100%. De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3-cloro-4-metoxianilina para dar N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-N2-(3-cloro-4-metoxifenil)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,20 (1H, s), 9,39 (1H, s), 9,34 (1H, s), 8,22 (1H, d, J = 3,3 Hz), 7,90 (1H, s), 7,62-7,54 (2H, m), 7,47 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,08 (1H, d, J = 9 Hz), 3,87 (3H, s), 1,53 (6H, s); LCMS: pureza: 97,92%; MS (m/e): 445 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.158	N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-N2-(3,5-dimetoxifenil)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina R940372	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3,5-dimetoxianilina para dar N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-N2-(3,5-dimetoxifenil)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,15 (1H, s), 9,34 (1H, s), 9,30 (1H, s), 8,23 (1H, d, J = 3,3 Hz), 7,74 (1H, dd, J = 8,7 Hz, J = 3,9 Hz), 7,43 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,02 (2H, s), 6,16 (1H, s), 3,75 (6H, s), 1,53 (6H, s); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 441 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.159	N2-(3,4-diclorofenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina R940373	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3,4-dicloroanilina para dar N2-(3,4-diclorofenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,20 (1H, s), 9,68 (1H, s), 9,54 (1H, s), 8,27 (1H, d, J = 3,6 Hz), 8,14 (1H, d, J = 2,1 Hz), 7,64 (1H, dd, J = 8,7 Hz, J = 2,1 Hz), 7,53-7,47 (3H, m), 1,53 (6H, s); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 449 (M <sup>+</sup> ).
7.4.160	N4-[(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(indazolín-6-il)-2,4-pirimidindiamina R940380	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 6-aminoindazol para dar N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(indazolín-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,16 (1H, s), 9,48 (1H, s), 9,28 (1H, s), 8,27 (1H, d, J = 3,3 Hz), 8,17 (1H, s), 7,98 (1H, s), 7,84 (1H, m), 7,65 (1H, d, J = 9 Hz), 7,47 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,36 (1H, d, J = 8,7 Hz), 1,53 (6H, s); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 421 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.161	N2-(3- <i>terc</i> -butilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina R940381	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3- <i>terc</i> -butilanilina para dar N2-(3- <i>terc</i> -butilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,16 (1H, s), 9,27 (1H, s), 9,23 (1H, s), 8,22

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.162	N4-[(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3-hidroxifenil)-2,4-pirimidindiamina R940382	(1H, d, J = 3,6 Hz), 7,74 (1H, m), 7,70 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,57 (1H, s), 7,44 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,205 (1H, t, J = 7,9 Hz), 7,01 (1H, d, J = 7,8 Hz), 1,53 (6H, s), 1,33 (9H, s); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 437 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.163	N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-N2-(3-fluoro-4-metoxifenil)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina R940384	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3-aminofenol para dar N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3-hidroxifenil)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,16 (1H, s), 9,29 (1H, s), 9,25 (1H, s), 9,23 (1H, s), 8,20 (1H, d, J = 3,6 Hz), 7,74 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,44 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,23 (1H, t, J = 1,25 Hz), 7,16 (1H, d, J = 8,1 Hz), 7,04 (1H, t, J = 7,9 Hz), 6,40 (1H, dd, J = 6,9 Hz, J = 1,2 Hz), 1,53 (6H, s); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 397 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.164	N2-(3-Clorofenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina R940386	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3-cloroanilina para dar N2-(3-clorofenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,10 (1H, s), 9,50 (1H, s), 9,43 (1H, s), 8,16 (1H, d, J = 3,3 Hz), 7,85 (1H, t, J = 1,95 Hz), 7,47 (2H, d, J = 8,7 Hz), 7,38 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,18 (1H, t, J = 8,1 Hz), 6,89 (1H, ddd, J = 7,8 Hz, J = 2,1 Hz, J = 1,2 Hz), 1,43 (6H, s); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 415 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.165	N2-(3,5-diclorofenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina R940387	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3,5-dicloroanilina para dar N2-(3,5-diclorofenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,10 (1H, s), 9,66 (1H, s), 9,49 (1H, s), 8,19 (1H, m), 7,70 (2H, m), 7,39 (2H, m), 6,99 (1H, t, J = 1,95 Hz), 1,42 (6H, s); LCMS: pureza: 96%; MS (m/e): 450 (MH <sup>+</sup> ).

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.166	N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(1-metilindazol-6-il)-2,4-pirimidindiamina R940389	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 6-amino-1-metilindazol para dar N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(1-metilindazol-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,22 (1H, s), 9,60 (1H, s), 9,43 (1H, s), 8,29 (1H, d, J = 3,6 Hz), 8,13 (1H, s), 7,95 (1H, s), 7,72 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,64 (1H, d, J = 9 Hz), 7,47 (1H, d, J = 8,1 Hz), 7,34 (1H, dd, J = 8,7 Hz, J = 1,8 Hz), 3,19 (3H, s), 1,53 (6H, s); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 435 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.167	N2-(3-cloro-4-trifluorometoxifenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina R940390	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3-cloro-4-trifluorometoxianilina para dar N2-(3-cloro-4-trifluorometoxifenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,24 (1H, s), 9,76 (1H, s), 9,60 (1H, s), 8,28 (1H, d, J = 3,6 Hz), 8,14 (1H, d, J = 2,4 Hz), 7,70 (1H, dd, J = 9 Hz, J = 2,7 Hz), 7,54-7,43 (3H, m), 1,53 (6H, s); LCMS: pureza: 94,6%; MS (m/e): 499 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.168	N2-(3-cloro-4-metoxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina R940391	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3-cloro-4-metoxi-5-metilfenilina para dar N2-(3-cloro-4-metoxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,20 (1H, s), 9,24 (1H, s), 9,40 (1H, s), 8,23 (1H, dd, J = 3,3 Hz, J = 0,9 Hz), 7,76 (1H, d, J = 2,7 Hz), 7,61 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,47 (1H, d, J = 8,1 Hz), 7,42 (1H, d, J = 2,7 Hz), 3,76 (3H, d, J = 1,2 Hz), 2,27 (3H, s), 1,53 (6H, s); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 459 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.169	N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3-metoxicarbonilmetileno-xifenil)-2,4-pirimidindiamina R940392	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3-(metoxicarbonilmetileno-xifenil)anilina para dar N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3-metoxicarbonilmetileno-xifenil)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,16 (1H, s), 9,36 (1H, s), 9,34 (1H, s), 8,23 (1H, d, J = 3,3 Hz), 7,69 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,47 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,42 (1H, s), 7,37 (1H, d, J = 8,1 Hz), 7,17 (1H, t, J = 8,1 Hz), 6,53 (1H, dd, J = 8,4 Hz, J = 2,4 Hz), 4,78 (2H, s), 3,79 (3H, s), 1,53 (6H, s); LCMS: pureza: 94,69%; MS (m/e): 469 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.171	N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina y 4-amino-2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 4-amino-2-

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
	pirimidindiamina R940394	cloro-6-metilfenol para dar N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,16 (1H, s), 9,27 (1H, s), 9,15 (1H, s), 8,67 (1H, s), 8,19 (1H, d, J = 3,6 Hz), 7,64 (2H, m), 7,42 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,29 (1H, d, J = 2,7 Hz), 2,22 (3H, s), 1,53 (6H, s); LCMS: pureza: 97,69%; MS (m/e): 444 (M <sup>+</sup> ).
7.4.172	N2-(3,5-Dimetil-4-metoxifenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina R940395	De la misma manera que para la preparación de N2-(3-cloro-4-hidroxi-5-metilfenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3,5-dimetil-4-metoxianilina para dar N2-(3,5-dimetil-4-metoxifenil)-N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 11,16 (1H, s), 9,23 (1H, s), 9,11 (1H, s), 8,19 (1H, d, J = 3,6 Hz), 7,69 (1H, d, J = 8,1 Hz), 7,44 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,33 (2H, s), 3,68 (3H, s), 2,23 (6H, s), 1,53 (6H, s); LCMS: pureza: 99%; MS (m/e): 439 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.181	(+) 4-(N-terc-butoxicarbonil)amino-6-nitro-1-benzopirano	Una disolución de (+) 4-amino-6-nitro-1-benzopirano en dioxano-agua se trató con bicarbonato de terc-butilo y bicarbonato de sodio. La mezcla se agitó durante 2 horas a 0°C y se diluyó con hexano. La mezcla se filtró, y los sólidos que quedan se lavaron con cuidado con hexano y se secaron a presión reducida para dar (+) 4-(N-terc-butoxicarbonil)amino-6-nitro-1-benzopirano como un sólido amarillo pálido. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,23 (d, 1H, J = 2,7 Hz), 8,04 (dd, 1H, J = 2,7, 9,6 Hz), 6,88 (d, 1H, J = 9,6 Hz), 4,89 (bs, 1H), 4,81 (bs, 1H), 4,26-4,38 (m, 2H), 2,03-2,26 (m, 2H).
7.4.184	(+) 4-(N-terc-butoxicarbonil-N-metil)amino-6-nitro-1-benzopirano	Una disolución de 4-amino-6-nitro-1-benzopirano en THF se trató con hidruro de sodio seguido de yoduro de metilo. La mezcla se agitó durante 24 horas a 0°C. La mezcla se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida para dar (+) 4-(N-terc-butoxicarbonil-N-metil)amino-6-nitro-1-benzopirano como un sólido amarillo pálido. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,98 (dd, 1H, J = 3,4, 9,3 Hz), 7,90 (bs, 1H), 6,82 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 5,65 (bs, 1H), 4,18-4,44 (m, 2H), 1,98-2,06 (m, 2H), 2,55 (s, 3H).
7.4.188	(+) 4-(N-Acetil)amino-6-nitro-1-benzopirano	Una disolución de 4-hidroxi-6-nitro-1-benzopirano en acetonitrilo seco se trató con ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se agitó durante 1 hora a 22°C para dar (+) 4-(N-acetil)amino-6-nitro-1-benzopirano como un precipitado parduzco pálido, que se separó por filtración y se secó. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,13 (d, 1H, J = 2,8 Hz), 8,04 (dd, 1H, J = 2,8, 8,7 Hz), 6,88 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 5,87 (bs, 1H), 5,17-5,24 (m, 1H), 4,25-4,39 (m, 2H), 2,04-2,26 (m, 2H), 2,08 (s, 3H).
7.4.189	(+) 4-Amino-6-nitro-1-benzopirano	Una disolución de (+) 4-(N-acetil)amino-6-nitro-1-benzopirano en HCl concentrado se puso a reflujo durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad a presión reducida y se basificó mediante adición de carbonato de potasio. Se añadió agua, y la fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno y se secó sobre sulfato de magnesio. La eliminación

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
		de los volátiles a presión reducida dio (+) 4-amino-6-nitro-1-benzopirano como un sólido amarillo, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,23 (d, 1H, J = 3,0 Hz), 7,96 (dd, 1H, J = 3,0, 9,0 Hz), 6,80 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 4,04-4,41 (m, 3H), 1,78-2,14 (m, 2H).
7.4.190	Sal del ácido (L)-(+)-tartárico de (S)-4-Amino-6-nitro-1-benzopirano	Una disolución de (+)-4-amino-6-nitro-1-benzopirano en etanol-agua se trató con ácido L-(+)-tartárico y se calentó para dar una disolución transparente. La mezcla se mantuvo durante 3 días a 22°C, y el precipitado resultante se filtró y se lavó cuidadosamente con etanol para dar sal del ácido (L)-(+)-tartárico de (S)-4-amino-6-nitrobenzo-1-pirano enantioméricamente pura. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 8,44 (d, 1H, J = 2,7 Hz), 8,08 (dd, 1H, J = 2,7, 9,3 Hz), 7,01 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 4,32-4,39 (m, 3H), 3,97 (s, 2H), 1,90-2,26 (m, 2H).
7.4.191	Sal del ácido (D)-(-)-tartárico de (R)-4-Amino-6-nitro-1-benzopirano	Una disolución de (+)-4-amino-6-nitrobenzopirano en etanol-agua se trató con ácido D-(+)-tartárico y se calentó para dar una disolución transparente. La mezcla se mantuvo durante 3 días a 22°C, y el precipitado resultante se filtró y se lavó cuidadosamente con etanol para dar sal del ácido (D)-(-)-tartárico de (R)-4-amino-6-nitro-1-benzopirano enantioméricamente pura. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 8,44 (d, 1H, J = 2,7 Hz), 8,08 (dd, 1H, J = 2,7, 9,3 Hz), 7,01 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 4,32-4,39 (m, 3H), 3,97 (s, 2H), 1,90-2,26 (m, 2H).
7.4.281	N2-[3-(N-Ciclobutilamino)carbonilmetileno-xifenil]-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945389)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendio-xifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidro-xifenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3-(N-ciclobutilaminocarbonilmetileno-xifenil)anilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-[3-(N-ciclobutilamino)carbonilmetileno-xifenil]-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 1,53-1,65 (m, 2H), 1,90-2,03 (m, 2H), 2,07-2,17 (m, 2H), 4,25 (q, J = 8,1 Hz, 1H), 4,32 (s, 2H), 4,61 (s, 2H), 6,46 (dd, J = 1,8 y 8,1 Hz, 1H), 7,10 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,23 (dd, J = 0,9 y 8,4 Hz, 1H), 7,38 (m, 2H), 7,60 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,13 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 8,22 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 9,23 (s, 1H), 9,26 (s, 1H), 11,12 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ -163,26; LCMS: tiempo de ret.: 9,98 min.; pureza: 92,21%; MS (m/e): 480,25 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.282	N2-[3-(N-Ciclopropilamino)carbonilmetileno-xifenil]-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945390)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendio-xifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidro-xifenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3-(N-ciclopropilaminocarbonilmetileno-xifenil)anilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-[3-(N-ciclopropilamino)carbonilmetileno-xifenil]-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 0,47 (m, 2H), 0,61 (m, 2H), 2,66 (m, J = 3,6 Hz, 1H), 4,32 (s, 2H), 4,62 (s, 2H), 6,44 (dd, J = 2,4 y 7,5 Hz, 1H), 7,09 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,22 (dd, J = 0,9 y 8,1 Hz, 1H), 7,37 (m, 2H), 7,59 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,05 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 8,13 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,22 (s, 1H), 9,26 (s, 1H), 11,12 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ -163,27;

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.283	N2-[4-(4-Acetilpiperazino)fenil]-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945391)	<p>LCMS: tiempo de ret.: 8,89 min.; pureza: 83,29%; MS (m/e): 466,24 (MH<sup>+</sup>).</p> <p>De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-(4-acetilpiperazino)anilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-[4-(4-acetilpiperazino)fenil]-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,02 (s, 3H), 2,96 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,02 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,55 (br, 4H), 4,62 (s, 2H), 6,84 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,57 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,01 (s, 1H), 9,13 (s, 1H), 11,14 (s, 1H); RMN <sup>19</sup>F (282 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ - 164,84; LCMS: tiempo de ret.: 7,29 min.; pureza: 88,46%; MS (m/e): 479,27 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.4.284	5-Fluoro-N2-[4-(4-metoxicarbonilpiperazino)fenil]-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945392)	<p>De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-(4-metoxicarbonilpiperazino)anilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar 5-fluoro-N2-[4-(4-metoxicarbonilpiperazino)fenil]-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,98 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 3,48 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 3,60 (s, 3H), 4,62 (s, 2H), 6,83 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,56 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,01 (s, 1H), 9,13 (s, 1H); RMN <sup>19</sup>F (282 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ - 164,84; LCMS: tiempo de ret.: 8,61 min.; pureza: 83,00%; MS (m/e): 495,25 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.4.290	N2-(3,4-diclorofenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945398)	<p>De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3,4-dicloroanilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-(3,4-diclorofenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 4,63 (s, 2H), 7,39-7,42 (m, 3H), 7,52 (dd, J = 2,4 y 8,7 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 8,18 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,46 (s, 1H), 9,59 (s, 1H), 11,17 (s, 1H); RMN <sup>19</sup>F (282 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ - 162,48; LCMS: tiempo de ret.: 13,30 min.; pureza: 90,24%; MS (m/e): 421,07 (MH<sup>+</sup>).</p>
7.4.291	N2-(3-cloro-4-metoxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945399)	<p>De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3-cloro-4-metoxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-(3-cloro-4-metoxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3,76 (s, 3H), 4,62 (s, 2H), 7,00 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,47 (m, 2H), 7,80 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 8,12 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 9,22 (s, 1H), 9,27 (s, 1H), 11,15 (s, 1H); RMN <sup>19</sup>F (282 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ - 163,98; LCMS: tiempo de ret.: 10,38 min.; pureza: 91,61%; MS (m/e): 417,14 (MH<sup>+</sup>).</p>

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.292	N2-(3,5-dicloro-4-metoxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945400)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxifenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3,5-dicloro-4-metoxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N2-(3,5-dicloro-4-metoxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 3,72 (s, 3H), 4,55 (s, 2H), 7,30 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,35 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,75 (s, 2H), 8,14 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,48 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 162,65.
7.4.293	N2-(3,5-dimetoxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945401)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxifenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3,5-dimetoxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N2-(3,5-dimetoxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 3,64 (s, 6H), 4,62 (s, 2H), 6,06 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,13 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,18 (s, 1H), 9,24 (s, 1H), 11,11 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 163,28; LCMS: tiempo de ret.: 10,41 min.; pureza: 97,00%; MS (m/e): 413,19 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.294	5-Fluoro-N2-(3-fluoro-4-metoxifenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945402)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxifenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3-fluoro-4-metoxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar 5-fluoro-N2-(3-fluoro-4-metoxifenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 3,75 (s, 3H), 4,62 (s, 2H), 6,99 (t, J = 9,3 Hz, 1H), 7,26 (dd, J = 2,4 y 9,0 Hz, 1H), 7,36 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,45 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,66 (dd, J = 2,7 y 14,4 Hz, 1H), 8,11 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 9,24 (s, 1H), 9,32 (s, 1H), 11,15 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 163,98, - 134,90; LCMS: tiempo de ret.: 9,84 min.; pureza: 93,66%; MS (m/e): 401,18 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.296	5-Fluoro-N2-(4-metoxifenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945404)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxifenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-metoxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar 5-fluoro-N2-(4-metoxifenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 3,69 (s, 3H), 4,63 (s, 2H), 6,79 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,35 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,53 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 9,05 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 11,13 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 175,00; LCMS: tiempo de ret.: 8,85 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 383,25 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.297	N2-(3,4-Etilendioxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945405)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxifenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3,4-etilendioxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N2-(3,4-etilendioxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 4,16 (q, J = 2,1 Hz, 4H), 4,62 (s, 2H), 6,67 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 6,98 (dd, J = 2,4 y 9,0 Hz, 1H), 7,27 (d,



Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.298	5-Fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-N2-(4-trifluorometoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (R945406)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-trifluorometoxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar 5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-N2-(4-trifluorometoxifenil)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 4,64 (s, 2H), 7,18 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,38 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,73 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 8,14 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 9,38 (s, 1H), 9,45 (s, 1H), 11,18 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 173,29, - 68,81; LCMS: tiempo de ret.: 12,95 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 437,25 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.299	N2-(4-Etoxfenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945407)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-etoxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-(4-etoxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 1,30 (t, J = 6,9 Hz, 3H), 3,94 (q, J = 6,9 Hz, 2H), 4,63 (s, 2H), 6,77 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,54 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,04 (s, 1H), 9,17 (s, 1H), 11,14 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 175,00; LCMS: tiempo de ret.: 9,87 min.; pureza: 90,82%; MS (m/e): 397,28 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.300	N2-(4-Butoxfenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945408)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-butoxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-(4-butoxfenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 0,93 (t, J = 7,5 Hz, 3H), 1,42 (hept, J = 7,5 Hz, 2H), 1,66 (p, J = 6,9 Hz, 2H), 3,89 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 4,62 (s, 2H), 6,78 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,35 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 7,54 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,04 (s, 1H), 9,17 (s, 1H), 11,14 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 175,02; LCMS: tiempo de ret.: 12,12 min.; pureza: 95,36%; MS (m/e): 425,31 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.301	5-Fluoro-N2-(4-fenoxifenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945409)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-fenoxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar 5-fluoro-N2-(4-fenoxifenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 4,60 (s, 2H), 6,91 (d, J = 9,0 Hz, 4H), 7,05 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,32 (m, 3H), 7,52 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 8,10 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,27 (s, 2H), 11,14 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.302	N2-(4-Benciloxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]loxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945410)	de): $\delta$ - 174,19; LCMS: tiempo de ret.: 12,69 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 445,27 (MH <sup>+</sup> ). De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-benciloxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]loxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-(4-benciloxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]loxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): $\delta$ 4,62 (s, 2H), 5,03 (s, 2H), 6,86 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,31-7,51 (m, 9H), 8,06 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 9,05 (s, 1H), 9,15 (s, 1H), 11,13 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): $\delta$ - 170,56; LCMS: tiempo de ret.: 12,02 min.; MS (m/e): 459,33 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.304	5-Fluoro-N2-(4-morfolinofenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]loxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945412)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-morfolinoanilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]loxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar 5-fluoro-N2-(4-morfolinofenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]loxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): $\delta$ 3,00 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 3,71 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 4,62 (s, 2H), 6,81 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,35 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,46 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 7,56 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,05 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,00 (s, 1H), 9,13 (s, 1H), 11,13 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): $\delta$ - 175,15; LCMS: tiempo de ret.: 8,08 min.; pureza: 92,97%; MS (m/e): 438,32 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.305	5-Fluoro-N2-(4-isopropoxifenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]loxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945413)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-isopropoxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]loxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar 5-fluoro-N2-(4-isopropoxifenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]loxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): $\delta$ 1,22 (d, J = 6,3 Hz, 6H), 4,48 (p, J = 6,0 Hz, 1H), 4,62 (s, 2H), 6,76 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,34 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,53 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,02 (s, 1H), 9,15 (s, 1H), 11,12 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): $\delta$ - 175,03; LCMS: tiempo de ret.: 10,52 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 411,32 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.308	N4-(2,2-Dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]loxazin-6-il)-5-fluoro-N2-[4-(4-metoxicarbonilpiperazino)fenil]-2,4-pirimidindiamina (R945416)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-(4-metoxicarbonilpiperazino)anilina (100 mg) y 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]loxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]loxazin-6-il)-5-fluoro-N2-[4-(4-metoxicarbonilpiperazino)fenil]-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): $\delta$ 1,43 (s, 6H), 2,99 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 3,49 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 3,61 (s, 3H), 6,82 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,37 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,55 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,02 (s, 1H), 9,14 (s, 1H), 11,08 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): $\delta$ - 164,38; LCMS: tiempo de ret.: 10,24 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 523,45 (MH <sup>+</sup> ).

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.309	N2-[4-(N-Acetil-N-metilamino)fenil]-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina (R945417)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxiifenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-(N-acetil-N-metilamino)anilina (100 mg) y 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-[4-(N-acetil-N-metilamino)fenil]-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 1,43 (s, 6H), 1,73 (s, 3H), 3,08 (s, 3H), 7,11 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,68 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,13 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,35 (s, 1H), 9,40 (s, 1H), 11,12 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 162,87; LCMS: tiempo de ret.: 10,03 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 452,26 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.310	N2-[4-(N-Acetil-N-etilamino)fenil]-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina (R945418)	De manera similar a la preparación de 4-(4-metoxicarbonilpiperazino)nitrobenzeno, se hicieron reaccionar N-etil-4-nitroanilina (1 g) y cloruro de acetilo (1 ml) para dar N-acetil-N-etil-4-nitroanilina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 1,15 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,94 (s, 3H), 3,81 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 8,30 (d, J = 8,7 Hz, 2H).  Se redujo N-acetil-N-etil-4-nitroanilina en condiciones de hidrogenolisis usando Pd al 10%-C en metanol a 40 psi durante 1 h. El catalizador se separó por filtración. El filtrado se evaporó para dar 4-(N-acetil-N-etilamino)anilina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 1,09 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,82 (s, 3H), 3,68 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 6,79 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,95 (d, J = 8,1 Hz, 2H).  De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxiifenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-(N-acetil-N-etilamino)anilina (100 mg) y 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-[4-(N-acetil-N-etilamino)fenil]-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 0,97 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,43 (s, 6H), 1,68 (s, 3H), 3,56 (q, J = 6,9 Hz, 2H), 7,06 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,40 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,69 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,13 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 9,35 (s, 1H), 9,40 (s, 1H), 11,12 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 162,90; LCMS: tiempo de ret.: 10,51 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 466,25 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.311	N2-[4-(4-Acetilpiperazino)fenil]-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina (R945419)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxiifenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-(4-acetilpiperazino)anilina (100 mg) y 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-[4-(4-acetilpiperazino)fenil]-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 1,43 (s, 6H), 2,03 (s, 3H), 2,96 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,03 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 3,56 (m, 4H), 6,82 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,37 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,56 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,02 (s, 1H), 9,13 (s, 1H), 11,08 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 164,40; LCMS: tiempo de ret.: 8,70 min.; pureza: 97,70%; MS (m/e): 507,55 (MH <sup>+</sup> ).

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.312	N2-[4-(N-Acetil-N-metilamino)fenil]-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidinamina (R945420)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxiifenil)-2,4-pirimidinamina, se hicieron reaccionar 4-(N-acetil-N-metilamino)anilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N2-[4-(N-acetil-N-metilamino)fenil]-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidinamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 1,74 (s, 3H), 3,09 (s, 3H), 4,64 (s, 2H), 7,13 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,40 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,69 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,13 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 9,34 (s, 1H), 9,39 (s, 1H), 11,16 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 171,37; LCMS: tiempo de ret.: 9,14 min.; pureza: 91,43%; MS (m/e): 424,50 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.313	N2-[4-(N-Acetil-N-etilamino)fenil]-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidinamina (R945421)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxiifenil)-2,4-pirimidinamina, se hicieron reaccionar 4-(N-acetil-N-etilamino)anilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N2-[4-(N-acetil-N-etilamino)fenil]-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidinamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 0,98 (t, J = 6,9 Hz, 3H), 1,69 (s, 3H), 3,57 (q, J = 6,9 Hz, 2H), 4,63 (s, 2H), 7,08 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,39 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,69 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 8,13 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,34 (s, 1H), 9,40 (s, 1H), 11,16 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 171,36; LCMS: tiempo de ret.: 9,26 min.; pureza: 91,13%; MS (m/e): 438,27 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.314	N2-(3,4-dimetoxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidinamina (R945422)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxiifenil)-2,4-pirimidinamina, se hicieron reaccionar 3,4-dimetoxianilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N2-(3,4-dimetoxifenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidinamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 3,64 (s, 3H), 3,68 (s, 3H), 4,63 (s, 2H), 6,79 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,20-7,23 (m, 2H), 7,33 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,08 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,03 (s, 1H), 9,16 (s, 1H), 11,13 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 172,45; LCMS: tiempo de ret.: 8,35 min.; pureza: 94,21%; MS (m/e): 413,30 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.315	N4-(2,2-Dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(4-morfolinofenil)-2,4-pirimidinamina (R945423)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxiifenil)-2,4-pirimidinamina, se hicieron reaccionar 4-morfolinoanilina (100 mg) y 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(4-morfolinofenil)-2,4-pirimidinamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 1,43 (s, 6H), 2,99 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 3,72 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 6,80 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,46 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,55 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,00 (s, 1H), 9,13 (s, 1H), 11,09 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 173,16; LCMS: tiempo de ret.: 9,59 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 466,28 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.316	N2-[3-(N-Ciclobutilamino)carbonilmetileno]fenil]-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3-hidroxiifenil)-2,4-pirimidinamina (100 mg) y 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina (50 mg)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxiifenil)-2,4-pirimidinamina, se hicieron reaccionar 3-(ciclobutilaminocarbonilmetileno)anilina (100 mg) y 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina (50 mg)

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
	fluoro-2,4-pirimidindiamina (R945424)	para dar N2-[3-(N-ciclobutilamino)carbonilmetileno]fenil]-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 1,42 (s, 6H), 1,57-1,66 (m, 2H), 1,90-2,04 (m, 2H), 2,12 (m, 2H), 4,25 (q, J = 8,4 Hz, 1H), 4,33 (s, 2H), 6,46 (dd, J = 1,8 y 8,1 Hz, 1H), 7,08 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,25 (dd, J = 8,4 Hz, 1H), 7,35 (m, 1H), 7,36 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 8,12 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 8,23 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 9,22 (s, 1H), 9,26 (s, 1H), 11,06 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 171,41; LCMS: tiempo de ret.: 11,46 min.; pureza: 97,65%; MS (m/e): 508,45 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.317	5-Fluoro-N2-[4-(4-metilpiperazino)fenil]-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945426)	Se hicieron reaccionar 1-(4-nitrofenil)piperazina (1 g), yodometano (0,3 ml) e hidruro de sodio (500 mg) en THF (10 ml) toda la noche a temperatura ambiente. La disolución se diluyó con agua. La precipitación amarilla se recogió mediante filtración, se lavó con agua para dar 4-(4-metilpiperazino)nitrobenzoceno como un sólido amarillo. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 2,45 (s, 3H), 2,69 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 3,52 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 6,83 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 8,12 (d, J = 9,3 Hz, 2H).  El 4-(4-Metilpiperazino)nitrobenzoceno se redujo en condiciones de hidrogenolisis usando Pd al 10%-C en metanol a 40 psi durante 1 h. El catalizador se separó por filtración. El filtrado se evaporó para dar 4-(4-metilpiperazino)anilina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 2,47 (s, 3H), 2,75 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 3,16 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 6,65 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 6,81 (d, J = 8,7 Hz, 2H).  De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-(4-metilpiperazino)anilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar 5-fluoro-N2-[4-(4-metilpiperazino)fenil]-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 2,85 (s, 3H), 3,16 (m, 2H), 3,48 (m, 4H), 3,69 (m, 2H), 4,63 (s, 2H), 6,87 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,54 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,08 (s, 1H), 9,21 (s, 1H), 11,16 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 172,68; LCMS: tiempo de ret.: 5,67 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 451 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.318	N4-(2,2-Dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-[4-(4-metilpiperazino)fenil]-2,4-pirimidindiamina (R945427)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 4-(4-metilpiperazino)anilina (100 mg) y 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-[4-(4-metilpiperazino)fenil]-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 1,43 (s, 6H), 2,71 (s, 3H), 3,16 (br, 8H), 6,84 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,37 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,54 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,05 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 11,10 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 172,96; LCMS: tiempo de ret.: 7,08 min.; pureza: 91,96%; MS (m/e): 479,25 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.319	N2-(3,5-Dimetilfenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3,5-dimetilanilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
	pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945432)	oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N2-(3,5-dimetilfenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 2,17 (s, 6H), 4,62 (s, 2H), 6,52 (s, 1H), 7,22 (s, 2H), 7,34 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,57 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,11 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,10 (s, 1H), 9,19 (s, 1H), 11,14 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 172,16; LCMS: tiempo de ret.: 11,34 min.; pureza: 90,04%; MS (m/e): 381,23 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.320	N2-(3,5-Dimetilfenil)-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina (R945433)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxi-fenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxi-fenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3,5-dimetilanilina (100 mg) y 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N2-(3,5-dimetilfenil)-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 1,42 (s, 6H), 2,16 (s, 6H), 6,51 (s, 1H), 7,23 (s, 2H), 7,35 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 8,11 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,10 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 11,08 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 172,19; LCMS: tiempo de ret.: 13,05 min.; pureza: 95,71%; MS (m/e): 409,30 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.321	5-Fluoro-N2-(3-isopropilfenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945434)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxi-fenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxi-fenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3-isopropilanilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar 5-fluoro-N2-(3-isopropilfenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 1,15 (d, J = 6,9 Hz, 6H), 2,74 (p, J = 6,9 Hz, 1H), 4,63 (s, 2H), 6,76 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,10 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,34 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,51 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,57 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,11 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,15 (s, 1H), 9,21 (s, 1H), 11,15 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 172,02; LCMS: tiempo de ret.: 12,40 min.; pureza: 92,20%; MS (m/e): 395,28 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.322	N2-(3-cloro-4-metilfenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945439)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxi-fenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxi-fenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3-cloro-4-metilaniina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N2-(3-cloro-4-metilfenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 2,22 (s, 3H), 4,63 (s, 2H), 7,13 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,38 (m, 2H), 7,48 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,83 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 8,13 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 9,31 (s, 1H), 9,33 (s, 1H), 11,13 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 171,47; LCMS: tiempo de ret.: 12,66 min.; pureza: 94,85%; MS (m/e): 401,13 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.323	5-Fluoro-N2-(3-metoxi-5-trifluorometilfenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945440)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxi-fenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxi-fenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3-metoxi-5-trifluorometilanilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar 5-fluoro-N2-(3-metoxi-5-trifluorometilfenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 3,74 (s, 3H), 4,63 (s, 2H), 6,72 (s, 1H), 7,32 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,51 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 8,18 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 9,36 (s, 1H), 9,55 (s, 1H), 11,12 (s,

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.324	5-Fluoro-N2-(indol-6-il)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945443)	1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 170,42; LCMS: tiempo de ret.: 13,14 min.; pureza: 86,65%; MS (m/e): 451,30 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.325	N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(indol-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945444)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 6-aminoindol (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (50 mg) para dar 5-fluoro-N2-(indol-6-il)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 4,62 (s, 2H), 6,30 (s, 1H), 7,17 (m, 2H), 7,29 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,35 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,82 (s, 1H), 8,10 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,08 (s, 1H), 9,11 (s, 1H), 10,84 (s, 1H), 11,11 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 172,73; LCMS: tiempo de ret.: 8,52 min.; pureza: 81,74%; MS (m/e): 392,30 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.326	N2-(3,5-diclorofenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945454)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 6-aminoindol (100 mg) y 2-cloro-N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N4-(2,2-dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(indol-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 1,42 (s, 6H), 6,30 (s, 1H), 7,18 (m, 2H), 7,29 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,35 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,77 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,80 (s, 1H), 8,10 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,02 (s, 1H), 9,09 (s, 1H), 10,84 (s, 1H), 11,04 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 172,86; LCMS: tiempo de ret.: 9,91 min.; pureza: 98,01%; MS (m/e): 420,18 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.327	N2-(3-Bromofenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945455)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3,5-dicloroanilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-(3,5-diclorofenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 4,62 (s, 2H), 6,99 (t, J = 1,8 Hz, 1H), 7,38 (s, 2H), 7,70 (d, J = 2,1 Hz, 2H), 8,19 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,52 (s, 1H), 9,66 (s, 1H), 11,17 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 170,19; LCMS: tiempo de ret.: 14,05 min.; pureza: 85,53%; MS (m/e): 421,21 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.327	N2-(3-Bromofenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945455)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxfenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxfenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3-bromoanilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidindiamina (50 mg) para dar N2-(3-bromofenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 4,63 (s, 2H), 7,02 (ddd, J = 0,9 y 1,8 y 7,8 Hz, 1H), 7,13 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,52 (dd, J = 0,9 y 8,1 Hz, 1H), 7,99 (t, J = 1,8 Hz, 1H), 8,16 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,40 (s, 1H), 9,47 (s, 1H), 11,17 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 170,91; LCMS: tiempo de ret.: 12,31 min.; pureza: 100%; MS (m/e): 431,20 (MH <sup>+</sup> ).

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.328	N2-(3- <i>terc</i> -butilfenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945456)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxiifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxiifenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3- <i>terc</i> -butilanilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N2-(3- <i>terc</i> -butilfenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 1,23 (s, 9H), 4,62 (s, 2H), 6,91 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,11 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,34 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,63 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 8,11 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,12 (s, 1H), 9,16 (s, 1H), 11,12 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 171,99; LCMS: tiempo de ret.: 13,16 min.; pureza: 93,03%; MS (m/e): 409,29 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.329	N2-(3,4-difluorofenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina (R945458)	De manera similar a la preparación de N4-(3,4-etilendioxiifenil)-5-fluoro-N2-(3-hidroxiifenil)-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 3,4-difluoranilina (100 mg) y 2-cloro-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-4-pirimidinamina (50 mg) para dar N2-(3,4-difluorofenil)-5-fluoro-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 4,63 (s, 2H), 7,27 (m, 2H), 7,38 (s, 2H), 7,88 (ddd, J = 2,7 y 8,1 y 14,1 Hz, 1H), 8,15 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 9,46 (s, 1H), 9,48 (s, 1H), 11,17 (s, 1H); RMN <sup>19</sup> F (282 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ - 162,44, - 148,50, - 138,13; LCMS: tiempo de ret.: 11,63 min.; pureza: 84,89%; MS (m/e): 389,25 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.330	Síntesis de anilinas (S)-2-Metil-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina	A una disolución de 2-amino-4-nitrofenol (6,6 g) en DMF (100 ml) a 0°C se añadió 95% de NaH (1 g) sólido, de una vez. La disolución se agitó a 0°C durante 20 minutos, después a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió (S)-(-)-2-cloropropionato de metilo (5 g) de una sola vez, y la reacción se calentó con un condensador de reflujo adjunto a 85°C toda la noche. La mezcla de reacción se concentró, y el residuo se repartió entre EtOAc y agua. La fase acuosa se extrajo con EtOAc, y las capas orgánicas combinadas se lavaron tres veces con agua y después una vez con salmuera, se secaron sobre MgSO <sub>4</sub> , se filtraron y el volumen se minimizó en el evaporador giratorio hasta alrededor de 15 ml. El residuo se cromatografió EtOAc/hexanos 1:4 isocráticamente. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron, y el producto bruto se recristalizó en EtOAc/hexanos para dar (S)-2-metil-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 7,82 (dd, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,12 (d, 1H), 4,90 (q, 1H), 1,42 (d, 3H); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 209 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.331	(S)-6-Amino-2-metil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina	A una disolución de (S)-2-metil-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina (2,5 g) en 250 ml de EtOH/EtOAc (1:1; v/v) se añadieron 500 mg de Pd al 10%C (Degussa), y la reacción se hidrogenó en el aparato Parr a 50 psi durante 1 hora. La reacción se filtró a través de un lecho de celite, se evaporó y se secó a vacío para dar la 2,3 g de (S)-6-Amino-2-metil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 6,60 (d, 1H), 6,12 (m, 2H), 4,40 (q, 1H), 1,32 (d, 3H); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 179 (MH <sup>+</sup> ).



Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.332	(R)-2-Metil-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina	De la misma manera que para la síntesis de (S)-2-metil-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina, la reacción de (R)-(+)-metil-2-cloropropionato con 2-amino-4-nitrofenol dio (R)-2-metil-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 7,82 (dd, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,12 (d, 1H), 4,90 (q, 1H), 1,42 (d, 3H); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 209 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.333	(R)-6-Amino-2-metil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina	De la misma manera que para la síntesis de (S)-6-amino-2-metil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina, la hidrogenación de (R)-2-metil-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina dio (R)-6-amino-2-metil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 6,60 (d, 1H), 6,12 (m, 2H), 4,40 (q, 1H), 1,32 (d, 3H); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 179 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.334	7-Amino-4,4-dimetil-1,3-dioxo-2H,4H-isoquinolina	El material se preparó según el procedimiento esquematizado en <i>J. Med Chem</i> , 2002, 45(16), 3394-3405.
7.4.335	(+)-2-(2-Hidroxietil)-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina	A una disolución de 2-amino-4-nitrofenol (16,5 g) en DMF (100 ml) a 0°C se añadió 95% de NaH (3 g) sólido de una sola vez. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 20 minutos, después a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió 2-bromobutirólactona (13,8 ml) a la mezcla de reacción, y entonces se calentó a 85°C durante toda la noche con un condensador de reflujo unido. La mezcla de reacción se concentró hasta aproximadamente 25 ml, y se diluyó con 25 ml de MeOH. Se añadieron 400 ml de agua DI, con agitación, y el producto precipitado se recogió filtración y se secó en el embudo durante 4 h para dar (+)-2-(2-hidroxietil)-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 7,82 (dd, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,18 (d, 1H), 4,90 (m, 1H), 4,70 (t, 1H), 3,8 (m, 2H), 1,96 (m, 2H); LCMS: pureza: 100%; MS (m/e): 239 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.336	(+)-6-Amino-2-(2-hidroxietil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina	Una disolución de (+)-2-(2-hidroxietil)-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina (1 g) en EtOH/EtOAc (100 ml; 1:1 v/v) se hidrogenó a 50 psi en presencia de 200 mg de Pd al 10%/C (Degussa) para dar (+)-6-amino-2-(2-hidroxietil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina. RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d6): δ 6,60 (d, 1H), 6,12 (m, 2H), 4,58 (t, 1H), 4,40 (m, 1H), 3,57 (m, 2H), 1,76 (m, 2H); LCMS: pureza: 98%; MS (m/e): 209 (MH <sup>+</sup> ).
7.4.363	Preparación de aminoindazolinás 1-(2-Etoxicarbonil)-5-nitroindazolína y 2-(2-etoxicarbonil)-5-nitroindazolína	De la misma manera que para la preparación de 1-(metoxicarbonil)metil-5-nitroindazolína, la 1-(2-etoxicarbonil)-5-nitroindazolína se preparó mediante alquilación de 5-nitroindazolína con 3-bromopropionato de etilo en presencia de K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . La 1-(2-etoxicarbonil)-5-nitroindazolína (43%) con valor de Rf elevado en la TLC en 30% de EtOAcn-hexanos se recogió mediante purificación cromatográfica en columna sobre gel de sílice. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,70 (d, 1H, J = 1,7 Hz), 8,27 (dd, 1H, J = 2,3 y 8,8 Hz), 8,20 (d, 1H, J = 1,7 Hz), 7,59 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 4,70 (t, 2H, J = 6,4 Hz), 4,07 (qt, 2H, J = 7,0 Hz), 3,01 (t, 2H, J = 6,4 Hz), 1,16 (t, 3H, J = 7,0 Hz). El subproducto de menor valor de Rf, 2-(2-etoxicarbonil)-5-nitroindazolína, también se recogió

Número de Sección	Nombre del compuesto y número de referencia	Experimental
7.4.364	5-Amino-1-(2-etoxicarboniletil)indazolina	De la misma manera que para la reacción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, la 1-(2-etoxicarboniletil)-5-nitroindazolina se redujo para dar 5-amino-1-(2-etoxicarboniletil)indazolina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,78 (s, 1H), 7,30 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,91 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,87 (dd, 1H, J = 2,3 y 8,8 Hz), 4,59 (t, 2H, J = 6,4 Hz), 4,08 (qt, 2H, J = 7,0 Hz), 3,02 (br s, 2H), 2,92 (t, 2H, J = 7,0 Hz), 1,16 (t, 3H, J = 7,0 Hz).
7.4.365	5-Amino-2-(2-etoxicarboniletil)indazolina	De la misma manera que para la reacción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, la reacción de 2-(2-etoxicarboniletil)-5-nitroindazolina proporcionó 5-amino-2-(2-etoxicarboniletil)indazolina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,64 (s, 1H), 7,45 (dd, 1H, J = 0,9 y 9,1 Hz), 6,74 (dd, 1H, J = 2,0 y 9,1 Hz), 6,67 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 4,57 (t, 2H, J = 6,7 Hz), 4,05 (qt, 2H, J = 7,0 Hz), 3,28 (br s, 2H), 2,93 (t, 2H, J = 6,7 Hz), 1,16 (t, 3H, J = 7,0 Hz).
7.4.366	1-metil-6-nitroindazolina y 2-metil-6-nitroindazolina	De la misma manera que para la preparación de 1-(metoxicarboniletil)-5-nitroindazolina, se alquiló 6-nitroindazol con yoduro de metilo en presencia de K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . La mezcla de reacción se diluyó con agua al terminar la reacción. El sólido formado se filtró, se secó y se cromatografió con 15% de EtOAc:n-hexanos sobre gel de sílice para dar un producto con valor elevado de Rf, 1-metil-6-nitroindazolina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,32 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,01 (dd, 1H, J = 2,7 y 8,8 Hz), 7,83 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 4,18 (s, 3H). También se recogió el subproducto de menor valor de Rf, 2-metil-6-nitroindazolina, eluyendo la columna con 30% de EtOAc:n-hexanos. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 8,69 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 8,03 (s, 1H), 7,90 (dd, 1H, J = 2,0 y 9,1 Hz), 7,75 (d, 1H, J = 9,1 Hz), 4,31 (s, 13H).
7.4.367	6-Amino-1-metilindazolina	De la misma manera que para la reacción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, se redujo 1-metil-6-nitroindazolina para dar 6-amino-1-metilindazolina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,80 (s, 1H), 7,48 (dd, 1H, J = 0,6 y 8,2 Hz), 6,58 (dd, 1H, J = 1,8 y 8,2 Hz), 6,54 (d, 1H, J = 0,6 Hz), 3,94 (s, 3H), 3,5 (br s, 2H).
7.4.368	6-Amino-2-metilindazolina	De la misma manera que para la reacción de 2-metil-2-(3-nitrofenoxi)malonato de dietilo, se redujo 2-metil-6-nitroindazolina para dar 6-amino-2-metilindazolina. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): δ 7,71 (s, 1H), 7,43 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,79 (app d, 1H, J = 1,7 Hz), 6,58 (dd, 1H, J = 1,7 y 8,8 Hz), 4,11 (s, 3H), 3,31 (br s, 2H).

### Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención inhiben la desgranulación mediada por el receptor $Fc\epsilon RI$

La capacidad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención para inhibir la desgranulación inducida por IgE se demostró en una variedad de ensayos celulares con mastocitos humanos cultivados (CHMC) y/o células derivadas de médula ósea (BMMC) de ratón. La inhibición de la desgranulación se midió a una densidad celular tanto baja como alta, cuantificando la liberación de los factores triptasa, histamina y hexosaminidasa específicos de gránulos. La inhibición de la liberación y/o síntesis de mediadores lipídicos se evaluó midiendo la liberación de leucotrieno LTC<sub>4</sub>, y la inhibición de la liberación y/o síntesis de citocinas se monitorizó cuantificando TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-13. La triptasa y hexosaminidasa se cuantificaron usando sustratos fluorógenos como se describe en sus ejemplos respectivos. La histamina, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-13 y LTC<sub>4</sub> se cuantificaron usando los siguientes kits de ELISA comerciales: histamina (Immunotech #2015, Beckman Coulter), TNF $\alpha$  (Biosource #KHC3011), IL-6 (Biosource #KMC0061), IL-13 (Biosource #KHC0132) y LTC<sub>4</sub> (Cayman Chemical #520211). Más abajo se proporcionan los protocolos de los diversos ensayos.

### Cultivo de mastocitos y basófilos Humanos

Los mastocitos y basófilos humanos se cultivaron a partir de células progenitoras negativas para CD34 como se describe más abajo (véanse también los métodos descritos en la Solicitud U.S. Serie n° 10/053.355, presentada el 8 de noviembre de 2001, en trámite junto con la presente).

### Preparación de medio completo STEMPRO-34

Para preparar medio completo ("CM") STEMPRO-34, se añadieron a un matraz de filtro 250 ml de medio libre de suero STEMPRO-34™ ("SFM"; GibcoBRL, número de catálogo 10640). A esto se añadieron 13 ml de suplemento nutriente STEMPRO-34 ("NS"; GibcoBRL, número de catálogo 10641) (preparado como se describe con más detalle, más abajo). El recipiente del NS se enjuagó con aproximadamente 10 ml de SFM, y el enjuague se añadió al matraz de filtro. Tras la adición de 5 ml de L-glutamina (200 mM; Mediatech, número de catálogo MT 25-005-CI) y 5 ml de 100X penicilina/estreptomicina ("pen-estrep"; HyClone, número de catálogo: SV30010), el volumen se llevó hasta 500 ml con SFM, y la disolución se filtró.

El aspecto más variable de la preparación del CM es el método mediante el cual el NS se descongela y se mezcla antes de la adición al SFM. El NS se debería de descongelar en un baño de agua a 37°C y hacerlo girar en remolinos, sin generar vórtices ni agitarlo, hasta que esté completamente en disolución. Mientras se le hace girar, obsérvese si hay lípidos que no están todavía en disolución. Si hay lípidos y el NS no tiene un aspecto uniforme, devuélvase al baño de agua y repítase el proceso de giro en remolino hasta que tenga un aspecto uniforme. Algunas veces este componente pasa a la disolución inmediatamente, algunas veces después de un par de ciclos de giro en remolino, y algunas veces no lo hace en absoluto. Si, después de un par de horas, el NS todavía no está en disolución, deséchese y descongélese una unidad reciente. No se debería de usar un NS que no parece uniforme después de la descongelación.

### Expansión de las células CD34+

Una población de partida de células positivas para CD34 (CD34+) de número relativamente pequeño ( $1-5 \times 10^6$  células) se expandió hasta un número relativamente grande de células progenitoras negativas a CD34 (alrededor de  $2-4 \times 10^9$  células) usando los medios de cultivo y métodos descritos más abajo. Las células CD34+ (procedentes de un único donante) se obtuvieron de Allcells (Berkeley, CA). Debido a que hay un grado de variación en la calidad y número de células CD34+ que típicamente proporciona Allcells, las células recientemente suministradas se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml y se llevaron hasta 10 ml en CM antes del uso.

En el día 0, se llevó a cabo un recuento celular sobre las células viables (fase brillante), y las células se hicieron girar a 1200 rpm hasta un pelete. Las células se resuspendieron hasta una densidad de 275.000 células/ml con CM, que contiene 200 ng/ml de Factor de Célula Madre humano recombinante ("SCF"; Peprotech, número de catálogo 300-07) y 20 ng/ml de ligando flt-3 humano (Peprotech, número de catálogo 300-19) ("medio CM/SCF/flt-3"). En aproximadamente el día 4 ó 5, la densidad del cultivo se comprobó llevando a cabo un recuento celular, y el cultivo se diluyó hasta una densidad de 275.000 células/ml con medio CM/SCF/flt-3 reciente. En aproximadamente el día 7, el cultivo se transfirió a un tubo estéril, y se llevó a cabo un recuento celular. Las células se hicieron girar a 1200 rpm y se resuspendieron hasta una densidad de 275.000 células/ml con medio CM/SCF/flt-3 reciente.

Este ciclo se repitió, comenzando a partir del día 0, un total de 3-5 veces a lo largo del período de expansión.

Cuando el cultivo es grande y se mantiene en múltiples matraces y se va a resuspender, los contenidos de todos los cultivos se combinan en un único recipiente antes de llevar a cabo un recuento celular. Esto asegura que se logre un recuento celular exacto, y proporciona un grado de uniformidad de tratamiento para toda la población. Cada matraz se comprueba separadamente en busca de contaminación bajo el microscopio antes de la combinación, para evitar la contaminación de toda la población.

Entre los días 17-24, el cultivo puede comenzar a decaer (es decir, aproximadamente 5-10% del número total de células muere) y no se expande tan rápidamente como antes. Las células se monitorizan entonces diariamente durante este tiempo, puesto que el fallo completo del cultivo puede tener lugar en un tiempo tan corto como 24 horas. Una vez ha

comenzado el decaimiento, las células se recuentan, se hacen girar a 850 rpm durante 15 minutos, y se resuspenden a una densidad de 350.000 células/ml en medio CM/SCF/flt-3, para inducir una o más divisiones de la célula. Las células se monitorizan diariamente para evitar el fallo del cultivo.

5 Cuando en el cultivo de células progenitoras es evidente una muerte celular mayor de 15% y hay algo de desecho en el cultivo, las células progenitoras negativas para CD34 están listas para ser diferenciadas.

#### **Diferenciación de células progenitoras negativas para CD34 en mastocitos de la mucosa**

10 Se lleva a cabo una segunda fase para convertir las células progenitoras expandidas, negativas para CD34, en mastocitos de la mucosa diferenciados. Estos mastocitos humanos cultivados ("CHMC") de la mucosa derivan de células CD34+, aisladas de sangre del cordón umbilical y tratadas para formar una población proliferada de células progenitoras negativas para CD34, como se describe anteriormente. Para producir las células progenitoras negativas para CD43, el ciclo de resuspensión para el cultivo fue el mismo que el descrito anteriormente, excepto que el cultivo se sembró a una densidad de 425.000 células/ml y se añadió 15% de medio adicional en aproximadamente el cuarto o quinto día sin llevar a cabo un recuento celular. También, la composición de citocinas del medio se modificó de forma que contuviese SCF (200 ng/ml) e IL-6 humana recombinante (200 ng/ml; Peprotech, número de catálogo 200-06, reconstituida hasta 100 ug/ml en ácido acético 10 mM estéril) ("medio CM/SCF/IL-6").

15 Las Fases I y II juntas duran aproximadamente 5 semanas. Durante las semanas 1-3 es evidente que hay algo de muerte y desechos en el cultivo, y hay un período durante las semanas 2-5 durante el cual un pequeño porcentaje del cultivo ya no está en suspensión, sino que en su lugar está adherido a la superficie de la vasija de cultivo.

20 Al igual que durante la Fase I, cuando el cultivo se va a resuspender en el séptimo día de cada ciclo, los contenidos de todos los matraces se combinan en un único recipiente antes de llevar a cabo un recuento celular, para asegurar la uniformidad de toda la población. Cada matraz se comprueba separadamente en busca de contaminación bajo el microscopio antes de la combinación, para evitar la contaminación de toda la población.

25 Cuando los matraces se combinan, aproximadamente el 75% del volumen se transfiere al recipiente común, dejando atrás alrededor de 10 ml, más o menos, en el matraz. El matraz que contiene el volumen que queda se golpeó brusca y lateralmente para descargar las células adheridas. El golpeteo se repitió en un ángulo perpendicular al primer golpeteo, para descargar completamente las células.

El matraz se recostó formando un ángulo de 45 grados durante un par de minutos antes de que el volumen que queda se transfiriese a la vasija de recuento. Las células se hicieron girar a 950 rpm durante 15 minutos antes de sembrar a 35-50 ml por matraz (a una densidad de 425.000 células/ml).

#### **30 Diferenciación de células progenitoras negativas para CD34 en mastocitos de tipo tejido conjuntivo**

Se preparó como antes una población proliferada de células progenitoras negativas para CD34, y se trató para formar un fenotipo positivo para triptasa/quimasa (tejido conjuntivo). Los métodos se llevan a cabo como se describe anteriormente para mastocitos de la mucosa, pero con la sustitución de IL-6 por IL-4 en el medio de cultivo. Las células obtenidas son típicas de mastocitos de tejido conjuntivo.

#### **35 Diferenciación de células progenitoras negativas para CD34 en basófilos**

Se preparó como se describe en la Sección 7.5.1.3, anterior, una población proliferada de células progenitoras negativas para CD34, y se usó para formar una población proliferada de basófilos. Las células negativas para CD34 se tratan como se describe para mastocitos de la mucosa, pero con la sustitución de IL-6 por IL-3 (a 20-50 ng/ml) en el medio de cultivo.

#### **40 Activación de baja densidad celular de CHMC con IgE: ensayos de triptasa y LTC4**

A placas con fondo en U de 96 pocillos duplicadas (Costar 3799) añádanse 65 ul de diluciones de compuesto o muestras de control que se han preparado en MT [137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5,6 mM de glucosa, 20 mM de Hepes (pH 7,4), 0,1% de seroalbúmina bovina (Sigma A4503)] que contiene 2% de MeOH y 1% de DMSO. Peletícense las células CHMC (980 rpm, 10 min.) y resuspéndanse en MT precalentado.

45 Añádanse 65 ul de células a cada placa de 96 pocillos. Dependiendo de la actividad de la desgranulación para cada donante de CHMC particular, cárguense 1000-1500 células/pocillo. Mézclense cuatro veces, seguido de una incubación durante 1 h a 37°C. Durante la incubación de 1 h, prepárese una disolución anti-IgE 6X [anticuerpo anti-IgE humana de conejo (1 mg/ml, Bethyl Laboratories A80-109A) diluido 1:167 en tampón MT]. Estimúlense las células añadiendo 25 ul de disolución anti-IgE 6X a las placas apropiadas. Añádanse 25 ul de MT a pocillos de control no estimulados. Mézclense dos veces tras la adición del anti-IgE. Incúbese a 37°C durante 30 minutos. Durante la incubación de 30 minutos, dilúyase la disolución madre de sustrato de triptasa 20 mM [(Z-Ala-Lys-Arg-AMC.2TFA; Enzyme Systems Products, #AMC-246)] 1:2000 en tampón de ensayo de triptasa [0,1 M de Hepes (pH 7,5), 10% p/v de glicerol, 10 uM de heparina (Sigma H-4898), 0,01% de NaN<sub>3</sub>]. Háganse girar las placas a 1000 rpm durante 10 min. para peletizar las células. Transfíranse 25 ul del sobrenadante a una placa de fondo negro de 96 pocillos, y añádanse a cada pocillo 100 ul de

disolución de sustrato de triptasa recientemente diluida. Incúbense las placas a temperatura ambiente durante 30 min. Léase la densidad óptica de las placas a 355 nm/460 nm en un lector de placas espectrofotométrico.

5 El leucotrieno C4 (LTC4) también se cuantifica usando un kit de ELISA sobre muestras de sobrenadante apropiadamente diluidas (determinadas empíricamente para cada población celular de donantes de forma que la medición de las muestras cae dentro de la curva patrón) siguiendo las instrucciones del proveedor.

