

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI0710076-0 A2

(22) Data de Depósito: 21/02/2007
(43) Data da Publicação: 02/08/2011
(RPI 2117)



(51) Int.Cl.:
C07D 233/54 2006.01
A61K 31/4164 2006.01
A61P 29/00 2006.01

(54) Título: **COMPOSTOS COM BASE EM IMIDAZOL, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO-OS E MÉTODOS DE SEU USO**

(30) Prioridade Unionista: 25/01/2007 US 11/698,253, 24/02/2006 US 60/776,473, 20/06/2006 US 60/815,221, 25/01/2007 US 11/698,253, 20/06/2006 US 60/815,221, 24/02/2006 US 60/776,473, 25/01/2007 US 11/698,253, 20/06/2006 US 60/815,221, 20/06/2006 US 60/815,221

(73) Titular(es): Lexicon Pharmaceuticals, Inc.

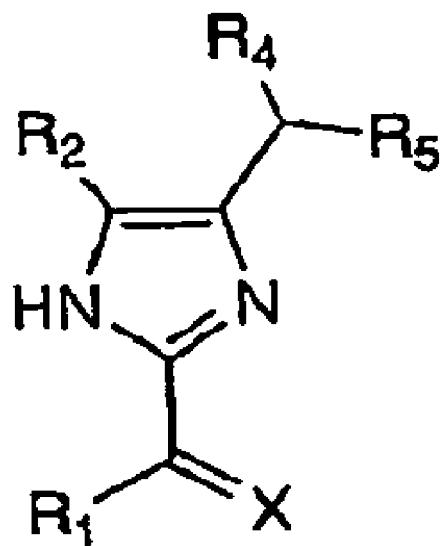
(72) Inventor(es): David J. Augeri, Jeffrey Bagdanoff, Kenneth G. Carson, Lakmal W. Boteju, S. David Kimball, Theodore C. Jessop

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007004648 de 21/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/100617 de 07/09/2007

(57) Resumo: COMPOSTOS COM BASE EM IMIDAZOL, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO-OS E MÉTODOS DE SEU USOSão descritas compostos com base em imidazol, composições compreendendo-os, e os métodos de seu uso para o tratamento, prevenção ou controle de distúrbios e doenças inflamatórias ou autoimunes. Os compostos particulares são de Fórmula I.





PI0710076-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "COMPOSTOS COM BASE EM IMIDAZOL, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO-OS E MÉTODOS DE SEU USO".

Este pedido reivindica a prioridade para o Pedido de Patente dos 5 Estados Unidos 11/698.253, depositado em 25 de Janeiro de 2007, e Pedidos de Patente dos Estados Unidos N^{os}: 60/776.473, depositado em 24 de fevereiro de 2006, e 60/815.221, depositado em 20 de Junho de 2006, todos os quais são incorporados aqui por referência.

1. CAMPO DA INVENÇÃO

10 Esta invenção refere-se a compostos com base em imidazol, e métodos de seu uso para o tratamento, prevenção e controle de várias doenças e distúrbios.

2. ANTECEDENTES

15 Esfingosina-1-fosfato (S1P) é uma molécula bioativa com efeitos potentes sobre os sistemas de órgão múltiplos. Saba, J.D. e Hla, T. Circ. Res. 94:724-734 (2004). Embora alguns acreditem que o composto é um mensageiro secundário intracelular, seu modo de ação é ainda um objeto de debate. *Id.* Realmente, seu metabolismo é ainda pouco conhecido. Hla, T., Science 309:1682-3 (2005). Pesquisadores atualmente acreditam que S1P é 20 formado pela fosforilação de Esfingosina, e degradado por desfosforilação ou clivagem. Sua clivagem no fosfato de etanolamina e um aldeído de cadeia longa é reportadamente catalizados por S1P liase. *Id.*; Pyne & Pyne, Biochem J. 349:385-402 (2000).

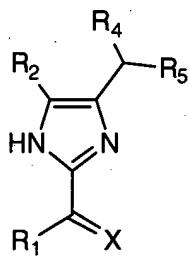
25 Esfingosina-1-fosfato liase é uma enzima dependente de vitamina B₆ localizada na membrana do retículo endoplasmico. Van Veldhoven e Mannaerts, J. Biol. Chem. 266:12502-12507 (1991); Van Veldhoven e Mannaerts, Adv. Lipid. Res. 26:69 (1993). O polinucleotídeo e seqüências de aminoácido de SP1 liase humano e seus produtos de gene são descritos no Pedido de Patente PCT N^o. WO 99/16888.

30 Recentemente, Schwab e colaboradores concluíram que um componente de 2-acetil-4-tetraidroxibutilimidazol, cor caramelo III (TI), inibe a atividade de S1P liase quando administrado a camundongos. Schwab, S. e

outro, Science 309:1735-1739 (2005). Enquanto outros têm postulado que TI exerce seus efeitos por um mecanismo diferente (veja, por exemplo, Pyne, S.G., ACGC Chem. Res. Comm. 11:108-112 (2000)), é claro que a administração do composto a ratos e camundongos induz linfopenia e causa o acúmulo de células T maduras no timo. veja, por exemplo, Schwab, *supra*; Pyne, S.G., ACGC Chem. Res. Comm. 11:108-112 (2000); Gugsyan, R., e outro, Immunology 93(3):398-404 (1998); Halweg, K.M. e Büchi, G., J.Org.Chem. 50:1134-1136 (1985); Patente dos Estados Unidos 4.567.194 de Kroeplien e Rosdorfer. Ainda, não existem relatos conhecidos de TI tendo 10 um efeito imunológico em animais diferentes de camundongos e ratos. Embora a Patente dos Estados Unidos 4.567.194 afirme que TI e alguns compostos relacionados podem ser úteis como agentes medicinais imunossupressores, estudos do composto em humanos não encontraram nenhum efeito imunológico. Veja, Thuvander, A. e Oskarsson, A., Ed. Chem. Toxic. 15 32(1):7-13 (1994); Houben, G.F., e outro, Ed. Chem. Toxic. 30(9):749-757 (1992).

3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção está direcionada, em parte a compostos de Fórmula I:



20 e sais farmaceuticamente aceitáveis e solvatos (por exemplo, hidratos) destes, em que: X é O ou NR₃; R₁ é OR_{1A}, NHOH, hidrogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; R₂ é OR_{2A}, C(O)OR_{2A}, hidrogênio, halogênio, nitrilo, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; R₃ é OR_{3A}, N(R_{3A})₂, NHC(O)R_{3A}, NHSO₂R_{3A}, ou hidrogênio; R₄ é OR_{4A}, OC(O)R_{4A}, hidrogênio, halogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, he- 25 terociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; R₅ é hidrogênio, halogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída.

teroalquila, heterociclo, alquilheterociclo ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; R_5 é $N(R_{5A})_2$, hidrogênio, hidróxi, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; e cada qual de R_{1A} , R_{2A} , R_{3A} , R_{4A} , e R_{5A} é independentemente hidrogênio ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída.

5 Esta invenção também abrange composições farmacêuticas compreendendo compostos de Fórmula I, e métodos de tratamento de distúrbios e doenças inflamatórias utilizando compostos de Fórmula I.

10 4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Certos aspectos desta invenção podem ser entendidos com referência às seguintes figuras:

15 A figura 1 fornece um plote de ponto de citometria de fluxo representativo mostrando o efeito de controle de veículo (VC), um composto da invenção (Composto 1), e TI sobre a composição de célula T (CD4+ e CD8+) de timo, e a média/desvio padrão para todos os camundongos ($n = 3$).

20 A figura 2 fornece um plote de ponto de FACS representativo mostrando o efeito de controle de veículo (VC), um composto da invenção (Composto 1), e TI sobre um subgrupo de células CD4+ (emigrantes tímicos recentes) em camundogos.

25 A figura 3 fornece um plote de ponto de FACS representativo mostrando o efeito de controle de veículo (VC), um composto da invenção (Composto 1), e TI sobre um subgrupo de células CD8+ (emigrantes tímicos recentes) em camundogos.

A figura 4 mostra os efeitos de controle de veículo, TI, Composto 1, e 1-(4-metil-5-((1S,2R,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)tiazol-2-il)etanona (Composto 2) sobre contagens de sangue total de camundongos.

30 A figura 5 mostra o efeito de dosagem oral única de um composto da invenção sobre artrite induzida por colágeno em camundogos.

A figura 6 mostra o efeito de dosagem oral única de um compos-

to da invenção sobre a célula sanguínea branca e contagens de linfócito de macacos cinomolgos.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA

Esta invenção resulta, em parte, de estudos de camundongos de 5 gene rompido por S1P liase, e refere-se grandemente a compostos acreditados serem úteis no tratamento, prevenção e/ou controle de distúrbios e doenças autoimunes e inflamatórias.

5.1. Definições

A menos que de outro modo indicado, o termo "alquenila" significa 10 um hidrocarboneto de cadeia linear, ramificada e/ou cíclica tendo de 2 a 20 (por exemplo, 2 a 10 ou 2 a 6) átomos de carbono, e incluindo pelo menos uma ligação dupla de carbono-carbono. Porções alquenila representativas incluem vinila, alila, 1-butenila, 2-butenila, isobutilenila, 1-pentenila, 2-pentenila, 3-metil-1-butenila, 2-metil-2-butenila, 2,3-dimetil-2-butenila, 1-hexenila, 2-hexenila, 3-hexenila, 1-heptenila, 2-heptenila, 3-heptenila, 1-octenila, 2-octenila, 3-octenila, 1-nonenila, 2-nonenila, 3-nonenila, 1-decenila, 2-decenila e 3-decenila.

A menos que de outro modo indicado, o termo "alquila" significa 20 um hidrocarboneto de cadeia linear, ramificado e ou cíclica ("cicloalquila") tendo de 1 a 20 (por exemplo, 1 a 10 ou 1 a 4) átomos de carbono. Porções alquila tendo de 1 a 4 carbonos são referidas como "alquila inferior." Exemplos de grupos alquila incluem, porém não estão limitados à, metila, etila, propila, isopropila, n-butila, t-butila, isobutila, pentila, hexila, isoexila, heptila, 4,4-dimetilpentila, octila, 2,2,4-trimetilpentila, nonila, decila, undecila e dodecila. Porções cicloalquila podem ser monocíclicas ou multicíclicas, e exemplos incluem ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, cicloexila, e adamantila. Exemplos adicionais de porções alquila têm porções lineares, ramificadas e /ou cíclicas (por exemplo, 1-etil-4-metil-cicloexila). O termo "alquila" inclui hidrocarbonetos saturados bem como porções alquenila e alquinila.

30 A menos que de outro modo indicado, o termo "alquilarila" ou "alquil-arila" significa uma porção alquila ligada a uma porção arila.

A menos que de outro modo indicado, o termo "alquilheteroarila"

ou "alquil-heteroarila" significa uma porção alquila ligada a uma porção heteroarila.

A menos que de outro modo indicado, o termo "alquilheterociclo" ou "alquil-heterociclo" significa uma porção alquila ligada a uma porção heterociclo.

A menos que de outro modo indicado, o termo "alquinila" significa um hidrocarboneto de cadeia linear, ramificada ou cíclica tendo de 2 a 20 (por exemplo, 2 a 20 ou 2 a 6) átomos de carbono, e incluindo pelo menos uma ligação tripla de carbono-carbono. Porções alquinila representativas incluem acetilenila, propinila, 1-butinila, 2-butinila, 1-pentinila, 2-pentinila, 3-metil-1-butinila, 4-pentinila, 1-hexinila, 2-hexinila, 5-hexinila, 1-heptinila, 2-heptinila, 6-heptinila, 1-octinila, 2-octinila, 7-octinila, 1-noninila, 2-noninila, 8-noninila, 1-decinila, 2-decinila e 9-decinila.

A menos que de outro modo indicado, o termo "alcóxi" significa um grupo $-O-$ alquila. Exemplos de grupos alcóxi incluem, porém não estão limitados a, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-O(CH_2)_2CH_3$, $-O(CH_2)_3CH_3$, $-O(CH_2)_4CH_3$, e $-O(CH_2)_5CH_3$.

A menos que de outro modo indicado, o termo "arila" significa um anel aromático ou um sistema de anel aromático ou parcialmente aromático composto de átomos de carbono e hidrogênio. Uma porção arila pode compreender múltiplos anéis ligados ou fundidos entre si. Exemplos de porções arila incluem, porém não estão limitados à, antracenila, azulenila, bifenila, fluorenila, indan, indenila, naftila, fenantrenila, fenila, 1,2,3,4-tetraidronaftaleno, e tolila.

A menos que de outro modo indicado, o termo "arilalquila" ou "aril-alquila" significa uma porção arila ligada a uma porção alquila.

A menos que de outro modo indicado, o termo "agente de redução de linfócito circulante" significa um composto que tem um CLRF mais do que cerca de 20 por cento.

A menos que de outro modo indicado, o termo "fator de redução de linfócito circulante" ou "CLRF" significa a diminuição no número de linfócitos circulantes em camundogos causada por administração oral de uma do-

se única de um composto em 100 mg/kg, como determinado pelo método descrito nos Exemplos, abaixo.

A menos que de outro modo indicado, os termos "halogênio" e "halo" abrange flúor, cloro, bromo e iodo.

5 A menos que de outro modo indicado, o termo "heteroalquila" refere-se a uma porção alquila (por exemplo, linear, ramificada ou cíclica) em que pelo menos um de seus átomos de carbono foi substituído com um heteroátomo (por exemplo, N, O ou S).

10 A menos que de outro modo indicado, o termo "heteroarila" significa uma porção arila em que pelo menos um de seus átomos de carbono foi substituído com um heteroátomo (por exemplo, N, O ou S). Exemplos incluem, porém não estão limitados à, acridinila, benzimidazolila, benzofuranila, benzoisotiazolila, benzoisoxazolila, benzoquinazolinila, benzotiazolila, 15 benzoxazolila, furila, imidazolila, indolila, isotiazolila, isoxazolila, oxadiazolila, oxazolila, ftalazinila, pirazinila, pirazolila, piridazinila, piridila, pirimidinila, pirimidinila, pirrolila, quinazolinila, quinolinila, tetrazolila, tiazolila, e triazinila.

A menos que de outro modo indicado, o termo "heteroarilalquila" ou "heteroaril-alquila" significa uma porção heteroarila ligada a uma porção alquila.

20 A menos que de outro modo indicado, o termo "heterociclo" refere-se a um sistema de anel ou anel aromático, parcialmente aromático ou não aromático monocíclico ou policíclico compreendido de carbono, hidrogênio e pelo menos um heteroátomo (por exemplo, N, O ou S). Um heterociclo pode compreender múltiplos anéis (isto é, dois ou mais) fundidos ou ligados 25 entre si. Heterociclos incluem heteroarilas. Exemplos incluem, porém não estão limitados à, benzo[1,3]dioxolila, 2,3-diidro-benzo[1,4]dioxinila, cinolinila, furanila, hidantoinila, morfolinila, oxetanila, oxiranila, piperazinila, piperidinila, pirrolidinonila, pirrolidinila, tetraidrofuranila, tetraidropiranila, tetraidropiridinila, tetraidropirimidinila, tetraidrotiofenila, tetraidrotiopiranila e valerolactamila.

30 A menos que de outro modo indicado, o termo "heterocicloalquila" ou "heterociclo-alquila" refere-se a uma porção heterociclo ligada a uma

porção alquila.

A menos que de outro modo indicado, o termo "heterocicloalquila" refere-se a um heterociclo não aromático.

A menos que de outro modo indicado, o termo "heterocicloalquila" ou "heterocicloalquil-alquila" refere-se a uma porção heterocicloalquila ligada a uma porção alquila.

A menos que de outro modo indicado, os termos "controlar," "controlando" e "controle" abrangem a prevenção da recorrência da doença ou distúrbio específico em um paciente que sofreu anteriormente da doença ou distúrbio, e/ou alongamento do tempo que um paciente sofreu da doença ou distúrbio permanece em remissão. Os termos abrangem a modulação do princípio, desenvolvimento e/ou duração da doença ou distúrbio, ou mudança da maneira que um paciente responde à doença ou distúrbio.

A menos que de outro modo indicado, o termo "sais farmaceuticamente aceitáveis" refere-se a sais preparados a partir bases ou ácidos não tóxicos farmaceuticamente aceitáveis incluindo bases e ácidos inorgânicos e bases e ácidos orgânicos. Sais de adição de base farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem, porém não estão limitados a, sais metálicos feitos de alumínio, cálcio, lítio, magnésio, potássio, sódio e zinco ou sais orgânicos feitos de lisina, N,N'-dibenziletlenodiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, meglumina (N-metilglucamina) e procaína. Ácidos não tóxicos adequados incluem, porém não estão limitados a, ácidos inorgânicos e orgânicos tais como ácidos acéticos, algínicos, antranílicos, benzenossulfônicos, benzóicos, canforsulfônicos, cítricos, etenossulfônicos, fórmicos, fumáricos, furóicos, galacturônicos, glucônicos, glucurônicos, glutâmicos, glicólicos, hidrobrônicos, hidroclóricos, isetiônicos, lácticos, malélicos, málicos, mandélicos, metanossulfônicos, múcicos, nítricos, pamóicos, pantotênicos, fenilacáticos, fosfóricos, propiônicos, salicílicos, esteáricos, sucínicos, sulfanílicos, sulfúricos, tartáricos, e ácido p-toluenossulfônico. Ácidos não tóxicos específicos incluem ácidos hidroclóricos, hidrobrônicos, fosfóricos, sulfúricos, e metanossulfônicos. Exemplos de sais específicos, desse modo, incluem sais de cloridrato e mesilato. Outros são bem conhecidos.

dos na técnica. Veja, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18^a edição, Mack Publishing, Easton PA: 1990) e *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (19^a edição, Mack Publishing, Easton PA: 1995).

A menos que de outro modo indicado, os termos "prevenir," 5 "prevenindo" e "prevenção" contemplam uma ação que ocorre antes do paciente começar a sofrer da doença ou distúrbio específico, que inibe ou reduz a gravidade da doença ou distúrbio. Em outras palavras, os termos abrangem a profilaxia.

A menos que de outro modo indicado, uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um composto é uma quantidade suficiente para prevenir 10 uma doença ou condição, ou um ou mais sintomas associados com a doença ou condição, ou prevenir sua recorrência. Uma quantidade profilaticamente eficaz de um composto significa uma quantidade de agente terapêutico, sozinha ou em combinação com outros agentes, que fornecem um benefício 15 profilático na prevenção da doença. O termo "quantidade profilaticamente eficaz" pode abranger uma quantidade que melhora a profilaxia total ou realça a eficácia profilática de outro agente profilático.

A menos que de outro modo indicado, o termo "agente de realce 20 de nível de S1P" significa um composto que tem um SLEF de pelo menos cerca de 10-vezes.

A menos que de outro modo indicado, o termo "fator de realce de nível de S1P" ou "SLEF" significa um aumento em S1P nos baços de camundongos causado por administração oral de uma dose única de um composto em 100 mg/kg, como determinado pelo método descrito nos Exemplos, 25 abaixo.

A menos que de outro modo indicado, o termo "mistura estereoisomérica" abrange misturas racêmicas bem como misturas estereomericamente enriquecidas (por exemplo, R/S = 30/70, 35/65, 40/60, 45/55, 55/45, 60/40, 65/35 e 70/30).

A menos que de outro modo indicado, o termo "estereomericamente puro" significa uma composição que compreende um estereoisômero 30 de um composto e é substancialmente livre de outros estereoisômeros da-

quele composto. Por exemplo, uma composição estereomericamente pura de um composto tendo um estereocentro será substancialmente livre do estereoisômero oposto do composto. Uma composição estereomericamente pura de um composto tendo dois estereocentros será substancialmente livre de outros diastereômeros do composto. Um composto estereomericamente puro compreende mais do que cerca de 80% por peso de um estereoisômero do composto e menos do que cerca de 20% por peso de outros estereoisômeros do composto, mais do que cerca de 90% por peso de um estereoisômero do composto e menos do que cerca de 10% por peso dos outros 5 estereoisômeros do composto, mais do que cerca de 95% por peso de um estereoisômero do composto e menos do que cerca de 5% por peso dos outros estereoisômeros do composto, mais do que cerca de 97% por peso de um estereoisômero do composto e menos do que cerca de 3% por peso dos outros estereoisômeros do composto, ou mais do que cerca de 99% por 10 peso de um estereoisômero do composto e menos do que cerca de 1% por peso dos outros estereoisômeros do composto.

