

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2004.07.30	(73) Titular(es): RIGEL PHARMACEUTICALS, INC. 1180 VETERANS BOULEVARD SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080 US
(30) Prioridade(s): 2003.07.30 US 491641 P 2003.12.19 US 531598 P 2004.05.18 US 572246 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.05.17	(72) Inventor(es): HUI LI US JEFFREY CLOUGH US HOLGER KEIM US SOMASEKHAR BHAMIDIPATI US CATHERINE SYLVAIN US
(45) Data e BPI da concessão: 2013.04.10 120/2013	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA O TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS AUTOIMUNES COM COMPOSTOS DE 2,4-PIRIMIDINADIAMINA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS DE TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS AUTOIMUNES COM COMPOSTOS 2,4- IRIMIDINADIAMINA, BEM COMO MÉTODOS PARA TRATAR, PREVENIR OU MELHORAR OS SINTOMAS ASSOCIADOS A ESSAS DOENÇAS. EXEMPLOS ESPECÍFICOS DE DOENÇAS AUTOIMUNES QUE PODEM SER TRATADAS OU PREVENIDAS COM OS COMPOSTOS INCLUEM A ARTRITE REUMATOIDE E/OU OS SEUS SINTOMAS ASSOCIADOS, LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E/OU OS SEUS SINTOMAS ASSOCIADOS E ESCLEROSE MÚLTIPLA E/OU OS SEUS SINTOMAS ASSOCIADOS.

RESUMO

"MÉTODOS PARA O TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS AUTOIMUNES COM COMPOSTOS DE 2,4-PIRIMIDINADIAMINA"

A presente invenção proporciona métodos de tratamento ou prevenção de doenças autoimunes com compostos 2,4-pirimidinadiamina, bem como métodos para tratar, prevenir ou melhorar os sintomas associados a essas doenças. Exemplos específicos de doenças autoimunes que podem ser tratadas ou prevenidas com os compostos incluem a artrite reumatoide e/ou os seus sintomas associados, lúpus eritematoso sistêmico e/ou os seus sintomas associados e esclerose múltipla e/ou os seus sintomas associados.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS PARA O TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS AUTOIMUNES COM COMPOSTOS DE 2,4-PIRIMIDINADIAMINA"

2. CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se genericamente a compostos de 2,4-pirimidinadiamina, a composições farmacêuticas que compreendem os compostos, e compostos e composições para uso numa variedade de contextos, tais como no tratamento ou prevenção da doenças autoimunes e/ou dos sintomas a elas associados.

3. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A reticulação de recetores Fc, tais como o recetor de alta afinidade para IgE (FcεRI) e/ou o recetor de alta afinidade para IgG (FcγRI), ativa uma cascata de sinalização em mastócitos, basófilos e outras células imunitárias que resulta na libertação de mediadores químicos responsáveis por inúmeros eventos adversos. Por exemplo, tal reticulação conduz à libertação de mediadores pré-formados de reações de hipersensibilidade anafilática do Tipo I (imediate), tais como a histamina, a partir de locais de armazenamento em grânulos, via desgranulação. Ela também conduz à síntese e libertação de outros mediadores, incluindo leucotrienos, prostaglandinas e fatores de ativação plaquetária (PAFs), que desempenham papéis importantes nas reações inflamatórias. Mediadores adicionais que são sintetizados e libertados mediante recetores Fc de reticulação incluem citocinas e óxido nítrico.

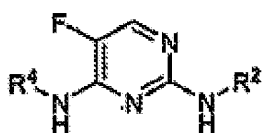
A(s) cascata(s) de sinalização ativada(s) por reticulação de recetores Fc, tais como FcεRI e/ou FcγRI compreende uma

variedade de proteínas celulares. Entre as mais importantes propagadoras de sinais intracelulares são as tirosina quinases. E, uma tirosina quinase importante envolvida nas vias de transdução de sinal associadas com a reticulação e/ou recetores FcεRI e/ou FcγRI, bem como com outras cascatas de transdução de sinal, é a Syk quinase (ver Valent *et al.* 2002, *Intl. J. Hematol* 75 (4): 257-362 para revisão).

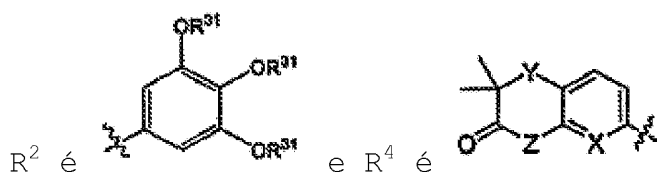
Uma vez que os mediadores libertados em resultado da reticulação de recetores FcεRI e FcγRI são responsáveis pela, ou desempenham um papel importante na, manifestação de numerosos eventos adversos, a disponibilidade de compostos capazes de inibir a(s) cascata(s) de sinalização responsáveis pela sua libertação seria altamente desejável. Além disso, devido ao papel essencial que a Syk quinase desempenha nestas e noutra(s) cascata(s) de sinalização de recetores, a disponibilidade de compostos capazes de inibir a Syk quinase, também seria altamente desejável.

1. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num aspeto, a presente invenção proporciona compostos com a seguinte fórmula estrutural:



sais, hidratos, solvatos e N-óxidos, em que:



em que

X é selecionado de entre o grupo que consiste em N e CH;

Y é selecionado a partir do grupo consistindo de O, S, SO, SO₂, SONR³⁶, NH, NR³⁵;

Z é selecionado a partir do grupo consistindo de O, S, SO, SO₂, SONR³⁶, NH, NR³⁵;

cada R³¹ é independentemente um alquilo (C1-C6);

cada R³⁵ é, independentemente dos outros, selecionado de entre o grupo constituído por hidrogénio e R⁸;

R⁸ é selecionado a partir do grupo consistindo em R^a, R^b, R^a substituído com um ou mais do mesmo ou diferente R^a ou R^b, -OR^a substituído com um ou mais do mesmo ou diferente R^a ou R^b, -B(OR^a)₂, -B(NR^cR^c)₂, -(CH₂)_m-R^b, -(CHR^a)_mR^b, -o-(CH₂)_m-R^b, -S-(CH₂)_m-R^b, -O-CHR^aR^b, -O-CR^a(R^b)₂, -O-(CHR^a)_m-R^b, -O-(CH₂)_m-CH[(CH₂)_mR^b]R^b, -S-(CHR^a)_m-R^b, -C(O)NH-(CH₂)_m-R^b, -C(O)NH-(CHRa)_m-R^b, -O-(CH₂)_m-C(O)NH-(CH₂)_m-R^b, -S-(CH₂)_m-C(O)NH-(CH₂)_m-R^b, -O-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b, -S-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b, -NH-(CH₂)_m-R^b, -NH-(CHR^a)_m-R^b, -NH[(CH₂)_mR^b], -N[(CH₂)_mR^b]₂, -NH-C(O)-NH-(CH₂)_m-R^b, -NH-C(O)-(CH₂)_m-CHR^bR^b e -NH-(CH₂)_m-C(O)-NH-(CH₂)_m-R^b;

cada R^a é selecionado independentemente a partir do grupo constituído por hidrogénio, (C1-C6) alquilo, (C3-C8) cicloalquilo, ciclo-hexilo, (C4-C11) cicloalquilalquilo, (C5-C10) arilo, fenilo, (C6-C16) arilalquilo, benzilo, heteroalquilo com 2-6 membros, ciclo-heteroalquilo de 3-8 membros, morfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, piperidinilo, cicloheteroalquilalquilo de 4-11 membros,

heteroarilo de 5-10 membros e heteroarilalquilo de 6-16 membros;

cada R^b é um grupo adequado selecionado independentemente do grupo que consiste em =O, $-OR^d$, (C1-C3) haloalquilóxi, $-OCF_3$, =S, $-SR^d$, $=NR^d$, $=NOR^d$, $-NR^cR^c$, halogéneo, $-CF_3$, $-CN$, $-NC$, $-OCN$, $-SCN$, $-NO$, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, $-S(O)R^d$, $-S(O)_2R^d$, $-S(O)_2OR^d$, $-S(O)NR^cR^c$, $-S(O)_2NR^cR^c$, $-OS(O)R^d$, $-OS(O)_2R^d$, $-OS(O)_2OR^d$, $-OS(O)_2NR^cR^c$, $-C(O)R^d$, $-C(O)OR^d$, $-C(O)NR^cR^c$, $-C(NH)NR^cR^c$, $-C(NR^a)NR^cR^c$, $-C(NOH)R^a$, $-C(NOH)NR^cR^c$, $-OC(O)R^d$, $-OC(O)OR^d$, $-OC(O)NR^cR^c$, $-OC(NH)NR^cR^c$, $-OC(NR^a)NR^cR^c$, $-[NHC(O)]_nR^d$, $-[NR^aC(O)]_nR^d$, $-[NHC(O)]_nOR^d$, $-[NR^aC(O)]_nOR^d$, $-[NHC(O)]_nNR^cR^c$, $-[NR^aC(O)]_nNR^cR^c$, $-[NHC(NH)]_nNR^cR^c$ e $-[NR^aC(NR^a)]_nNR^cR^c$;

cada R^c é independentemente R^a ou, em alternativa, R^c é tomado em conjunto com o átomo de azoto a que se encontra ligado para formar um ciclo-heteroalquilo ou heteroarilo de 5 a 8 membros, que pode, opcionalmente, incluir um ou mais dos mesmos ou diferentes heteroátomos adicionais e que pode opcionalmente ser substituído com um ou mais do mesmo ou de diferentes grupos R^a ou R^b adequados;

cada R^d é independentemente R^a ;

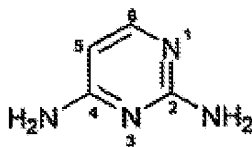
cada m é independentemente um número inteiro de 1 até 3;

cada n é independentemente um número inteiro de 0 a 3; e

R^{36} é selecionado independentemente do grupo consistindo de hidrogénio e (C1-C6) alquilo.

Tal como será discutido mais abaixo em maior detalhe, os compostos da invenção têm uma miríade de atividades biológicas. Os compostos compreendem um núcleo de 2,4-

pirimidinadiamina, tendo a seguinte estrutura e convenção de numeração:



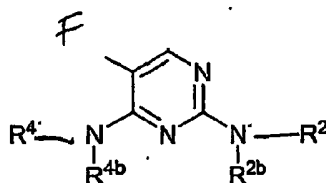
Os compostos da invenção são substituídos no azoto C2 (N2) para formar uma amina secundária e são ainda opcionalmente substituídos no azoto C4 (N4) e na posição C5. O substituinte N4 forma uma amina secundária.

Também aqui revelados são pró-fármacos dos compostos 2,4-pirimidinadiamina. Tais pró-fármacos podem ser ativos na sua forma pró-fármaco, ou podem ser inativos até serem convertidos em condições fisiológicas ou noutras condições de uso numa forma ativa de fármaco. Nos pró-fármacos aqui revelados, um ou mais grupos funcionais dos compostos 2,4-pirimidinadiamina estão incluídos nas pró-moléculas que clivam a partir da molécula sob as condições de utilização, tipicamente através de hidrólise, clivagem enzimática ou de algum outro mecanismo de clivagem, de forma a produzir os grupos funcionais. Por exemplo, grupos amina primários ou secundários podem ser incluídos numa pró-molécula amida que cliva em condições de utilização para gerar o grupo amino primário ou secundário. Assim, os pró-fármacos aqui revelados incluem tipos especiais de grupos protetores, denominados "progrupos" que mascaram um ou mais grupos funcionais dos compostos de 2,4-pirimidinadiamina que clivam sob as condições de utilização para se obter um fármaco ativo de 2,4-pirimidinadiamina. Os grupos funcionais no âmbito dos compostos de 2,4-pirimidinadiamina que podem ser mascarados com grupos para inclusão numa pró-molécula incluem, mas não estão limitados a, aminas

(primárias e secundárias), hidroxilos, sulfanilos (tióis), carboxilos, carbonilos, fenóis, catecóis, dióis, alcinos, fosfatos, etc. Inúmeros progrupos adequados para mascarar esses grupos funcionais para dar pró-moléculas que são cliváveis sob as condições desejadas de utilização são conhecidos na arte. Todos estes progrupos, isoladamente ou em combinação, podem ser incluídos nos pró-fármacos aqui revelados. Exemplos específicos de pró-moléculas que produzem os grupos amina primários ou secundários que podem ser incluídos nos pró-fármacos aqui revelados incluem, mas não estão limitados a, amidas, carbamatos, iminas, ureias, fosfenilos, fosforilos e sulfenilos. Exemplos específicos de pró-moléculas que geram grupos sulfanilo que podem ser incluídos nos pró-fármacos aqui revelados incluem, mas não estão limitados a, tioéteres, por exemplo, derivados de S-metilo (monotio, ditio, oxitio, aminotio acetais), sililo tioéteres, tioésteres tiocarbonatos, tiocarbamatos, dissulfuretos assimétricos, etc. Exemplos específicos de pró-moléculas que clivam, para se obterem os grupos hidroxilo que podem ser incluídos nos pró-fármacos aqui revelados incluem, mas não estão limitados a, sulfonatos, ésteres e carbonatos. Exemplos específicos de pró-moléculas que geram grupos carboxilo que podem ser incluídas nos pró-fármacos aqui revelados incluem, mas não se limitam a, ésteres (ésteres de sililo, incluindo ésteres de ácidos oxâmicos e tioésteres), amidas e hidrazidas.

Numa forma de realização ilustrativa, os pró-fármacos aqui revelados são compostos da invenção em que R^c e R^d é substituído por um progrupo.

Numa outra forma de realização ilustrativa, os pró-fármacos da invenção são compostos de acordo com a fórmula estrutural (II):



incluindo sais, hidratos, solvatos e N-óxidos dele derivados, em que:

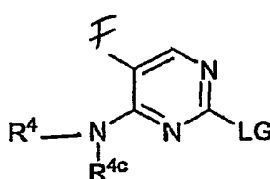
R^2 , R^4 são como previamente definidos;

R^{2b} é um progrupo;

R^{4b} é um progrupo ou um grupo alquilo, por exemplo, metilo.

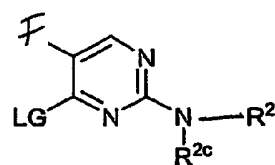
Num outro aspeto, a presente invenção proporciona composições que compreendem um ou mais compostos da invenção e opcionalmente um pró-fármaco dele derivado e um transportador, excipiente ou diluente apropriado. A natureza exata do transportador, excipiente ou diluente dependerá da utilização desejada para a composição, e poderá variar desde ser adequada ou aceitável para fins veterinários, para ser adequada ou aceitável para o uso humano.

Também aqui revelados são intermediários úteis para sintetizar os compostos 2,4-pirimidinadiazina da invenção e pró-fármacos deles derivados. Numa forma de realização, os intermediários são 4-pirimidinaminas de acordo com a fórmula estrutural (III):



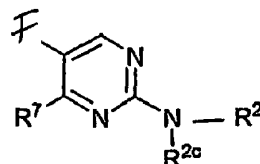
incluindo sais, hidratos, solvatos e N-óxidos deles derivados, em que R^4 é como anteriormente definido; LG é um grupo de saída tal como, por exemplo, $-S(O)_2Me$, $-SMe$ ou halo (por exemplo, F, Cl, Br, I), e R^{4c} representa um hidrogénio, um progrupo, um grupo alquilo ou como aqui descrito.

Em alternativa, os intermediários poderão ser 2-pirimidinaminas de acordo com a fórmula estrutural (IV):



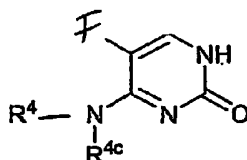
incluindo sais, hidratos, solvatos e N-óxidos deles derivados, em que R^2 é como anteriormente definido; LG é um grupo de saída tal como, por exemplo, $-S(O)_2Me$, $-SMe$ ou halo (por exemplo, F, Cl, Br, I).

Em alternativa, os intermediários são 4-amino- ou 4-hidroxi-2-pirimidinoaminas de acordo com a fórmula estrutural (V):



incluindo sais, hidratos, solvatos e N-óxidos deles derivados, em que R^2 é como anteriormente definido, R^7 é um grupo amino ou hidroxilo e R^{2c} é um átomo de hidrogénio ou um progrupo.

Em alternativa, os intermediários são citosinas N4-substituídas de acordo com a fórmula estrutural (VI):



incluindo sais, hidratos, solvatos e N-óxidos deles derivados, em que R^4 é como anteriormente definido para a fórmula estrutural (I) e R^{4c} é como previamente definido na fórmula (III).

Também aqui revelados são métodos para sintetizar os compostos de 2,4-pirimidinadiamina e pró-fármacos deles derivados. Os métodos incluem a reação de uma 4-pirimidinoamina de acordo com a fórmula estrutural (III) com uma amina da fórmula $HR^{2c}N-R^2$, onde R^2 e R^{2c} são como previamente definidos para a fórmula estrutural (IV) para obter uma 2,4-pirimidinadiamina da invenção ou um pró-fármaco de acordo com a fórmula estrutural (II).

Métodos alternativos incluem a reação de uma 2-pirimidinamina de acordo com a fórmula estrutural (IV) com uma amina de fórmula R^4-NHR^{4c} em que R^4 e R^{4c} são como previamente definidos para a fórmula estrutural (III) para se obter uma 2,4-pirimidinadiamina da invenção ou um pró-fármaco de acordo com a fórmula estrutural (II).

Outros métodos alternativos incluem a reação de uma 4-amino-2-pirimidinamina de acordo com a fórmula estrutural (V) (em que R^7 representa um grupo amino) com uma amina de fórmula R^4-NHR^{4c} , onde R^4 e R^{4c} são como definidos para a fórmula estrutural (III), para se obter 2,4-

pirimidinadiamina da invenção ou um pró-fármaco de acordo com a fórmula estrutural (II). Em alternativa, a 4-amino-2-pirimidinamina pode reagir com um composto de fórmula R^4 -LG, em que R^4 é como anteriormente definido e LG é um grupo de saída.

Ainda numa outra alternativa, o método envolve a halogenação de um 4-hidroxi-2-pirimidinamina de acordo com a fórmula estrutural (V) (R^7 é um grupo hidroxilo) para se obter uma 2-pirimidinamina de acordo com a fórmula estrutural (IV) e fazendo reagir esta pirimidinamina com uma amina apropriada, como descrito acima.

Ainda numa outra alternativa, o método envolve a halogenação de uma citosina N4-substituída de acordo com a fórmula estrutural (VI) para se obter uma 4-pirimidinamina de acordo com a fórmula estrutural (III) e fazendo reagir esta pirimidinamina com uma amina apropriada, como descrito acima.

Os compostos 2,4-pirimidinadiamina da invenção são inibidores potentes da desgranulação de células imunitárias tais como mastócitos, basófilos, neutrófilos e/ou eosinófilos. Assim, em ainda outro aspeto, compostos da presente invenção podem ser utilizados em métodos para regular, e em particular inibir, a desgranulação de tais células. O método envolve, geralmente, o contacto de uma célula que desgranula com uma quantidade de um composto de 2,4-pirimidinadiamina ou pró-fármaco da invenção, ou um sal aceitável, hidrato, solvato, N-óxido e/ou composição dele derivado, eficaz para regular ou inibir a desgranulação da célula. O método pode ser praticado em contextos *in vitro* ou em contextos *in vivo* como uma abordagem terapêutica para o tratamento ou prevenção de doenças caracterizadas por, causadas por ou associadas com a desgranulação celular.

Embora não pretendendo ficar limitado por qualquer teoria de funcionamento, os dados bioquímicos confirmam que os compostos de 2,4-pirimidinadiazina exercem o seu efeito inibitório na desgranulação, pelo menos em parte, por bloqueio ou inibição da(s) cascata(s) de transdução de sinal iniciada por reticulação dos recetores de alta afinidade para IgE (Fc "FcεRI") e/ou IgG ("FcγRI"). Com efeito, os compostos de 2,4-pirimidinadiazina, são inibidores potentes de desgranulação mediadas por FcεRI e mediadas FcγRI. Como consequência, os compostos de 2,4-pirimidina podem ser pra utilização em métodos que inibam estas cascatas de sinalização do recetor Fc em qualquer tipo de célula que expresse tais recetores FcεRI e/ou FcγRI, incluindo mas não se limitando a macrófagos, mastócitos, basófilos, neutrófilos e/ou eosinófilos.

Os métodos permitem ainda a regulação de, e em particular a inibição de, processos a jusante, que resultam como consequência da ativação de tal cascata(s) de sinalização do recetor Fc. Tais processos a jusante incluem, mas não estão limitados a, desgranulação mediada por FcεRI e/ou FcγRI, produção de citocina e/ou produção e/ou libertação de mediadores lipídicos, tais como leucotrienos e prostaglandinas. O método geralmente envolve o contacto de uma célula que expressa um recetor Fc, como um dos tipos de células descritos anteriormente, com uma quantidade de um composto de 2,4-pirimidinadiazina ou pró-fármaco da invenção, ou um sal aceitável, hidrato, solvato, N-óxido e/ou composição dele derivado, eficaz para regular ou inibir a cascata de sinalização de recetores Fc e/ou um processo a jusante iniciado pela ativação dessa cascata de sinalização. O método pode ser praticado em contextos *in vitro* ou em contextos *in vivo* como uma abordagem terapêutica para o tratamento ou prevenção de doenças caracterizadas por, causadas por ou associadas à, cascata

de sinalização do recetor Fc, tais como as doenças causadas pela libertação de mediadores químicos específicos de grânulos após a desgranulação, a libertação e/ou síntese de citocinas e/ou a libertação e/ou síntese de mediadores lipídicos, tais como leucotrienos e prostaglandinas.

Ainda noutro aspeto, a presente invenção proporciona os compostos da invenção para uso em métodos de tratamento e/ou prevenção de doenças caracterizadas por, causadas por ou associadas à, libertação de mediadores químicos como consequência da ativação de cascatas de sinalização de recetores Fc, tais como cascatas de sinalização de FcεRI e/ou FcγRI. Os métodos podem ser praticados em animais, em contextos veterinários ou em seres humanos. Os métodos envolvem normalmente a administração a um sujeito animal ou humano de uma quantidade de um composto de 2,4-pirimidinadiamina ou pró-fármaco da invenção, ou um sal aceitável, hidrato, solvato, N-óxido e/ou composição dele derivado, eficaz para tratar ou prevenir a doença. Como discutido anteriormente, a ativação da cascata de sinalização do recetor FcεRI ou FcγRI em certas células do sistema imune conduz à libertação e/ou síntese de uma variedade de substâncias químicas que são mediadores farmacológicos de uma ampla variedade de doenças.

Qualquer uma destas doenças pode ser tratada ou prevenida de acordo com os métodos nos quais os compostos da invenção podem ser para uso.

Por exemplo, nos mastócitos e basófilos, a ativação da cascata de sinalização do recetor FcεRI ou FcγRI conduz à imediata (isto é, dentro de 1-3 minutos de ativação do recetor) libertação de mediadores pré-formados de reações de hipersensibilidade atópicas e/ou do tipo I (por exemplo, histamina, proteases, tais como triptase, etc.) por meio do

processo de desgranulação. Tais reações de hipersensibilidade atópicas ou de tipo I incluem, mas não estão limitadas a, reações anafiláticas aos alérgenos ambientais e outros (por exemplo, pólen, venenos de insetos e/ou animais, alimentos, medicamentos, corantes de contraste, etc.), reações anafilactóides, febre do feno, conjuntivite alérgica, rinite alérgica, asma alérgica, dermatite atópica, eczema, urticária, perturbações da mucosa, perturbações dos tecidos e certos distúrbios gastrointestinais.

A libertação imediata de mediadores pré-formados através de desgranulação é seguida pela libertação e/ou síntese de uma variedade de outros mediadores químicos, incluindo, entre outras coisas, o fator ativador de plaquetas (PAF), prostaglandinas e leucotrienos (por exemplo, LTC₄) e a síntese *de novo* e libertação de citocinas, tais como TNF α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, etc. O primeiro destes dois processos ocorre aproximadamente 3-30 minutos após a ativação do recetor; o processo seguinte, aproximadamente, 30 minutos a 7 horas após a ativação do recetor. Estes mediadores de "fase tardia" são considerados serem em parte responsáveis pelos sintomas crónicos das reações de hipersensibilidade atópicas e Tipo I acima listadas, e em adição, são mediadores químicos da inflamação e de doenças inflamatórias (por exemplo, osteoartrite, doença inflamatória intestinal, colite ulcerativa, doença de Crohn, doença inflamatória intestinal idiopática, síndrome do intestino irritável, cólon espástico, etc.), cicatrizes de baixo grau (por exemplo, escleroderma, fibrose aumentada, queloides, cicatrizes pós-cirúrgicas, fibrose pulmonar, espasmos vasculares, enxaqueca, lesão de reperfusão e síndrome de Dressler), e complexo ou síndrome sicca. Todas estas doenças podem ser tratadas ou prevenidas

de acordo com os métodos em que os compostos da invenção poderão ser para uso.

Doenças adicionais que podem ser tratadas ou prevenidas de acordo com métodos em que os compostos da invenção poderão ser para uso incluem as doenças associadas com patologia de basófilos e/ou de mastócitos. Exemplos de tais doenças incluem, mas não estão limitadas a, doenças da pele tais como esclerodermia, doenças cardíacas, tais como enfarte do miocárdio, doenças pulmonares, tais como alterações ou remodelação muscular pulmonar e doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e doenças do intestino tais como a síndrome inflamatória do intestino (cólon espástico).

Os compostos de 2,4-pirimidinadiamina da invenção são também inibidores potentes da tirosina quinase Syk quinase. Assim, ainda noutro aspeto, a presente invenção proporciona compostos para serem utilizados em métodos para regular, e em particular inibir, a atividade da Syk quinase. O método envolve geralmente fazer contactar uma Syk quinase, ou uma célula contendo uma Syk quinase, com uma quantidade de um composto de 2,4-pirimidinadiamina da invenção ou um pró-fármaco, ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido e/ou composição dele derivados aceitáveis, eficaz para regular ou inibir a atividade de Syk quinase. Numa forma de realização, a Syk quinase é uma Syk quinase isolada ou recombinante. Numa outra forma de realização, a Syk quinase é uma Syk quinase endógena ou recombinante, expressa por uma célula, por exemplo um mastócito ou um basófilo. O método poderá ser praticado em contextos *in vitro* ou em contextos *in vivo* como uma abordagem terapêutica para o tratamento ou prevenção de doenças caracterizadas por, causadas por ou associadas com a atividade de Syk quinase.

Embora não pretendendo ser limitado por qualquer teoria particular de operação, acredita-se que os compostos de 2,4-pirimidinodiamina da invenção inibem a desgranulação celular e/ou a libertação de outros mediadores químicos, principalmente pela inibição da Syk quinase que é ativada pelo homodímero de cadeia gama $Fc\epsilon RI$ (ver, por exemplo, a FIG. 2). Este homodímero de cadeia gama é compartilhado por outros recetores Fc, incluindo $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$ e $Fc\alpha RI$. Para todos estes recetores, a transdução de sinal intracelular é mediada pelo homodímero da cadeia gama comum. A ligação e agregação desses recetores resulta no recrutamento e ativação de tirosina-quinases tais como a Syk quinase. Como consequência destas atividades de sinalização comuns, os compostos de 2,4-pirimidinodiamina aqui descritos podem ser utilizados em métodos que regulem, e em particular inibam as cascatas de sinalização de recetores Fc possuindo este homodímero da cadeia gama, tais como $Fc\epsilon RI$, $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$ e $Fc\alpha RI$, bem como as respostas celulares desencadeadas por estes recetores.

A Syk quinase é conhecida por desempenhar um papel crucial noutras cascatas de sinalização. Por exemplo, a Syk quinase é um efetor de sinalização do recetor de célula B (BCR) (Turner *et al*, 2000, *Immunology Today* 21:148-154) e é um componente essencial da sinalização de integrinas beta(1), beta(2) e beta(3) em neutrófilos (Mocsai *et al*, 2002, *Immunity* 16:547-558). Como os compostos de 2,4-pirimidinodiamina aqui descritos são potentes inibidores da Syk quinase, podem ser utilizados para regular, e em particular inibir, qualquer cascata de sinalização onde a Syk desempenhe um papel, tais como, por exemplo, as cascatas de sinalização do recetor de Fc, do BCR e de integrinas, bem como as respostas celulares provocadas por essas cascatas de sinalização. A resposta celular particular regulada ou inibida irá depender, em parte, do

tipo específico de célula e da cascata de sinalização do recetor, tal como é bem conhecido na técnica. Exemplos de respostas celulares que podem ser reguladas ou inibidas com os compostos de 2,4-pirimidinadiazina incluem burst oxidativo, adesão celular, desgranulação celular, espalhamento celular, migração celular, fagocitose (por exemplo, nos macrófagos), o fluxo de iões cálcio (por exemplo, em mastócitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos e células B), a agregação plaquetária e a maturação celular (por exemplo, em células-B).