**Activación de densidad celular elevada de CHMC con IgE: Ensayos de desgranulación (triptasa, histamina), leucotrieno (LTC4) y citocina (TNF alfa, IL-13)**

10 Mastocitos humanos cultivados (CHMC) se sensibilizaron durante 5 días con IL-4 (20 ng/ml), SCF (200 ng/ml), IL-6 (200 ng/ml), e IgE humana (CP 1035K de Cortx Biochem, 100-500 ng/ml, dependiendo de la generación) en medio CM. Después de sensibilizarlas, las células se contaron, se peletizaron (1000 rpm, 5-10 minutos), y se resuspendieron a  $1-2 \times 10^6$  células/ml en tampón MT. Añádanse 100 ul de suspensión celular a cada pocillo, y 100 ul de diluciones de compuesto. La concentración final de vehículo es 0,5% de DMSO. Incúbese a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>) durante 1 hora. Después de 1 hora de tratamiento con compuesto, estímense las células con 6X anti-IgE. Mézclense los pocillos con las células, y déjense incubar las placas a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>) durante una hora. Después de la incubación durante 1 hora, peleticense las células (10 minutos, 1000 rpm) y recójense 200 ul por pocillo del sobrenadante, teniendo cuidado de no perturbar el pelete. Colóquese la placa del sobrenadante sobre hielo. Durante la etapa de 7 horas (véase a continuación), realícese el ensayo de triptasa sobre el nadante que se ha diluido 1:500. Resuspéndase el pelete celular en 240 ul de medio CM que contiene 0,5% de DMSO y una concentración correspondiente de compuesto. Incúbense las células CHMC durante 7 horas a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). Tras la incubación, peleticense las células (1000 rpm, 10 minutos) y recójense 225 ul por pocillo y colóquense en -80°C hasta que se esté listo para llevar a cabo los ensayos de ELISA. Los ensayos de ELISA se realizan sobre muestras apropiadamente diluidas (determinadas empíricamente para cada población celular de donantes, de forma que la medición de la muestra cae dentro de la curva patrón) según las instrucciones del proveedor.

25 **Activación de densidad celular elevada de BMMC con IgE: Ensayos de desgranulación (hexosaminidasa, histamina), leucotrieno (LTC4), y citocina (TNF alfa, IL-6)**

**Preparación de medio acondicionado con WEHI**

30 El medio acondicionado con WEHI se obtuvo haciendo crecer células mielomonocíticas murinas WEHI-3B (American Type Culture Collection, Rockville, MD) en medio Eagle modificado de Iscove (Mediatech, Herndon, VA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS; JRH Biosciences, Kansas City, MO), 50 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) y 100 UI/ml de penicilina-estreptomocina (Mediatech) en un incubador con 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire, humidificado a 37°C. Se sembró una suspensión celular inicial a 200.000 células/ml, y después se dividió 1:4 cada 3-4 días durante un período de dos semanas. Los sobrenadantes libres de células se cosecharon, se repartieron en alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta que se necesitaron.

**Preparación de medio de BMMC**

35 El medio de BMMC consiste en 20% de medio acondicionado con WEHI, 10% de FBS inactivado por calor (JRH Biosciences), 25 mM de HEPES, pH 7,4 (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Mediatech), 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Mediatech), 1 mM de piruvato sódico (Mediatech), 50 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma) y 100 UI/ml de penicilina-estreptomocina (Mediatech) en medio RPMI 1640 (Mediatech). Para preparar el medio de BMMC, todos los componentes se añaden a una unidad filtrante de 1 l estéril, y se filtran a través de un filtro de 0,2 µm antes del uso.

40 **Protocolo**

45 Mastocitos derivados de médula ósea (BMMC) se sensibilizaron toda la noche con SCF murino (20 ng/ml) y anticuerpo monoclonal anti-DNP (10 ng/ml, Clon SPE-7, Sigma # D-8406) en medio de BMMC a una densidad celular de  $666 \times 10^3$  células/ml. Después de la sensibilización, las células se contaron, se peletizaron (1000 rpm, 5-10 minutos), y se resuspendieron a  $1-3 \times 10^6$  células/ml en tampón MT. Añádanse 100 ul de suspensión celular a cada pocillo, y 100 ul de diluciones de compuesto. La concentración final de vehículo es 0,5% de DMSO. Incúbese a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>) durante 1 hora. Después de 1 hora de tratamiento con compuesto, estímense las células con 6X estímulo (60 ng/ml de DNP-BSA). Mézclense los pocillos con las células y déjense incubar las placas a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>) durante una hora. Después de una incubación de 1 hora, peleticense las células (10 minutos, 1000 rpm) y recójense 200 ul por pocillo del sobrenadante, teniendo cuidado de no perturbar el pelete, y transfíranse a un tubo limpio o a una placa de 96 pocillos. Colóquese la placa con el sobrenadante sobre hielo. Durante la etapa de 4-5 horas (véase a continuación), llévase a cabo el ensayo de hexosaminidasa. Resuspéndase el pelete celular en 240 ul de medio acondicionado con WEHI que contiene 0,5% de DMSO y la concentración correspondiente de compuesto. Incúbense las células BMMC durante 4-5 horas a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). Tras la incubación, peleticense las células (1000 rpm, 10 minutos) y recójense 225 ul por pocillo y colóquense en -80°C hasta que se esté listo para llevar a cabo los ensayos de ELISA. Los ensayos de ELISA se realizan sobre muestras apropiadamente diluidas (determinadas empíricamente para cada población celular de donantes, de forma que la medición de la muestra cae dentro de la curva patrón) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Ensayo de hexosaminidasa: en una placa de ensayo de 96 pocillos negra sólida, añádanse 50 ul de sustrato de hexosaminidasa (4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida; 2 mM) a cada pocillo. Añádanse 50 ul de sobrenadante celular de BMMC (véase anteriormente) al sustrato de hexosaminidasa, colóquense a 37°C durante 30 minutos y léase la placa a 5, 10, 15 y 30 minutos en un espectrofotómetro.

#### 5 **Activación de basófilos con IgE o ácaro del polvo: Ensayo de liberación de histamina**

El ensayo de activación de basófilos se llevó a cabo usando sangre periférica humana completa procedente de donantes alérgicos a ácaros del polvo, eliminándose la mayoría de los glóbulos rojos mediante sedimentación con dextrano. La sangre periférica humana se mezcló 1:1 con dextrano T500 al 3%, y los glóbulos rojos (RBC) se dejaron sedimentar durante 20-25 min. La fracción superior se diluyó con 3 volúmenes de D-PBS, y las células se centrifugaron durante 10 min. a 1500 rpm, a temperatura ambiente (RT). El sobrenadante se aspiró, y las células se lavaron en un volumen igual de tampón MT. Finalmente, las células se resuspendieron en tampón MT que contiene 0,5% de DMSO en el volumen de sangre original. Se mezclaron 80 ul de células con 20 ul de compuesto en presencia de 0,5% de DMSO, por triplicado, en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos con fondo en V. Se ensayó un intervalo de dosis de 8 concentraciones de compuesto, dando como resultado una curva de respuesta a la dosis de 10 puntos, incluyendo una respuesta máxima (estimulada) y mínima (no estimulada). Las células se incubaron con compuesto durante 1 hora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, después de lo cual se añadieron 20 ul de 6X estímulo [1 ug/ml de anticuerpo anti-IgE (Bethyl Laboratories) o 667 au/ml de ácaro del polvo (Antigen Laboratories)]. Las células se estimularon durante 30 minutos a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. La placa se hizo girar durante 10 min. a 1500 rpm a temperatura ambiente, y se cosecharon 80 ul del sobrenadante para el análisis del contenido de histamina usando el kit de ELISA para histamina suministrado por Immunotech. El ELISA se llevó a cabo según las instrucciones del proveedor.

#### **Resultados**

En la TABLA 1 se proporcionan los resultados de los ensayos de CHMC de baja densidad (Sección 7.5.2), de los ensayos de BMMC de alta densidad (Sección 7.5.4) y de los ensayos con basófilos (Sección 7.5.5). En la TABLA 2 se proporcionan los resultados de los ensayos de CHMC de alta densidad (Sección 7.5.3). En las TABLAS 1 y 2, todos los valores dados son las IC<sub>50</sub> (en  $\mu$ M). Un valor de "9999" indica una IC<sub>50</sub> > 10  $\mu$ M, sin ninguna actividad medible a una concentración de 10  $\mu$ M. La mayoría de los compuestos ensayados tuvieron unas IC<sub>50</sub> de menos de 10  $\mu$ M, exhibiendo muchos de ellos unas IC<sub>50</sub> en el intervalo submicromolar.

#### **Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina inhiben la desgranulación mediada por el receptor Fc $\gamma$ RI**

La capacidad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención para inhibir la desgranulación mediada por Fc $\gamma$ RI se demostró con el compuesto R940347 en ensayos similares a los descritos en la Sección 7.5, con la excepción de que las células no se cebaron con IgE, y se activaron con fragmento Fab de anti-IgG humana de conejo (Bethyl Laboratories, número de catálogo A80-105).

Todos los compuestos ensayados mostraron unas IC<sub>50</sub> en el intervalo submicromolar.

TABLA 1

Compuesto de ensayo	Baja densidad			CHMC anti-IgE Hexos	CHMC Ionomicina Hexos	Basófilos anti-IgE Histamina	Basófilos Ionomicina Histamina	Basófilos Acaro del polvo Histamina	Densidad elevada								
	CHMC anti-IgE Triptasa	CHMC Ionomicina Triptasa	CHMC anti-IgE LTC4						BMCM anti-IgE hexos	BMCM Ionomicina Hexos	BMCM anti-IgE histamina	BMCM anti-IgE LTC4	BMCM anti-IgE TNF-alfa	BMCM anti-IgE IL-6			
R940345	1,712																
R940347	0,063	99															
R945242	0,247	9999															
R945263	1,642																
R921304	0,085	9999															
R945299																	
R945298	9999	9999															
R940344	9999																

ES 2 445 208 T3

TABLA 1B					
Compuesto	CHMC anti-IgE Triptasa	CHMC Ionomicina Triptasa	BMMC anti-IgE Hexos.	BMMC anti-IgE TNF-alfa	BMMC anti-IgE IL-6
R940371	0,316				
R940372	0,094				
R940373	8888				
R940380	0,042				
R940381	8888				
R940382	0,104				
R940384	1,32				
R940386	3,42				
R940387	1,19				
R940389	0,06				
R940390	9999	9999			
R940391	0,261				
R940392	0,145				
R940394	16,5353				
R940395	9999				
R945389	0,0748	9999			
R945390	0,118	9999			
R945391	0,094	9999			
R945392	0,085	9999			
R945398	7				
R945399	0,163	9999			
R945400	9999				
R945401	8888	9999			
R945402	0,112				
R945404	0,103				
R945405	0,131				
R945406	8888				
R945407	8888				
R945408	9999				
R945409	9999				
R945410	9999				
R945412	0,095				
R945413	1,698				
R945416	0,053				
R945417	2,52082	9999			



TABLA 1B					
Compuesto	CHMC anti-IgE Tryptasa	CHMC Ionomicina Tryptasa	BMMC anti-IgE Hexos.	BMMC anti-IgE TNF-alfa	BMMC anti-IgE IL-6
R945418	8888	9999			
R945419	0,125				
R945420	0,436				
R945421	0,371				
R945422	0,092				
R945423	0,145				
R945424	0,188				
R945426	0,256				
R945427	0,279				
R945432	0,049				
R945433	0,276				
R945434	8888				
R945439	8888				
R945440	8888				
R945443	0,081	9999			
R945444	0,043	9999			
R945454	20,6	9999			
R945455	8888	9999			
R945456	8888				
R945458	8888				

### Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención inhiben selectivamente la cascada del receptor de IgE aguas arriba

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

#### Activación de densidad celular baja de CHMC con ionomicina: Ensayo de triptasa

Los ensayos para la desgranulación de mastocitos inducida por ionomicina se llevaron a cabo como se describe para los ensayos de activación de baja densidad de CHMC con IgE (Sección 7.5.2, *más arriba*), con la excepción de que, durante la incubación de 1 hora, se preparó una disolución 6X de ionomicina [5 mM de ionomicina (Sigma I-0634) en MeOH (madre) diluida 1:416,7 en tampón MT (2  $\mu$ M final)] y las células se estimularon añadiendo 25  $\mu$ l de la disolución 6X de ionomicina a las placas apropiadas.

#### Activación de basófilos con ionomicina: ensayo de liberación de histamina

Los ensayos para la desgranulación de basófilos inducida por ionomicina se llevaron a cabo como se describe para el ensayo de activación de basófilos con IgE o con ácaro del polvo (Sección 7.5.5, *más arriba*), con la excepción de que, tras la incubación con compuesto, las células se estimularon con 20  $\mu$ l de ionomicina 2  $\mu$ M.

#### Resultados

Los resultados de los ensayos de desgranulación inducida por ionomicina, dados como valores de IC<sub>50</sub> (en  $\mu$ M), se proporcionan en la TABLA 1, *más arriba*. De los compuestos activos ensayados (*es decir*, aquellos que inhiben la desgranulación inducida por IgE), la inmensa mayoría no inhibe la desgranulación inducida por ionomicina, confirmando que estos compuestos activos inhiben selectivamente la cascada de transducción de señales del receptor de IgE temprana (o aguas arriba).

Estos resultados se confirmaron para ciertos compuestos midiendo el flujo de ion calcio inducido por anticuerpos anti-IgE o inducido por ionomicina en células CHMC. En estos ensayos del flujo de Ca<sup>2+</sup>, 10  $\mu$ M de R921218 y 10  $\mu$ M de R902420 inhibieron el flujo de Ca<sup>2+</sup> inducido por anticuerpos anti-IgE, pero no tuvieron efecto sobre el flujo de Ca<sup>2+</sup> inducido por ionomicina (véase la FIG. 4).

#### El efecto inhibitor de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención es inmediato

Para ensayar la inmediatez de su efecto inhibitor, se añadieron simultáneamente ciertas 2,4-pirimidindiaminas de la invención con un activador de anticuerpo anti-IgE en los ensayos celulares descritos anteriormente. Todos los compuestos ensayados bloquearon la desgranulación inducida por IgE de células CHMC en el mismo grado que el observado cuando los compuestos se preincubaron con células CHMC durante 10 ó 30 min. antes de la reticulación del receptor.

#### Cinética de la actividad farmacológica *in vitro*

Los compuestos R921218, R921302, R921219, R926240, R940277, R926742, R926495, R909243 y R926782 se ensayaron en experimentos de lavado. En los experimentos, células CHMC se activaron inmediatamente con anticuerpo anti-IgE en presencia de 1,25  $\mu$ M de compuesto (tiempo cero), o el compuesto se lavó tras la activación con anticuerpo anti-IgE a 30, 60 ó 120 min. La actividad inhibidora de estos compuestos disminuyó enormemente 30 min. después de la eliminación del compuesto, indicando que se requiere una exposición constante de los mastocitos a estos compuestos para una inhibición máxima de la desgranulación. Los otros compuestos ensayados produjeron resultados similares.

#### Toxicidad: células T y B

La capacidad de los compuestos de la invención para ejercer su actividad inhibidora sin ser tóxicos para las células del sistema inmunitario se demostró en ensayos celulares con células B y T. A continuación se proporcionan los protocolos para los ensayos.

#### Toxicidad de Jurkat (célula T)

Dilúyanse células Jurkat hasta 2 x 10<sup>5</sup> células/ml en medio RPMI completo (10% de suero fetal bovino inactivado por calor), e incúbense a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 horas. Añádanse 65  $\mu$ l de células a 7,7 x 10<sup>5</sup> células/ml a una placa de 96 pocillos con fondo en V (tratada con TC, Costar) que contiene 65  $\mu$ l de 2X compuesto (la concentración final del vehículo es 0,5% de DMSO, 1,5% de MeOH). Mézclase, e incúbense las placas durante 18-24 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. La toxicidad se evaluó mediante análisis citométrico de flujo de la dispersión de la luz celular.

#### Toxicidad de BJAB (célula B)

La estirpe de células B BJAB se cultivó en fase logarítmica en RPMI 1640 + 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 1x L-glutamina, 1x penicilina, 1x estreptavidina y 1x betamercaptoetanol a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. En primer lugar, las BJAB se cosecharon, se hicieron girar y se resuspendieron en medio de cultivo hasta una concentración de  $7,7 \times 10^5$  células/ml. Se mezclaron 65  $\mu$ l de células con 65  $\mu$ l de compuesto, por duplicado y en presencia de 0,1% de DMSO, en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos con fondo en V. Las células se incubaron con compuesto a diversas diluciones a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. La toxicidad se evaluó mediante análisis citométrico de flujo de la dispersión de la luz celular.

#### Toxicidad: ensayo de Cell Titer Glo

Siémbrense 50  $\mu$ l de células ( $1 \times 10^6$ /ml) en cada pocillo que contiene 50  $\mu$ l de compuesto. La concentración final del vehículo es 0,5% de DMSO, 1,5% de MeOH. Agítense las placas durante 1 minuto para mezclar las células y el compuesto. Incúbense las placas a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>) durante 18 horas. Al siguiente día, cosechéense 50  $\mu$ l de células de cada pocillo, y añádanse a 50  $\mu$ l de reactivo Cell Titer Glo (Invitrogen). Agítense las placas durante 1 minuto. Léanse en un luminómetro.

#### Resultados

En la TABLA 2, *más arriba*, se presentan los resultados de los ensayos de toxicidad de las células T y B, dados como valores de IC<sub>50</sub> (en  $\mu$ M). Con unas pocas excepciones (véase la TABLA 1), todos los compuestos ensayados no fueron tóxicos ni para las células B ni para las células T a las concentraciones inhibitorias efectivas. Los ensayos realizados con células B primarias produjeron resultados similares.

#### Los compuestos son eficaces en el tratamiento de asma

La eficacia del compuesto R921304 en el tratamiento de asma también se demostró en un modelo de ratón de asma alérgica.

#### Protocolo de estudio

Se sensibilizaron ratones frente a ovoalbúmina (proteína de pollo) en presencia de un adyuvante (Alum) por vía intraperitoneal en el día 0 y en el día 7. Una semana más tarde, los ratones se sometieron a una exposición intranasalmente con ovoalbúmina en los Días 14, 15 y 16 (modelo más restrictivo) o en el Día 14 (modelo menos restrictivo). Este régimen de sensibilización y exposición conduce a hipersensibilidad de las vías respiratorias e inflamación en los pulmones, que son dos características dominantes del asma alérgico humano. En el modelo de ratón, las respuestas in vivo de las vías respiratorias se miden usando un pletismógrafo de cuerpo completo que determina la PENH (paua aumentada, Buxco Electronics). La PENH es un valor adimensional que comprende el caudal inspiratorio pico (PIF), el caudal espiratorio pico (PEF), el tiempo de inspiración, el tiempo de expiración y el tiempo de relajación, y se considera un parámetro validado de la sensibilidad de las vías respiratorias. Las respuestas frente a la exposición alérgica (OVA) se comparan con animales expuestos solamente a disolución salina. Veinticuatro horas después de la exposición, los ratones se exponen a dosis crecientes de metacolina (agonista del receptor muscarínico), lo que da como resultado una contracción del músculo liso. Los ratones expuestos a ovoalbúmina demuestran una hipersensibilidad significativa de las vías respiratorias a metacolina, cuando se comparan con los ratones expuestos a la disolución salina. Además, se observa un infiltrado celular en las vías respiratorias en animales expuestos a ovoalbúmina, cuando se comparan con los ratones expuestos a la disolución salina. Este infiltrado celular se caracteriza principalmente por eosinófilos, pero también está presente un influjo más pequeño de neutrófilos y células mononucleares.