15

A menos que de outro modo indicado, o termo "substituído," quando usado para descrever uma porção ou estrutura química, refere-se a um derivado daquela porção ou estrutura em que um ou mais de seus átomos de hidrogênio são substituídos com uma porção química ou grupo funcional tal como, porém não limitado a, álcool, aldeído, alcóxi, alcanoilóxi, alcóxicarbonila, alquenila, alquila (por exemplo, metila, etila, propila, t-butila), alquinila, alquilcarbonilóxi ($-\text{OC(O)Alquil}$), amida ($-\text{C(O)NH-Alquil}$ ou $-\text{AlquilNHCO(O)Alquil}$), amidinil ($-\text{C(NH)NH-Alquila}$ ou $-\text{C(NR)NH}_2$), amina (primária, secundária e terciária tal como alquilamino, arilamino, arilalquilamino), aroíla, arila, arilóxi, azo, carbamoíla ($-\text{NHC(O)O-Alquil}$ ou $-\text{OC(O)NH-Alquil}$), carbamila (por exemplo, CONH_2 , bem como CONH-Alquila , CONH-Arila , e CONH-ArilaAlquil), carbonila, carboxila, ácido carboxílico, anidrido de ácido carboxílico, cloreto de ácido carboxílico, ciano, éster, epóxido, éter (por exemplo, metóxi, etóxi), guanidino, halo, haloalquila (por exemplo, $-\text{CCl}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{C}(\text{CF}_3)_3$), heteroalquila, hemiacetal, imina (primária e secundária), isocianato, isotiocianato, cetona, nitrilo, nitro, oxo, fosfodiéster, sulfeto, sulfo-

20

25

30

namido (por exemplo, SO_2NH_2), sulfona, sulfonila (incluindo alquilsulfonila, arilsulfonila e arilalquilsulfonila), sulfóxido, tiol (por exemplo, sulfidrila, tioéter) e uréia (- NHCONH -alquil-).

A menos que de outro modo indicado, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de um composto é uma quantidade suficiente para fornecer um benefício terapêutico no tratamento ou controle de uma doença ou condição, ou para retardar ou minimizar um ou mais sintomas associados com a doença ou condição. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto significa uma quantidade de agente terapêutico, sozinho ou em combinação com outras terapias, que fornecem um benefício terapêutico no tratamento ou controle da doença ou condição. O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" pode abranger uma quantidade que melhora a terapia total, reduz ou evita os sintomas ou causas de uma doença ou condição, ou realça a eficácia terapêutica de outro agente terapêutico.

A menos que de outro modo indicado, os termos "tratar," "tratando" e "tratamento" contemplam uma ação que ocorre enquanto um paciente está sofrendo da doença ou distúrbio específico, que reduz a gravidade da doença ou distúrbio, ou retarda ou atrasa a progressão da doença ou distúrbio.

A menos que de outro modo indicado, o termo "incluem" tem o mesmo significado como "incluem, porém não estão limitados a," e o termo "inclui" tem o mesmo significado como "inclui, porém não está limitado a." Similarmente, o termo "tal como" tem o mesmo significado como o termo "tal como, porém não está limitado a."

A menos que de outro modo indicado, um ou mais adjetivos imediatamente precedendo uma série de substantivos devem ser construídos como aplicando-se a cada qual dos substantivos. Por Exemplo, a frase "alquila, arila, ou heteroarila opcionalmente substituída" tem o mesmo significado como "alquila opcionalmente substituída, arila opcionalmente substituída, ou heteroarila opcionalmente substituída."

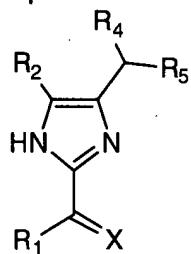
Deve ser observado que uma porção química que faz parte de um composto maior pode ser descrita aqui utilizando um nome comumente

de acordo com ela, quando ela existe como uma molécula simples ou um nome comumente de acordo com seu radical. Por exemplo, os termos "piridina" e "piridila" são de acordo com o mesmo significado quando usados para descrever uma porção ligada a outras porções químicas. Desse modo, 5 as duas frases "XOH, em que X é piridila" e "XOH, em que X é piridina" são de acordo com o mesmo significado, e abrangem os compostos piridin-2-ol, piridin-3-ol e piridin-4-ol.

Deve ser também observado que se a estereoquímica de uma estrutura ou uma porção da estrutura não estiver indicada com, por exemplo, 10 linhas negritas ou tracejadas, a estrutura ou a porção da estrutura deve ser interpretada como abrangendo todos os estereoisômeros dela. Entretanto, qualquer átomo mostrando em um desenho com valências não satisfeitas é assumido estar ligado a átomos suficientes de hidrogênio para satisfazer as valências. Além disso, ligações químicas descritas com uma linha sólida paralela a uma linha tracejada abrangem tanto as ligações simples quanto as duplas (por exemplo, aromáticas), se as valências permitirem.

5.2. Compostos

Esta invenção encompasse compostos de Fórmula I:



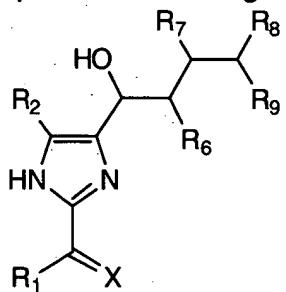
e sais farmaceuticamente aceitáveis e solvatos (por exemplo, hidratos) desse, em que: X é O ou NR₃; R₁ é OR_{1A}, NHOH, hidrogênio, ou alquila, arila, 20 alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; R₂ é OR_{2A}, C(O)OR_{2A}, hidrogênio, halogênio, nitrilo, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; R₃ é OR_{3A}, N(R_{3A})₂, NHC(O)R_{3A}, NHSO₂R_{3A}, ou hidrogênio; R₄ é OR_{4A}, 25 OC(O)R_{4A}, hidrogênio, halogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo ou heterocicloalquila opcionalmente

substituída; R_5 é $N(R_{5A})_2$, hidrogênio, hidróxi, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; e cada qual de R_{1A} , R_{2A} , R_{3A} , R_{4A} , e R_{5A} é independentemente hidrogênio ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, 5 heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída.

Compostos particulares de Fórmula I são tais que se X for O, R_1 será alquila dentre 1 a 4 átomos, fenila, benzila ou feniletila; R_2 será hidrogênio; e um dentre R_4 e R_5 será hidroxila; o outro dentre R_4 e R_5 não será 10 alquila de 1 a 6 carbonos, hidroxialquila de 1 a 6 carbonos, poliidroxialquila de 1 a 6 carbonos tendo até uma hidroxila por carbono, poliacetilalquila de 1 a 6 carbonos tendo até uma acetila por carbono, fenila, benzila ou feniletila.

Em modalidades particulares, o composto não é 2-acetil-4-tetraidroxibutilimidazol, 1-(4-(1,1,2,2,4-pentaidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona, tetraacetato de 1-(2-acetil-1H-imidazol-4-il)butano-1,1,2,2-tetraíl, 15 ou pentaacetato de 1-(2-acetil-1H-imidazol-4-il)butano-1,1,2,2,4-pentail.

Uma modalidade particular abrange compostos de Fórmula II:



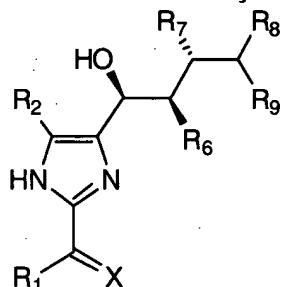
II

e sais farmaceuticamente aceitáveis e solvatos destes, em que: X é O ou NR_3 ; R_1 é OR_{1A} , $NHOH$, hidrogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, 20 heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; R_2 é OR_{2A} , $C(O)OR_{2A}$, hidrogênio, halogênio, nitrilo, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; R_3 é OR_{3A} , $N(R_{3A})_2$, $NHC(O)R_{3A}$, $NHSO_2R_{3A}$, ou hidrogênio; R_6 é OR_{6A} , $OC(O)R_{6A}$, $N(R_{6B})_2$, 25 $NHC(O)R_{6B}$, hidrogênio, ou halogênio; R_7 é OR_{7A} , $OC(O)R_{7A}$, $N(R_{7B})_2$, $NHC(O)R_{7B}$, hidrogênio, ou halogênio; R_8 é OR_{8A} , $OC(O)R_{8A}$, $N(R_{8B})_2$,

NHC(O)R_{8B}, hidrogênio, ou halogênio; R₉ é CH₂OR_{9A}, CH₂OC(O)R_{9A}, N(R_{9B})₂, NHC(O)R_{9B}, hidrogênio, ou halogênio; cada qual de R_{1A}, R_{2A}, R_{3A}, R_{6A}, R_{7A}, R_{8A} e R_{9A} é independentemente hidrogênio ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; e cada qual de R_{6B}, R_{7B}, R_{8B} e R_{9B} é independentemente hidrogênio ou alquila opcionalmente substituída com ou mais grupos hidróxi ou halogênio;

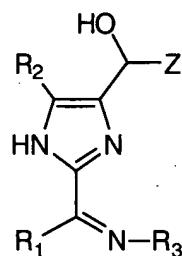
Compostos particulares de Fórmula II são tais que: 1) se X for O, R₁ será alquila de 1 a 4 átomos, fenila, benzila ou feniletila, e R₂ será hidrogênio, pelo menos dois dentre R₆, R₇, R₈ e R₉ não serão hidroxila ou acetato; 2) se X for O, R₁ será metila, R₂ será hidrogênio, R₆ e R₇ serão ambos hidroxila, e um dentre R₈ e R₉ será hidrogênio, o outro não será NHC(O)R_{9B}; 3) se X for O, R₁ será OR_{1A}, R_{1A} será hidrogênio ou alquila inferior, e R₂ será hidrogênio, pelo menos um, porém não todos, dentre R₆, R₇, R₈ e R₉ será hidroxila ou acetato.

Compostos particulares da invenção são de Fórmula II(a):



II(a)

Outros são de Fórmula III:

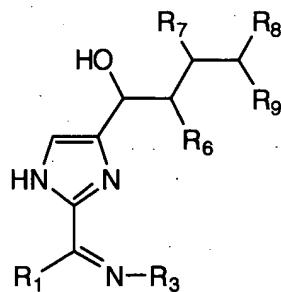


III

em que: Z é alquila opcionalmente substituída; R₁ é OR_{1A}, NHOH, hidrogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; R₂ é OR_{2A},

C(O)OR_{2A}, hidrogênio, halogênio, nitrilo, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; R₃ é OR_{3A}, N(R_{3A})₂, NHC(O)R_{3A}, NHSO₂R_{3A}, ou hidrogênio; e cada qual de R_{1A}, R_{2A}, e R_{3A} é independentemente hidrogênio ou 5 alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída.

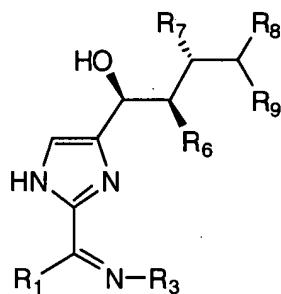
Outra modalidade da invenção abrange compostos de Fórmula IV:



IV

e sais farmaceuticamente aceitáveis e solvatos destes, em que: R₁ é OR_{1A}, 10 NHOH, hidrogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; R₃ é OR_{3A}, N(R_{3A})₂, NHC(O)R_{3A}, NHSO₂R_{3A}, ou hidrogênio; R₆ é OR_{6A}, OC(O)R_{6A}, N(R_{6B})₂, NHC(O)R_{6B}, hidrogênio, ou halogênio; R₇ é OR_{7A}, OC(O)R_{7A}, N(R_{7B})₂, NHC(O)R_{7B}, hidrogênio, ou halogênio; R₈ é OR_{8A}, 15 OC(O)R_{8A}, N(R_{8B})₂, NHC(O)R_{8B}, hidrogênio, ou halogênio; R₉ é CH₂OR_{9A}, CH₂OC(O)R_{9A}, N(R_{9B})₂, NHC(O)R_{9B}, hidrogênio, ou halogênio; e cada qual de R_{1A}, R_{3A}, R_{6A}, R_{7A}, R_{8A} e R_{9A} é independentemente hidrogênio ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída.

20 Os compostos particulares são de Fórmula IV(a):



IV(a)

Com respeito a cada uma das Fórmulas mostradas acima que contêm as porções descritas abaixo, certas modalidades da invenção são tais que:

Em algumas, X é O. Em outras, X é NR₃.

5 Em algumas, R₁ é hidrogênio. Em outras, R₁ é alquila inferior opcionalmente substituída. Em outras, R₁ é NHOH. Em outras, R₁ é OR_{1A} e R_{1A} é, por exemplo, hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.

Em algumas, R₂ é hidrogênio. Em outras, R₂ não é hidrogênio.

10 Em outras, R₂ é nitrilo. Em outras, R₂ é alquila inferior opcionalmente substituída. Em outras, R₂ é OR_{2A}. Em outras, R₂ é C(O)OR_{2A}. Em algumas, R_{2A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.

Em algumas, R₃ é OR_{3A}. Em outras, R₃ é N(R_{3A})₂ ou NHC(O)R_{3A}.

15 Em outras, R₃ é NHO₂R_{3A}. Em algumas, R_{3A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída. Em outras, R_{3A} é heterociclo ou arila opcionalmente substituída.

Em algumas, R₄ é OR_{4A}. Em outras, R₄ é halogênio.

20 Em algumas, R₅ é N(R_{5A})₂. Em outras, R₅ é hidrogênio. Em outras, R₅ é hidroxila. Em outras, R₅ é heteroalquila (por exemplo, alcóxi). Em outras, R₅ é alquila opcionalmente substituída. Em outras, R₅ é arila opcionalmente substituída.

Em algumas, um ou mais de R₆, R₇, R₈, e R₉ é hidróxi ou halogênio. Em algumas, todos de R₆, R₇, R₈, e R₉ são hidroxila ou acetato.

Em algumas, Z é alquila opcionalmente substituída com uma ou mais porções hidroxila, acetato ou halogênio.

25 Os compostos da invenção podem conter um ou mais estereocentros, e podem existir como misturas racêmicas de enantiômeros ou misturas de diastereômeros. Esta invenção abrange formas estereomericamente puras de tais compostos, bem como misturas daquelas formas. Os estereoisômeros podem ser assimetricamente sintetizados ou resolvidos utilizando técnicas padrão tais como colunas quirais ou agentes de resolução quiral. Veja, por exemplo, Jacques, J., e outro, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley Interscience, Nova Iorque, 1981); Wilen, S. H., e outro,

Tetrahedron 33:2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compuestos* (McGraw Hill, NY, 1962); e Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents an Optical Resolutions*, p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

5 Esta invenção também abrange as mistura estereoisoméricas de compostos descritas aqui. Ela também abrange isômeros configuracionais de compostos descritos aqui, ou em mistura ou em forma substancialmente pura ou pura, tal como isômeros cis (Z) e trans (E) de alceno e isômeros e *syn* e *anti*-oxima.

10 Os compostos preferidos da invenção são agentes de redução de linfócito circulantes. Certos compostos inibem a quantidade de linfócitos circulantes, como determinado utilizando o método descrito nos Exemplos, por mais do que cerca de 20, 50, 75, 100, 150 ou 200 por cento. A este respeito, descobriu-se que enquanto TI é capaz de reduzir linfócitos circulantes 15 em camundogos, muitos análogos e derivados de TI, tais como 1-(4-metil-5-((1S,2R,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)tiazol-2-il)etanona, têm pouco ou nenhum efeito sobre os linfócitos circulantes, a despeito de relatos ao contrário. Veja, WO 97/46543.

20 Sem serem limitados pela teoria, compostos da invenção são supostos realizarem a série de reação metabólica de S1P, e podem inibir S1P liase diretamente ou indiretamente *in vivo*. Compostos particulares são os agentes de realce de nível de S1P. Certos compostos aumentam a quantidade de S1P, como determinado utilizando o método descrito abaixo nos Exemplos, por mais do que cerca de 10, 15, 20, 25, ou 30 vezes.

25 Os compostos da invenção podem ser preparados por métodos conhecidos na técnica (por exemplo, variando e adicionando-se aos métodos descritos em Pyne, S.G., *ACGC Chem. Res. Comm.* 11:108-112 (2000); Halweg, K.M. e Büchi, G., *J.Org.Chem.* 50:1134-1136 (1985)). Os compostos podem também ser feitos pelos métodos descritos abaixo e variantes 30 destes, que será evidente para aqueles versados na técnica.

5.3. Métodos de Uso

Esta invenção abrange um método de modulação (por exemplo,

aumento) da quantidade de S1P em um paciente (por exemplo, um camundongo, rato, cão, gato ou humano) em necessidade disto, que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um composto da invenção (isto é, um composto descrito aqui).

5 Outra modalidade abrange um método de redução do número de células T no sangue de um paciente, que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um composto da invenção.

Outra modalidade abrange um método de tratamento, controle ou prevenção de uma doença afetada por (ou tendo sintomas afetados por) 10 níveis de S1P, que compreende administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um composto da invenção.

Outra modalidade abrange a método de supressão da resposta imune em um paciente, que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um composto da invenção.

Outra modalidade abrange um método de tratamento, controle ou prevenção de um distúrbio ou doença autoimune ou inflamatória, que compreende administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um composto da invenção. Exemplos de doenças e distúrbios incluem espondilite anquilosante, 20 asma (por exemplo, asma bronquial), dermatite atópica, doença de Behcet, doença do enxerto versus hospedeiro, síndrome Kawasaki, lúpus eritematoso, esclerose múltipla, miastenia grave, polinose, psoríase, artrite psoriática, escleroderma, rejeição de transplante (por exemplo, de órgão, célula ou medula óssea), diabetes tipo1, e uveíte.

Doenças e distúrbios adicionais incluem doença de Addison, síndrome anti-fosfolipídeo, gastrite atrófica autoimune, acloridria autoimune, doença celiálica, Doença de Crohn, Síndrome de Cushing, dermatomiosite, Síndrome de Goodpasture, Doença Grave, tiróide de Hashimoto, atrofia adrenar idiopática, trombocitopenia idiopática, Síndrome Lambert-Eaton, penfigoide, pênfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarterite nodosa, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, síndrome de Reiter, Raynauds,

policondrite reincidente, Síndrome de Schmidt, Síndrome de Sjogren, oftalmia simpática, Arterite de Takayasu, arterite temporal, tirotoxicose, colite ulcerativa, e granulomatose de Wegener.

A quantidade, rotina de administração e escala de dosagem de um composto dependerá de fatores tais como da indicação específica a ser tratada, prevenida, ou controlada, e da idade, sexo e condição do paciente. Os papéis desempenhados por tais fatores são bem conhecidos na técnica, e podem ser acomodados por experimentos de rotina. Em uma modalidade particular, um composto da invenção é administrado a um paciente humano em uma quantidade de cerca de 0,5, 1, 2,5 ou 5 mpk.