Assim, num outro aspeto, a presente invenção proporciona os compostos da invenção para uso em métodos de regular, e em particular de inibir, as cascatas de transdução de sinal em que a Syk desempenha um papel. O método geralmente envolve o contacto de um recetor dependente da Syk, ou uma célula que expressa um recetor dependente da Syk, com uma quantidade de um composto de 2,4-pirimidinadiazina da invenção ou pró-fármaco, ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido e/ou composição aceitável, dele derivado, eficaz para regular ou inibir a cascata de transdução de sinal. Os métodos também podem ser utilizados para regular, e em particular inibir processos ou respostas celulares a jusante induzidos por ativação da cascata de transdução de sinal dependente de Syk em particular. Os métodos podem ser praticados para regular qualquer cascata de transdução de sinal onde a Syk não é reconhecida ou é mais tarde descoberta a desempenhar um papel. Os métodos podem ser praticados em contextos *in vitro* ou em contextos *in vivo* como uma abordagem terapêutica para o tratamento ou prevenção de doenças caracterizadas por, causadas por ou associadas com a ativação da cascata de transdução de sinal dependente de Syk. Exemplos não limitativos de tais doenças incluem aqueles discutidos anteriormente.

Dados celulares e animais também confirmam que os compostos de 2,4-pirimidinadiamina da invenção também podem ser utilizados em métodos que tratem ou previnam doenças autoimunes e/ou os sintomas de tais doenças. Os métodos geralmente envolvem a administração a um indivíduo que sofre de uma doença autoimune, ou em risco de desenvolver uma doença autoimune, uma quantidade de composto de 2,4-pirimidinadiamina da invenção ou pró-fármaco, ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido e/ou composição aceitável, dele derivado, eficaz para tratar ou prevenir a doença autoimune e/ou os seus sintomas associados. As doenças autoimunes que podem ser tratadas ou prevenidas com os métodos em que os compostos de 2,4-pirimidinadiamina da invenção são para uso incluem aquelas doenças que são comumente associadas com reações de hipersensibilidade não anafiláticas (reações de hipersensibilidade do Tipo II, Tipo III e/ou Tipo IV) e/ou as doenças que são mediadas, pelo menos em parte, pela ativação da cascata de sinalização de FcγR em monócitos. Tais doenças autoimunes incluem, mas não estão limitadas a, aquelas doenças autoimunes que são frequentemente designadas como distúrbios autoimunes de órgão único ou do tipo único de célula e aquelas doenças autoimunes que são frequentemente designadas como envolvendo um distúrbio autoimune sistémico. Exemplos não limitativos de doenças frequentemente designadas como de órgão único ou distúrbios autoimunes de tipo único de célula incluem: tiroidite de Hashimoto, anemia hemolítica autoimune, gastrite atrófica por anemia perniciosa autoimune, encefalomielite autoimune, orquite autoimune, doença de Goodpasture, trombocitopenia autoimune, oftalmia simpática, miastenia gravis, doença de Graves, cirrose biliar primária, hepatite agressiva crónica, colite ulcerosa e glomerulopatia membranosa. Exemplos não limitantes de doenças frequentemente designadas como envolvendo distúrbio autoimune sistémico incluem: lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatoide,

síndrome de Sjogren, síndrome de Reiter, polimiosite-dermatomiosite, esclerose sistémica, poliartrite nodosa, esclerose múltipla e penfigoide bolhoso.

5. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1 apresenta um desenho que ilustra a produção induzida por alérgenos de IgE e consequente libertação de mediadores químicos pré-formados e outros a partir de mastócitos;

FIG. 2 proporciona um desenho que ilustra a cascata de transdução de sinal de FcεR1 que conduz à desgranulação de mastócitos e/ou de basófilos; e

FIG. 3 proporciona um desenho que ilustra os pontos de ação putativos de compostos que inibem seletivamente a montante a desgranulação mediada por FcεRI e de compostos que inibem a desgranulação mediada por FcεRI e induzida por ionomicina.

6. DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

6.1 Definições

Tal como aqui utilizado, os termos seguintes destinam-se a ter os seguintes significados:

"Alquilo", por si só ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um radical saturado ou insaturado, ramificado, de cadeia linear ou hidrocarboneto cíclico monovalente tendo o número declarado de átomos de carbono (isto é, C1-C6 significa um a seis átomos de carbono), que é derivado pela remoção de um átomo de

hidrogénio de um único átomo de carbono de um alceno, alceno ou alcino progenitor. Os grupos alquilo típicos incluem, mas não estão limitados a, metilo; etilos tais como etanilo, etenilo, etinilo; propilos tais 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-ino-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; butilos tais como butan-1-ilo, butan-2-ilo, 2-metilpropan-1-ilo, 2-metilpropan-2-ilo, ciclobutan-1-ilo, but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metilprop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dieno-1-ilo, buta-1,3-dien-2-ilo, ciclobut-1-en-1-ilo, ciclobut-1-en-3-ilo, ciclobuta-1,3-dieno-1-ilo, but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo, etc.; e semelhantes. Quando níveis específicos de saturação são pretendidos, a nomenclatura "alcanilo", "alcenilo" e/ou "alcinilo" é usada, tal como definido abaixo. Em formas de realização preferidas, os grupos alquilo são (C1-C6)alquilo.

"Alcanilo", por si só ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo alquilo ramificado, de cadeia linear ou cíclico saturado derivado pela remoção de um átomo de hidrogénio de um único átomo de carbono de um alceno progenitor. Grupos alcanilo típicos incluem, mas não estão limitados a, metanilo; etanilo; propanilo tais como propan-1-ilo, propan-2-ilo (isopropil), ciclopropan-1-ilo, etc.; butanilos tais como butan-1-ilo, butan-2-ilo (sec-butilo), 2-metilpropan-1-ilo (isobutilo), 2-metilpropan-2-ilo (*t*-butilo), ciclobutan-1-ilo, etc.; e semelhantes. Em formas de realização preferidas, os grupos alcanilo são (C1-C6) alcanilo.

"Alcenilo", por si só ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo alquilo insaturado, ramificado, de cadeia linear ou cíclico com pelo menos uma

ligação dupla carbono-carbono derivada pela remoção de um átomo de hidrogénio a partir de um único átomo de carbono de um alceno progenitor. O grupo pode estar na conformação *cis* ou *trans* em torno da ligação dupla(s). Os grupos alcenilo típicos incluem, mas não estão limitados a, etenilo; propenilos tais 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 tais 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., e afins. Em formas de realização preferidas, o grupo alcenilo é (C2-C6) alcenilo.

"Alcinilo", por si só ou como parte de um outro substituinte refere-se a um grupo alquilo insaturado, ramificado, de cadeia linear ou cíclica com pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono derivada pela remoção de um átomo de hidrogénio de um único átomo de carbono de um alcino progenitor. Os grupos alcinilo típicos incluem, mas não estão limitados a, etinilo; propinilo tais como prop-1-in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; butinilos tais como but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo, etc., e afins. Em formas de realização preferidas, o grupo alcinilo é (C2-C6) alcinilo.

"Alquildiilo", por si próprio ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo hidrocarboneto saturado ou insaturado, ramificado, de cadeia linear ou cíclica divalente, tendo o número declarado de átomos de carbono (isto é, C1-C6 significa de um a seis átomos de carbono) derivado pela remoção de um átomo de hidrogénio de cada um de dois átomos de carbono diferentes de um alcano, alceno ou alcino progenitor, ou por remoção de dois átomos de hidrogénio a partir de um único átomo de carbono de um

alcano, alceno ou alcino progenitor. Os dois centros radicais monovalentes ou cada valência do centro radical divalente podem formar ligações com os mesmos ou diferentes átomos. Grupos típicos alquildiilo incluem, mas não estão limitados a, metanodiilo; etildiilos, tais como etan-1,1-diilo, etan-1,2-diilo, eten-1,1-diilo, eten-1,2-diilo; propildiilos tais 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-ino-1,3-diilo, etc.; butildiilos tais 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-metanilidene-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-ino-1,3-di-ilo, but-1-ino-1,4-diilo, buta-1,3-diin-1,4-diilo, etc.; e afins. Quando são pretendidos níveis específicos de saturação, a nomenclatura alcanildiilo, alcenildiilo e/ou alcinildiilo é usada. Sempre que é especificamente pretendido que as duas valências estejam no mesmo átomo de carbono, a nomenclatura "alquilideno" é utilizada. Em formas de realização preferidas, o grupo alquildiilo é (C1-C6) alquildiilo. Também preferidos são grupos alcanildiilo acíclicos saturados em que os centros de radicais estão nos carbonos terminais, por exemplo, metanodiilo (metano); etan-1,2-diilo (etano); propan-1,3-diilo (propano); butan-1,4-diilo (butano); e semelhantes (também referida como alcilenos, definidos abaixo).

"Alcilenos", por si próprio ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo alquildiilo saturado ou insaturado de cadeia linear com dois centros radicais monovalentes terminais derivados através da remoção de um átomo de hidrogénio a partir de cada um dos dois átomos de carbono terminais do alcano, alceno ou alcino de cadeia linear progenitor. A localização de uma ligação dupla ou tripla, se presente, num determinado alcileno é indicada entre parêntesis retos. Grupos alcileno típicos incluem, mas não estão limitados a, metano; etilenos tais como etano, eteno, etino; propilenos tais como propano, prop[1]eno, propa[1,2]dieno, prop[1]ino, etc.; butilenos, tais como butano, but[1]eno, but[2]eno, buta[1,3]dieno, buta[1]ino, but[2]ino, buta[1,3]diino, etc.; e similares. Quando se pretendem níveis específicos de saturação, a nomenclatura alcano, alceno e/ou alcino é usada. Em formas de realização preferidas, o grupo alcileno é (C1-C6) ou (C1-C3)alcileno. Também preferidos são os grupos alcano de cadeia linear saturados, por exemplo, metano, etano, propano, butano, e afins.

"Heteroalquilo", "Heteroalcanilo", "Heteroalcenilo", "Heteroalcinilo", "Heteroalquildiilo" e "Heteroalcileno", por si ou como parte de outro substituinte, referem-se a grupos alquilo, alcanilo, alcenilo, alcinilo, alquildiilo e alcileno, respetivamente, nos quais um ou mais átomos de carbono são cada um independentemente substituídos com os mesmos ou diferentes heteroátomos ou grupos heteroatómicos. Heteroátomos e/ou grupos heteroatómicos típicos que podem substituir os átomos de carbono incluem, mas não estão limitados a, -O-, -S-, -SO-, -NR'-, -PH-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)NR'-, -S(O)₂NR'-, e outros semelhantes, incluindo as suas combinações, em que cada R' é independentemente hidrogénio ou (C1-C6) alquilo.

"Cicloalquilo" e "Heterocicloalquilo", por si só ou como parte de outro substituinte, referem-se a versões cíclicas de grupos "alquilo" e "heteroalquilo", respetivamente. Para grupos heteroalquilo, um heteroátomo pode ocupar a posição que está ligada à restante molécula. Grupos cicloalquilo típicos incluem, mas não estão limitados a, ciclopropilo; ciclobutilos como ciclobutanilo e ciclobutenilo; ciclopentilos, tais como ciclopentanilo e ciclopentenilo; ciclohexilos como ciclohexanil e ciclohexenilo; e similares. Grupos heterocicloalquilo típicos incluem, mas não estão limitados a, tetra-hidrofuranilo (por exemplo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, etc.), piperidinilo (por exemplo, piperidin-1-ilo, piperidin-2-ilo, etc.), morfolinilo (por exemplo, morfolin-3-ilo, morfolin-4-ilo, etc.), piperazinilo (por exemplo, piperazin-1-ilo, piperazin-2-ilo, etc.), e semelhantes.

"Ponte heteroatómica acíclica" refere-se a uma ponte divalente, em que os átomos do esqueleto são exclusivamente heteroátomos e/ou grupos heteroatómicos. Pontes heteroatómicas acíclicas típicas incluem, mas não são limitadas a, -O-, -S-, -SO-, -NR'-, -PH-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)NR'-, -S(O)₂NR'-, e semelhantes, incluindo as suas combinações, em que cada R' é independentemente hidrogénio ou (C1-C6) Alquilo.

"Sistema de anel aromático progenitor" refere-se a um sistema de anel cíclico ou policíclico insaturado tendo um sistema conjugado de eletrões π . Especificamente incluídos dentro da definição de "sistema de anel aromático progenitor" estão os sistemas de anel fundidos em que um ou mais dos anéis são aromáticos e um ou mais dos anéis são saturados ou insaturados, tais como, por exemplo, fluoreno, indano, indeno, fenaleno, tetrahidronaftaleno, etc. Os

sistemas de anéis aromáticos progenitores típicos incluem, mas não estão limitados a, aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benzeno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, indaceno, *s*-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadenos, pireno, pirantreno, rubiceno, hidronaftaleno, trifenileno, trinaftaleno, e semelhantes, como bem como os vários isómeros hidro deles derivados.

"Arilo", por si só ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo hidrocarboneto aromático monovalente, tendo o número declarado de átomos de carbono (isto é, C5-C15 significa de 5 a 15 átomos de carbono) derivado pela remoção de um átomo de hidrogénio a partir de um único átomo de carbono de um sistema de anel aromático progenitor. Grupos arilo típicos incluem, mas não estão limitados a, grupos derivados de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benzeno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, *as*-indaceno, *s*-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadenos, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno, e semelhantes, bem como os vários isómeros hidro deles derivados. Em formas de realização preferidas, o grupo arilo é (C5-C15) arilo, com (C5-C10) sendo ainda mais preferido. Arilos particularmente preferidos são os ciclopentadienilo, fenilo e naftilo.

"Arilarilo", por si só ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo hidrocarboneto

monovalente derivado pela remoção de um átomo de hidrogénio a partir de um único átomo de carbono de um sistema em anel no qual dois ou mais sistemas de anel aromáticos progenitores idênticos ou não idênticos são unidos diretamente entre si por uma ligação simples, em que o número de tais junções simples de anel é menos um do que o número de sistemas de anéis aromáticos progenitores envolvidos. Grupos arilarilos típicos incluem, mas não estão limitados a, bifenilo, trifenilo, fenil-naftilo, binaftilo, bifenil-naftilo, e semelhantes. Quando o número de átomos de carbono num grupo arilarilo for especificado, os números referem-se aos átomos de carbono compreendendo cada anel aromático progenitor. Por exemplo, (C5-C15) arilarilo é um grupo arilarilo em que cada anel aromático compreende de 5 a 15 átomos de carbono, por exemplo, bifenilo, trifenilo, binaftilo, fenilnaftilo, etc. Preferivelmente, cada sistema de anel aromático progenitor de um grupo arilarilo é independentemente um (C5-C15) aromático, mais preferencialmente um (C5-C10) aromático. Também são preferidos os grupos arilarilo em que todos os sistemas de anéis aromáticos progenitores são idênticos, por exemplo, bifenilo, trifenilo, binaftilo, trinaftilo, etc.

"Biarilo", por si só ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo arilarilo tendo dois sistemas aromáticos progenitores idênticos unidos diretamente entre si por uma ligação simples. Grupos biarilo típicos incluem, mas não estão limitados a, bifenilo, binaftilo, biantracilo, e semelhantes. De preferência, os sistemas de anéis aromáticos são anéis aromáticos (C5-C15), mais preferivelmente anéis aromáticos (C5-C10). Um grupo biarilo particularmente preferido é o bifenilo.

"Arilalquilo", por si só ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo alquilo acíclico em que um dos átomos de hidrogénio ligados a um átomo de carbono, tipicamente um átomo de carbono terminal ou sp^3 , é substituído com um grupo arilo. Grupos arilalquilo típicos incluem, mas não estão limitados a, benzilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobenzilo, 2-naftofeniletan-1-ilo e semelhantes. Quando grupos alquilo específicos são pretendidos, a nomenclatura arilalcanilo, arilalcenilo e/ou arilalcinilo é usada. Em formas de realização preferidas, o grupo arilalquilo é (C6-C21) arilalquilo, por exemplo, o alcanilo, alcenilo ou alcinilo do grupo arilalquilo é (C1-C6) e a porção arilo é (C5-C15). Em formas de realização particularmente preferidas, o grupo arilalquilo é (C6-C13), por exemplo, o alcanilo, alcenilo ou alcinilo do grupo arilalquilo é (C1-C3) e o grupo arilo é (C5-C10).

"Sistema de anel heteroaromático progenitor" refere-se a um sistema de anel aromático progenitor no qual um ou mais átomos de carbono são, cada um, independentemente substituídos com os mesmos ou diferentes heteroátomos ou grupos heteroatómicos. Heteroátomos ou grupos heteroatómicos típicos para substituir os átomos de carbono incluem, mas não estão limitados a, N, NH, P, O, S, S(O), S(O)₂, Si, etc. Especificamente incluídos dentro da definição de "sistemas de anel heteroaromático progenitor" são sistemas de anéis fundidos em que um ou mais dos anéis são aromáticos e um ou mais dos anéis são saturados ou insaturados, tais como, por exemplo, benzodioxano, benzofurano, cromano, cromeno, indole, indolina, xanteno, etc. Também incluídos na definição de "sistema de anel heteroaromático progenitor" estão aqueles anéis reconhecidos que incluem substituintes comuns, tais como, por exemplo, benzopirona e 1-metil-1,2,3,4-tetrazole.

Especificamente excluídos da definição de "sistema de anel heteroaromático progenitor" estão anéis de benzeno fundidos a polialquilenoglicóis cíclicos tais como polietilenoglicóis cíclicos. Os sistemas de anel heteroaromático progenitor típicos incluem, mas não estão limitados a, acridina, benzimidazolo, benzisoxazolo, benzodioxano, benzodioxolo, benzofurano, benzopirona, benzotiadiazole, benzotiazolo, benzotriazolo, benzoxaxine, benzoxazole, benzoxazoline, carbazole, β -carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazole, indazole, indole, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindole, isoindolina, isoquinolina, isotiazole, isoxazole, naftiridina, oxadiazole, oxazole, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazole, piridazina, piridina, pirimidina, pirrole, pirrolizina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, tetrazole, tiadiazole, tiazole, tiofeno, triazole, xanteno, e afins.

"Heteroarilo", por si só ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo heteroaromático monovalente tendo o número de átomos de anel declarado (por exemplo, "com 5-14 membros" significa 5-14 átomos de anel), derivado pela remoção de um átomo de hidrogénio a partir de um único átomo de um sistema de anel heteroaromático progenitor. Grupos heteroarilo típicos incluem, mas não estão limitados a, grupos derivados de acridina, benzimidazolo, benzisoxazolo, benzodioxano, benzodioxole, benzofurano, benzopirona, benzotiadiazole, benzotiazolo, benzotriazolo, benzoxazina, benzoxazolo, benzoxazoline, carbazole, β -carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazole, indazole, indole, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindole, isoindolina, isoquinolina, isotiazole, isoxazole, naftiridina, oxadiazole, oxazole, perimidina, fenantridina,

fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazole, piridazina, piridina, pirimidina, pirrole, pirrolizina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, tetrazole, tiadiazole, tiazole, tiofeno, triazole, xanteno, e afins, bem como os vários isómeros hidro deles derivados. Em formas de realização preferidas, o grupo heteroarilo é um heteroarilo de 5-14 membros, sendo particularmente preferido um heteroarilo com 5-10 membros.

"Heteroaril-Heteroarilo", por si só ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo heteroaromático monovalente derivado pela remoção de um átomo de hidrogénio a partir de um único átomo de um sistema em anel no qual dois ou mais sistemas de anéis heteroaromáticos progenitores idênticos ou não idênticos são unidos diretamente entre si por uma ligação simples, em que o número de tais junções de anel diretas é menos um do que o número de sistemas de anéis heteroaromáticos progenitores participantes. Grupos heteroaril-heteroarilo típicos incluem, mas não estão limitados a, bipiridilo, tripiridilo, piridilpurinilo, bipurinilo, etc. Quando o número de átomos é especificado, os números referem-se ao número de átomos compreendidos nos sistemas de anel heteroaromático de cada progenitor. Por exemplo, 5-15 heteroarilo-heteroarilo é um grupo heteroaril-heteroarilo em que cada sistema de anel heteroaromático progenitor compreende de 5 a 15 átomos, por exemplo, bipiridilo, tripuridilo, etc. Preferivelmente, cada sistema de anel heteroaromático progenitor é, independentemente, um heteroaromático de 5-15 membros, mais preferencialmente um heteroaromático de 5-10 membros. Também são preferidos os grupos heteroaril-heteroarilo nos quais todos os sistemas de anéis heteroaromáticos progenitores são idênticos.

"Biheteroarilo", por si próprio ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo heteroaril-heteroarilo possuindo dois sistemas de anéis heteroaromáticos progenitores idênticos unidos diretamente entre si por uma ligação simples. Grupos biheteroarilo típicos incluem, mas não estão limitados a, bипiridilo, bipurinilo, biquinolinilo, e semelhantes. De preferência, os sistemas de anéis heteroaromáticos são anéis heteroaromáticos com 5-15 membros, mais preferivelmente com 5-10 anéis heteroaromáticos membros.

"Heteroarilalquilo", por si só ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo alquilo acíclico em que um dos átomos de hidrogénio ligados a um átomo de carbono, tipicamente um átomo de carbono terminal ou sp^3 é substituído com um grupo heteroarilo. Quando são pretendidos grupos alquilo específicos, a nomenclatura heteroarilalcanilo, heteroarilalcenilo e/ou heteroarilalcinilo é usada. Em formas de realização preferidas, o grupo heteroarilalquilo é um heteroarilalquilo com 6-21 membros, por exemplo, o alcanilo, alcenilo ou alcinilo do heteroarilalquilo é (C1-C6) e a porção heteroarilo é um heteroarilo de 5 a 15 membros. Em formas de realização particularmente preferidas, o heteroarilalquilo é um heteroarilalquilo de 6-13 membros, por exemplo, o grupo alcanilo, alcenilo ou alcinilo é (C1-C3) alquilo e o heteroarilo um heteroarilo de 5-10 membros.

"Halogénio" ou "halo", por si só ou como parte de outro substituinte, a menos que seja indicado o contrário, referem-se a flúor, cloro, bromo e iodo.

"Haloalquilo", por si só ou como parte de um outro substituinte, refere-se a um grupo alquilo no qual um ou

mais dos átomos de hidrogénio é substituído com um halogénio. Assim, o termo "haloalquilo" pretende incluir, monohaloalquilos, dihaloalquilos, trihaloalquilos, etc., até perhaloalquilos. Por exemplo, a expressão "(C1-C2) haloalquilo" inclui fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 1-fluoroetilo, 1,1-difluoroetilo, 1,2-difluoroetilo, 1,1,1-trifluoroetilo, perfluoroetilo, etc.

Os grupos acima definidos podem incluir prefixos e/ou sufixos que são comumente utilizados na técnica para criar grupos substituintes adicionais bem reconhecidos. Como exemplos, "alquilóxi" ou "alcóxi" refere-se a um grupo de fórmula -OR", "alquilamina" refere-se a um grupo de fórmula -NHR" e "dialquilamina" refere-se a um grupo de fórmula -NR"R", em que cada R" é independentemente um grupo alquilo. Como outro exemplo, "haloalcóxi" ou "haloalquilóxi" refere-se a um grupo de fórmula -OR'", em que R'" é um haloalquilo.

"Grupo protetor" refere-se a um grupo de átomos que, quando ligados a um grupo funcional reativo numa molécula, mascara, reduz ou impede a reatividade do grupo funcional. Tipicamente, um grupo protetor pode ser removido seletivamente como desejado durante o decurso de uma síntese. Exemplos de grupos protetores podem ser encontrados em Greene e Wuts, *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3rd ED., 1999, John Wiley & Sons, NY, e Harrison et al., *Compendium of Synthetic Organic Methods*, Vols. 1-8, 1971-1996, John Wiley & Sons, NY. Grupos protetores de amino representativos incluem, mas não estão limitados a, formilo, acetilo, trifluoroacetilo, benzilo, benziloxicarbonilo ("CBZ"), terc-butoxicarbonilo ("Boc"), trimetilsililo ("TMS"), 2-trimetilsilil-etanossulfonilo ("TES"), tritilo e grupos tritilo substituídos,

aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo ("Fmoc"), nitro-veratriloxicarbonilo ("NVOC") e afins. Os grupos protetores de hidroxilo representativos incluem, mas não estão limitados a, àqueles em que o grupo hidroxilo é acilado ou alquilado tais como éteres de benzilo e tritilo, bem como éteres de alquilo, éteres de tetra-hidropirano, éteres de trialkilsililo (por exemplo, grupos TMS ou TIPPS) e éteres alilo.

"Pró-fármaco" refere-se a um derivado de um composto 2,4-pirimidinadiazina ativo (fármaco) que requer uma transformação de acordo com as condições de utilização, tal como dentro do corpo, para libertar o fármaco ativo 2,4-pirimidinadiazina. Os pró-fármacos são frequentemente, mas não necessariamente, farmacologicamente inativos até serem convertidos no fármaco ativo. Os pró-fármacos são tipicamente obtidos mascarando um grupo funcional no fármaco de 2,4-pirimidinadiazina que se crê ser em parte necessário para a atividade, com um prógrupo (definido abaixo) de modo a formar um pró-molécula que sofre uma transformação, tal como clivagem, nas condições de utilização especificadas de forma a libertar o grupo funcional e, conseqüentemente, o fármaco ativo de 2,4-pirimidinadiazina. A clivagem da pró-molécula pode proceder-se espontaneamente, tal como por meio de uma reação de hidrólise, ou pode ser catalisada ou induzida por outro agente, tal como por uma enzima, pela luz, por ácido ou base, ou por uma mudança de ou exposição a um parâmetro físico ou ambiental, tal como uma mudança de temperatura. O agente pode ser endógeno às condições de utilização, tal como uma enzima presente nas células em que o pró-fármaco é administrado ou as condições ácidas do estômago, ou pode ser fornecido exogenamente.

Uma grande variedade de progrupos, bem como as pró-moléculas resultantes, adequados para mascarar grupos funcionais nos compostos de 2,4-pirimidinadiazinas ativos de maneira a produzir pró-fármacos é bem conhecida na técnica. Por exemplo, um grupo funcional hidroxilo pode ser mascarado como uma pró-molécula de sulfonato, éster ou carbonato, a qual pode ser hidrolisada *in vivo* para proporcionar o grupo hidroxilo. Um grupo funcional amino pode ser mascarado como uma pró-molécula de amida, carbamato, imina, ureia, fosfenil, fosforilo ou sulfenilo, que pode ser hidrolisada *in vivo* para proporcionar o grupo amino. Um grupo carboxilo pode ser mascarado como uma pró-molécula de éster (incluindo ésteres e tioésteres de sililo), amida ou hidrazida, o qual pode ser hidrolisada *in vivo* para proporcionar o grupo carboxilo. Os grupos protetores de azoto e pró-fármacos de azoto da invenção podem incluir grupos alquila inferiores, bem como amidas, carbamatos, etc. Outros exemplos específicos de progrupos adequados e suas respectivas pró-moléculas serão evidentes para aqueles peritos na técnica.

"Progrupo" refere-se a um tipo de grupo protetor que quando utilizado para mascarar um grupo funcional num fármaco ativo de 2,4-pirimidinadiazina para formar uma pró-molécula, converte o fármaco para um pró-fármaco. Progrupos estão tipicamente ligados ao grupo funcional do fármaco por via de ligações que são cliváveis sob condições específicas de uso. Assim, um progrupo é aquela porção de uma pró-molécula que é clivada para libertar o grupo funcional de acordo com as condições de utilização especificadas. Como um exemplo específico, uma pró-molécula de amida de fórmula -NH-C(O)CH_3 compreende o progrupo -C(O)CH_3 .

"Recetor de Fc" refere-se a um membro da família de moléculas da superfície celular que se liga à porção Fc (que contém a região constante específica) de uma imunoglobulina. Cada recetor Fc liga imunoglobulinas de um tipo específico. Por exemplo, o recetor de Fc α ("Fc α R") liga-se a IgA, o Fc ϵ R liga-se a IgE e o Fc γ R liga-se a IgG.

A família Fc α R inclui o recetor polimérico de Ig envolvido no transporte epitelial de IgA/IgM, o recetor específico miclóide R α RI (também chamado CD89), o Fc α / μ R e pelo menos dois recetores de IgA alternativos (para uma revisão recente ver Monteiro & van de Winkel, 2003, Annu. Rev. Immunol, e-publicação em avanço). O Fc α RI é expresso em neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos, células dendríticas e células de kupfer. O Fc α RI inclui uma cadeia alfa e o homodímero FcR gama que tem um motivo de ativação (ITAM) no domínio citoplasmático e fosforila a Syk quinase.