El uso de este modelo para la evaluación de inhibidores de pequeñas moléculas de la desgranulación de mastocitos se ha validado de varias formas. En primer lugar, usando ratones con deficiencia de mastocitos ( $W/W^V$ ), se ha demostrado que las respuestas inducidas por ovoalbúmina dependen de la presencia de mastocitos. En los ratones con deficiencia de mastocitos, la sensibilización y exposición a ovoalbúmina no da como resultado una hipersensibilidad de las vías respiratorias ni influjo de eosinófilos. En segundo lugar, el estabilizador de mastocitos, cromolina, fue capaz de bloquear la hipersensibilidad e inflamación de las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina (datos no mostrados). El uso de este modelo para evaluar compuestos para el tratamiento de respuestas asmáticas que pueden estar mediadas por mecanismos distintos de la estabilización de mastocitos está apoyado además por el efecto inhibitorio de los esteroides dexametasona y budesonida sobre la broncoconstricción inducida por metacolina.

#### Resultados

La eficacia de R921304 se evaluó mediante administración intranasal en 10 días consecutivos, desde el Día 7 hasta el Día 16, a una dosis de 20 mg/kg, con las últimas 3 dosis administradas 30 minutos antes de la exposición a disolución salina o a ovoalbúmina. R921304 fue capaz de inhibir la hipersensibilidad de las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina frente a metacolina, cuando se compara con los ratones tratados con el vehículo.

Estos resultados demuestran claramente que R921219 y R921304 son eficaces inhibiendo las respuestas de las vías respiratorias en un modelo de ratón de asma alérgica.

### Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina inhiben la fosforilación de proteínas aguas abajo de Syk cinasa en mastocitos activados

El efecto inhibitorio de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina sobre la fosforilación de proteínas aguas abajo de Syk cinasa se ensayó con los compuestos R921304 en células BMMC activadas por el receptor de IgE.

5 Para el ensayo, se incubaron células BMMC en presencia de concentraciones variables de compuesto de ensayo (0,08  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 1 h a 37°C. Las células se estimularon entonces con anticuerpo anti-IgE como se describe previamente. Después de 10 min., las células se lisaron, y las proteínas celulares se separaron mediante electroforesis (SDS PAGE).

10 Tras la electroforesis, la fosforilación de las proteínas indicadas en FIGS. 7, 10 y 11A-D se evaluó mediante inmunotransferencia. Los anticuerpos se adquirieron de Cell Signaling Technology, Beverley, MA.

Haciendo referencia a las FIGS. 7, 10 y 11A-D, los compuestos indicados ensayados inhibieron la fosforilación de proteínas aguas abajo de Syk, pero no aguas arriba de Syk, en la cascada de señalización del receptor de IgE, confirmando que los compuestos inhiben aguas arriba la desgranulación inducida por IgE, y que los compuestos ejercen su actividad inhibitoria inhibiendo Syk cinasa.

### 15 Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina inhiben Syk cinasa en ensayos bioquímicos

Se ensayaron varios compuestos de 2,4-pirimidindiamina para determinar la capacidad para inhibir la fosforilación, catalizada por Syk cinasa, de un sustrato peptídico en un ensayo bioquímico de polarización fluorescente con Syk cinasa aislada. En este experimento, los Compuestos se diluyeron hasta 1% de DMSO en tampón de cinasa (20 mM de HEPES, pH 7,4, 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM de  $\text{MnCl}_2$ , 1 mM de DTT, 0,1 mg/ml de gammaglobulina bovina acetilada). El compuesto en 1% de DMSO (0,2% de DMSO final) se mezcló con disolución de ATP/sustrato a temperatura ambiente. Se añadió Syk cinasa (Upstate, Lake Placid NY) hasta un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{l}$ , y la reacción se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las condiciones finales de la reacción enzimática fueron 20 mM de HEPES, pH 7,4, 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM de  $\text{MnCl}_2$ , 1 mM de DTT, 0,1 mg/ml de gammaglobulina bovina acetilada, 0,125 ng de Syk, 4  $\mu\text{M}$  de ATP, 2,5  $\mu\text{M}$  de sustrato peptídico (biotina-EQEDEPEGDYEEVLE-CONH<sub>2</sub>, SynPep Corporation). Se añadió EDTA (10 mM final)/anticuerpo anti-fosfotirosina (1X final)/trazador fosfopeptídico fluorescente (0,5X final) en tampón de dilución FP para detener la reacción para un volumen total de 40  $\mu\text{l}$  según las instrucciones del fabricante (PanVera Corporation). La placa se incubó durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las placas se leyeron en un lector de placas de polarización de la fluorescencia Polarion (Tecan). Los datos se convirtieron en cantidad de fosfopéptido presente usando una curva de calibración generada mediante competición con el competidor fosfopeptídico proporcionado en el Kit de Ensayo de Tirosina Cinasa, Green (PanVera Corporation).

En la TABLA 6, a continuación, se muestran los resultados del ensayo:

Com-puesto	Syk cinasa IC50 (en $\mu\text{M}$ )	Com-puesto	Syk cinasa IC50 (en $\mu\text{M}$ )	Com-puesto	Syk cinasa IC50 (en $\mu\text{M}$ )
R945398	0.182	R945419	0.127	R940380	0.029
R945399	0.166	R945422	0.087	R940381	9999.846
R945400	17.925	R945423	0.273	R940382	0.144
R945401	0.007	R945424	0.665	R940384	9999
R945402	0.418	R945426	0.301	R940386	19.49
R945402	0.418	R945427	0.479	R940387	9999
R945404	9999	R945432	4444.247	R940389	0.053
R945405	0.168	R945433	0.431	R940390	9999
R945407	9999	R945434	9999	R921304	0.017
R945412	0.308	R940347	0.038	R945299	0.022
R945413	9999	R940371	3.643	R945389	0.035
R945416	0.515	R940372	0.253	R945390	0.009
R945417	9999	R940380	0.029	R945391	0.01
R945418	9999	R940373	9999	R945392	0.014

Estos datos demuestran que todos los compuestos ensayados inhiben la fosforilación por Syk cinasa, con IC<sub>50</sub> en el intervalo submicromolar. Todos los compuestos ensayados inhiben la fosforilación por Syk cinasa con IC<sub>50</sub> en el intervalo micromolar.

### Los compuestos son eficaces para el tratamiento de la autoinmunidad

La eficacia *in vivo* de ciertos compuestos de 2,4-pirimidindiamina con respecto a enfermedades autoinmunitarias se evaluó en la reacción de Arthus pasiva inversa, un modelo agudo de lesión tisular mediada por antígenos-anticuerpos, y en varios modelos de enfermedades de autoinmunidad e inflamación. Estos modelos son similares por cuanto un anticuerpo contra un antígeno específico media la enfermedad inflamatoria provocada por el complejo inmunitario (provocada por IC), y la destrucción subsiguiente de tejido. La deposición de IC en sitios anatómicos específicos (sistema nervioso central (SNC) para encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE), y sinovio para artritis inducida por colágeno (CIA)) conduce a la activación de células que expresan Fc $\gamma$ R y Fc $\epsilon$ R de superficie, principalmente mastocitos, macrófagos, y neutrófilos, lo que da como resultado la liberación de citocinas, y la quimiotaxia de neutrófilos. La activación de la respuesta inflamatoria es responsable de las respuestas efectoras aguas abajo, incluyendo edema, hemorragia, infiltración de neutrófilos, y liberación de mediadores proinflamatorios. Las consecuencias de estos sucesos provocados por IC son difíciles de identificar en trastornos autoinmunitarios; no obstante, muchos investigadores han demostrado que la inhibición de la ruta de señalización de Fc $\gamma$ R en estos modelos de animales ha dado como resultado una reducción significativa del comienzo y gravedad de la enfermedad.

#### Los compuestos son eficaces en la reacción de Arthus en el ratón

La eficacia *in vivo* del compuesto R940347 para inhibir la cascada inflamatoria provocada por IC se demostró en un modelo de ratón de la Reacción de Arthus Pasiva Inversa (reacción de RPA).

#### Modelo

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

#### Protocolo de estudio

En este sistema modelo, los compuestos de ensayo se administran en varios momentos de tiempo antes de la administración de los Ab y los Ag. Se inyecta intradérmicamente una disolución de anti-IgG de OVA de conejo (50  $\mu$ g en 25  $\mu$ l/ratón), e inmediatamente le sigue una inyección intravenosa de albúmina de huevo de pollo (20 mg/kg de peso corporal) en una disolución que contiene 1% de colorante de azul de Evans. El grado de edema y hemorragia se mide en la piel dorsal de ratones C57BL/6, usando el colorante de azul de Evans como un indicador del daño tisular local. Como control se usa IgG de conejo policlonal purificado.

El tiempo de pretratamiento, en el que los compuestos de ensayo se administran antes de la exposición a Ab/Ag, depende de las propiedades farmacocinéticas (PK) de cada compuesto individual. Cuatro horas después de la inducción de la reacción de Arthus, los ratones se eutanasiaron, y los tejidos se recogieron para evaluación del edema. Este sistema modelo nos permite identificar rápidamente la actividad *in vivo* de muchos inhibidores.

#### Resultados

Todos los compuestos ensayados se administraron mediante la vía oral.

R940347 inhibió el edema en un 89% cuando se administró a una dosis de 100 mg/kg, 2 horas antes de la exposición.

En la Tabla 7 se resumen los resultados para los compuestos ensayados.

			% de inhibición frente al control con vehículo	Concentración plasmática $\pm$ SEM (ng/ml)
Nombre del compuesto	Dosis (mg/kg)	Tiempo de Pretratamiento (h)	Tamaño del edema $\pm$ SEM	Exposición = tiempo de pretratamiento + 4 horas
R940347	100	0,5	36,7 $\pm$ 22,4	1596 $\pm$ 485
		1	48,2 $\pm$ 5,7	3014 $\pm$ 590
		2	88,9 $\pm$ 9,1	1992 $\pm$ 247
R940347	100	1	48	nd*

**Tabla 7**

			% de inhibición frente al control con vehículo	Concentración plasmática ± SEM (ng/ml)
Nombre del compuesto	Dosis (mg/kg)	Tiempo de Pretratamiento (h)	Tamaño del edema ± SEM	Exposición = tiempo de pretratamiento + 4 horas
	100	2	89	nd

\*nd = no determinado

**Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención inhiben la activación de macrófagos**

**Descripción**

5 La capacidad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención para inhibir la activación de macrófagos diferenciados se demostró midiendo la liberación de citocinas a partir de macrófagos estimulados. La liberación de factor alfa de necrosis tumoral (TNF) e interleucina 6 (IL-6) se cuantificó en respuesta a la estimulación con IgG o LPS.

**Purificación y cultivo de macrófagos humanos**

10 Se purificaron monocitos CD14+ a partir de PBMC (Allcells # PB002) usando el kit de aislamiento de monocitos (Miltenyi biotec #130-045-501) según las instrucciones del fabricante. La pureza se evaluó midiendo el porcentaje de células CD14+ mediante citometría de flujo. Típicamente se logró una pureza > 90%. Las células CD14+ purificadas se colocaron entonces en placas (6x10<sup>6</sup> células/cápsula de TC de 150 cm en 15 ml de medio) en Macrophage-SFM (Gibco #12065-074) con 100 ng/ml de M-CSF (Pepro Tech #300-25), y se dejaron diferenciar durante cinco días. Al final de ese período, la morfología celular y los marcadores de superficie celular (CD14, HLA-DR, B7.1, B7.2, CD64, CD32, y CD16) reflejaron la presencia de macrófago diferenciado maduro.

**Estimulación con LPS**

15 Para la estimulación con LPS, se añadieron 10 ul de una disolución madre 10X a la mezcla de células preincubada-compuesto, hasta una concentración final de 10 ng/ml. Las células se incubaron entonces durante 16 h a 37°C, y los sobrenadantes se analizaron como se describe anteriormente.

20 Se compararon concentraciones variadas de compuesto frente al disolvente sólo para determinar la IC<sub>50</sub> de cada compuesto para cada citocina. Las IC<sub>50</sub> representativas para compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11**

Compuesto	Jurkat	1° Célula T					1° Célula B	Monocitos/Macrófago	
		CD69 IC50 (en μM)	TNF IC50 (en μM)	IL2 IC50 (en μM)	GMSCF IC50 (en μM)	IL4 IC50 (en μM)		IFNg IC50 (en μM)	TNF IC50 (en μM)
R940344	7,735								
R940345	5,395								
R940347	0,581	0,0992	1,894	1,613	0,212	1,673	0,47	0,038	0,019
R945242	1,707								
R945263	4,467								
R921304	0,141	1,497	2,772	1,567	0,366	2,894	0,167		
R945298	9,467								
R945299	1,063								
R950346	1,948								
R950347	2,704								
R950348	0,224								
R950349	0,363								
R950356	5,731								

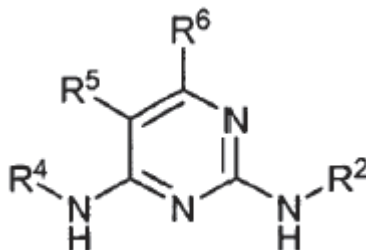
ES 2 445 208 T3

R950368	0,125								
R950371	1,105								
R950372	2,192								
R950373	3,614								
R950374	1,65								
R950376	18,08								
R950377	5,962								
R950378	9999								
R950379	0,878								
R950380	8,688								
R950381	0,805								
R950382	1,547								
R950383	1,026								
R950385	2,58								
R950386	11,354								

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle para facilitar la comprensión, será manifiesto que se pueden realizar algunos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones anejas. En consecuencia, las realizaciones descritas se han de considerar como ilustrativas y no restrictivas, y la invención no se limitará a los detalles dados aquí, sino que se puede modificar dentro del alcance y equivalentes de las reivindicaciones anejas.

## Reivindicaciones

1. Un compuesto de formula (Ia)



o una sal del mismo, en la que:

- 5  $R^5$  se selecciona del grupo que consiste en halógeno, halógeno,  $-OR^d$ ,  $-SR^d$ , haloalquiloxi (C1-C3), perhaloalquiloxi (C1-C3),  $-NR^cR^c$ , haloalquilo (C1-C3), perhaloalquilo (C1-C3),  $-CN$ ,  $-NC$ ,  $-OCN$ ,  $-SCN$ ,  $-NO$ ,  $-NO_2$ ,  $-N_3$ ,  $-S(O)R^d$ ,  $-S(O)_2R^d$ ,  $-S(O)_2OR^d$ ,  $-S(O)NR^cR^c$ ;  $-S(O)_2NR^cR^c$ ,  $-OS(O)R^d$ ,  $-OS(O)_2R^d$ ,  $-OS(O)_2OR^d$ ,  $-OS(O)NR^cR^c$ ,  $-OS(O)_2NR^cR^c$ ,  $-C(O)R^d$ ,  $-C(O)OR^d$ ,  $-C(O)NR^cR^c$ ,  $-C(NH)NR^cR^c$ ,  $-OC(O)R^d$ ,  $-SC(O)R^d$ ,  $-OC(O)OR^d$ ,  $-SC(O)OR^d$ ,  $-OC(O)NR^cR^c$ ,  $-SC(O)NR^cR^c$ ,  $-OC(NH)NR^cR^c$ ,  $-SC(NH)NR^cR^c$ ,  $-[NHC(O)]_nR^d$ ,  $-[NHC(O)]_nOR^d$ ,  $-[NHC(O)]_nNR^cR^c$  y  $-[NHC(NH)]_nNR^cR^c$ , arilo (C5-C10) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, arilalquilo (C6-C16) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, y heteroarilalquilo de 6-16 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, alquileno (C1-C4) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, y alquileno (C2-C4) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes;

- 20 cada  $R^6$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno,  $-OR^d$ ,  $-SR^d$ , haloalquiloxi (C1-C3), perhaloalquiloxi (C1-C3),  $-NR^cR^c$ , haloalquilo (C1-C3), perhaloalquilo (C1-C3),  $-CN$ ,  $-NC$ ,  $-OCN$ ,  $-SCN$ ,  $-NO$ ,  $-NO_2$ ,  $-N_3$ ,  $-S(O)R^d$ ,  $-S(O)_2R^d$ ,  $-S(O)_2OR^d$ ,  $-S(O)NR^cR^c$ ;  $-S(O)_2NR^cR^c$ ,  $-OS(O)R^d$ ,  $-OS(O)_2R^d$ ,  $-OS(O)_2OR^d$ ,  $-OS(O)NR^cR^c$ ,  $-OS(O)_2NR^cR^c$ ,  $-C(O)R^d$ ,  $-C(O)OR^d$ ,  $-C(O)NR^cR^c$ ,  $-C(NH)NR^cR^c$ ,  $-OC(O)R^d$ ,  $-SC(O)R^d$ ,  $-OC(O)OR^d$ ,  $-SC(O)OR^d$ ,  $-OC(O)NR^cR^c$ ,  $-SC(O)NR^cR^c$ ,  $-OC(NH)NR^cR^c$ ,  $-SC(NH)NR^cR^c$ ,  $-[NHC(O)]_nR^d$ ,  $-[NHC(O)]_nOR^d$ ,  $-[NHC(O)]_nNR^cR^c$  y  $-[NHC(NH)]_nNR^cR^c$ , arilo (C5-C10) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, arilalquilo (C6-C16) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, y heteroarilalquilo de 6-16 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes;

$R^8$  se selecciona del grupo que consiste en  $R^a$   $R^a$ , sustituido con uno o más del mismo o diferente  $R^a$  o  $R^b$ ,

- 30  $R^b$ ,  $-OR^a$  sustituidos con uno o más del mismo o diferente  $R^a$  o  $R^b$ ,  $-B(OR^a)_2$ ,  $-B(NR^cR^c)_2$ ,  $-(CH_2)_m-R^b$ ,  $-(CHR^a)_m-R^b$ ,  $-O-(CH_2)_m-R^b$ ,  $-S-(CH_2)_m-R^b$ ,  $-O-CHR^aR^b$ ,  $-O-CR^a(R^b)_2$ ,  $-O-(CHR^a)_m-R^b$ ,  $-O-(CH_2)_m-CH[(CH_2)_mR^b]R^b$ ,  $-S-(CHR^a)_m-R^b$ ,  $-C(O)NH-(CH_2)_m-R^b$ ,  $-C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b$ ,  $-O-(CH_2)_m-C(O)NH-(CH_2)_m-R^b$ ,  $-S-(CH_2)_m-C(O)NH-(CH_2)_m-R^b$ ,  $-O-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b$ ,  $-S-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b$ ,  $-NH-(CH_2)_m-R^b$ ,  $-NH-(CHR^a)_m-R^b$ ,  $-N[(CH_2)_mR^b]_2$ ,  $-NH-C(O)-NH-(CH_2)_m-R^b$ ,  $-NH-C(O)-(CH_2)_m-CHR^bR^b$  y  $-NH-(CH_2)_m-C(O)-NH-(CH_2)_m-R^b$ ;

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

- 40 cada  $R^b$  es un grupo adecuado seleccionado independientemente del grupo que consiste en  $-C(O)R^d$ ,  $-C(O)OR^d$ ,  $=O$ ,  $-OR^d$ , haloalquiloxi (C1-C3),  $-OCF_3$ ,  $=S$ ,  $-SR^d$ ,  $=NR^d$ ,  $=NOR^d$ ,  $-NR^cR^c$ , halógeno,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-NC$ ,  $-OCN$ ,  $-SCN$ ,  $-NO$ ,  $-NO_2$ ,  $=N_2$ ,  $-N_3$ ,  $-S(O)R^d$ ,  $-S(O)_2R^d$ ,  $-S(O)_2OR^d$ ,  $-S(O)NR^cR^c$ ,  $-S(O)_2NR^cR^c$ ,  $-OS(O)R^d$ ,  $-OS(O)_2R^d$ ,  $-OS(O)_2OR^d$ ,  $-OS(O)_2NR^cR^c$ ,  $-C(O)NR^cR^c$ ,  $-C(NH)NR^cR^c$ ,  $-C(NR^a)NR^cR^c$ ,  $-C(NOH)R^a$ ,  $-C(NOH)NR^cR^c$ ,  $-OC(O)R^d$ ,  $-OC(O)OR^d$ ,  $-OC(O)NR^cR^c$ ,  $-OC(NH)NR^cR^c$ ,  $-OC(NR^a)NR^cR^c$ ,  $-[NHC(O)]_nR^d$ ,  $-[NR^aC(O)]_nR^d$ ,  $-[NHC(O)]_nOR^d$ ,  $-[NR^aC(O)]_nOR^d$ ,  $-[NHC(O)]_nNR^cR^c$ ,  $-[NR^aC(O)]_nNR^cR^c$ ,  $-[NHC(NH)]_nNR^cR^c$  y  $-[NR^aC(NR^a)]_nNR^cR^c$ ;

- 45 cada  $R^c$  es independientemente un grupo de protección  $R^a$ , o, como alternativa, cada  $R^c$  se toma junto con el átomo de nitrógeno al que está enlazado para formar un cicloheteroalquilo o heteroarilo de 5 a 8 miembros que puede incluir opcionalmente uno o más de los mismos o diferentes heteroátomos adicionales, y que puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes  $R^a$  o grupos  $R^b$  adecuados;

cada  $R^d$  es independientemente un  $R^a$  o un grupo de protección;

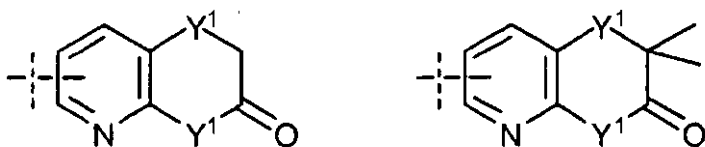
cada  $m$  es independientemente un número entero de 1 a 3; y



cada  $n$  es independientemente un número entero de 0 a 3.