5.4. Formulações Farmacêuticas

Esta invenção abrange composições farmacêuticas compreendendo um ou mais compostos da invenção. Certas composições farmacêuticas são em forma de dosagem unitária para administração oral, mucosal (por exemplo, nasal, sublingual, vaginal, bucal, ou retal), parenteral (por exemplo, subcutânea, intravenosa, injeção de bolo, intramuscular, ou intra-arterial), ou transdérmica a um paciente. Exemplos de formas de dosagem incluem, porém não estão limitados a: comprimidos, capsulas; cápsulas, tais como cápsulas de gelatina elásticas moles; selos; pastilhas; lozangos; dispersões; supositórios; ungüentos; cataplasmas (cataplasmas); pastas; pós; curativos; cremes; emplastros; soluções; emplastros; aerossóis (por exemplo, inaladores ou sprays nasais); géis; formas de dosagem líquidas adequadas para administração oral ou mucosal a um paciente, incluindo suspensões (por exemplo, suspensões líquidas aquosas e não aquosas, emulsões óleo-em-água, ou emulsões água-em-óleo), soluções, e elixires; formas de dosagem líquidas adequadas para administração parenteral a um paciente; e sólidos estéreis (por exemplo, sólidos cristalinos ou amorfos) que podem ser reconstituídos para fornecer formas de dosagem líquidas adequadas para administração parenteral a um paciente.

A formulação deve ajustar-se ao modo de administração. Por exemplo, administração oral requer revestimentos para proteger os compostos desta invenção da degradação dentro do trato gastrointestinal. Similar-

mente, uma formulação pode conter ingredientes que facilitam a liberação do(s) ingrediente(s) ativo(s) para o sítio de ação. Por exemplo, os compostos podem ser administrados em formulações lipossômicas, a fim de protegê-los das enzimas degradativas, facilitar o transporte no sistema circulatório, e 5 realizar a liberação através de membranas celulares para sítios intracelulares.

Similarmente, compostos poucos solúveis podem ser incorporados em formas de dosagem líquidas (e formas de dosagem adequadas para reconstituição) com o auxílio de agentes de solubilização, emulsificantes e 10 tensoativos tais como, porém não limitado à, ciclodextrinas (por exemplo, α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, Captisol[®], e EncapsinTM (veja, por exemplo, Davis e Brewster, 2004, Nat. Rev. Drug Disc. 3:1023-1034), Labrasol[®], La-15 brafil[®], Labrafac[®], cremafor, e solventes não aquosos, tal como, porém não limitados a, álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de 15 etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, propileno glicol, 1,3-butíleno glicol, formamida de dimetila, sulfóxido de dimetila (DMSO), óleos biocompatíveis (por exemplo, óleos de caroço de algodão, amendoim, milho, germe, 20 oliva, rícino, e gergelim), glicerol, álcool de tetraidrofurfurila, polietileno glicóis, ésteres de ácido graxo de, e misturas destes (por exemplo, DMSO: óleo de milho).

Compostos pouco solúveis podem também ser incorporados em suspensões utilizando outras técnicas conhecidas na técnica. Por exemplo, nanopartículas de um composto podem ser suspensas em um líquido para fornecer uma nanossuspensão (veja, por exemplo, Rabinow, 2004, Nature Rev. Drug Disc. 3:785-796). Formas de nanopartículas de compostos descritas aqui podem ser preparadas pelos métodos descritos nas Publicações de 25 Patente dos Estados Unidos N°s. 2004-0164194, 2004-0195413, 2004-0251332, 2005-0042177 A1, 2005-0031691 A1, e Patentes dos Estados Unidos N°s. 5.145.684, 5.510.118, 5.518.187, 5.534.270, 5.543.133, 30 5.662.883, 5.665.331, 5.718.388, 5.718.919, 5.834.025, 5.862.999, 6.431.478, 6.742.734, 6.745.962, as totalidades de cada quais são incorporadas aqui por referência. Em uma modalidade, a forma de nanopartícula

compreende partículas tendo um tamanho de partícula médio de menos do que cerca de 2000 nm, menos do que cerca de 1000 nm, ou menos do que cerca de 500 nm.

A composição, forma, e tipo de uma forma de dosagem variarão dependendo de seu uso. Por exemplo, uma forma de dosagem usada no tratamento agudo de uma doença pode conter quantidades maiores de um ou mais dos ingredientes ativos que ele comprehende, do que uma forma de dosagem usada no tratamento crônico da mesma doença. Similarmente, uma forma de dosagem parenteral pode conter quantidades menores de um ou mais dos ingredientes ativos que ele comprehende, do que uma forma de dosagem usada para tratar a mesma doença. Estes e outros modos em que formas de dosagem específicas abrangidas por esta invenção variarão uma da outra, serão facilmente evidentes para aqueles versados na técnica. Veja, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a edição, Mack Publishing, Easton PA (1990).

5.4.1. Formas de Dosagem Oral

As composições farmacêuticas da invenção adequadas para administração oral podem ser apresentadas como formas de dosagem discretas, tais como, porém não limitadas a, comprimidos (por exemplo, comprimidos mastigáveis), capselas, cápsulas, e líquidos (por exemplo, xaropes aromatizados). Tais formas de dosagem contêm quantidades pré-determinadas de ingredientes ativos, e podem ser preparadas por métodos de farmácia bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Veja, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a edição, Mack Publishing, Easton PA (1990).

Formas de dosagem oral típicas são preparadas combinando-se o(s) ingrediente(s) ativo(s) em uma mistura íntima com pelo menos um excipiente de acordo com técnicas de composição farmacêutica convencionais. Excipientes podem tomar uma ampla variedade de formas dependendo da forma de preparação desejada para administração.

Por causa de sua facilidade de administração, comprimidos e cápsulas representam as formas de unidade de dosagem oral mais vantajo-

sas. Se desejado, comprimidos podem ser revestidos por técnicas aquosas ou não aquosas padrão. Tais formas de dosagem podem ser preparadas por métodos convencionais de farmácia. Em geral, formas de dosagem e composições farmacêuticas são preparadas misturando-se uniformemente e intimamente os ingredientes ativos com veículos líquidos, veículos sólidos finamente divididos, ou ambos, e em seguida modelando o produto na apresentação desejada se necessário. Desintegrantes podem ser incorporados nas formas de dosagem líquidas para facilitarem a rápida dissolução. Lubrificantes podem também ser incorporados para facilitarem a fabricação de formas de dosagem (*por exemplo, comprimidos*).

5.4.2. Formas de Dosagem Parenteral

Formas de dosagem Parenteral podem ser administradas a pacientes por várias rotinas incluindo, porém não limitado às subcutâneas, intravenosas (incluindo injeção de bolo), intramusculares, e intra-arteriais. Por 15 que sua administração tipicamente desvia as defesas naturais do paciente contra contaminantes, formas de dosagem parenteral são especificamente estéreis ou capazes de serem esterilizadas antes da administração a um paciente. Exemplos de formas de dosagem parenteral incluem, porém não estão limitados às soluções prontas para injeção, produtos secos prontos a 20 serem dissolvidos ou suspensos em um veículo farmaceuticamente aceitável para injeção, e emulsões.

Veículos adequados que podem ser usados para fornecer formas de dosagem parenteral da invenção são bem conhecidas por aqueles versados na técnica. Exemplos incluem, porém não estão limitados à: Água 25 para Injeção USP; veículos aquosos tais como, porém não limitados à, Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer, Injeção de Dextrose, Injeção de Dextrose e Cloreto de Sódio, e Injeção de Ringer Lactada; veículos miscíveis em água tais como, porém não limitados a, álcool etílico, polietileno glicol, e polipropileno glicol; e veículos não aquosos tais como, porém não limitados 30 a, óleo de milho, óleo de caroço de algodão, óleo de amendoim, óleo de gergelim, oleato de etila, miristato de isopropila, e benzoato de benzila.

5.4.3. Formas de dosagem Transdérmica, Tópica e Mucosal

Formas de dosagem Transdérmica, tópica e mucosal incluem, porém não estão limitadas às, soluções oftálmicas, sprays, aerossóis, creme, loções, ungüentos, géis, soluções, emulsões, suspensões, ou outras formas conhecidas por alguém versado na técnica. Veja, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a e 18^a edições, Mack Publishing, Easton PA (1980 & 1990); e *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 4^a edição, Lea & Febiger, Philadelphia (1985). Formas de dosagem transdérmica incluem emplastros "tipo reservatório" ou "tipo matriz", que podem ser aplicados à pele e usado durante um período específico de tempo para permitir a penetração de uma quantidade desejada de ingredientes ativos.

Excipientes adequados (por exemplo, veículos e diluentes) e outros materiais que podem ser usados para fornecer formas de dosagem transdérmica, tópica e mucosal são bem conhecidos por aqueles versados nas técnicas farmacêuticas, e dependem do tecido particular ao qual uma determinada dosagem ou composição farmacêutica será aplicada.

Dependendo do tecido específico a ser tratado, componentes adicionais podem ser usados antes de, em combinação com, ou subsequente ao tratamento com ingredientes ativos da invenção. Por exemplo, realçadores de penetração podem ser usados para ajudar na liberação de ingredientes ativos ao tecido.

O pH de uma forma de dosagem ou composição farmacêutica, ou do tecido ao qual a forma de dosagem ou composição farmacêutica é aplicado, pode também ser ajustado para melhorar a liberação de um ou mais ingredientes ativos. Similarmente, a polaridade de um veículo de solvente, sua intensidade iônica, ou tonicidade podem ser ajustadas para melhorar a liberação. Compostos tais como estearatos podem também ser adicionados às formas de dosagem ou composições farmacêuticas para vantajosamente alterar a hidrofilicidade ou lipofilicidade de um ou mais ingredientes ativos a fim de melhorar a liberação. A este respeito, estearatos podem servir como veículo de lipídeo para a formulação, como um agente emulsificante ou tensoativo, e como um agente de realce de penetração ou realce de liberação. Diferentes sais, hidratos ou solvatos dos ingredientes ativos

podem ser usados também para ajustar as propriedades da composição resultante.

6. EXEMPLOS

Aspectos desta invenção podem ser entendidos a partir dos seguintes Exemplos, que não limitam seu escopo.

6.1. Camundongos de Gene Rompido por S1P Lisase

Captura de gene é um método de mutagênese insercional aleatório que usa um fragmento de codificação de DNA para um gene marcador selecionável ou repórter como um mutagênico. Os vetores de captura de gene foram designados para interagirem nos íntrons ou exons de uma maneira que permite a maquinaria de ligação celular ligar os exons codificados por vetor aos mRNAs celulares. Vetores de captura de gene tipicamente contêm seqüências marcadoras selecionáveis que são precedidas por fortes seqüências receptoras de ligação e não são precedidas por um promotor.

Desse modo, quando tais vetores integram-se em um gene, a maquinaria de ligação celular liga os exons do gene capturado na extremidade 5' da seqüência marcadora selecionável. Tipicamente, tais genes marcadores selecionáveis podem apenas ser expressos se o vetor codificando o gene estiver integrado em um íntron. Os eventos de captura de gene resultantes são subseqüentemente identificados selecionando quanto às células que podem sobreviver à cultura seletiva.

Células-tronco embrionárias (derivadas de Linhagem de murino A129) foram mutadas por um processo envolvendo a inserção de pelo menos uma porção de uma seqüência de vetor geneticamente construída no gene de SP1 liase. As células-tronco embrionárias mutadas foram em seguida microinjetadas em blastocistos, que foram seqüencialmente introduzidos em hospedeiras fêmeas pseudo-grávidas e levadas a termo utilizando métodos estabelecidos. Neste caso, o vírus foi inserido entre os 1 e 2, e rompeu o gene SP1 liase. Os animais quiméricos resultantes foram subseqüentemente criados para produzir filhotes capazes de transmissão de linha germinativa de um alelo contendo a mutação construída no gene SP1 liase.

Técnicas úteis para romper um gene em uma célula, e especi-

almente uma célula ES, que pode anteriormente ter um gene rompido são descritas nas Patentes dos Estados Unidos Nºs. 6.136.566; 6.139.833 e 6.207.371 e Pedido de Patente dos Estados Unidos Nº. 08/728,963, cada dos quais são incorporados aqui por referência em suas totalidades.

5 **6.2. Efeitos Hematológicos de Rompimento de S1P Liase**

O sangue total foi coletado por sangramento retro-orbital e colocado em um tubo de coleta de sangue capilar que continha EDTA. O sangue foi analisado utilizando o analisador Cell-Dyn 3500R (Abbott Diagnostics). O analisador emprega tecnologia dual para fornecer a base para uma identificação diferencial de célula sanguínea branca (WBC) de cinco partes. Separação por Dispersão Polarizada de Múltiplos Ângulos (M.A.P.S.S.) fornece a contagem de célula sanguínea branca e informação diferencial, enquanto a impedância fornece informação adicional na presença de linfócitos frágeis e células sanguíneas vermelhas hipotonicamente resistentes.

15 Aproximadamente 135 microlitros de sangue total foram aspirados no analisador utilizando uma bomba peristáltica. Quatro técnicas de Avaliação independente foram utilizadas pelo Sistema Cell-Dyn 3500R (Abbott, IL) para obter os parâmetros hematológicos. A contagem ótica de WBC (WOC) e os dados diferenciais de WBC foram avaliados no canal de fluxo 20 ótico, resultante na identificação das subpopulações de WBC (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, e basófilos) para o WBC de cinco partes diferencial. A contagem de Impedância de WBC (WIC) foi avaliada em um canal de impedância elétrica. Os dados de plaqueta e RBC foram avaliados em um segundo canal de impedância elétrica. A hemoglobina foi avaliada no 25 canal espectrofotométrica. A amostra foi aspirada, diluída, misturada, e as avaliações para cada parâmetro foram obtidos durante cada ciclo de instrumento. Os parâmetros de análise hematológicos obtidos foram contagem de célula sanguínea branca, neutrófilo, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, células sanguíneas vermelhas, hemoglobina, hematócrito', plaquetas, 30 amplitude de distribuição de célula vermelha, volume corpuscular médio e volume plaquetário médio.

As amostras de sangue foram obtidas a partir de um total de 16

camundongos. A análise e comparação das amostras de sangue foram obtidas a partir de sete camundongos tipo selvagem, seis camundongos heterozigotos e três camundongos homozigotos. Não existem diferenças associadas com genótipo significantes entre camundongos de diferentes grupos

5 com respeito às contagem de célula sanguínea (RBC) vermelha, níveis de hemoglobina, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular médio, contagem de plaqueta ou volume de plaqueta médio. Existem diferenças em amplitude de hematócrito distribuição de célula vermelha. O hematócrito médio em camundongos homozigotos (-/-) foi $37 \pm 2,56$ por cento, em camundongos heterozigotos (+/-), $40,9 \pm 4$ por cento e em camundongos tipo selvagem (+/+) foi de $44,7 \pm 2,7$ por cento. A amplitude de distribuição de células sanguíneas vermelhas em camundongos homozigotos (-/-) foi de $25,2 \pm 4,2$ por cento, em camundongos heterozigotos (+/-), $17,6 \pm 1,9$ por cento e camundongos tipo selvagem (+/+) foi de $17,2 \pm 2$ por cento.

10

15

Similarmente, camundongos deficientes de SP1 liase não tinham nenhuma diferença significante nas contagens totais de célula sanguínea branca como comparado aos camundongos heterozigotos ou tipo selvagem. Camundongos homozigotos (-/-) tinham uma contagem total de célula sanguínea branca de 7200 ± 700 células/ μ l. Camundongos heterozigotos (+/-) tinham uma contagem total de célula sanguínea branca de 6200 ± 1800 células/ μ l e camundongos tipo selvagem (+/+) tinham uma contagem total de célula sanguínea branca de 7200 ± 2600 células/ μ l.

20

25

Nos camundongos que foram homozigotos quanto ao rompimento de S1P liase, a contagem de linfócito foi diminuída, ao mesmo tempo em que o número de neutrófilos, monócitos, eosinófilos, e basófilos foi aumentado. As contagens de linfócito de sangue de camundongos homozigotos (-/-) durante o rompimento no gene de SP1 liase foram grandemente reduzidas. A contagem média de linfócito em camundongos homozigotos (-/-) foi de 847 ± 139 células/ μ l, em camundongos heterozigotos (+/-) a contagem de linfócito médio foi de 4582 ± 2364 células/ μ l, em oposição à contagem média de linfócito em camundongos tipo selvagem (+/+) que foi de 6126 ± 2151 células/ μ l.

30

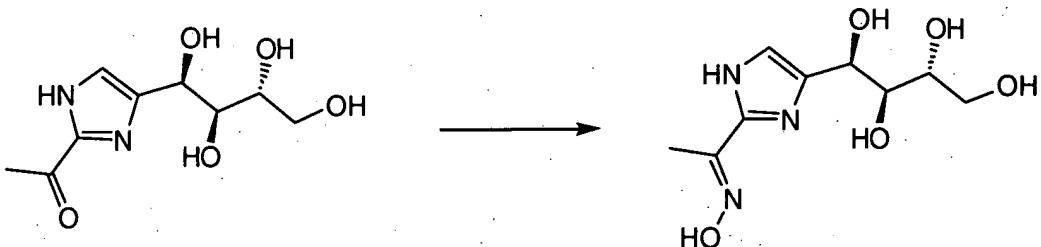
las/ μ l.

Ao contrário, contagem média de neutrófilo em camundongos homozigotos (-/-) foi de 5020 ± 612 células/ μ l, enquanto em camundongos heterozigotos (+/-) a contagem média de neutrófilo foi 1380 ± 1140 células/ μ l e camundongos tipo selvagem (+/+) tinham a contagem média de neutrófilo de apenas 886 ± 479 células/ μ l. Similarmente, a contagem média de monócito em camundongos homozigotos (-/-) foi de 950 ± 218 células/ μ l, enquanto em camundongos heterozigotos (+/-) a contagem média de monócito foi de 250 ± 108 células/ μ l e em camundongos tipo selvagem (+/+) a contagem média de monócito foi de apenas 146 ± 92 células/ μ l. Igualmente com eosinófilos, a contagem média de eosinófilo em camundongos homozigotos (-/-) foi de 247 ± 297 células/ μ l, enquanto em camundongos heterozigotos (+/-) a contagem média de eosinófilo foi de 8 ± 8 células/ μ l e em camundongos tipo selvagem (+/+) a contagem média de eosinófilo foi de apenas 14 ± 21 células/ μ l.

O mesmo foi real de basófilo. A contagem média de basófilo em camundongos homozigotos (-/-) foi de 130 ± 90 células/ μ l, em camundongos heterozigotos (+/-) a contagem média de basófilo foi de 7 ± 5 células/ μ l e em camundongos tipo selvagem (+/+) a contagem média de basófilo foi de apenas 16 ± 11 células/ μ l.

Similarmente, a contagem média de monócito em camundongos homozigotos (-/-) foi de 950 ± 218 células/ μ l, enquanto em camundongos heterozigotos (+/-) a contagem média de monócito foi de 250 ± 108 células/ μ l e em camundongos tipo selvagem (+/+) a contagem média de monócito foi de apenas 146 ± 92 células/ μ l. Igualmente com, a contagem média de eosinófilo em camundongos homozigotos (-/-) foi de 247 ± 297 células/ μ l, enquanto em camundongos heterozigotos (+/-) a contagem média de eosinófilo foi de 8 ± 8 células/ μ l e em camundongos tipo selvagem (+/+) a contagem média de eosinófilo foi de apenas 14 ± 21 células/ μ l.