A família Fc ϵ R inclui dois tipos, designados Fc ϵ RI e Fc ϵ RII (também conhecido como CD23). O Fc ϵ RI é um recetor de alta afinidade (liga-se a IgE com uma afinidade de cerca de 10^{10} M^{-1}) encontrado em mastócitos, basófilos e eosinófilos, que ancora IgE monomérica à superfície da célula. O Fc ϵ RI possui uma cadeia alfa, uma cadeia beta e o homodímero de cadeia gama discutido acima. O Fc ϵ RII é um recetor de baixa afinidade expresso em fagócitos mononucleares, linfócitos B, eosinófilos e plaquetas. O Fc ϵ RII compreende um polipéptido de cadeia única, e não inclui o homodímero da cadeia gama.

A família Fc γ R inclui três tipos, designados Fc γ RI (também conhecido como CD64), Fc γ RII (também conhecido como CD32) e Fc γ RIII (também conhecido como CD16). Fc γ RI é um recetor de alta afinidade (liga-se a IgG1 com uma afinidade de 10^8 M^{-1}) encontrado em mastócitos, basófilos, células mononucleares,

neutrófilos, eosinófilos, células fagocíticas e dendríticas, que ancora IgG monomérica na superfície da célula. O Fc γ RI inclui uma cadeia alfa e o dímero de cadeia gama compartilhada por Fc α RI e Fc ϵ RI.

O Fc γ RII é um recetor de baixa afinidade expresso em neutrófilos, eosinófilos, monócitos, plaquetas e linfócitos B. O Fc γ RII inclui uma cadeia alfa, e não inclui o homodímero da cadeia gama discutido acima.

O Fc γ RIII é um recetor de baixa afinidade (liga-se a IgG1 com uma afinidade de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) expresso em NK, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e mastócitos. É composto por uma cadeia alfa e o homodímero gama compartilhado por Fc α RI, Fc ϵ RI e Fc γ RI.

Os peritos na técnica irão reconhecer que a estrutura de subunidades e propriedades de ligação destes diversos recetores Fc, bem como os tipos de células que os expressam, não estão completamente caracterizados. A discussão acima reflete apenas o estado da arte atual sobre esses recetores (ver, por exemplo, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5ª Edição, Janeway et al, Eds, 2001, ISBN 0-8153-3642-x, Figura 9.30 na página 371), e não se pretende que sejam limitativos no que diz respeito à miríade de cascatas de sinalização de recetor que podem ser reguladas com os compostos aqui descritos.

"Desgranulação mediada pelo recetor Fc" ou "Desgranulação induzida pelo recetor Fc" refere-se à desgranulação que prossegue via uma cascata de transdução de sinal do recetor Fc iniciada por reticulação de um recetor de Fc.

"Desgranulação induzida pela IgE" ou "Desgranulação mediada por Fc ϵ RI" refere-se à desgranulação que prossegue via a

cascata de transdução de sinal do recetor de IgE iniciada por reticulação de IgE ligada a FcεRI. A reticulação pode ser induzida por um alergénio ou outro agente de ligação multivalente específico de IgE, tal como um anticorpo anti-IgE. Em referência à FIG. 2, em mastócitos e/ou basófilos, a cascata de sinalização de FcεRI que conduz à desgranulação pode ser dividida em duas fases: a montante e a jusante. A fase a montante inclui todos os processos que ocorrem antes da mobilização do ião cálcio (ilustrada como "Ca²⁺" na FIG 2; ver também a FIG. 3). A fase a jusante inclui a mobilização de ião de cálcio e todos os processos a jusante dos mesmos. Os compostos que inibem a desgranulação mediada por FcεRI podem atuar em qualquer ponto ao longo da cascata de transdução de sinal mediada por FcεRI. Os compostos que inibem seletivamente a desgranulação mediada por FcεRI a montante atuam para inibir a porção da cascata de sinalização de FcεRI a montante do ponto em que é induzida a mobilização do ião cálcio. Em ensaios celulares, os compostos que inibem seletivamente a montante a desgranulação mediada por FcεRI inibem a desgranulação de células tais como mastócitos ou basófilos que estão ativadas ou estimuladas com um alergénio ou agente de ligação específico de IgE (tal como um anticorpo anti-IgE), mas não inibem apreciavelmente a desgranulação de células que são ativadas ou estimuladas com agentes desgranuladores que evitam a via de sinalização de FcεRI, tal como, por exemplo, os ionóforos de cálcio ionomicina e A23187.

"Desgranulação Induzida por IgG" ou "Desgranulação Mediada por FcγRI" refere-se à desgranulação que prossegue via a cascata de transdução de sinal de FcγRI iniciada pela reticulação de FcγRI ligado a IgG. A reticulação pode ser induzida por um alergénio específico de IgG ou de outro agente de ligação multivalente, tal como um anticorpo anti-

IgG ou fragmento de anticorpo. Tal como a cascata de sinalização de FcεRI, em mastócitos e basófilos a cascata de sinalização de FcγRI também leva à desgranulação que pode ser dividida nas mesmas duas fases: a montante e a jusante. De forma semelhante à desgranulação mediada por FcεRI, os compostos que inibem seletivamente a desgranulação mediada por FcγRI a montante atuam a montante do ponto em que é induzida a mobilização do ião cálcio. Em ensaios celulares, os compostos que inibem seletivamente a desgranulação mediada por FcγRI a montante inibem a desgranulação de células tais como mastócitos ou basófilos que estão ativadas ou estimuladas com um alergénio ou agente de ligação específico de IgG (tal como um anticorpo ou fragmento anti-IgG), mas não inibem significativamente a desgranulação de células que se encontram ativadas ou estimuladas com agentes desgranuladores que evitam a via de sinalização de FcγRI, tal como, por exemplo, os ionóforos de cálcio ionomicina e A23187.

"Desgranulação Induzida por Ionóforo" ou "Desgranulação Mediada por Ionóforo" refere-se a desgranulação de uma célula, tal como um mastócito ou basófilo, que ocorre após a exposição a um ionóforo de cálcio, tal como, por exemplo, ionomicina ou A23187.

"Syk Quinase" refere-se à bem conhecida proteína (citoplasmática) não recetor do baço, com 72kDa, tirosina quinase expressa em células B e outras células hematopoiéticas. A Syk quinase inclui dois domínios consenso de homologia Src 2 (SH2) em tandem que se ligam a motivos de ativação fosforilados baseados em imuno-recetores de tirosina ("ITAMs"), um domínio "ligador" e um domínio catalítico (para uma revisão da estrutura e função da Syk quinase ver Sada et al., 2001, J. Biochem. (Tóquio) 130: 177-186), ver também Turner et al, 2000, Immunology

Today 21: 148-154). A Syk quinase tem sido extensamente estudada como um efetor de sinalização do recetor da célula B (BCR) (Turner *et al.*, 2000, *supra*). A Syk quinase é também crítica para a fosforilação da tirosina de múltiplas proteínas que regulam vias importantes desde imuno-recetores, tais como mobilização de Ca^{2+} e cascatas da quinase de proteínas ativadas por mitogénio (MAPK) (ver, por exemplo, a FIG. 2) e desgranulação. A Syk quinase desempenha também um papel crítico na sinalização de integrinas nos neutrófilos (ver, por exemplo, Mocsai *et al.* 2002, *Immunity* 16: 547-558).

Tal como aqui utilizado, a Syk quinase inclui quinases de qualquer espécie animal, incluindo, mas não limitado a, *Homo sapiens*, símios, bovinos, porcos, roedores, etc., reconhecidas como pertencendo à família de Syk. Especificamente incluídas estão isoformas, variantes de splicing, variantes alélicas, mutantes, tanto ocorridas naturalmente como feitas pelo homem. As sequências de aminoácidos destas Syk quinases são bem conhecidas e estão disponíveis no GENBANK. Os exemplos específicos de mRNAs que codificam diferentes isoformas da Syk quinase humana podem ser encontradas no GENBANK n.º de acesso gi|21361552|ref|NM_003177.21|, gi|496899|emb|Z29630.1|HSSYKPTK[496899] e gi|15030258|gb|BC011399.1|BC011399 [15030258], os quais são aqui incorporados por referência.

Os peritos na técnica reconhecerão que tirosina quinases pertencentes a outras famílias podem ter sítios ativos ou bolsas de ligação que sejam semelhantes em estrutura tridimensional aos da Syk. Como consequência desta semelhança estrutural, espera-se que tais quinases, aqui referidas como "Syk mímicas", catalisem a fosforilação de substratos fosforilados pela Syk. Assim, será apreciado que

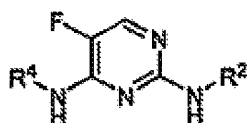
tais Syk mímicas, cascatas de transdução de sinal em que essas Syk mímicas desempenham um papel e as respostas biológicas efetuadas por tais Syk mímicas e cascatas de sinalização dependentes das Syk mímicas podem ser reguladas, e em particular inibidas com os compostos de 2,4-pirimidinadiamina aqui descritos.

"Cascata de sinalização dependente de Syk" refere-se a uma cascata de transdução de sinal em que a Syk quinase desempenha um papel. Exemplos não limitativos de tais cascatas de sinalização dependentes de Syk incluem as cascatas de sinalização de FcαRI, FcεRI, FcγRI, FcγRIII, BCR e de integrinas.

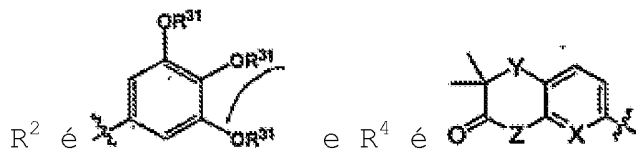
"Doença autoimune" refere-se àquelas doenças que são geralmente associadas com as reações de hipersensibilidade não anafiláticas (reações de hipersensibilidade do Tipo II, Tipo III e/ou Tipo IV), que geralmente resultam como uma consequência da própria resposta imune humoral e/ou mediada por células do sujeito a uma ou mais substâncias imunogénicas de origem endógena e/ou exógena. Tais doenças autoimunes são diferenciadas das doenças associadas às reações de hipersensibilidade anafiláticas (Tipo I ou mediadas por IgE).

1.1 Os Compostos 2,4-pirimidinadiamina

Os compostos da invenção são compostos de 2,4-pirimidinadiamina de acordo com a fórmula estrutural:



e sais, hidratos, solvatos e N-óxidos deles derivados, em que



em que

X é selecionado do grupo que consiste em N e CH;

Y é selecionado a partir do grupo consistindo de O, S, SO, SO₂, SONR³⁶, NH, NR³⁵;

Z é selecionado a partir do grupo consistindo de O, S, SO, SO₂, SONR³⁶, NH, NR³⁵;

Cada R³¹ é independentemente (C1-C6) alquilo;

Cada R³⁵ é, independentemente dos outros, selecionado de entre o grupo constituído por hidrogénio e R⁸.

R⁸ é selecionado a partir do grupo consistindo de R^a, R^b, R^a substituído com um ou mais do mesmo ou diferentes R^a ou R^b, -OR^a substituído com um ou mais do mesmo ou diferentes R^a ou R^b, -B(OR^a)₂, -B(NR^cR^c)₂, -(CH₂)_m-R^b, -(CHR^a)_m-R^b, -O-(CH₂)_m-R^b, -S-(CH₂)_m-R^b, -O-CH(R^a)R^b, -O-CR^a(R^b)₂, -O-(CHR^a)_m-R^b, -O-(CH₂)_m-CH[(CH₂)_m-R^b]R^b, -S-(CHR^a)_m-R^b, -C(O)NH-(CH₂)_m-R^b, -C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b, -O-(CH₂)_m-C(O)NH-(CH₂)_m-R^b, -S-(CH₂)_m-C(O)NH-(CH₂)_m-R^b, -O-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b, -S-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b, -NH-(CH₂)_m-R^b, -NH-(CHR^a)_m-R^b, -NH[(CH₂)_m-R^b], -N[(CH₂)_m-R^b]₂, -NH-C(O)-NH-(CH₂)_m-R^b, -NH-C(O)-(CH₂)_m-CHR^bR e -NH-(CH₂)_m-C(O)-NH-(CH₂)_m-R^b;

cada R^a é selecionado independentemente a partir do grupo constituído por hidrogénio, (C1-C6) alquilo, (C3-C8) cicloalquilo, ciclo-hexilo, (C4-C11) cicloalquilalquilo, (C5-C10) arilo, fenilo, (C6-C16) arilalquilo, benzilo, heteroalquilo de 2-6 membros, ciclo-heteroalquilo de 3-8 membros, morfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, piperidinilo, cicloheteroalquilalquilo de 4-11 membros, heteroarilo de 5-10 membros e heteroarilalquilo de 6-16 membros;

cada R^b é um grupo adequado selecionado independentemente do grupo que consiste em =O, $-OR^d$, (C1-C3) haloalquilóxi, $-OCF_3$, =S, $-SR^d$, $=NR^d$, $=NOR^d$, $-NR^cR^c$, halogénio, $-CF_3$, $-CN$, $-NC$, $-OCN$, $-SCN$, $-NO$, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, $-S(O)R^d$, $-S(O)_2R^d$, $-S(O)_2OR^d$, $-S(O)NR^cR^c$, $-S(O)_2NR^cR^c$, $-OS(O)R^d$, $-OS(O)_2R^d$, $-OS(O)_2OR^d$, $-OS(O)_2NR^cR^c$, $-C(O)R^d$, $-C(O)OR^d$, $-C(O)NR^cR^c$, $-C(NH)NR^cR^c$, $-C(NR^a)NR^cR^c$, $-C(NOH)R^a$, $-C(NOH)NR^cR^c$, $-OC(O)R^d$, $-OC(O)OR^d$, $-OC(O)NR^cR^c$, $-OC(NH)NR^cR^c$, $-OC(NR^a)NR^cR^c$, $-[NHC(O)]_nR^d$, $-[NR^aC(O)]_nR^d$, $-[NHC(O)]_nOR^d$, $-[NR^aC(O)]_nOR^d$, $-[NHC(O)]_nNR^cR^c$, $-[NR^aC(O)]_nNR^cR^c$, $-[NHC(NH)]_nNR^cR^c$ e $-[NR^aC(NR^a)]_nNR^cR^c$;

cada R^c é independentemente R^a , ou, em alternativa, cada R^c é tomado em conjunto com o átomo de azoto ao qual está ligado para formar um cicloheteroalquilo ou heteroarilo de 5 a 8-membros, que pode, opcionalmente, incluir um ou mais dos mesmos ou diferentes heteroátomos adicionais e o qual está opcionalmente substituído com um ou mais do mesmo ou de diferentes grupos R^a ou R^b adequados;

cada R^d é independentemente R^a ;

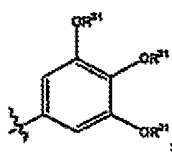
cada m é independentemente um número inteiro de 1 até 3;

cada n é independentemente um número inteiro de 0 a 3; e

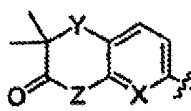
R^{36} é selecionado independentemente do grupo que consiste em hidrogénio e (C1-C6) alquilo.

Formas de realização adicionais dos compostos de 2,4-pirimidinadiamina da invenção são descritos em baixo.

Numa forma de realização dos compostos da invenção R^2 é



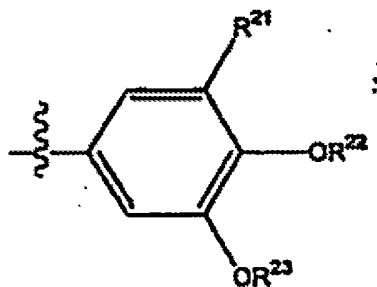
, em que cada R^{31} , independentemente dos outros, é



metil ou (C1-C6) alquilo e R^4 é . Em particular, Y é O, Z, é NH e X é N. Num aspeto em particular, Y é O, Z é NH, X é N e cada R^{31} é metilo.

Em certas formas de realização, os compostos divulgados na aplicação de patente dos EUA com número de série 10/631,029, depositada em Julho 29, 2003 e 10/355,543, depositada em Janeiro 31, 2003, respetivamente, não estão incluídas no âmbito da presente aplicação.

Numa outra forma de realização dos compostos da invenção, R^2 e R^4 são tal como descritos anteriormente, com a condição de que R^2 não é 3,4,5-trimetoxifenil, 3,4,5-tri(C1-C6)alcoxifenil ou



Em que R^{21} , R^{22} e R^{23} são tal como definido para R^1 , R^2 e R^3 , respectivamente na patente dos EUA N° 6,235,746.

Num aspecto específico desta forma de realização, R^{21} é metóxi opcionalmente substituído com um ou mais do mesmo ou diferentes grupos halo e/ou R^{22} e R^{23} de cada, independentemente um do outro, um metil ou etil opcionalmente substituídos com um ou mais dos mesmos ou diferentes grupos halo.

Também são descritas especificamente combinações das formas de realização acima.

Aqueles peritos na técnica apreciarão que os compostos de 2,4-pirimidinadiamina aqui descritos podem incluir grupos funcionais que podem ser mascarados com progrupos para criar pró-fármacos. Tais pró-fármacos normalmente são, mas não precisam de ser, farmacologicamente inativos até convertidos na sua forma ativa do fármaco. De facto, muitos dos compostos ativos de 2,4-pirimidinadiamina descritos na TABELA 1, incluem pró-moléculas hidrolisáveis ou de outro modo cliváveis sob as condições de utilização. Por exemplo, os grupos éster geralmente são sujeitos a hidrólise catalisada por ácido para produzir o ácido carboxílico-progenitor quando expostos às condições ácidas do estômago, ou de hidrólise catalisada por base, quando expostos às condições básicas do intestino ou sangue. Assim, quando

administradas oralmente a um sujeito, as 2,4-pirimidinadiaminas que incluem porções de éster podem ser consideradas pró-fármacos do seu ácido carboxílico correspondente, independentemente de a forma de éster ser farmacologicamente ativa. Em referência à TABELA 1, numerosas 2,4-pirimidinadiaminas da invenção contendo éster são ativas na sua forma éster de "pró-fármaco".

Nos pró-fármacos dos compostos da invenção, qualquer grupo funcional disponível pode ser mascarado com um progrupo para se obter um pró-fármaco. Os grupos funcionais no âmbito dos compostos de 2,4-pirimidinadiamina que podem ser mascarados com progrupos para inclusão num pró-molécula incluem, mas não estão limitados a, aminas (primárias e secundárias), hidroxilos, sulfanilos (tióis), carboxilos, etc. Inúmeros progrupos adequados para mascarar esses grupos funcionais de modo a dar pró-moléculas que são cliváveis sob as condições desejadas de utilização são conhecidos na técnica. Todos estes progrupos, isoladamente ou em combinações, poderão ser incluídos nos pró-fármacos dos compostos da invenção.

Numa forma de realização ilustrativa, os pró-fármacos dos compostos da invenção são compostos da invenção, em que R^c e R^d são substituídos por um progrupo.

Os especialistas na técnica apreciarão que muitos dos compostos da invenção e pró-fármacos deles derivados, bem como as diferentes espécies de compostos especificamente descritas e/ou ilustradas aqui, podem exhibir o fenómeno de tautomerismo, isomerismo conformacional, isomerismo geométrico e/ou isomerismo ótico. Por exemplo, os compostos da invenção e pró-fármacos deles derivados podem incluir um ou mais centros quirais e/ou ligações duplas, e como consequência podem existir como estereoisómeros, tais como

isómeros de ligação dupla (isto é, isómeros geométricos), enantiómeros e diastereómeros e suas misturas, tais como misturas racêmicas. Como outro exemplo, os compostos da invenção e pró-fármacos deles derivados podem existir em várias formas tautoméricas, incluindo a forma de enol, a forma ceto e suas misturas. Como os diferentes nomes, fórmulas e desenhos dos compostos, dentro da especificação e reivindicações podem representar apenas uma das possíveis formas tautoméricas, isoméricas conformacionais, isoméricas óticas ou isoméricas geométricas, deve ser entendido que a invenção abrange qualquer forma tautomérica, isomérica conformacional, isomérica ótica e/ou isomérica geométrica dos compostos tendo uma ou mais das utilidades aqui descritas, bem como misturas destas várias formas isoméricas diferentes. Em caso de rotação limitada em torno da estrutura do núcleo de 2,4-pirimidinadiamina, atropisómeros são também possíveis e são também especificamente incluídos nos compostos da invenção.

Além disso, os peritos na técnica irão apreciar que, quando listas de substituintes alternativos incluem membros que, devido a requisitos de valência ou por outros motivos, não podem ser utilizados para substituir um grupo particular, a lista destina-se a ser lida no contexto para incluir aqueles membros da lista que são adequados para substituir o grupo particular. Por exemplo, os peritos na arte apreciarão que embora todas as alternativas listadas para R^b possam ser utilizadas para substituir um grupo alquilo, algumas das alternativas, tais como $=O$, não podem ser utilizadas para substituir um grupo fenilo. É para ser entendido que apenas as combinações possíveis de pares substituinte-grupo são pretendidas.

Os compostos da invenção e pró-fármacos deles derivados podem ser identificados pela sua estrutura química ou pela

sua designação química. Quando a estrutura química e o nome químico entram em conflito, a estrutura química é determinativa da identidade do composto específico.

Dependendo da natureza dos vários substituintes, os compostos de 2,4-pirimidinadiazina da invenção e pró-fármacos deles derivados podem estar na forma de sais. Tais sais incluem sais adequados para usos farmacêuticos ("sais farmacologicamente aceitáveis"), sais adequados para utilizações veterinárias, etc. Tais sais podem ser derivados de ácidos ou bases, como é bem conhecido na técnica.

Numa forma de realização, o sal é um sal farmacologicamente aceitável. Geralmente, os sais farmacologicamente aceitáveis são aqueles sais que retêm substancialmente uma ou mais das atividades farmacológicas desejadas do composto progenitor e que são adequados para administração a seres humanos. Os sais farmacologicamente aceitáveis incluem sais de adição de ácido formados com ácidos inorgânicos ou ácidos orgânicos. Os ácidos inorgânicos adequados para formar sais de adição de ácido farmacologicamente aceitáveis incluem, a título de exemplo e não de limitação, os ácidos hidro-halogeneto (por exemplo, ácido clorídrico, ácido bromídrico, iodídrico, etc.), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, e outros semelhantes. Os ácidos orgânicos adequados para formar sais de adição de ácido farmacologicamente aceitáveis incluem, a título de exemplo e não de limitação, o ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiônico, ácido hexanóico, ácido ciclopentanopropiônico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malônico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido palmítico, ácido benzóico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil) benzóico, ácido

cinâmico, ácido mandélico, ácidos alquilsulfônicos (por exemplo, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, 1,2-etano-dissulfônico, ácido 2-hidroxi-etanossulfônico, etc.), ácidos arilsulfônicos (por exemplo, ácido benzenossulfônico, ácido 4-clorobenzenossulfônico, ácido 2-naftalenossulfônico, ácido 4-toluenossulfônico, ácidos cicloalquilsulfônicos (por exemplo, ácido canforossulfônico), ácido 4-metilbíciclo [2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido gluco-heptônico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciário, ácido lauril sulfúrico, ácido glucônico, ácido glutâmico, ácido hidroxinaftóico, salicílico, ácido esteárico, ácido mucônico, e similares.

Os sais farmacologicamente aceitáveis também incluem sais formados quando um próton ácido presente no composto progenitor é substituído ou por um íon metálico (por exemplo, um íon de metal alcalino, um íon de metal alcalino-terroso ou um íon de alumínio), ou por um íon de amônio ou coordena com uma base orgânica (por exemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina, morfolina, piperidina, dimetilamina, dietilamina, etc.).

Os compostos de 2,4-pirimidinadiazina da invenção, bem como os seus sais, podem também estar na forma de hidratos, solvatos e N-óxidos, como são bem conhecidos na técnica.

6.3 Métodos de Síntese

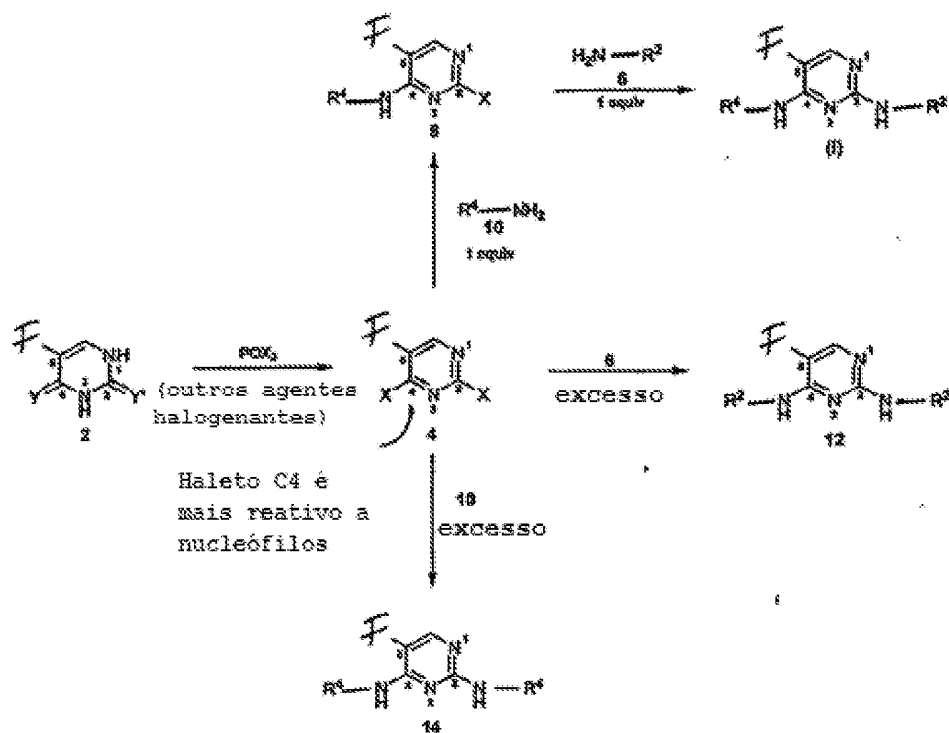
Os compostos da invenção e pró-fármacos deles derivados podem ser sintetizados através de uma variedade de diferentes vias de síntese utilizando materiais de partida disponíveis comercialmente e/ou materiais de partida preparados por métodos sintéticos convencionais. Exemplos

de métodos adequados que podem ser rotineiramente adaptados para sintetizar os compostos de 2,4-pirimidinadiazina da invenção e pró-fármacos deles derivados são encontrados na Patente dos EUA N° 5,958,935, Pedido de Patente EUA 10/355,543, depositado em 31 de Janeiro, 2003 (Publicação EUA US20040029902-A1), WO 03/063794, publicada em Agosto 1 de Agosto, 2003, Pedido de Patente dos EUA 10/631,029, depositado em 29 de Julho, 2003 e WO 2004/014382, publicado em 19 de Fevereiro, 2004. Todos os compostos da invenção e de fórmula estrutural (II) podem ser preparados por adaptação rotineira destes métodos.

Uma variedade de vias de síntese exemplificativas que podem ser utilizadas para sintetizar os compostos de 2,4-pirimidinadiazina da invenção são descritas nos Esquemas (I)-(XI) abaixo. Nos Esquemas (I)-(XI), compostos com a mesma numeração têm estruturas semelhantes. Estes métodos podem ser rotineiramente adaptados para sintetizar os pró-fármacos de acordo com a fórmula estrutural (II).

Numa forma de realização exemplar, os compostos podem ser sintetizados a partir de uracilos ou tiouracilos substituídos ou não substituídos tal como ilustrado no Esquema (I), abaixo:

Esquema (I)



No Esquema (I), R^2 e R^4 são como anteriormente definidos, X é um halogénio (por exemplo, F, Cl, Br ou I) e Y e Y' são cada um, independentemente um do outro, selecionados a partir do grupo que consiste em O e S. Em referência ao Esquema (I), uracilo ou tiouracilo **2** é di-halogenado nas posições 2- e 4- utilizando o agente de halogenação padrão POX_3 (ou outro agente de halogenação padrão) sob condições convencionais para se obter 2,4-bishalopirimidina **4**. 2N,4N-bis(substituído)-2,4-pirimidinadiaminas **12** e **14** podem ser obtidas por reação de 2,4-bishalopirimidina **4** com excesso de **6** ou **10**, respetivamente.

A regiosselectividade da reação pode ser controlada ajustando os solventes e outras condições de síntese (como temperatura), como é bem conhecido na técnica.

As reações representadas no Esquema (I) podem prosseguir mais rapidamente quando as misturas reacionais são aquecidas por meio de micro-ondas. Durante o aquecimento desta forma, podem ser utilizadas as seguintes condições: o calor a 175°C em etanol durante 5-20 minutos num reator de Smith (Personal Chemistry) num tubo selado (a 20 bares de pressão).

Os materiais de partida uracilo ou tiouracilo **2** podem ser adquiridos a partir de fontes comerciais ou preparados usando técnicas padrão de química orgânica. Uracilos e tiouracilos comercialmente disponíveis e que podem ser usados como materiais de partida no Esquema (I) incluem, a título de exemplo e não de limitação, uracilo (Aldrich #13,078-8; Registo CAS 66-22-8); 2-tiouracilo (Aldrich #11,558-4; Registo CAS 141-90-2); 2,4-ditiouracilo (Aldrich #15,846-1; Registo CAS 2001-93-6); 5-acetouracilo (Chem. Sources Int'l 2000; Registo CAS 6214-65-9); 5-azidouracilo; 5-aminouracilo (Aldrich #85,528-6; Registo CAS 932-52-5); 5-bromouracilo (Aldrich #85,247-3; Registo CAS 51-20-7); 5-(trans-2-bromovinil)-uracilo (Aldrich #45,744-2; Registo CAS 69304-49-0); 5-(trans-2-clorovinil)-uracilo (Registo CAS 81751-48-2); 5-(trans-2-carboxivinil)-uracilo; ácido uracil-5-carboxílico (hidrato de ácido 2,4-dihidroxipirimidina-5-carboxílico; Aldrich #27,770-3; Registo CAS 23945-44-0); 5-clorouracilo (Aldrich #22,458-8; Registo CAS 1820-81-1), 5-cianouracilo (Chem. Sources Int'l 2000; Registo CAS 4425-56-3), 5-etiluracilo (Aldrich #23,044-8; Registo CAS 4212-49-1), 5-etenluracilo (Registo CAS 37107-81-6); 5-fluorouracilo (Aldrich #85,847-1; Registo CAS 51-21-8), 5-iodo-uracilo (Aldrich #85,785-8; Registo CAS 696-07-1); 5-metiluracilo (timina; Aldrich #13,199-7; Registo CAS 65-71-4); 5-nitrouracil (Aldrich #85,276-7; Registo CAS 611-08-5); ácido uracila-5-sulfâmico (Chem. Sources Int'l 2000; Registo CAS 5435-16-5); 5-

(trifluorometil)-uracilo (Aldrich #22,327-1; Registo CAS 54-20-6); 5-(2,2,2-trifluoroetil)-uracilo (Registo CAS 155143-31-6); 5-(pentafluoroetil)-uracilo (Registo CAS 60007-38-3); 6-aminouracilo (Aldrich #A5060-6; Registo CAS 873-83-6) ácido uracil-6-carboxílico (ácido orótico; Aldrich #0-840-2; Registo CAS 50887-69-9); 6-metiluracilo (Aldrich #D11,520-7; Registo CAS 626-48-2); ácido uracil-5-amino-6-carboxílico (ácido 5-aminoorótico; Aldrich #19,121-3; Registo CAS #7164-43-4); 6-amino-5-nitrosouracilo (6-amino-2,4-di-hidroxi-5-nitrosopirimidina; #Aldrich 27,689-8; Registo CAS 5442-24-0); ácido uracil-5-fluoro-6-carboxílico (ácido 5-fluoroorótico; Aldrich #42,513-3; Registo CAS 00000-00-0); e ácido uracil-5-nitro-6-carboxílico (ácido 5-nitroorótico; Aldrich #18,528-0; Registo CAS 600779-49-9). Uracilos e/ou tiouracilos 5-, 6- e 5,6-substituídos adicionais estão disponíveis em *General Intermediates of Canada, Inc.*, Edmonton, Alberta, Canada (www.generalintermediates.com) e/ou *Interchim*, França (www.interchim.com), ou podem ser preparados utilizando técnicas padrão. Inúmeras referências de livros didáticos ensinando métodos sintéticos adequados são fornecidos abaixo.

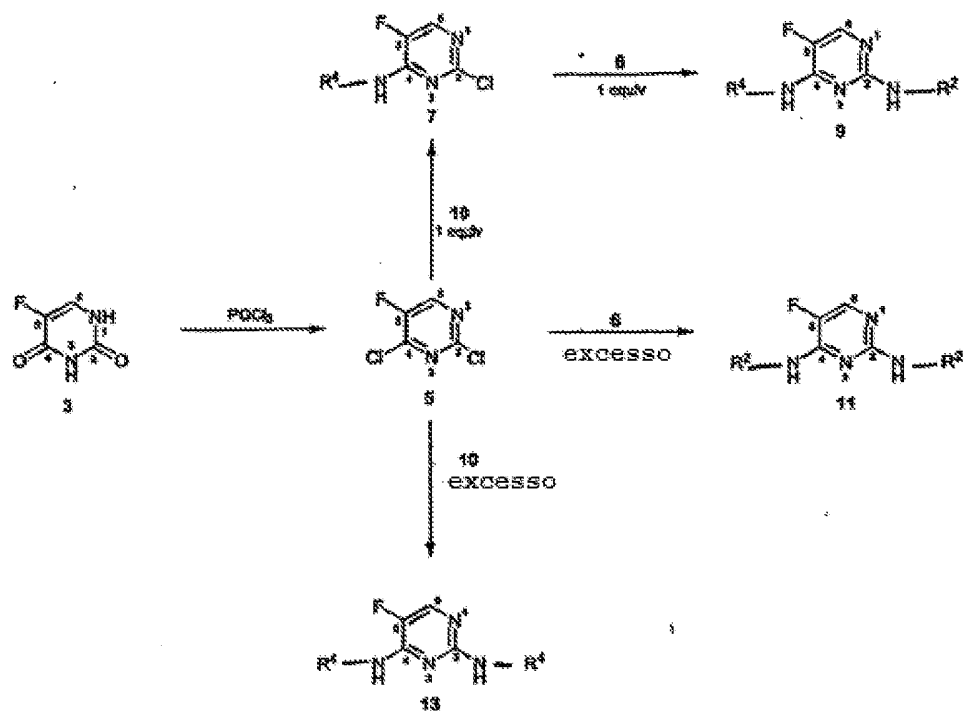
As aminas 6 e 10 podem ser adquiridas a partir de fontes comerciais ou, alternativamente, podem ser sintetizadas utilizando técnicas convencionais. Por exemplo, aminas adequadas podem ser sintetizadas a partir de precursores nitro utilizando química padrão. As reações específicas exemplificativas são fornecidos na secção de Exemplos. Ver também Vogel, 1989, *Practical Organic Chemistry*, Addison Wesley Longman, Ltd. e John Wiley & Sons, Inc.

Os especialistas na técnica irão reconhecer que, em alguns casos, as aminas 6 e 10 e/ou uracilo ou tiouracilo 2 podem

incluir grupos funcionais que requeiram proteção durante a síntese. A identidade exata de qualquer grupo(s) protetor(es) utilizado(s) vai depender da identidade do grupo funcional a ser protegido, e será evidente para especialistas na técnica. Orientações para a seleção de grupos protetores adequados, bem como estratégias de síntese para a sua ligação e remoção, podem ser encontradas, por exemplo, em Greene & Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3d Edition, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque (1999) e as referências aí citadas (doravante, "Greene & Wuts").

Uma concretização específica do Esquema (I) utilizando 5-fluorouracilo (Aldrich #32,937-1) como um material de partida está ilustrada no Esquema (Ia), abaixo:

Esquema (Ia)

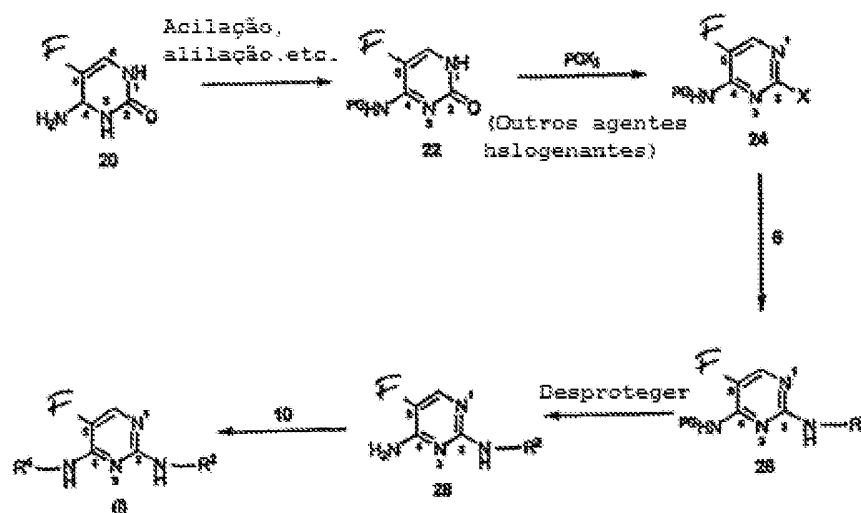


No Esquema (Ia), R^2 , R^4 são como anteriormente definidos para o Esquema (I).

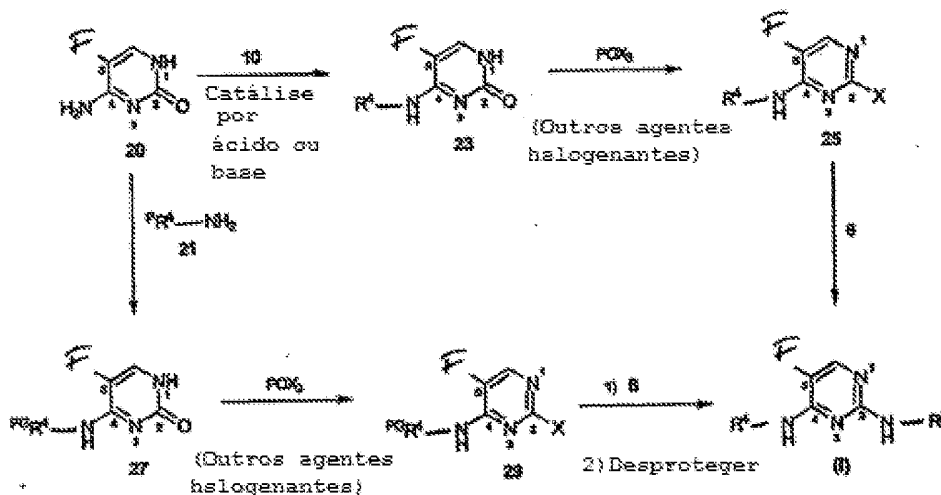
De acordo com o Esquema (Ia), 5-fluorouracilo **3** é halogenado com $POCl_3$ de modo a se obter 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina **5**, que é então feita reagir com excesso de amina **6** ou **10** para produzir N2,N4-bis-substituída-5-fluoro-2,4-pirimidinadiamina **11** ou **13**, respetivamente. Alternativamente, não bis 2N,4N-disubstituída-5-fluoro-2,4-pirimidinadiamina **9** pode ser obtida por reação de 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina **5** com um equivalente de amina **10** (para produzir 2-cloro-N4-substituída-5-fluoro-4-pirimidinoamina **7**) seguida de um ou mais equivalentes de amina **6**.

Numa outra forma de realização exemplar, os compostos de 2,4-pirimidinadiamina da invenção podem ser sintetizados a partir de citosinas substituídas ou não substituídas tal como ilustrado nos Esquemas (IIa) e (IIb) abaixo:

Esquema (IIa)



Esquema (IIb)



Nos Esquemas (IIa) e (IIb), R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 , L^2 e X são como previamente definidos para o Esquema (I) e PG representa um grupo protetor. Em referência ao Esquema (IIa), a amina exocíclica C4 de citosina **20** é primeiro protegida com um grupo protetor adequado PG para dar a citosina **22** N4-protegida. Para obter orientação específica sobre grupos protetores úteis neste contexto, ver Vorbrüggen e Ruh-Pohlenz, 2001, *Handbook of Nucleoside Synthesis*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, páginas 1-631 ("Vorbrüggen"). A citosina protegida **22** é halogenada na posição C2 utilizando um reagente de halogenação padrão sob condições padrão para se obter 2-cloro-4N-protegida-4-pirimidinoamina **24**. A reação com amina **6** seguida de desproteção da amina exocíclica C4 e reação com amina 10 produz 2,4-pirimidinadiamina de acordo com a fórmula estrutural (I).

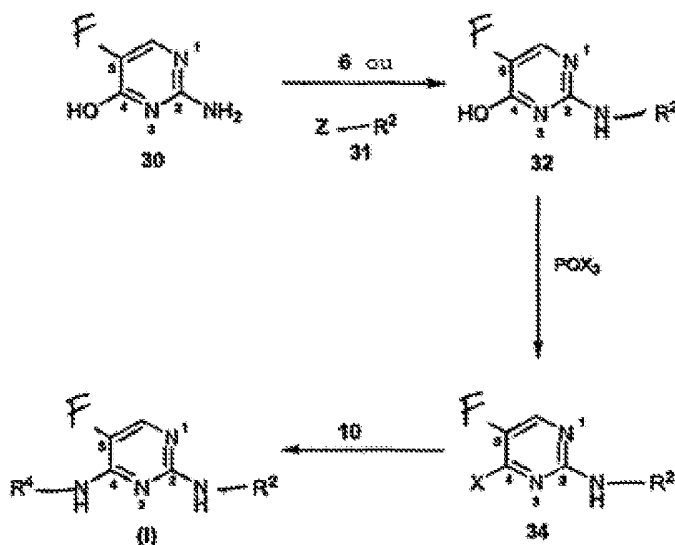
Alternativamente, referindo-se ao Esquema (IIb), a citosina **20** poderá ser feita reagir com a amina **10** ou a amina protegida **21** para se obterem citosinas N4-substituídas **23**

ou **27**, respetivamente. Estas citosinas substituídas podem então ser halogenadas como descrito anteriormente, desprotegidas (no caso de citosina N4-substituída **27**) e feita reagir com amina **6** para dar uma 2,4-pirimidinadiamina de acordo com a fórmula estrutural (**I**).

Citosinas disponíveis comercialmente que podem ser utilizadas como materiais de partida nos Esquemas (IIa) e (IIb) incluem, mas não estão limitadas a, citosina (Aldrich #14,201-8; Registo CAS 71-30-7); N⁴-acetilcitosina (Aldrich #37,791-0; Registo CAS 14631-20-0); 5-fluorocitosina (Aldrich #27,159-4; Registo CAS 2022-85-7); e 5-(trifluorometil)-citosina. Outras citosinas adequadas úteis como materiais de partida nos Esquemas (IIa), estão disponíveis em *General Intermediates of Canada, Inc.*, Edmonton, Canadá (www.generalintermediates.com) e/ou Interchim, França (www.interchim.com), ou podem ser preparadas utilizando técnicas padrão. Inúmeras referências de livros ensinando métodos sintéticos adequados são fornecidas abaixo.

Ainda numa outra forma de realização exemplificativa, os compostos de 2,4-pirimidinadiamina da invenção podem ser sintetizados a partir 2-amino-4-pirimidinóis substituídos ou não substituídos como ilustrado no Esquema (III), abaixo:

Esquema (III)



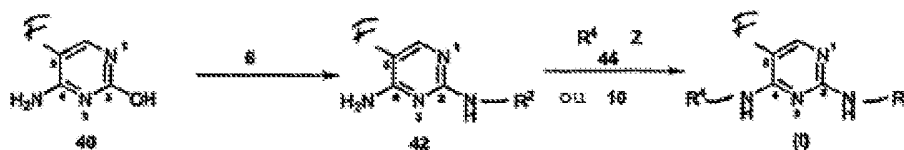
No Esquema (III), R², R⁴, e X são como previamente definidos para o Esquema (I) e Z é um grupo de saída tal como discutido em mais pormenor em ligação com o Esquema IV, abaixo. Em referência ao Esquema (III), 2-amino-4-pirimidinol **30** reage com a amina **6** (ou opcionalmente amina protegida **21**) para dar N2-substituído-4-pirimidinol **32**, que é em seguida halogenado como previamente descrito para produzir N2-substituída-4-halo-2-pirimidinoamina **34**. Desproteção opcional (por exemplo, se a amina protegida **21** fosse usada no primeiro passo) seguida de reação com a amina **10** proporciona uma 2,4-pirimidinadiamina de acordo com a fórmula estrutural (I). Alternativamente, pirimidinol **30** pode reagir com um agente de acilação **31**.

2-amino-4-pirimidinóis **30** apropriados comercialmente disponíveis que podem ser utilizados como materiais de partida no Esquema (III) incluem, mas não estão limitados a, hidrato de 2-amino-6-cloro-4-pirimidinol (Aldrich #A4702- 8; Registo CAS 00000-00-0) e 2-amino-6-hidroxi-4-pirimidinol (Aldrich #A5040-1; Registo CAS 56-09-7). Outros 2-amino-4-pirimidinóis **30** úteis como materiais de partida

no Esquema (III) estão disponíveis a partir de *General Intermediates of Canada, Inc.*, Edmonton, Alberta, CA (www.generalintermediates.com) e/ou Interchim, França (www.interchim.com), ou podem ser preparados utilizando técnicas padrão. Inúmeras referências de livros que ensinam métodos sintéticos adequados são fornecidas abaixo.

Alternativamente, os compostos de 2,4-pirimidinadiamina da invenção podem ser preparados a partir de 4-amino-2-pirimidinóis substituído ou não substituído como ilustrado no Esquema (IV), abaixo:

Esquema (IV)



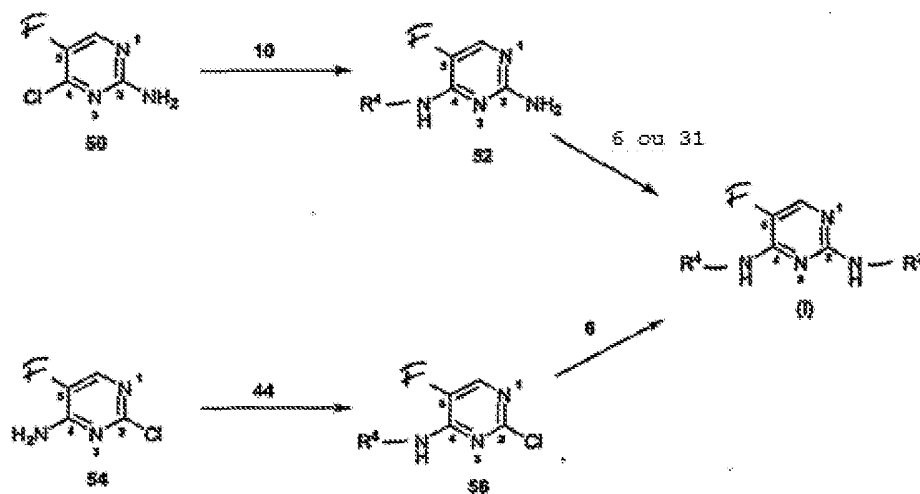
No Esquema (IV), R^2 , R^4 são como anteriormente definidos para o Esquema (I) e **Z** representa um grupo de saída. Em referência ao Esquema (IV), o C2-hidroxilo do 4-amino-2-pirimidinol **40** é mais reativo para nucleófilos do que o C4-amino, de tal forma que a reação com amina **6** dá origem a N2-substituído-2,4-pirimidinadiamina **42**. A reação subsequente com o composto **44**, que inclui um bom grupo de saída **Z**, ou amina **10**, produz uma 2,4-pirimidinadiamina de acordo com a fórmula estrutural (I). O composto **44** pode incluir virtualmente qualquer grupo de saída que possa ser deslocado pelo C4-amino da N2-substituída-2,4-pirimidinadiamina **42**. Grupos de saída adequados **Z** incluem, mas não estão limitadas a, átomos de halogênio, metanossulfonilóxi (mesiloxi; "OMs"), trifluorometanosulfonilóxi ("OTf") e *p*-toluenossulfonilóxi

(tosilóxi; "OTs"), sulfonilóxi de benzeno ("besilato") e sulfonilóxi de metanitro benzeno ("nosilato"). Outros grupos de saída adequados serão evidentes para aqueles peritos na técnica.

Materiais de partida 4-amino-2-pirimidinol substituídos podem ser obtidos comercialmente ou sintetizados utilizando técnicas convencionais. Inúmeras referências de livros que ensinam métodos sintéticos adequados são fornecidas abaixo.

Ainda numa outra forma de realização exemplificativa, os compostos de 2,4-pirimidinadiamina da invenção podem ser preparados a partir de 2-cloro-4-aminopirimidinas ou 2-amino-4-chloropyrimidines como ilustrado no Esquema (V), abaixo:

Esquema (V)



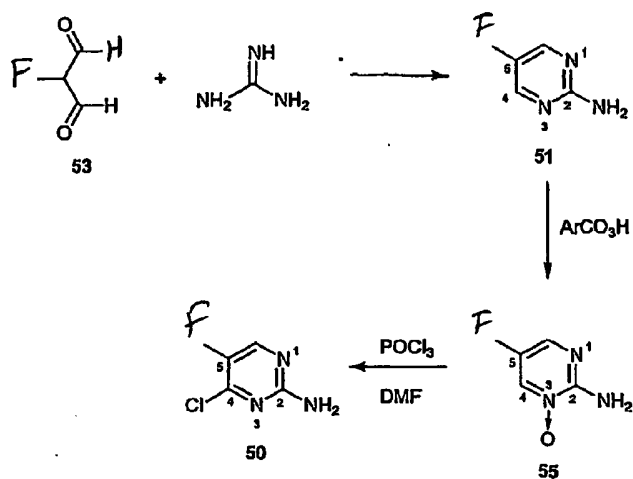
No Esquema (V), R², R⁴ e X são como definidos para o Esquema (I) e Z é tal como definido para o Esquema (IV). Em referência ao Esquema (V), 2-amino-4-cloropirimidina **50** reage com amino **10** para dar origem a 4N-substituído-2-pirimidinoamina **52** que, após a reação com o composto **31** ou

amina **6**, produz uma 2,4-pirimidinadiamina de acordo com a fórmula estrutural (**I**). Alternativamente, 2-cloro-4-amino-pirimidina **54** pode ser feita reagir com o composto **44** seguido de amina **6** para dar origem a um composto de acordo com a fórmula estrutural (**I**).

Uma variedade de pirimidinas **50** e **54** adequadas para utilização como materiais de partida no Esquema (V) estão comercialmente disponíveis, incluindo por meio de exemplo e não de limitação, a 2-amino-4,6-dicloropirimidina (Aldrich #A4860-1; Registo CAS 56-05-3); 2-amino-4-cloro-6-metoxipirimidina (Aldrich #51, 864-6; Registo CAS 5734-64-5); 2-amino-4-cloro-6-metilpirimidina (#Aldrich 12,288-2; Registo CAS 5600-21-5); e 2-amino-4-cloro-6-metiltiopirimidina (Aldrich # A4600-5; Registo CAS 1005-38-5). Materiais de partida adicionais de pirimidina estão disponíveis a partir de *General Intermediates of Canada, Inc.*, Edmonton, Alberta, Canadá (www.generalintermediates.com) e/ou Interchim, França (www.interchim.com), ou podem ser preparados utilizando técnicas padrão. Inúmeras referências de livros que ensinam métodos sintéticos adequados são fornecidas abaixo.

Alternativamente, 4-cloro-2-pirimidinoaminas **50** podem ser preparadas como ilustrado no Esquema (Va):

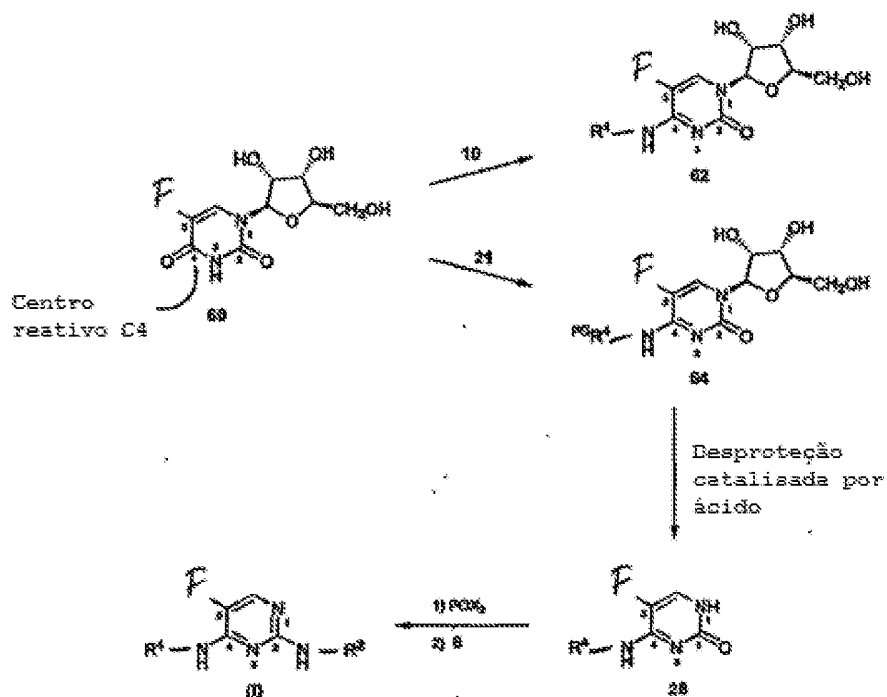
Esquema (Va)



No Esquema (Va), dicarbonilo **53** reage com guanidina para dar origem 2-pirimidinoamina **51**. Reação com perácidos como o ácido m-cloroperbenzóico, ácido trifluoroperacético ou complexo de ureia peróxido de hidrogénio produz N-óxido **55**, que é então halogenado para dar origem a 4-cloro-2-pirimidinoamina **50**. As correspondentes 4-halo-2-pirimidinoaminas podem ser obtidas utilizando os reagentes de halogenação adequados.

Ainda numa outra forma de realização exemplificativa, os compostos de 2,4-pirimidinadiamina da invenção podem ser preparados a partir de uridinas substituídos ou não substituídos, como ilustrado no Esquema (VI), abaixo:

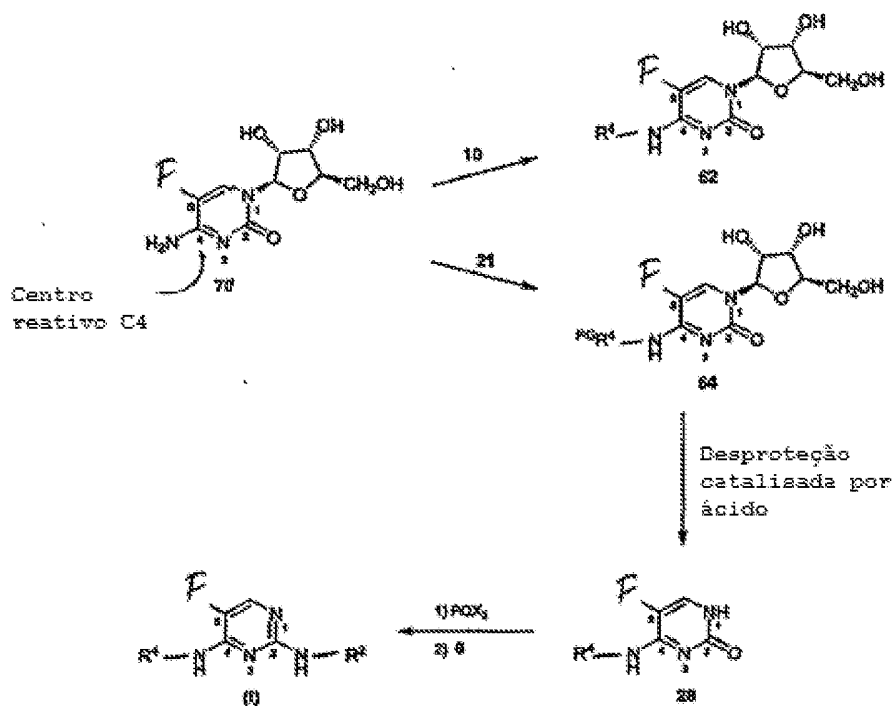
Esquema (VI)



No Esquema (VI), R^2 , R^4 e X são como previamente definidos para o Esquema (I) e o sobrescrito PG representa um grupo protetor, tal como discutido em ligação com o Esquema (IIb). De acordo com o Esquema (VI), a uridina **60** tem um centro reativo C4 tal que a reação com a amina **10** ou amina protegida **21** dá origem citidina N4-substituída **62** ou **64**, respetivamente. Desproteção catalisada por ácido de **62** ou **64** N4-substituídos (quando "PG" representa um grupo de proteção ácido lábil) dá origem a citosina N4-substituída **28**, que pode ser subsequentemente halogenada na posição C2 e feita reagir com amina **6** para dar origem a uma 2,4-pirimidinadiamina de acordo com a fórmula estrutural (I).

Citidinas também podem ser utilizadas como materiais de partida de uma maneira análoga, tal como ilustrado no Esquema (VII), abaixo:

Esquema (VII)



No Esquema (VII), R^2 , R^4 e X são como previamente definidos no Esquema (I) e o sobrescrito PG representa um grupo protetor como discutido acima. Em referência ao Esquema (VII), tal como a uridina **60**, a citidina **70** tem um centro reativo C4 tal que a reação com a amina **10** ou amina protegida **21** dá origem a citidina N4-substituída **62** ou **64**, respetivamente. Estas citidinas **62** e **64** são, então, tratadas como anteriormente descrito para o Esquema (VI) para se obter 2,4-pirimidinodiamina de acordo com a fórmula estrutural (I).

Embora os Esquemas (VI) e (VII) sejam exemplificados com ribosilnucleósidos, os peritos na técnica apreciarão que os correspondentes 2'-desoxiribo e 2',3'-didesoxiribo nucleósidos, bem como os nucleósidos incluindo açúcares ou

outros análogos de açúcar que não ribose, também resultariam.

Numerosas uridinas e citidinas úteis como materiais de partida nos Esquemas (VI) e (VII) são conhecidas na arte, e incluem, a título de exemplo e não de limitação, a 5-trifluorometil-2'-desoxicitidina (Chem. Sources #ABCR F07669; Registo CAS 66,384-66-5); 5 bromouridina (Chem. Sources Int'l 2000; Registo CAS 957-75-5); 5-iodo-2'-desoxiuridina (Aldrich #1-775-6; Registo CAS 54-42-2); 5-fluorouridina (Aldrich #32,937-1; Registo CAS 316-46-1); 5-iodouridina (Aldrich #85,259-7; Registo CAS 1024-99-3); 5-(trifluorometil)uridina (Chem. Sources Int'l 2000; Registo CAS 70-00-8); 5-trifluorometil-2'-desoxiuridina (Chem. Sources Int'l 2000; Registo CAS 70-00-8). Uridinas e citidinas adicionais e que podem ser usadas como materiais nos de partida Esquemas (VI) e (VII) estão disponíveis a partir de General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, Canadá (www.generalintermediates.com) e/ou Interchim, França (www.interchim.com), ou podem ser preparados utilizando técnicas padrão. Inúmeras referências de livros que ensinam métodos sintéticos adequados são fornecidas abaixo.

Como será reconhecido pelos peritos na arte, as 2,4-pirimidinadiaminas de acordo com a invenção, sintetizadas através dos métodos exemplificativos descritos acima ou por outros meios bem conhecidos, podem também ser utilizadas como materiais de partida e/ou intermediários para a síntese adicional de compostos de 2,4-pirimidinadiaminas da invenção.

Apesar de muitos dos esquemas de síntese descritos acima não ilustrarem a utilização de grupos protetores, os peritos na técnica reconhecerão que em alguns casos os

substituintes R^2 , R^4 podem incluir grupos funcionais que requerem proteção. A identidade exata do grupo protetor utilizado dependerá, entre outras coisas, da identidade do grupo funcional a ser protegido e das condições de reação usadas no esquema sintético particular, e será evidente para os peritos na técnica. Orientações para selecionar grupos protetores e químicas para a sua ligação e remoção adequadas para uma aplicação particular, podem ser encontradas, por exemplo, em Greene & Wuts, acima referido.

Os pró-fármacos de acordo com a fórmula estrutural (II) podem ser preparados por modificação de rotina dos métodos acima descritos. Alternativamente, tais pró-fármacos podem ser preparados por reação de uma 2,4-pirimidinadiazina da invenção adequadamente protegida com um progrupo adequado. As condições para a realização de tais reações e para desproteger o produto para se obter um pró-fármaco de fórmula (II) são bem conhecidas.

Inúmeras referências ensinando métodos úteis para a síntese de pirimidinas em geral, bem como materiais de partida descritos nos Esquemas (I)-(IX), são conhecidas na arte. Para orientação específica, o leitor é remetido para Brown, D.J., "The Pyrimidines", em *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Volume 16* (Weissberger, A., Ed.), 1962, Interscience Publishers, (uma divisão de John Wiley & Sons), Nova Iorque ("Brown I"); Brown, D.J., "The Pyrimidines", em *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Volume 16, Suplemento I* (Weissberger, A. e Taylor, E. C, Ed.), 1970, Wiley-Interscience, (uma divisão de John Wiley & Sons), Nova Iorque (Brown II"); Brown, D.J., "The Pyrimidines", em *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Volume 16, Suplemento II* (Weissberger, A. e Taylor, E. C, Ed.), 1985, uma publicação Interscience Publication (John

Wiley & Sons), Nova Iorque ("Brown III"); Brown, D. J., "The Pyrimidines" em *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Volume 52 (Weissberger, A. e Taylor, E. C, Ed.), 1994, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, pp. 1-1509 (Brown IV"); Kenner, G.W. e Todd, A., in *Heterocyclic Compounds*, Volume 6, (Elderfield, R. C, Ed.), 1957, John Wiley, Nova Iorque, Capítulo 7 (pirimidinas); Paquette, L. A., *Principles of Modern Heterocyclic Chemistry*, 1968, W. A. Benjamin, Inc., Nova Iorque, pp. 1-401 (síntese de uracilo pp. 313,315; síntese de pirimidina pp. 313-316; síntese de amino pirimidina pp. 315); Joule, J. A., Mills, K. e Smith, G. F., *Heterocyclic Chemistry*, 3rd Edition, 1995, Chapman e Hall, Londres, Reino Unido, pp. 1 - 516; Vorbrüggen, H. e Ruh-Pohlenz, C., *Handbook of Nucleoside Synthesis*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 2001, pp. 1-631 (proteção de pirimidinas por acilação pp. 90-91; sililação de pirimidinas pp. 91-93); Joule, J. A., Mills, K. e Smith, G. F., *Heterocyclic Chemistry*, 4th Edition, 2000, Blackwell Science, Ltd, Oxford, Reino Unido, pp. 1-589; e *Comprehensive Organic Synthesis*, Volumes 1-9 (Trost, B.M. e Fleming, I., Ed.), 1991, Pergamon Press, Oxford, Reino Unido.

Deverá ser entendido pelo perito na técnica que nos Esquemas I a VII, o átomo de azoto N4 pode ser substituído por R^{4c}, conforme descrito ao longo da especificação e nos exemplos aqui fornecidos.

6.4 Inibição das cascatas de sinal do recetor Fc

Compostos ativos de 2,4-pirimidinadiazina da invenção inibem as cascatas de sinalização do recetor Fc que conduzem, entre outras coisas, à desgranulação das células. Como um exemplo específico, os compostos inibem as cascatas

de sinal de FcεRI e/ou FcγRI que conduzem à desgranulação de células imunitárias, tais como neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e/ou basófilos. Tanto os mastócitos como os basófilos desempenham um papel central em doenças induzidas por alérgenos, incluindo, por exemplo, rinite alérgica e asma. Em referência à FIG. 1, após exposição a alérgenos, os quais podem ser, entre outras coisas, pólen ou parasitas, anticorpos IgE específicos para o alérgeno são sintetizados por células B ativadas por IL-4 (ou IL-13) e outros mensageiros para alterar para a síntese de anticorpos específicos da classe IgE. Estas IgEs específicas para o alérgeno ligam-se ao FcεRI de alta afinidade. Após a ligação do antígeno, as IgEs ligadas a FcεRI são reticuladas e a via do recetor de sinal de transdução do IgE é ativada, o que conduz à desgranulação das células e consequente libertação e/ou síntese de uma série de mediadores químicos, incluindo histamina, proteases (por exemplo, triptase e quimase), mediadores lipídicos, tais como leucotrienos (por exemplo, LTC₄), fator ativador de plaquetas (PAF) e prostaglandinas (por exemplo, PGD₂) e uma série de citocinas, incluindo TNF-α, IL-4, IL-13, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, VEGF e TGF-β. A libertação e/ou síntese destes mediadores dos mastócitos e/ou basófilos representa as respostas em fase inicial e tardia induzidas por alérgenos, e está diretamente ligada aos acontecimentos posteriores, que conduzem a um estado inflamatório sustentado.

Os eventos moleculares na via de transdução de sinal de FcεRI que conduzem à libertação de mediadores pré-formados através da desgranulação e libertação e/ou síntese de outros mediadores químicos são bem conhecidos e encontram-se ilustrados na FIG. 2. Em referência à FIG. 2, o FcεRI é um recetor heterotetramérico composto por uma subunidade alfa de ligação IgE, uma subunidade beta e duas subunidades

gama (homodímero gama). A reticulação de IgE ligado a FcεRI através de agentes de ligação multivalentes (incluindo, por exemplo, alérgenos específicos de IgE ou anticorpos ou fragmentos anti-IgE) induz a associação rápida e ativação da quinase Lyn relacionada com Src. Lyn fosforila motivos de ativação dos imuno-recetores baseados em tirosina (ITAMS) nas subunidades intracelulares beta e gama, o que conduz ao recrutamento de Lyn adicional para a subunidade beta e de Syk quinase para o homodímero gama. Estas quinases associadas a recetores, as quais são ativadas por fosforilação intra- e intermolecular, fosforilam outros componentes da via, tais como a quinase Btk, LAT, e fosfolipase C-gama PLC-gama. A PLC-gama ativada inicia vias que conduzem à ativação da proteína quinase C e à mobilização de Ca^{2+} , ambos os quais são necessários para a desgranulação. A reticulação de FcεRI também ativa as três principais classes de proteínas-quinases ativadas por mitógeno (MAP), ou seja, ERK1/2, JNK1/2 e p38. A ativação de tais vias é importante na regulação da transcrição de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF-α e IL-6, bem como o mediador lipídico leucotrieno CA (LTC4).

Embora não ilustrado, crê-se que a cascata de sinalização de FcγRI partilha alguns elementos comuns com a cascata de sinalização FcεRI. De importância ainda, tal como FcεRI, o FcγRI inclui um homodímero gama que é fosforilado e recruta Syk, e, tal como FcεRI, a ativação da cascata de sinalização FcγRI conduz, entre outras coisas, à desgranulação. Outros recetores Fc que partilham o homodímero gama, e que podem ser regulados pelos compostos de 2,4-pirimidinadiazina ativos incluem, mas não estão limitados a, FcαRI e FcγRIII.

A capacidade dos compostos de 2,4-pirimidinadiazina da invenção para inibir cascatas de sinalização de recetores

Fc pode ser determinada ou confirmada de forma simples em ensaios *in vitro*. Ensaaios adequados para confirmar a inibição da desgranulação mediada por FcεRI são fornecidos na secção de Exemplos. Num ensaio típico, as células capazes de sofrer desgranulação mediada por FcεRI, tais como mastócitos e basófilos, são primeiramente cultivadas na presença de IL-4, fator de células estaminais (FCE), IL-6 e IgE, de modo a aumentar a expressão de FcεRI, expostas a um composto teste de 2,4-pirimidinadiamina da invenção e estimuladas com anticorpos anti-IgE (ou, em alternativa, com um alergénio específico de IgE). Após a incubação, a quantidade de um mediador químico ou outro agente químico libertado e/ou sintetizado como consequência da ativação da cascata de sinalização FcεRI, pode ser quantificada utilizando técnicas padrão e comparada com a quantidade do mediador ou agente libertado a partir de células de controlo (isto é, células que são estimuladas, mas que não são expostas ao composto de teste). A concentração do composto de teste que produz uma redução de 50% da quantidade do mediador ou agente medido em comparação com células de controlo é a IC₅₀ do composto de teste. A origem dos mastócitos ou basófilos utilizados no ensaio irá depender, em parte, da utilização pretendida para os compostos e irá ser evidente para os peritos na técnica. Por exemplo, se os compostos serão utilizados em métodos os quais tratam ou previnem uma doença em particular em humanos, uma fonte conveniente de mastócitos ou basófilos é um humano ou outro animal que constitua um modelo clínico reconhecido ou conhecido para a doença em particular. Deste modo, dependendo da aplicação em particular, os mastócitos ou basófilos podem ser derivados de uma grande variedade de fontes animais, variando de, por exemplo, mamíferos inferiores, tais como ratinhos e ratos, de cães, ovelhas e outros mamíferos normalmente utilizados em testes clínicos, a mamíferos superiores, tais como macacos, chimpanzés e

símios, aos seres humanos. Exemplos específicos de células adequadas para a realização de ensaios *in vitro* incluem, mas não estão limitados a, células basófilas de roedores ou humanas, linhas celulares de basófilos de ratos com leucemia, mastócitos de rato primários (tais como os mastócitos de rato derivados da medula óssea "BMMC") e mastócitos humanos primários isolados de sangue do cordão umbilical ("CHMC") ou outros tecidos, tais como pulmão. Os métodos para o isolamento e cultura destes tipos de células são bem conhecidos ou são fornecidos na secção de Exemplos (ver, por exemplo, Demo *et al*, 1999, *Cytometry* 36(4):340-348 e pedido de patente co-pendente N.º de Série 10/053,355, registado em Novembro 8, 2001, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência). Naturalmente, também podem ser utilizados outros tipos de células do sistema imunológico que desgranulem após ativação da cascata de sinalização FcεRI, incluindo, por exemplo, eosinófilos.

Tal como será reconhecido pelos peritos na técnica, o mediador ou agente quantificado não é crítico. O único requisito é que seja um mediador ou agente libertado e/ou sintetizado como consequência de se iniciar ou ativar a cascata de sinalização do recetor de Fc. Por exemplo, em referência à FIG. 1, a ativação da cascata de sinalização de FcεRI em mastócitos e/ou basófilos leva a inúmeros eventos a jusante. Por exemplo, a ativação da cascata de sinalização de FcεRI conduz à libertação imediata (isto é, dentro de 1-3 min, seguida da ativação do recetor) de uma variedade de mediadores químicos pré-formados e agentes através da via de desgranulação. Deste modo, numa forma de realização, o mediador ou agente quantificado pode ser específico de grânulos (isto é, presente em grânulos, mas não no citoplasma celular em geral). Exemplos de mediadores ou agentes específicos de grânulos que podem ser

quantificados para determinar e/ou confirmar a atividade de um composto de 2,4-pirimidinadiazina da invenção incluem, mas não estão limitados a, enzimas específicas de grânulos, tais como hexosaminidase e triptase e componentes específicos de grânulos, tais como histamina e serotonina. Ensaio para quantificar tais fatores são bem conhecidos e, em muitos casos, estão comercialmente disponíveis. Por exemplo, a libertação de triptase e/ou hexosaminidase pode ser quantificada por incubação das células com os substratos suscetíveis de serem clivados que apresentam fluorescência após clivagem e quantificação da quantidade de fluorescência produzida utilizando técnicas convencionais. Tais substratos fluorogênicos cliváveis estão comercialmente disponíveis. Por exemplo, o substrato fluorogênico Z-Gli-Pro-Arg-AMC (Z= benziloxycarbonilo; AMC= 7-amino-4-metilcumarina; BIOMOL Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA 19462, N.º de Catálogo P-142) e Z-Ala-Lis-Arg-AMC (Enzyme Systems Products, uma divisão da ICN Biomedicals, Inc., Livermore, CA 94550, N.º de Catálogo AMC-246) podem ser utilizados para quantificar a quantidade de triptase libertada. O substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma, St. Louis, MO, Catálogo #69585) pode ser utilizado para quantificar a quantidade de hexosaminidase libertada. A libertação de histamina pode ser quantificada utilizando um ensaio de imunoabsorção enzimática comercialmente disponível (ELISA), tal como o ensaio ELISA de histamina da Immunotech #IM2015 (Beckman-Coulter, Inc.). Os métodos específicos para quantificar a libertação de triptase, hexosaminidase e histamina são fornecidos na secção de Exemplos. Qualquer um destes ensaios pode ser utilizado para determinar ou confirmar a atividade dos compostos de 2,4-pirimidinadiazina da invenção.

Em referência novamente à FIG. 1, desgranulação é apenas uma das várias respostas iniciadas pela cascata de sinalização FcεRI. Em adição, a ativação desta via de sinalização conduz à síntese *de novo* e à libertação de citocinas e quimocinas, tais como IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α, IL-13 e MIP1-α), e à libertação de mediadores lipídicos, tais como leucotrienos (por exemplo, LTC4), fator ativador de plaquetas (FAP) e prostaglandinas. Por conseguinte, os compostos de 2,4-pirimidinadiamina da invenção podem também ser avaliados para a atividade por quantificação da quantidade de um ou mais destes mediadores libertados e/ou sintetizados por células ativadas.

Ao contrário dos componentes específicos de grânulos discutidos acima, estes mediadores de "fase tardia" não são libertados imediatamente a seguir à ativação da cascata de sinalização FcεRI. Por conseguinte, ao quantificar estes mediadores de fase tardia, deve ser tomado cuidado de modo a assegurar que a cultura de células ativadas é incubada durante um tempo suficiente para resultar na síntese (se necessário) e libertação do mediador a ser quantificado. Em geral, FAP e mediadores lipídicos tais como o leucotrieno C4 são libertados 3-30 minutos após a ativação de FcεRI. As citocinas e outros mediadores de fase tardia são libertadas aproximadamente 4-8 horas após a ativação de FcεRI. Os tempos de incubação adequados para um mediador específico serão evidentes para os peritos na técnica. Orientações e ensaios específicos são fornecidos na secção de Exemplos.

A quantidade libertada de um mediador de fase tardia em particular pode ser quantificada utilizando qualquer técnica padrão. Numa forma de realização, a(s) quantidade(s) pode(m) ser quantificada(s) utilizando ensaios ELISA. Kits de ELISA adequados para a quantificação da quantidade libertada de TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6 e/ou IL-

13 estão disponíveis a partir de, por exemplo, Biosource International, Inc., Camarillo, CA 93012 (ver, por exemplo, Catálogo N.º KHC3011, KHC0042, KHC0052, KHC0061 e KHC0132). Kits de ensaios de ELISA adequados para quantificar a quantidade de leucotrieno C4 (LTC4) libertada pelas células estão disponíveis a partir de Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI 48108 (ver, por exemplo, Catálogo N.º 520211).

Tipicamente, compostos de 2,4-pirimidinadiazina ativos da invenção irão exibir IC_{50} s relativamente à desgranulação mediada por FcεRI e/ou à libertação ou síntese de mediador de cerca de 20 μ M ou inferior, conforme medido num ensaio *in vitro*, tal como num dos ensaios *in vitro* descritos acima ou na secção de Exemplos. Claro que os peritos na técnica compreenderão que os compostos que exibem IC_{50} s mais baixos, por exemplo na ordem dos 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, ou mesmo inferiores, são particularmente úteis.

Os especialistas na técnica também compreenderão que os vários mediadores discutidos acima podem induzir diferentes efeitos adversos ou exibir diferentes potências relativamente ao mesmo efeito adverso. Por exemplo, o mediador lipídico LTC4 é um vasoconstritor potente - é aproximadamente 1000 vezes mais potente na indução da vasoconstrição do que a histamina. Como outro exemplo, para além de mediar reações atópicas ou de hipersensibilidade do tipo I, as citocinas podem também causar remodelação de tecidos e proliferação celular. Deste modo, embora os compostos que inibem a libertação e/ou síntese de qualquer dos mediadores químicos anteriormente discutidos sejam úteis, os especialistas na técnica apreciarão que os compostos que inibem a libertação e/ou síntese de uma pluralidade de, ou mesmo de todos, os mediadores previamente descritos, encontram utilização especial, uma vez que tais compostos são úteis para melhorar ou evitar de

todo uma pluralidade de, ou mesmo todos, efeitos adversos induzidos pelos mediadores particulares. Por exemplo, os compostos que inibem a libertação de todos os três tipos de mediadores - específicos de grânulos, de lípidos e de citocinas - são úteis para o tratamento ou prevenção de reações imediatas de hipersensibilidade tipo I, bem como os sintomas crônicos associados às mesmas.

Os compostos da invenção capazes de inibir a libertação de mais do que um tipo de mediador (por exemplo, específico de grânulos ou de fase tardia) podem ser identificados através da determinação do IC_{50} em relação a um mediador representativo de cada classe, usando os vários ensaios *in vitro* acima descritos (ou outros ensaios *in vitro* equivalentes). Os compostos da invenção que são capazes de inibir a libertação de mais do que um tipo de mediador irão, tipicamente, apresentar um valor de IC_{50} para cada tipo de mediador testado menor do que cerca de 20 μM . Por exemplo, um composto que exibe um valor de IC_{50} de 1 μM em relação à libertação de histamina ($IC_{50}^{histamine}$) e um valor de IC_{50} de 1 nM em relação à síntese e/ou libertação de leucotrieno LTC₄ (IC_{50}^{LTC4}) inibe tanto a libertação de mediadores imediata (específica de grânulos) como também de fase tardia. Como outro exemplo específico, um composto que exibe um valor $IC_{50}^{triptase}$ de 10 μM , um valor de IC_{50}^{LTC4} de 1 μM e um valor de IC_{50}^{IL-4} de 1 μM inibe a libertação imediata (específica de grânulo) de mediadores lipídicos e e citocinas. Embora os exemplos específicos acima utilizem os valores IC_{50} s de um mediador representativo de cada classe, os especialistas da técnica compreenderão que os IC_{50} s de uma pluralidade, ou mesmo de todos, os mediadores compreendendo uma ou mais das classes podem ser obtidos. A(s) quantidade(s) e identidade(s) de mediadores para os quais os valores de IC_{50} devem ser determinados para um

composto e aplicação em particular serão evidentes para aqueles peritos na técnica.

Ensaio semelhante podem ser utilizados para confirmar a inibição da cascata de transdução de sinal iniciada por outros recetores de Fc, tais como a sinalização de Fc α RI, Fc γ RI e/ou Fc γ RIII, com modificação do procedimento. Por exemplo, a capacidade dos compostos para inibir a transdução de sinal de Fc γ RI pode ser confirmada em ensaios semelhantes aos descritos acima, com a exceção de que a cascata de sinalização de Fc γ RI é ativada, por exemplo, através da incubação das células com uma IgG e um alérgeno ou anticorpo específicos para a IgG, em vez de IgE e alérgeno ou anticorpo específicos para a IgE. Tipos de células, agentes de ativação e agentes para quantificar adequados para confirmar a inibição de outros recetores Fc, tais como recetores Fc que compreendem um homodímero gama, serão evidentes para aqueles peritos na técnica.

Uma classe particularmente útil de compostos inclui aqueles compostos de 2,4-pirimidinadiazina que inibem a libertação de mediadores imediatos específicos de grânulos e mediadores de fase tardia com valores IC₅₀ aproximadamente equivalentes. Por aproximadamente equivalente entende-se que os valores IC₅₀s para cada tipo de mediador estão dentro de um intervalo aproximadamente 10 vezes um do outro. Outra classe particularmente útil de compostos inclui aqueles compostos de 2,4-pirimidinadiazina que inibem a libertação de mediadores imediatos específicos do grânulo, mediadores lipídicos e mediadores de citocinas com IC₅₀s aproximadamente equivalentes. Numa forma de realização específica, tais compostos inibem a libertação dos seguintes mediadores com IC₅₀s aproximadamente equivalentes: histamina, triptase, hexosaminidase, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF α e LTC₄. Tais compostos são

particularmente úteis para, entre outras coisas, melhorar ou evitar inteiramente tanto as respostas de fase inicial como de fase tardia associadas a reações de hipersensibilidade atópica ou imediata de tipo I.

Idealmente, a capacidade para inibir a libertação de todos os tipos desejados de mediadores reside num único composto. No entanto, misturas de compostos que atingem o mesmo resultado podem também ser identificadas. Por exemplo, um primeiro composto que inibe a libertação de mediadores específicos de grânulos pode ser usado em combinação com um segundo composto que inibe a libertação e/ou síntese de mediadores de citocinas.

Em adição às vias de desgranulação de FcεRI ou FcγRI discutidas acima, a desgranulação de mastócitos e/ou basófilos pode ser induzida por outros agentes. Por exemplo, a ionomicina, um ionóforo de cálcio que evita a maquinaria inicial de transdução de sinal de FcεRI ou FcγRI da célula, induz diretamente um fluxo de cálcio que provoca a desgranulação. Em referência novamente à FIG. 2, PLCγ ativado inicia vias que conduzem, entre outras coisas, à mobilização de iões de cálcio e à subsequente desgranulação. Tal como ilustrado, esta mobilização de Ca^{2+} é acionada numa fase tardia da via de transdução de sinal de FcεRI. Tal como mencionado acima, e como ilustrado na FIG. 3, a ionomicina induz, diretamente, a mobilização de Ca^{2+} e um fluxo de Ca^{2+} que conduz à desgranulação. Outros ionóforos que induzem a desgranulação deste modo incluem A23187. A capacidade dos ionóforos indutores de granulação, tais como a ionomicina, para ultrapassar as fases iniciais das cascatas de sinalização de FcεRI e/ou FcγRI pode ser utilizada como um verificador para identificar compostos ativos da invenção que exercem especificamente a sua atividade inibidora de desgranulação através do bloqueio ou

da inibição do início das cascatas de sinalização de FcεRI ou FcγRI, tal como discutido acima. Os compostos que inibem especificamente tal desgranulação inicial mediada por FcεRI ou FcγRI, inibem não só a desgranulação e a subsequente libertação rápida de histamina, triptase e outros conteúdos dos grânulos, como também inibem as vias de ativação pró-inflamatória que causam a libertação de TNF- α , IL-4, IL-13 e os mediadores lipídicos, tais como LTC₄. Deste modo, os compostos que inibem especificamente tal bloco de desgranulação inicial mediada por FcεRI e/ou FcγRI ou inibem não só reações atópicas agudas ou de hipersensibilidade do tipo I, mas também respostas tardias envolvendo múltiplos mediadores inflamatórios.

Os compostos da invenção que inibem especificamente a desgranulação precoce mediada por FcεRI e/ou FcγRI são aqueles compostos que inibem a desgranulação mediada por FcεRI e/ou FcγRI (por exemplo, têm um valor de IC₅₀ inferior a cerca de 20 μ M no que respeita à libertação de mediador ou componente específico de grânulo tal como medido num ensaio *in vitro* com células estimuladas com um agente de ligação IgE ou IgG) mas que não inibem significativamente a desgranulação induzida por ionóforo. Numa forma de realização, os compostos são considerados não inibirem significativamente a desgranulação induzida por ionóforo se exibirem um valor de IC₅₀ de desgranulação induzida por ionóforo superior do que cerca de 20 μ M, tal como medido num ensaio *in vitro*. É claro que, os compostos ativos que exibam valores ainda mais superiores de IC₅₀s de desgranulação induzida por ionóforo, ou que não inibem a desgranulação induzida por ionóforo de todo, são particularmente úteis. Numa outra forma de realização, os compostos são considerados não inibirem significativamente a desgranulação induzida por ionóforo se exibirem uma diferença superior a 10 vezes entre os seus valores de

IC₅₀s de desgranulação mediada por FcεRI e/ou FcγRI e desgranulação induzida por ionóforo, tal como medido num ensaio *in vitro*. Ensaio adequado para a determinação do valor de IC₅₀ de desgranulação induzida por ionóforo incluem qualquer um dos ensaios de desgranulação descritos anteriormente, com a modificação de que as células são estimuladas ou ativadas com um ionóforo de cálcio indutor de desgranulação, tal como ionomicina ou A23187 (A.G. Scientific, San Diego, CA), em vez de anticorpos anti-IgE ou alérgenos específicos de IgE. Ensaio específico para determinar a capacidade de um determinado composto de 2,4-pirimidinadiazina da invenção para inibir a desgranulação induzida por ionóforo são fornecidos na secção de Exemplos.

Tal como será reconhecido pelos peritos na técnica, os compostos que exibem um elevado grau de seletividade da desgranulação mediada por FcεRI encontram utilização especial, uma vez que tais compostos visam seletivamente a cascata de FcεRI e não interferem com outros mecanismos de desgranulação. De modo similar, os compostos que exibem um elevado grau de seletividade para a desgranulação mediada por FcγRI encontram utilização especial, uma vez que tais compostos visam seletivamente a cascata de FcγRI e não interferem com outros mecanismos de desgranulação. Os compostos que exibem um elevado grau de seletividade são geralmente seletivos 10 vezes ou mais para desgranulação mediada por FcεRI ou FcγRI do que desgranulação induzida por ionóforo, tal como desgranulação induzida por ionomicina.

Por conseguinte, a atividade dos compostos de 2,4-pirimidinadiazina da invenção também pode ser confirmada em ensaios bioquímicos ou celulares da atividade da Syk quinase. Em referência novamente à FIG. 2, na cascata de sinalização de FcεRI em mastócitos e/ou basófilos, a Syk

quinase fosforila LAT e PLC-gammal, o que conduz, entre outras coisas, a desgranulação. Qualquer destas atividades podem ser utilizadas para confirmar a atividade dos Compostos de 2,4-pirimidinadiamina da invenção. Numa forma de realização, a atividade é confirmada fazendo contactar uma Syk quinase isolada, ou um fragmento ativo dela derivado, com um composto de 2,4-pirimidinadiamina na presença de um substrato de Syk quinase (por exemplo, um péptido sintético ou uma proteína que é conhecida por ser fosforilada por Syk numa cascata de sinalização) e avaliando se a Syk quinase fosforilou o substrato. Em alternativa, o ensaio pode ser realizado com células que expressam uma Syk quinase. As células podem expressar a Syk quinase endogenamente ou podem ser manipuladas de modo a expressar uma Syk quinase recombinante. As células poderão ainda, opcionalmente, expressar o substrato da Syk quinase. Células adequadas para a realização de tais ensaios de confirmação, bem como métodos de manipulação de células adequados serão evidentes para os peritos na técnica. Exemplos específicos de ensaios bioquímicos e celulares adequados para confirmar a atividade dos compostos de 2,4-pirimidinadiamina são fornecidos na secção de Exemplos.