$R^2$  se selecciona del grupo que consiste en alquilo (C1-C6) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, cicloalquilo (C3-C8) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, cicloheteroalquilo de 3-8 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, arilo (C5-C15) opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes, y heteroarilo de 5-15 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^8$  o diferentes;

$R^4$  es



en la que:

10 cada  $Y^1$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en O,  $NR^{37}$ , S, SO,  $SO_2$ ,  $SONR^{36}$  y NH;

$R^{36}$  es hidrógeno o alquilo; y

$R^{37}$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno o un progrupo seleccionado del grupo que consiste en  $-CH_2-PO(OR^8)_2$ , arilo, arilalquilo, heteroarilo,  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $-CR^aR^b-O-C(OR^8)$ ,  $-CR^aR^b-O-PO(OR^8)_2$ ,  $-CH_2-O-PO(OR^8)_2$ ,  $-C(O)-CR^aR^b-N(CH_3)_2$ ,  $-CR^aR^b-O-C(O)-CR^aR^b-N(CH_3)_2$ ,  $-C(OR^8)$ , y  $-C(O)-NR^8-C(OR^8)$ .

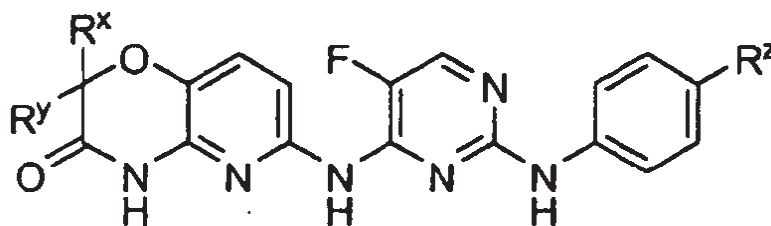
15 2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que  $R^8$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en  $R^d$ ,  $-NR^cR^c$ ,  $-(CH_2)_m-NR^cR^c$ ,  $-C(O)NR^cR^c$ ,  $-(CH_2)_m-C(O)NR^cR^c$ ,  $-C(O)OR^d$ ,  $-(CH_2)_m-C(O)OR^d$  y  $-(CH_2)_m-OR^d$ .

3. El compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que cada  $R^c$  se toma junto con el átomo de nitrógeno al que está enlazado para formar un cicloheteroalquilo o heteroarilo de 5 a 8 miembros que opcionalmente puede incluir uno o más de los mismos heteroátomos adicionales o diferentes, y que puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos grupos  $R^a$  o  $R^b$  o diferentes adecuados.

20

4. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que  $R^5$  es fluro y  $R^6$  es H.

5. El compuesto según la reivindicación 1 de fórmula



en la que:

25  $R^x$  y  $R^y$  son independientemente H o metilo; y

$R^z$  es (a) piperazin-1-ilo sustituido en el N en la posición 4 con metoxicarbonilo, metilcarbonilo, o metilo, o (b) morfolinilo.

6. El compuesto según la reivindicación 1 que es

5-Fluoro-N2-(4-morfolinofenil)-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina;

30 N4-(2,2-Dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-[4-(4-metoxicarbonilpiperazino)fenil]-2,4-pirimidindiamina;

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

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

5-Fluoro-N2-[4-(4-metilpiperazino)fenil]-N4-(2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidindiamina;

N4-(2,2-Dimetil-2H-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-[4-(4-metilpiperazino)fenil]-2,4-pirimidindiamina; o

una sal farmacéuticamente aceptable de uno de los anteriores.

7. Una composición que comprende un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 8. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una composición según la reivindicación 7, para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad autoinmunitaria y/o uno o más síntomas asociados con ella en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una composición según la reivindicación 7.

9. El compuesto o composición según la reivindicación 8, en el que el mamífero es un ser humano.

10 10. El compuesto o la composición según la reivindicación 9, en el que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en enfermedades autoinmunitarias que se denominan frecuentemente como trastornos autoinmunitarios de un solo órgano o de un solo tipo de células, y enfermedades autoinmunitarias que se denominan frecuentemente por implicar un trastorno autoinmunitario sistémico.

15 11. El compuesto o la composición según la reivindicación 9, en el que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de anemia perniciosa, encefalomiелitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmia simpática, miastenia grave, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, hepatitis agresiva crónica, colitis ulcerosa y glomerulopatía membranosa.

20 12. El compuesto o la composición según la reivindicación 9, en el que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, síndrome de Reiter, polimiositis, dermatomiositis, esclerosis sistémica, panarteritis nudosa, esclerosis múltiple y penfigoide ampolloso.

13. El compuesto o la composición según la reivindicación 9, en el que la enfermedad autoinmunitaria es lupus eritematoso sistémico.

14. El compuesto o la composición según la reivindicación 9, en el que la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.

25 15. El compuesto o la composición según la reivindicación 9, en el que la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple.

FIG. 1

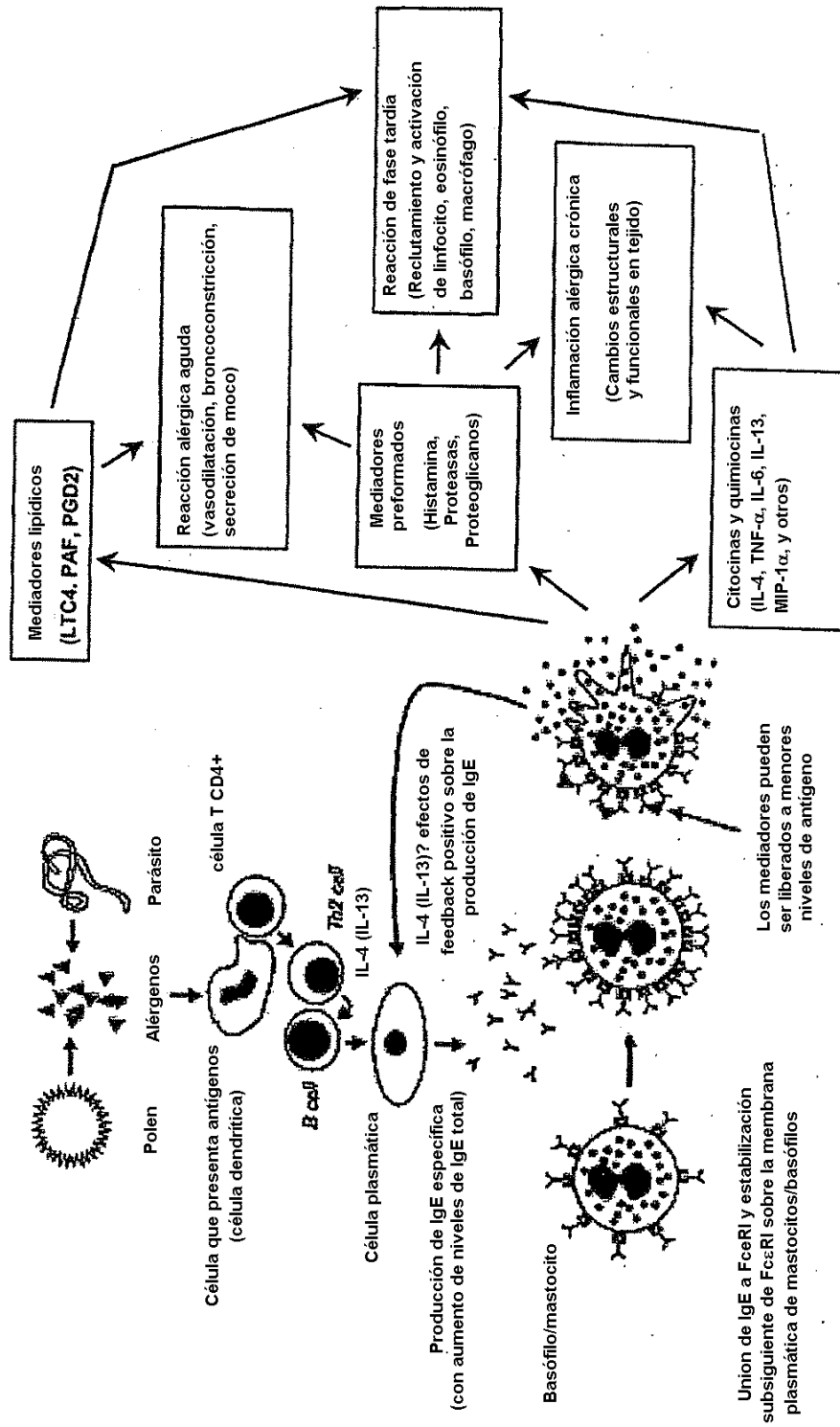
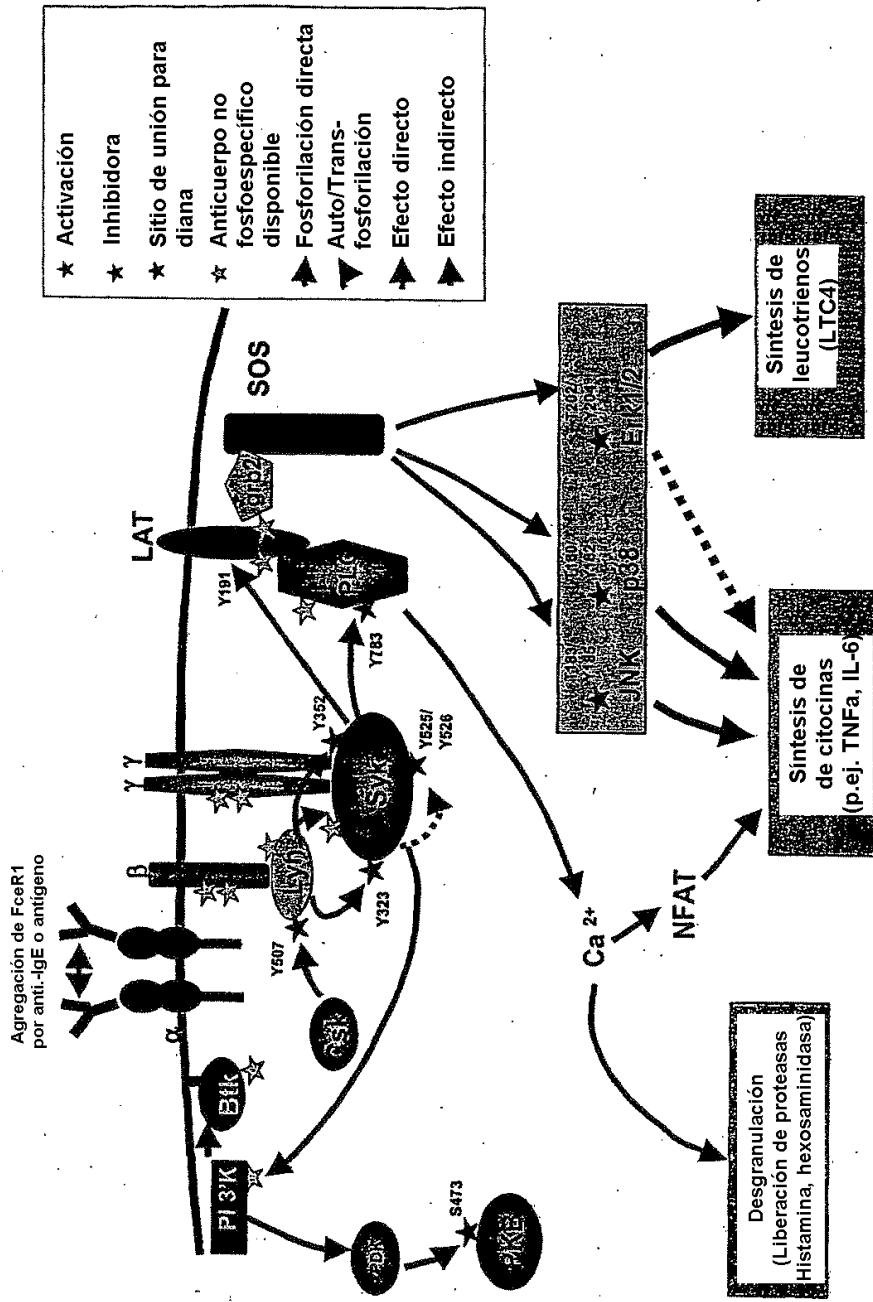


FIG. 2  
Ruta de señalización de FcεR1 en mastocitos



- ★ Activación
- ★ Inhibidora
- ★ Sitio de unión para diana
- ☆ Anticuerpo no fosfoespecífico disponible
- ▶ Fosforilación directa
- ▶ Auto/Trans-fosforilación
- ▶ Efecto directo
- ▶ Efecto indirecto

FIG. 3

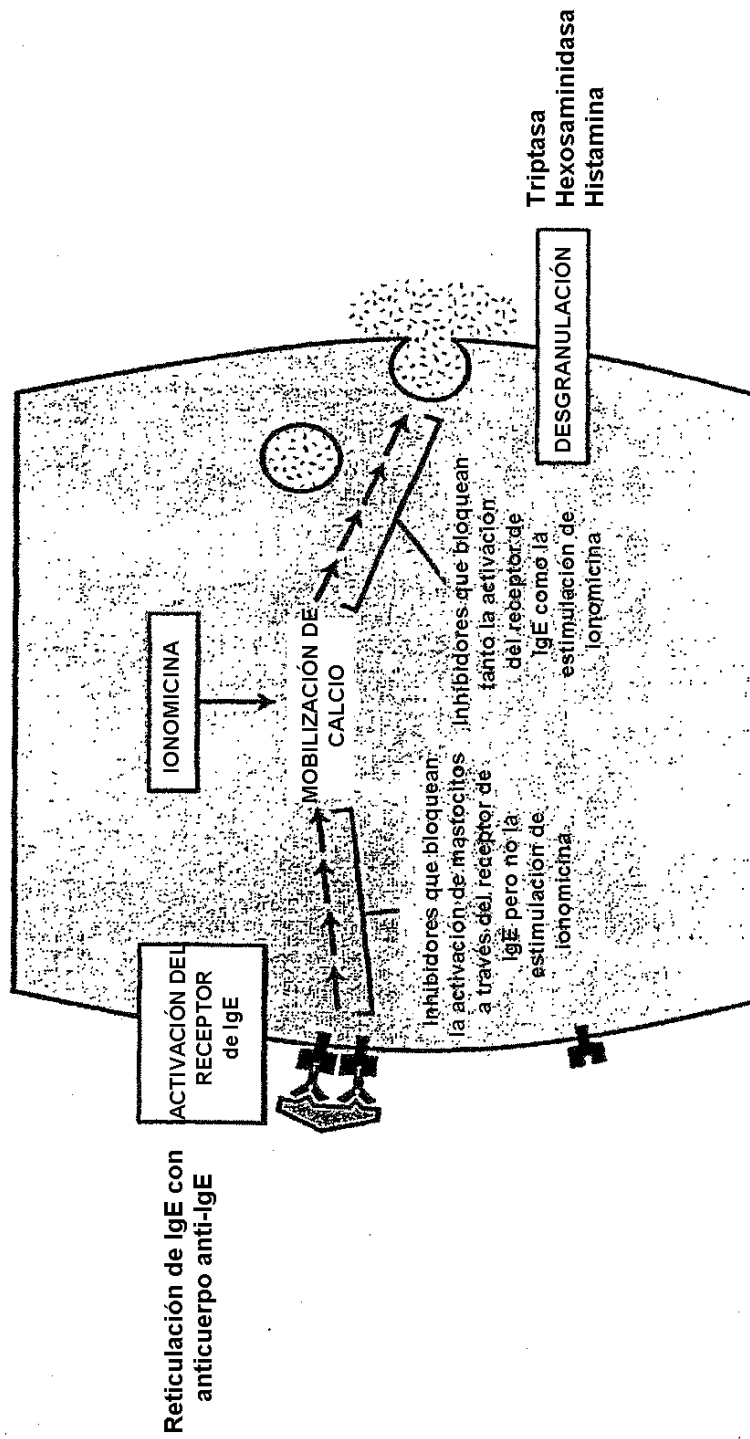


FIG. 4

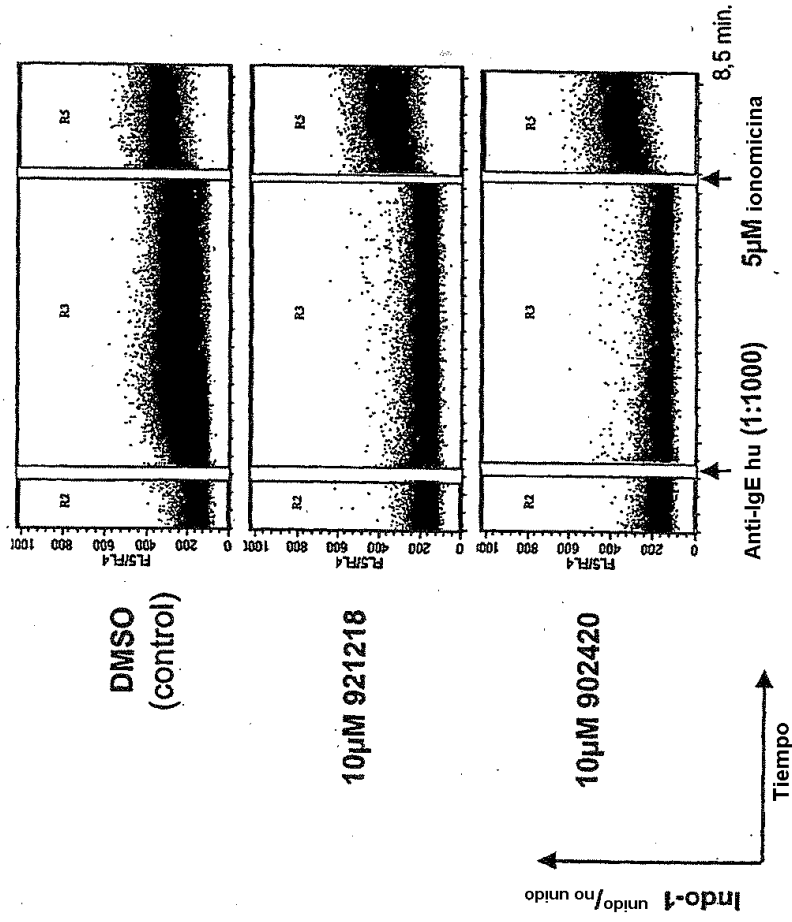


FIG. 5

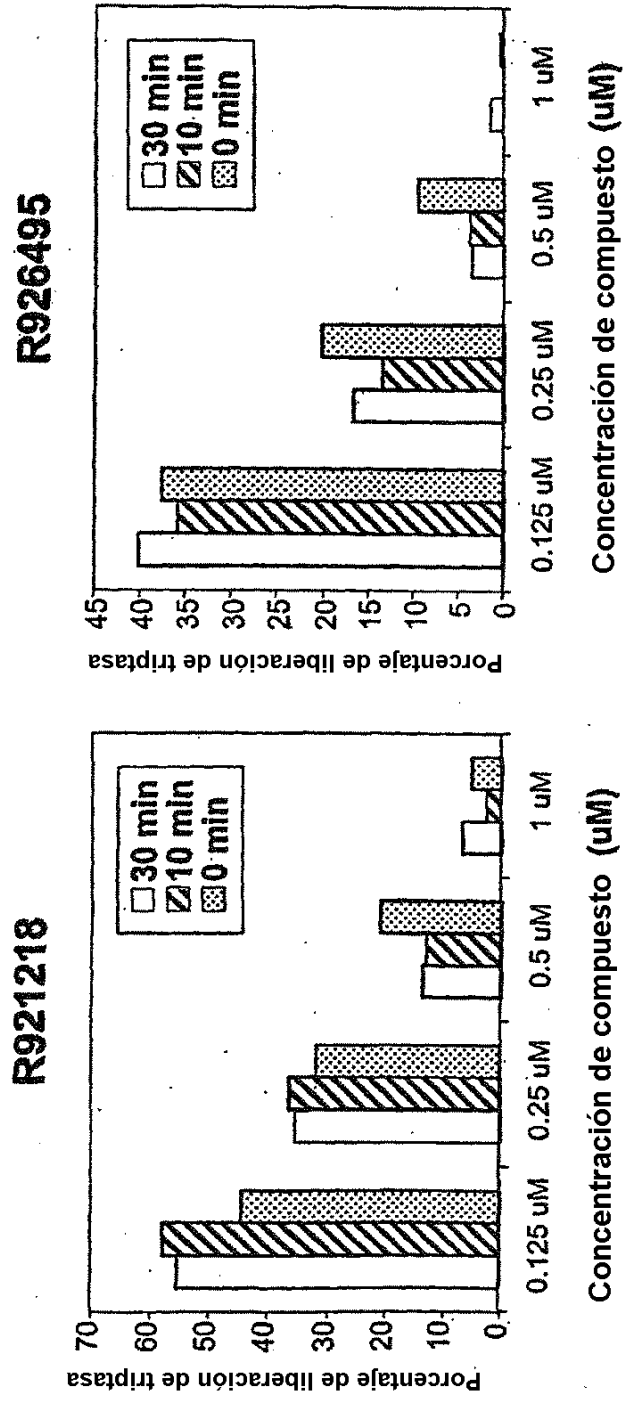


FIG. 6

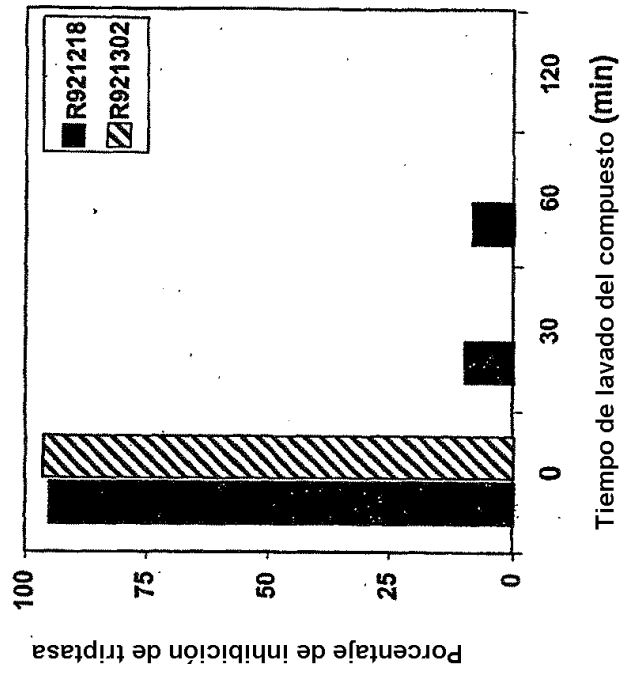




FIG. 7

Inhibición de la fosforilación de proteínas aguas debajo de Syk cinasa en células BMMC activadas con el receptor de Fce

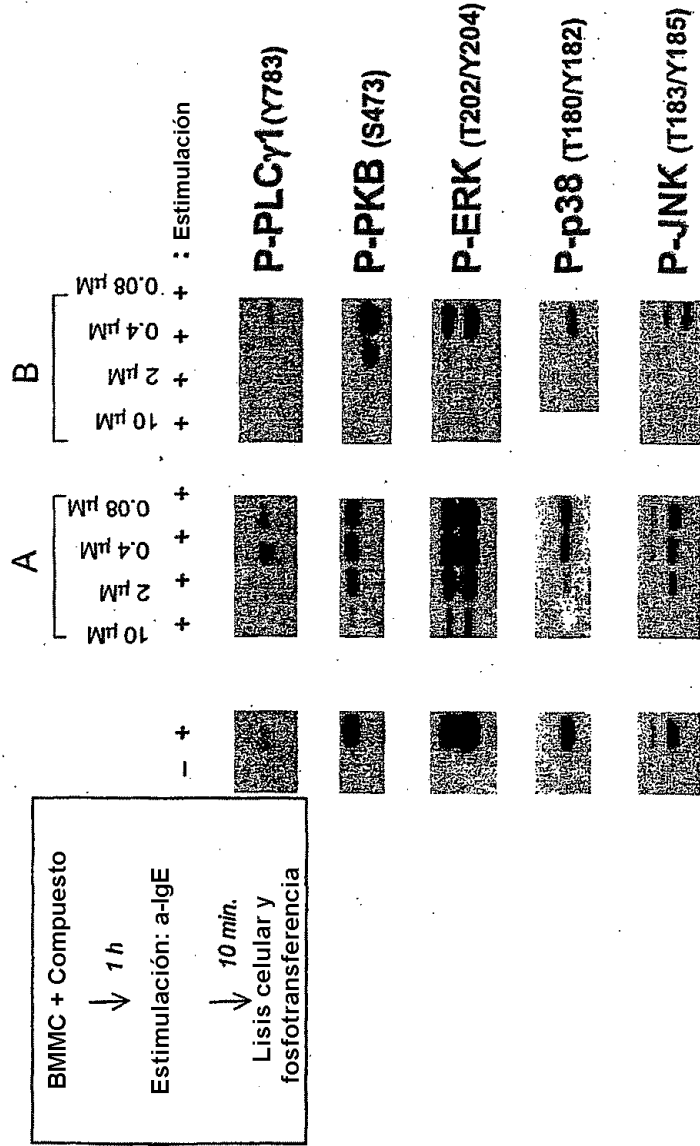
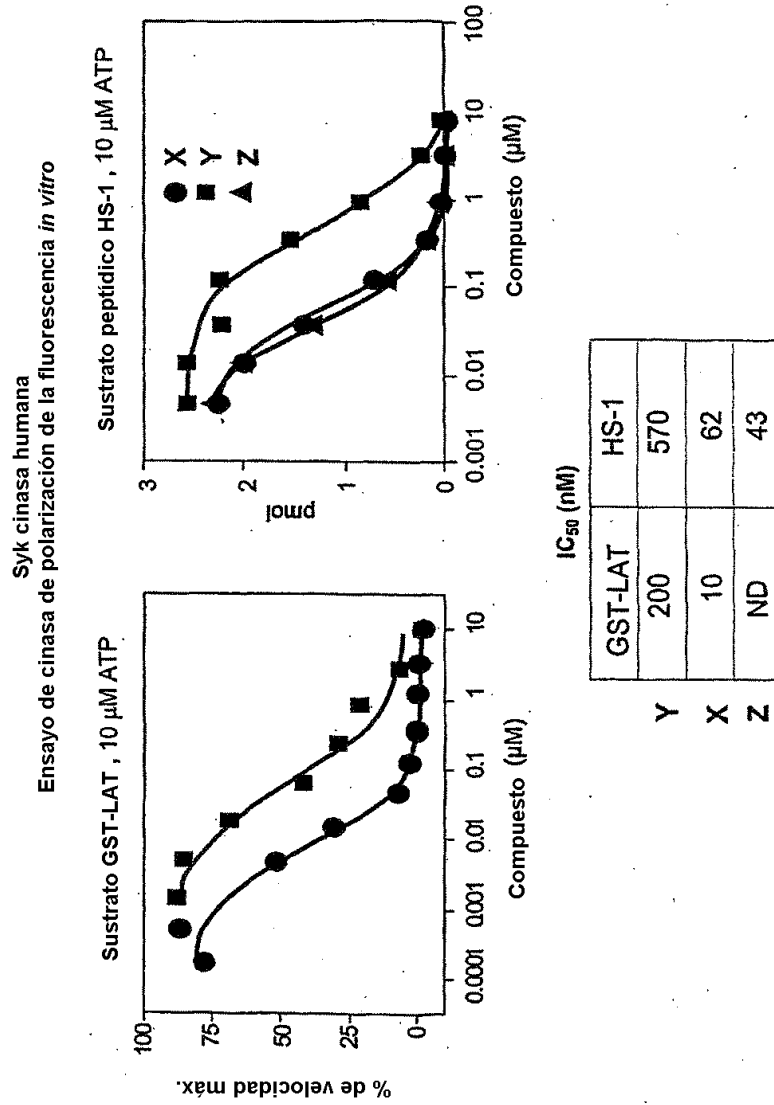
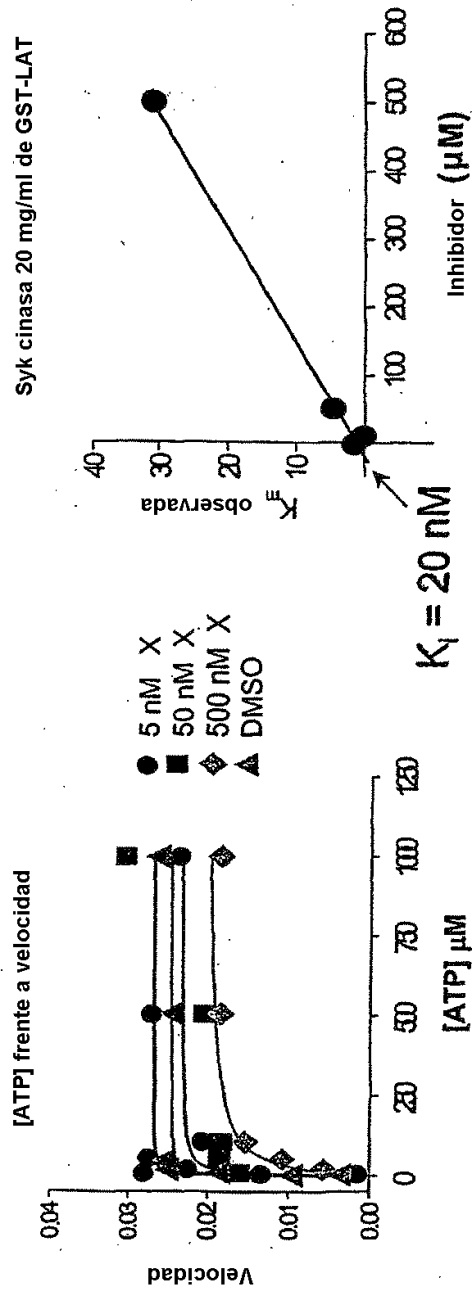


FIG. 8

Los compuestos descritos inhiben potencialmente la actividad de Syk cinasa



**FIG. 9**  
Inhibición de Syk por el compuesto es ATP competitiva



	DMSO	5 nM X	50 nM X	500 nM X
$V_{max}$	.025	0.027	.023	0.020
$K_m$	1.54	0.79	4.5	31

FIG. 10

CHMC: Mastocitos humanos cultivados

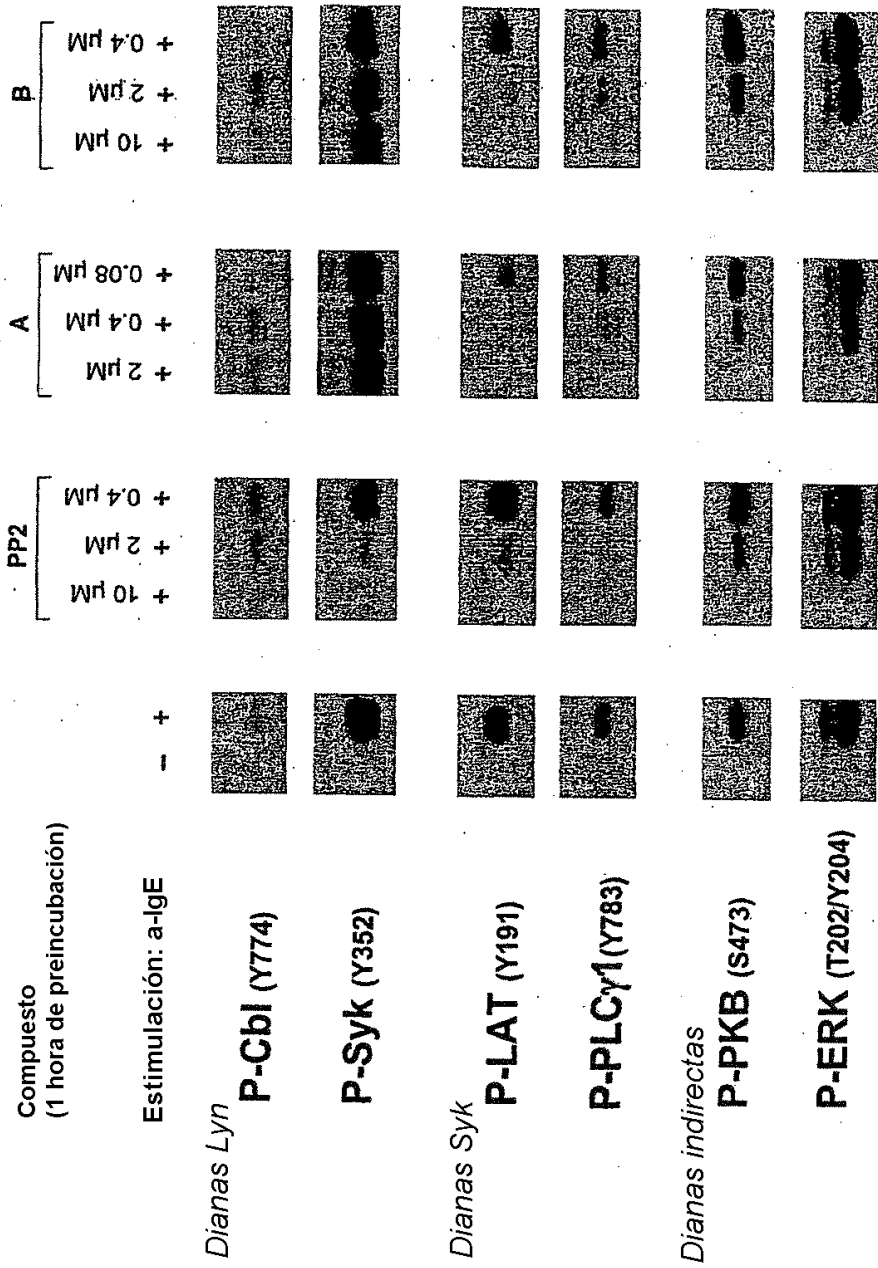
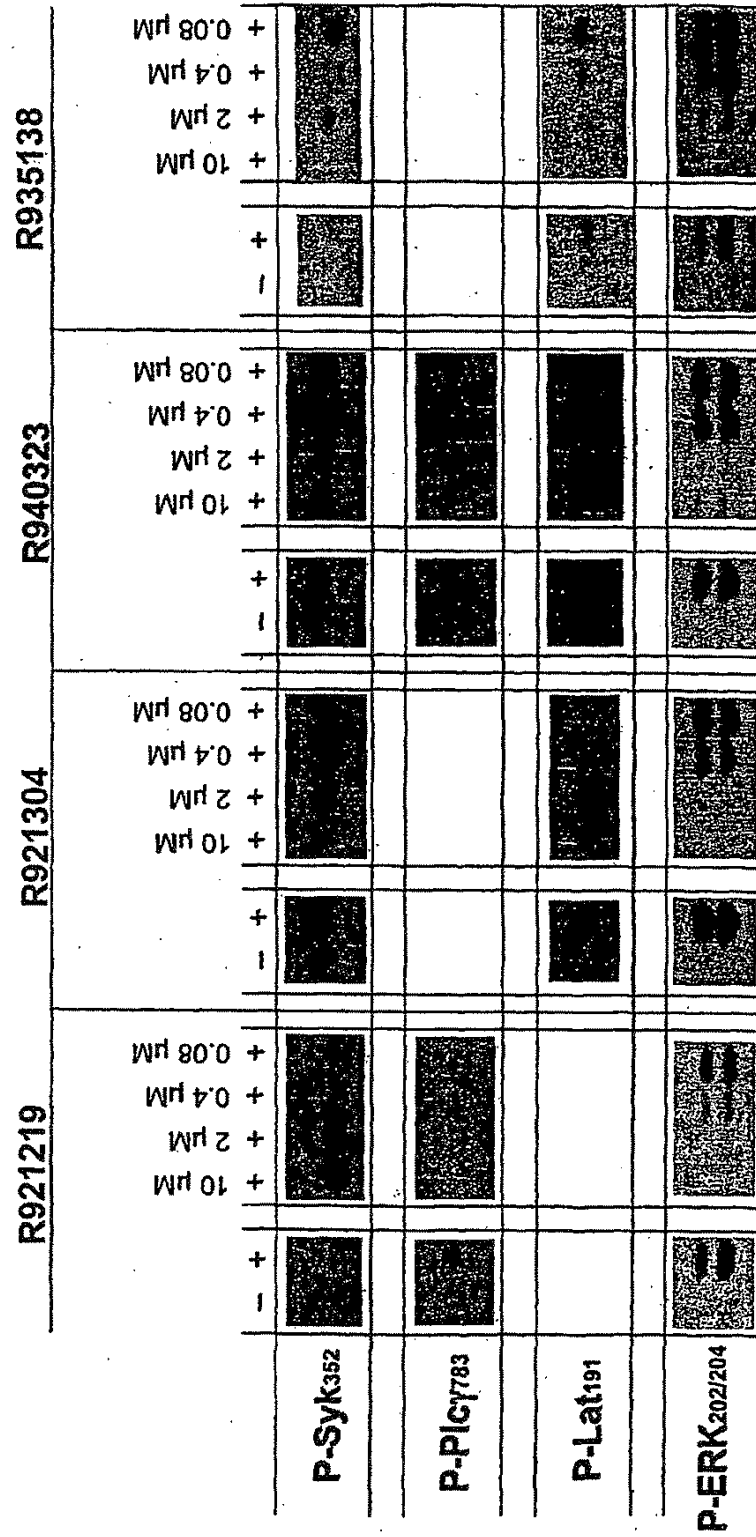
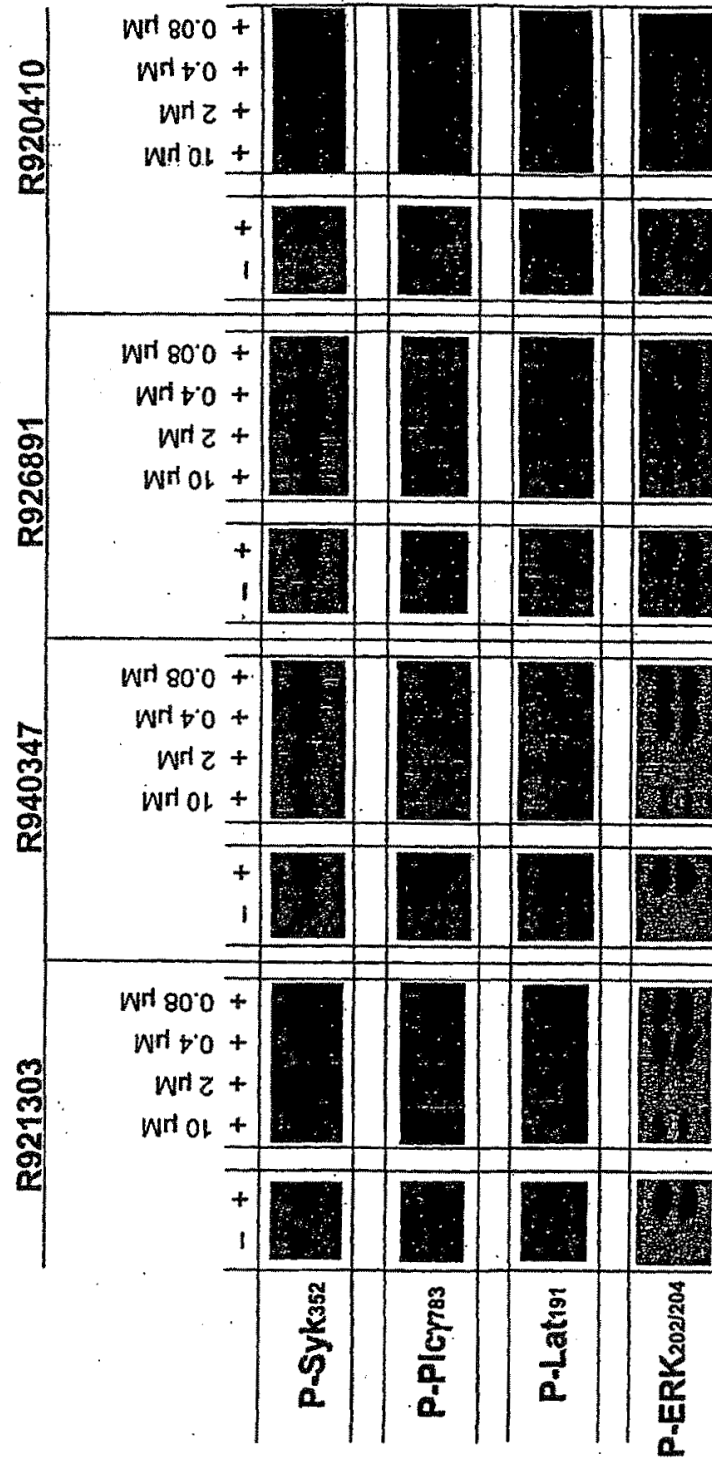