30 6.3. Síntese de oxima de (Z)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)-etanona



1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-1H-imidazol-2-yl]-

etanona (T1, preparado de acordo com Halweg, K.M. e Büchi, G., *J.Org.Chem.* 50:1134-1136 (1985)) (350 mg, 1,52 mmol) foi suspenso em água (10 ml). Hidrocloreto de hidroxilamina (126,8 mg, 1,82 mmol, 1,2 eq.) e

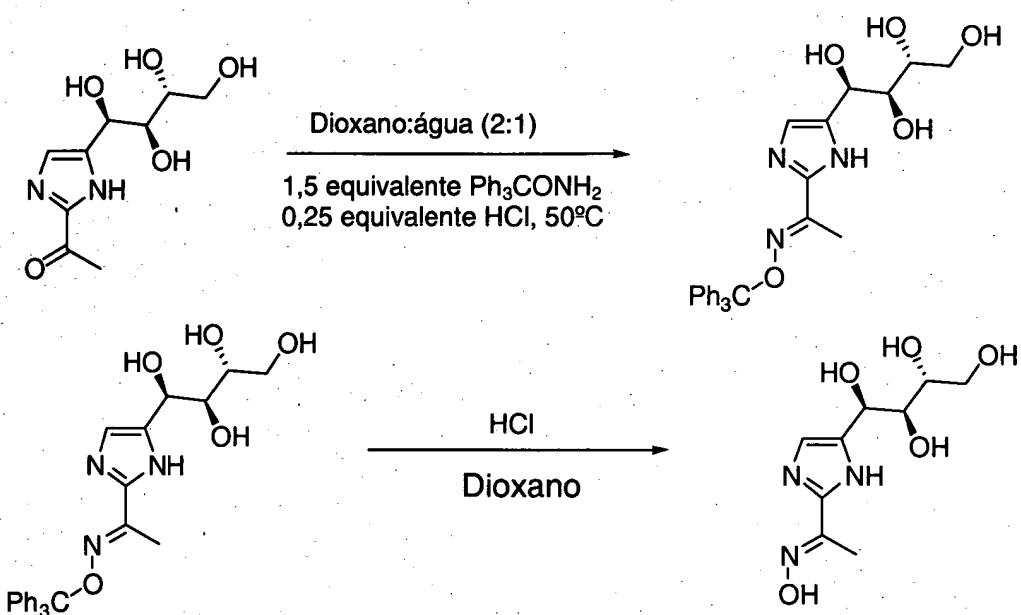
5 acetato de sódio (247,3 mg, 3,04 mmol, 2 eq.) foram adicionados, e a suspensão foi agitada a 50°C. A mistura reacional tornou-se clara após aproximadamente 4 horas. A agitação foi continuada a 50°C durante 16 horas. A análise de LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura reacional foi deixada atingir temperatura ambiente e pas-

10 sada através de um filtro de porosidade fino. Esta solução foi usada diretamente para purificar o produto usando HPLC preparativa: Coluna de sílica Atlantis HILIC 30 x 100mm; 2% - 21% de água em acetonitrilo durante 6 minutos; 45 ml/minuto; com detecção em 254 nm. As frações do produto foram colocadas e o acetonitrilo foi evaporado sob pressão reduzida. A solução aquosa foi liofilizada para produzir o produto, uma mistura de aproximadamente 3:1 anti:isômeros *Syn*, como um sólido branco: 284 mg (77%).

15 LCMS: Coluna Sunfire C-18, 4,6 x 50mm; 0 – 17% de MeOH (0,1% TFA) em água (0,1% TFA) durante 5 minutos; taxa de fluxo = 3 ml/minuto; Detecção 220nm; Tempos de retenção: 0,56 min (isômero *syn*, 246,0 (M+1)) e 0,69 minutos (anti isômero, 246,0 (M+1)). ¹H NMR (D₂O e DCl) δ 2,15 e 2,22 (singletos, 3H), 3,5 – 3,72 (m, 4H), 4,76 (br, prótons de OH e H₂O), 4,95 e 4,97 (singletos, 1H), 7,17 e 7,25 (singletos, 1H), ¹³C NMR (D₂O e DCl) δ 10,80, 16,76, 63,06, 64,59, 64,75, 70,86, 72,75, 72,85, 117,22, 117,64, 135,32, 138,39, 141,35, 144,12.

20 25 6.4. Síntese de oxima de (E)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroxibutyl)-1H-imidazol-2-yl)-etanona

Este composto foi preparado em duas etapas, como mostrado abaixo

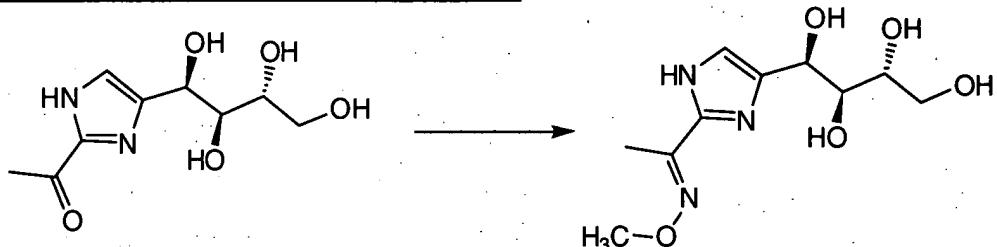


Primeiro, a um frasco carregado com TI (21,20 mmol, 4,88g) é adicionada água (25 ml) e 1N de HCl aquoso (21,2 ml, 21,2 mmol). Após todos os sólidos dissolverem, uma solução de hidroxilamina de tritila (25,44 mmol, 7.00 g) em dioxano (55 ml) foi adicionada e a reação foi mantida a 5 50°C durante 4 horas. Na conclusão, a reação foi resfriada temperatura ambiente e a solução foi ajustada ao pH=7 pela adição de 1N de NaOH aquoso. A solução neutralizada foi em seguida concentrada a uma massa plástica, que foi purificada por cromatografia *flash* em sílica gel [10% de MeOH/1% 10 NH₄OH (5% em peso de solução em água) em DCM] para fornecer o tritil-éter como plástico claro. Tratamento da massa plástica com hexano e concentração forneceram uma espuma branca, que pode ser secada a vácuo em um sólido flocoso (10,00 g, 97% de produção).

Segundo, a uma solução em temperatura ambiente, vigorosamente agitada do oxima-éter de tritila (4,8 g, 10 mmol) em dioxano (90 ml) é 15 adicionada uma solução de HCl em dioxano (4M, 60 ml). Após alguns minutos, um precipitado branco foi observado, e a agitação foi continuada durante um total de 30 minutos, antes da filtragem sobre um filtro de vidro fritado e enxágüe da massa com dioxano e éter. A massa foi redissolvida em água (200 ml), tratada com ondas sonoras durante 5 minutos, em seguida resfriada para 0°C, tratada com celita (5 g), e filtrada sobre um filtro de vidro filtrado. A solução aquosa foi concentrada até secura, em seguida isolada de 20

metanol (30 ml) / éter de dietila (60 ml) para fornecer a *E*-oxima como pó branco analiticamente puro (3,8 g, 80% de produção).

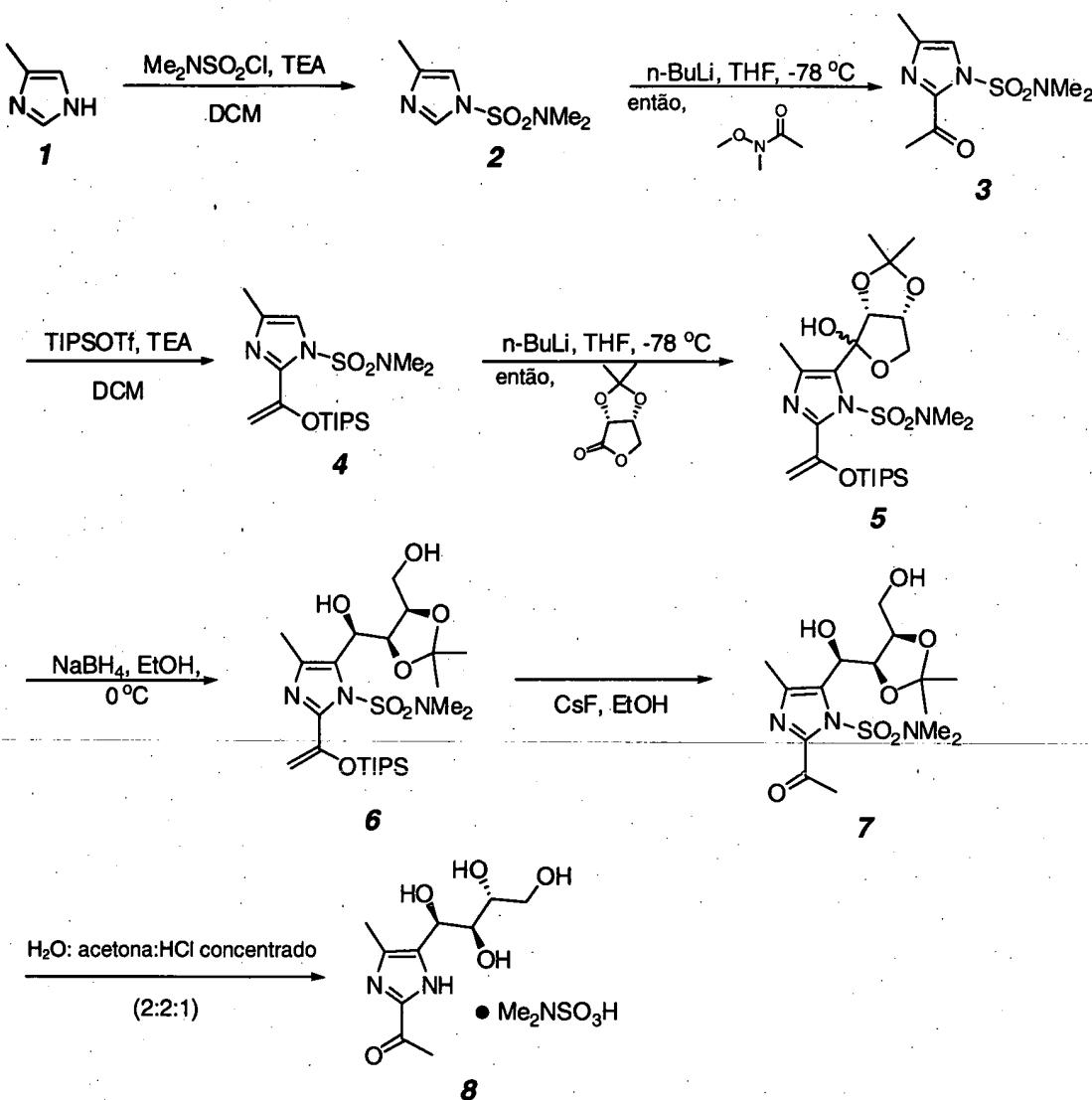
6.5. Síntese de oxima de O-metila de (Z)-1-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona



O composto capitulado foi preparado como descrito acima no Exemplo 6,3, usando hidrocloreto de metoxilamina no lugar de hidrocloreto de hidroxilamina, em 74% de produção. O produto foi um sólido fofo branco. LCMS: Coluna C-18 Sunfire, 4,6 x 50mm; 0 – 17% de MeOH (0,1% TFA) em água (0,1% TFA) durante 5 minutos; taxa de fluxo = 3 ml/minuto; Detecção 220 nm; Tempos de retenção: 1,59 minutos (isômero *syn*, 260,1 (M+1)) e 1,73 minutos (anti isômero, 260,1 (M+1)). ¹H NMR (D₂O) δ 2,18 e 2,22 (singletos, 3H), 3,54 – 3,60 (m, 1H), 3,66 – 3,79 (m, 3H), 3,94 e 3,95 (singletos, 3H), 4,76 (br, prótons de OH e H₂O), 4,93 e 4,97 (singletos, 1H), 7,17 e 7,25 (singletos, 1H), ¹³C NMR (D₂O) δ 11,55, 17,56, 62,32, 62,38, 62,99, 63,07, 67,09, 71,54, 73,86, 119,09, 138,64, 139,79, 142,95, 144,98, 148,97.

6.6. Síntese de 1-(5-metil-4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona

O composto capitulado foi preparado em sete etapas, usando o processo delineado abaixo.



- 4-Metilimidazol-1-dimetilaminossulfonamida (2):** A uma solução em temperatura ambiente de 4-metil imidazol **1** (3,00 g, 36,54 mmol) em tolueno (200 ml) foi consecutivamente adicionado trietilamina (5,6 ml, 40,20 mmol) e cloreto de N,N-dimetilaminossulfamoíla (3,9 ml, 36,54 mmol). O vaso foi armazenado em um refrigerador a 5°C durante 48 horas, em seguida os sólidos foram filtrados da reação e o líquido foi concentrado para obter uma mistura de 2,5:1 de regioisômeros **2** e **2a**. O produto cru foi purificado por cromatografia *flash* sobre sílica gel (80-100% de eluente de acetato de tiila:hexano) para obter um **2:2a** em uma mistura de regioisômeros de 5,5:1 (4,31 g; 62% de produção): $M+1=190,1$
- 4-Metil-2-acetilimidazol-1-dimetilaminossulfonamida (3):** A uma solução a -78°C do imidazol **2** (1,99 g, 10,54 mmol) em tetraidrofurano (70 ml) foi adicionada lentamente uma solução de *n*-BuLi em dioxano (2,5M, 11,60 ml).

Após 40 minutos, *N*-metoxi-*N*-metylacetamida (1,30 g, 12,65 mmol) foi adicionado gota a gota à solução resfriada. A reação foi deixada aquecer para temperatura ambiente e mantida durante 2 horas. Na conclusão, a reação foi saciada pela adição de NH₄Cl aquoso saturado (20 ml), em seguida diluída com água (20 ml). As camadas foram separadas, e a camada orgânica foi lavada com acetato de etila (2 x 30 ml). Os orgânicos combinados foram lavados com salmoura (20 ml), em seguida concentrados sobre MgSO₄ e concentrados. O produto cru foi purificado por cromatografia *flash* sobre sílica (60-80% de eluente de acetato de etila:hexano) para fornecer **3** como um óleo (1,85 g, 76% de produção): M+1 = 232,1.

4-Metil-2-(1-(triisopropilsililóxi)vinil)-1-dimetilaminossulfonamida (4): A uma solução de imidazol **3** (1,65 g, 7,14 mmol) em diclorometano (45 ml) foi consecutivamente adicionado trietilamina (1,00 ml, 14,28 mmol) e trifluorometanossulfonato de triisopropilsilila (2,12 ml, 7,86 mmol). A reação foi mantida em temperatura ambiente durante 20 horas, em seguida saciada pela adição de NaHCO₃ aquoso saturado (20 ml). A mistura foi diluída com água (20 ml) e as camadas foram separadas. A camada aquosa foi lavada com diclorometano (2 x 20 ml) e os orgânicos combinados foram lavados com solução de salmoura (20 ml), em seguida concentrados sobre MgSO₄ e concentrados. O óleo resultante foi purificado por cromatografia *flash* sobre sílica gel (1-2% de eluente de metanol:diclorometano) para fornecer éter de sililenol **4** como um óleo laranja (2,26 g, 83% de produção): M+1 = 388,2.

Lactol (5): A uma solução a -78°C de imidazol **4** (2,26 g, 5,84 mmol) em tetraidrofurano (40 ml) foi lentamente adicionada uma solução de hexano de *n*-BuLi (2,5M, 3,27 ml). Após 30 minutos, uma solução de (-)-2,3-*O*-isopropilidina-*D*-eritronolactona (1,66 g, 10,51 mmol) em tetraidrofurano (10 ml) foi adicionada lentamente à solução a -78°C. A reação foi mantida a -78°C durante 2 horas, em seguida deixada aquecer para 0°C antes da saciedade da reação pela adição de NH₄Cl aquoso saturado (20 ml). A mistura foi diluída com água (10 ml) e as camadas foram separadas. Os orgânicos foram lavados com acetato de etila (2 x 20 ml) e os orgânicos combinados foram lavados com salmoura (20 ml), em seguida concentrados sobre Mg-

SO₄ e concentrados. O produto cru foi purificado em sílica gel (30-50% de eluente de acetato de etila:hexano) para fornecer o lactol **5** (2,69 g, 85% de produção) como uma espuma branca: M+1 = 546,4.

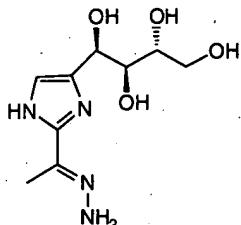
Diol (6): A umá solução a 0°C do lactol **5** (2,09 g, 3,83 mmol) em etanol (70 ml) foi adicionado NaBH₄ granular (1,4 g, 38,32 mmol) em algumas porções. Após 2 horas, a reação foi aquecida para temperatura ambiente durante 30 minutos, em seguida concentrada. O resíduo foi redissolvido em água (40 ml) e acetato de etila (40 ml). A mistura bifásica foi agitada vigorosamente durante 10 minutos, em seguida as camadas foram separadas. A camada aquosa foi lavada com acetato de etila (2 x 40 ml) e os orgânicos combinados foram lavados com salmoura (30 ml), em seguida concentrados sobre MgSO₄ e concentrados. A espuma branca foi purificado por cromatografia *flash* sobre sílica (5% de eluente de metanol:diclorometano) para fornecer diol **6** (1,88g, 90% de produção) como uma mistura de 3:1 de diastereômeros inseparáveis na posição benzílica: M+1 = 547,4.

Imidazol (7): Fluoreto de césio (315 mg, 2,08 mmol) foi adicionada a uma solução do imidazol **6** (567 mg, 1,04 mmol) em etanol (10 ml) e aquecido para 65°C. Após 1 hora, a reação foi resfriada para temperatura ambiente e tratada com NH₄Cl aquoso saturado (1 ml), em seguida concentrada. O produto cru foi purificado por cromatografia *flash* sobre sílica gel (5% de Metanol:diclorometano eluente) para fornecer imidazol **7** (380 mg, 94% de produção) como uma espuma branca: M+1 = 392,1.

Produto Final (8): O imidazol protegido **7** (380 mg, 0,97 mmol) foi dissolvida em acetona (6 ml) e consecutivamente tratada com água (6 ml) e HCl aquosa concentrada (3 ml). O vaso foi aquecido para 40°C durante 45 minutos, em seguida resfriado para temperatura ambiente e concentrado. O material cru foi purificado por cromatografia preparativa de fase reversa usando uma coluna 150mm x 30 mm Zorbax C-6 usando solventes não tamponados pelo método seguinte: ciclo de 1% de acetonitrilo:água isocrático durante 5 minutos ($T_R=1,52$ minutos). Segundo liofilização, Composto **8** foi obtido como o sal de ácido dimetilaminossulfâmico um amorfó sólido: M+1 = 245,1; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) maior δ 5,04 (d, 1H), 3,62 (comp, m, 2H), 3,42 (comp, m,

2H), 2,62 (s, 6H), 2,43 (s, 3H), 2,21 (s, 3H); menor δ 5,01 (d, 1H), 3,79 (comp, m, 2H), 3,55 (comp, m, 2H), 2,62 (s, 6H), 2,43 (s, 3H), 2,21 (s, 3H).

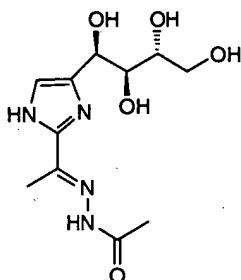
6.7. Síntese de (1R,2S,3R)-1-(2-(1-hidrazonoetil)-1H-imidazol-4-il)butano-1,2,3,4-tetraol



5 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidróxi-butil)-1H-imidazol-2-il]-etanona (Tl, preparado de acordo com Halweg, K.M. e Büchi, G., J. Org. Chem. 50:1134-1136 (1985)) (148 mg, 0,64 mmol) foi suspenso em metanol (3 ml) e água (1 ml). Hidrato de hidrazina (35 mg, 0,7 mmol, 1,2 eq.) e ácido acético (uma gota) foram adicionados, e a suspensão foi agitada a 50°C durante 6 horas. A análise de LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura reacional foi resfriada para temperatura ambiente e diluída com tetraidrofuran. O precipitado branco resultante foi coletado e lavado com tetraidrofuran para produzir o produto, uma mistura de aproximadamente 3:1 E:Z de isômeros, como um sólido branco: 90mg
10 (58%).

15 LCMS: Coluna Zorbax C-8, 4,6 x 150mm; 10 – 90% em água (10 mM acetato de amônio) durante 6 minutos; taxa de fluxo = 2 ml/minuto; Detecção 220nm; Tempos de retenção: 0,576 min (isômero *syn*, 245,0 (M+1)) e 1,08 minutos (anti isômero, 245,0 (M+1)). ^1H NMR (DMSO-d6) δ 2,5 (single-to, 3H sob DMSO), 3,4 – 3,7 (m, 4H), 4,3 (m, 2H), 4,6 (m, 2H), 4,8 (m, 1H), 4,9 e 5,0 (dupletos, 1H), 7,04 e 7,21 (singletos, 1H).