Geralmente, os compostos que são inibidores da Syk quinase irão apresentar um valor de IC_{50} em relação à atividade de uma Syk quinase, tal como a capacidade da Syk quinase fosforilar um substrato sintético ou endógeno, num ensaio *in vitro* ou celular, no intervalo de cerca de 20 μM ou menos. Peritos na técnica irão apreciar que os compostos que exibem valores de IC_{50} s inferiores, tais como na gama de 10 μM , 1 μM , 100 nM, 10 nM, 1 nM, ou mesmo menores, são particularmente úteis.

6.5 Usos e Composições

Tal como discutido anteriormente, os compostos ativos da invenção inibem cascatas de sinalização de recetores Fc, em especial aqueles recetores de Fc incluindo um homodímero gama, tal como as cascatas de sinalização FcεRI e/ou FcγRI, que conduzem, entre outras coisas, à libertação e/ou síntese de mediadores químicos a partir das células, quer através da via de desgranulação ou de outros processos. Tal como também discutido, os compostos ativos são também inibidores potentes da Syk quinase. Como consequência destas atividades, os compostos ativos da invenção podem ser para uso numa variedade de contextos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* para regular ou inibir a Syk quinase, cascatas de sinalização em que a Syk quinase desempenha um papel, cascatas de sinalização de recetores Fc, e as respostas biológicas efetuadas por essas cascatas de sinalização. Por exemplo, numa forma de realização, os compostos podem ser para uso na inibição da Syk quinase, *in vitro* ou *in vivo*, em virtualmente qualquer tipo de célula que expresse a Syk quinase. Podem também ser para uso na regulação de cascatas de transdução de sinal nas quais a Syk quinase desempenha um papel. Tais cascatas de transdução do sinal dependentes de Syk incluem, mas não estão limitadas a, cascatas de transdução de sinal de FcεRI, FcγRI, FcγRIII, BCR e de integrinas. Os compostos também podem ser para uso *in vitro* ou *in vivo* para regular, e em particular para inibir, respostas celulares ou biológicas efetuadas por tais cascatas de transdução de sinal dependentes de Syk. Tais respostas celulares ou biológicas incluem, mas não estão limitadas a, burst oxidativo, adesão celular, desgranulação celular, espalhamento celular, migração celular, agregação celular, fagocitose, síntese e libertação de citocinas, maturação celular e fluxo de Ca^{2+} . Mais importante, os compostos podem ser para uso na inibição da Syk quinase *in vivo* como uma abordagem terapêutica para o tratamento ou

prevenção de doenças mediadas, no todo ou em parte, por uma atividade de Syk quinase. Exemplos não limitativos de doenças mediadas por Syk quinase, nos quais os compostos da invenção podem ser para uso no tratamento ou prevenção, são discutidos em mais detalhe, abaixo.

Numa outra forma de realização, os compostos ativos podem ser para uso na regulação ou inibição das cascatas de sinalização de recetores Fc e/ou desgranulação mediada por Fc ϵ RI e/ou Fc γ RI como uma abordagem terapêutica para o tratamento ou prevenção de doenças caracterizadas por, causadas por e/ou associadas à libertação ou síntese de mediadores químicos de tais cascatas de sinalização de recetores Fc ou de desgranulação. Tais tratamentos podem ser administrados a animais em contextos veterinários ou a seres humanos. Doenças que são caracterizadas por, causadas por ou associadas à libertação, síntese ou desgranulação de tais mediadores, e que os compostos da invenção podem ser para uso no tratamento ou prevenção incluem, a título de exemplo e não limitação, atopia ou hipersensibilidade anafilática ou reações alérgicas, alergias (por exemplo, conjuntivite alérgica, rinite alérgica, asma atópica, dermatite atópica e alergias alimentares), cicatrizes de baixo grau (por exemplo, escleroderma, fibrose aumentada, queloides, cicatrizes pós-cirúrgicas, fibrose pulmonar, espasmos vasculares, enxaqueca, lesão de reperfusão e síndrome de Dressler), doenças associadas com a destruição de tecido (por exemplo, DPOC, cardiobronquite e síndrome de Dressler), doenças associadas com a inflamação do tecido (por exemplo, síndrome do intestino irritável, cólon espástico e doença inflamatória do intestino), inflamação e formação de cicatrizes.

Para além das inúmeras doenças discutidas acima, dados empíricos celulares e animais confirmam que os compostos de

2,4-pirimidinadiamina aqui descritos também podem ser para uso no tratamento ou prevenção de doenças autoimunes, bem como dos vários sintomas associados a essas doenças. Os tipos de doenças autoimunes que os compostos da invenção podem ser para uso no tratamento ou prevenção, geralmente incluem aqueles distúrbios que envolvem lesão do tecido que ocorre como resultado de uma resposta humoral e/ou mediada pelas células a imunogénios ou antigénios de origem endógena e/ou exógena. Tais doenças são frequentemente referidas como doenças envolvendo as reações de hipersensibilidade não anafiláticas (isto é, Tipo II, Tipo III e/ou Tipo IV).

Tal como discutido anteriormente, reações de hipersensibilidade do tipo I resultam geralmente da libertação de substâncias farmacologicamente ativas, tais como a histamina, dos mastócitos e/ou basófilos após contato com um antigénio exógeno específico. Tal como mencionado acima, tais reações de tipo I desempenham um papel num número de doenças, incluindo a asma alérgica, rinite alérgica, etc.

As reações de hipersensibilidade do tipo II (também referidas como reações citotóxicas, citolíticas dependentes do complemento ou de hipersensibilidade estimuladas por células) acontecem quando imunoglobulinas reagem com componentes antigénicos de células ou tecidos, ou com um antigénio ou hapteno que se tornou intimamente associado a células ou tecidos. As doenças que são geralmente associadas a reações de hipersensibilidade do tipo II incluem, mas não estão limitadas a, anemia hemolítica autoimune, eritroblastose fetal e doença de Goodpasture.

As reações de hipersensibilidade do tipo III (também referidas como reações de hipersensibilidade do complexo

tóxico, complexo solúvel ou complexo imune) resultam da deposição de complexos circulantes solúveis antígeno-imunoglobulina em vasos ou tecidos, com acompanhamento de reações inflamatórias agudas no local da deposição do complexo imune. Exemplos não limitativos de doenças de reação do Tipo III prototípicas incluem a reação de Arthus, artrite reumatoide, doença do soro, lúpus eritematoso sistêmico, certos tipos de glomerulonefrite, esclerose múltipla e penfigoide bolhoso.

Reações de hipersensibilidade do Tipo IV (frequentemente denominadas de reações celulares, mediadas por células, retardadas, ou de hipersensibilidade do tipo tuberculina) são causadas por linfócitos T sensibilizados, os quais resultam do contato com um antígeno específico. Exemplos não limitativos de doenças citadas como envolvendo reações do Tipo IV são a dermatite de contacto e a rejeição de aloenxertos, incluindo, mas não se limitando a, transplante de coração.

Os compostos da invenção podem ser para uso no tratamento ou prevenção de doenças autoimunes associadas a qualquer uma das reações de hipersensibilidade não anafiláticas acima referidas. Em particular, os compostos da invenção podem ser para uso em métodos para tratar ou prevenir essas doenças autoimunes frequentemente caracterizadas como sendo do tipo de órgão único ou de célula única, incluindo, mas não limitado a: tiroidite de Hashimoto, anemia hemolítica autoimune, gastrite atrófica por anemia perniciosa autoimune, encefalomielite autoimune, orquite autoimune, doença de Goodpasture, trombocitopenia autoimune, oftalmia simpática, miastenia gravis, doença de Graves, cirrose biliar primária, hepatite crónica agressiva, colite ulcerosa e glomerulopatia membranosa, bem como aquelas doenças autoimunes frequentemente caracterizadas como

envolvendo distúrbio autoimune sistémico, que incluem mas não se limitam a: lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatoide, síndrome de Sjogren, síndrome de Reiter, polimiosite-dermatomiosite, esclerose sistémica, poliartrite nodosa, esclerose múltipla e penfigóide bolhoso.

Será apreciado por peritos na técnica que muitas das doenças autoimunes listadas acima estão associadas a sintomas graves, cuja melhoria proporciona um benefício terapêutico significativo, mesmo nos casos em que a doença autoimune subjacente pode não ser aliviada. Muitos destes sintomas, bem como os estados subjacentes da doença, resultam como consequência da ativação da cascata de sinalização FcγR em monócitos. Uma vez que os compostos de 2,4-pirimidinadiamina aqui descritos são inibidores potentes de tal sinalização FcγR em monócitos e outras células, estes podem ser para uso em métodos para tratamento e/ou prevenção de inúmeros sintomas adversos associados às doenças autoimunes acima mencionadas.

Como um exemplo específico, a artrite reumatoide (AR) resulta, geralmente, em inchaço, dor, perda de movimento e sensibilidade nas articulações alvo, em todo o corpo. A AR é caracterizada pelo sinóvio cronicamente inflamado, que é densamente povoado com linfócitos. A membrana sinovial, a qual tem tipicamente a espessura de uma camada de células, torna-se intensamente celular e assume uma forma semelhante à do tecido linfoide, incluindo células dendríticas, células T, B e NK, macrófagos e aglomerados de células plasmáticas. Este processo, bem como uma multiplicidade de mecanismos imunopatológicos incluindo a formação de complexos antigénio-imunoglobulina, eventualmente, pode resultar na destruição da integridade da articulação, resultando na deformação, perda permanente da função e/ou

erosão do osso na ou perto da articulação. Os compostos da invenção podem ser para uso em métodos quem tratam ou melhoram qualquer um, vários ou todos estes sintomas da AR. Deste modo, no contexto da AR, é considerado que os métodos proporcionam benefícios terapêuticos (discutido mais em geral, em baixo) quando uma redução ou melhoria de qualquer um dos sintomas habitualmente associados à AR é alcançada, independentemente de se o tratamento resulta num tratamento concomitante da AR subjacente e/ou numa redução da quantidade de fator reumatoide ("FR") em circulação.

Como outro exemplo específico, o lúpus eritematoso sistémico ("LES") é tipicamente associado a sintomas como febre, dor nas articulações (artralgias), artrite e serosite (pleurisia e pericardite). No contexto da LES, é considerado que os métodos proporcionam benefícios terapêuticos quando a redução ou melhoria de qualquer um dos sintomas normalmente associados com a LES são alcançados, independentemente de se o tratamento resulta no tratamento concomitante da LES subjacente.

Como outro exemplo específico, a esclerose múltipla ("EM") reduz a capacidade do paciente através da perturbação da acuidade visual; estimulando a visão dupla; perturbando as funções motoras que afetam a marcha e uso das mãos; produzindo incontinências no intestino e na bexiga; espasticidade; e défices sensoriais (tato, dor e sensibilidade à temperatura). No contexto da EM, é considerado que os métodos proporcionam benefícios terapêuticos quando uma melhoria ou a uma redução na progressão de um ou mais dos efeitos debilitantes comumente associados à EM é alcançada, independentemente de se o tratamento resulta num tratamento concomitante da EM subjacente.

Quando para uso no tratamento ou prevenção de tais doenças, os compostos ativos podem ser para administração isoladamente, como misturas de um ou mais compostos ativos ou em mistura ou combinação com outros agentes úteis para o tratamento de tais doenças e/ou os sintomas associados a essas doenças. Os compostos ativos também podem ser para administração em mistura ou em combinação com agentes úteis para tratar outras doenças ou enfermidades, tais como esteroides, estabilizadores de membrana, inibidores de 5LO, inibidores da síntese e do recetor de leucotrienos, inibidores de troca de isótipo IgE ou de síntese de IgE, troca de isótipo de IgG ou de síntese de IgG, β -agonistas, inibidores de triptase, aspirina, inibidores da COX, metotrexato, drogas anti-TNF, retuxina, inibidores de PD4, inibidores de p38, inibidores de PDE4 e anti-histamínicos, para citar alguns. Os compostos ativos podem ser para administração *per se* na forma de pró-fármacos ou como composições farmacêuticas, compreendendo um composto ativo ou pró-fármaco.

As composições farmacêuticas compreendendo os compostos ativos da invenção (ou pró-fármacos deles derivados) podem ser fabricados por meio de processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, fabrico de drageias por levigação, emulsão, encapsulação, encurralamento ou liofilização. As composições podem ser formuladas de forma convencional, usando um ou mais transportadores fisiologicamente aceitáveis, diluentes, excipientes ou auxiliares, os quais facilitam o processamento dos compostos ativos em preparações que podem ser utilizadas farmacologicamente.

O composto ativo ou pró-fármaco pode ser formulado nas composições farmacêuticas por si só, ou sob a forma de um hidrato, solvato, N-óxido ou sal farmacologicamente

aceitável, tal como descrito anteriormente. Tipicamente, tais sais são mais solúveis em soluções aquosas do que os correspondentes ácidos e bases livres, mas sais com menor solubilidade do que os correspondentes ácidos e bases livres também podem ser formados.

As composições farmacêuticas da invenção podem assumir uma forma adequada para virtualmente qualquer modo de administração, incluindo, por exemplo, tópica, ocular, oral, bucal, sistêmica, nasal, injeção, transdérmica, retal, vaginal, etc, ou uma forma adequada para administração por inalação ou insuflação.

Para administração tópica, o(s) composto(s) ativo(s) ou pró-fármaco(s) pode(m) ser formulado(s) como soluções, géis, pomadas, cremes, suspensões, etc, tal como são bem conhecidos na técnica.

As formulações sistêmicas incluem aquelas concebidas para administração por injeção, por exemplo, injeção subcutânea, intravenosa, intramuscular, intratecal ou intraperitoneal, assim como aquelas concebidas para administração transdérmica, transmucosa oral ou pulmonária.

Preparações injetáveis úteis incluem suspensões estéreis, soluções ou emulsões do(s) composto(s) ativo(s) em veículos aquosos ou oleosos. As composições podem também conter agentes de formulação, tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou de dispersão. As formulações para injeção podem ser apresentadas em forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes multidoses, e podem conter conservantes adicionados.

Alternativamente, a formulação injetável pode ser fornecida na forma de pó para reconstituição com um veículo adequado

antes da utilização, incluindo, mas não limitado a, água estéril livre de pirogênio, tampão, solução de dextrose, etc. Para este fim, o(s) composto(s) ativo(s) pode(m) ser seco(s) por qualquer técnica conhecida da técnica, tal como a liofilização, e reconstituídos antes da utilização.

Para administração transmucosa, penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada são usados na formulação. Tais penetrantes são conhecidos na técnica.

Para administração oral, as composições farmacêuticas podem tomar a forma de, por exemplo, pastilhas, comprimidos ou cápsulas, preparados por meios convencionais com excipientes farmacologicamente aceitáveis, tais como agentes de ligação (por exemplo, amido de milho pré-gelatinizado, polivinilpirrolidona ou hidroxipropilmetilcelulose); enchimentos (por exemplo, lactose, celulose microcristalina ou hidrogenofosfato de cálcio), lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio, talco ou sílica); desintegrantes (por exemplo, amido de batata ou amido glicolato de sódio); ou agentes humidificantes (por exemplo, lauril sulfato de sódio). Os comprimidos podem ser revestidos por métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, açúcares, filmes ou revestimentos entéricos.

As preparações líquidas para administração oral podem tomar a forma de, por exemplo, elixires, soluções, xaropes ou suspensões, ou podem ser apresentadas como um produto seco para constituição com água ou outro veículo adequado antes da utilização. Tais preparações líquidas podem ser preparadas por meios convencionais com aditivos farmacologicamente aceitáveis, tais como agentes de suspensão (por exemplo, xarope de sorbitol, derivados de celulose ou gorduras comestíveis hidrogenadas); agentes

emulsionantes (por exemplo, lecitina ou acácia); veículos não aquosos (por exemplo, óleo de amêndoa, ésteres oleosos, álcool etílico, cremophoreTM ou óleos vegetais fracionados); e conservantes (por exemplo, metil- ou propil-p-hidroxibenzoatos ou ácido sórbico). As preparações podem também conter sais tampão, conservantes, aromatizantes, corantes e edulcorantes, quando apropriado.

As preparações para administração oral podem ser adequadamente formuladas para proporcionar uma libertação controlada do composto ativo ou pró-fármaco, tal como é bem conhecido.

Para administração bucal, as composições podem tomar a forma de comprimidos ou pastilhas formuladas de forma convencional.

Para administração retal e vaginal, o(s) composto(s) ativo(s) pode(m) ser formulado(s) como soluções (para enema de retenção), supositórios ou pomadas contendo bases de supositório convencionais, tais como manteiga de cacau ou outros glicéridos.

Para administração nasal ou administração por inalação ou insuflação, o(s) composto(s) ativo(s) ou pró-fármaco(s) pode(m) ser convenientemente libertado(s) sob a forma de um spray de aerossol a partir de embalagens pressurizadas ou de um nebulizador com a utilização de um propelente adequado, por exemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, fluorocarbonetos, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada proporcionando uma válvula para libertar uma quantidade doseada. As cápsulas e cartuchos para utilização num inalador ou insuflador (por exemplo,

cápsulas e cartuchos compreendidos por gelatina) podem ser formulados contendo uma mistura em pó do composto e uma base em pó adequada, tal como lactose ou amido.

Um exemplo específico de uma formulação de suspensão aquosa apropriada para administração nasal utilizando dispositivos para pulverização nasal comercialmente disponíveis inclui os seguintes ingredientes: composto ativo ou pró-fármaco (0,5-20 mg/ml); cloreto de benzalcônio (0,1-0,2 mg/mL); polissorbato 80 (TWEEN® 80; 0,5-5 mg/ml); carboximetilcelulose de sódio ou celulose microcristalina (1-15 mg/ml); feniletanol (1-4 mg/ml); e dextrose (20-50 mg/ml). O pH da suspensão final pode ser ajustado para variar desde cerca de pH5 a pH7, com um valor de pH típico de cerca de pH5,5.

Outro exemplo específico de uma suspensão aquosa adequada para administração dos compostos através de inalação, e em particular para tal administração de um composto da invenção, contém 1-20 mg/mL do composto ou pró-fármaco, 0,1-1% (v/v) de Polissorbato 80 (TWEEN®80), 50 mM de citrato e/ou 0,9% de cloreto de sódio.

Para administração ocular, o(s) composto(s) ativo(s) ou pró-fármaco(s) pode(m) ser formulado(s) como uma solução, emulsão, suspensão, etc, adequada para administração ao olho. Uma variedade de veículos adequados para a administração de compostos para o olho é conhecida na técnica. Exemplos não limitativos específicos são descritos na Patente dos EUA N.º 6,261,547; Patente dos EUA No.º 6,197,934; Patente dos EUA N.º 6,056,950; Patente dos EUA N.º 5,800,807; Patente dos EUA N.º 5,776,445; Patente dos EUA N.º 5,698,219; Patente dos EUA N.º 5,521,222; Patente dos EUA N.º 5,403,841; Patente dos EUA N.º 5,077,033;

Patente dos EUA N.º 4,882,150; e Patente dos EUA N.º 4,738,851.

Para libertação prolongada, o(s) composto(s) ativo(s) ou pró-fármaco(s) pode(m) ser formulado(s) como uma preparação de depósito para administração por implantação ou injeção intramuscular. O ingrediente ativo pode ser formulado com materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados (por exemplo, como uma emulsão num óleo aceitável) ou resinas de troca iônica, ou como derivados moderadamente solúveis, por exemplo, como um sal moderadamente solúvel. Alternativamente, podem ser utilizados sistemas de libertação transdérmicos, fabricados como um disco adesivo ou penso, o qual liberta lentamente o(s) composto(s) ativo(s) para a absorção percutânea. Para este fim, podem ser utilizados intensificadores de permeação de modo a facilitar a penetração transdérmica do(s) composto(s) ativo(s). Os adesivos transdérmicos adequados são descritos em, por exemplo, Patente dos EUA N.º 5,407,713; Patente dos EUA N.º 5,352,456; Patente dos EUA N.º 5,332,213; Patente dos EUA N.º 5,336,168; Patente dos EUA N.º 5,290,561; Patente dos EUA N.º 5,254,346; Patente dos EUA N.º 5,164,189; Patente dos EUA N.º 5,163,899; Patente dos EUA N.º 5,088,977; Patente dos EUA N.º 5,087,240; Patente dos EUA N.º 5,008,110; e Patente dos EUA N.º 4,921,475.

Em alternativa, podem ser empregues outros sistemas de libertação farmacêutica. Os lipossomas e as emulsões são exemplos bem conhecidos de veículos de libertação que podem ser utilizadas para administrar o(s) composto(s) ativo(s) ou pró-fármaco(s). Certos solventes orgânicos, tais como dimetilsulfóxido (DMSO) podem também ser empregues, embora habitualmente à custa de uma maior toxicidade.

As composições farmacêuticas podem, se desejado, ser apresentadas numa embalagem ou dispositivo dispensador que pode conter uma ou mais formas de dosagem unitárias contendo o(s) composto(s) ativo(s). A embalagem pode, por exemplo, compreender folha metálica ou plástica, tal como uma embalagem blister. A embalagem ou dispositivo dispensador pode ser acompanhado por instruções para administração.

6.6 Dosagens Eficazes

O(s) composto(s) ativo(s) da invenção ou pró-fármaco(s) deles derivados, ou composições do(s) mesmo(s), serão geralmente utilizados numa quantidade eficaz para atingir o resultado pretendido, por exemplo, numa quantidade eficaz para tratar ou prevenir a doença particular a ser tratada. O(s) composto(s) pode(m) ser administrado(s) terapêuticamente para conseguir benefício terapêutico ou profilaticamente para conseguir benefício profilático. Por benefício terapêutico entende-se erradicação ou melhoramento da doença subjacente a ser tratada e/ou erradicação ou melhoramento de um ou mais dos sintomas associados à doença subjacente, tal que o paciente relate uma melhoria na sensação ou condição, não obstante que o paciente possa ainda ser afetado com a doença subjacente. Por exemplo, a administração de um composto a um paciente que sofra de uma alergia proporciona benefício terapêutico, não só quando a resposta alérgica subjacente é erradicada ou melhorada, mas também quando o paciente relata uma diminuição na gravidade ou duração dos sintomas associados com a alergia na sequência de exposição ao alergénio. Como outro exemplo, o benefício terapêutico no contexto de asma inclui uma melhoria na respiração após o início de um ataque de asma, ou uma redução na frequência ou gravidade de episódios asmáticos. Benefício terapêutico também inclui

parar ou retardar a progressão da doença, independentemente de se obter melhoria.

Para a administração profilática, o composto pode ser administrado a um paciente em risco de desenvolver uma das doenças descritas anteriormente. Por exemplo, se for desconhecido se um paciente é alérgico a um medicamento em particular, o composto pode ser administrado antes da administração do fármaco para evitar ou atenuar a resposta alérgica ao fármaco. Alternativamente, a administração profilática pode ser utilizada para evitar o surgimento de sintomas num paciente diagnosticado com a doença subjacente. Por exemplo, um composto pode ser administrado a um doente com alergia antes da exposição prevista ao alergénio. Os compostos podem também ser administrados profilaticamente a indivíduos saudáveis que são repetidamente expostos a agentes conhecidos de uma das doenças acima descritas, de modo a prevenir o aparecimento da doença. Por exemplo, um composto pode ser administrado a um indivíduo saudável que é repetidamente exposto a um alergénio conhecido por induzir alergias, tais como látex, num esforço para impedir que o indivíduo desenvolva uma alergia. Alternativamente, um composto pode ser administrado a um paciente que sofre de asma antes de participar em atividades que desencadeiem ataques de asma, de modo a diminuir a gravidade de, ou evitar completamente, um episódio asmático.

A quantidade de composto administrada irá depender de uma variedade de fatores, incluindo, por exemplo, a indicação particular a ser tratada, o modo de administração, se o benefício desejado é profilático ou terapêutico, a gravidade da indicação a ser tratada e a idade e peso do paciente, a biodisponibilidade do composto ativo em

particular, etc. A determinação de uma dose eficaz está bem dentro das capacidades dos especialistas na técnica.

As dosagens eficazes podem ser inicialmente estimadas a partir de ensaios *in vitro*. Por exemplo, uma dosagem inicial para uso em animais pode ser formulada de modo a alcançar uma concentração do composto ativo em circulação no sangue ou soro que seja igual ou superior a um IC₅₀ do composto particular, tal como medido no ensaio *in vitro*, tal como o CHMC ou BMMC *in vitro* e outros ensaios *in vitro* descritos na secção de Exemplos. O cálculo as dosagens para alcançar tais concentrações em circulação no sangue ou soro, tendo em conta a biodisponibilidade do composto em particular, está bem dentro das capacidades dos peritos na técnica. Para orientação, o leitor é remetido para Fingl & Woodbury, "General Principles", In: *Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, Capítulo 1, pp. 1-46, a mais recente edição, Pagamonon Press, e as referências ali citadas.

As dosagens iniciais podem também ser estimadas a partir de dados *in vivo*, como modelos animais. Os modelos animais úteis para testar a eficácia de compostos para tratar ou prevenir várias doenças descritas acima são bem conhecidos na técnica. Modelos animais adequados de hipersensibilidade ou reações alérgicas são descritos em Foster, 1995, *Allergy* 50 (21Suppl):6-9, discussão 34-38 e Tumas *et al.*, 2001, *J. Allergy Clin. Immunol.* 107(6):1025-1033. Modelos animais adequados de rinite alérgica são descritos em Szelenyi *et al.*, 2000, *Arzneimittelforschung* 50(11):1037-42; Kawaguchi *et al.*, 1994, *Clin. Exp. Allergy* 24(3):238-244 e Sugimoto *et al.*, 2000, *Immunopharmacology* 48(1):1-7. Modelos animais adequados de conjuntivite alérgica encontram-se descritos em Carreras *et al.*, 1993, *Br. J. Ophthalmol.* 77(8):509-514;

Saiga *et al.*, 1992, *Ophthalmic Res.* 24(1):45-50; e Kunert *et al.*, 2001, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42(11):2483-2489. Modelos animais adequados de mastocitose sistêmica são descritos em O'Keefe *et al.*, 1987, *J. Vet. Intern. Med.* 1(2):75-80 e Bean-Knudsen *et al.*, 1989, *Vet. Pathol.* 26(1):90-92. Modelos animais adequados de síndrome de hiper IgE são descritos em Claman *et al.*, 1990, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 56(1):46-53. Modelos animais adequados de linfoma de células B são descritos em Hough *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 95:13853-13858 e Hakim *et al.*, 1996, *J. Immunol.* 157(12):5503-5511. Modelos animais adequados de distúrbios atópicos tais como dermatite atópica, eczema atópico e asma atópica são descritos em Chan *et al.*, 2001, *J. Invest. Dermatol.* 117(4):977-983 e Suto *et al.*, 1999, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 120(Suppl 1):70-75. Especialistas habituais podem rotineiramente adaptar tais informações para determinar dosagens adequadas para administração a seres humanos. Modelos animais adequados adicionais são descritos na secção de Exemplos.

As quantidades de dosagem serão tipicamente na gama de desde cerca de 0,0001 ou 0,001 ou 0,01 mg/kg/dia a cerca de 100 mg/kg/dia, mas podem ser superiores ou inferiores, dependendo, entre outros fatores, da atividade do composto, da sua biodisponibilidade, do modo de administração e de vários fatores discutidos acima. A quantidade de dosagem e o intervalo podem ser ajustados individualmente de modo a proporcionar níveis de plasma do(s) composto(s) que são suficientes para manter o efeito terapêutico ou profilático. Por exemplo, os compostos podem ser administrados uma vez por semana, várias vezes por semana (por exemplo, em dias alternados), uma vez por dia ou várias vezes por dia, dependendo, entre outras coisas, do modo de administração, da indicação específica a ser

tratada e do julgamento do médico que prescreve. Em casos de administração local ou de absorção seletiva, tal como a administração tópica local, a concentração local eficaz do(s) composto(s) ativo(s) não pode ser relacionada com a concentração plasmática. Os especialistas na técnica serão capazes de otimizar as dosagens locais eficazes sem experimentação indevida.

De preferência, o(s) composto(s) irá fornecer o benefício terapêutico ou profilático sem causar toxicidade substancial. A toxicidade do(s) composto(s) pode ser determinada utilizando procedimentos farmacêuticos padrão. A proporção de dose entre o efeito tóxico e o terapêutico (ou profilático) é o índice terapêutico. São preferidos o(s) compostos(s) que exibe(m) índices terapêuticos elevados.

Tendo a invenção sido descrita, os seguintes exemplos são oferecidos como forma de ilustração e não de limitação.

7. EXEMPLOS

7.1 Compostos de 2,4-pirimidinadiazina

Uma variedade de 4-pirimidinadiazinas N4-substituídas-N2-monosubstituídas foi preparada com base em procedimentos aqui descritos. Tais compostos são descritos na Tabela 1.

7.2 Os Compostos de 2,4-pirimidinadiazina da invenção inibem a desgranulação mediada pelo recetor FcεRI

A capacidade dos compostos de 2,4-pirimidinadiazina da invenção para inibir a desgranulação induzida por IgE foi demonstrada numa variedade de ensaios celulares com

mastócitos humanos em cultura (CHMC) e/ou células de ratinho derivadas da medula óssea (BMMC). A inibição da desgranulação foi medida a baixa e alta densidade celular através da quantificação da libertação de fatores específicos de grânulo como triptase, histamina e hexosaminidase. A inibição da libertação e/ou síntese de mediadores lipídicos foi avaliada através da medição da libertação de leucotrieno LTC₄ e a inibição da libertação e/ou síntese de citocinas foi monitorizada através da quantificação de TNF- α , IL-6 e IL-13. A triptase e hexosaminidase foram quantificadas utilizando substratos fluorogénicos, tal como descrito nos respetivos exemplos. A histamina, TNF- α , IL-6, IL-13 e LTC₄ foram quantificados utilizando os seguintes kits comerciais de ELISA: histamina (Immunotech #2015, Beckman Coulter), TNF α (Biosource #KHC3011), IL-6 (Biosource #KMC0061), IL-13 (Biosource #KHC0132) e LTC₄ (Cayman Chemical #520211). Os protocolos dos vários ensaios são apresentados em baixo.

7.2.1 Cultura de mastócitos e basófilos humanos

Mastócitos e basófilos humanos foram cultivados a partir de células progenitoras CD34-negativas, tal como descrito em baixo (ver também os métodos descritos no pedido de patente co-pendente dos EUA N.º de série 10/053,355, apresentado em 8 de novembro, 2001, cuja divulgação é aqui incorporada por referência).

7.2.1.1 Preparação do Meio Completo STEMPRO-34

Para preparar o meio completo STEMPRO-34 ("CM"), 250 mL de meio STEMPRO-34TM sem soro ("SFM"; GibcoBRL, N.º de catálogo 10640) foram adicionados a um balão de filtração. A isto foram adicionados 13 mL de Suplemento de Nutriente

STEMPRO-34 ("NS"; GibcoBRL, N.º de catálogo 10641) (preparado como descrito em mais detalhe, em baixo). O recipiente de NS foi enxaguado com aproximadamente 10 mL de SFM e essa lavagem adicionada ao frasco de filtração. Após a adição de 5 mL de L-glutamina (200 mM; Mediatech, N.º de catálogo MT 25-005-CI) e de 5 mL de 100X penicilina/estreptomicina ("pen-strep"; HyClone, N.º de catálogo SV30010), o volume foi trazido até 500 mL com SFM e a solução foi filtrada.

O aspeto mais variável na preparação do CM é o método pelo qual o NS é descongelado e misturado antes da adição ao SFM. O NS deve ser descongelado num banho de água a 37°C e girado, não centrifugado ou agitado, até que esteja completamente em solução. Enquanto é girado, tome nota se existem lipídios que ainda não estão em solução. Se lipídios estão presentes e o NS não tem uma aparência uniforme, volte a colocar no banho de água e repita o processo de girar até que a aparência seja uniforme. Por vezes este componente entra em solução imediatamente, por vezes depois de um par de ciclos a girar, e por vezes não entra de todo. Se depois de algumas horas, o NS ainda não estiver em solução, descarta-se e descongela-se uma unidade nova. NS que pareça não uniforme após o descongelamento não deve ser usado.

7.2.1.2 Expansão de células CD34+

Uma população inicial de células CD34-positivas (CD34+) com um número relativamente baixo de células ($1-5 \times 10^6$ células) foi expandida para um número relativamente grande de células progenitoras CD34-negativas (de cerca de $2-4 \times 10^9$ células) utilizando os meios de cultura e métodos descritos abaixo. As células CD34+ (de um único dador)

foram obtidas de Allcells (Berkeley, CA). Uma vez que existe uma certa variação na qualidade e no número de células CD34+ que a Allcells normalmente fornece, as células recém-entregues foram transferidas para um tubo cónico de 15 mL e ajustadas até 10 mL em CM antes da utilização.

No dia 0, uma contagem celular foi realizada sobre as células viáveis (brilhante em contraste de fase) e as células foram centrifugadas a 1200 rpm para sedimentar. As células foram ressuspensas a uma densidade de 275.000 células/mL com CM contendo 200 ng/mL de Fator de Células Estaminais humanas recombinante ("SCF"; Peprotech, N.º de catálogo 300-07) e 20 ng/mL de ligando de flt-3 humano (Peprotech, N.º de catálogo 300-19) ("meio CM/SCF/flt-3"). Por volta do dia 4 ou 5, a densidade da cultura foi verificada através da realização de uma contagem celular e a cultura foi diluída para uma densidade de 275.000 células/mL com meio CM/SCF/flt-3 fresco. Por volta do dia 7, a cultura foi transferida para um tubo estéril e uma contagem celular foi realizada. As células foram centrifugadas a 1200 rpm e ressuspensas a uma densidade de 275.000 células/mL com meio CM/SCF/flt-3 fresco.

Este ciclo foi repetido, a partir do dia 0, um total de 3-5 vezes ao longo do período de expansão.

Quando a cultura é grande e mantida em múltiplos frascos e é para ser ressuspensa, os conteúdos de todos os frascos são combinados num único recipiente antes da realização de uma contagem celular. Isto assegura que uma contagem celular precisa é conseguida, e proporciona um grau de uniformidade de tratamento de toda a população. Cada frasco é verificado separadamente para contaminação sob o

microscópio antes de se combinar de modo a evitar contaminação da população total.

Entre os dias 17-24, a cultura pode começar a entrar em declínio (ou seja, aproximadamente 5-10% do número total de células morre) e não conseguem expandir-se tão rapidamente quanto antes. As células são então monitorizadas numa base diária durante este tempo, uma vez que uma falha completa da cultura pode ocorrer em menos de 24 horas. Uma vez iniciado o declínio, as células são contadas, centrifugadas a 850 rpm durante 15 minutos e ressuspensas a uma densidade de 350.000 células/mL em meio CM/SCF/flt-3 de modo a induzir mais uma ou duas divisões a partir da cultura. As células são monitorizadas diariamente de modo a evitar falha da cultura.

Quando é evidente uma morte celular superior a 15% na cultura de células progenitoras e alguns detritos se encontram presentes na cultura, as células progenitoras CD34-negativas estão prontas para serem diferenciadas.

7.2.1.3 Diferenciação das células progenitoras CD34-negativas em mastócitos da mucosa

Uma segunda fase é realizada para converter as células progenitoras CD34-negativas expandidas em mastócitos da mucosa diferenciados. Estes mastócitos da mucosa humana cultivados ("CHMC") são derivados de células CD34+ isoladas a partir de sangue de cordão umbilical e tratadas de modo a formar uma população de células progenitoras CD34-negativas proliferativas, tal como descrito acima. De modo a produzir células progenitoras CD43-negativas, o ciclo de ressuspensão para a cultura foi igual ao descrito acima, com a exceção de que a cultura foi semeada a uma densidade

de 425.000 células/mL e que 15% de meio adicional foi adicionado cerca do dia quatro ou cinco sem realizar uma contagem de células. Para além disso, a composição de citocinas do meio foi modificada de tal modo que contenha SCF (200 ng/mL) e IL-6 recombinante humana (200 ng/mL; Peprotech, N.º de catálogo 200-06 reconstituída para 100 ug/mL em 10 mM de ácido acético estéril) ("meio CM/SCF/IL-6").

As fases I e II em conjunto abrangem cerca de 5 semanas. Algumas células mortas e detritos são evidentes na cultura durante as semanas 1-3 e há um período durante as semanas 2-5, durante o qual uma pequena percentagem da cultura já não está em suspensão, mas encontra-se em vez disso ligada à superfície do recipiente de cultura.

Tal como durante a Fase I, quando a cultura é para ser ressuspensa no dia sete de cada ciclo, os conteúdos de todos os frascos são combinados num único recipiente antes de se efetuar uma contagem celular de modo a assegurar uniformidade de toda a população. Cada frasco é verificado separadamente para contaminação sob o microscópio antes de se combinar para evitar a contaminação da população total.

Quando os frascos são combinados, aproximadamente 75% do volume é transferido para o recipiente comum, deixando para trás cerca de 10 mL no frasco. O frasco contendo o volume restante foi batido de forma brusca, e lateralmente, de modo a destacar as células ligadas. O batimento foi repetido em um ângulo reto, com o primeiro batimento a destacar completamente as células.

O frasco foi inclinado a um ângulo de 45 graus por alguns minutos, antes de o volume restante ser transferido para o recipiente de contagem. As células foram centrifugadas a

950 rpm durante 15 minutos antes de semear a 35-50 mL por frasco (com uma densidade de 425.000 células/mL).

7.2.1.4 Diferenciação das células progenitoras CD34-negativas em mastócitos do tipo de tecido conjuntivo

Uma população de células progenitoras CD34-negativas proliferativa é preparada como acima e tratada para formar um fenótipo triptase/quimase positivo (tecido conjuntivo). Os métodos são realizados tal como descrito acima para os mastócitos da mucosa, mas com a substituição de IL-4 por IL-6 no meio de cultura. As células obtidas são típicas de mastócitos do tecido conjuntivo.

7.2.1.5 Diferenciação das células progenitoras CD34-negativas em células basófilas

Uma população de células progenitoras CD34-negativas proliferativa é preparada tal como descrito na Secção 7.2.1.3 acima, e utilizada para formar uma população proliferativa de células basófilas. As células CD34-negativas são tratadas como se descreveu para os mastócitos da mucosa, mas com a substituição de IL-3 (a 20-50 ng/mL) por IL-6 no meio de cultura.

7.2.2 Ativação de IgE com Baixa Densidade Celular CHMC: Triptase e Ensaio LTC₄

De modo a duplicar placas de 96 poços com fundo em U (Costar 3799) adicionar 65 µl de diluições do composto ou amostras de controlo que tenham sido preparadas em MT [137 mM de NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM de CaCl₂, 1,0 mM de MgCl₂, 5,6 mM de Glucose, 20 mM de HEPES (pH 7,4), 0,1% de Albumina de Soro Bovino (Sigma A4503)] contendo 2% de MeOH

e 1% de DMSO. Sedimentar células CHMC (980 rpm, 10 min) e ressuspender em MT pré-aquecido. Adicionar 65 µl de células a cada placa com 96 poços. Dependendo da atividade de desgranulação para cada doador de CHMC em particular, carregar 1000-1500 células/poço. Misturar quatro vezes seguido por uma incubação de 1 hora a 37°C. Durante a incubação de 1 hora, preparar uma solução de anti-IgE 6X [IgE de coelho anti-humana (1 mg/ml, Bethyl Laboratories A80-109A) diluído 1:167 em tampão de MT]. Estimular as células através da adição de 25 µl de solução 6X anti-IgE às placas apropriadas. Adicionar 25 µl de MT aos poços de controlo não-estimulados. Misturar duas vezes após a adição do anti-IgE. Incubar a 37°C durante 30 minutos. Durante a incubação de 30 minutos, diluir a solução stock de 20 mM de substrato de triptase [(Z-Ala-Lys-Arg-AMC 2TFA; Enzyme System Products, #AMC-246)] 1:2000 em tampão do ensaio de triptase [0,1 M Hepes (pH 7,5), 10% p/v Glicerol, 10 µM Heparina (Sigma H-4898) 0,01% NaN₃]. Agitar as placas a 1000 rpm durante 10 minutos para sedimentar as células. Transferir 25 µl do sobrenadante para uma placa de 96 poços de fundo preto e adicionar 100 µl de solução de substrato de triptase recentemente diluída a cada poço. Incubar as placas à temperatura ambiente durante 30 min. Ler a densidade ótica das placas a 355nm/460nm num leitor de placas espectrofotométrico.

O leucotrieno C4 (LTC₄) também é quantificado usando um kit de ELISA em amostras de sobrenadante apropriadamente diluídas (determinado empiricamente para cada população de células do doador de modo que a medição da amostra caia dentro da curva padrão), seguindo as instruções do fornecedor.

7.2.3 Ativação de IgE com Elevada Densidade Celular de CHMC: Ensaios de Desgranulação (Tryptase, Histamina), Leucotrienos (LTC4) e Citocinas (TNF-alfa, IL-13)

Mastócitos humanos cultivados (CHMC) são sensibilizados durante 5 dias com IL-4 (20 ng/mL), SCF (200 ng/ml), IL-6 (200 ng/ml), e IgE Humana (CP 1035K da Cortx Biochem, 100-500 ng/ml dependendo da geração) em meio CM. Após a sensibilização, as células são contadas, sedimentadas (1000 rpm, 5-10 minutos) e ressuspensas a $1-2 \times 10^6$ células/ml em tampão de MT. Adicionar 100 µl de suspensão celular a cada poço e 100 µl de diluições do composto. A concentração final do veículo é de 0,5% de DMSO. Incubar a 37°C (5% CO₂) durante 1 hora. Depois de 1 hora de tratamento com composto, estimular as células com 6X anti-IgE. Misturar poços com as células e deixar as placas a incubar a 37°C (5% CO₂) durante uma hora. Após 1 hora de incubação, sedimentar as células (10 minutos, 1000 RPM) e recolher 200 µl por poço de sobrenadante, tendo cuidado para não perturbar o sedimento. Colocar a placa de sobrenadante sobre gelo. Durante a etapa de 7 horas (ver a seguir) realizar o ensaio de triptase no sobrenadante que foi diluído 1:500. Ressuspender o sedimento celular em 240 µl de meio CM contendo 0,5% de DMSO e a concentração correspondente de composto. Incubar as células CHMC durante 7 horas a 37°C (5% CO₂). Após a incubação, sedimentar as células (1000 RPM, 10 minutos) e recolher 225 µl por poço e colocar a -80°C até que esteja pronto para realizar ELISAS. ELISAS são realizadas em amostras diluídas apropriadamente (determinado empiricamente para cada população de células do doador, de modo a que a medição da amostra caia dentro da curva padrão), seguindo as instruções do fornecedor.

7.2.4 Resultados

Os resultados dos ensaios de baixa densidade de CHMC são fornecidos na Tabela 1. Na Tabela 1, todos os valores reportados são IC_{50} s (em μM). A maioria dos compostos testados apresentavam IC_{50} s inferiores a 10 μM , com muitos exibindo IC_{50} s na gama sub-micromolar. Na Tabela 1, todos os valores relatados são IC_{50} s (em μM). Um valor de "-" indica um valor de $IC_{50} > 10 \mu M$, sem nenhuma atividade mensurável na concentração 10 μM . A maioria dos compostos testados tinha IC_{50} s menores do que 10 μM , com muitos exibindo IC_{50} s na gama sub-micromolar. Um valor de "+" indica um valor de $IC_{50} < 10 \mu M$. Dos compostos testados, os valores BMMC são comparáveis aos observados para os resultados CHMC.

7.3 Os Compostos de 2,4-pirimidinadiazina da invenção inibem seletivamente a cascata do recetor IgE a montante

De modo a confirmar que muitos dos compostos de 2,4-pirimidinadiazina da invenção exercem a sua atividade inibidora através do bloqueio ou da inibição da cascata de transdução de sinal precoce do recetor IgE, vários dos compostos foram testados em ensaios celulares para a desgranulação induzida por ionomicina, tal como descrito abaixo.

7.3.1 Ativação da Ionomicina com Baixa Densidade Celular de CHMC: Ensaio de Triptase

Os ensaios para a desgranulação de mastócitos induzida por ionomicina foram realizados tal como descrito para os ensaios de ativação de IgE com baixa densidade celular (Secção 7.2.2, em cima), com a exceção de que durante a incubação de 1 hora, foi preparada uma solução de 6X

ionomicina [5 mM de ionomicina (Sigma I-0634) em MeOH (stock) diluído 1:416,7 em tampão de MT (2 μ M final)] e as células estimuladas através da adição de 25 μ l da solução de 6X de ionomicina às placas apropriadas.

7.3.2 Resultados

Os resultados dos ensaios de desgranulação induzida por ionomicina, reportados como valores de IC_{50} (em μ M) são fornecidos na Tabela 1. Dos compostos ativos testados (isto é, aqueles que inibem a desgranulação induzida por IgE), a vasta maioria não inibe a desgranulação induzida por ionomicina, confirmando que estes compostos ativos inibem seletivamente a cascata de transdução de sinal inicial (ou a montante) do recetor de IgE. Na Tabela 1, todos os valores reportados são IC_{50} s (em μ M). Um valor "-" indica um $IC_{50} > 10$ μ M, sem nenhuma atividade mensurável a uma concentração de 10 μ M. Um valor de "+" indica um $IC_{50} < 10$ μ M.

7.4 Os Compostos de 2,4-pirimidinadiazina inibem a Syk quinase em ensaios bioquímicos

Muitos dos Compostos de 2,4-pirimidinadiazina foram testados quanto à capacidade de inibirem a fosforilação catalisada pela Syk quinase de um substrato de péptido num ensaio bioquímico de polarização fluorescente com Syk quinase isolada. Nesta experiência, os compostos foram diluídos para 1% de DMSO em tampão de quinase (20 mM de HEPES, pH 7,4, 5 mM de $MgCl_2$, 2 mM $MnCl_2$, 1 mM DTT, 0,1 mg/mL de Globulina gama Bovina acetilada). O composto em 1% de DMSO (0,2% DMSO final) foi misturado com uma solução de ATP/substrato à temperatura ambiente. Syk quinase (Upstate, Lake Placid NY) foi adicionada a um volume de reação final

de 20 μL e a reação foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. As condições de reação finais da enzima eram 20 mM de HEPES, pH 7,4, 5 mM de MgCl_2 , 2 mM MnCl_2 , 1 mM DTT, 0,1 mg/mL de Globulina Gama Bovina acetilada, 0,125 ng de Syk, 4 μM de ATP, 2,5 μM de substrato de péptido (biotina-EQEDEPEGDYEEVLE-CONH₂, SynPep Corporation). EDTA (10 mM final)/anticorpo anti-fosfotirosina (1X final)/marcador fluorescente fosfopéptido (0,5X final) foi adicionado em tampão de FP Diluição de modo a parar a reação para um volume total de 40 μL de acordo com as instruções do fabricante (PanVera Corporation). A placa foi incubada durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. As placas foram lidas num leitor de placas de polarização de fluorescência Polarion (Tecan). Os dados foram convertidos em quantidade de fosfopéptido presente utilizando uma curva de calibração gerada pela competição com o fosfopéptido competidor fornecido no Kit de Ensaio de Tirosina Quinase, Green (PanVera Corporation).

Estes dados, apresentados na Tabela 1, demonstram que quase todos os compostos testados, inibem a fosforilação da Syk quinase com IC_{50} na gama sub-micromolar. Uma grande maioria dos compostos testados inibem a fosforilação da Syk quinase com IC_{50} s na gama micromolar. Na Tabela 1, todos os valores reportados são IC_{50} s (em μM). Um valor de "-" indica um $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$, sem nenhuma atividade mensurável na concentração 10 μM . Um valor de "+" indica um valor de $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$.

Número do composto	Nome do composto	Dados físicos	LD Triptase, CHMC, IgE, 3pt	LD Triptase, CHMC, IgE, 8pt	LD Triptase, CHMC, Iono, 3pt	Fp_syk, 11pt
269	N4-(2,2-Dimetil-1,1,3-trioxo-4H-benzotiazina-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	LCMS: tempo de ret 11,28 mínimo de pureza: 99 %; MS (m/e): 518 (MH ⁺)		+		+
292	N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-benzo[1,4]tiazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	LCMS: tempo de ret 11,86 mínimo de pureza: 99 %; MS (m/e): 486 (MH ⁺)		+		
543	N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-benzo[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-	LCMS: pureza: 98 %; MS (m/e): 470 (MH ⁺)	+	+		+

Número do composto	Nome do composto	Dados físicos	LD Triptase, CHMC, IgE, 3pt	LD Triptase, CHMC, IgE, 8pt	LD Triptase, CHMC, Iono, 3pt	Fp_syk, 11pt
	pirimidinadiazina					
549	N4-(4-Acetil-2,2-dimetil-3-oxo-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	LCMS: pureza: 97 %; MS (m/e): 513 (M ⁺)				
673	Sal de ácido benzenossulfônico N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	¹ H RMN (DMSO-d ₆): d 11,14 (s, 1H), 9,98 (s, 1H), 9,63 (s, 1H), 8,17 (d, J=3,9 Hz, 1H), 7,62-7,53 (m, 3H), 7,36-7,25 (m, 4H), 6,87 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 1,43 (s, 6H).	+	+		
674	Sal de ácido metanossulfônico N4-(2,2-Dimetil-3-	¹ H RMN (DMSO-d ₆): d 11,13 (s, 1H), 9,95 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,18 (d, J=3,9 Hz, 1H), 7,56 (d,	+	+		

Número do composto	Nome do composto	Dados físicos	LD Triptase, CHMC, IgE, 3pt	LD Triptase, CHMC, IgE, 8pt	LD Triptase, CHMC, Iono, 3pt	Fp_syk, 11pt
	oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	J=9,0 Hz, 1H), 7,31 (d, J=8,4 Hz, 1H), 6,88 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 2,33 (s, 3H), 1,43 (s, 6H).				
675	Sal de ácido p-toluenossulfônico N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	¹ H RMN (DMSO-d ₆): d 11,12 (s, 1H), 9,89 (s, 1H), 9,57 (s, 1H), 8,17 (d, J=3,9 Hz, 1H), 7,57 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,45 (d, J=7,8 Hz, 2H), 7,31 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,08 (d, J=7,8 Hz, 2H), 6,89 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 1,43 (s, 6H)	+	+		
676	Sal de ácido 4-hidroxibenzenossulfônico N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-	¹ H RMN (DMSO-d ₆): d 11,12 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 9,53 (s, 1H), 8,16 (d, J=4,2 Hz, 1H), 7,58 (d, J=8,1 Hz, 2H), 7,37 (d, J=8,1 Hz, 2H), 7,31 (d, J=8,7 Hz, 1H),	+	+		

Número do composto	Nome do composto	Dados físicos	LD Triptase, CHMC, IgE, 3pt	LD Triptase, CHMC, IgE, 8pt	LD Triptase, CHMC, Iono, 3pt	Fp_syk, 11pt
	il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	6,90 (s, 2H), 6,64 (d, J=8,7 Hz, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 1,43 (s, 6H).				
677	Sal de ácido 2,4,6-trimetilbenzenossulfônico N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	¹ H RMN (DMSO-d ₆): d 11,10 (s, 1H), 9,72 (s, 1H), 9,47 (s, 1H), 8,15 (d, J=4,2 Hz, 1H), 7,62-7,56 (m, 1H), 7,31 (d, J=8,1 Hz, 1H), 6,91 (s, 2H), 6,72 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 2,48 (s, 6H), 2,16 (s, 3H), 1,43 (s, 6H).	+			
678	Sal de ácido 0,5 piridina-3-sulfônico N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-	¹ H RMN (DMSO-d ₆): d 11,08 (s, 2H), 9,46 (s, 2H), 9,30 (s, 2H), 8,91 (s, 1H), 8,70 (d, J= 5,4 Hz, 1H), 8,37 (dd, J= 1,5 e 7,8 Hz, 1H), 8,13 (d, J= 3,6 Hz, 2H), 7,80-7,74 (m, 1H), 7,62 (d, J= 8,1 Hz, 2H), 7,31 (d, J= 8,1	+	+		

Número do composto	Nome do composto	Dados físicos	LD Triptase, CHMC, IgE, 3pt	LD Triptase, CHMC, IgE, 8pt	LD Triptase, CHMC, Iono, 3pt	Fp_syk, 11pt
	trimetoxifenil)- 2,4- pirimidinadiazina	Hz, 2H), 6,97 (s, 4H), 3,66 (s, 1).				
679	Sal de ácido p- etilbenzenossulfônico N4-(2,2-dimetil- 3-oxo-4H-5- pirid[1,4]oxazin-6- il)-5-fluor-N2- (3,4,5- trimetoxifenil)- 2,4- pirimidinadiazina	1H RMN (DMSO-d6): d 11,08 (s, 1H), 9,44 (s, 1H), 9,26 (s, 1H), 8,13 (d, J= 3,3 Hz, 1H), 7,63 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,47 (d, J= 8,1 Hz, 2H), 7,31 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 7,12 (d, J= 7,8 Hz, 2H), 6,97 (s, 2H), 3,65 (s, 6H), 3,59 (s, 3H), 2,57 (q, J= 7,8 Hz, 2H).	+	+		
680	Sal de ácido 0,5 1,2- etanodissulfônico N4-(2,2-dimetil-3- oxo-4H-5- pirid[1,4]oxazin-6- il)-5-fluor-N2- (3,4,5- trimetoxifenil)-	1H RMN (DMSO-d6): d 11,08 (s, 2H), 9,54 (s, 2H), 9,35 (s, 2H), 8,14 (d, J= 3,9 Hz, 2H), 7,60 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 7,31 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 6,95 (s, 4H), 3,66 (s, 12H), 3,60 (s, 6H), 2,62 (s, 4H), 1,43 (s, 12H).	+	+		

Número do composto	Nome do composto	Dados físicos	LD Triptase, CHMC, IgE, 3pt	LD Triptase, CHMC, IgE, 8pt	LD Triptase, CHMC, Iono, 3pt	Fp_syk, 11pt
	2,4- pirimidinadiazina					
681	Sal de ácido (1R)- 10-canforssulfônico N4-(2,2-dimetil-3- oxo-4H-5- pirid[1,4]oxazin-6- il)-5-fluor-N2- (3,4,5- trimetoxifenil)- 2,4- pirimidinadiazina	1H RMN (DMSO-d6): d 11,11 (s, 1H), 9,83 (s, 1H), 9,54 (s, 1H), 8,17 (d, J= 3,9 Hz, 1H), 7,57 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 7,30 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 6,99 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 2,86 (d, J= 14,7 Hz, 1H), 2,67 (t, J= 9,9 Hz, 1H), 2,38 (d, J= 14,7 Hz, 1H).	+	+		
682	Sal de ácido (1S)- 10-canforsulfônico N4-(2,2-dimetil-3- oxo-4H-5- pirid[1,4]oxazin-6- il)-5-fluor-N2- (3,4,5- trimetoxifenil)- 2,4- pirimidinadiazina	1H RMN (DMSO-d6): d 11,08 (s, 1H), 9,55 (s, 1H), 9,36 (s, 1H), 8,14 (d, J= 3,9 Hz, 1H), 7,60 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 7,31 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 6,94 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,60 (s, 3H), 2,85 (d, J= 14,7 Hz, 1H), 2,68 (t, J= 11,4 Hz, 1H), 2,36 (d, J= 14,7 Hz, 1H).	+	+		

Número do composto	Nome do composto	Dados físicos	LD Triptase, CHMC, IgE, 3pt	LD Triptase, CHMC, IgE, 8pt	LD Triptase, CHMC, Iono, 3pt	Fp_syk, 11pt
685	Sal de cloreto de hidrogênio N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	¹ H RMN (DMSO-d ₆): d 11,31 (s, 1H), 9,89 (s, 1H), 9,66 (s, 1H), 8,18 (d, J= 4,5 Hz, 1H), 7,55 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,30 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 6,89 (s, 2H), 3,65 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 1,43 (s, 6H).	+	+		
689	5-Fluor-N4-(3-oxo-2,2,4-trimetil-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	¹ H RMN (DMSO-d ₆): d 9,42 (s, 1H), 9,13 (s, 1H), 8,14 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,80 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,32 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,03 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,60 (s, 3H), 1,44 (s, 6H); LCMS: pureza: 97%; MS (m/e): 485 (MH ⁺).		+		
690	N4-(2,2-dimetil-4-carbometoximetil-3-oxo-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-	¹ H RMN (DMSO-d ₆): d 9,46 (s, 1H), 9,15 (s, 1H), 8,15 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,86 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 7,37 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 7,04 (s, 2H), 4,80 (s, 2H), 3,67		+		

Número do composto	Nome do composto	Dados físicos	LD Triptase, CHMC, IgE, 3pt	LD Triptase, CHMC, IgE, 8pt	LD Triptase, CHMC, Iono, 3pt	Fp_syk, 11pt
	(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	(s, 6H), 3,66 (s, 3H), 3,60 (s, 3H), 1,47 (s, 6H); LCMS: pureza: 96%; MS (m/e): 543 (MH ⁺).				
1007	N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	¹ H RMN (DMSO-d ₆): δ 11,14 (1H, s), 9,24 (1H, s), 9,19 (1H, s), 8,21 (1H, d, J=3,3 Hz), 7,76 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,41 (1H, d, J=8,7 Hz), 7,12 (2H, s), 3,75 (6H, s), 3,69 (3H, s), 1,52 (6H, s); pureza 96%; MS (m/e): 471 (MH ⁺)	+	+	-	+
1340	N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-N4-oxo-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina	LCMS: tempo de ret: 3,48 minutos (7 minutos método); pureza: 97,4%; MS (m/e): 487,3 (MH ⁺)	+	+		

7.5 Os compostos são eficazes para o tratamento da Autoimunidade

A eficácia *in vivo* de certos compostos de 2,4-pirimidinadiamina em relação às doenças autoimunes foi avaliada na reação de Arthus reversa passiva, um modelo agudo de lesão tecidual mediada por antígeno-anticorpo, e em vários modelos de autoimunidade e inflamação. Estes modelos são semelhantes, em que um anticorpo específico de um antígeno medeia doença inflamatória acionada pelo complexo imune (CI-acionada) e subsequente destruição dos tecidos. A deposição de IC em locais anatómicos específicos (sistema nervoso central (SNC) para encefalomielite autoimune experimental (EAE) e o sinóvio para artrite induzida por colagénio (AIC)) conduz à ativação de células que expressam FcγR FcεR de superfície, especialmente mastócitos, macrófagos e neutrófilos, o que resulta na libertação de citocinas, e na quimiotaxia de neutrófilos. A ativação da resposta inflamatória é responsável por respostas efetoras a jusante, incluindo edema, hemorragia, infiltração de neutrófilos, e libertação de mediadores pró-inflamatórios. As consequências de tais eventos acionados pelo CI são difíceis de identificar em doenças autoimunes; no entanto, diversos investigadores demonstraram que a inibição da via de sinalização de FcγR nestes modelos animais resultou numa redução significativa no surgimento e na gravidade da doença.

7.5.1 Os compostos são eficazes na reação de Arthus em ratinhos

A eficácia *in vivo* de composto 1007 para inibir a cascata inflamatória acionada pelo CI foi demonstrada num modelo de ratinho de Reação Arthus reversa passiva (reação RPA).

7.5.1.1 Modelo

Lesão inflamatória aguda do tecido mediada pelo complexo imune (CI) é implicada numa variedade de doenças autoimunes humanas, incluindo síndrome de vasculite, síndrome de soro, lúpus eritematoso sistémico (LES), artrite reumatoide, síndrome de Goodpasture, e glomerulonefrite. O modelo experimental clássico para a lesão do tecido mediada pelo CI é a reação de Arthus reversa passiva. O modelo de reação RPA é um método *in vivo* conveniente para estudar a inflamação localizada, induzida por CIs, sem os efeitos sistémicos. A injeção intradérmica de anticorpos (Abs) específicos para a ovalbumina de galinha (IgG de coelho anti-OVA), seguido por injeção intravenosa (IV) de antigénios (Ags), especificamente de albumina de ovo de galinha (ovalbumina, OVA), causa a deposição perivascular de CIs e a rápida resposta inflamatória caracterizada por edema, infiltração de neutrófilos e hemorragia nos locais de injeção. Aspetos do modelo de reação RPA em ratinho assemelham-se à resposta inflamatória de pacientes com artrite reumatoide, LES e glomerulonefrite.

7.5.1.2 Protocolo do Estudo

Neste sistema modelo, o composto de teste é administrado em vários períodos de tempo antes da administração de Abs e Ags. Uma solução de IgG de coelho anti-OVA (50 µg em 25 µl/ratinho) é injetada por via intradérmica, e imediatamente a seguir há uma injeção intravenosa de albumina de ovo de galinha (20 mg/kg do peso corporal) numa solução contendo 1% de corante azul de Evans. O grau de edema e hemorragia é medido na pele dorsal de ratinhos C57BL/6 utilizando o corante azul de Evan como um indicador

de danos tecidulares locais. IgG de coelho policlonal purificada é utilizada como um controlo.

O tempo de pré-tratamento, em que o composto teste é administrado antes do estímulo Ab/Ag, é de 0,5 horas, de acordo com as propriedades farmacocinéticas (PK) de cada composto individual. Quatro horas após a indução da reação de Arthus, os ratinhos são sacrificados e os tecidos são recolhidos para avaliação do edema. Este modelo de sistema permite-nos examinar rapidamente a atividade *in vivo* do composto.

7.5.1.3 Resultados

O composto testado foi administrado por via oral.

O composto 1007 mostrou a eficácia da inibição do edema por 89,4%, quando administrado a 1,0 mg/kg, 30 minutos antes do estímulo.

O composto 1007 apresentou 64,3%, 78,7%, 98,1% e 99,8% de inibição da formação de edema quando administrado em níveis de dose de 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg e 5 mg/kg e com um tempo de pré-tratamento de 30, respetivamente. Os resultados do composto testado estão resumidos na Tabela 2.

Resumo da Reação Cutânea Arthus reversa passiva (RPA) em ratinho							
				% de inibição para o veículo de controlo	Satélite: No momento do estímulo	Exposição = Tempo de pré-tratamento + 4 horas	Potência <i>in vitro</i> (CHMC IgE)
Nome do composto	Número do composto	Dosagem (mg/kg)	Tempo de pré-tratamento	Tamanho do edema ± EPM	Concentração plasmática ± EPM (ng/ml)	Concentração plasmática ± EPM (ng/ml)	

			(horas)				
1007		1	0,5	89,4 ± 2,2			
		3	0,5	86,3 ± 7,9			
		10	0,5	97,8 ± 1,1			
		30	0,5	88,2 ± 5,7			
1007		0,1	0,5	64,3 ± 11,2	24,4 ± 9,6	BLQ	
		0,5	0,5	78,7 ± 6,3	73,1 ± 14,5	BLQ	
		1	0,5	98,1 ± 0,8	90,0 ± 11,0	2,3 ± 0,9	
		5	0,5	99,8 ± 0,2	398,0 ± 30,2	19,8 ± 15,7	

Tabela 2

7.5.2 Os compostos são eficazes no modelo de ratinho de artrite induzida por anticorpo de colagénio

A eficácia *in vivo* de compostos relativamente a doenças autoimunes pode ser demonstrada num modelo de ratinho de artrite induzida por anticorpo de colagénio (CAIA).

7.5.2.1 Modelo

A artrite induzida por colagénio (CIA) em roedores é frequentemente usada como um dos modelos experimentais de lesão de tecidos mediada por CI. A administração de colagénio do tipo II em ratinhos ou ratos resulta numa reação imunitária que, caracteristicamente, envolve a destruição inflamatória da cartilagem e do osso das articulações distais com inchaço concomitante dos tecidos

circundantes. CIA é normalmente usada para avaliar os compostos que podem ser de uso potencial como fármacos para o tratamento da artrite reumatoide e de outras doenças inflamatórias crônicas.

Em anos recentes, surgiu uma nova técnica de modelação da CIA, em que os anticorpos anti-colagénio do tipo II são aplicados para induzir uma CIA mediada por anticorpos. As vantagens do método são: tempo curto para a indução da doença (a desenvolver dentro de 24-48 horas após uma injeção intravenosa (IV) de anticorpos); artrite é indtível tanto em estirpes de ratinhos suscetíveis a CIA como em estirpes resistentes a CIA; e o procedimento é ideal para uma triagem rápida de agentes terapêuticos anti-inflamatórios.

Uma mistura de anticorpos monoclonais indutores de artrite Arthrogen-CIA® (Chemicon International, Inc.) é administrada por via intravenosa a ratinhos Balb/c (2 mg/ratinho) no Dia 0. Quarenta e oito horas mais tarde, 100 µl de LPS (25 µg) são injetados intraperitonealmente. No dia 4, os dedos podem aparecer inchados. Ao Dia 5, uma ou duas patas (especialmente as patas traseiras) começam a aparecer vermelhas e inchadas. No Dia 6, e posteriormente, as patas vermelhas e inchadas irão permanecer durante, pelo menos, 1-2 semanas. Durante o estudo, os sinais clínicos de inflamação são pontuados de modo a avaliar a intensidade do edema nas patas. A gravidade da artrite é registrada como a soma de ambas as patas traseiras para cada animal (pontuação máxima possível de 8). O grau de inflamação das patas envolvidas é avaliada através da medição do diâmetro das patas. As mudanças de peso corporal são monitorizadas.

Os animais podem ser tratados no momento da indução da artrite, a começar no Dia 0. Os compostos de teste e os

compostos de controlo podem ser administrados uma vez por dia (q.d.) ou duas vezes por dia (b.i.d.), por via oral (PO), dependendo dos perfis PK previamente estabelecidos.

No final do estudo (1-2 semanas após a indução de artrite), os ratinhos são sacrificados e as patas são seccionadas na tíbia distal utilizando uma guilhotina e pesadas. A média \pm erro padrão da média (EPM) para cada grupo é determinada cada dia a partir de pontuações clínicas individuais dos animais, e os pesos da pata traseira para cada grupo experimental são calculados e registados no fim do estudo. A avaliação histopatológica das patas é obtida.

7.5.2.2 Resultados

Uma redução da inflamação e do inchaço deve ser evidente nos animais tratados com os compostos da invenção, e a artrite deverá progredir mais lentamente. O tratamento com compostos (b.i.d.) deve reduzir significativamente a artrite clínica em comparação com os animais tratados apenas com veículo.

7.5.3 Os compostos podem ser eficazes em artrite induzida por colagénio em ratos

A eficácia *in vivo* dos compostos da invenção em relação às doenças autoimunes pode ser demonstrada num modelo de rato de artrite induzida por colagénio (CIA).

7.5.3.1 Descrição do Modelo

A artrite reumatoide (AR) é caracterizada pela inflamação crónica das articulações, eventualmente conduzindo à destruição irreversível da cartilagem. CI contendo IgG são

abundantes no tecido sinovial de pacientes com AR. Enquanto é ainda debatido o papel que estes complexos desempenham na etiologia e patologia da doença, os CI comunicam com as células hematopoéticas via FcγR.

A CIA é um modelo amplamente aceite de RA que resulta em sinovite inflamatória crónica caracterizada pela formação de pannus e degradação da articulação. Neste modelo, a imunização intradérmica de colagénio tipo II nativo, emulsionado com adjuvante incompleto de Freund, resulta numa poliartrite inflamatória em 10 ou 11 dias e subsequente destruição da articulação em 3 a 4 semanas.

7.5.3.2 Protocolo do Estudo

Ratos LOU singénicos foram imunizados no Dia 0 com CII/IFA nativa de galinha (realizado na UCLA; E. Brahn, Investigador Principal). Começando no dia do início da artrite (Dia 10), um total de 59 ratinhos podem ser tratados com um veículo de controlo ou um composto da invenção num dos quatro níveis de dose (1, 3, 10, e 30 mg/kg, q.d. por gavagem p.o.).

7.5.3.3 Resultados

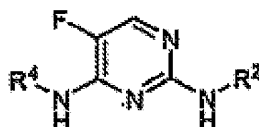
Membros posteriores seriam avaliados diariamente para a gravidade da artrite clínica usando um método normalizado baseado no grau de inflamação da articulação. Radiografias digitais de alta resolução de membros posteriores podem ser obtidas no final do estudo (Dia 28). Estes membros também podem ser analisados para alterações histopatológicas. Anticorpos IgG para o CII nativo podem ser medidos em quadruplicado por ELISA.

Embora a invenção anterior tenha sido descrita com algum detalhe para facilitar a compreensão, será aparente que certas alterações e modificações podem ser praticadas dentro do âmbito das reivindicações anexas. Deste modo, as formas de realização descritas são para ser consideradas como ilustrativas e não restritivas, e a invenção não é para ser limitada aos detalhes dados aqui, mas pode ser modificada dentro do âmbito e equivalentes das reivindicações anexas.

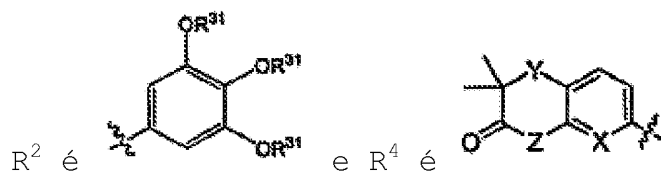
Lisboa, 18 de Junho de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto com a seguinte fórmula estrutural:



ou é um sal, hidrato, solvato ou N-óxido dele derivado, em que:



em que

X é selecionado de entre o grupo que consiste em N e CH;

Y é selecionado a partir do grupo consistindo de O, S, SO, SO₂, SONR³⁶, NH, NR³⁵;

Z é selecionado a partir do grupo consistindo de O, S, SO, SO₂, SONR³⁶, NH, NR³⁵;

cada R³¹ é independentemente um (C1-C6) alquilo;

cada R³⁵ é, independentemente dos outros, selecionado de entre o grupo constituído por hidrogénio e R⁸;

R⁸ é selecionado a partir do grupo consistindo de R^a, R^b, R^a substituído com um ou mais do mesmo ou diferente R^a ou R^b, -OR^a substituído com um ou mais do

mesmo ou diferente R^a ou R^b , $-B(OR^a)_2$, $-B(NR^{C^C})_2$, $-(CH_2)_m-R^b$, $-(CHR^a)_m-R^b$, $-O-(CH_2)_m-R^b$, $-S-(CH_2)_m-R^b$, $-O-CHR^aR^b$, $-O-CR^a(R^b)_2$, $-O-(CHR^a)_m-R^b$, $-O-(CH_2)_m-CH[(CH_2)_mR^b]R^b$, $-S-(CHR^a)_m-R^b$, $-C(O)NH-(CH_2)_m-R^b$, $-C(O)NH-(CHRa)_m-R^b$, $-O-(CH_2)_m-C(O)NH-(CH_2)_m-R^b$, $-S-(CH_2)_m-C(O)NH-(CH_2)_m-R^b$, $-O-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b$, $-S-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b$, $-NH-(CH_2)_m-R^b$, $-NH-(CHR^a)_m-R^b$, $-NH[(CH_2)_mR^b]$, $-N[(CH_2)_mR^b]_2$, $-NH-C(O)-NH-(CH_2)_m-R^b$, $-NH-C(O)-(CH_2)_m-CHR^bR^b$ e $-NH-(CH_2)_m-C(O)-NH-(CH_2)_m-R^b$;

cada R^a é selecionado independentemente a partir do grupo consistindo de hidrogénio, (C1-C6) alquilo, (C3-C8) cicloalquilo, ciclo-hexilo, (C4-C11) cicloalquilalquilo, (C5-C10) arilo, fenilo, (C6-C16) arilalquilo, benzilo, heteroalquilo com 2-6 membros, ciclo-heteroalquilo de 3-8 membros, morfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, piperidinilo, cicloheteroalquilalquilo de 4-11 membros, heteroarilo de 5-10 membros e heteroarilalquilo de 6-16 membros;

cada R^b é um grupo adequado selecionado independentemente do grupo que consiste em $=O$, $-OR^d$, (C1-C3) haloalquilóxi, $-OCF_3$, $=S$, $-SR^d$, $=NR^d$, $=NOR^d$, $-NR^{C^C}$, halogéneo, $-CF_3$, $-CN$, $-NC$, $-OCN$, $-SCN$, $-NO$, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, $-S(O)R^d$, $-S(O)_2R^d$, $-S(O)_2OR^d$, $-S(O)NR^{C^C}$, $-S(O)_2NR^{C^C}$, $-OS(O)R^d$, $-OS(O)_2R^d$, $-OS(O)_2OR^d$, $-OS(O)_2NR^{C^C}$, $-C(O)R^d$, $-C(O)OR^d$, $-C(O)NR^{C^C}$, $-C(NH)NR^{C^C}$, $-C(NR^a)NR^{C^C}$, $-C(NOH)R^a$, $-C(NOH)NR^{C^C}$, $-OC(O)R^d$, $-OC(O)OR^d$, $-OC(O)NR^{C^C}$, $-OC(NH)NR^{C^C}$, $-OC(NR^a)NR^{C^C}$, $-[NHC(O)]_nR^d$, $-[NR^aC(O)]_nR^d$, $-[NHC(O)]_nOR^d$, $-[NR^aC(O)]_nOR^d$, $-[NHC(O)]_nNR^{C^C}$, $-[NR^aC(O)]_nNR^{C^C}$, $-[NHC(NH)]_nNR^{C^C}$ e $-[NR^aC(NR^a)]_nNR^{C^C}$;

cada R^C é independentemente R^a ou, em alternativa, cada R^C é tomado em conjunto com o átomo de azoto a

que se encontra ligado para formar um ciclo-heteroalquilo ou heteroarilo de 5 a 8 membros, que pode, opcionalmente, incluir um ou mais dos mesmos ou diferentes heteroátomos adicionais e que pode opcionalmente ser substituído com um ou mais do mesmo ou de diferentes grupos R^a ou R^b adequados;

cada R^d é, independentemente R^a ;

cada m é independentemente um número inteiro de 1 até 3;

cada n é independentemente um número inteiro de 0 a 3;
e

R^{36} é selecionado independentemente do grupo consistindo de hidrogénio e (C1-C6) alquilo.

2. O composto da reivindicação 1, em que

R^2 é 3,4,5-trimetoxifenil.

3. O composto da reivindicação 2, em que Y é O, Z é NH, e X é N.

4. O composto da reivindicação 1, selecionado de:

N4-(2,2-Dimetil-1,1,3-trioxo-4H-benzo[1,4]tiazina-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina;

N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-benzo[1,4]tiazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina;

N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-benzo[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina;

N4-(4-Acetil-2,2-dimetil-3-oxo-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina;

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

N4-(2,2-Dimetil-4-carbometoximetil-3-oxo-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina;

ou sal, hidrato, solvato ou N-óxido deles derivados.

5. O sal do composto da reivindicação 1, em que o composto é:

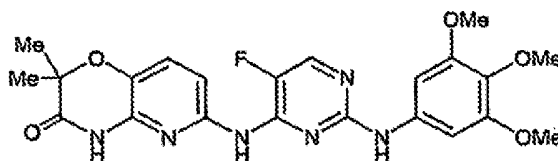
N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluor-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina, e em que o sal é selecionado de entre o grupo consistindo de: sal do ácido benzenossulfónico, sal do ácido metanosulfónico, sal do ácido p-tolueno sulfónico, sal do ácido hidroxibenzenossulfónico, sal do ácido trimetilbenzenossulfónico, sal do ácido hemipiridina-3-sulfónico, sal do ácido p-etilbenzenossulfónico, sal do ácido hemi-1,2-etanodisulfónico, sal do ácido (1R)-10-canforsulfónico, sal do ácido (1S)-10-canforsulfónico, e sal de cloreto de hidrogénio.

6. O composto da reivindicação 2, em que Y é O.

7. O composto da reivindicação 2, em que cada Z é NH.

8. O composto da reivindicação 2, em que X é N.

9. O composto da reivindicação 1, tendo a estrutura:



10. Um composto de acordo com a reivindicação 4 ou 9, o qual é um sal de adição de um ácido selecionado a partir de ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido iodídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiônico, ácido hexanóico, ácido ciclopentanopropiônico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malônico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido palmítico, ácido benzóico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil) benzóico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido 1,2-etano-dissulfônico, ácido 2-hidroxietanossulfônico, ácido benzenossulfônico, ácido 4-clorobenzenossulfônico, ácido 2-naftalenossulfônico, ácido 4-toluenossulfônico, ácido canforossulfônico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido gluco-heptônico, ácido 3-fenilpropiônico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciário, ácido lauril sulfúrico, ácido glucônico, ácido glutâmico, ácido hidroxinaftóico, salicílico, ácido esteárico e ácido mucônico.

11. Uma composição farmacêutica compreendendo um composto de qualquer uma das Reivindicações 1-10 e compreendendo ainda um transportador, diluente ou excipiente farmacologicamente aceitável.

12. Um composto tal como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10 para uso num método de tratamento do corpo humano ou animal através de terapia.
13. Um composto ou composição tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 para uso num método para tratamento ou prevenção de uma doença autoimune.
14. O composto ou composição da reivindicação 13, em que a doença autoimune é selecionada do grupo consistindo de rejeição de enxerto, tiroidite de Hashimoto, anemia hemolítica autoimune, gastrite atrófica por anemia perniciosa autoimune, encefalomielite autoimune, orquite autoimune, doença de Goodpasture, trombocitopenia autoimune, oftalmia simpática, miastenia gravis, doença de Graves, cirrose biliar primária, hepatite agressiva crónica, glomerulopatia membranosa e uma doença autoimune envolvendo um distúrbio autoimune sistémico.
15. O composto ou composição da reivindicação 14, em que a doença autoimune envolvendo um distúrbio autoimune sistémico é selecionada de um grupo consistindo de lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatoide, síndrome de Sjogren, síndrome de Reiter, polimiosite-dermatomiosite, esclerose sistémica, poliartrite nodosa, esclerose múltipla e penfigóide bolhoso.
16. O composto ou composição da reivindicação 13, em que a doença autoimune é rejeição de enxerto.

17. O composto ou composição da reivindicação 13, em que a doença autoimune é lúpus eritematoso sistémico.
18. O composto ou composição da reivindicação 13, em que a doença autoimune é artrite reumatoide.
19. O composto ou composição da reivindicação 13, em que a doença autoimune é esclerose múltipla.
20. Uso de um composto ou composição tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1-11 no fabrico de um medicamento eficaz no tratamento ou prevenção de uma doença autoimune.
21. Uso de um composto ou composição tal como reivindicado na reivindicação 20, em que a doença autoimune é tal como definido em qualquer uma das reivindicações de 14 a 19.

Lisboa, 18 de Junho de 2013

FIG. 1

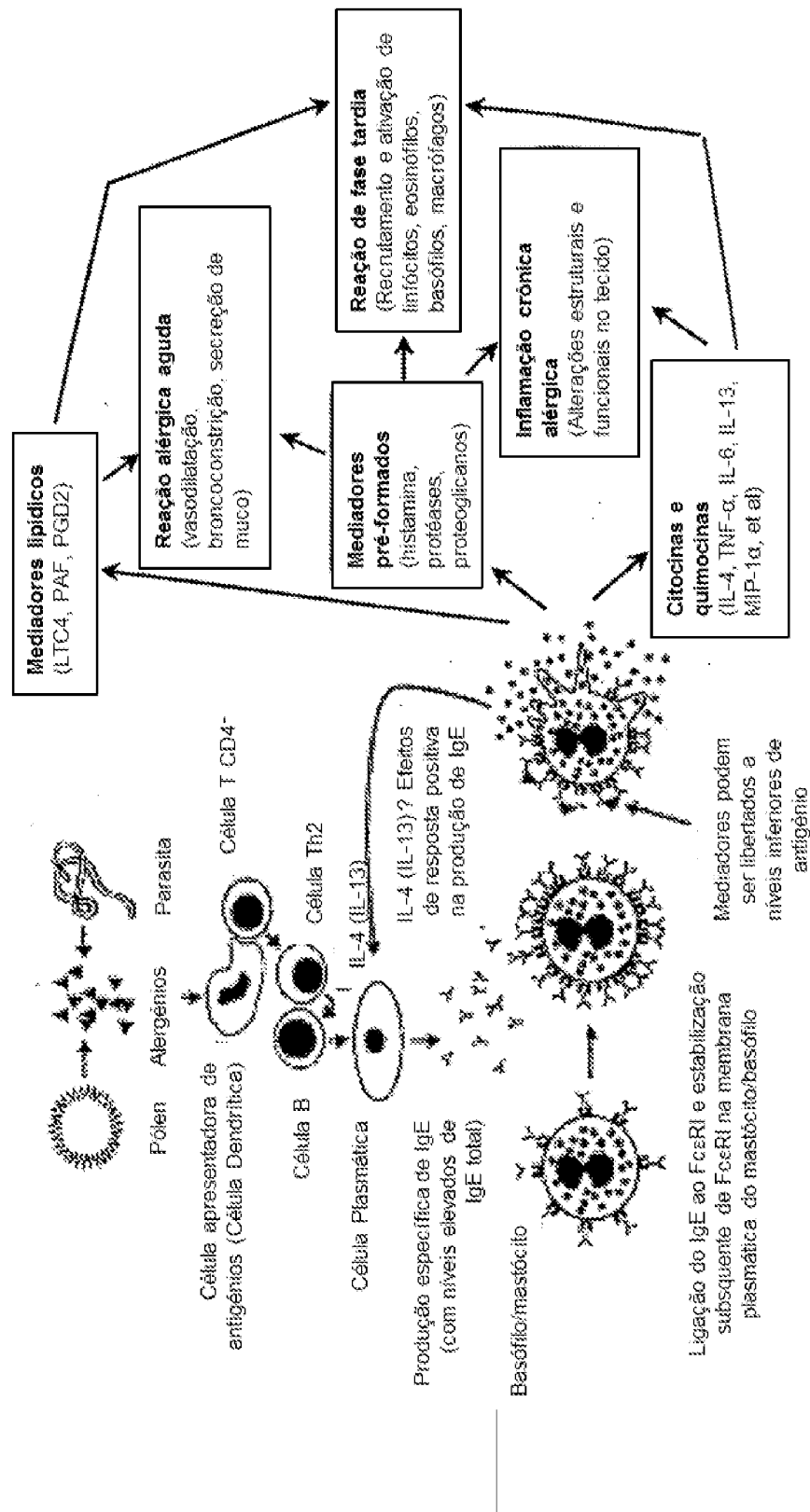


FIG. 2

Via de sinalização de FcεR1 mastócitos

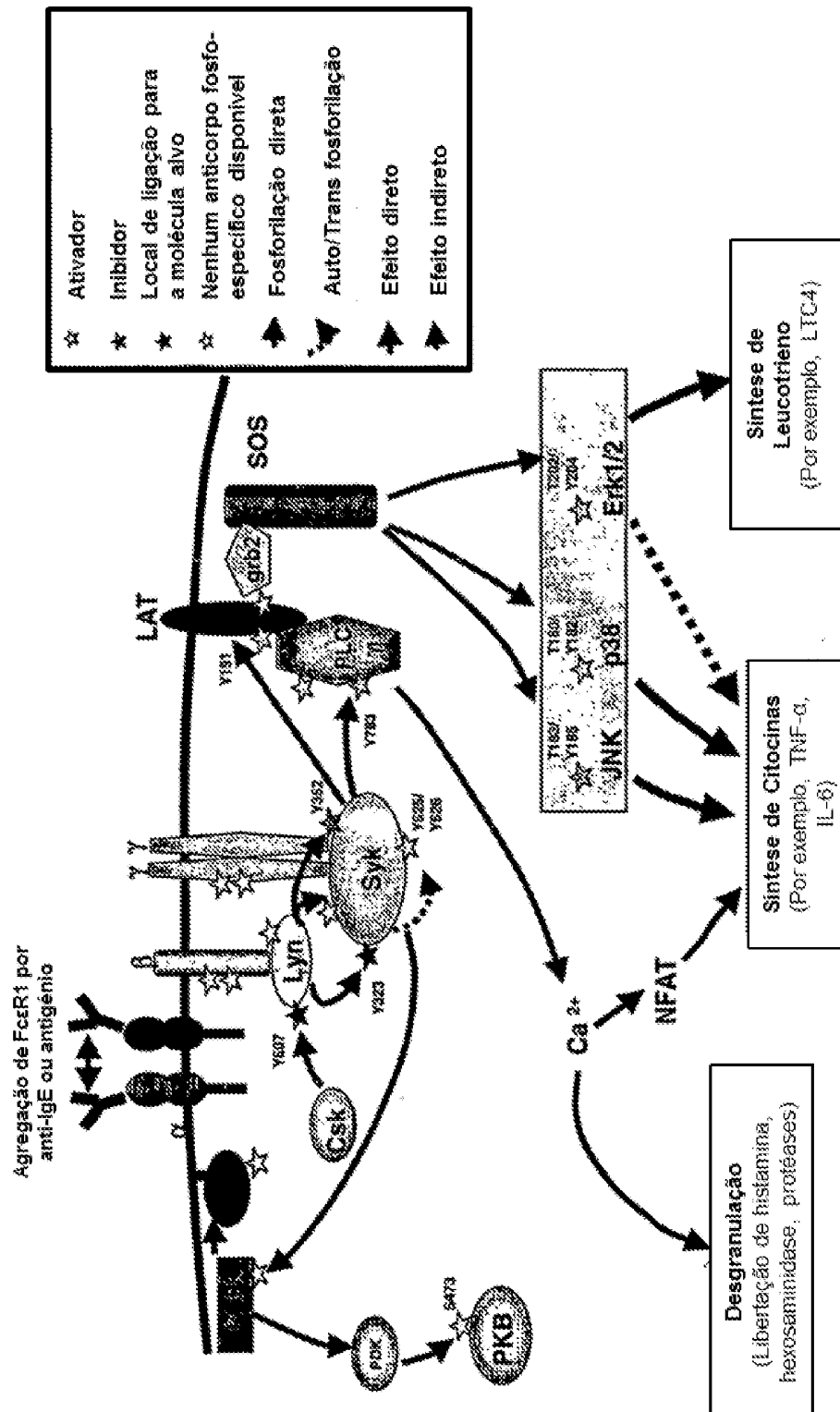


FIG. 3