FIG. 11A

Inhibición de la fosforilación de proteínas aguas debajo de Syk en BMMC



**FIG. 11B**  
**Inhibición de la fosforilación de proteínas aguas debajo de Syk en BMBC**



**FIG. 11C**  
Inhibición de la fosforilación de proteínas aguas debajo de Syk en BMMC

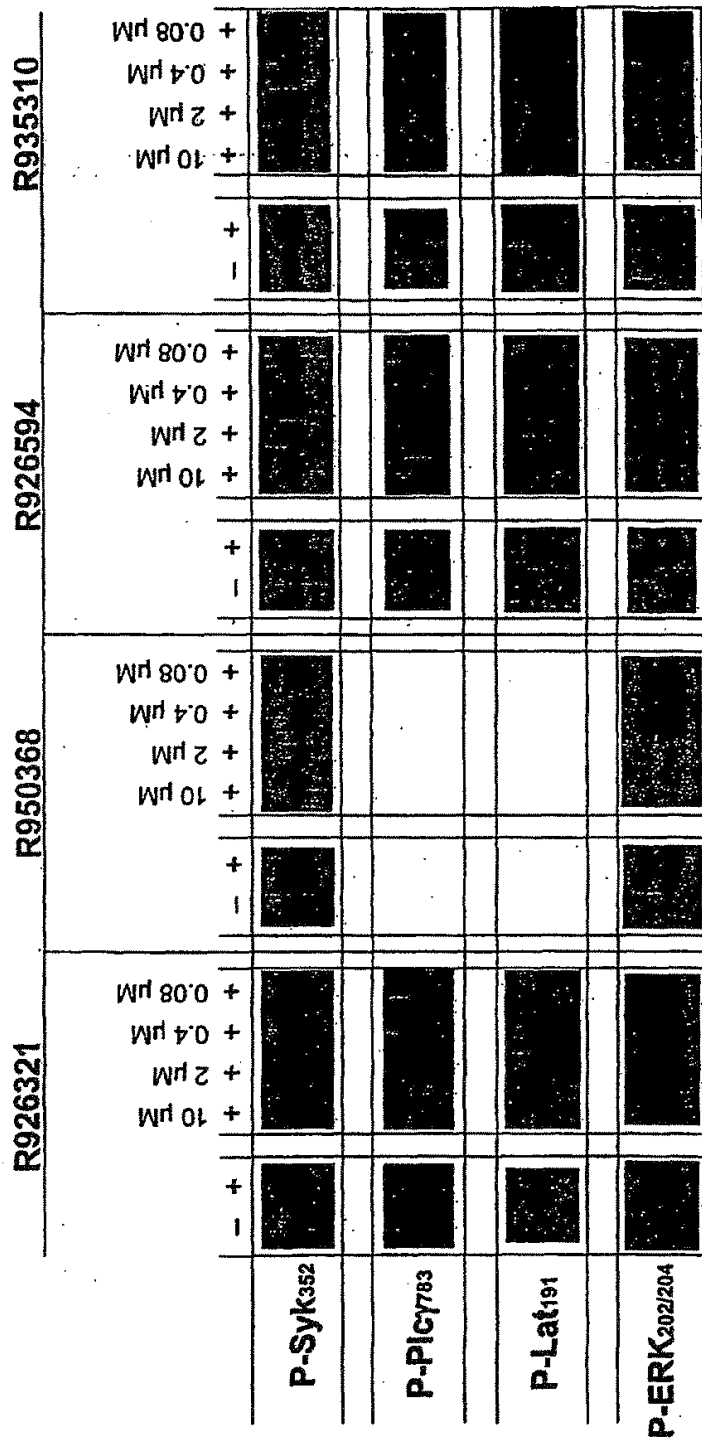


FIG. 11D

Inhibición de la fosforilación de proteínas aguas debajo de Syk en BMBC

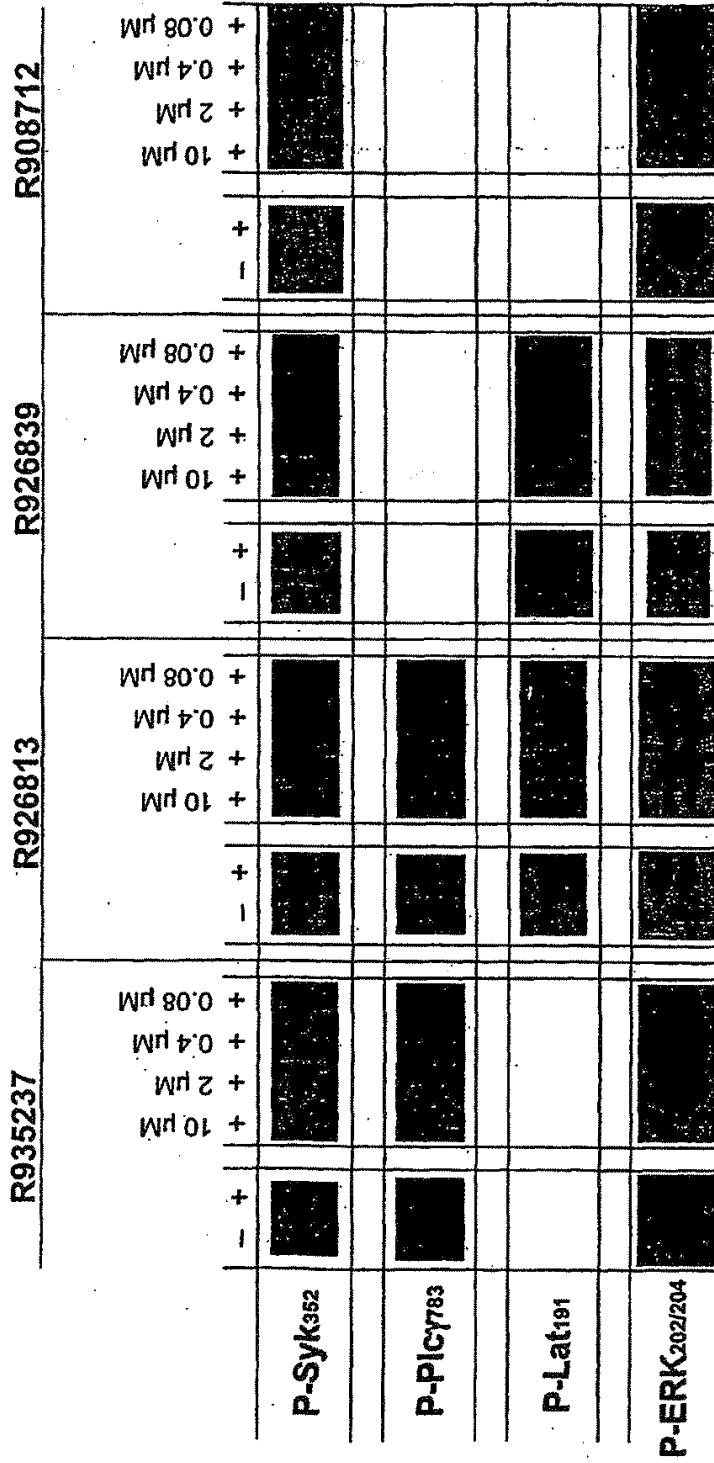




FIG. 12

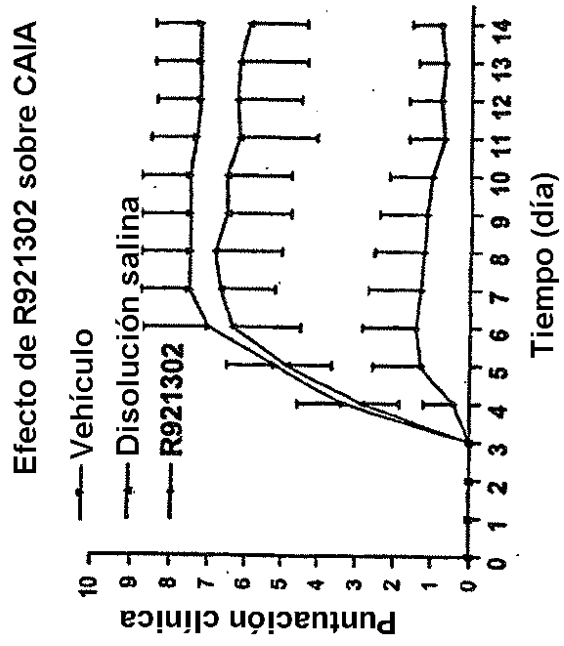


FIG. 13

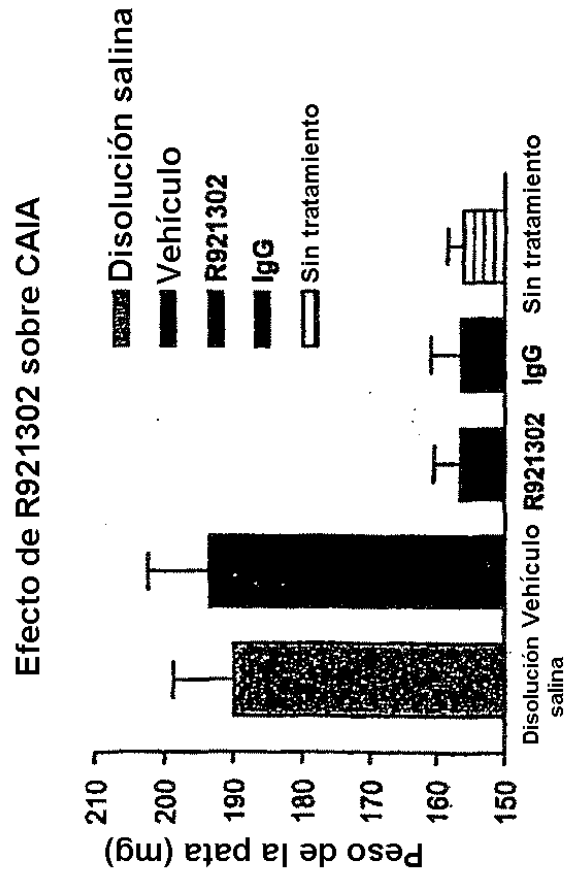


FIG. 14

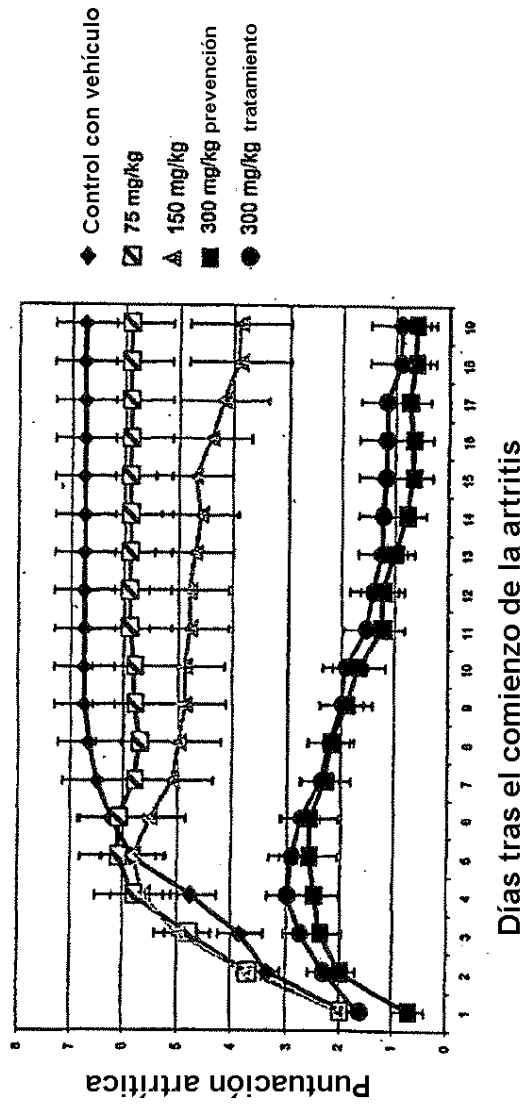


FIG. 15

Efecto de R921302 sobre la supresión de EAE

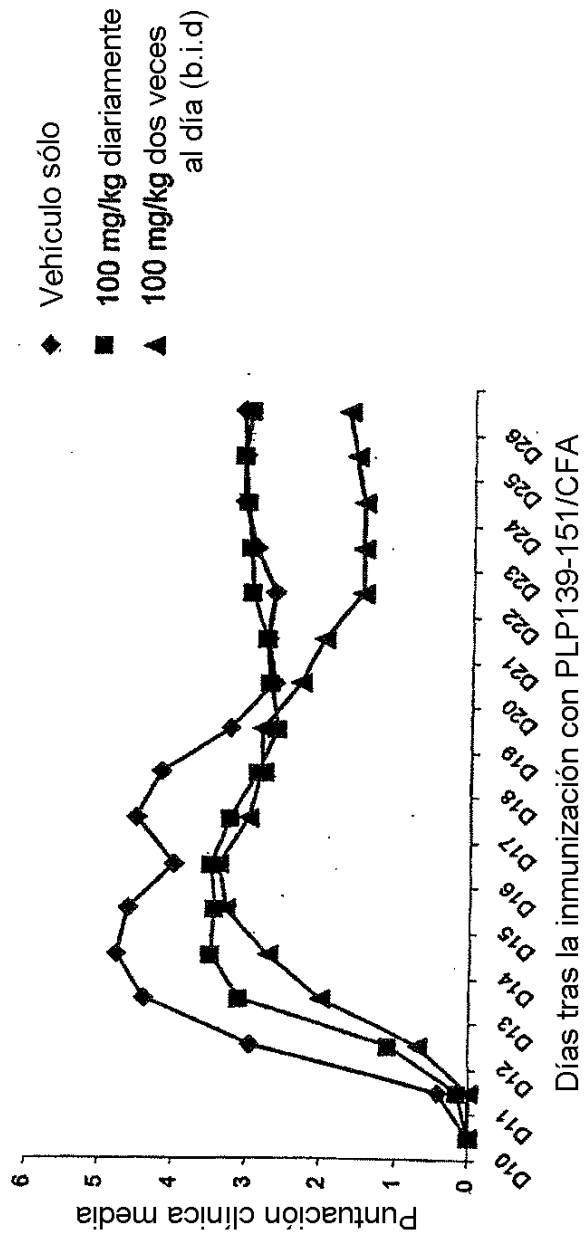


FIG. 16