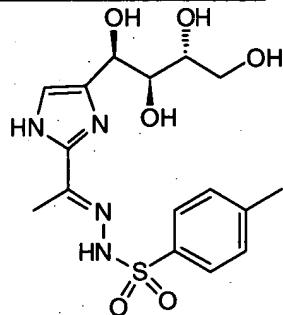
20 6.8. Síntese de N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)acetoidrazida



1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidróxi-butil)-1H-imidazol-2-il]-etanona (160 mg, 0,70 mmol) foi suspenso em metanol (3 ml) e água (1 ml). Hidrazida acética (56 mg, 0,75 mmol, 1,2 eq.) e ácido hidroclórico (uma gota, 12 N) foram adicionados, e a suspensão foi agitada a 50°C durante 48 horas. A análise de LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura reacional foi resfriada para temperatura ambiente e diluída com tetraidrofuran. O precipitado branco resultante foi coletado e lavado com tetraidrofuran para produzir o produto, uma mistura de aproximadamente 3:1 E:Z de isômeros, como um sólido branco: 129 mg (65%).

10 LCMS: Coluna C-18 Sunfire, 4,6 x 50mm; 2 – 20% em água (10 mM de acetato de amônio) durante 2,5 minutos; taxa de fluxo = 3,5 ml/minuto; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 0,53 minutos (287,1 (M+1)). ¹H NMR (DMSO-d6) δ 2,2 (singletos, 3H), 2,5 (singletos, 3H sob DMSO), 3,4 – 3,7 (m, 4H), 4,3 (br, 2H), 4,6-5,0 (br, 4H), 7,0 (br, 1H), 10,30 e 10,37 (singletos, 1H).

15 6.9. Síntese de (E)-4-metil-N'-(1-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzenossulfonoidrazida

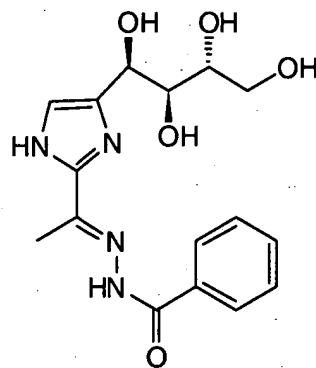


1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidróxi-butil)-1H-imidazol-2-il]-etanona (153 mg, 0,67 mmol) foi suspenso em metanol (3 ml) e água (1 ml). Hidrazida de p-toluenossulfonila (140 mg, 0,75 mmol, 1,2 eq.) e ácido hidroclórico (uma gota, 12 N) foram adicionados, e a suspensão foi agitada a 50°C durante 24 horas. A análise de LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura reacional foi resfriada para temperatura ambiente e carregada seca em sílica gel. Cromatografia *flash* em sílica gel (10g SiO₂, 4:1 acetato de etila:metanol) para produzir o produto, uma mistura de aproximadamente 85:15 E:Z de isômeros, como um sólido branco: 142 mg (53%).

LCMS: Coluna C-18 Sunfire, 4,6 x 50mm; 10-90% em água (10 mM de ace-

tato de amônio) durante 2,5 minutos; taxa de fluxo = 3,5 ml/minuto; Detecção 220nm; Tempos de retenção: 0,50 minutos (399,2 (M+1)) e 0,66 minutos (399,3 (M+1)). ^1H NMR (Metanol-d4) δ 2,2 (singletos, 3H), 2,41 e 2,45 (singletos, 3H), 3,6 – 3,85 (m, 4H), 4,99 e 5,05 (singletos, 1H), 7,09 (br s, 1H), 7,39 (d, 2H, j = 8 Hz), 7,77 e 7,87 (d, 2H, j = 8 Hz).

5 **6.10. Síntese de N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzoidrazida**

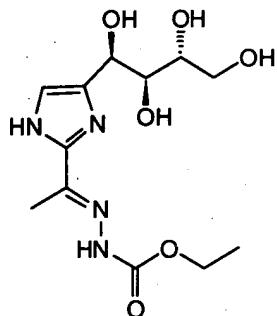


10 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidróxi-butil)-1H-imidazol-2-il]-etanona (150 mg, 0,65 mmol) foi suspenso em metanol (3 ml) e água (1 ml). Hidrazida de ácido benzóico (102 mg, 0,75 mmol, 1,2 eq.) e ácido hidroclórico (uma gota, 12 N) foram adicionados, e a suspensão foi agitada a 50°C durante 18 horas. A análise de LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura reacional homogênea foi resfriada para temperatura ambiente e concentrada a vácuo. SPE de Fase Reversa C-

15 18 (10g de Alltech Hi-load C18, gradiente de água a 20% de Metanol/água) para produzir o produto, uma mistura de aproximadamente 1:1 E:isômeros Z, como um sólido incolor: 193 mg (85%).

LCMS: Coluna C-18 Sunfire, 4,6 x 50mm; 10-90% em água (10 mM de acetato de amônio) durante 2,5 minutos; taxa de fluxo = 3,5 ml/minuto; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 0,49 minutos (349.2 (M+1)). ^1H NMR (Metanol-d4) δ 2,2 (singletos, 3H), 2,42 e 2,45 (singletos, 3H), 3,6 – 3,85 (m, 4H), 5,11 e 5,14 (singletos, 1H), 7,30 (br s, 1H), 7,40-7,7 (m, 4H), 7,80 e 7,95 (m, 2H), 8,1 (br s, 1H).

20 **6.11. Síntese de (E)-etil 2-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)hidrazinacarboxilato**

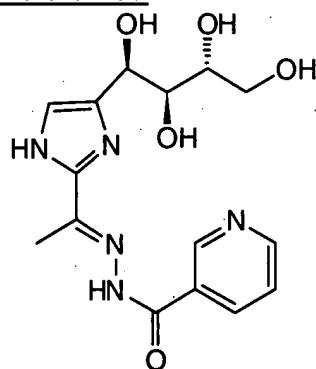


1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroxibutyl)-1H-imidazol-2-il]-etanona (150 mg, 0,65 mmol) foi suspenso em metanol (3 ml) e água (1 ml). Carbazato de etila,

(78 mg, 0,75 mmol, 1,2 eq.) e ácido hidroclórico (uma gota, 12 5 N) foram adicionados, e a suspensão foi agitada a 50°C durante 18 horas. A análise de LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura reacional foi resfriada para temperatura ambiente, concentrada a vácuo, e diluída com acetona. O precipitado branco resultante foi coletado e lavado com acetona para produzir o produto, um isômero aparente, como um sólido branco: 96mg (47%).

LCMS: Coluna C-18 Sunfire, 4,6 x 50mm; 2 – 20% em água (10 mM acetato de amônio) durante 2,5 minutos; taxa de fluxo = 3,5 ml/minuto; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 0,25 min (317,35 (M+1)). ¹H NMR (Metanol-d4) δ 1,36 (t, 3H, *j* = 8 Hz), 2,28 (s, 3H), 2,42 e 2,45 (singletos, 3H), 3,60 – 3,85 (m, 4H), 4,34 (dd, 2H, *j* = 8 Hz), 5,08 (s, 1H), 7,27 (s, 1H).

15 6.12. Síntese de (E)-N¹-(1-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroxibutyl)-1H-imidazol-2-il)etilideno)nicotinoidrazida

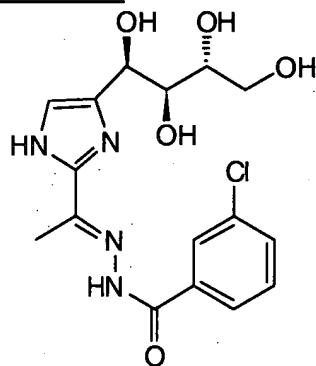


20 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroxibutyl)-1H-imidazol-2-il]-etanona (215 mg, 0,93 mmol) foi suspenso em metanol (3 ml) e água (1 ml). Hidrazida de ácido nicotínico (137 mg, 1,0 mmol, 1,1 eq.) e ácido hidroclórico

(uma gota, 12 N) foram adicionados, e a suspensão foi agitada a 50°C durante 48 horas. A análise de LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura reacional foi resfriada para temperatura ambiente, e parcialmente concentrada *a vácuo*. O precipitado branco resultante foi coletado e lavado com água para produzir o produto, um isômero aparente, como um sólido branco: 311 mg (95%).

5 LCMS: Coluna C-18 Sunfire, 4,6 x 50mm; 10 – 90% em água (10 mM acetato de amônio) durante 2,5 minutos; taxa de fluxo = 3,5 ml/minuto; Detecção 220nm; Tempo de retenção: 0,22 min (350,27 (M+1)), ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10 2,37 (s, 3H), 3,60 – 3,85 (m, 4H), 4,40 (m, 2H), 4,71 (m, 1H), 5,01 (m, 2H), 5,16 (m, 1H), 7,25 (br, 1H), 7,64 (br, 1H), 8,35 (br, 1H), 8,80 (br, 1H), 9,14 (br, 1H).

15 6.13. Síntese de 3-cloro-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzoidrazida

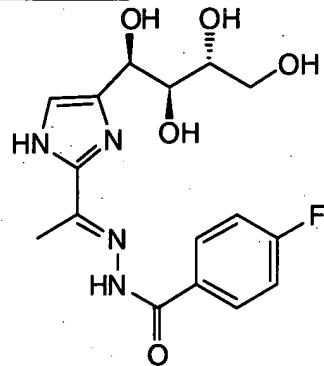


15 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidróxi-butil)-1H-imidazol-2-il]-etanona (194 mg, 0,84 mmol) foi suspenso em etanol (4 ml) e água (1 ml). 3-cloroidrazida de ácido benzóico (170 mg, 1,0 mmol, 1,2 eq.) e ácido hidroclórico (uma gota, 12 N) foram adicionados, e a suspensão foi agitada a 50°C durante 48 horas. A análise de LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura reacional foi resfriada para temperatura ambiente, e parcialmente concentrada *a vácuo*. O precipitado branco resultante foi coletado e lavado com etanol para produzir o produto, como uma mistura de ~3:1 E:Z, como um sólido branco: 108 mg (33%).

20 LCMS: Coluna C-18 Sunfire, 4,6 x 50mm; 10– 90% em água (10 mM acetato de amônio) durante 2,5 minutos; taxa de fluxo = 3,5 ml/minuto; Detecção 220nm; Tempo de retenção: 0,63 minutos (383,23 (M+1)), ¹H NMR (Metanol-

d4) δ 2,44 (s, 3H), 3,60 – 3,90 (m, 4H), 5,12 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,65 (m, 2H), 8,04 (m, 2H).

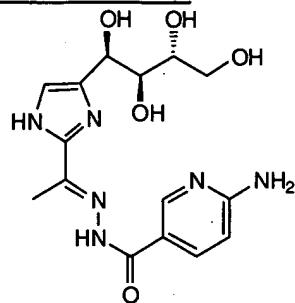
6.14. Síntese de (E)-4-flúor-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzoidrazida



5 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidróxi-butil)-1H-imidazol-2-il]-etanona (172 mg, 0,74 mmol) foi suspenso em etanol (4 ml) e água (1 ml). 4-Fluoroidrazida de ácido benzóico (131 mg, 0,85 mmol, 1,1 eq.) e ácido hidroclórico (uma gota, 12 N) foram adicionados, e a suspensão foi agitada a 10 55°C durante 48 horas. A análise de LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura reacional foi resfriada para temperatura ambiente, e parcialmente concentrada *a vácuo*. O precipitado branco resultante foi coletado e lavado com etanol para produzir o produto, como 15 um isômero aparente, como um sólido branco: 97 mg (35%).

LCMS: Coluna C-18 Sunfire, 4,6 x 50mm; 10– 90% em água (10 mM acetato de amônio) durante 2,5 minutos; taxa de fluxo = 3,5 ml/minuto; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 0,55 min (367.24 (M+1)). ^1H NMR (Metanol-d4, uma gota DCl) δ 2,55 (s, 3H), 3,60 – 3,90 (m, 4H), 5,22 (s, 1H), 7,30 (m, 2H), 7,54 (s, 1H), 8,08 (m, 2H).

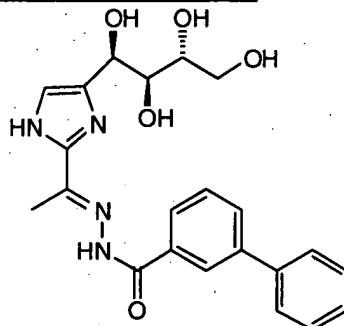
6.15. Síntese de (E)-6-amino-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)nicotinoidrazida



- 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidróxi-butil)-1H-imidazol-2-il]-etanona (115 mg, 0,50 mmol) foi suspenso em etanol (4 ml) e água (1 ml). Hidrazida substituída (91 mg, 0,6 mmol, 1,2eq.) e ácido hidroclórico (uma gota, 12 N) foram adicionados, e a suspensão foi agitada a 55°C durante 48 horas. A análise de LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura reacional foi resfriada para temperatura ambiente, e parcialmente concentrada *a vácuo*. O precipitado branco resultante foi coletado e lavado com etanol para produzir o produto, como um isômero aparente, como um sólido branco: 136 mg (75%).
- 10 LCMS: Coluna C-18 Sunfire, 4,6 x 50mm; 10– 90% em água (10 mM acetato de amônio) durante 2,5 minutos; taxa de fluxo = 3,5 ml/minuto; Detecção 220nm; Tempo de retenção: 0,15 min (365.32 (M+1)). ¹H NMR (Metanol-d4, uma gota DCI) δ 2,58 (s, 3H), 3,60 – 3,90 (m, 4H), 5,22 (s, 1H), 7,17 (m, 1H), 7,54 (m, 1H), 8,44 (m, 1H), 8,68 (m, 1H).
- 15 6.16. Síntese de (E)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)isonicotinoidrazida
-
- 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidróxi-butil)-1H-imidazol-2-il]-etanona (168 mg, 0,73 mmol) foi suspenso em etanol (4 ml) e água (1 ml). Hidrazida isonicotínica (110 mg, 0,80 mmol, 1,1eq.) e ácido hidroclórico (uma gota, 12 N) foram adicionados, e a suspensão foi agitada a 55°C durante 24 horas. A análise de LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura reacional foi resfriada para temperatura ambiente, e parcialmente concentrada *a vácuo*. O precipitado branco resultante foi coletado e lavado com etanol para produzir o produto, como um isômero aparente, como um sólido branco: 136 mg (75%).
- LCMS: Coluna C-18 Sunfire, 4,6 x 50mm; 10– 90% em água (10 mM acetato

de amônio) durante 2,5 minutos; taxa de fluxo = 3,5 ml/minuto; Detecção 220nm; Tempo de retenção: 0,15 min (365,32 (M+1)), ¹H NMR (Metanol-d4, uma gota DCl) δ 2,63 (s, 3H), 3,60 – 3,90 (m, 4H), 5,12 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 8,63 (d, 2H, *j* = 8 Hz), 9,14 (d, 2H, *j* = 8 Hz).

5 6.17. Síntese de (E)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)bifenil-3-carboidrazida



10 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidróxi-butil)-1H-imidazol-2-il]-etanona (315 mg, 1,36 mmol) e bifenil-3-carboidrazida (360 mg, 1,81 mmol) foram suspensos em DMSO (2 ml). ácido hidroclórico concentrado (duas gotas) foi adicionado, e a suspensão foi agitada a 40°C durante 5 horas. A análise de LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura reacional foi resfriada para temperatura ambiente, diluída com metanol e purificada por HPLC de fase reversa (10 mM NH₄OAc / acetona). Duas frações (isômeros E e Z) da massa desejada foram colocadas separadamente e liofilizadas. A fração um forneceu um sólido branco, 95 mg (16%). A fração dois foi um sólido branco, 82 mg (14%).

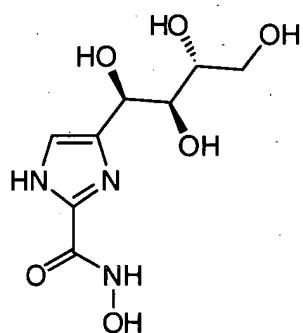
15 Fração um: Coluna HPLC Zorbax C-8 analítica, 4,6 x 150mm; Solvente A = 10 mM acetato de amônio; Solvente B = MeCN; 5% de B em 0 minuto, 5% de B em 1 minuto, 90% de B em 3 minutos, parada de 4 minutos; taxa de fluxo = 3 ml/minuto; Detecção 220 nm; Tempo de retenção : 2,9 minutos (nota: contém ~5% do outro isômero). M+H = 425,28, ¹H NMR (DMSO-d6 com 2 gotas de D₂O) δ 2,3 (singlet, 3H) , 3,3 – 3,7 (m, 4H), 4,9 (m, 1H), 7,19 (s, 1H), 7,37 (m, 1H) 7,47 (m, 2H), 7,67 (m, 3H), 7,85-7,92 (m, 2H) e 8,15 (s, 1H). HSQC da mesma amostra correlacionada ao sinal do próton em 2,3 (CH₃) com um sinal de carbono em 20 ppm.

20 Fração dois: Coluna HPLC Zorbax C-8 analítica, 4,6 x 150mm; Solvente A =

10 mM de acetato de amônio; Solvente B = MeCN; 5% de B em 0 minuto, 5% de B em 1 minuto, 90% de B em 3 minutos, parada de 4 minutos; taxa de fluxo = 3 ml/minuto; Detecção 220 nm; Tempo de retenção : 2,963 minutos (nota: contém ~6% do outro isômero). M+H = 425,28, ¹H NMR (DMSO-d₆

5 com 2 gotas de D₂O) δ 2,4 (singlet, 3H), 3,4 – 3,6 (m, 4H), 4,77 e 4,86 (singletos amplos, combinado = 1H), 6,9 e 7,1 (singletos amplos, combinado = 1H), 7,40 (m, 1H) 7,50 (m, 2H), 7,61 (m, 1H), 7,73 (m, 2H), 7,87 (m, 2H) e 8,10 (s, 1H). HSQC da mesma amostra correlacionada ao sinal do próton em 2,4 (CH₃) com um sinal de carbono em 13 ppm.

10 6.18. Síntese de N-hidróxi-4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-carboxamida



1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidróxi-butil)-1H-imidazol-2-il]-etanona (18 g, 78,3 mmol) foi suspenso em dicloroetano (160 ml) e 2,2-dimetóxi propano (160 ml). Ácido 4-toluenossulfônico (3 g) foi adicionado e a mistura agitada a 70°C durante 18 horas. A reação foi diluída com diclorometano e lavada com água, 5% de bicarbonato, salmoura e em seguida carregado seco sobre SiO₂. Purificação por cromatografia *flash* (hexano / acetato de etila) forneceu 1-(4-((4S,4'R,5R)-2,2,2',2'-tetrametil-4,4'-bi(1,3-dioxolan)-5-il)-1H-imidazol-2-il)etanona como um óleo incolor (18,8 g, 60,6 mmol, 77%);

20 M+H cálculo: 311,4, obs: 311,3).

O produto obtido acima (20 g, 64,5 mmol) foi dissolvido em DMF. K₂CO₃ foi adicionado (12,5 g, 90,3 mmol) seguido por brometo de benzila (10,7 ml, 90,3 mmol). A reação foi aquecida a 50°C durante 18 horas. Análise de LC/MS indicou resto de material de partida. Uma porção adicional de brometo de benzila (5 ml, 42 mmol) foi adicionada e a temperatura aumentada para 60°C. Após 3 horas a reação foi saciada com água fria e extraída

com acetato de etila. Os extratos orgânicos foram lavados com água, em seguida salmoura, secados sobre sulfato de sódio, e carregados sobre sílica gel. Cromatografia *flash* (20 a 40% de acetato de etila em hexano) forneceu 1-(1-benzil-4-((4S,4'R,5R)-2,2,2',2'-tetrametil-4,4'-bi(1,3-dioxolan)-5-il)-1H-imidazol-2-il)etanona (16,1 g, 62%).

O intermediário obtido (13g, 32,5 mmol) foi dissolvido em dioxano (120 ml) e tratado com NaOH (13,2 g) dissolvido em dissolvido em branqueamento comercial (200 ml, 6% de NaOCl). Após 2 horas de agitação vigorosa, a reação foi extraída com acetato de etila. Os extratos orgânicos foram lavados com salmoura em seguida concentrados sobre celite. Filtração e evaporação forneceu um sólido que foi também secado a vácuo para fornecer ácido 1-benzil-4-((4S,4'R,5R)-2,2,2',2'-tetrametil-4,4'-bi(1,3-dioxolan)-5-il)-1H-imidazol-2-carboxílico (13 g, produção quantitativa, cálculo M+H: 403,2, obs: 403,2).

O produto obtido acima (600 mg, 1,49 mmol), O-tritilidroxilamina (820 mg, 2,98 mmol), EDAC (430 mg, 2,24 mmol) e HOBt (305 mg, 2,24 mmol) foram combinados com DMF (8 ml) e trietilamina (622 μ l, 4,47 mmol). A reação foi agitada em temperatura ambiente durante 22 horas, concentrada e em seguida carregada sobre sílica usando DCM / MeOH. Cromatografia *flash* (MeOH / DCM) forneceu 1-benzil-4-((4S,4'R,5R)-2,2,2',2'-tetrametil-4,4'-bi(1,3-dioxolan)-5-il)-N-(tritilóxi)-1H-imidazol-2-carboxamida (480 mg, 0,73 mmol, 49%, cálculo M+H: 660,3, obs: 660,4).

O produto obtido acima (480 mg, 0,73 mmol) foi dissolvido em etanol (50 ml). Pd(OH)₂ (500 mg, 20% sobre carbono, úmido) foi adicionado e a reação agitada sob H₂ (**65 psi**) durante 18 horas e filtrada. Etanol foi removido a vácuo. O resíduo foi dissolvido em DCM e purificado por cromatografia *flash* (MeOH / DCM) para fornecer N-hidróxi-4-((4S,4'R,5R)-2,2,2',2'-tetrametil-4,4'-bi(1,3-dioxolan)-5-il)-1H-imidazol-2-carboxamida (150 mg, 0,46 mmol, 63%, cálculo M+H: 328,1, obs: 328,3).

O produto obtido acima (150 mg, 0,46 mmol) foi dissolvido em acetona (8 ml) e água (8 ml). A reação foi resfriada para uma temperatura interna de -15°C usando um gelo seco / banho de acetona. HCl concentrado

- (3 ml) foi adicionada em uma taxa tal que a temperatura interna restante foi abaixo de -10°C. O banho gelado foi removido e a reação agitada em temperatura ambiente durante 3 horas, a 4°C durante 18 horas e novamente em temperatura ambiente durante 7 horas. Após remoção da acetona e alguma
- 5 água a vácuo, um precipitado formou-se. Dioxano (20 ml) foi adicionado seguido por THF (10 ml). O sólido foi isolado por filtração, lavado com THF / dioxano e secado a vácuo para fornecer N-hidróxi-4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-carboxamida como o sal de hidrocloreto (98 mg, 0,40 mmol, 87%).
- 10 Espectroscopia de massa: cálculo M+H: 248,1, obs: 248,2. HPLC analítico: Luna Fenil-Hexila, 5 um, 4,6x50 mm, 10 mM de acetato de amônio isocrático com 1% de acetonitrilo, taxa de fluxo = 3 ml/minuto, 220 nm de detecção, tempo de retenção = 0,245 minutos. ^1H NMR (DMSO-d6) δ 3,37-3,64 (m, 4H), 4,96 (singleto amplo, 1H), 7,47 (s, 1H), 11,9 (singleto amplo, 1H).
- 15 6.19. Avaliação dos Efeitos sobre os Linfócitos em Camundogos

Os compostos foram administrados por gavagem oral ou em água potável. Para experimentos de dosagem oral, os compostos foram ressuspendidos a partir de cristais em 10 mg/ml em veículo (por exemplo, água). Aos camundongos (Híbridos de F1 de linhagem 129/B6) foi fornecida gavagem com uma dose única de 100 mg/kg dose de composto (equivalente a 20 100 mpk da base livre para cada composto) ou um controle de apenas um veículo, e retornaram as suas gaiolas. Os camundongos foram anestesiados utilizando isofluorano dezoito horas após a dosagem e os tecidos foram coletados para análise como descrito abaixo. Para estudos de água potável, os 25 compostos foram dissolvidos em 50 mg/L em água acidificada (pH = 2,8) contendo 10 g/L de glicose. Os camundongos foram permitidos livre acesso à água contendo composto (ou solução de glicose com um controle) durante 72 horas. Ao término das 72 horas, os tecidos foram coletados para análise.

As avaliações de CBC foram obtidas como segue. Os camundongos foram anestesiados com isofluorano e o sangue foi coletado do plexo retro-orbital em tubos de coleta de EDTA (Capiject-MQK, Terumo Medical Corp., Elkton, MD). Análise de CBC automatizada foi realizada utilizando um

instrumento Cell-Dyn 3500 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL) ou um Hemavet 850 (Drew Scientific, Inc., Oxford, CT).

As avaliações de citometria de fluxo (FACS) foram obtidas como segue. Vinte e cinco μ l de sangue total foram lisados por choque hipotônico, 5 lavados uma vez em 2 ml de tampão de lavagem de FACS (FWB: PBS/0,1% BSA/0,1% de NaN₃/2mM de EDTA) e manchados durante 30 minutos a 4°C no escuro com uma combinação de anticorpos conjugados com fluorocromo diluídos em 50 μ l de FWB. Após o manchamento, as células foram lavadas uma vez com 2 ml de FWB e ressuspensas em 300 μ l de FWB para aquisição. 10

Procedimentos padrão para remoção não estéril de baço e timo foram seguidos. Os órgãos foram dispersos em suspensões de célula única forçando o tecido através de um coador celular de 70 μ m (Falcon, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Para análise de FACS, RBCs foram lisados por lise hipotônica, lavados, e células 1×10^6 foram incubadas com 10 μ l de anti-CD16/CD32 (Fc BlockTM, BD-PharMingen, San Diego, CA) (1/10 diluição em FWB) durante 15 minutos a 4°C. As células foram manchadas com uma combinação de anticorpos conjugados com fluorocromo diluídos em 50-100 μ l de FWB, adicionados diretamente às células em Bloco Fc, durante 30 15 minutos a 4°C no escuro. Após manchamento as células foram lavadas uma vez com 1 ml de FWB, e ressuspensas em 300 μ l de FWB para aquisição. Todos os anticorpos foram adquiridos de BD-PharMingen, San Diego, CA a menos que de outro modo especificado. As amostras forma analisadas utilizando um citômetro de fluxo FACSCalibur e software CellQuest Pro (Becton 20 Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

Misturas de anticorpos usadas para o timo foram: TCRb APC Cy7; CD4 APC; CD8 PerCP; CD69 FITC; e CD62L PEI. Misturas de anticorpos usadas para baço e sangue foram: B220 PerCP; TCRb APC; CD4 APC Cy7; CD8 PE Cy7; CD69 FITC; e CD62L PE.

30 6.20. Avaliação de Efeitos sobre os Níveis de S1P em Camundogos

Os níveis de S1P em baços de camundongos (Híbridos de F1 de linhagem 129/B6) foram avaliados utilizando uma adaptação do ensaio de

ligação de rádio-receptor descrito em Murata, N., e outro, Anal. Biochem. 282:115-120 (2000). Este método utilizou células HEK293F superexpressando Edg-1, um dos subtipos de receptor de S1P, e foi baseado na competição de S1P rotulado e S1P não rotulado em uma determinada amostra.

5 As células HEK293F foram transfectadas com um vetor de expressão de (Edg-1) receptor S1P pEFneo e um clone de célula resistente a G418 foi selecionado. As células HEK293F expressando Edg-1 foram cultivadas em 12 multiplacas em DMEM contendo 5 % (volume/volume) de FBS em uma atmosfera de ar umidificado:CO₂ (19:1). Vinte quatro horas antes do
10 experimento, o meio foi alterado para DMEM fresco (sem soro) contendo 0,1% (peso/volume) de BSA.

Dezoito horas após o composto teste ser administrado, os camundongos foram sacrificados e seus baços foram removidos e congelados. S1P foi obtido a partir dos tecidos congelado utilizando métodos conhecidos. 15 Veja, por exemplo, Yatomi, Y., e outro, FEBS Lett. 404:173-174 (1997). Em particular, 10 baços de camundongo em 1 ml de tampão de fosfato gelado de 50 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de EGTA, 1mM de DTT e inibidores de protease completa Roche foram homogeneizados três vezes em intervalos de um minuto em gelo. O resultado é centrifugado em 2500 rpm e 4°C durante 10 minutos para remover resíduos celulares. O sobrenadante foi em seguida ultracentrifugado a 45000 rpm e 4°C em um rotor 70Ti durante 1 hora para diminuir as proteínas associadas com membrana. O sobrenadante foi descartado, e a pélete foi de ressuspensa em volume mínimo (~1 ml) de tampão de fosfato gelado de 50 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de EGTA, 1 20 mM de DTT e 33% de glicerol com inibidores de protease completa Roche presentes. A concentração total de proteína foi avaliada utilizando o ensaio Bradford.

S1P foi extraído de clorofórmio/KCl/NH₄OH (pH ~ 12), e a fase aquosa superior é mantida. Ela foi em seguida extraída em clorofórmio/metanol/HCl (pH < 1), e a fase orgânica inferior foi mantida e evaporada para fornecer S1P, que foi estocada em um freezer até o uso. Exatamente antes do ensaio, a amostra secada foi dissolvida por sonicação em um tam-

pão aglutinante consistindo em 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM de NaCl, 15 mM de NaF, e 0,4 % (peso/volume) BSA.

O teor de S1P de uma amostra foi avaliado por um ensaio de ligação de radioreceptor com base em uma ligação competitiva de [³³P]S1P com S1P na amostra em células expressando Edg-1. Células HEK293F expressando Edg-1 em 12 multiplacas confluentes foram lavadas duas vezes com tampão de ligação gelado e em seguida incubadas com o mesmo tampão contendo 1 nM de [³³P]S1P (cerca de 18,00 dpm por cavidade) e doses aumentadas de S1P autêntico ou amostra teste em um volume final de 0,4 ml. As placas foram mantidas em gelo durante 30 minutos, e as células foram lavadas duas vezes com o mesmo tampão de ligação gelado para remover o ligando não ligado. As células foram solubilizadas com uma solução composta de 0,1 % de SDS, 0,4 % de NaOH, e 2 % de Na₂CO₃, e a radioatividade foi contada por um contador de cintilação líquida. O teor de S1P no ensaio foi bem estimado por extrapolação da curva de deslocamento padrão. O teor de S1P na(s) amostra(s) teste inicial(is) foi calculado multiplicando-se o valor obtido da curva padrão pela eficiência recuperada extração de S1P e do fator de diluição.

6.21. Efeitos de Compostos sobre os Linfócitos em Camundogos

Utilizando os métodos acima descritos, os efeitos *in vivo* de vários compostos foram determinados. Como mostrado nas Figuras 1-3, quando administrados aos camundongos (Híbridos F1 de linhagem 129/B6) em água potável, tanto TI quanto um composto representativo da invenção (Composto 1) reduziram a saída de linfócito do timo.

A figura 4 mostra os efeitos de controle de veículo (água potável), TI, composto 1, e 1-(4-metil-5-((1S,2R,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)tiazol-2-il)etanona (Composto 2) sobre as contagens de sangue total. Interessantemente, os efeitos *in vivo* reportados por Pyne (WO 97/46543) para Composto 2 não foram observados.

6.22. Modelo de Artrite Induzida por Colágeno

Artrite induzida por colágeno (CIA) é um modelo amplamente usado de artrite reumatóide (RA), uma doença da articulação causada por

processos autoimunes e inflamatórios. Veja, geralmente, Wooley P.H. e outro, J. Immunol. 135(4):2443-2451; A. Persidis, Nature Biotechnology 17:726-728; Current Protocols in Immunology (John Wiley & Son, Inc. 1996). Estudos anteriores estabeleceram uma hierarquia de sensibilidade à CIA 5 ligada a certos haplótipos de H-2. Mais recentemente, Campbell e colaboradores re-avaliaram CIA em camundongos C57BL/129sv (H-2b) e descobriram que camundongos derivados da base C57B6 podem desenvolver CIA. Campbell I. K, e outros. Eur. J. Immunol. 30: 1568-1575 (2000).

Aqui, colágeno para injeção, 2mg/ml de colágeno tipo II de frango (CII) (Sigma), foi dissolvido em 10 mM de ácido acético agitando-se durante a noite a 4°C. Adjuvante de Freund completo (CFA) foi adquirido pronto (Sigma). Utilizando uma seringa de vidro, CII foi emulsificado em um volume igual de CFA exatamente antes da imunização. Para imunizar os camundongos, uma seringa de vidro e agulha 26G foram usadas, e os camundongos foram injetados com emulsão de CII/CFA intradermicamente na base da cauda. CFA e 100 µg de CII de frango em um volume total 50 µl de CFA foram usados para cada injeção. Uma imunização formentadora de 100 µg de CII emulsificado em CFA foi fornecida através da mesma rotina 3 semanas 10 apóis a imunização primária.

20 Injeção do colágeno induziu à intumescência da almofada da pata e articulação de camundongos. Os camundongos foram inspecionados a cada dois a três dias durante o início da artrite, que foi avaliada por combinação de avaliações de compasso da espessura da almofada da pata traseira e avaliação visual das articulações das patas traseiras afetadas. A progressão de CIA foi seguida durante 10 semanas apóis o início da doença, tempo apóis o qual a doença foi avaliada por histologia das articulações. Os camundongos foram negativamente considerados para artrite se eles não desenvolveram CIA dentro de 150 dias de imunização de colágeno tipo II.

30 A presença ou ausência de artrite em camundongos foi determinada por um sistema de classificação visual estabelecido. Em CIA de camundongos, qualquer ou as quatro podem ser afetadas. A inflamação em seu pico estende-se do tornozelo em todo o caminho através das digitais, e

é caracterizada por eritema e intumescência extrema. Assim que a artrite apareceu, cada pata foi examinada 2 a 3 vezes por semana. Para avaliar a gravidade da inflamação, a classificação visual amplamente usada de 0 a 4 foi de usada, em que: 0 = normal, nenhuma evidência de eritema e; 1 = eritema e intumescência branda confinada ao meio do pé ou articulação do tornozelo ou digitais individuais; 2 = eritema e intumescência branda estendendo-se ao tornozelo e o meio do pé ou intumescência em mais do que um digital; 3 = eritema e intumescência moderada estendendo-se do tornozelo às articulações metatarsais; e 4 = eritema e intumescência grave abrangendo o tornozelo, pé e digitais.

6.23. Efeito sobre o Modelo de Artrite Induzida por Colágeno

O efeito de um composto da invenção no modelo de CIA como determinado utilizando 30 camundongos (Híbridos F1 de linhagem 129/B6) no modelo acima descrito. Os camundongos foram aleatoriamente divididos em dois grupos cegados, que receberam 0 mpk (controle de veículo) ou 100 mpk do composto. O veículo foi água destilada, estéril. O controle de veículo foi dosado em 10 μ l/g de peso corporal.

A dosagem foi realizada uma vez ao dia por gavagem oral. Ela começou três dias antes da iniciação do experimento de CIA, e continuou durante toda a duração do experimento. A figura 5 mostra o efeito do composto sobre CIA durante o tempo, em que a marca acumulativa é a soma das marcas do membro dianteiro e tornozelo.

6.24. O Efeito de um Composto em Macacos

O efeito de um composto da invenção em vinte macacos cincos, machos, que receberam tratamento, foi investigado por Covance Research Products Inc. (Alice, TX). Cada animal foi identificado com uma tatuagem individualmente numerada. Os animais foram aclimados durante aproximadamente 11 dias antes da administração de dose. No momento da administração de dose, os animais foram considerados ser adulto jovem /adulto idoso.

Durante a aclimação e o período teste, os animais foram alojados em gaiolas individuais. Os animais não foram misturados durante pelo

menos 48 horas após a administração da dose para permitir o monitoramento de quaisquer efeitos relacionados com veículos ou artigos teste. Os animais tinham acesso à dieta de primata não certificada *ad libitum*, exceto como especificado para a administração de dose. Frutas e outros prazeres foram também fornecidos, como apropriados, durante períodos de não jejum. Água foi fornecida *ad libitum*.

O composto testado foi armazenado protegido da luz em um recipiente selado em dessecante sob condições ambientais (temperatura ambiente aproximada). Água destilada foi fornecida por Covance para administração oral a animais no grupo de controle de veículo. As formulações de dose de artigo teste para o teste foram preparadas no dia da administração. Para cada grupo, uma quantidade apropriada do artigo teste foi pesada e um volume apropriado de água destilada.

Todos os animais foram jejuados durante a noite antes da dosagem durante aproximadamente 4 horas após a dose. As doses individuais foram calculadas com base nos pesos corporais tirados no dia da administração de dose.

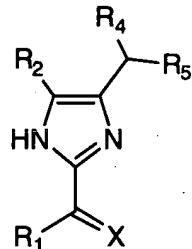
A dose oral foi administrada por meio de intubação nasogástrica. Antes da abstinência o tubo de gavagem foi inundado com aproximadamente 5 ml de água. Para análise de hematologia, sangue (aproximadamente 0,5 ml) foi coletado de cada animal antes da dose (Dia -7), antes da dose (Dia -3), e em 8, 16, 24, 32, e 48 horas após a dose. Os testes de hematologia de sangue total foram realizados utilizando as amostras frescas obtidas no dia da coleta.

Como mostrando na figura 6, uma dose oral única dose do composto teve um significante efeitos sobre as contagens de linfócitos e célula sanguínea branca dos macacos, quando avaliados 32 horas após a dosagem.

Algumas Publicações, Patentes e Pedidos de Patentes são aqui incorporados por referência em suas totalidades.

REIVINDICAÇÕES

1. Agente de redução de linfócito circulante de Fórmula I:



ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato (por exemplo, hidrato) deste, em que:

5 X é O ou NR₃;

R₁ é OR_{1A}, NHOH, hidrogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

10 R₂ é OR_{2A}, C(O)OR_{2A}, hidrogênio, halogênio, nitrilo, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

R₃ é OR_{3A}, N(R_{3A})₂, NHC(O)R_{3A}, NHSO₂R_{3A}, ou hidrogênio;

15 R₄ é OR_{4A}, OC(O)R_{4A}, hidrogênio, halogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

R₅ é N(R_{5A})₂, hidrogênio, hidróxi, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; e

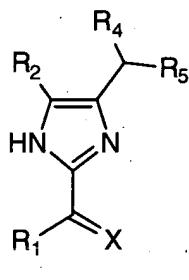
20 cada qual de R_{1A}, R_{2A}, R_{3A}, R_{4A}, e R_{5A} é independentemente hidrogênio ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

com a condição de que: se X for O, R₁ será alquila dentre 1 a 4 átomos, fenila, benzila ou feniletila; R₂ será hidrogênio; e um dentre R₄ e R₅ será hidroxila; o outro dentre R₄ e R₅ não será alquila de 1 a 6 carbonos, hidroxila de 1 a 6 carbonos, polihidroxialquila de 1 a 6 carbonos tendo até uma hidroxila por carbono, poliacetilalquila de 1 a 6 carbonos tendo até uma acetila por carbono, fenila, benzila ou feniletila.

25 com a condição de que: se X for O, R₁ será alquila dentre 1 a 4 átomos, fenila, benzila ou feniletila; R₂ será hidrogênio; e um dentre R₄ e R₅ será hidroxila; o outro dentre R₄ e R₅ não será alquila de 1 a 6 carbonos, hidroxila de 1 a 6 carbonos, polihidroxialquila de 1 a 6 carbonos tendo até uma hidroxila por carbono, poliacetilalquila de 1 a 6 carbonos tendo até uma acetila por carbono, fenila, benzila ou feniletila.

2. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, que tem um CLRF de mais do que cerca de 50 por cento.
3. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que X é O.
- 5 4. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que X é NR_3 .
5. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_1 é hidrogênio.
- 10 6. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_1 é alquila inferior opcionalmente substituída.
7. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_1 é $NHOH$.
8. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_1 é OR_{1A} .
- 15 9. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 7, em que R_{1A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.
10. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_2 é hidrogênio.
- 20 11. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_2 não é hidrogênio.
12. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_2 é nitrilo.
- 25 13. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_2 é alquila inferior opcionalmente substituída.
14. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_2 é OR_{2A} .
15. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_2 é $C(O)OR_{2A}$.
- 30 16. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 14 ou 15, em que R_{2A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.

17. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_3 é OR_{3A} .
18. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_3 é $N(R_{3A})_2$ ou $NHC(O)R_{3A}$.
- 5 19. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_3 é $NHSO_2R_{3A}$.
20. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 17, 18 ou 19, em que R_{3A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.
- 10 21. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 17, 18 ou 19, em que R_{3A} é heterociclo ou arila opcionalmente substituída.
22. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_4 é OR_{4A} .
- 15 23. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_4 é halogênio.
24. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_5 é $N(R_{5A})_2$.
25. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_5 é hidrogênio.
- 20 26. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_5 é hidroxila.
27. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_5 é heteroalquila (por exemplo, alcóxi).
- 25 28. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_5 é alquila opcionalmente substituída.
29. Agente redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que R_5 é arila opcionalmente substituída.
30. Agente de realce de nível de S1P de Fórmula I:



ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato deste, em que:

X é O ou NR₃;

R₁ é OR_{1A}, NHOH, hidrogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

R₂ é OR_{2A}, C(O)OR_{2A}, hidrogênio, halogênio, nitrilo, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

R₃ é OR_{3A}, N(R_{3A})₂, NHC(O)R_{3A}, NSO₂R_{3A}, ou hidrogênio;

R₄ é OR_{4A}, OC(O)R_{4A}, hidrogênio, halogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

R₅ é N(R_{5A})₂, hidrogênio, hidróxi, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; e

cada qual de R_{1A}, R_{2A}, R_{3A}, R_{4A}, e R_{5A} é independentemente hidrogênio ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

com a condição de que o agente não seja 2-acetil-4-tetraidroxibutilimidazol,

1-(4-(1,1,2,2,4-pentaidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona, tetraacetato de 1-(2-acetil-1H-imidazol-4-il)butano-1,1,2,2-tetraíl, ou pentaacetato de 1-(2-acetil-1H-imidazol-4-il)butano-1,1,2,2,4-pentail.

31. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, que tem um SLEF de mais do que cerca de 20 vezes.

32. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que X é O.

33. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindi-

cação 30, em que X é NR_3 .

34. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_1 é hidrogênio.

5 35. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_1 é alquila inferior opcionalmente substituída.

36. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_1 é $NHOH$.

37. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_1 é OR_{1A} .

10 38. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_{1A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.

39. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_2 é hidrogênio.

15 40. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_2 não é hidrogênio.

41. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_2 é nitrilo.

20 42. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_2 é alquila inferior opcionalmente substituída.

43. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_2 é OR_{2A} .

44. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_2 é $C(O)OR_{2A}$.

25 45. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 43 ou 44, em que R_{2A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.

46. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_3 é OR_{3A} .

30 47. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_3 é $N(R_{3A})_2$ ou $NHC(O)R_{3A}$.

48. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindi-

cação 30, em que R_3 é $NHSO_2R_{3A}$.

49. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 46, 47 ou 48, em que R_{3A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.

5 50. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 46, 47 ou 48, em que R_{3A} é heterociclo ou arila opcionalmente substituída.

51. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_4 é OR_{4A} .

10 52. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_4 é halogênio.

53. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_5 é $N(R_{5A})_2$.

15 54. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_5 é hidrogênio.

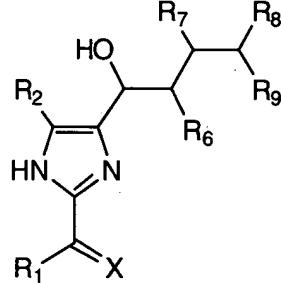
55. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_5 é hidroxila.

56. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_5 é heteroalquila (por exemplo, alcóxi).

20 57. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_5 é alquila opcionalmente substituída.

58. Agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que R_5 é arila opcionalmente substituída.

59. Composto de Fórmula II:



II

25 ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato deste, em que :

X é O ou NR_3 ;

R_1 é OR_{1A} , $NHOH$, hidrogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

5 R_2 é OR_{2A} , $C(O)OR_{2A}$, hidrogênio, halogênio, nitrilo, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

R_3 é OR_{3A} , $N(R_{3A})_2$, $NHC(O)R_{3A}$, $NHSO_2R_{3A}$, ou hidrogênio;
10 R_6 é OR_{6A} , $OC(O)R_{6A}$, $N(R_{6B})_2$, $NHC(O)R_{6B}$, hidrogênio, ou halogênio;
 R_7 é OR_{7A} , $OC(O)R_{7A}$, $N(R_{7B})_2$, $NHC(O)R_{7B}$, hidrogênio, ou halogênio;

R_8 é OR_{8A} , $OC(O)R_{8A}$, $N(R_{8B})_2$, $NHC(O)R_{8B}$, hidrogênio, ou halogênio;
15 R_9 é CH_2OR_{9A} , $CH_2OC(O)R_{9A}$, $N(R_{9B})_2$, $NHC(O)R_{9B}$, hidrogênio, ou halogênio;

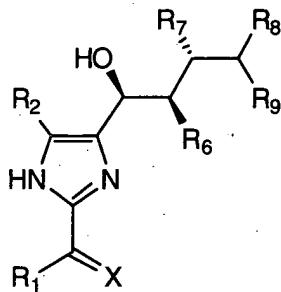
cada qual de R_{1A} , R_{2A} , R_{3A} , R_{6A} , R_{7A} , R_{8A} e R_{9A} é independentemente hidrogênio ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída; e
20 cada qual de R_{6B} , R_{7B} , R_{8B} e R_{9B} é independentemente hidrogênio ou alquila opcionalmente substituída com ou mais grupos hidróxi ou halogênio;

com a condição de que: 1) se X for O, R_1 é alquila de 1 a 4 átomos, fenila, benzila ou feniletila, e R_2 é hidrogênio, pelo menos dois de R_6 , R_7 , R_8 e R_9 não são hidroxila ou acetato; 2) se X for O, R_1 é metila, R_2 é hidrogênio, R_6 e R_7 são ambos hidroxila, e um de R_8 e R_9 é hidrogênio, o outro não é $NHC(O)R_{9B}$; 3) se X for O, R_1 é OR_{1A} , R_{1A} é hidrogênio ou alquila inferior, e R_2 é hidrogênio, pelo menos um, porém não todos, de R_6 , R_7 , R_8 e R_9 é hidroxila ou acetato.

60. Composto de acordo com a reivindicação 59, que é um agente de redução de linfócito circulante.

30 61. Composto de acordo com a reivindicação 59, que é um agente de realce de nível de S1P.

62. Composto de acordo com a reivindicação 59, que é de Fórmula II(a):



II(a)

63. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que X é O.

64. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que X é

5 NR₃.

65. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R₁ é hidrogênio.

66. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R₁ é alquila inferior opcionalmente substituída.

10 67. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R₁ é NHOH.

68. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R₁ é OR_{1A}.

15 69. Composto de acordo com a reivindicação 67, em que R_{1A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.

70. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R₂ é hidrogênio.

71. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R₂ não é hidrogênio.

20 72. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R₂ é nitrilo.

73. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R₂ é alquila inferior opcionalmente substituída.

25 74. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R₂ é OR_{2A}.

75. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R₂ é

$C(O)OR_{2A}$.

76. Composto de acordo com a reivindicação 74 ou 75, em que R_{2A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.

5 77. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R_3 é OR_{3A} .

78. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R_3 é $N(R_{3A})_2$ ou $NHC(O)R_{3A}$.

79. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que R_3 é $NHSO_2R_{3A}$.

10 80. Composto de acordo com a reivindicação 77, 78 ou 79, em que R_{3A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.

81. Composto de acordo com a reivindicação 77, 78 ou 79, em que R_{3A} é heterociclo ou arila opcionalmente substituída.

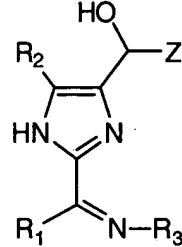
15 82. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que X é O e R_2 não é hidrogênio.

83. Composto de acordo com a reivindicação 82, em que R_2 é alquila inferior opcionalmente substituída.

84. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que um ou mais de R_6 , R_7 , R_8 , e R_9 é hidróxi ou halogênio.

20 85. Composto de acordo com a reivindicação 62, em que todos de R_6 , R_7 , R_8 , e R_9 são hidroxila ou acetato.

86. Composto de Fórmula III :



III

ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato deste, em que:

Z é alquila opcionalmente substituída;

25 R_1 é OR_{1A} , $NHOH$, hidrogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

R_2 é OR_{2A} , $C(O)OR_{2A}$, hidrogênio, halogênio, nitrilo, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

R_3 é OR_{3A} , $N(R_{3A})_2$, $NHC(O)R_{3A}$, $NHSO_2R_{3A}$, ou hidrogênio;

- 5 cada qual de R_{1A} , R_{2A} , e R_{3A} é independentemente hidrogênio ou alquila opcionalmente substituída, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila.

- 10 87. Composto de acordo com a reivindicação 86, em que Z é alquila opcionalmente substituída com uma ou mais porções hidroxila, acetato ou halogênio.

88. Composto de acordo com a reivindicação 86, em que R_1 é alquila inferior opcionalmente substituída.

89. Composto de acordo com a reivindicação 86, em que R_1 é $NHOH$.

- 15 90. Composto de acordo com a reivindicação 86, em que R_2 é hidrogênio ou halogênio.

91. Composto de acordo com a reivindicação 86, em que R_3 é OR_{3A} .

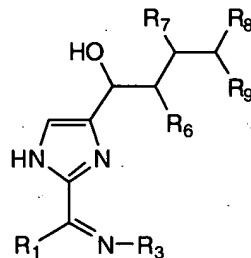
92. Composto de acordo com a reivindicação 86, em que R_3 é $N(R_{3A})_2$ ou $NHC(O)R_{3A}$.

93. Composto de acordo com a reivindicação 86, em que R_3 é $NHSO_2R_{3A}$.

94. Composto de acordo com a reivindicação 91, 92 ou 93, em que R_{3A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.

- 25 95. Composto de acordo com a reivindicação 91, 92 ou 93, em que R_{3A} é heterociclo ou arila opcionalmente substituída.

96. Composto de Fórmula IV:



ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato deste, em que:

R_1 é OR_{1A} , $NHOH$, hidrogênio, ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída;

5 R_3 é OR_{3A} , $N(R_{3A})_2$, $NHC(O)R_{3A}$, $NHSO_2R_{3A}$, ou hidrogênio;

R_6 é OR_{6A} , $OC(O)R_{6A}$, $N(R_{6B})_2$, $NHC(O)R_{6B}$, hidrogênio, ou halogênio;

R_7 é OR_{7A} , $OC(O)R_{7A}$, $N(R_{7B})_2$, $NHC(O)R_{7B}$, hidrogênio, ou halogênio;

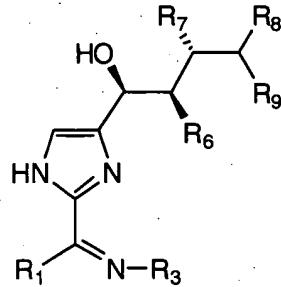
10 R_8 é OR_{8A} , $OC(O)R_{8A}$, $N(R_{8B})_2$, $NHC(O)R_{8B}$, hidrogênio, ou halogênio;

R_9 é CH_2OR_{9A} , $CH_2OC(O)R_{9A}$, $N(R_{9B})_2$, $NHC(O)R_{9B}$, hidrogênio, ou halogênio; e

cada qual de R_{1A} , R_{3A} , R_{6A} , R_{7A} , R_{8A} e R_{9A} é independentemente hidrogênio

15 ou alquila, arila, alquilarila, arilalquila, heteroalquila, heterociclo, alquilheterociclo, ou heterocicloalquila opcionalmente substituída.

97. Composto de acordo com a reivindicação 96, que é de Fórmula IV(a):



IV(a)

98. Composto de acordo com a reivindicação 96, em que um ou 20 mais de R_6 , R_7 , R_8 , e R_9 é hidróxi ou halogênio.

99. Composto de acordo com a reivindicação 96, em que todos de R_6 , R_7 , R_8 , e R_9 são hidroxila ou acetato.

100. Composto de acordo com a reivindicação 97, em que todos de R_6 , R_7 , R_8 , e R_9 são hidroxila ou acetato.

25 101. Composto de acordo com a reivindicação 97, em que R_1 é alquila inferior opcionalmente substituída.

102. Composto de acordo com a reivindicação 97, em que R_1 é NHOH.
103. Composto de acordo com a reivindicação 97, em que R_3 é OR_{3A}.
- 5 104. Composto de acordo com a reivindicação 97, em que R_3 é N(R_{3A})₂ ou NHC(O)R_{3A}.
105. Composto de acordo com a reivindicação 97, em que R_3 é NHSO₂R_{3A}.
106. Composto de acordo com a reivindicação 103, 104 ou 105, 10 em que R_{3A} é hidrogênio ou alquila inferior opcionalmente substituída.
107. Composto de acordo com a reivindicação 103, 104 ou 105, em que R_{3A} é heterociclo ou arila opcionalmente substituída.
108. Composto, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato deste, em que o composto é :
- 15 Oxima de 1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)-etanona; Oxima de (E)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)-etanona; Oxima de (Z)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)-etanona;
- 20 Oxima de 1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona O-metila; Oxima de (E)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona O-metil;
- 25 Oxima de (Z)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona O-metila; 1-(5-metil-4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona; (1R,2S,3R)-1-(2-(1-hidrazonoetil)-1H-imidazol-4-il)butano-1,2,3,4-tetraol; N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)acetoidrazida;
- 30 4-metil-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzenosulfonoidrazida; (E)-4-metil-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-

- il) etilideno)benzenosulfonoidrazida;
(Z)-4-metil-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
il) etilideno)benzenosulfonoidrazida;
N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
5 il) etilideno)benzoidrazida;
2-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
il) etilideno)hidrazinacarboxilato de etila;
2-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
il) etilideno)hidrazinacarboxilato de (E)-etila;
10 2-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
il) etilideno)hidrazinacarboxilato de (Z)-etila;
N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
il) etilideno)nicotinoidrazida;
(E)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
15 il) etilideno)nicotinoidrazida;
(Z)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
il) etilideno)nicotinoidrazida;
3-cloro-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
il) etilideno)benzoidrazida;
20 4-flúor-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
il) etilideno)benzoidrazida;
(E)-4-flúor-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
il) etilideno)benzoidrazida;
(Z)-4-flúor-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
25 il) etilideno)benzoidrazida;
6-amino-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
il) etilideno)nicotinoidrazida;
(E)-6-amino-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
il) etilideno)nicotinoidrazida;
30 (Z)-6-amino-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
il) etilideno)nicotinoidrazida;
N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-

- ii)etilideno)isonicotinoidrazida;
(E)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
ii)etilideno)isonicotinoidrazida;
(Z)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
5 ii)etilideno)isonicotinoidrazida;
N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-ii)etilideno)bifenil-
3-carboidrazida;
(E)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
ii)etilideno)bifenil-3-carboidrazida;
10 (Z)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-
ii)etilideno)bifenil-3-carboidrazida; ou
N-hidróxi-4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetraidroxibutil)-1H-imidazol-2-carboxamida.

109. Composição farmacêutica compreendendo um agente de redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, e um diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

110. Composição farmacêutica compreendendo um agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, e um diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

111. Composição farmacêutica compreendendo um composto de acordo com a reivindicação 59, 84, 96 ou 108, e um diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

112. Método de redução do número de linfócitos circulantes em um paciente, que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um agente de redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1.

113. Método de modulação da quantidade de S1P em um paciente, que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30.

114. Método de supressão da resposta imune em um paciente, que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um agente de redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1.

115. Método de supressão da resposta imune em um paciente,

que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30.

116. Método de supressão da resposta imune em um paciente, que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um composto de acordo com a reivindicação 59, 84, 96 ou 108.

117. Método de tratamento, controle ou prevenção de uma doença ou distúrbio, que compreende administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz um agente de redução de linfócito circulante de acordo com a reivindicação 1, em que a doença ou distúrbio é artrite reumatóide, asma, dermatite atópica, doença de Behcet, doença do enxerto versus hospedeiro, lúpus eritematoso, esclerose múltipla, polinose, psoríase, rejeição de transplante ou uveíte.

118. Método de tratamento, controle ou prevenção de uma doença ou distúrbio, que compreende administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um agente de realce de nível de S1P de acordo com a reivindicação 30, em que a doença ou distúrbio é artrite reumatóide, asma, dermatite atópica, doença de Behcet, doença do enxerto versus hospedeiro, lúpus eritematoso, esclerose múltipla, polinose, psoríase, rejeição de transplante ou uveíte.

119. Método de tratamento, controle ou prevenção de uma doença ou distúrbio, que compreende administrar a um paciente em necessidade disto uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um composto de acordo com a reivindicação 59, 84, 96 ou 108, em que a doença ou distúrbio é artrite reumatóide, asma, dermatite atópica, doença de Behcet, doença do enxerto versus hospedeiro, lúpus eritematoso, esclerose múltipla, polinose, psoríase, rejeição de transplante ou uveíte.

FIG. 1

Porcentagem aumentada de células T maduras em timo tratado

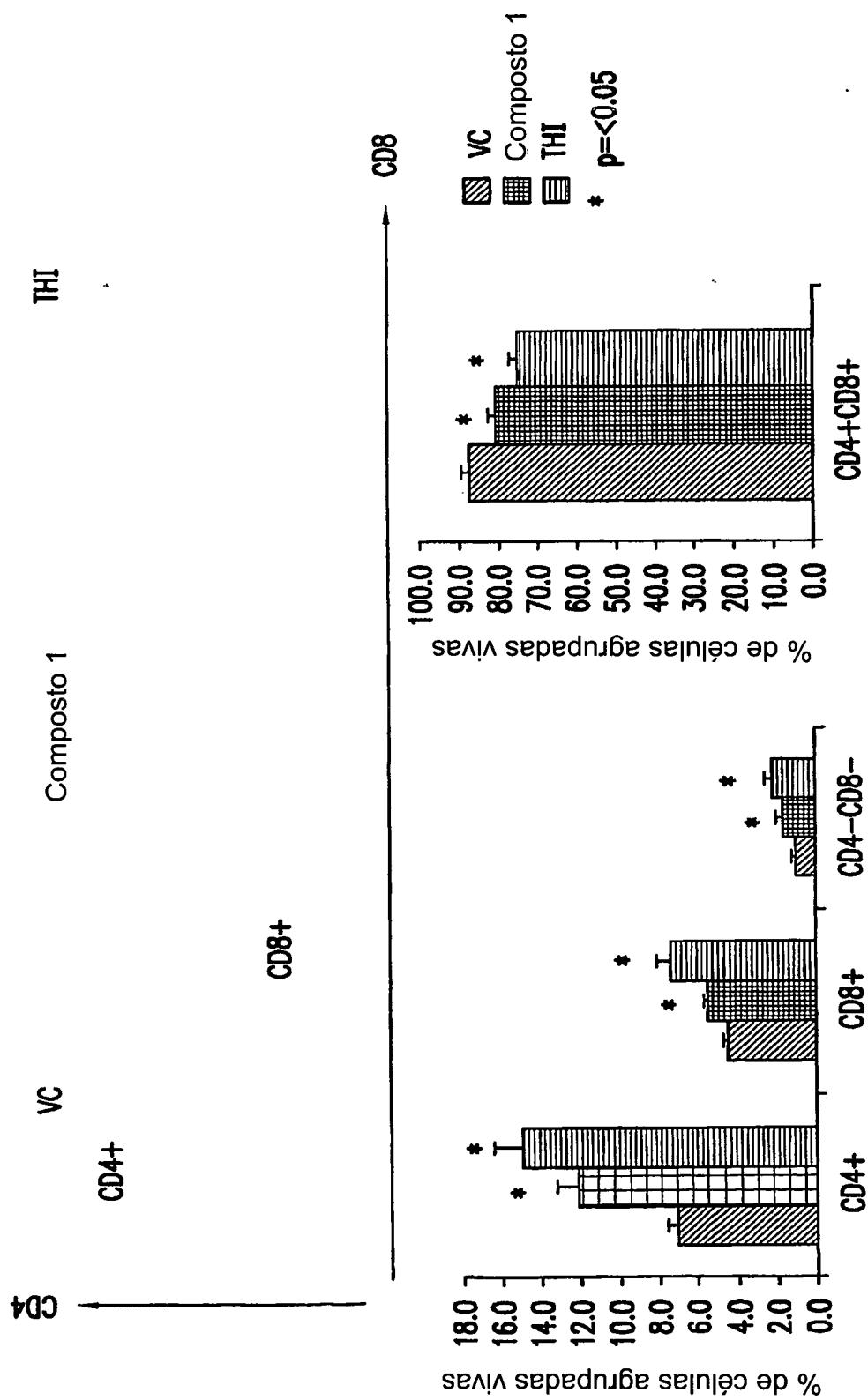


FIG. 2

Porcentagem aumentada de emigrantes tímicos recentes CD 4+

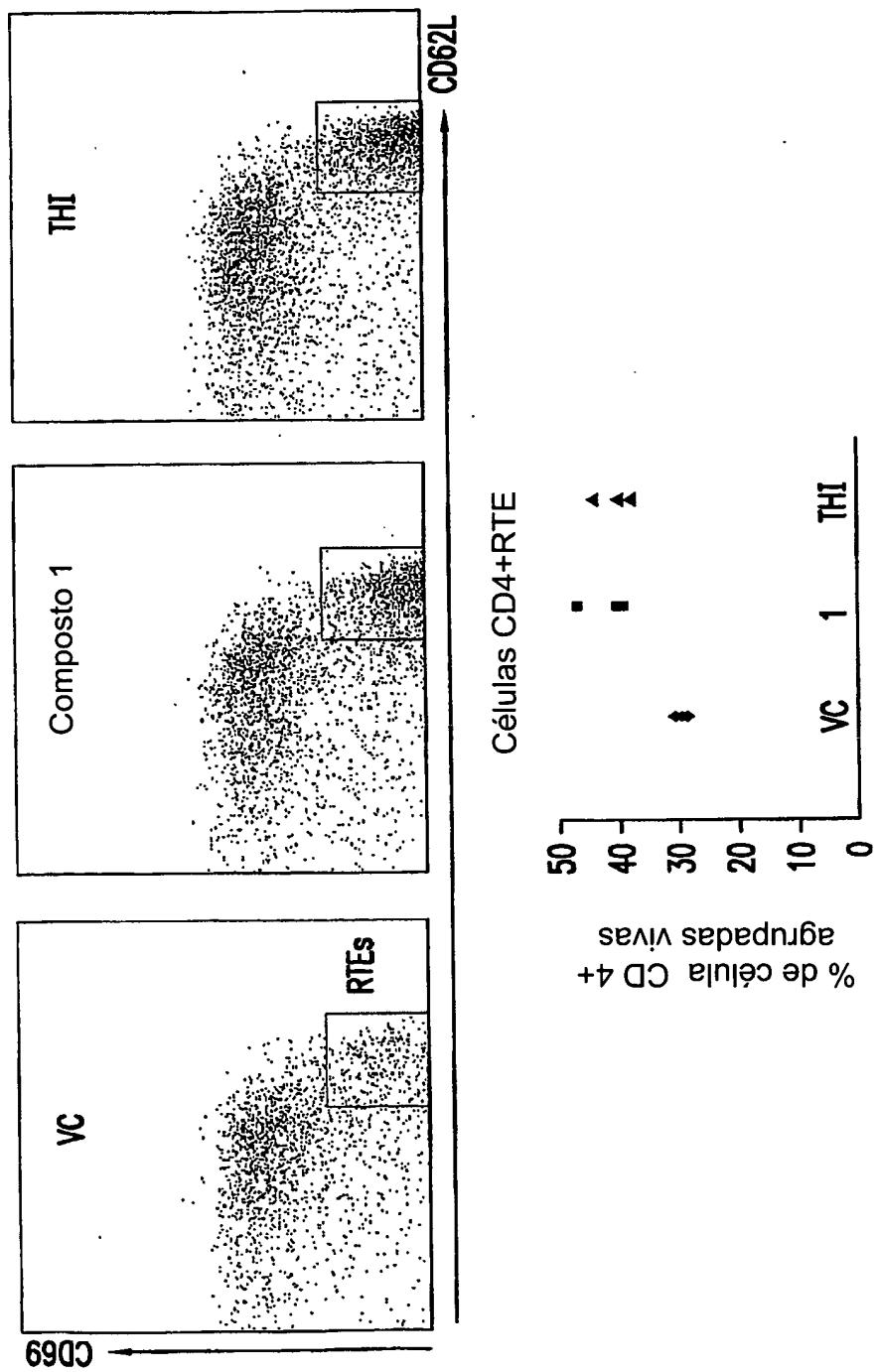


FIG. 3

Porcentagem aumentada de emigrantes tímicos recentes CD 8+

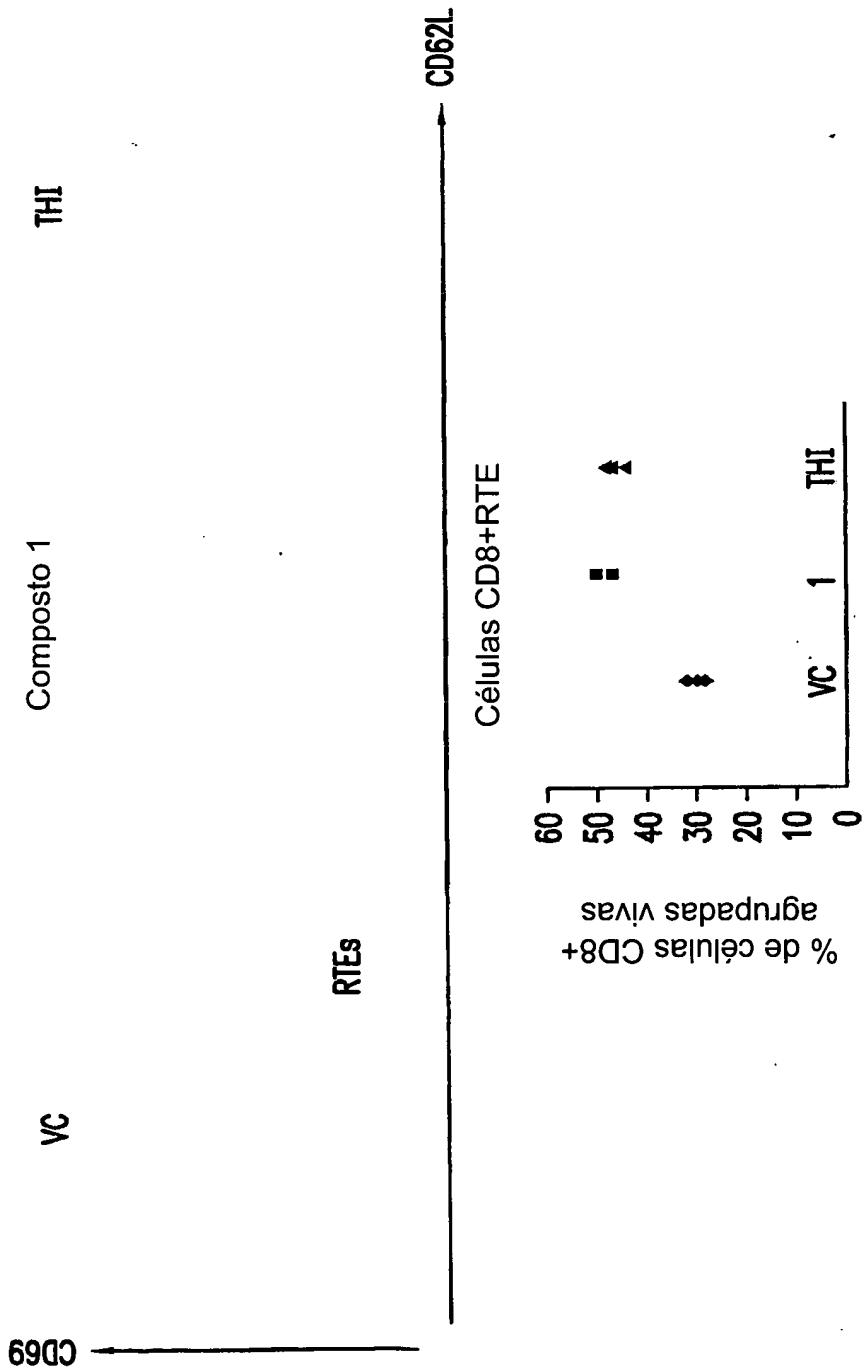
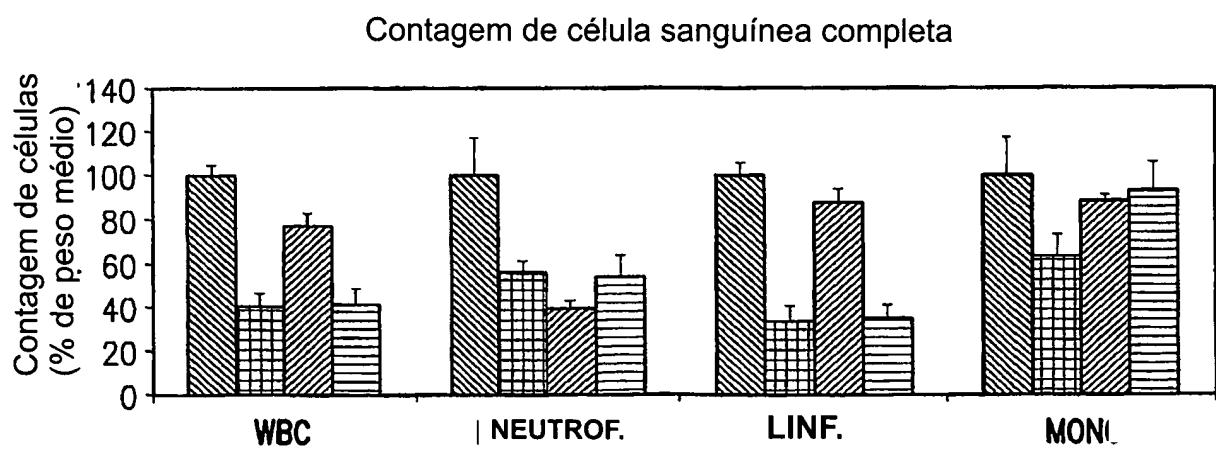
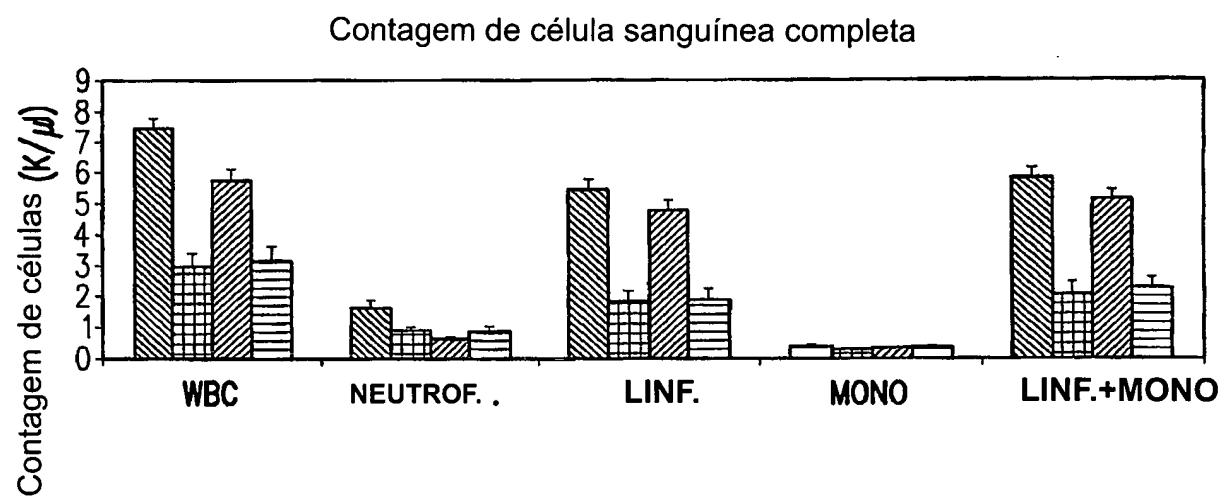
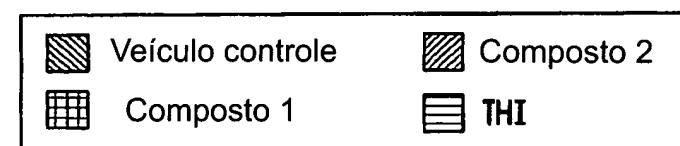


FIG. 4



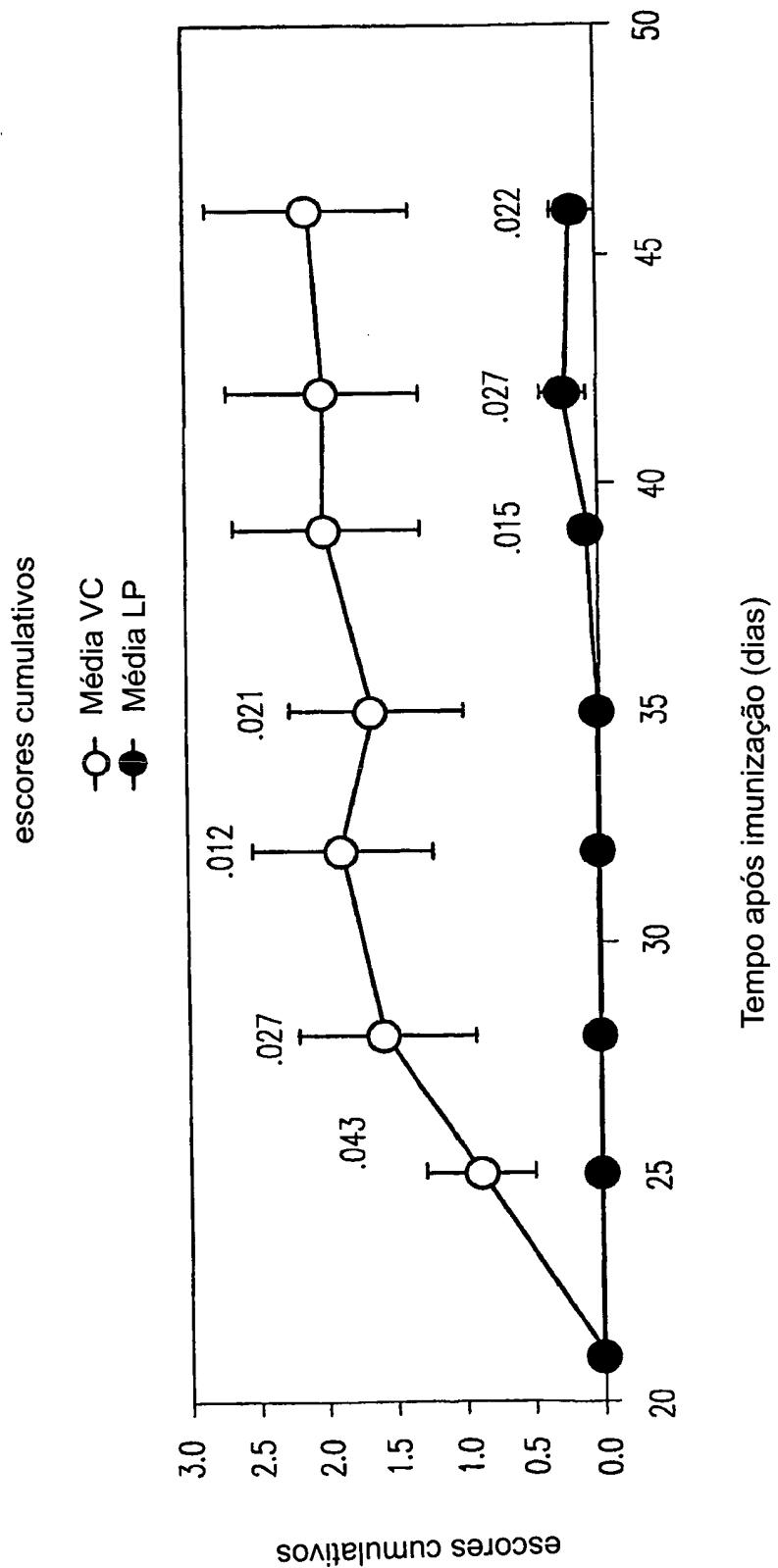
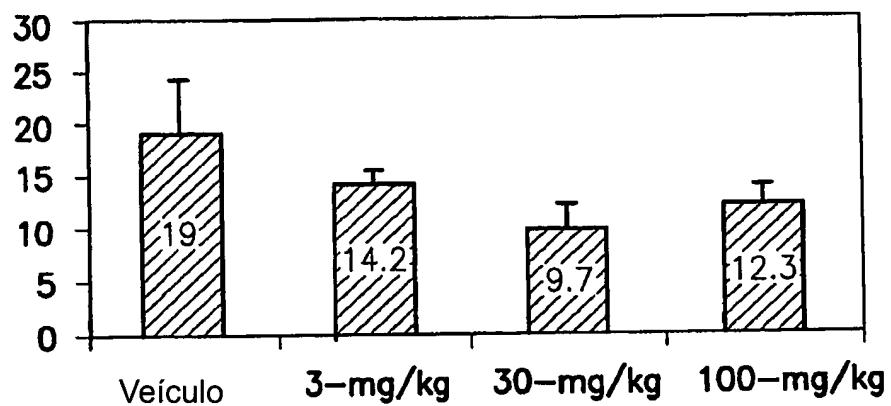


FIG. 5

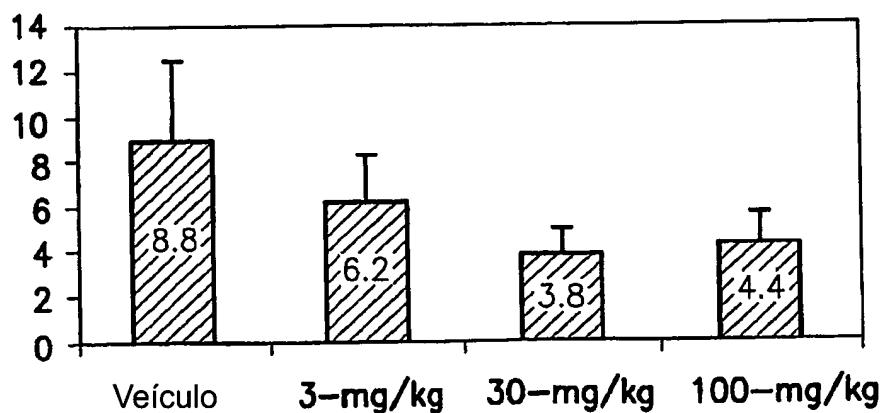
FIG. 6

 Média : \pm SD

Células sanguíneas brancas - 32 horas após a dose



Linfócitos - 32 horas após a dose



RESUMO

Patente de Invenção "COMPOSTOS COM BASE EM IMIDAZOL, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO-OS E MÉTODOS DE SEU USO".

São descritos compostos com base em imidazol, composições 5 compreendendo-os, e os métodos de seu uso para o tratamento, prevenção ou controle de distúrbios e doenças inflamatórias ou autoimunes. Os compostos particulares são de Fórmula I:

