

(11) Número de Publicação: **PT 2185151 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/45 (2014.01) **C07D 211/76** (2014.01)
C07D 223/12 (2014.01) **A61P 29/00** (2014.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2008.08.01**

(30) Prioridade(s): **2007.08.02 GB 0715068**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.05.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.04.09**
136/2014

(73) Titular(es):

CAMBRIDGE ENTERPRISE LTD.
THE OLD SCHOOLS TRINITY LANE
CAMBRIDGE CAMBRIDGESHIRE CB2 1TN GB

(72) Inventor(es):

DAVID JOHN GRAINGER GB
DAVID FOX GB

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A 3-(2',2'-DIMETILPROPANOILAMINO)- TETRA-HIDROPIRIDIN-2-ONA E AS SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E A SUA UTILIZAÇÃO PARA PREPARAR UM MEDICAMENTO DESTINADO A PREVENIR OU TRATAR DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS.

RESUMO

"COMPOSIÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA"

A invenção refere-se a 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona e as suas composições farmacêuticas e a sua utilização para preparar um medicamento destinado a prevenir ou tratar distúrbios inflamatórios.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA"

A invenção refere-se a 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona e as suas composições farmacêuticas e sua utilização para preparar um medicamento destinado a prevenir ou tratar distúrbios inflamatórios.

A inflamação é uma componente importante da defesa fisiológica do hospedeiro. No entanto, é cada vez mais claro que respostas inflamatórias temporal ou espacialmente inapropriadas desempenham um papel numa grande gama de doenças, incluindo aquelas com uma componente de leucócitos óbvia (tais como as doenças auto-imunes, asma ou aterosclerose), mas também em doenças que não são tradicionalmente consideradas como envolvendo leucócitos (tais como a osteoporose ou doença de Alzheimer).

As quimiocinas são uma grande família de moléculas de sinalização com homologia com a interleucina-8, as quais têm sido implicadas na regulação do trânsito de leucócitos em condições fisiológicas e patológicas. Com mais de cinquenta ligandos e vinte receptores envolvidos na sinalização por quimiocinas, o sistema tem a densidade de informação necessária para abordar os leucócitos através dos processos reguladores imunológicos complexos da medula óssea, para a periferia, em seguida de regresso através dos órgãos linfóides secundários. No entanto, esta complexidade do sistema de quimiocinas tem, em princípio, impedido abordagens farmacológicas para modular as

respostas inflamatórias através do bloqueio do receptor de quimiocinas. Tem-se revelado difícil determinar que receptor(es) de quimiocinas deve(m) ser inibido(s) para produzir benefício terapêutico numa dada doença inflamatória.

Mais recentemente foi descrita uma família de agentes que bloqueia simultaneamente a sinalização por uma grande gama de quimiocinas: Reckless *et al.*, *Biochem J.* (1999) 340:803-811. Determinou-se que o primeiro desses agentes, um péptido designado "Péptido 3", inibe a migração de leucócitos induzida por 5 quimiocinas diferentes, deixando a migração inalterada em resposta a outros quimiotáticos (tais como fMLP ou TGF-beta). Este péptido e os seus análogos, tal como NR58-3.14.3 (*i. e.* Sequência ID N° 1 c(DCys-DGln-DIle-DTrp-DLys-DGln-DLys-DPro-DAsp-DLeu-DCys)-NH₂), são colectivamente designados "Inibidores de Quimiocina de Largo Espectro" (BSCI). Grainger *et al.*, *Biochem. Pharm.* 65 (2003) 1027-1034 demonstraram posteriormente que os BSCI têm actividade anti-inflamatória útil potencialmente numa gama de modelos animais de doenças. Curiosamente, o bloqueio simultâneo de múltiplas quimiocinas não está manifestamente associado a toxicidade aguda ou crónica, sugerindo que esta abordagem pode ser uma estratégia útil para desenvolver novas medicações anti-inflamatórias com benefícios semelhantes aos esteróides mas com efeitos secundários reduzidos.

No entanto, os péptidos e derivados peptóides, tal como o NR58-3.14.3, podem não ser óptimos para utilização *in vivo*. Estes são bastante dispendiosos de sintetizar e têm propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas relativamente desfavoráveis. Por exemplo, o NR58-3.14.3 não é biodisponível por via oral e é

eliminado do plasma sanguíneo com um período de semi-vida inferior a 30 minutos após injeção intravenosa.

Duas estratégias paralelas têm sido adoptadas para identificar novas preparações que retêm as propriedades anti-inflamatórias do péptido 3 e NR58-3.14.3, mas têm melhores características para utilização como farmacêuticos. Em primeiro lugar foi desenvolvida uma série de análogos de péptidos, alguns dos quais têm semi-vidas no plasma mais longas do que o NR58-3.14.3 e que são consideravelmente mais baratos de sintetizar. Em segundo lugar foi realizada uma análise da actividade estrutural: dos péptidos para identificar farmacóforos de modo a propor estruturas não peptídicas pequenas que possam reter as propriedades benéficas do péptido original.

Esta segunda abordagem produziu várias séries de compostos estruturalmente distintos que retinham as propriedades anti-inflamatórias dos péptidos, incluindo os derivados 16-amino e 16-aminoalquilo do alcalóide ioimbina, bem como uma gama de 3-aminoglutarimidaz N-substituídas. (Referência: Fox *et al.*, J Med Chem 45(2002) 360-370; documentos WO 99/12968 e WO 00/42071). Todos estes compostos são inibidores de quimiocina de largo espectro que retêm selectividade sobre os quimiotácticos não quimiocinas e foi demonstrado que vários deles bloqueiam a inflamação aguda *in vivo*.

O mais potente e selectivo destes compostos foi a (S)-3-(undec-10-enoil)-aminoglutarimida (NR58,4), a qual inibiu a migração induzida por quimiocinas *in vitro* com uma ED₅₀ de 5 nM. No entanto, estudos adicionais revelaram que o anel de aminoglutarimida era susceptível a abertura enzimática de anel no soro. Consequentemente, para algumas aplicações (por exemplo,

nos casos em que a inflamação sob tratamento é crónica, tal como nas doenças auto-imunes) estes compostos podem não ter propriedades óptimas e um composto mais estável com propriedades anti-inflamatórias semelhantes pode ser melhor.

Como uma abordagem para identificar tais análogos estáveis, vários derivados de (S)-3-(undec-10-enoil)-aminoglutarimida foram testados quanto à sua estabilidade no soro. Um desses derivados, o análogo 6-desoxo (S)-3-(undec-10-enoil)-tetra-hidropiridin-2-ona, é completamente estável no soro humano durante pelo menos 7 dias a 37 °C, mas tem uma potência consideravelmente reduzida em comparação com a molécula parental.

Uma tal família de inibidores de quimiocina de largo espectro (BSCI) estáveis são as 3-amino-caprolactamas, com um anel de monolactama de sete membros (ver, por exemplo, os documentos WO2005/053702 e WO2006/016152). No entanto, outros compostos anti-inflamatórios úteis têm sido também produzidos a partir de outras 3-aminolactamas com tamanho de anel diferente (ver, por exemplo, o documento WO2006/134385). Outras modificações ao anel de lactama, incluindo a introdução de heteroátomos e sistemas de anéis de biciclolactama, produzem também compostos com actividade BSCI (ver, por exemplo, os documentos WO2006/018609 e WO2006/085096).

Até à data, a identificação de classes gerais de agentes com actividade BSCI e, por isso, com propriedades anti-inflamatórias *in vivo*, tem-se baseado na optimização da potência da actividade BSCI. Por exemplo, divulgações anteriores ensinaram que a introdução de dissubstituição-2,2 (no átomo de carbono alfa ou ki na cadeia lateral acilo de

acil-3-aminolactamas) leva a um aumento considerável da potência como um BSCI, *in vitro* e *in vivo* em modelos de inflamação aguda, quer o grupo acilo 2,2-dissubstituído fosse de cadeia aberta (ver documento WO2005/053702), monocíclico (ver documento WO2006/134384) ou policíclico (ver documento WO2006/016152).

No entanto, a potência do efeito farmacológico desejado é apenas um factor para determinar se um agente produzirá um fármaco humano útil, se bem que seja um factor importante. Em particular, a farmacocinética (ou disposição do agente dentro do corpo) tem um efeito importante na utilidade de um agente particular. A farmacocinética (definida no seu sentido mais lato, como o estudo dos efeitos do corpo no fármaco, em contraste com a farmacodinâmica, a qual é o estudo dos efeitos do fármaco no corpo) depende de um grande número de processos fisiológicos complexos, incluindo (mas não estando limitados a) absorção, estabilidade no plasma, volume de distribuição (e, em particular, a velocidade de equilíbrio para os tecidos "alvo"), transformação metabólica (incluindo metabolismo hepático, tal como oxidação mediada pela isoenzima do citocromo P450 e metabolismo de fase II, tais como sulfatação e glucuronidação, e metabolismo extra-hepático, tais como modificação enzimática no soro) e excreção (tais como eliminação renal na urina e eliminação fecal). Frequentemente, estes processos são muitas vezes referidos colectivamente como as propriedades "ADME" do agente (sendo ADME um acrónimo para Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção).

Outro factor importante para determinar a utilidade de um agente como um fármaco humano é a segurança. Muitos, se não todos, os compostos administrados desencadeiam efeitos múltiplos no corpo dos quais os efeitos farmacológicos desejáveis são

geralmente apenas um subconjunto. Os restantes efeitos podem resultar em dano (efeitos tóxicos) ou incómodo (efeitos secundários) para o doente. O estudo dessas propriedades dos agentes farmacêuticos candidatos é chamado toxicologia ou farmacologia de segurança. Os efeitos indesejados podem ser geralmente classificados em dois tipos. Os *efeitos da classe* estão intimamente ligados à acção farmacológica desejada e (numa extensão maior ou menor) são uma consequência inevitável da manipulação do alvo molecular escolhido. Por exemplo, os agentes concebidos para prevenir a inflamação patológica podem resultar, num determinado grau, em imunossupressão e um maior risco de infecção. Isto é porque o dano tecidular inflamatório e a infecção estão ambos inextrincavelmente ligados ao grau de actividade do sistema imunitário. Como uma consequência, todas as moléculas que partilham um alvo farmacológico idêntico partilharão, numa extensão maior ou menor, os efeitos da classe. Em contraste, os *efeitos do composto* estão especificamente associados a uma estrutura de composto particular, geralmente em consequência de uma interacção (frequentemente inesperada) com um alvo distinto do alvo farmacológico pretendido. Em princípio, é possível encontrar outra molécula com os mesmos efeitos farmacológicos pretendidos, mas que é completamente desprovida dos efeitos secundários específicos do composto. Alguns efeitos do composto são comuns (tal como a interacção com hERG, a qual pode resultar num prolongamento perigoso do intervalo QT durante o ritmo cardíaco, resultando em arritmias cardíacas potencialmente fatais), enquanto outros efeitos do composto podem ser manifestamente únicos ao composto particular.

Fundamentalmente, apesar de décadas de experiência de desenvolvimento farmacêutico, continua a não existir qualquer método geralmente aceite para prever as propriedades de ADME e

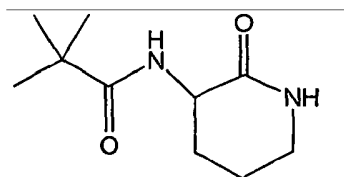
farmacocinéticas de um agente, ou a sua toxicologia e farmacologia de segurança. É por esta razão que a avaliação explícita utilizando, primeiro, sistemas de ensaio *in vitro* (tal como linhas de células que expressam hERG), em seguida em animais e finalmente em ensaios clínicos de fase I no homem, é um requisito regulamentar à escala mundial para o desenvolvimento de um novo fármaco.

Foram descritos métodos para prever determinados aspectos de ADME a partir da inspecção da estrutura molecular e existem poucas dúvidas de que um químico medicinal experiente pode eliminar, de modo fidedigno, muitas estruturas em bases puramente teóricas. Um exemplo de uma tal "regra de ouro" (pelo que não é mais confiável do que isso) seria as "Regras dos Cinco" de Lipinsky, com base na observação de que a maioria dos fármacos aprovados satisfaz determinados critérios relacionados com o peso molecular, número de ligações rotativas e polaridade. Analogamente, é geralmente bem conhecido que as moléculas com grupos hidrófobos grandes têm maior probabilidade de exibir uma interacção indesejável com o canal hERG.

Estas linhas de orientação gerais, mesmo quando aplicadas em conjunto, podem ser úteis para eliminar moléculas inadequadas, mas muitas moléculas muito inadequadas (por várias razões) continuariam a passar através da rede. Hoje em dia, ninguém aprovaria seriamente a selecção de um candidato a fármaco a partir de uma classe de compostos activos em bases puramente teóricas. Como uma consequência, a selecção de um composto particular dentro de uma classe que tem propriedades de ADME, farmacocinéticas, toxicológicas e farmacológicas de segurança, particularmente vantajosas, requer experimentação prática considerável entre bons candidatos e é uma nova invenção

que não poderia ser prevista mesmo pelos especialistas na técnica.

Aqui, a requerente descreve o novo composto 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona (**I**), o qual não foi anteriormente divulgado.



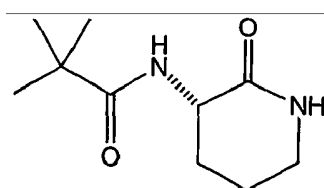
(I)

Este composto é um membro específico da classe genérica lata dos BSCI que foram anteriormente descritos (por exemplo, ver o documento WO2006/134385). No entanto, a requerente demonstrou agora que apesar de todas as moléculas da classe terem actividade BSCI, os compostos (**I**) tem propriedades significativamente superiores para utilização como um fármaco humano em consequência da sua combinação de propriedades de ADME, farmacocinética, toxicologia e farmacologia de segurança, quando comparados experimentalmente com outros membros da classe.

O átomo de carbono na posição 3 do anel de lactama é assimétrico e, conseqüentemente, os compostos de acordo com a presente invenção têm, pelo menos, duas formas individuais possíveis, isto é, as configurações "R" e "S". A presente invenção abrange as duas formas enantioméricas e todas as combinações destas formas, incluindo as misturas "RS" racémicas. Tendo em vista a simplicidade, quando não for indicada qualquer

configuração específica na fórmula estrutural, deve ser entendido que são representadas as duas formas enantioméricas individuais e as suas misturas. Uma vez que a inversão enantiomérica não tem qualquer efeito nas propriedades-chave de ADME responsáveis pela superioridade do composto (e, além disso, tem apenas um pequeno efeito na potência do composto como um BSCI), ambas as formas enantioméricas, bem como as suas misturas, representam exemplos específicos que são materialmente superiores à classe em geral.

De um modo preferido, o composto de fórmula (**I**) de acordo com esta invenção será o composto de fórmula (**I'**).



(**I'**)

O composto (**I'**), com a configuração (S) no centro estereoquímico, é 5-25 vezes mais potente como um BSCI do que o enantiómero (R).

São também proporcionadas composições farmacêuticas, compreendendo, como ingrediente activo, um composto de fórmula geral (**I**) ou (**I'**), ou um seu sal farmacêuticamente aceitável e, pelo menos, um excipiente e/ou veículo farmacêuticamente aceitável.

Por sal farmacêuticamente aceitável entende-se, em particular, os sais de adição de ácidos inorgânicos, tais como

cloridrato, bromidrato, iodidrato, sulfato, fosfato, difosfato e nitrato ou de ácidos orgânicos, tais como acetato, maleato, fumarato, tartarato, succinato, citrato, lactato, metanossulfonato, p-toluenossulfonato, palmoato e estearato. Também no âmbito da presente invenção, encontram-se os sais preparados a partir de bases, tais como hidróxido de sódio ou potássio, quando puderem ser utilizados. Para outros exemplos de sais farmacêuticamente aceitáveis, pode ser feita referência a "Salt selection for basic drugs", Int. J. Pharm. (1986), 33:201-217.

A composição farmacêutica pode estar na forma de um sólido, por exemplo, pós, granulados, comprimidos, cápsulas de gelatina, lipossomas ou supositórios. Os suportes sólidos apropriados podem ser, por exemplo, fosfato de cálcio, estearato de magnésio, talco, açúcares, lactose, dextrina, amido, gelatina, celulose, metilcelulose, carboximetilcelulose sódica, polivinilpirrolidina e cera. Outros excipientes e/ou veículos farmacêuticamente aceitáveis apropriados serão conhecidos dos especialistas na técnica.

As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem ser também apresentadas na forma líquida, por exemplo, soluções, emulsões, suspensões ou xaropes. Os suportes líquidos apropriados podem ser, por exemplo, água, solventes orgânicos, tais como glicerol ou glicóis, bem como as suas misturas, em várias proporções, em água.

A invenção também proporciona a utilização de um composto de fórmula (**I**) ou (**I'**), ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, para a preparação de um medicamento destinado a tratar distúrbios inflamatórios.

A invenção inclui compostos, composições e suas utilizações como definidos, em que o composto está na forma hidratada ou solvatada.

Em comparação com a técnica anterior, a melhoria da presente invenção assenta na observação inesperada de que a 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona tem propriedades de ADME superiores em comparação com as classes gerais de BSCI de lactama que foram anteriormente descritas (tais como, por exemplo, os Pedidos internacionais *supra*). Embora tais compostos fossem descritos como tendo propriedades farmacodinâmicas aceitáveis (isto é, eles têm um efeito anti-inflamatório potente *in vivo* em consequência da sua actividade BSCI) e fosse inferido que têm de possuir farmacocinética aceitável e, por esse motivo, propriedades de ADME, mesmo assim a avaliação directa das propriedades de ADME sugerem que a 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona é, de modo notável e inesperadamente, superior (ver os exemplos abaixo).

Em particular, enquanto estudos de estabilidade *in vitro* no soro anteriores sugeriram que os BSCI de lactama eram consideravelmente melhores do que os BSCI de tipo imida iniciais (ver, por exemplo, o documento W099/12968), como descrito na literatura (por exemplo, Fox et al. J. Med. Chem. 2005 48:867-74), é agora claro que muitas (ou na verdade a maioria) da classe de lactamas dos BSCI são submetidas a metabolismo indesejado *in vivo*. A requerente preparou e testou mais de uma dúzia de BSCI da classe de acilaminolactamas e, à excepção da 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona, todos os BSCI da classe de lactamas testados até à data são submetidos

a metabolismo rápido no fígado (por hidroxilação mediada pelo citocromo P450 e/ou metabolismo de fase II).

Pelo menos parcialmente, como uma consequência do menor metabolismo *in vivo*, a eliminação global de 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona é acentuadamente inferior à dos outros BSCI de lactama testados. Como uma consequência, a exposição após uma única dose oral é mais do que 10 vezes superior para a 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona. Por conseguinte, a 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona é mais adequada para utilização como um fármaco humano, em particular nos casos em que é necessária exposição oral crônica para eficácia, do que a maioria (se não a totalidade) dos BSCI de lactama anteriormente divulgados.

Os péptidos da técnica anterior (tal como o NR58-3.14.3) têm as desvantagens de: (a) serem dispendiosos e requererem síntese em fase sólida (pelo menos, para os maiores) e (b) serem muito rapidamente eliminados através dos rins e (c) serem geralmente muito menos potentes (>25 vezes menos potentes *in vitro* e >10 000 vezes menos potentes *in vivo*).

As aminoglutarimidas da técnica anterior são baratas, não são eliminadas rapidamente através dos rins e são mais potentes *in vitro*, MAS são extremamente instáveis no soro (em consequência de uma abertura enzimática do anel de imida; ver, por exemplo, Fox *et al.* J. Med. Chem. 2005 48:867-74). Como uma consequência, os BSCI de tipo aminoglutarimida, tal como a (S)-3-(undec-10-enoilamino)glutarimida, são pelo menos 250 vezes menos potentes *in vivo* do que a 2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona, mesmo em modelos de inflamação aguda

(tal como a endotoxemia induzida por LPS acentuada pela produção sistémica de TNF- α , onde o impacto da estabilidade do composto e propriedades de ADME é menos evidente).

Outra série de compostos estruturalmente relacionados (mas funcionalmente muito diferentes) que foi descrita na literatura são os compostos autoindutores bacterianos que se baseiam tipicamente em torno da estrutura de homoserinalactona de 6 membros, geralmente com uma cadeia lateral de 3-oxo-acilo (por exemplo, ver Bycroft *et al.* documento US 5969158, o qual reivindica uma gama larga desses compostos). Curiosamente, embora tais divulgações incluam fórmulas genéricas que abrangem lactamas, bem como lactonas, poucos, se é que algum, dos compostos exemplificados com propriedades autoindutoras bacterianas têm grupos cabeças lactama. Todos esses compostos (mas, em particular, aqueles com um grupo cabeça lactona e/ou um grupo cauda 3-oxoacilo) são conhecidos como sendo relativamente instáveis, limitando as suas aplicações como medicamentos.

A melhoria aqui descrita, 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona, é pouco dispendiosa de sintetizar (e o método aqui divulgado permite a síntese directa mesmo à escala do Kg), e apresenta excelente estabilidade metabólica não só em soro isolado *in vitro* (uma propriedade partilhada com toda a classe de lactamas dos BSCI anteriormente divulgados) mas também *in vivo*. Como uma consequência, os compostos da presente invenção encontram-se (entre os compostos extensivamente estudados até à data) optimizados de modo único para o tratamento de doenças inflamatórias no homem em termos de eficácia, potência e propriedades farmacológicas, tais como ADME, farmacocinética, toxicologia e farmacologia de segurança.

De acordo com esta invenção, os distúrbios inflamatórios que se pretende prevenir ou tratar com os compostos de fórmula (I) ou (I') ou os seus sais farmacêuticamente aceitáveis ou composições farmacêuticas ou medicamentos contendo-os como ingredientes activos incluem de modo notável:

- doenças auto-imunes, por exemplo tais como esclerose múltipla, artrite reumatóide, lúpus, síndrome do intestino irritável, doença de Crohn;
- distúrbios vasculares incluindo acidente vascular cerebral, doenças coronárias, enfarte do miocárdio, angina de peito instável, aterosclerose ou vasculite, e. g., síndrome de Behçet, arterite de células gigantes, polimialgia reumática, granulomatose de Wegener, vasculite do síndrome de Churg-Strauss, púrpura de Henoch-Schönlein e doença de Kawasaki;
- infecção ou replicação viral, e. g. infecções devido a ou replicação de vírus incluindo vírus da varíola, vírus do herpes (e. g., Herpesvirus samiri), citomegalovírus (CMV), vírus da hepatite ou lentivírus (incluindo VIH);
- asma e distúrbios respiratórios relacionados tais como rinite alérgica e COPD;
- osteoporose; (baixa densidade mineral óssea);
- crescimento de tumores;

- rejeição de transplantes de órgãos e/ou funcionamento retardado de enxerto ou órgão, e. g., em doentes com transplante renal;
- um distúrbio caracterizado por um nível elevado de TNF- α ;
- psoríase;
- feridas da pele e outros distúrbios fibróticos incluindo cicatrização hipertrófica (formação de quelóide), formações de adesão após cirurgia geral ou ginecológica, fibrose pulmonar, fibrose hepática (incluindo doença hepática alcoólica) ou fibrose renal, idiopática ou em consequência de uma doença subjacente, tal como diabetes (nefropatia diabética);
- distúrbios provocados por parasitas intracelulares tais como malária ou tuberculose;
- dor neuropática (tais como dor de membro fantasma pós-operatório, nevralgia pós-herpética, etc.)
- alergias; ou
- doença de Alzheimer.

De acordo com esta invenção, outros distúrbios inflamatórios incluem:

- ALS;

- resposta de memória induzida por antigénio
- supressão de resposta imunológica.

Estas indicações clínicas caem sob a definição geral de distúrbios inflamatórios ou distúrbios caracterizados por níveis elevados de TNF α .

Deve assinalar-se, para que não restem dúvidas, que o mecanismo primário de acção dos BSCI, incluindo os compostos aqui reivindicados, é no sistema imunitário. Consequentemente, os efeitos benéficos reivindicados em doenças, tais como infecção e/ou replicação viral e crescimento de tumores (estados que, por si só, não são doenças originariamente do sistema imunitário) resultam dos efeitos consequentes da modulação do sistema imunitário na infecção e/ou padrões de replicação do vírus, ou no crescimento e disseminação do tumor. Uma vez que os BSCI, incluindo os compostos aqui reivindicados, não afectam (em geral) directamente a replicação viral ou crescimento de tumores, esperar-se-ia que não tivessem qualquer efeito de todo num sistema isolado (por exemplo, numa infecção *in vitro* de uma linha de células cultivada ou num ensaio de proliferação de linha de células tumorais) onde está ausente um sistema imunitário intacto e actuante. Consequentemente, a informação anterior referente aos efeitos de quaisquer compostos nesses sistemas isolados não pode dar informação sobre o desenvolvimento de BSCI, os quais actuam no sistema imunitário.

A administração de um medicamento de acordo com a invenção pode ser realizada por via tópica, oral, parentérica, por injeção intramuscular, etc.

A dose de administração considerada para um medicamento de acordo com a invenção está compreendida entre 0,1 mg e 10 g dependendo da formulação e via de administração utilizadas.

De acordo com a invenção, os compostos de fórmula geral (I) ou (I') podem ser preparados utilizando os processos descritos daqui em diante.

Preparação dos compostos de fórmula geral (I) ou (I')

Todos os compostos de fórmula geral (I) ou (I') podem ser facilmente preparados de acordo com métodos gerais conhecidos pelo especialista na técnica.

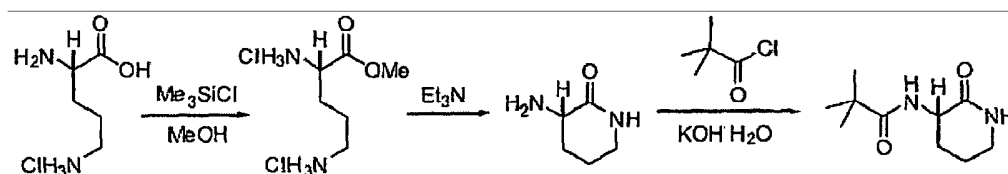
O composto (I) é um composto cristalino incolor que pode ser preparado a partir de ornitina e cloreto de 2,2-dimetilpropionóilo. Para a síntese de (I') enantiomericamente puro seria utilizada (S)-ornitina. É possível um fecho de anel começando com ornitina ou o seu éster metílico. O aminoácido pode ser esterificado em metanol seco por geração *in situ* de HCl utilizando cloreto de trimetilsililo. Alternativamente, o éster isolado pode sofrer fecho de anel, em quaisquer dos casos utilizando trietilamina. O produto em bruto pode ser depois acilado após uma troca de solvente.

O produto de acilaminolactama (I) tem solubilidade significativa em água e como uma consequência, as condições de acilação utilizadas para produtos mais hidrófobos, relacionados (ver, por exemplo, documento WO2006/134385) foram insatisfatórias. A utilização de três equivalentes de carbonato de sódio como base resultou na formação de precipitação

significativa do subproduto hidrogenocarbonato de sódio, a menos que fosse utilizada uma grande quantidade de água (>4 mL/mmol de ornitina). A estas concentrações a extracção do produto para diclorometano não é eficaz. Por conseguinte, os três equivalentes de carbonato de sódio foram substituídos com 2,5 equivalentes de hidróxido de potássio (os quais neutraliza os 2,5 equivalentes de cloridrato de trietilamina produzidos no passo de fecho do anel). Com esta base pode utilizar-se significativamente menos água (menos de 1 mL/mmol de ornitina) (pH final 8-9). A extracção da camada aquosa com AcOEt (3 x 2 mL/mmol de ornitina) e recristalização de AcOEt (0,5 mL/mmol, quente) e éter de petróleo 40-60 (5 mL/mmol) produziram uma primeira colheita com 43% de rendimento (4,25 g a partir de 50 mmol de ornitina).

Assinale-se que se o pH da camada aquosa for demasiado baixo durante o processamento, serão então extraídas pequenas quantidades de cloridrato de trietilamina para a camada de AcOEt. Tentativas para lavar esta solução de AcOEt com água extrairão quantidades significativas do produto de lactama (**I**) juntamente com o cloridrato de amina. Isto pode ser evitado aumentando o pH da camada aquosa até 12 (por exemplo, por adição de grosseiramente um equivalente de KOH em relação ao cloreto de ácido) antes de ser tentada a extracção com AcOEt, em seguida apenas é extraída trietilamina base livre juntamente com o produto de lactama (**I**), a qual pode ser removida mais facilmente por evaporação ou durante a recristalização.

Por conseguinte, é proporcionada a seguinte via sintética preferida:



Monocloridrato de (S)-ornitina (50 mmol) é suspenso em metanol seco (100 mL) e adicionado cloreto de trimetilsililo (75 mmol). A reacção é aquecida a refluxo durante 24 horas. Em seguida, é adicionada trietilamina (150 mmol) e a reacção é aquecida a refluxo durante 48 horas. O metanol é, em seguida removido sob pressão reduzida (opcionalmente, pode ser adicionado tolueno nas últimas fases para facilitar a remoção) e o resíduo é dissolvido em água (20 mL), com KOH adicionado (125 mmol).

A mistura é arrefecida até 0 °C, em seguida, é lentamente adicionado cloreto de 2,2-dimetilpropionilo (50 mmol) e a reacção agitada durante 18 horas, enquanto é aquecida até à temperatura ambiente. Em seguida, é adicionado KOH sólido (50 mmol) e uma vez dissolvido a reacção é extraída com AcOEt (3 × 100 mL). As camadas orgânicas combinadas são rapidamente secas sobre uma combinação de K_2CO_3 e Na_2SO_4 e reduzidas sob pressão baixa. O resíduo sólido é depois recristalizado de AcOEt (25 mL)/éter de petróleo 40-60 (200-250 mL) para dar a lactama (I') como um sólido cristalino (mais de 50% de rendimento).

A identidade e pureza (>95%) do produto foi então confirmada por espectroscopia de RMN de protão (δH (400 MHz, CDCl_3) 6,63 (1H, s 1, NH), 6,01 (1H, s 1, NH), 4,20 (1H, dt, J 11, 5,5, CHNH), 3,40-3,31 (2H, m, CH_2NH), 2,61 (1H, dq, J 13,

4,5, CH₂), 1,97-1,88 (2H, m, CH₂), 1,50 (1H, dddd, J 13, 12, 9,5, 7,5, CH₂), 1,22 (9H, s, 3× CH₃).

DEFINIÇÕES

A expressão "cerca de" refere-se a um intervalo em torno do valor considerado. Como utilizado neste pedido de patente, "cerca de X" significa um intervalo desde X menos 10% de X até X mais 10% de X e, de um modo preferido, um intervalo desde X menos 5% de X até X mais 5% de X.

A utilização de uma gama numérica nesta descrição destina-se inequivocamente a incluir no âmbito da invenção todos os números inteiros individuais dentro da gama e todas as combinações de números limite superiores e inferiores dentro do âmbito mais alargado da referida gama. Assim, por exemplo, a gama de 0,1 mg a 10 g especificada em relação (*inter alia*) à dose de 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona a ser utilizada pretende incluir todas as doses entre 0,1 mg e 10 g e todas as subgamas de cada combinação de números superiores e inferiores, explicitamente exemplificado ou não.

Como aqui utilizado, o termo "compreendendo" é para ser lido como significando compreendendo e consistindo de. Consequentemente, quando a invenção refere-se a uma "composição farmacêutica compreendendo como ingrediente activo" um composto, esta terminologia destina-se a abranger composições nas quais podem estar presentes outros ingredientes activos e também composições que consistem apenas de um ingrediente activo como definido.

Salvo indicação em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que aquele geralmente entendido por um especialista no campo ao qual pertence esta invenção. Analogamente, todas as publicações, pedidos de patente, todas as patentes e todas as outras referências aqui mencionadas são incorporados por meio de referência (quando legalmente admissível).

Os exemplos seguintes são apresentados para ilustrar os procedimentos acima e não devem ser considerados, de modo algum, como limitando o âmbito da invenção.

FIGURAS

A Figura 1 (painéis A a E) mostra os gráficos tempo-concentração para os cinco compostos (**I'**) a (**V**) testados, após administração de uma única dose de 3 mg/kg em CMC a 1% através da via oral a ratos. As três linhas para cada composto representam réplicas em três animais. O eixo dos Y representa a concentração em unidades de ng/mL (0-3000); o eixo dos X representa o tempo em unidades de minutos (0-480).

A Figura 2 mostra os metabolitos principais identificados por LC-MS-MS (no modo de varrimento total) em urina agrupada recolhida ao longo de 24 h de ratos expostos a uma única dose oral de cada um dos cinco compostos (**I'**) a (**V**) testados, administrada em CMC a 1% a 3 mg/kg. Assinale-se que foi identificado um metabolito principal do composto (**IV**) mas a sua estrutura não foi elucidada por comparação dos padrões de fragmentação/rearranjo com os publicamente

disponíveis nas bases de dados Metabolite ID. Embora não tivessem sido determinadas as concentrações dos metabolitos individuais, eles são apresentados por ordem qualitativa de abundância na urina, com a espécie mais abundante na esquerda de cada fila.

A Figura 3 (painéis A-F) mostra os gráficos da corrente contra o tempo para células que expressam o produto de gene hERG, quando expostas ao veículo ou aos cinco compostos (**I'**) a (**V**), cada numa experiência separada. Em cada experiência, réplicas de células foram expostas ao composto de controlo positivo, o qual bloqueia completamente a corrente transduzida pelo hERG. O eixo dos Y representa a corrente em unidades de nA; o eixo dos X representa o tempo em unidades de segundos. O painel G mostra a corrente de cauda de hERG (a área sob os gráficos do tempo contra a corrente nos painéis A-F) para réplicas de células expostas a cada composto ou ao veículo com 0,1% de DMSO sozinho (Veíc.) ou ao composto de controlo positivo E-4031 (+ve). O eixo dos Y do histograma no painel G representa a percentagem de inibição da corrente de cauda de hERG relativamente a células não tratadas.

A Figura 4 mostra uma curva de ligação típica para o composto (**I'**). Nesta experiência, cada reacção recebeu BN83250 marcado 10 nM (um BSCI de lactama, que se liga ao mesmo receptor que o composto (**I'**)), em conjunto com vários competidores (100 μ M-1 pM). A ligação específica total foi a quantidade substituída por um grande excesso (100 μ M). Cada barra representa a média de três determinações repetidas, com os bigodes a representar o SEM. O eixo dos Y representa as contagens radioactivas ligadas em cada

experiência em unidades de contagens por minuto (cpm). A linha a tracejado superior representa a ligação total nas condições da experiência, enquanto a linha a tracejado inferior representa a ligação não específica; a ligação específica é representada pela distância entre as linhas a tracejado.

A Figura 5 mostra o perfil de reactividade cruzada para cada um dos cinco compostos (**I'**) a (**V**) (painel A: (**II**); B: (**III**); C: (**V**); D: (**I'**) e E: (**IV**)) contra um painel de 75 receptores diferentes que constituem o painel CEREP (ver texto). Os compostos foram testados a uma única concentração (10 μ M) e é indicada a inibição da ligação (eixo dos Y de cada histograma) de um ligando conhecido a cada dos 75 receptores (portanto -100% representa um aumento de 2 vezes na ligação do ligando específico na presença do composto de ensaio). Todas as reacções foram realizadas em duplicado e as barras representam a média (não é mostrada a estimativa do erro da repetição para simplificar os gráficos). Apenas uma inibição (ou estimulação) de 50% ou mais da ligação (que representa uma ED50 inferior a 10 μ M para a interacção do composto de ensaio com o receptor particular) foi considerada estatística e biologicamente significativa neste ensaio de selecção. Para os cinco compostos aqui testados, apenas uma interacção (a do composto (**II**) com o receptor NK2, marcada pela ponta de seta no painel A) foi considerada potencialmente significativa, embora mesmo esta interacção seja fraca (ED50 estimada 5-10 μ M).

A Figura 6 (painéis A-E) mostra curvas dose-resposta representativas para a inibição da migração de leucócitos

induzida por quimiocina *in vitro*, para cada um dos cinco compostos (**I'**) a (**V**) no ensaio de migração *transwell* ChemoTx™. Em cada experiência, células THP-1 foram induzidas a migrar utilizando uma dose maximamente eficaz da quimiocina MCP-1 na presença ou ausência de várias doses (desde 10 µM a 1 µM) de cada composto. Em cada experiência foi utilizado um controle de veículo apropriado. A percentagem de inibição da migração induzida por MCP-1 (calculada como o número de células migradas na presença de MCP-1 menos o número de células migradas sem MCP-1 na câmara inferior) a cada concentração de cada composto de ensaio é mostrada como a média de determinações em triplicado, com os bigodes a representar o SEM. A ED50 foi estimada por interpolação linear dos gráficos apresentados. O eixo dos Y de cada gráfico representa a percentagem de inibição da migração induzida por MCP-1; o eixo dos X representa a concentração de composto de ensaio presente em unidades de nM (0,01-1000).

A Figura 7 mostra curvas dose-resposta representativas para a inibição da produção de TNF-α induzida por LPS *in vivo* num modelo murídeo de endotoxemia subletal. Em cada experiência, grupos de seis ratinhos receberam pré-tratamento com os cinco compostos (painel A: (**II**); B: (**III**); C: (**V**); D: (**I'**) e E: (**IV**)) a várias doses, através da via oral (círculos) ou via subcutânea (triângulos). Após 30-60 min, os animais foram inoculados com LPS através da via intraperitoneal e foi preparado soro a partir de um sangramento terminal 3 horas depois. O nível de TNF-α no sangue foi medido por ELISA, e o grau de inibição da produção de TNF-α induzida por LPS (calculada como a concentração de TNF-α em ratinhos expostos a LPS

menos a concentração de TNF- α em ratinhos que receberam uma exposição simulada a PBS sem endotoxina) é mostrado no eixo dos Y de cada gráfico como a média de seis animais, com os bigodes a representar os SEM. A concentração de TNF- α em ratinhos que receberam LPS mas sem tratamento com BSCI foi tipicamente de 5000 a 6000 pg/mL em média (em comparação com os <10 pg/mL em ratinhos não inoculados). A ED50 foi estimada por interpolação linear dos gráficos apresentados. O eixo dos X de cada gráfico representa a dose de cada composto administrada a cada ratinho no grupo em unidades de mg (1E-07 a 1).

A Figura 8 mostra o efeito do composto (**I'**) na inflamação pulmonar numa experiência representativa, como avaliado pelas contagens de células no líquido BAL num modelo de asma em roedor. As barras representam as contagens médias de células, mostradas no eixo dos Y em unidades de 10^6 células, para grupos de 5 animais com os bigodes a representar o SEM; *p < 0,01 contra 'sensibilizados' utilizando o teste t de Student desemparelhado assumindo variância igual, bilateral). A linha horizontal representa o número médio de leucócitos presentes no líquido BAL dos pulmões de ratos não inoculados. Todos os ratos nos restantes três grupos receberam o mesmo regime de sensibilização e inoculação, mas foram tratados com veículo sozinho ("Sensibilizados") ou com composto (**I'**) a 0,3 mg/kg de peso corporal ou com montelucaste ("Singulair™") a 30 mg/kg de peso corporal, todos administrados diariamente por sonda oral.

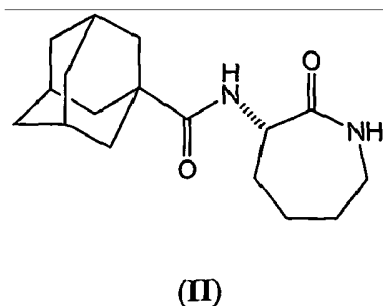
A Figura 9 mostra o efeito do composto (**I'**) na polarização de células T auxiliares numa experiência representativa,

como avaliado através de determinação por citometria de fluxo da produção de IFN- γ (uma citocina marcadora de Th1) e IL-4 (uma citocina marcadora de Th2) por esplenócitos CD4+ num modelo de asma em roedor. As barras representam as razões Th1/Th2 médias, mostradas no eixo dos Y, para grupos de 10 animais, os bigodes representam o SEM; * p < 0,05 contra ratos não inoculados; † p < 0,05 contra ratos sensibilizados e inoculados, em ambos os casos utilizando o teste t de Student desemparelhado assumindo variância igual, bilateral). Todos os ratos (excepto o grupo de 'ratos BN', o qual não foi exposto a ovalbumina) receberam o mesmo régimen de sensibilização e inoculação, mas foram tratados com veículo sozinho ('Sensibilizados + veículo'), ou com composto (**I'**) a 0,3 mg/kg de peso corporal ou com montelucaste ('Singulair™') a 30 mg/kg de peso corporal, todos administrados diariamente por sonda oral.

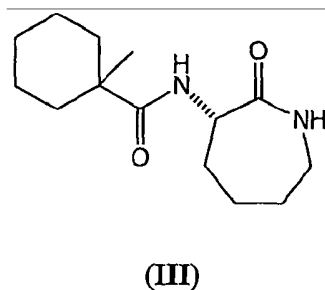
A Figura 10 é um gráfico da semi-vida no plasma (em minutos) contra a exposição oral para uma gama de compostos BSCI diferentes em rato. Em cada caso, a semi-vida foi estimada utilizando um modelo de um compartimento padrão de concentrações no plasma às 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h após uma única dose bolus iv do composto a 1 mg/kg dissolvido em CMC a 1%, DMSO a 0,9% em soro fisiológico. A exposição oral (AUC_{0-t} em unidades de min.ng/mL) foi calculada após uma única dose oral do composto a 3 mg/kg dissolvido em CMC a 1%, DMSO a 0,9% em soro fisiológico. O enantiómero R do composto (**I**) que é a inversão do composto (**I'**) e é identificado como "(R)-(**I**)" está marcado com um círculo aberto.

EXEMPLOS

Em cada dos exemplos 1 a 6 seguintes, a (S)-3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona (composto **I'**) foi comparada com uma gama de outros BSCI de lactama, os quais foram seleccionados como sendo representativos das várias subclasses. Por exemplo, a 3-(adamantano-1-carbonilamino)-caprolactama (**II**) foi seleccionada como típica da subclasse de BSCI de tipo policicloacil-lactama (tal como aqueles anteriormente divulgados no documento W02006/016152).

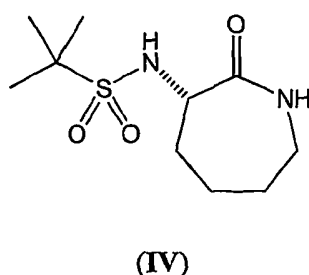


Analogamente, a 3-(1'-metilciclo-hexilcarbonilamino)-caprolactama (**III**) foi seleccionada como típica da subclasse de BSCI de tipo monocicloacil-lactama (tal como aqueles anteriormente divulgados no documento W02006/134384).

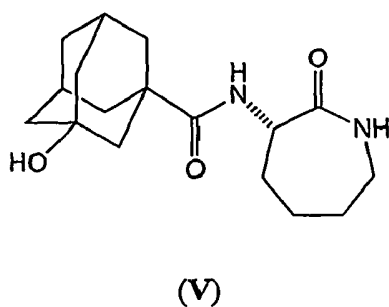


O composto 3-(1',1'-dimetiletilsulfonilamino)-caprolactama (**IV**) foi seleccionado como típico da subclasse de

BSCI com cadeias laterais alquilo simples (não cíclicas) (tais como aqueles anteriormente divulgados no documento WO2005/053702), bem como aqueles com um ligante sulfonilamino (ao contrário do ligante de amida de carbono nos restantes compostos seleccionados).



O composto final seleccionado, a 3-(3'-hidroxiadamantil-1-carbonilamino)-caprolactama (**V**) foi típica dos BSCI com uma cadeia lateral acilo substituída (quer de estrutura linear simples, ramificada, mono- ou policíclica).



É importante referir que todos estes compostos BSCI (**II**) a (**V**) foram antes especificamente divulgados e todos têm actividade BSCI potente *in vitro* (ED50 <1nM para a inibição da migração de células THP-1 induzida por MCP-1). Todos têm excelente estabilidade no soro, *in vitro* e, de uma perspectiva teórica, são todos excelentes candidatos para desenvolvimento

como fármacos humanos com propriedades anti-inflamatórias *in vivo*.

Todos os compostos acima (**I'**, **II**, **III**, **IV** e **V**) foram testados na configuração (S) no centro estereoquímico lactama.

Exemplo 1 Farmacocinética após uma dose única

Os compostos foram administrados como uma dose única (1 mg/kg de peso corporal em DMSO a 5% através da via intravenosa ou 3 mg/kg em carboximetilcelulose a 1% através da via oral) a três ratos adultos (utilizando ratos diferentes para cada composto e cada via de administração).

O sangue foi então amostrado em vários intervalos de tempo (incluindo imediatamente antes da administração da dose) até 24 h após a dose e o nível dos vários compostos foi avaliado utilizando um ensaio de LC-MS/MS validado. Resumidamente, 3-5 µL da amostra desproteïnizada foram aplicados numa coluna de cromatografia de fase inversa Waters Atlantis (C 18 20x2,1 mm, 3 µm de tamanho de partícula) equilibrada em 0,1% de ácido fórmico em água :acetonitrilo 95:5. Ao longo de 3,5 minutos o material ligado foi eluído com um gradiente que atingiu 0,1% de ácido fórmico em água :acetonitrilo 5:95, seguido de um gradiente em degrau de regresso a 0,1% de ácido fórmico em água :acetonitrilo 95:5. O eluente da coluna foi então dirigido para um espectrómetro de massa MS/MS API 4000/3200 QTrap Applied Biosystems, com uma fonte de iões TurboIonspray™ a funcionar no modo de iões positivos. A temperatura da interface foi ajustada para 650 °C, com um tempo de residência de 40 ms para cada transição de MRM, monitorizando os seguintes iões:

Analito	Massa Q1 (amu)	Massa Q3 (amu)
(II)	291,14	135,1
(III)	253,16	97,0
(V)	307,15	151,1
(I')	199,15	57,2
(IV)	249,15	129,3
Padrão interno	213,19	57,1

O padrão interno em cada determinação foi o composto relacionado (S)-3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-caprolactama, o qual foi adicionado à amostra antes da desproteínização. O limite inferior de quantificação (LLOQ) para este ensaio foi 2,4 ng/mL para cada composto excepto o (I'), onde foi 38,1 ng/mL.

Após análise por LC-MS/MS de cada amostra recolhida, a disposição farmacocinética do composto foi modelada utilizando o software Kinetica, um pacote de software bem conhecido para estas aplicações.

Resultados

Os gráficos da concentração individual contra o tempo para cada rato tratado com cada composto através da via oral são mostrados na Figura 1. É imediatamente óbvio que destes cinco BSCI de lactama estruturalmente diferentes apenas o (IV), (V) e (I') conseguem qualquer exposição oral apreciável e, que destes, o (I') é substancialmente melhor do que os outros.

Os parâmetros de um modelo farmacocinético simples de um compartimento são mostrados na Tabela 1. Em primeiro lugar, isto demonstra a exposição superior conseguida com **(I')** - quase 20 vezes superior ao melhor composto seguinte, **(V)**. A razão para esta exposição superior (a qual é calculada como a área sob a curva da concentração contra o tempo, nas unidades de min.ng/mL) é também evidente: a eliminação de **(I')**, a qual é definida como o volume teórico de sangue que é completamente limpo de fármaco a cada minuto em unidades de mL/min/kg, é mais de 10 vezes inferior do que para os outros BSCI de lactama.

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos para BSCI de lactama estruturalmente diferentes.

	F (%)	t _{1/2} (min)	Eliminação (mL/min/kg)	V _{ss} (L/kg)	Exposição (min.ng/mL)
(I')	69	196	2,6	0,7	939 000
(II)	<1	16	84	0,8	477
(III)	5	11	55	0,6	2,900
(IV)	45	19	32	0,6	41 400
(V)	59	24 *	31	1,4	57 100

A biodisponibilidade oral (F, %), semi-vida dominante no plasma (t_{1/2}, min), eliminação (mL/min/kg), volume de distribuição (V_{ss}, L/kg) e exposição (AUC 0->infinito, min.ng/mL) de um modelo farmacocinético simples de um compartimento para cada composto, baseou-se na média para três ratos. * 24 min é a semi-vida dominante para **(V)** representando a eliminação de mais de 95% da dose injectada; o t_{1/2β} mais pequeno foi 110 min. Em todos os casos a C_{max} foi conseguida em menos de 30 min, coerente com absorção óptima.

A eliminação de **(II)** e **(III)** aproxima-se do fluxo sanguíneo hepático do rato, sugerindo fortemente que ambos estes compostos são metabolizados quase completamente na primeira passagem através do fígado. Analogamente, as eliminações de **(IV)** e **(V)** excederam o fluxo sanguíneo renal no rato por algo como 3-4 vezes, sugerindo mais uma vez uma eliminação metabólica substancial também presumivelmente mediada pelo fígado. Em contraste acentuado, a eliminação de **(I')** a 2,6 mL/min/kg é menos de metade do fluxo sanguíneo renal (tipicamente citado como 7-9 mL/min/kg), o que sugere eliminação metabólica mínima. Uma vez que **(I')** é extremamente solúvel em água, com um volume de distribuição coerente com equilíbrio livre na água de todo o corpo (0,7 L/kg), é provável que a eliminação abaixo do fluxo sanguíneo renal represente a reabsorção com água no túbulo distal renal (em vez de, por exemplo, exposição reduzida ao rim devido a sequestro nos compartimentos lipófilos).

Coerente com a eliminação muito menor para **(I')** em comparação com os outros compostos, **(I')** tem uma semi-vida no plasma substancialmente mais longa (mais do que 3 horas, em comparação com menos de meia hora para os outros quatro compostos).

Verifica-se que nem todos os BSCI têm biodisponibilidade oral, ainda que todos os cinco compostos escolhidos fossem conhecidos como tendo bioactividade oral nos critérios de inflamação aguda. Isto reflecte provavelmente o metabolismo rápido mediado pelo fígado de **(II)** e **(III)**, os quais são absorvidos eficientemente mas convertidos na primeira passagem através do fígado em metabolitos que retêm alguma actividade como BSCI (ver exemplo 2).

Com base nesta análise farmacocinética, será óbvio para os especialistas na técnica que apesar da estabilidade química e estabilidade *in vitro* semelhantes em soro isolado para estes cinco compostos, bem como das suas propriedades previstas semelhantes em termos teóricos, todavia (**I'**) é acentuadamente superior a todos os outros. Em particular, a eliminação do composto é muito menor, reflectindo provavelmente uma menor propensão para o metabolismo mediado pelo fígado, resultando numa semi-vida no plasma 10 vezes mais longa e quase 20 vezes melhor exposição oral do que o melhor composto seguinte examinado.

Numa experiência separada, (**I'**) foi comparado com o segundo melhor composto (**V**) quanto aos parâmetros farmacocinéticos numa espécie diferente (não roedora), o cão. Foram administradas doses únicas (1 mg/kg em DMSO a 5% por via intravenosa ou 3 mg/kg em CMC a 1% *per se*) a um único cão para cada composto numa concepção cruzada simples com 1 semana de intervalo entre as duas vias de administração.

Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação dos parâmetros farmacocinéticos para as duas melhores lactamas

PK Intravenosa (1 mg/kg)				
Composto	Espécie	Semi-vida (min)	Eliminação (mL/min/kg)	Vss (L/kg)
(V)	Rato	24	33	0,8
	Cão	66	7,4	0,6
(I')	Rato	196	2,6	0,7
	Cão	236	1,9	0,6

PK Intravenosa (1 mg/kg)					
Composto	Espécie	Semi-vida (min)	Eliminação (mL/min/kg)	Vss (L/kg)	
PK Oral (3 mg/kg)					
Composto	Espécie	Tmax (min)	Semi-vida (min)	Bio-disponibilidade (%)	AUC (min.ng/mL)
(V)	Rato*	15	24	59	57100
	Cão	60	67	59	240000
(I')	Rato	15 - 120	226	81	939000
	Cão	60	217	75	1210638

BSCI no rato e cão. As farmacocinéticas no cão são, em geral, semelhantes ao rato. Em ambas as espécies, o composto (I') tem eliminação consideravelmente inferior, semi-vida no plasma mais longa e, por isso, maior exposição (AUC em min.ng/mL). Em cada caso a semi-vida predominante (o $t_{1/2\alpha}$ mais rápido) é responsável pela eliminação de mais de 95% da dose injectada.

Estas observações indicam que as propriedades farmacocinéticas superiores de (I') não são específicas para a espécie e, conseqüentemente, é também muito provável que sejam observadas em humanos.

Exemplo 2 Identificação dos metabolitos primários

Foi recolhida urina de ratos expostos a uma única dose oral (3 mg/kg em CMC a 1%) de cada composto ao longo de um período de 24 horas em gaiolas metabólicas. A amostra de urina agrupada foi

então submetida a análise por espectrometria de massa de varrimento total, utilizando as mesmas condições de LC-MS que as descritas no exemplo 1 acima. Foi então realizada uma análise MS-MS adicional dos iões produto e as fragmentações/rearranjos prováveis atribuídos a partir da base de dados publicamente disponível Metabolite ID.

Para os metabolitos principais, as estruturas atribuídas foram confirmadas por síntese de amostras autênticas, utilizando métodos bem conhecidos na técnica, as quais foram submetidas a análise por LC-MS-MS nas mesmas condições que as amostras de urina.

Assinale-se que os estudos ID de metabolitos proporcionam apenas estimativas qualitativas das quantidades relativas dos diferentes metabolitos presentes e seriam necessários ensaios validados separadamente com padrões internos apropriados para quantificar cada espécie de metabolito.

Resultados

Os metabolitos detectados, por ordem de classificação da concentração detectada são mostrados na Figura 2 para os cinco compostos analisados. É importante referir que a metodologia aqui utilizada não é necessariamente exaustiva e podem estar também presentes outros metabolitos (em particular, secundários) que estavam abaixo dos limites de detecção para os métodos aqui aplicados. Como uma regra geral, pode assumir-se que os metabolitos que representam 10% ou mais da dose injectada serão detectados (embora não sejam necessariamente identificados em termos estruturais) pelos métodos aqui utilizados).

Para os compostos **(II)** e **(III)** a via principal de metabolismo é a hidroxilação mediada pelo citocromo P450, coerente com a eliminação rápida a uma velocidade que se aproxima do fluxo sanguíneo hepático (ver exemplo 1 acima). O sítio principal de hidroxilação em ambos os compostos é no grupo cicloalquilo da cauda, com uma segunda hidroxilação (mais lenta) a ocorrer no grupo lactama da cabeça. Assinale-se que os produtos de hidroxilação da lactama surgiam no MS-MS a -2 amu (ao contrário de +16 amu) devido à instabilidade dos aductos 7-hidroxilo na fonte de electrospray.

Para o composto **(II)** o produto di-hidroxilado estava presente em quantidade suficiente para ser detectado na urina, enquanto para o composto **(III)** não foi detectado qualquer produto de di-hidroxilação. Em ambos os casos, é provável que se tenham também formado produtos secundários adicionais abaixo do nível de detecção do método aplicado (por exemplo, os derivados 3,5-di-hidroxi- e 3,5,7-tri-hidroxi-adamantilo de **(II)**, bem como os aductos glucuronidados de ambos hidroxi-**(II)** e hidroxi-**(III)**, particularmente porque foi detectado o aducto glucuronidado de **(V)**).

Para o composto **(V)** o composto glucuronidado foi o metabolito principal, embora no rato apenas uma fracção menor do glucuronato seja eliminado na urina, passando a maior parte para as fezes (em contraste acentuado com os humanos, onde este aducto glucuronidado seria principalmente excretado na urina). É possível que se formem também outros metabolitos de fase II (tal como o 3'-O-sulfato), mas apenas a níveis (pelo menos na urina) demasiado baixos para serem detectados pelos métodos aqui utilizados. Quanto aos compostos **(II)** e **(III)** foi também

detectada uma pequena quantidade de produto hidroxilado no grupo lactama da cabeça (mais uma vez, principalmente como um ião produto a -2 amu).

Para o composto (**IV**) o metabolito principal não pôde ser identificado, embora a perda de composto parental (ver Tabela 3) fosse claramente coerente com a formação de um metabolito não identificado (menos de 10% da dose injectada de (**IV**) foi recuperada inalterada. Dado que o composto (**IV**) era o único agente contendo uma ligação sulfonamida é plausível, mas não foi efectivamente demonstrado que ocorresse dissociação metabólica (ou outra modificação) do ligante. Mais uma vez foi também observada uma pequena quantidade de hidroxilação no grupo de lactama da cabeça.

Em contraste acentuado com todos os outros compostos não foram detectados metabolitos significativos de (**I'**) na urina, coerente com o aparecimento da maioria da dose injectada na urina na forma inalterada (ver Tabela 3) e com taxas de eliminação iguais ou inferiores ao fluxo sanguíneo renal (ver exemplo 1 acima). Esta ausência de formação de metabolitos é uma vantagem importante e inesperada de (**I'**) em relação aos outros compostos aqui testados para desenvolvimento como um fármaco humano e é, pelo menos em parte, responsável pelas propriedades farmacocinéticas superiores descritas no exemplo 1 acima.

Para proporcionar uma estimativa quantitativa do grau de metabolismo sofrido por cada dos compostos testados, a quantidade de composto parental inalterado na urina foi medido utilizando o mesmo ensaio de LC-MS validado descrito no exemplo 1, utilizando (S)-3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-caprolactama como um padrão interno. Os resultados são mostrados

na Tabela 3. Além disso, foi também determinado o nível de compostos em vários tecidos alvo.

Quadro 3. Distribuição dos compostos em vários tecidos 24 h após uma dose única no rato.

<i>nd = não detectado; LLOQ = 2,4 ng/g</i>							
Composto	Coração	Pulmão	Rim	Fígado	Músculo	Cérebro	Urina (ng/mL)
(II)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
(III)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
(V)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	16300
(I')	5,3	21,9	5,1	3,6	3,1	1,6	24567
(IV)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	1010

Apenas os compostos (I'), (V) e (IV) foram detectáveis na urina às 24 h após uma dose oral única (3 mg/kg em CMC a 1%). Destes, o composto (I') sofreu significativamente menos metabolismo (mais de 60% da dose injectada foi recuperada na urina). Além disso, apenas o composto (I') podia ser detectado em qualquer dos outros tecidos examinados 24 h após uma dose única. Isto reflecte provavelmente a distribuição superior e maior exposição associada a (I') em comparação com os outros compostos aqui testados.

A velocidade de metabolismo muito menor de (I') em comparação com os outros compostos demonstra que, de modo inesperado, (I') é acentuadamente superior à grande gama de BSCI de lactama anteriormente divulgados para desenvolvimento como um fármaco humano. Este metabolismo reduzido (e, por isso, melhores propriedades de ADME) é provavelmente responsável pelas propriedades farmacocinéticas dramaticamente superiores

mostradas no exemplo 1 acima. Além disso, uma vez que os BSCI se destinam ao desenvolvimento como agentes anti-inflamatórios que visam o recrutamento inapropriado de leucócitos numa grande gama de tecidos, a observação inesperada de que (**I'**) estava presente em todos os tecidos do corpo testados 24 h após uma dose única, enquanto todos os outros BSCI de lactama testados não estavam, demonstra inequivocamente a utilidade particular deste novo composto.

Exemplo 3. Farmacologia de Segurança

Os cinco compostos foram submetidos a um ensaio AMES padrão para avaliar a probabilidade de genotoxicidade. Três estirpes de auxotrofos de His de *S. Typhinurium* (TA102, TA98 e TA100) foram tratadas com cada um dos compostos a 5 concentrações (até 5 mg/mL) na presença e ausência de sistema de metabolização microssômico S9 de fígado de rato. O número de colónias com mutação inversa foi então determinado aplicando meio mínimo com vestígios de His.

Os resultados (Tabela 4) mostram que nenhum dos cinco compostos aumenta significativamente a formação de colónias com mutação inversa (com ou sem activação metabólica) em qualquer uma das estirpes testadas.

Tabela 4. Formação de colónias com mutação inversa no teste de AMES.

Composto	TA100	TA100 +S9	TA102	TA102 +S9	TA98	TA98 +S9
(II)	0,59 *	0,73	0,50 *	0,93	0,58 *	0,60 *
(III)	0,79	0,81	0,69	0,88	0,68	0,55
(V)	0,78	0,88	0,93	1,09	0,96	0,91
(I')	0,97	0,95	0,82	0,93	2,00 **	1,23
(IV)	0,89	0,90	0,85	0,88	0,82	0,90
controlo +vo	6,89	7,18	5,97	2,65	9,68	19,05

A 5 mg/mL: * = camada de fundo bacteriana escassa
 ** = valor de controlo baixo nesta experiência
 = aumento significativo de colónias com mutação inversa

Nenhum dos compostos testados originou um aumento significativo na formação de colónias com mutação inversa a qualquer uma das concentrações testadas (são mostrados dados apenas para a dose máxima). Assinale-se que o composto (II) provocou inibição do crescimento da camada bacteriana a 5 mg/mL.

Numa experiência separada, todos os cinco compostos foram testados quanto à interacção com o canal iónico hERG. Os compostos que interagem com hERG têm o risco de originar prolongamento QT e arritmia cardíaca potencialmente fatal. Os compostos que inibem a corrente de cauda de hERG em mais do que 50% a 10 µM são geralmente considerados de alto risco para desenvolvimento como fármacos humanos.

Células HEK239 transfectadas de forma estável para expressar hERG foram perfundidas com solução de banho contendo os compostos a 10 µM (DMSO a 0,1%). As correntes de cauda de hERG de três células foram, em seguida, registadas por análise de contacto hermético após despolarização a +20 mV durante 5 s.

A potência da interacção com hERG foi então determinada numa curva dose-resposta de 4 pontos para qualquer um dos compostos que apresenta modulação significativa a 10 µM.

Os resultados (Figura 3) mostram que nenhum dos cinco compostos interagiu significativamente com o canal hERG a 10 µM.

A requerente concluiu que, de uma perspectiva de farmacologia de segurança, todos os cinco compostos, incluindo (**I'**) são igualmente adequados para desenvolvimento como fármacos humanos. Em particular, as propriedades de ADME e farmacocinéticas consideravelmente superiores de (**I'**), ilustradas nos Exemplos 1 e 2 acima, não são acompanhadas pelos perfis de farmacologia de segurança correspondentemente piores.

Exemplo 4. Farmacologia geral

A farmacologia geral dos cinco compostos foi avaliada contra o receptor alvo específico e contra uma grande variedade de outros receptores, muitos relacionados em estrutura com o receptor alvo. A ligação específica ao receptor alvo foi avaliada por competição para a ligação de [³H]-BN83250 (BN83250 é (S)-3-(2',2'-dimetildodecanoilamino)-caprolactama; Fox *et al.* J Med Chem. 200;48(3):867-74; um agente conhecido por se ligar ao mesmo receptor alvo que os BSCI de lactama aqui divulgados). A ligação a receptores não alvos foi avaliada por competição para a ligação de vários radioligandos específicos para outros receptores, os quais são bem conhecidos na técnica.

Para ligação específica, a linha de células mielomonocítica humana foi ressuspensa em tampão de ligação (HEPES 20 mM, NaCl

150 mM, pH 7,4; 10^6 células por reacção) a 4 °C na presença de [³H]-BN83250 10 nM (a partir de uma solução-mãe 1 µM em etanol a 100%; 30 Ci/mmol) e vários competidores (concentração de veículo máxima DMSO a 1%). As reacções foram incubadas durante 2 horas sobre gelo, em seguida filtradas através de filtros GF/C pré-embecidos em polietilenoimina a 0,5%. O material não ligado foi eliminado por lavagem com 5 × 5 mL de tampão de lavagem gelado (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) sob um vácuo lento. Estas condições foram anteriormente demonstradas conseguir uma ligação de equilíbrio com, pelo menos, 80% de ligação específica (que pode competir com BN83250 frio 10 µM).

A competição para o [³H]-BN83250 específico com os compostos (**I'**), (**II**) e (**V**) foi então determinada a várias concentrações desde 1pM a 10µM. Os compostos (**III**) e (**IV**) não foram examinados nestas experiências. Uma curva de ligação competitiva típica para (**I'**) é mostrada na Figura 4.

Foi então aplicada modelação não linear às curvas de ligação competitiva para os vários compostos, de modo a comparar a suas propriedades como agentes ligação ao receptor alvo (definido como o sítio de interacção específica do BN83250). Os parâmetros dos modelos resultantes são dados na tabela 5.

Tabela 5. Modelação não linear das curvas de ligação competitiva.

Composto	ED50 funcional contra MCP-1 (pM)	Ka no receptor alvo (pM)	Declive de Hill
(II)	80	8200	-0,5
(III)	80	<i>Não testado</i>	<i>Não testado</i>
(V)	120	10000	-0,5
(I')	50	50	-1,0
(IV)	800	<i>Não testado</i>	<i>Não testado</i>

É importante referir que o composto (I'), em contraste acentuado com os BSCI de lactama (II) e (V), exibiu ligação ideal e previsível ao receptor alvo. Em particular, a afinidade aparente para se ligar ao receptor foi de uma grandeza semelhante ao valor de ED50 funcional nos ensaios de inibição da migração. Analogamente, o Declive de Hill foi, aproximadamente, -1,0 (o valor teoricamente esperado para um modelo de ligação competitiva não cooperativa, simples), enquanto os outros BSCI de lactama exibiram Declives de Hill consideravelmente menos acentuados. A razão do afastamento da ligação ideal ao receptor alvo para os compostos (II) e (V) não é conhecida, mas esta diferença realça ainda mais a superioridade inesperada do composto (I').

A ligação a receptores não alvos foi avaliada utilizando protocolos semelhantes, explorando radioligandos específicos para cada receptor, os quais são bem conhecidos na técnica. Cada composto foi testado quanto à competição contra a ligação específica de cada ligando apenas a uma única concentração (10 μ M). Nos casos em que a inibição de ligação foi entre 20% e 80% foi estimado o Ka para a interacção. Nos casos em que a

inibição foi <20%, assumiu-se que o composto não tinha qualquer interacção competitiva com o receptor. Nos casos em que a inibição foi >80%, o K_a foi indicado como <1 μM . Os detalhes sobre os receptores rastreados e os radioligandos e tipos de células utilizados nos ensaios estão disponíveis em www.cerep.fr

Os resultados (Figura 5) demonstram que todos os compostos de BSCI de lactama testados são desprovidos de reactividades cruzadas importantes com base neste painel de 75 receptores (não foram observadas interacções com um K_a estimado <1 μM). Foi observada (composto (II) com o receptor NK2) apenas uma reacção cruzada fraca (mas estatisticamente significativa). Nesta base, o composto (I') foi ligeiramente mais específico para o receptor alvo do que o (II), mas todos os compostos de BSCI de lactama testados foram adequados para desenvolvimento como fármacos humanos com base na sua ausência de ligação a não alvos identificada neste formato de ensaio de selecção de alto rendimento.

Exemplo 5. Actividade de Inibição de Quimiocinas de Largo Espectro *in vitro*

A actividade biológica dos compostos da presente invenção pode ser demonstrada utilizando qualquer um de uma grande gama de ensaios funcionais de migração de leucócitos *in vitro*, incluindo mas não estando limitados a câmara de Boyden e ensaios de migração *transwell* relacionados, ensaios de migração sob agarose e câmaras de visualização directa tal como a Câmara de Dunn.

Por exemplo, para demonstrar a inibição da migração de leucócitos em resposta a quimiocinas (mas não outros quimiotáticos) foi utilizado o microssistema de ensaio *transwell* ChemoTx™ da Neuroprobe (Gaithersburg, MD, EUA) no formato de 96 poços. Em princípio, este ensaio consiste de duas câmaras separadas por uma membrana porosa. O quimiotático é colocado no compartimento inferior e as células são colocadas no compartimento superior. Após incubação, durante um período a 37 °C, as células movem-se na direcção do quimiotático e o número de células no compartimento inferior é proporcional à actividade quimiotáctica (relativamente a uma série de controlos).

Este ensaio pode ser utilizado com uma gama de populações de leucócitos diferentes. Por exemplo, podem ser utilizados leucócitos de sangue periférico humano recém-preparados. Alternativamente podem ser preparados subconjuntos de leucócitos, incluindo células polimorfonucleares ou linfócitos ou monócitos utilizando métodos bem conhecidos para os especialistas na técnica, tais como centrifugação com gradiente de densidade ou separações com esferas magnéticas. Alternativamente podem ser utilizadas linhas de células imortais que foram consideravelmente validadas como modelos de leucócitos de sangue periférico humano, incluindo, mas não estando limitadas a células THP-1 como um modelo de monócitos ou células Jurkat como modelo de células T naïve.

Embora seja aceitável uma gama de condições para o ensaio para demonstrar a inibição da migração de leucócitos induzida por quimiocina (ver, por exemplo, o conselho proporcionado por Frow *et al.* *Med Res Rev.* 2004; 24(3):276-98 sobre as condições

necessárias para interpretar ensaios de migração *in vitro*) é aqui proporcionado um exemplo específico.

Materiais

Os sistemas de migração *transwell* são fabricados por Neuroprobe, Gaithersburg, MD, EUA. As placas utilizadas são placas ChemoTx™ (Neuroprobe 101-8) e placas transparentes de 30 µL (Neuroprobe MP30).

A Solução Salina Equilibrada de Gey é adquirida de Sigma (Sigma G-9779). A BSA isenta de ácidos gordos é adquirida de Sigma (Sigma A-8806). O MTT, *i. e.* brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, é adquirido de Sigma (Sigma M-5655). O RPMI-1640 sem vermelho de fenol é adquirido de Sigma (Sigma R-8755).

A linha de células THP-1 (Colecção Europeia de Cultura de Células) foi utilizada como a população de células de leucócitos.

Protocolo de ensaio

O seguinte procedimento é utilizado para testar o composto da presente invenção quanto à aptidão para bloquear especificamente migração de leucócitos induzida por quimiocinas:

Em primeiro lugar, é preparada a suspensão de células a ser colocada no compartimento superior. As células THP-1 são sedimentadas por centrifugação (770 × g; 4 min) e lavadas com

Solução Salina Equilibrada de Geys com 1 mg/mL de BSA (GBSS + BSA). Esta lavagem é em seguida repetida e as células ressedimentadas antes de serem ressuspensas num pequeno volume de GBSS + BSA para contagem, utilizando, por exemplo, um hemocitómetro corrente.

O volume de GBSS + BSA é, em seguida, ajustado dependendo do número de células presentes de modo que as células estejam numa densidade final de $4,45 \times 10^6$ células por mL de GBSS + BSA. Isto garante que existam 100000 células THP-1 em cada 25 μ L da solução que será colocada na câmara superior da placa.

De modo a testar um único composto quanto à sua aptidão para inibir a migração induzida por quimiocinas, é necessário preparar dois lotes de células. A suspensão de células THP-1 a $4,45 \times 10^6$ células/mL é dividida em dois vasos. A um vaso é adicionado o inibidor sob ensaio numa concentração final apropriada, num veículo apropriado (por exemplo a 1 μ M em não mais do que 1% de DMSO). Ao segundo vaso é adicionado um volume igual de GBSS + BSA mais veículo consoante apropriado (e. g. não mais do que 1% de DMSO) para actuar como um controlo.

A seguir é preparada a solução de quimiotáctico a ser colocada no compartimento inferior. Por exemplo, a MCP-1 é diluída em GBSS + BSA para dar uma concentração final de 25 ng/mL. Esta é dividida para dois vasos, para a suspensão de células. A um vaso é adicionado o composto de ensaio à mesma concentração final que foi adicionado à suspensão de células, enquanto ao outro vaso é adicionado um volume igual de GBSS + BSA mais veículo consoante apropriado (e. g., não mais do que 1% de DMSO). Alternativamente, podem ser utilizadas outras

quimiocinas (SDF-1 α a 7,5 ng/mL; RANTES a 50 ng/mL; IL-8 a 10 ng/mL utilizando neutrófilos como a população de células alvo). Em cada caso é importante determinar (numa experiência separada) a concentração de cada quimiocina que origina estimulação máxima da migração da população de leucócitos alvos escolhidos. Esta concentração máxima tem de ser depois utilizada em experiências para testar a actividade inibidora dos compostos da invenção. Uma vez que as quimiocinas induzem tipicamente a migração de leucócitos com uma curva dose-resposta em forma de sino, a utilização de uma concentração sub- ou supra-máxima de quimiocina pode levar a resultados artefactuais (por exemplo, um composto que é um inibidor de quimiocinas pode produzir uma *estimulação* paradoxal da migração de leucócitos se for incorrectamente seleccionada uma concentração supra-máxima de quimiotáctico para a experiência. Outras ilustrações deste factor importante na concepção de experiências de migração de leucócitos *in vitro* foram proporcionados por Frow e colegas (Med Res Rev. 2004;24(3):276-98). Além disso, quimiotácticos não quimiocinas podem ser também utilizados para demonstrar a selectividade para a quimiocina da actividade biológica dos compostos da invenção (por exemplo, C5a a 25 ng/mL utilizando neutrófilo como a população de células alvo ou TGF- β 1 a 10 ng/mL utilizando células THP-1 como a população alvo).

Refira-se que o volume de líquido que tem de ser adicionado com a adição do composto de ensaio tem de ser tido em consideração quando se estabelece a concentração final de MCP-1 na solução para o compartimento inferior e a concentração final de células no compartimento superior.

Uma vez preparadas as soluções de quimiotáctico para os poços inferiores e as soluções de células para as câmaras

superiores, a câmara de migração deve ser montada. Colocar 29 μL da solução de quimiotáctico apropriado no poço inferior da câmara. Os ensaios devem ser realizados com, pelo menos, determinações em triplicado de cada condição. Uma vez cheias as câmaras inferiores, aplicar a membrana porosa à câmara de acordo com as instruções do fabricante. Finalmente, aplicar 25 μL da solução de células apropriadas a cada câmara superior. É colocada uma tampa plástica sobre todo o aparelho para prevenir evaporação.

A câmara montada é incubada a 37 °C, 5% de CO_2 , durante 2 horas. Uma suspensão de células em GBSS + BSA é também incubada sob condições idênticas num tubo: estas células serão utilizadas para construir uma curva de calibração para determinar o número de células que migraram para a câmara inferior em cada condição.

No final da incubação, a suspensão líquida de células é suavemente retirada da câmara superior e são adicionados 20 μL de EDTA 20 mM gelado em PBS à câmara superior e o aparelho é incubado a 4 °C durante 15 min. Este procedimento faz com que quaisquer células aderentes ao lado de baixo da membrana caiam para a câmara inferior.

Após esta incubação o filtro é cuidadosamente purgado com GBSS + BSA para eliminar o EDTA e, em seguida, o filtro é retirado.

O número de células que migraram para a câmara inferior sob cada condição pode ser depois determinado por um número de métodos, incluindo contagem directa, marcação com marcadores fluorescentes ou radioactivos ou através da utilização de um

corante vital. Tipicamente, a requerente utiliza o corante vital MTT. São adicionados 3 μ L da solução-mãe de MTT a cada poço e, em seguida, a placa é incubada a 37 °C, durante 1-2 horas, no decurso das quais as enzimas desidrogenase dentro das células convertem o MTT solúvel num produto de formazano azul insolúvel que pode ser quantificado espectrofotometricamente.

Em paralelo é preparada uma curva de calibração de 8 pontos. Começando com o número de células adicionadas a cada câmara superior (100000) e descendo em diluições sucessivas por desdobramento em GBSS + BSA, as células são adicionadas a uma placa em 25 μ L, adicionando 3 μ L de solução-mãe de MTT. A placa da curva de calibração é incubada juntamente com a placa de migração.

No final desta incubação, o líquido é cuidadosamente removido das câmaras inferiores, tendo o cuidado de não perturbar o produto de formazano precipitado. Depois de deixar secar ao ar brevemente, são adicionados 20 μ L de DMSO a cada câmara inferior para solubilizar o corante azul e é determinada a absorvância a 595 nm utilizando um leitor de placas de 96 poços. A absorvância de cada poço é depois interpolada na curva de calibração para estimar o número de células em cada câmara inferior.

A migração estimulada pelo quimiotáctico é determinada subtraindo o número médio de células que atingiu o compartimento inferior nos poços em que não foi adicionada quimiotáctico do número médio de células que atingiu o compartimento inferior quando o quimiotáctico estava presente.

O impacto da substância de ensaio é calculado comparando a migração induzida pelo quimiotáctico que ocorreu na presença ou ausência de várias concentrações da substância de ensaio. Tipicamente, a inibição de migração é expressa como uma percentagem da migração total induzida pelo quimiotáctico que foi bloqueada pela presença do composto. Para a maioria dos compostos é construído um gráfico dose-resposta determinando a inibição da migração induzida pelo quimiotáctico que ocorre numa gama de concentrações diferentes do composto (que vai tipicamente desde 1 nM a 1 μ M ou mais no caso de compostos pouco activos). A actividade inibidora de cada composto é em seguida expressa como a concentração de composto necessário para reduzir a migração induzida pelo quimiotáctico em 50% (a concentração ED₅₀). Tipicamente, a migração induzida por MCP-1 de células THP-1 tem sido utilizada como o sistema de ensaio padronizado para a comparação da actividade biológica de uma vasta gama de compostos (ver, por exemplo, Reckless & Grainger *Biochem J.* 1999 Jun 15;340 (Pt 3):803-11; Reckless *et al.* *Immunology.* 2001 Jun;103(2):244-54; Fox *et al.* *J Med Chem.* 2002 Jan 17;45(2):360-70; Fox *et al.* *J Med Chem.* 2005 Feb 10;48(3):867-74; os Pedidos internacionais *supra*). Os compostos que inibem a migração de leucócitos induzida por mais do que uma quimiocina, mas não por quimiotácticos não quimiocinas (tais como TGF- β ou C5a) são definidos como Inibidores de Quimiocina de Largo Espectro (BSCI; ver, por exemplo, Grainger & Reckless *Biochem Pharmacol.* 2003 Abr 1; 65(7):1027-34; Grainger *et al.* *Mini Rev Med Chem.* 2005;5(9):825-32).

Resultados

Uma curva dose-resposta típica para a inibição pelo composto (**I'**) da migração induzida por MCP-1 de células THP-1 é mostrada na Figura 6, em conjunto com curvas dose-resposta comparáveis para outros BSCI de lactama seleccionados conhecidos como tendo potência particularmente alta (isto é, <1 nM). A potência do composto (**I'**) contra várias quimiocinas e quimiotácticos não quimiocinas expressa como valores de ED50 é mostrada na Tabela 6 e é comparada com outros BSCI de lactama anteriormente descritos.

É claro a partir destes dados que o composto (**I'**) pode ser classificado como um BSCI (uma vez que inibe poderosa e fortemente a migração de leucócitos induzida por uma gama de quimiocinas, mas não tem qualquer efeito na migração de leucócitos induzida por um quimiotáctico não quimiocina, neste caso o C5a, anafilatoxina). Além disso, é evidente que o composto (**I'**) é pelo menos tão potente e poderoso quanto um BSCI *in vitro* como os BSCI de lactama seleccionados que foram anteriormente divulgados (por exemplo, composto (**II**) no documento W02006/016152 ou composto (**IV**) no documento W02005/053702). Todos os BSCI de lactama aqui examinados são consideravelmente mais potentes do que qualquer um dos BSCI de tipo não lactama que foram divulgados até à data (incluindo imidas, tal como NR58,4, ioimbamidas, lisergamidas e péptido 3 e estruturas relacionadas, tal como NR58-3.14.3). De facto, o composto (**I'**) é mais potente como um BSCI *in vitro* (pelo menos contra a migração induzida por MCP-1) do que qualquer outro composto anteriormente divulgado ou descrito. Embora esta potência como um BSCI seja quantitativamente superior aos BSCI da técnica anterior (se bem que num pequeno grau), não é esta

propriedade que marca essencialmente o composto (I) como inesperadamente superior aos BSCI da técnica anterior. Em vez disso, isto demonstra que as propriedades de ADME e farmacocinéticas inesperadas e, substancialmente superiores, do composto (I) em comparação com uma grande gama de BSCI anteriormente divulgados, foram conseguidas sem qualquer perda de força ou potência como um BSCI *in vitro*.

Quadro 6. Efeito dos BSCIs de tipo lactama seleccionados na migração de leucócitos *in vitro*.

Composto	MCP-1	SDF-1 α	RANTES	IL-8 neutrófilos	C5a neutrófilos
(II)	80	100	100	600	>1000000
(III)	80	<i>Não testado</i>	<i>Não testado</i>	<i>Não testado</i>	<i>Não testado</i>
(V)	120	200	250	500	>1000000
(I')	50	50	80	600	>1000000
(IV)	800	<i>Não testado</i>	<i>Não testado</i>	<i>Não testado</i>	<i>Não testado</i>

Em cada caso é mostrada a dose de composto (em μM) necessária para inibir a migração de leucócitos em resposta a uma dose máxima do quimiotáctico especificado em 50% (a ED50). Salvo indicação em contrário, os dados são para a linha de células THP-1. No caso da migração induzida por C5a nenhum dos compostos testados inibiu a migração de neutrófilos em qualquer grau mesmo à concentração mais alta testada (1 μM).

Exemplo 6. Actividade anti-inflamatória in vivo

A requerente utilizou o ensaio de endotoxemia subletal induzida por LPS para demonstrar as propriedades anti-inflamatórias *in vivo* generalizadas dos BSCI anteriormente divulgados (ver, por exemplo, Fox *et al.* J Med Chem. 2002;45(2):360-70; Fox *et al.* J Med Chem. 2005;48(3):867-74). Neste ensaio, ratinhos são inoculados com um pró-inflamatório não específico utilizando uma endotoxina bacteriana (LPS) e a grandeza da resposta inflamatória sistémica (medida pelos níveis no soro da citocina pró-inflamatória central TNF- α , a qual está essencialmente ausente do sangue em condições normais, mas é rapidamente elevada em resposta a uma grande gama de estímulos inflamatórios). A requerente seleccionou este modelo ainda que não seja, por si só, um modelo particularmente próximo de qualquer condição patológica inflamatória humana, porque se sabe que o TNF- α é importante em muitas doenças (incluindo artrite reumatóide, distúrbios auto-imunes, doença de Crohn, aterosclerose, asma e muitas mais). Consequentemente, os agentes que suprimem a produção de TNF- α já são clinicamente utilizados (e. g., Enbrel™ e outros produtos de anticorpos anti-TNF- α) para tratar uma grande gama dessas doenças. A demonstração de actividade supressora de TNF- α neste modelo é, portanto, altamente preditiva de um efeito anti-inflamatório clinicamente útil numa grande gama de doenças.

Os ratinhos (em grupos de 6) foram pré-tratados com várias doses de cada composto, pela via subcutânea 30 min antes da inoculação com LPS ou pela via oral (via sonda esofágica) 60 min antes de LPS. Os ratinhos foram, em seguida, inoculados com uma injeção intraperitoneal de 750 μ g de LPS bacteriana e sacrificados 3 horas depois. Foi preparado soro a partir de um

sangramento terminal por punção cardíaca e a concentração de TNF- α é determinada por ELISA (R&D Systems). Em cada experiência, um grupo de 6 ratinhos não recebe qualquer LPS para funcionar como um controlo negativo e um segundo grupo recebe apenas LPS (sem qualquer inibidor candidato). O nível de TNF- α no soro destes animais, que receberam LPS sem pré-tratamento com fármaco, é arbitrariamente fixo em 100% (e é tipicamente da ordem de 6 000 pg/mL, em comparação com os níveis <10 pg/mL entre o grupo de controlo negativo). A requerente demonstrou anteriormente que o corticosteróide sintético dexametasona (por si só um medicamento anti-inflamatório bem conhecido activo numa grande gama de doenças inflamatórias) inibe a produção de TNF- α induzida por LPS em, pelo menos, 90% neste modelo, enquanto a talidomida (outro inibidor da produção de TNF- α publicado, que actua ao nível da produção de TNF- α celular em vez de um inibidor de recrutamento de leucócitos como os BSCI aqui descritos) inibe a produção de TNF- α induzida por LPS em cerca de 60%.

O efeito do composto (**I'**) a várias doses, bem como de outros BSCI de lactama seleccionados, é mostrado na Figura 7. Como esperado, o composto inibe poderosamente a produção de TNF- α induzida por LPS, seja o composto seja administrado através da via subcutânea (círculos) ou da via oral (triângulos). A doses acima de 1 μ g/ratinho, os níveis de TNF- α induzidos por LPS foram geralmente suprimidos em mais de 90%, comparável aos efeitos do corticosteróide dexametasona.

Os outros BSCI de lactama testados também inibiram o TNF- α induzido por LPS de uma maneira dependente da dose (Figura 7), embora a potência *in vivo* de (**I'**) fosse maior do que qualquer um dos outros compostos testados (e, de facto, maior do que a

potência de outros BSCI de lactama anteriormente divulgados noutro lado, que foram testados neste ensaio). Este aumento quantitativo (se bem que pequeno) na potência não é a razão principal pela qual a requerente aqui reivindica o composto (**I**) como inesperadamente superior aos BSCI da técnica anterior. Em vez disso, isto demonstra que as propriedades de ADME e farmacocinéticas inesperadas, e substancialmente superiores do composto (**I**) em comparação com uma grande gama de BSCI anteriormente divulgados, foram conseguidas sem qualquer perda de força ou potência como um agente anti-inflamatório *in vivo*. Além disso, estas observações demonstram claramente a utilidade de (**I**) como um agente anti-inflamatório *in vivo*, num modelo de inflamação o que indica a utilidade numa grande variedade de doenças inflamatórias onde a produção aumentada de TNF- α é uma componente do mecanismo patogénico.

É importante referir que a inflamação hiperaguda observada neste modelo é particularmente insensível às propriedades de ADME e farmacocinéticas dos agentes anti-inflamatórios testados. Uma vez que a estimulação com LPS é administrada apenas 30 minutos após o fármaco, mesmo os agentes com tempos de residência muito curtos no plasma (tais como os compostos (**II**) e (**III**)) permanecem presentes no plasma em concentrações suficientes para desencadear um efeito anti-inflamatório potente. Por conseguinte, apesar de um tal teste não acentuar a superioridade dos compostos reivindicados em relação à técnica anterior, ele mesmo assim demonstra a utilidade do composto.

A utilidade do composto reivindicado é ainda demonstrada por estudos num modelo animal da doença humana asma (a resposta inflamatória hiperaguda observada em resposta à exposição a LPS pode não ser típica de qualquer doença humana particular, apesar

de ser claramente um sistema modelar útil da inflamação aguda em geral). Nestes estudos, roedores (tipicamente ratos) são expostos a ovalbumina de acordo com o seguinte desenho experimental:

Ratos da Noruega Castanhos Adultos (200-300 g de peso corporal; n=10 por grupo) foram sensibilizados com uma única injeção intraperitoneal de 0,1 mg de Ovalbumina no dia 0. Cada rato recebeu em seguida uma inoculação intratraqueal com uma solução de 1% de ovalbumina (p/v) no dia 8 e com 2% de ovalbumina (p/v) nos dias 15, 18 e 21. Os animais foram em seguida sacrificados 3 horas após a inoculação final no dia 21. Refira-se que a ovalbumina (Sigma; tipo mais puro disponível) foi tornada isenta de endotoxina por passagem através de colunas EndoTrap™ Red (adquiridas de Cambrex; utilizadas de acordo com as instruções do fabricante) e o nível de endotoxina foi confirmado como <5 EU/mg de proteína utilizando o ensaio LAL (QCL-1000™; Cambrex; realizado de acordo com as instruções do fabricante; 1 mg de endotoxina padrão contém ~900000 EU/mg). Isto garante que a resposta de inflamação pulmonar resulta da resposta alérgica à proteína de ovalbumina, em vez da estimulação não intencional pela LPS que ocorre mesmo com as preparações de ovalbumina de tipo comercial da pureza mais alta e, por conseguinte, garante que o modelo representa mais de perto a patologia molecular subjacente à asma humana.

Um grupo de ratinhos (que funciona como um controlo de base) não recebeu quaisquer inoculações com ovalbumina, mas quanto ao resto foram tratados de modo idêntico. Um segundo grupo (controlo positivo) recebeu as inoculações mas nenhum tratamento com fármaco. Um terceiro grupo foi tratado de modo idêntico, mas recebeu dosagem diária com o composto (**I'**) a uma

dose de 0,3 mg/kg através de sonda oral desde o dia 8 até ao dia 21, sendo a dosagem administrada 1 h antes de qualquer inoculação subsequente com ovalbumina feita no mesmo dia. O composto (**I'**) foi administrado como uma solução estéril em soro fisiológico isento de endotoxinas tamponado com fosfato. Um quarto grupo recebeu montelucaste (o componente activo da medicação para a asma comercialmente disponível Singulair™) a 30 mg/kg através da via oral, num plano de tratamento idêntico ao composto (**I'**).

Na altura do sacrifício, o recrutamento total de leucócitos no pulmão foi avaliado realizando uma lavagem broncoalveolar (BAL) utilizando 4 lotes de 3 mL de soro fisiológico tamponado com fosfato estéril, introduzidos através de uma cânula na traqueia. Para cada animal, as lavagens BAL foram combinadas e a população total de células contada (utilizando um hemocitómetro). Adicionalmente, os tipos de leucócitos presentes foram estimados utilizando um citómetro de fluxo de acordo com procedimentos bem conhecidos na técnica.

O baço de cada ratinho foi também retirado e colocado em RPMI + 10% FCS + antibióticos. O baço foi então comprimido através de filtros de nylon de malha fina (100 µm) num copo perfurado estéril colocado numa placa de petri estéril para produzir suspensões de células únicas. A suspensão de células resultante foi então centrifugada (328 g; 5 min) e lavada em RPMI + 10% FCS + antibióticos, antes de serem ressuspensas em meio fresco e contadas utilizando um hemocitómetro.

Um total de 4×10^6 esplenócitos totais (excluindo RBC) foi cultivado (37 °C; 5% CO₂) em RPMI + 10% FCS + antibióticos de um dia para o outro na presença de 2 U/mL (10 ng/mL) de IL-2

murídea em 4 poços de uma placa de 96 poços (100 µL de volume por poço/ 1×10^6 células/poço) de cada ratinho. Aproximadamente 24 h depois, os 4 poços foram divididos em dois grupos de 2 poços: um grupo foi deixado não tratado, enquanto o segundo grupo foi estimulado com 500 ng/mL de Ionomicina e 50 ng/mL de PMA durante 4 horas a 37 °C. Durante as duas últimas horas desta incubação foram adicionados 10 µg/mL de Brefeldin A (solução-mãe a 1 mg/mL em EtOH) a um poço de cada conjunto. O Brefeldin A bloqueia o transporte de proteínas para os golgi e, portanto, permite a acumulação de proteínas no ER.

Os poços sem Brefeldin A, foram incubados durante mais 48 horas a 37 °C. No final da incubação, as suspensões de células foram centrifugadas (328 g; 5 min) e o sobrenadante foi submetido a ensaios ELISA (R&D Systems; realizados de acordo com as instruções do fabricante) em relação à IL-4 murídea (um marcador de células Th2) e interferão-γ murídeo (IFN-γ; um marcador de células Th1).

Os poços com Brefeldin A foram revelados em relação aos IL-4 e IFN-γ intracelulares imediatamente no final da incubação de quatro horas como se segue: as células foram reveladas com anticorpo anti-CD4-FITC (IgG2b de Rato eBioscience, Código de Catálogo 11-0041) durante 30 min sobre gelo, em seguida lavadas em PBS de Dulbecco e fixadas com 2% de paraformaldeído (concentração final) em PBS de Dulbecco durante 20 min. Após fixação, as células foram tornadas permeáveis com PBS de Dulbecco/1% de BSA/0,5% de saponina (Sigma S7900) durante 10 min à temperatura ambiente. As células de cada poço foram em seguida divididas em três tubos FACS separados e incubadas com:

- IFN- γ -PE (IgG1 de Rato eBioscience, Código de Catálogo 12-7311-82, 100 μ g) OU
- IL-4-PE (IgG1 de Rato eBioscience, Código de Catálogo 12-7041-82, 100 μ g) OU
- Controlos de isotipo (uma mistura de IgG2b de Rato-FITC, Código de Catálogo eBioscience 11-4031 e IgG1 de Rato-PE, Código de Catálogo eBioscience 12-4301)

durante 30 min à temperatura ambiente. As células foram em seguida lavadas (duas vezes com PBS/BSA/saponina e, em seguida, com PBS/BSA sem saponina para permitir o fecho da membrana) e ressuspensas em PBS de Dulbecco, prontas para análise por citometria de fluxo.

As células com revelação específica para CD4 no canal FITC (que as identifica como células T auxiliares) foram analisadas quanto à presença de revelação específica para IL-4 ou IFN- γ no canal PE. A proporção de células CD4+ com revelação positiva para IFN- γ relativamente às células CD4+ com revelação positiva para IL-4 foi então indicada como a proporção Th1/Th2. Os ratos da Noruega Castanhos não tratados têm uma proporção Th1/Th2 de aproximadamente 2,7 no baço (isto é, aproximadamente 2,7 vezes mais células CD4+ no baço estão a sintetizar INF- γ do que IL-4). Após sensibilização e inoculação repetida com ovalbumina, a proporção baixou para menos de 1,5 demonstrando a polarização Th2 acentuada que acompanha as alterações asmáticas em roedores e humanos (uma proporção Th1/Th2 inferior indica polarização relativa para Th2, enquanto um aumento da proporção Th1/Th2 indica uma polarização relativa para Th1).

A administração diária com o composto (**I'**) e o composto de comparação de controlo positivo montelucaste reduziu significativamente o número de leucócitos na lavagens BAL (redução de 70% com o composto (**I'**); $p < 0,01$ teste t de Student desemparelhado; Figura 8).

Isto demonstra inequivocamente que o composto da invenção tem um efeito anti-inflamatório útil num modelo de asma humana, resultante da sua aptidão para bloquear a migração de leucócitos em resposta a quimiocinas. A grandeza de um tal efeito é, pelo menos, comparável ao dos medicamentos comercialmente disponíveis que se destinam ao tratamento de asma humana (tal como Singular™), enquanto os excelentes parâmetros de farmacocinética e biodistribuição do composto (**I'**) são ilustrados pela potência consideravelmente aumentada em comparação com o montelucaste (é necessária uma dose de 30 mg/kg de montelucaste para gerar uma redução semelhante nas contagens de leucócitos na BAL em comparação com uma dose de apenas 0,3 mg/kg de composto (**I'**)).

A administração diária com o composto (**I'**), mas não com o composto de comparação de controlo positivo montelucaste, inverteu significativamente a polarização Th2 (Figura 9), o que é considerado um estímulo principal da patogénese da asma no modelo de inflamação pulmonar induzida por ovalbumina aqui utilizado e na asma humana. O tratamento com composto (**I'**) mesmo a doses baixas tal como 0,3 mg/kg através da via oral, anula completamente a polarização Th2 provocada por exposição crónica a alergénios, tal como ovalbumina, de tal forma que o equilíbrio Th1/Th2 em animais tratados com o composto (**I'**) é essencialmente indistinguível de ratos da Noruega Castanhos não inoculados.

É interessante assinalar que outras doenças inflamatórias crônicas, tal como a aterosclerose, estão associadas a uma polarização Th1 (ao contrário de uma Th2). Em ambos os tipos de doenças, o desequilíbrio no perfil de citocinas de células T auxiliares foi descrito como uma causa patogénica importante da componente inflamatória crónica da doença. Nos modelos de uma doença associada a uma polarização Th1 (tal como na aterosclerose) a requerente observou anteriormente um desvio acentuado para Th2 no tratamento com BSCI, tal como o composto (**I'**) aqui reivindicado. Ratinhos com uma supressão homocigótica do gene que codifica a apoE (ratinhos apoe -/-) desenvolvem várias lesões lipídicas vasculares, mesmo com uma dieta de ração normal e têm uma proporção Th1/Th2 de aproximadamente 8 (em comparação com os 3,2 na estirpe de tipo selvagem C57B16 de base). No entanto, após tratamento com BSCI durante um período de 3 meses (desde as 12 semanas de idade até às 24 semanas de idade, o período durante o qual ocorre o desenvolvimento da maioria das lesões lipídicas) normaliza a proporção Th1/Th2 (e até origina mesmo uma polarização Th2 a doses muito altas neste modelo). Em conjunto com os dados do modelo de inflamação pulmonar induzida por ovalbumina da asma, a requerente demonstrou que os BSCI são capazes de normalizar ou reequilibrar o perfil de produção de citocinas das células T auxiliares independentemente de o defeito patogénico subjacente ser uma polarização Th2 (como na asma) ou uma polarização Th1 (como na aterosclerose). A requerente acredita que os BSCI são presentemente os únicos agentes descritos que têm este efeito de "reequilíbrio" na população de células T auxiliares. Estes conhecimentos mecanísticos sustentam ainda mais (em conjunto com os dados de eficácia em numerosos modelos animais de diferentes doenças com uma componente inflamatória) a reivindicação da requerente de que os BSCI e, em particular, o composto (**I**) aqui

reivindicado (em consequência das suas propriedades farmacocinéticas e de biodistribuição inesperadamente superiores) são úteis como medicamentos para tratar uma gama invulgarmente larga de condições com uma componente inflamatória.

Exemplo 7. Comparação do composto (I') com análogos estruturalmente relacionados

Tendo identificado o composto (I) como possuindo propriedades farmacológicas surpreendentemente superiores, particularmente em relação à sua farmacocinética, em comparação com outros BSCI de acilaminolactama, a requerente comparou-o, em seguida, directamente com os análogos mais estruturalmente semelhantes que foram anteriormente divulgados.

O painel original dos compostos comparados nos exemplos 1 a 6 tinha sido construído como sendo tão estruturalmente diferente quanto possível, dentro dos limites dos BSCI de tipo acilaminolactama anteriormente divulgados. O composto (I) garantiu que eram incluídos “grupos cabeça” de lactama de 6 membros no painel, embora não houvesse qualquer razão particular para assumir que fossem geralmente superiores (ou, de facto, inferiores) aos compostos com anéis de lactama de 7 membros (ver documento WO2006/134385 para uma comparação minuciosa de análogos de acilaminolactama com tamanhos de anel diferentes em termos de potência como BSCI *in vitro*). Analogamente, o painel incluiu um único exemplo de uma ligação sulfonamida (IV) como diferente do ligante amida das restantes moléculas.

Em relação aos “grupos de cauda”, o painel incluiu dois grupos alquilo simples (ambos pivôis) e três grupos alquilo cíclicos (um grupo metilciclo-hexilo e dois adamantanos, um dos quais estava substituído). Todos os cinco compostos partilhavam a dissustituição 2'2 bem estabelecida com ângulos de ligação tetraédricos no carbono chave (na posição 2 relativamente ao carbonilo do carbonilo da amida, com 4 átomos de carbono ligados a este carbono chave num arranjo tetraédrico). Esta dissustituição 2'2' característica no átomo de carbono chave já foi divulgada (documento W02006/016152) como conferindo potência adicional aos BSCI em comparação com os “grupos de cauda” alquilo linear ou outras estruturas que carecem de quatro átomos de carbono ligados a este carbono chave num arranjo essencialmente tetraédrico.

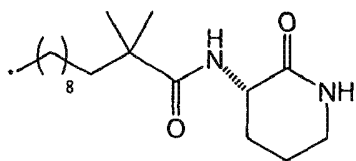
Como uma consequência, os “grupos de cauda” no painel original foram seleccionados com o requisito de possuir esta dissustituição 2',2' característica, para assegurar potência *in vitro* adequada, mas também com o requisito de produzir provavelmente propriedades físicas aceitáveis nas moléculas resultantes. Por exemplo, era esperado que o adamantano, ciclo-hexilo e grupos alquilo de cadeia curta ramificados na posição 2'2 resultassem em compostos com formas sólidas cristalinas (ou semicristalinas), e com solubilidade aceitável em água. Em contraste, outros grupos de cauda possíveis, tal como o 2',2'-dimetildodecanoílo (o qual de outra maneira está em conformidade com o arranjo desejável de átomos de carbono na posição chave 2), foram excluídos do painel com base nas suas formas físicas amorfas, cerosas como sólidos e na sua extrema insolubilidade em tampões fisiológicos. Ambos estes factores reduzem a conveniência de um composto para desenvolvimento farmacêutico mesmo antes de se determinarem as propriedades de

ADME e toxicológicas porque tornam o composto difícil de manusear, por exemplo, durante a formulação ou transformação em comprimidos e isto aumenta a probabilidade de propriedades de ADME desfavoráveis, tal como a acumulação em depósitos de gordura durante a administração crónica ou ausência de biodisponibilidade oral.

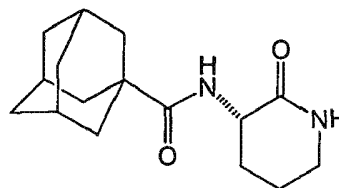
Assim, os cinco compostos examinados nos exemplos 1 a 6 tinham uma probabilidade aproximadamente igual de serem adequados para desenvolvimento farmacêutico. Antes de determinar as suas propriedades de ADME não era possível prever qual seria superior.

No entanto, uma vez concluída a avaliação descrita nos exemplos 1 a 6, tornou-se claro que o composto (**I**) era substancial e inesperadamente superior aos outros compostos. Uma vez que o composto (**I**) era o único composto no painel com um anel de 6 membros, era possível que as propriedades superiores fossem devido ao tamanho do anel de lactama. Para determinar se isto era verdade, a requerente reviu todos os exemplos de compostos de acilaminolactama anteriormente divulgados com actividade BSCI e seleccionou os dois compostos com maior semelhança estrutural com (**I**). De todos os compostos anteriormente conhecidos com actividade BSCI, estes foram os dois compostos com a estrutura mais semelhante ao composto (**I**).

Os compostos seleccionados foram 3-(2',2'-dimetildodecanoilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona (exemplo 3 do documento W02006/134385; aqui designado **VI**) e 3-(adamanatano-1-carbonilamino)-tetra-hidropiridin-2-ona (exemplo 1 do documento W02006/134385; aqui designado **VII**):



(VI)



(VII)

Estes compostos partilham em comum com (I) o anel de lactama de 6 membros, o ligante amida e a presença da dissubstituição 2',2', com 4 átomos de carbono ligados ao carbono chave na posição 2 relativamente ao grupo carbonilo da amida, num arranjo essencialmente tetraédrico.

Os compostos (VI) e (VII) foram submetidos a análise farmacocinética em ratos utilizando exactamente os mesmos protocolos anteriormente aplicados aos compostos (I) a (V) no exemplo 1. Refira-se que nestas experiências foi utilizado o enantiómero (S) de (VI) e (VII), uma vez que se prevê que este seja o enantiómero mais activo em comum com todos os outros BSCI de tipo acilaminolactama descritos até à data.

Resultados

Infelizmente, (VI) era um sólido ceroso com tendência para reter solvente. Foi difícil obter uma preparação de (VI) que fosse isenta de solvente, mas isto foi eventualmente conseguido após secagem considerável durante muitas semanas. No entanto, esta amostra era completamente insolúvel em 5% de DMSO em soro fisiológico, utilizado como veículo para administração intravenosa dos compostos anteriores. Como uma consequência, foi necessário utilizar um veículo totalmente diferente de modo a

preparar uma solução adequada para administração intravenosa. O composto (VI) foi dissolvido em 50% de PEG400/20% de solutol/30% de soro fisiológico para administração intravenosa. Todos os compostos, incluindo (VI), foram suspensos (ou dissolvidos) em 1% de carboximetilcelulose em soro fisiológico para administração oral. Embora a comparação da biodisponibilidade oral entre experiências utilizando veículos diferentes não seja geralmente recomendada (porque o veículo pode ter um impacto considerável na absorção dos compostos no intestino) é contudo muito improvável que a selecção do veículo afecte significativamente a semi-vida observada após injeccção intravenosa de (VI) em comparação com outros compostos, tal como (I).

Os parâmetros de um modelo farmacocinético simples de um compartimento são mostrados na Tabela 7. Os dados para o composto (I') da Tabela 1 acima são mostrados para comparação. É evidente que (VI) e (VII) são ambos acentuadamente inferiores a (I'), com taxas de eliminação mais do que 10 vezes superiores e uma exposição oral que é 25-50 vezes inferior à que foi conseguida com (I')

Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos para BSCI de tipo acilaminolactama de 6 aneis seleccionados.

	F (%)	t _{1/2} (min)	Eliminação (mL/min/kg)	V _{ss} (L/kg)	Exposição (min.ng/mL)
(VI)	16	46	40,3	1,95	11 000
(VII)	35	20	31,1	0,7	32 500
(I')	69	196	2,6	0,7	939 000

A biodisponibilidade oral (F , %), semi-vida dominante no plasma ($t_{1/2}$, min) após administração intravenosa, eliminação (mL/min/kg), volume de distribuição (V_{ss} , L/kg) e exposição oral (AUC 0-t, min.ng/mL) de um modelo farmacocinético simples de um compartimento para cada composto, baseou-se na média para três ratos. Para **(VII)**, a C_{max} foi conseguida em menos de 15 min, coerente com absorção ótima como para **(I')**. No entanto, o hidrófobo **(VI)** foi absorvido mais lentamente com T_{max} entre 60 e 120 min.

Na realidade, é evidente da comparação da Tabela 7 com a Tabela 1 que os compostos **(VI)** e **(VII)** não são sequer tão bons quanto **(IV)** e **(V)** em termos de exposição. Apesar de partilharem a lactama de 6 anéis com **(I)**, os compostos **(VI)** e **(VII)** têm propriedades de ADME acentuadamente inferiores e não são melhores do que uma grande gama de outros compostos de BSCI de acilaminolactama que foram anteriormente divulgados.

Coerente com a eliminação muito maior para **(VI)** e **(VII)** em comparação com **(I')**, estes compostos têm semi-vidas no plasma substancialmente mais curtas do que **(I')** (menos de 1 hora, em comparação com mais de 3 horas).

Com base nesta análise farmacocinética, será óbvio para os especialistas na técnica que apesar da estabilidade química semelhante, bem como das suas propriedades previstas semelhantes em termos teóricos e da sua semelhança estrutural, mesmo assim **(I')** é acentuadamente superior a **(VI)** e **(VII)**, com 25-50 vezes melhor exposição oral do que quaisquer destes análogos de lactama de 6 anéis. A requerente conclui que as inesperadamente excelentes propriedades inesperadas de ADME de **(I')** não podem ser atribuídas à lactama de 6 anéis (uma vez que outras lactamas

de 6 anéis, tais como (VI) e (VII) não partilham as suas características ADME excepcionais), nem ao ligante amida (uma vez que outros compostos com ligante amida, incluindo (II), (III) e (V) não partilham as suas características ADME excepcionais), nem ao grupo de cauda pivóilo (uma vez que o composto (IV) partilha este grupo e não tem as características ADME excepcionais de (I')). Em vez disso, as características ADME surpreendentes e acentuadamente superiores de (I') dependem da combinação particular de características estruturais, o que não podia ser previsto.

Exemplo 8. Tentativa para conceber racionalmente um BSCI de acilaminolactama com propriedades de ADME equivalentes a (I')

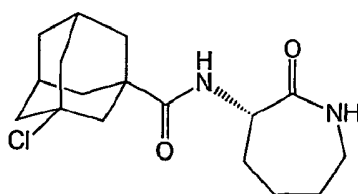
No processo de identificação das propriedades de ADME superiores do composto (I'), a requerente analisou a farmacocinética de uma variedade de acilaminolactamas diferentes com potência sub-nanomolar como BSCI *in vitro*. Como uma consequência, a requerente esperaria ter adquirido algum conhecimento sobre os factores que modulam as propriedades de ADME para moléculas dentro deste espaço estrutural. Por esse motivo, a requerente tentou utilizar esta experiência para seleccionar um segundo composto de BSCI de acilaminolactama de entre as classes estruturais anteriormente divulgadas com propriedades de ADME tão semelhantes quanto possível daquelas de (I').

A eliminação relativamente rápida de (IV) em comparação com (I') (ver Tabela 1 acima) sugeriu que o ligante amida pode estar correlacionado com propriedades de ADME superiores. Por

consequente, a requerente limitou a selecção a compostos com unidades de ligação amida.

O composto (**II**) foi muito bem absorvido, mas foi rapidamente convertido em (**V**) *in vivo*, presumivelmente através da acção da(s) isoenzima(s) do citocromo P450 do fígado. O composto (**V**) não foi ele mesmo manifestamente mais oxidado (provavelmente em consequência do substituinte de remoção de electrões no anel de adamantino) mas foi contudo eliminado de forma relativamente rápida. A ausência de metabolitos primários detectáveis na urina sugere fortemente que a eliminação rápida foi mediada pela formação de um conjugado de fase II, tal como o glucuronídeo, o qual no rato é excretado nas fezes. Os conjugados de fase II são facilmente formados em grupos hidroxilo, tal como o 3-hidroxiadamantano em (**V**). Como uma consequência, a requerente propôs que um derivado de (**II**) com um substituinte de remoção de electrões estável (para prevenir hidroxilação do anel de adamantino pelo citocromo P450 ou outras hidroxilases ou oxidases do fígado) que foi incapaz de formar conjugados de fase II, tal como um substituinte halo, pode ter as propriedades de ADME óptimas que a requerente estava à procura.

Como uma consequência, o composto (**VIII**), abaixo, foi sintetizado e testado. A requerente seleccionou o análogo substituído com cloro (em vez, por exemplo, do análogo substituído com fluoro) porque este era um composto conhecido (ver exemplo 8 no documento W02006/016152) para o qual estava facilmente disponível uma via sintética. Além disso, a introdução de ligações C-F alifáticas é um desafio em termos de síntese e pode aumentar o custo das matérias-primas para o ingrediente farmacêutico activo numa ordem de grandeza ou mais.



(VIII)

Como anteriormente (ver Exemplo 7), a requerente escolheu preparar e avaliar o enantiómero (S) deste composto, uma vez que, em geral, os enantiómeros (S) dos compostos de acilaminolactama são conhecidos como tendo maior actividade BSCI *in vitro*.

Uma preocupação óbvia relacionada com esta molécula era a estabilidade da ligação C-Cl. Por conseguinte, a requerente examinou a estabilidade de (VIII) *in vitro*, em soro fisiológico e numa preparação de microsomas de fígado de rato. De forma encorajante, menos de 2% de (VIII) sofreu hidrólise (determinada por LC/MS, com detecção de duplo ião do produto de hidrólise (V) e do composto parental (VIII)) mesmo após 24 horas a 37 °C. Analogamente, a incubação de (VIII) a 1 µM com uma preparação de microsomas de rato durante 1 hora a 37 °C resultou em menos de 10% de degradação em comparação com um ensaio em branco "sem NADPH". Como uma consequência, a requerente concluiu que o composto (VIII) tem estabilidade e eliminação intrínseca *in vitro* semelhante a (I').

Assim, com base em hipóteses teóricas utilizando a experiência ganha a partir da descoberta de (I'), bem como na perícia geral na técnica para prever propriedades de ADME, bem como utilizando ensaios de selecção *in vitro* convencionais, tais

como estabilidade e eliminação intrínseca *in vitro* em preparações de microssomas de fígado, esperar-se-ia que o composto (**VIII**) tivesse propriedades ADME comparáveis a (**I'**).

Por conseguinte, a requerente submeteu (**VIII**) a análise farmacocinética em ratos utilizando exactamente os mesmos protocolos anteriormente aplicados aos compostos (**I'**) a (**VII**) nos exemplos 1 e 7.

Resultados

Os parâmetros de um modelo farmacocinético simples de um compartimento são mostrados na Tabela 8. Os dados para o composto (**I'**) da Tabela 1 acima são mostrados para comparação. É evidente que o composto (**VIII**) é acentuadamente inferior ao (**I'**), com taxas de eliminação mais do que 20 vezes superiores e nenhuma biodisponibilidade oral absolutamente não detectável.

tabela 8. Parâmetros farmacocinéticos para BSCI de lactama seleccionados.

	F (%)	t1/2 (min)	Eliminação (mL/min/kg)	Vss (L/kg)	Exposição (min.ng/mL)
(VIII)	<1%	15	62,8	0,7	<100
(I')	69	196	2,6	0,7	939 000

A biodisponibilidade oral (F, %), semi-vida dominante no plasma (t1/2, min) após administração intravenosa, eliminação (mL/min/kg), volume de distribuição (Vss, L/kg) e exposição oral

(AUC 0-t, min.ng/mL) de um modelo farmacocinético simples de um compartimento para cada composto, baseou-se na média para três ratos. Para (**VIII**), o nível de analito foi abaixo do limite de quantificação (~2 ng/mL) em todos os intervalos de tempo após administração oral.

Em conclusão, o composto (**VIII**), que a requerente tinha seleccionado com base em considerações teóricas e ensaios de selecção *in vitro*, como tendo propriedades de ADME óptimas estava, contudo, entre os compostos de acilaminolactama menos adequados, pelo menos entre aqueles cuja PK foi determinada, para desenvolvimento como um agente farmacêutico. O composto exibiu eliminação rápida, resultando numa semi-vida no plasma curta e, além disso, apresentou absolutamente nenhuma biodisponibilidade oral.

A grandeza da superioridade do composto (**I'**) é ilustrada na Figura 10. Aqui, a requerente representou graficamente dois parâmetros de PK (semi-vida no plasma e exposição oral) para todos os compostos BSCI para os quais foi analisada a farmacocinética no rato. O composto (**I'**) situa-se bastante longe do agregado, que representa as propriedades de ADME geralmente fracas dos compostos neste espaço estrutural (e não atípico de muitas classes de candidatos a fármaco totalmente não relacionadas), indicando que o composto (**I'**) é inesperadamente e, invulgarmente, superior.

Exemplo 9. Comparação dos enantiómeros (S) e (R) de (I)

Foi demonstrado que o composto (**I'**) tem propriedades de ADME inesperadas e acentuadamente superiores (ver exemplo 1).

Este composto tem um átomo de carbono assimétrico (na ligação do anel com o ligante amida) e, conseqüentemente, existe em dois estereoisómeros: o enantiómero (S) designado (**I'**) e o enantiómero oposto (R), designado (R)-(**I**).

Como com todos os outros BSCI de acilaminolactama descritos até à data, o enantiómero (S) de (**I**) é mais potente como um BSCI *in vitro* do que o enantiómero (R) correspondente. É por esta razão que (**I'**) foi estudado na maioria das experiências, em vez do enantiómero (R) isolado ou uma mistura dos enantiómeros. No entanto, é improvável que as propriedades de ADME estejam relacionadas com a actividade farmacológica primária. De facto, para muitos compostos, as propriedades de ADME de pares enantioméricos são muito semelhantes, uma vez que (em muitos casos) as propriedades físicas do composto são particularmente dominantes na determinação da disposição *in vivo*, e as propriedades físicas de pares enantioméricos são idênticas.

Como uma consequência, a requerente testou se o enantiómero (R) partilha as propriedades de ADME particularmente excelentes de (**I'**). Uma vez que a utilidade de qualquer composto particular depende da potência do(s) efeito(s) farmacológico(s) primário(s) e da disposição da molécula *in vivo* (uma vez que para ser eficaz, a molécula de fármaco tem de estar presente no(s) sítio(s) alvo(s) pretendido(s) numa concentração suficiente para exercer os seus efeitos farmacológicos), então um composto que tenha potência inferior mas excelentes propriedades de ADME pode ser mais eficaz (ou mais potente *in vivo*) do que um composto de comparação de maior potência mas propriedades de ADME inferiores.

Por conseguinte, o enantiómero (R) isolado de (**I**) foi sintetizado (exactamente como aqui descrito para o enantiómero (S) isolado, mas substituindo o material de partida (S)-ornitina por (R)-ornitina comercialmente disponível de alta pureza estereoquímica) e as propriedades PK deste agente no rato foram determinadas utilizando metodologia idêntica à descrita acima (ver Exemplos 1, 7 e 8).

Resultados

Os parâmetros de um modelo farmacocinético simples de um compartimento são mostrados na Tabela 9. Os dados para o composto (**I'**) da Tabela 1 acima são mostrados para comparação. É evidente que (R)-(**I**) partilha, em grande medida, as propriedades de ADME inesperadamente superiores de (**I'**). Como com (**I'**), (R)-(**I**) está também essencialmente quantitativamente biodisponível por via oral e consegue uma exposição após uma única dose oral a 3 mg/kg mais de 5 vezes superior ao melhor composto seguinte testado até à data (ver composto (**V**) no exemplo 1; Quadro 1).

Quadro 9. Parâmetros farmacocinéticos para os enantiómeros (R) e (S) isolados de (I).

	F (%)	t _{1/2} (min)	Eliminação (mL/min/kg)	V _{ss} (L/kg)	Exposição (min.ng/mL)
(R)- (I)	84	81	8,6	0,9	295000
(I')	69	196	2,6	0,7	939000

A biodisponibilidade oral (F , %), semi-vida dominante no plasma ($t_{1/2}$, min) após administração intravenosa, eliminação (mL/min/kg), volume de distribuição (V_{ss} , L/kg) e exposição oral (AUC 0-t, min.ng/mL) de um modelo farmacocinético simples de um compartimento para cada composto, baseou-se na média para três ratos. Em ambos os casos, a concentração máxima no plasma foi tipicamente observada cerca dos 30 min, coerente com boa absorção.

Embora (R)-(I) partilhe claramente, numa medida significativa, as propriedades de ADME invulgarmente benéficas de (I'), existem contudo algumas diferenças estatisticamente significativas. A mais acentuada é o aumento da eliminação do plasma (~3 vezes maior para (R)-(I) em comparação com (I')), resultando numa semi-vida no plasma 2 vezes mais curta após administração intravenosa bem como uma exposição 3 vezes inferior após a dose oral única.

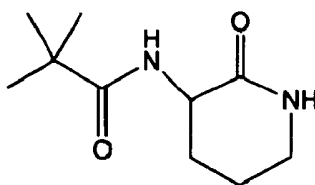
A eliminação de (R)-(I) aproxima-se da velocidade de filtração glomerular no rato (tipicamente indicada como 9 mL/min/kg), enquanto a eliminação de (I') é significativamente menor. Uma interpretação possível destas observações é que (I') é activamente reabsorvido, eventualmente no túbulo distal do nefrónio e este processo de reabsorção é selectivo para o enantiómero (S) relativamente ao enantiómero (R). Se, como parece plausível, as propriedades de ADME inesperadas e altamente superiores de (I') são devidas, em parte, à recaptção no nefrónio através de um transportador capaz de distinguir o enantiómero (S) do enantiómero (R), então isto realça a imprevisibilidade das propriedades de ADME, e ilustra ainda a actividade inventiva da invenção aqui descrita.

Não obstante, o (R)-(I) é também claramente um composto superior de acordo com a presente invenção (como ilustrado pelo círculo aberto na Figura 10, o que ilustra que é mais próximo em termos de propriedades de ADME a (I') do que a classe geral de acilaminolactamas. Em conclusão, portanto, ambos (R)-(I) e (I'), e, por isso, mais geralmente o composto (I) mostrou ter propriedades de ADME inesperadas e acentuadamente superiores em comparação com os outros BSCI de tipo acilaminolactama que foram divulgados. Além do mais, em geral, o composto (I') é ligeiramente, mas significativamente, superior ao composto (I) e é, portanto, preferido.

Lisboa, 8 de Julho de 2014

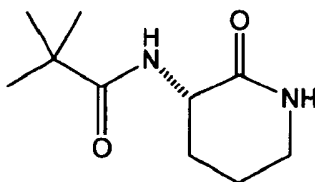
REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacologicamente aceitável, para a preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio inflamatório:



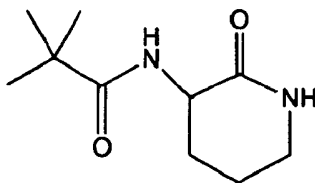
(I).

2. Utilização de um composto de fórmula (I') ou um seu sal farmacologicamente aceitável, para a preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio inflamatório:



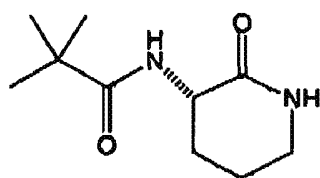
(I').

3. Composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacologicamente aceitável, para utilização como um medicamento:



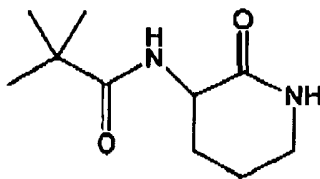
(I).

4. Composto de fórmula (I') ou um seu sal farmacologicamente aceitável, para utilização como um medicamento:



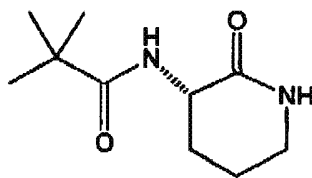
(I').

5. Composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacologicamente aceitável, para utilização no tratamento de um distúrbio inflamatório:



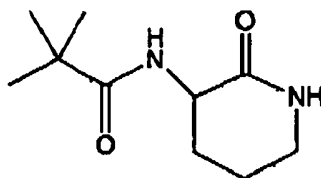
(I).

6. Composto de fórmula (I') ou um seu sal farmacologicamente aceitável, para utilização no tratamento de um distúrbio inflamatório:



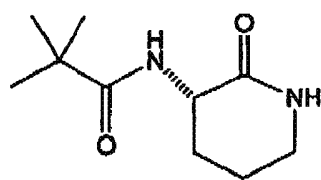
(I').

7. Composição farmacêuticamente aceitável compreendendo, como ingrediente activo, um composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável e, pelo menos, um excipiente e/ou veículo farmacêuticamente aceitável:



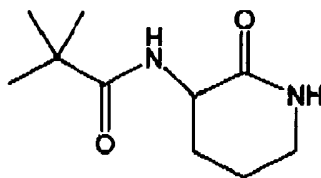
(I).

8. Composição farmacêuticamente aceitável compreendendo, como ingrediente activo, um composto de fórmula (I') ou um seu sal farmacêuticamente aceitável e, pelo menos, um excipiente e/ou veículo farmacêuticamente aceitável:



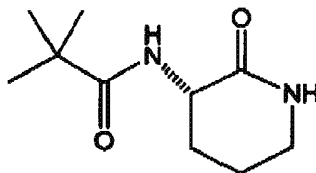
(I').

9. Composto de fórmula geral (I):



(I).

10. Composto de fórmula geral (I'):

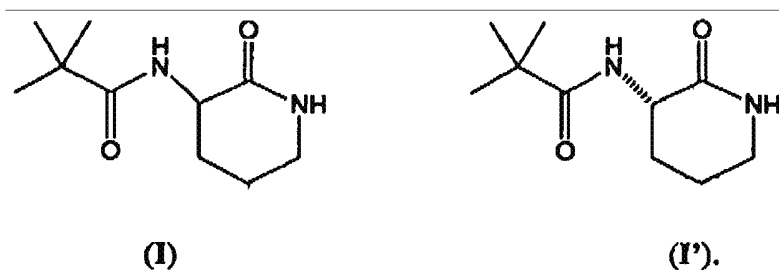


(I').

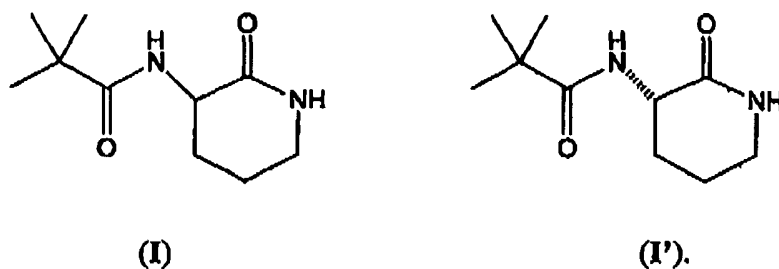
11. Utilização de um composto de fórmula (I) ou (I') de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2, ou o composto de fórmula (I) ou (I') para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 ou 6, em que o distúrbio inflamatório é seleccionado do grupo consistindo de doenças auto-imunes, distúrbios vasculares, infecção ou replicação viral, asma, osteoporose (baixa densidade mineral óssea), crescimento de tumores, rejeição de transplantes de órgãos e/ou funcionamento retardado de enxerto ou órgão, um distúrbio caracterizado por um nível elevado de TNF- α , psoríase, feridas cutâneas, distúrbios provocados por parasitas intracelulares, dor neuropática, alergias, doença de Alzheimer, resposta de memória induzida por antigénio, supressão de resposta imunológica, artrite reumatóide, esclerose múltipla, ALS, fibrose e formação de adesões.

12. Utilização de um composto de fórmula (I) ou (I'), ou o composto de fórmula (I) ou (I') para utilização, de acordo com a reivindicação 11, em que o distúrbio inflamatório é asma, rinite alérgica ou doença pulmonar obstrutiva crónica.

13. Utilização de um composto de fórmula (I) ou (I'), ou o composto de fórmula (I) ou (I') para utilização, de acordo com a reivindicação 11, em que o distúrbio inflamatório é a formação de adesões após cirurgia ginecológica ou geral.
14. Utilização de um composto de fórmula (I) ou (I'), ou o composto de fórmula (I) ou (I') para utilização, de acordo com a reivindicação 11, em que o distúrbio inflamatório é nefropatia, incluindo nefropatia diabética.
15. Utilização de um composto de fórmula (I) ou (I') ou um seu sal farmacologicamente aceitável, para a preparação de um medicamento para o tratamento, melhoria ou profilaxia de sintomas de uma doença inflamatória (incluindo uma reacção inflamatória desfavorável a qualquer agente):



16. Composto de fórmula (I) ou (I') ou um seu sal farmacologicamente aceitável, para utilização no tratamento, melhoria ou profilaxia de sintomas de uma doença inflamatória (incluindo uma reacção inflamatória desfavorável a qualquer agente):



17. Composição farmacologicamente aceitável de acordo com a reivindicação 7 ou 8, para utilização no tratamento, melhoria ou profilaxia dos sintomas de um distúrbio inflamatório.
18. Composição farmacologicamente aceitável para utilização de acordo com a reivindicação 17, em que o distúrbio é seleccionado dos distúrbios definidos em qualquer das reivindicações 11 a 14.
19. Utilização, composto, composto para utilização, composição ou composição para utilização de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o composto de fórmula (I) ou (I') está na forma hidratada ou solvatada.

Lisboa, 8 de Julho de 2014

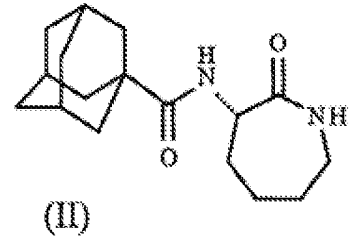
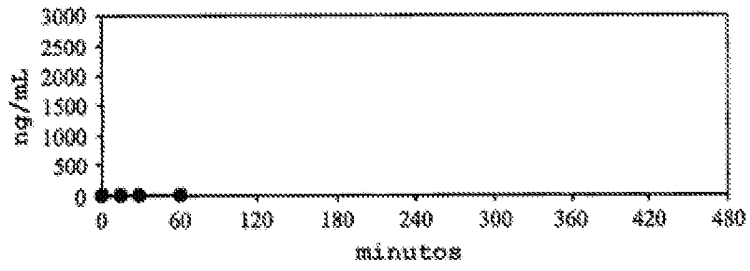


FIG. 1A

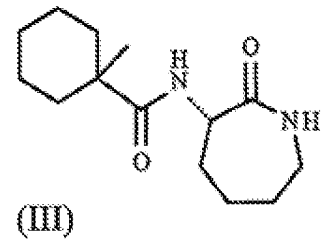
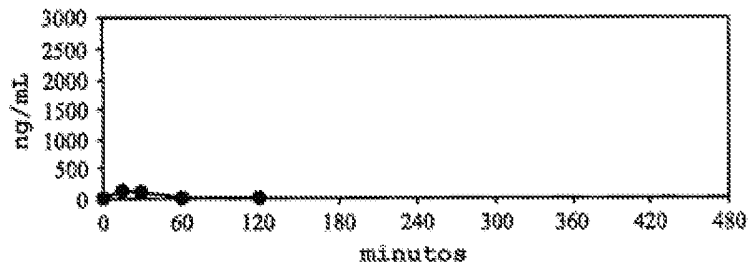


FIG. 1B

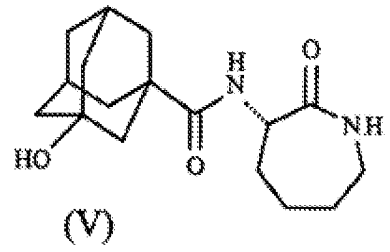
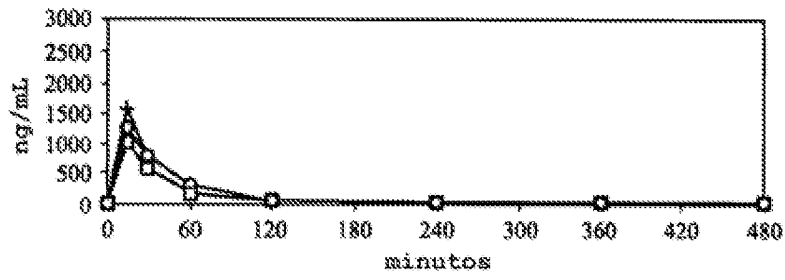


FIG. 1C

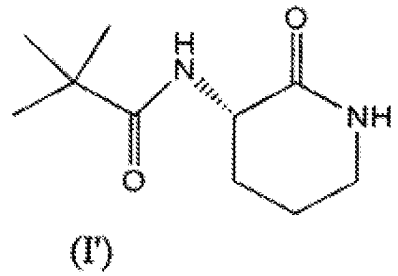
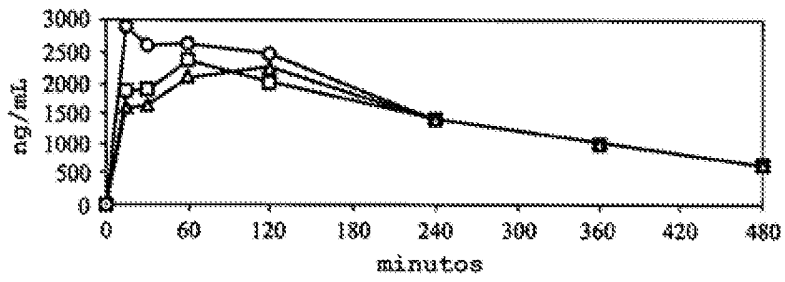


FIG. 1D

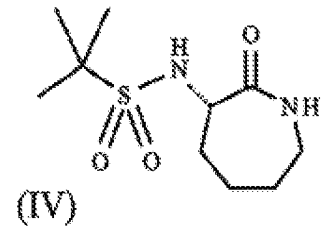
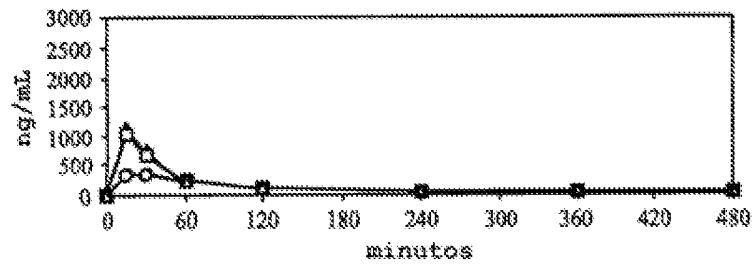


FIG. 1E

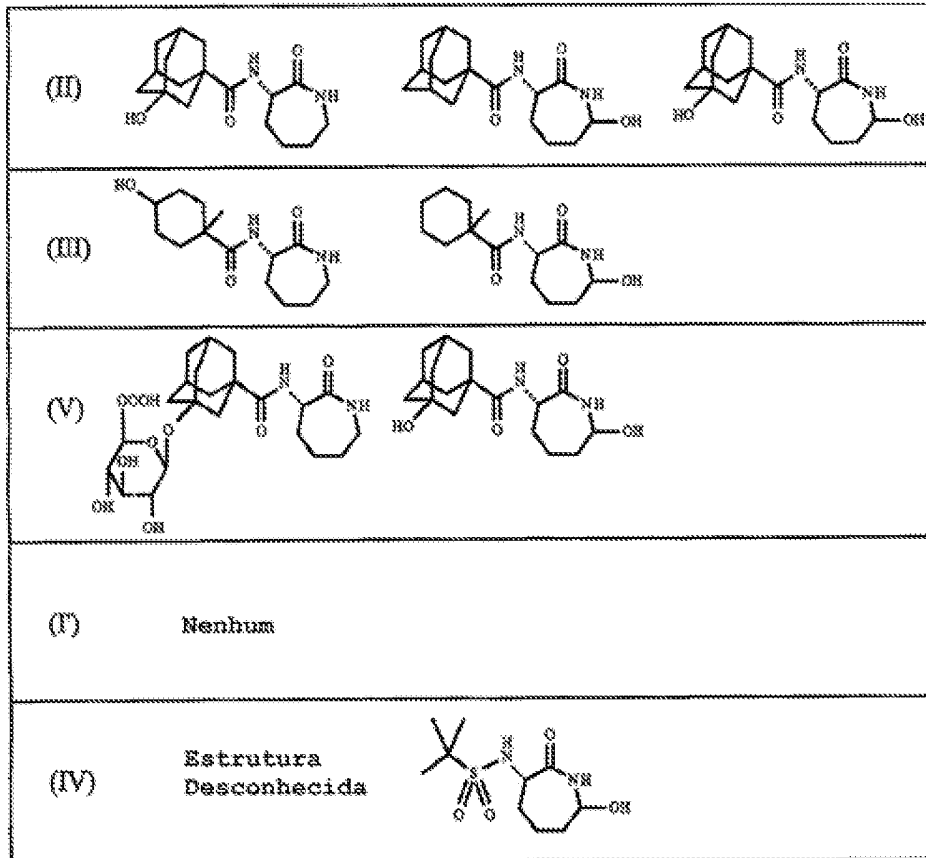


FIG. 2

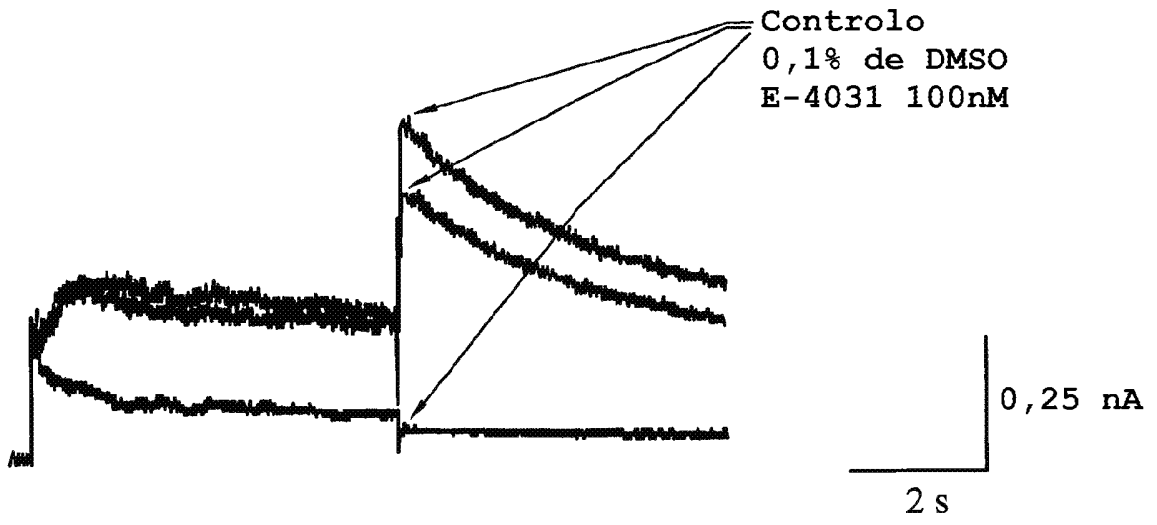


FIG. 3A

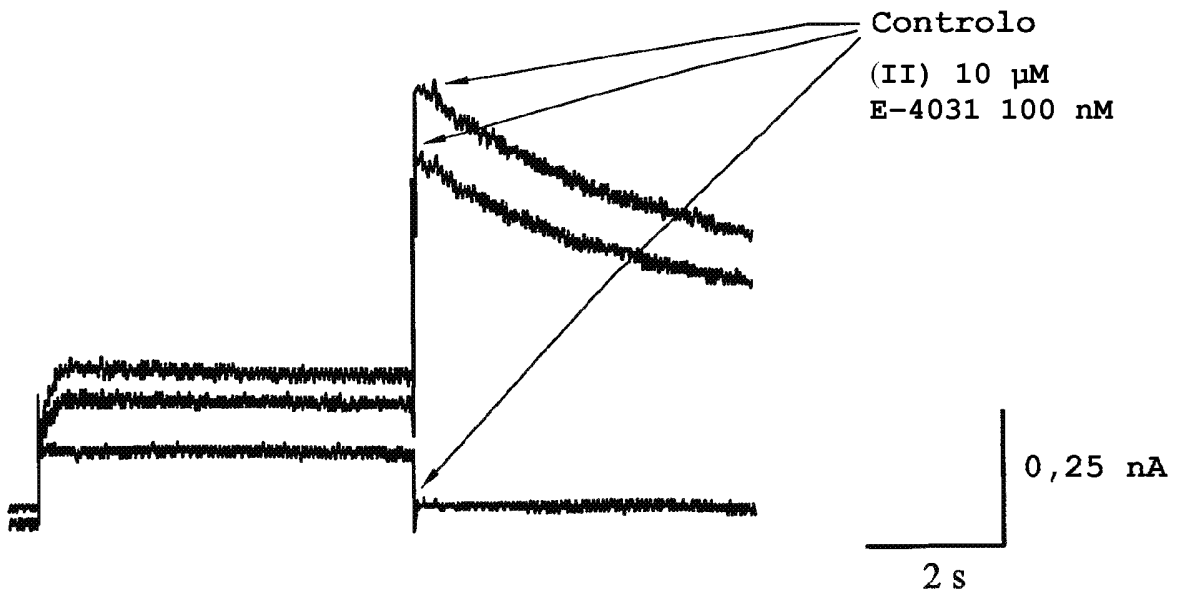


FIG. 3B

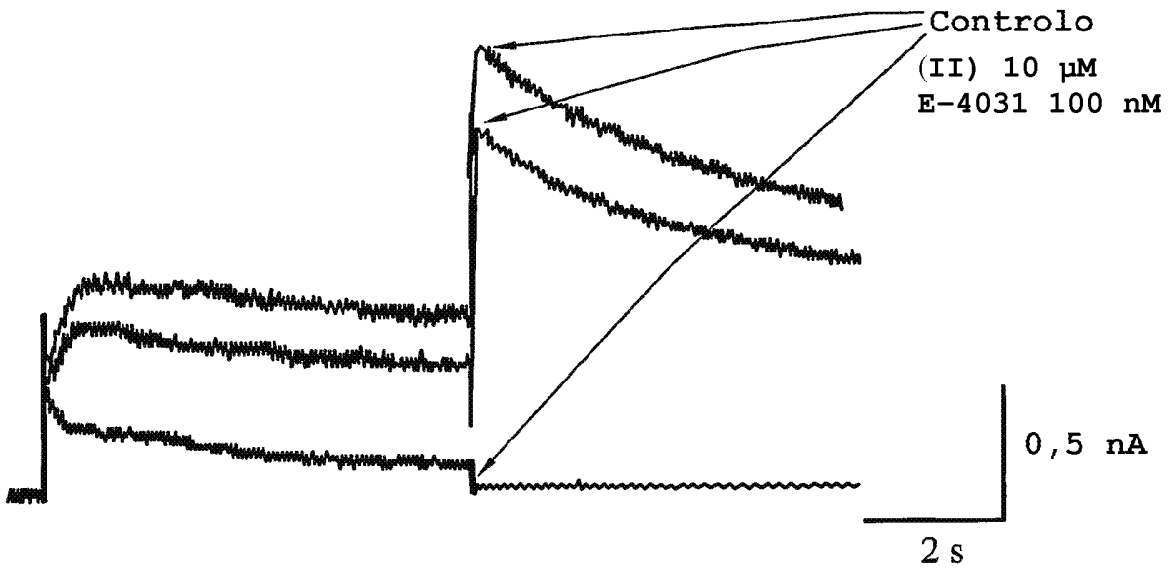


FIG. 3C

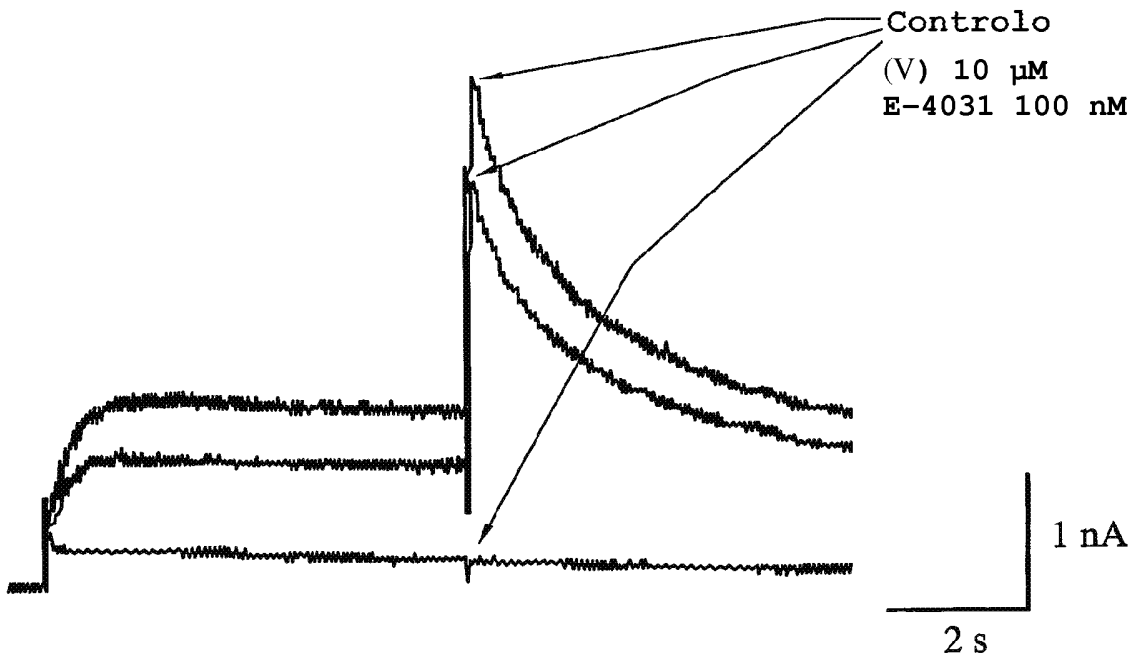


FIG. 3D

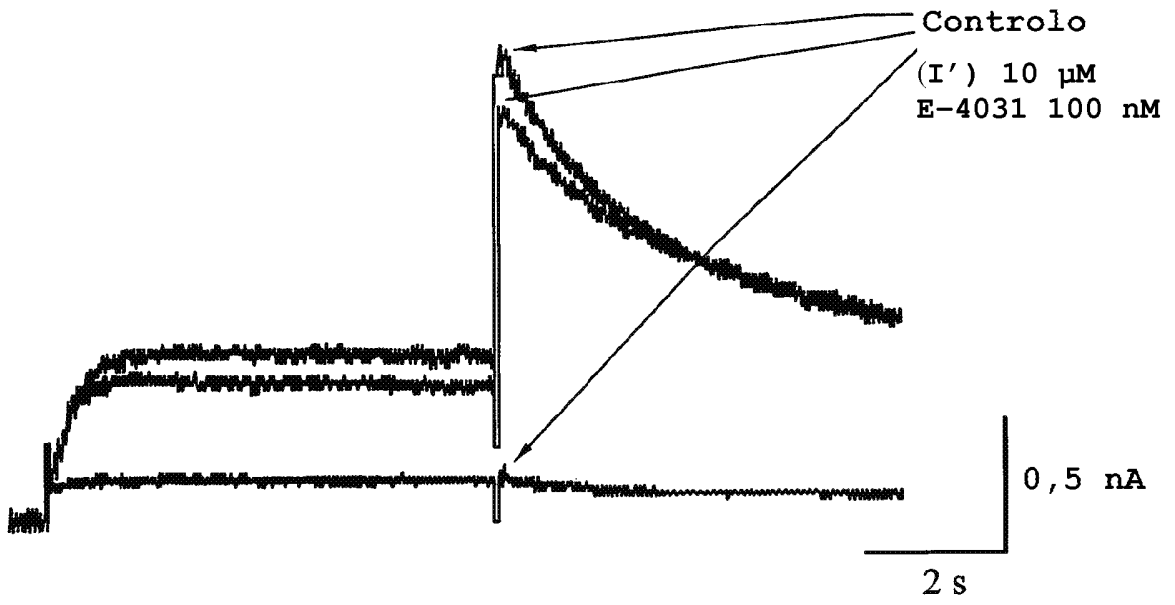


FIG. 3E

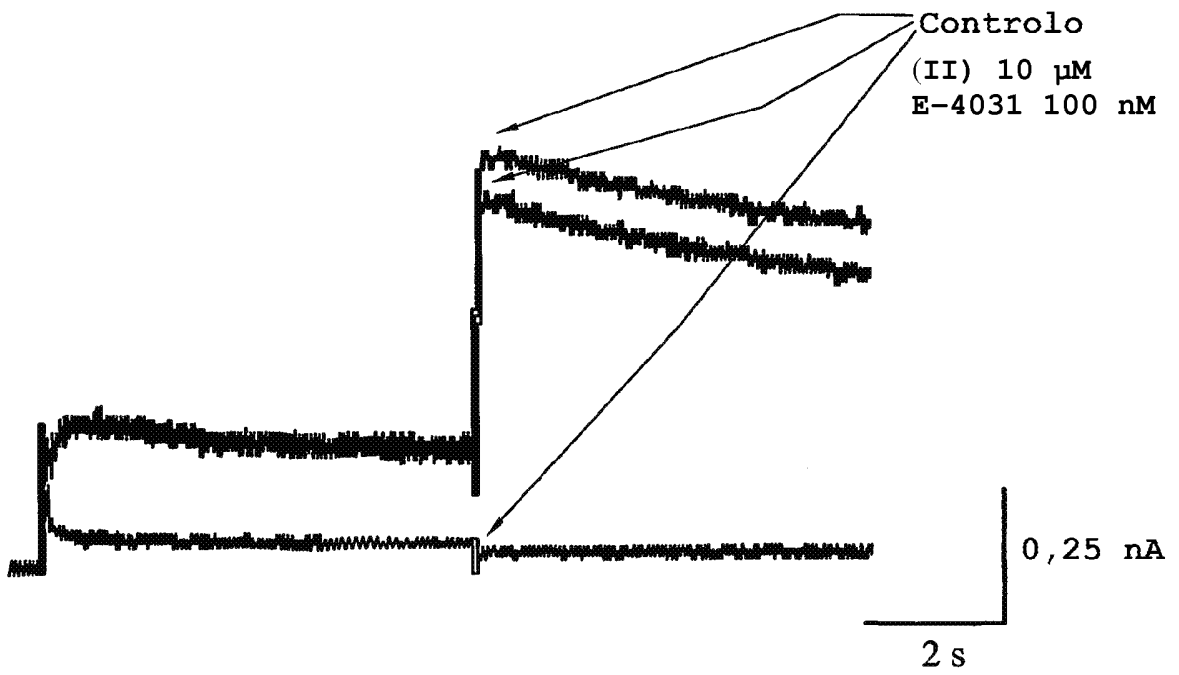


FIG. 3F

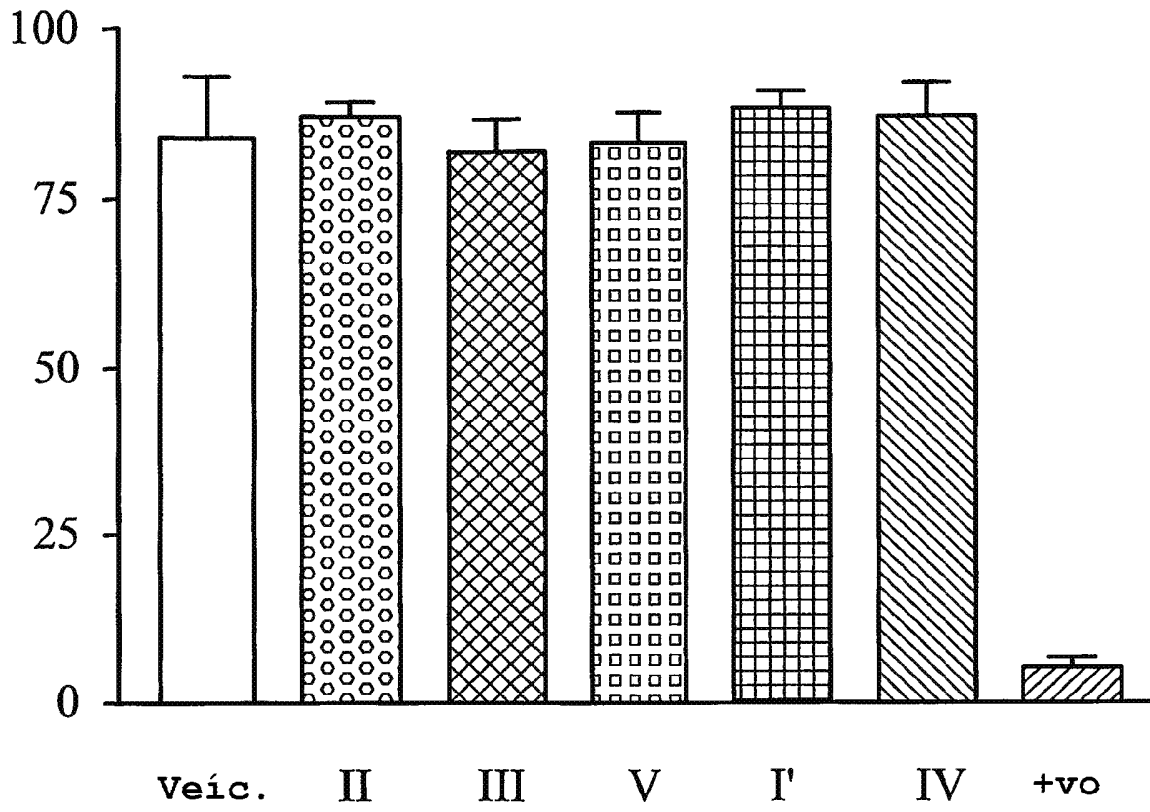


FIG. 3G

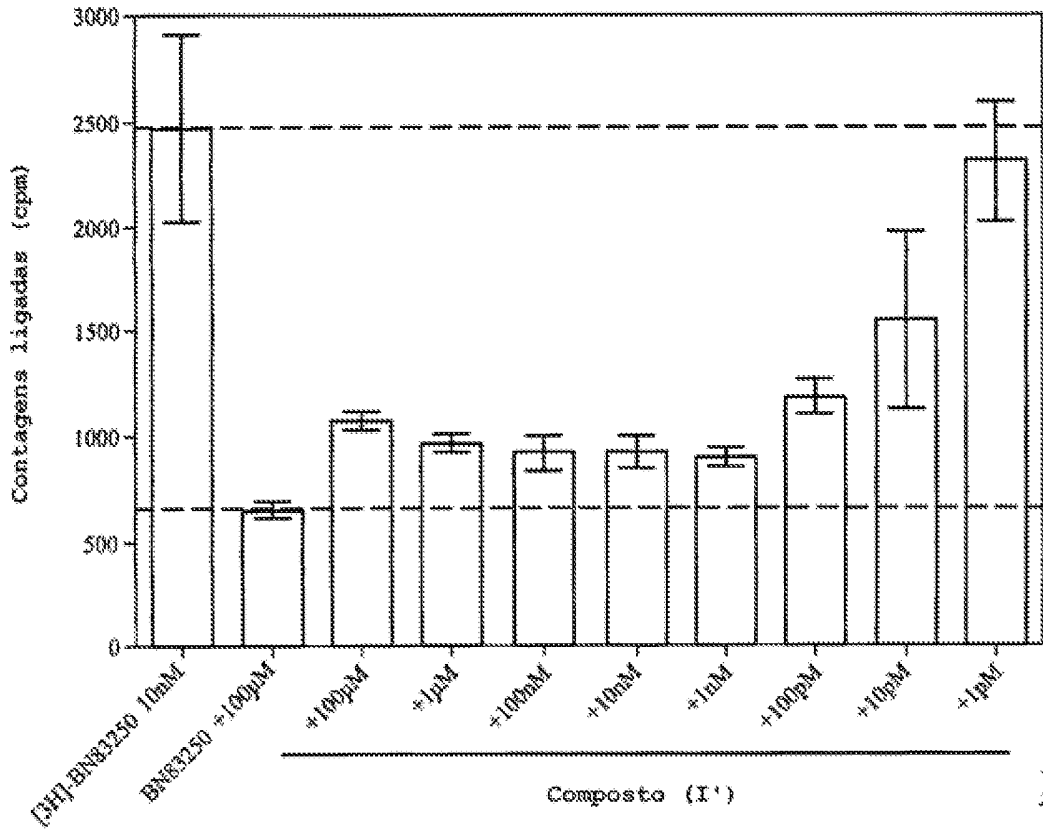


FIG. 4

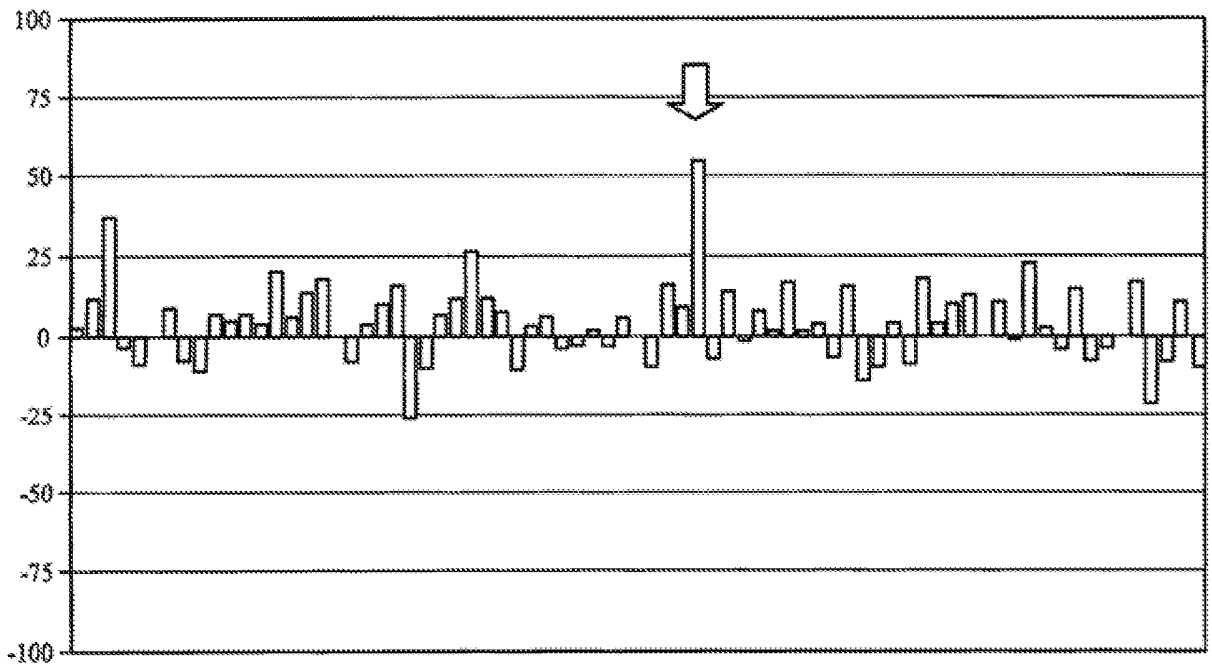


FIG. 5A

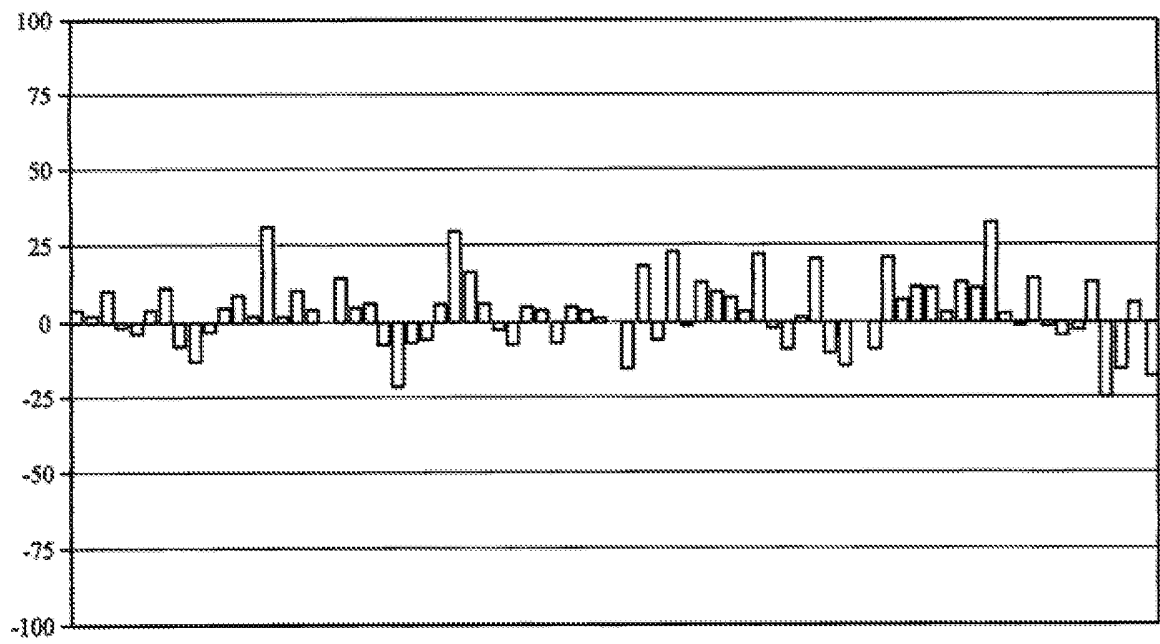


FIG. 5B

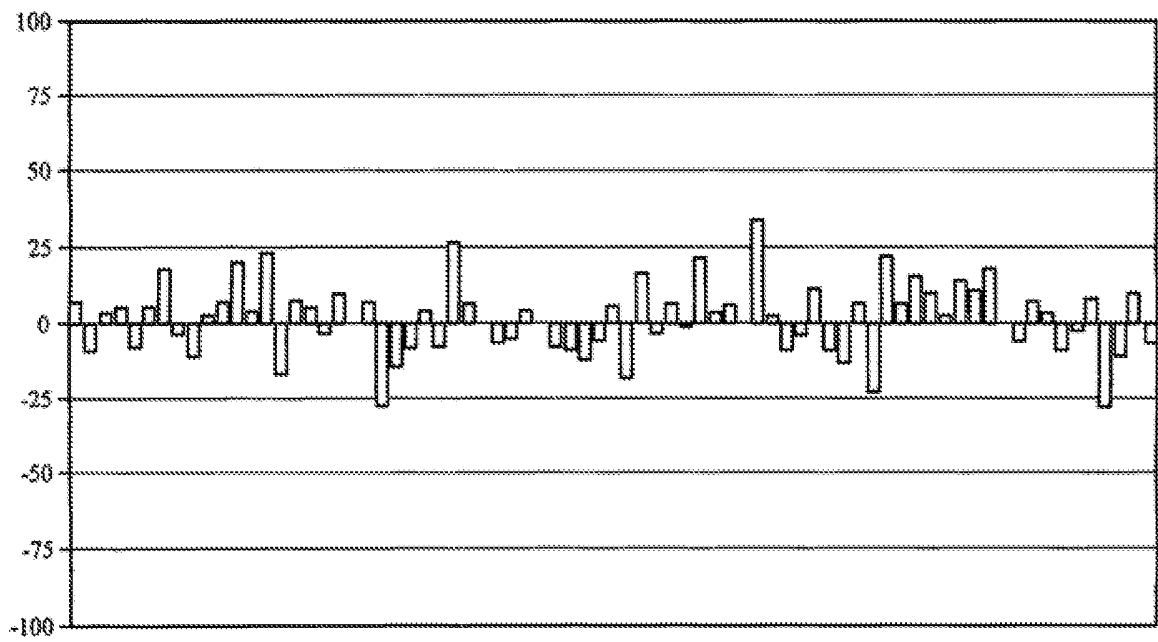


FIG. 5C

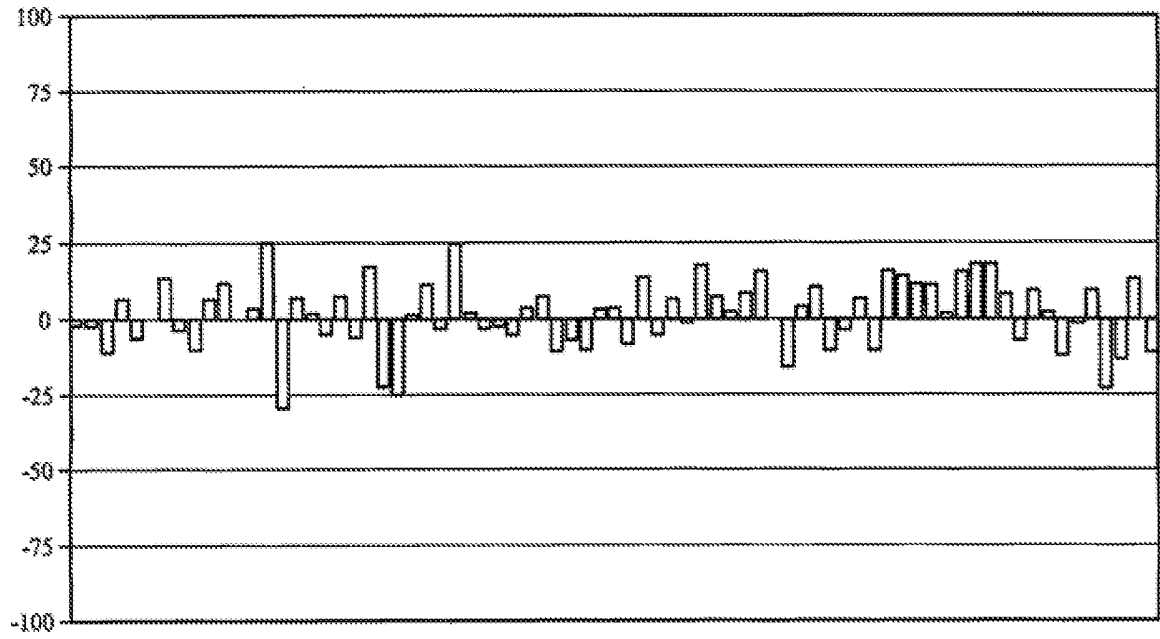


FIG. 5D

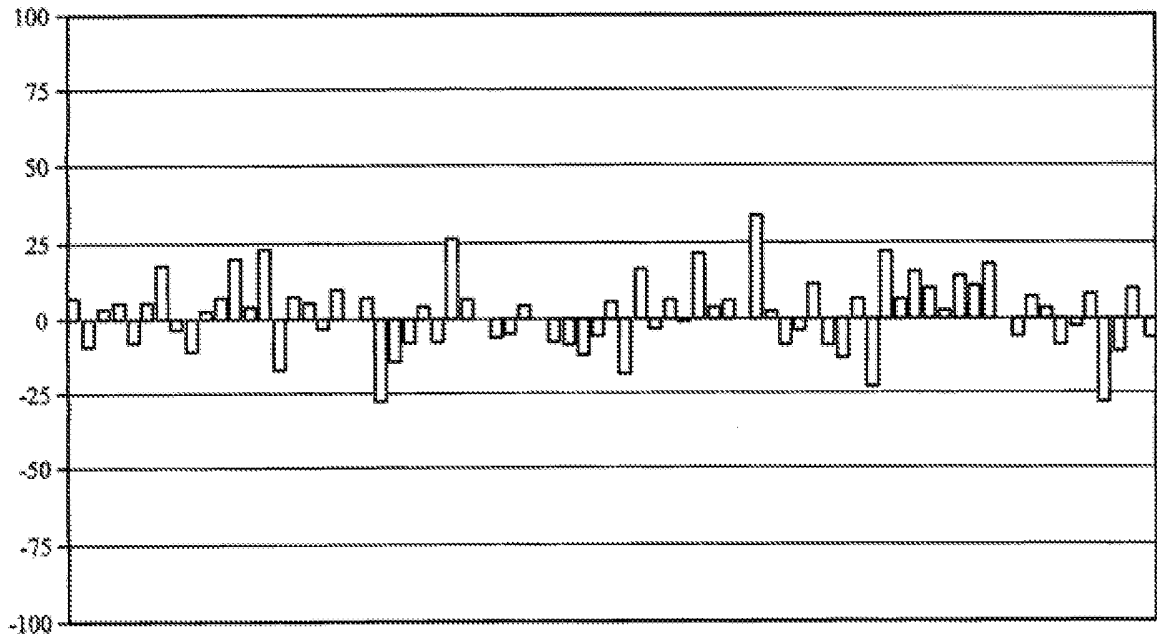


FIG. 5E

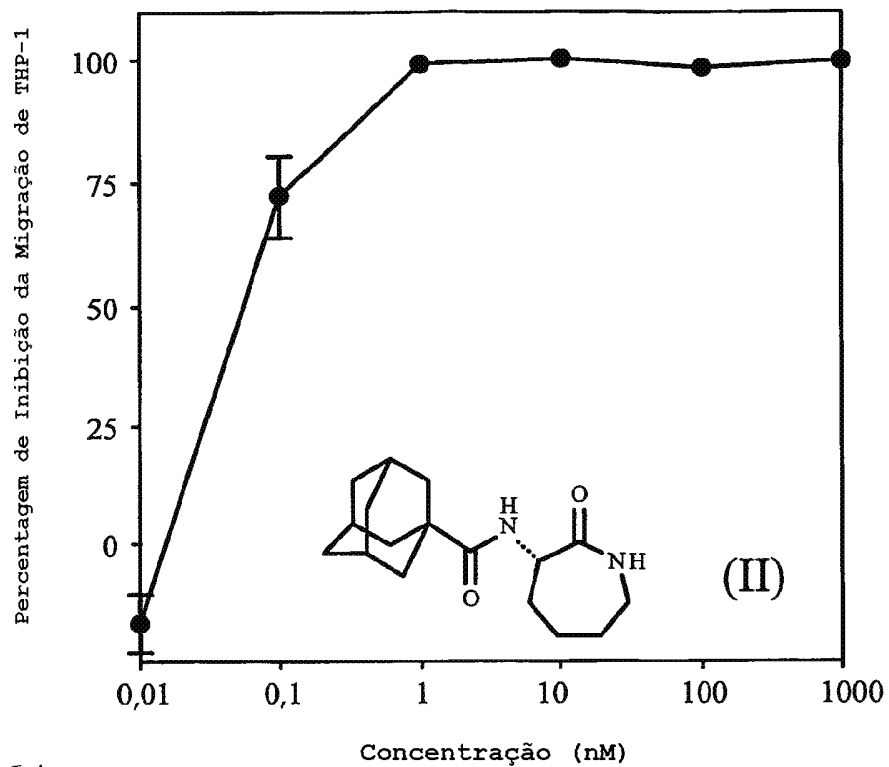


FIG. 6A

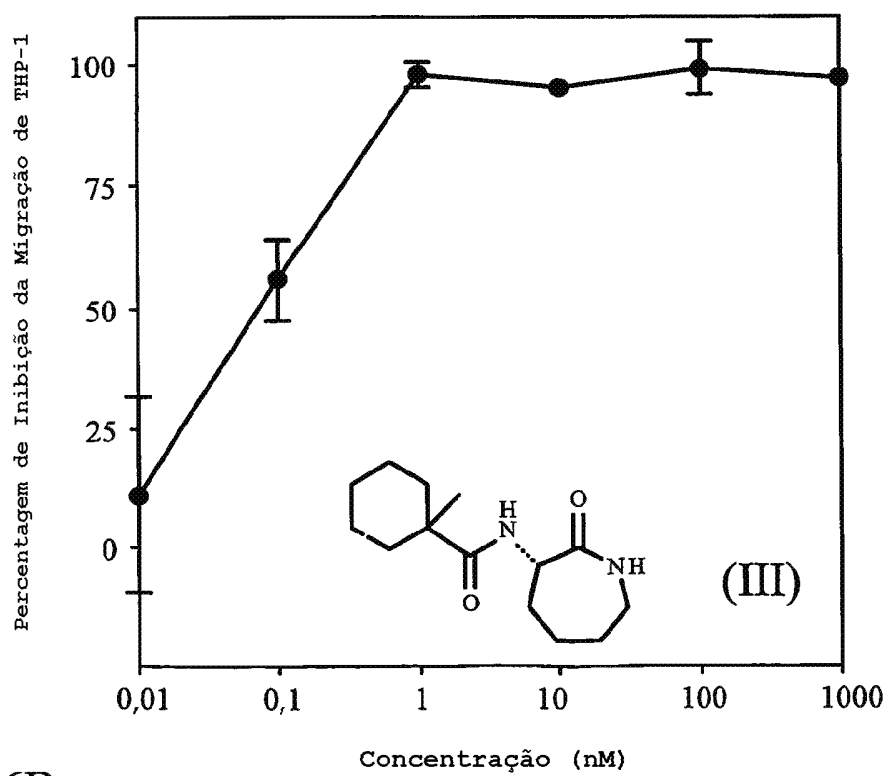
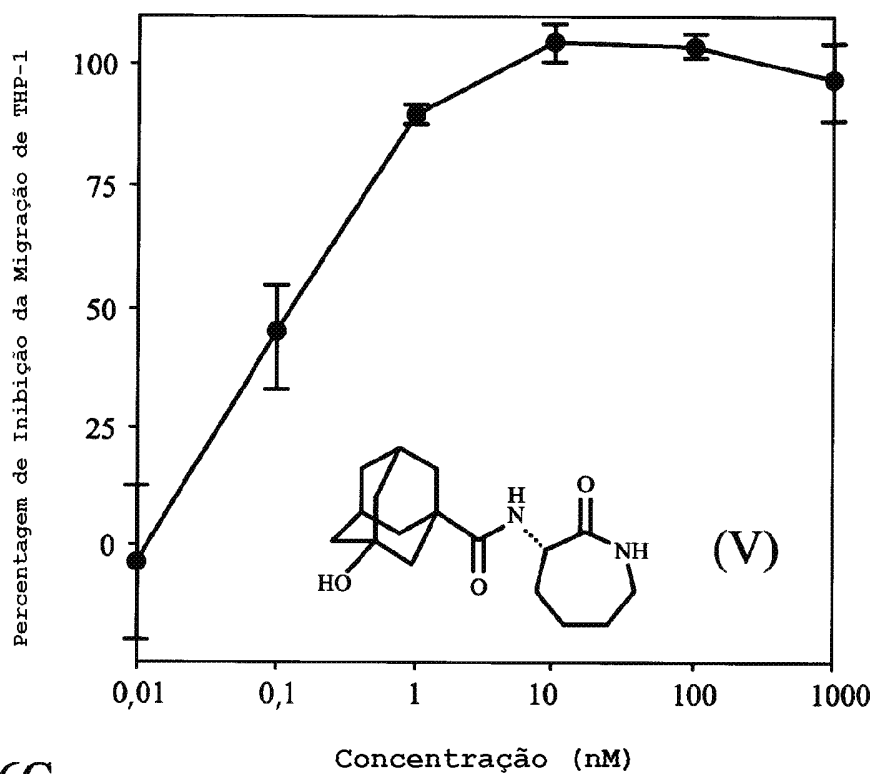
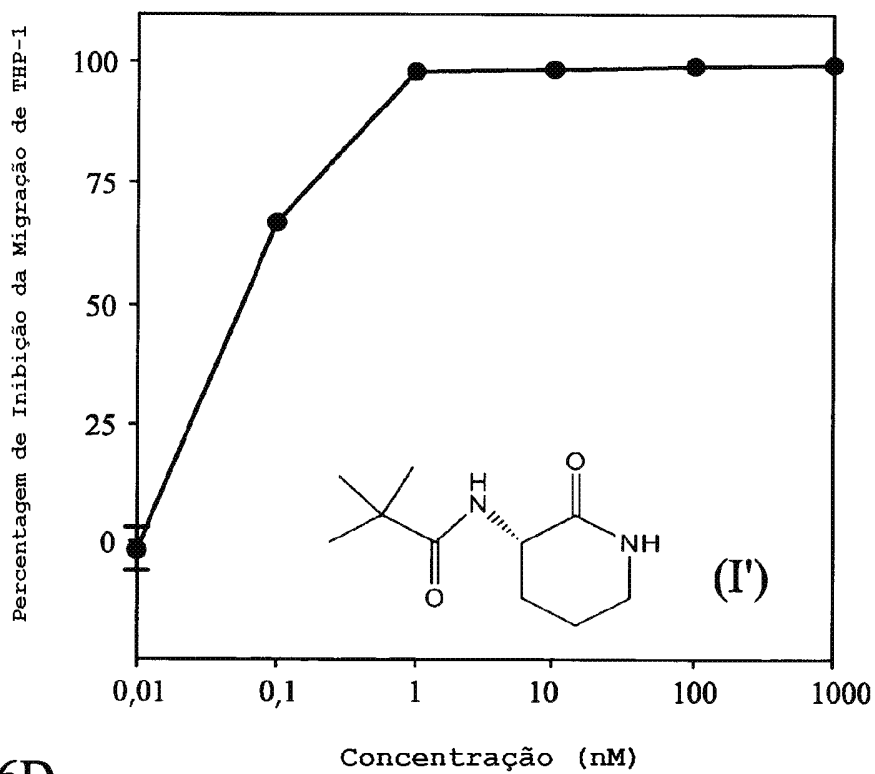


FIG. 6B

FIG. 6CFIG. 6D

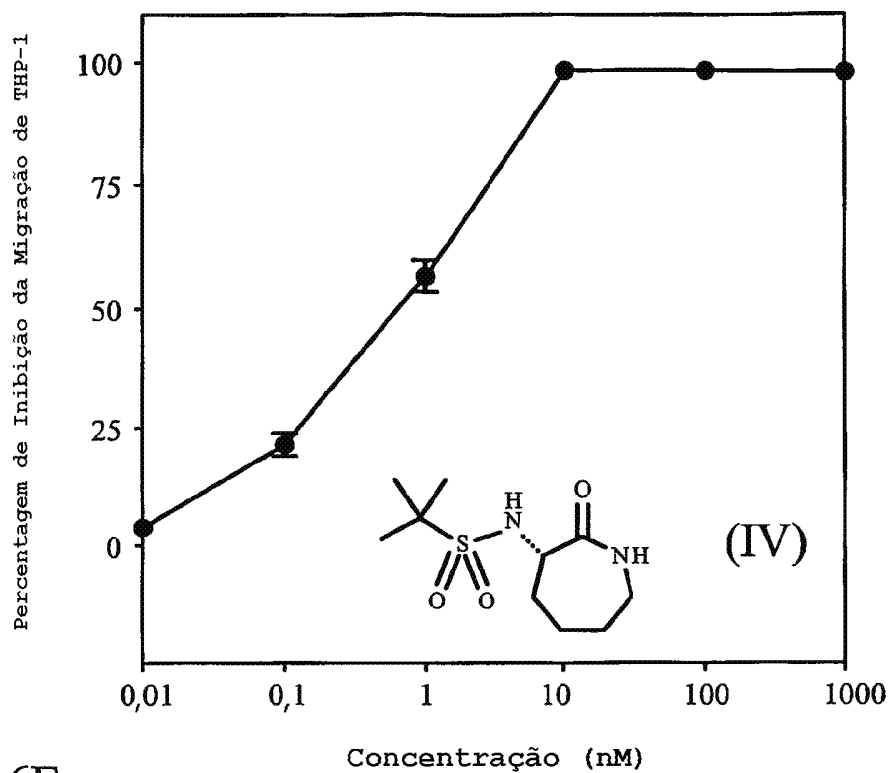


FIG. 6E

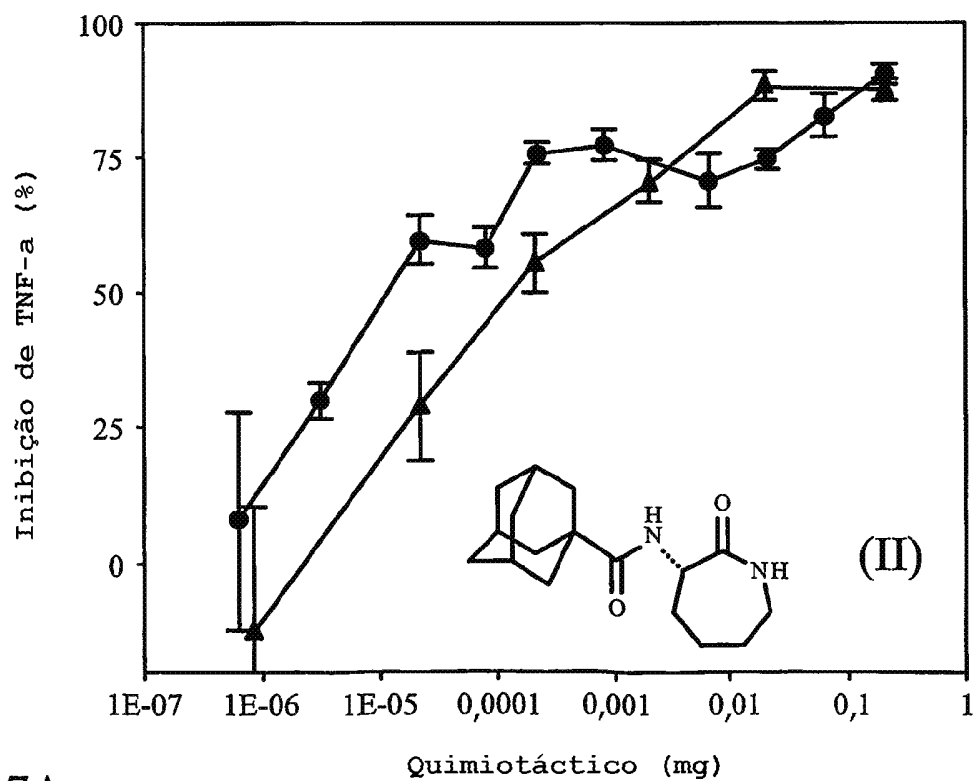


FIG. 7A

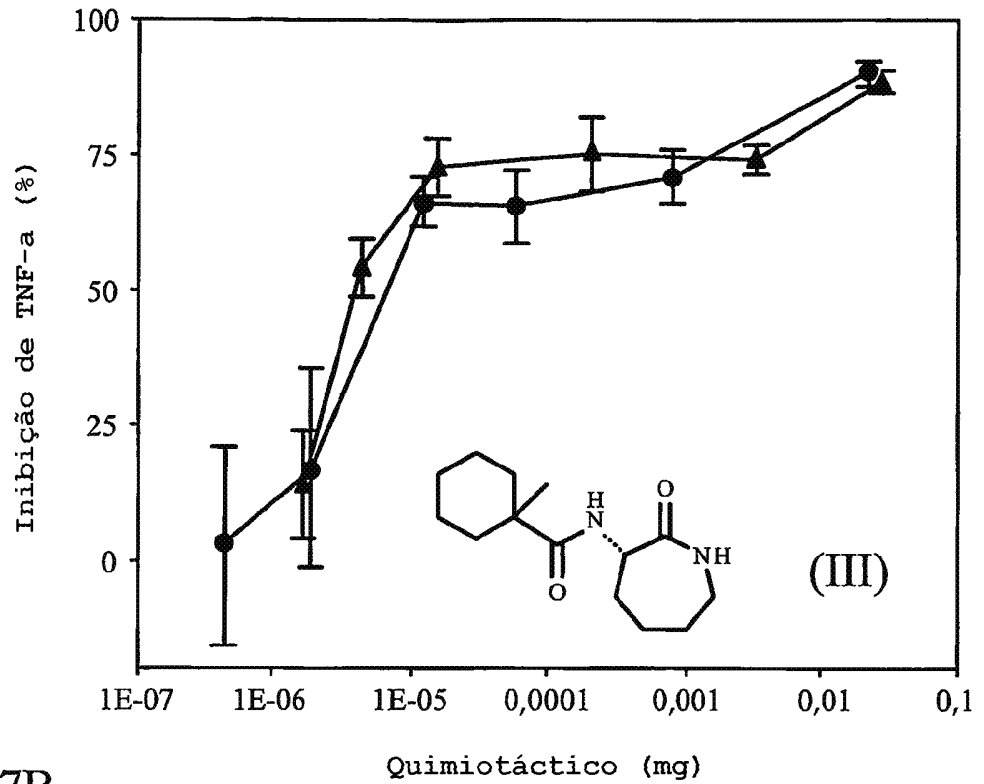


FIG. 7B

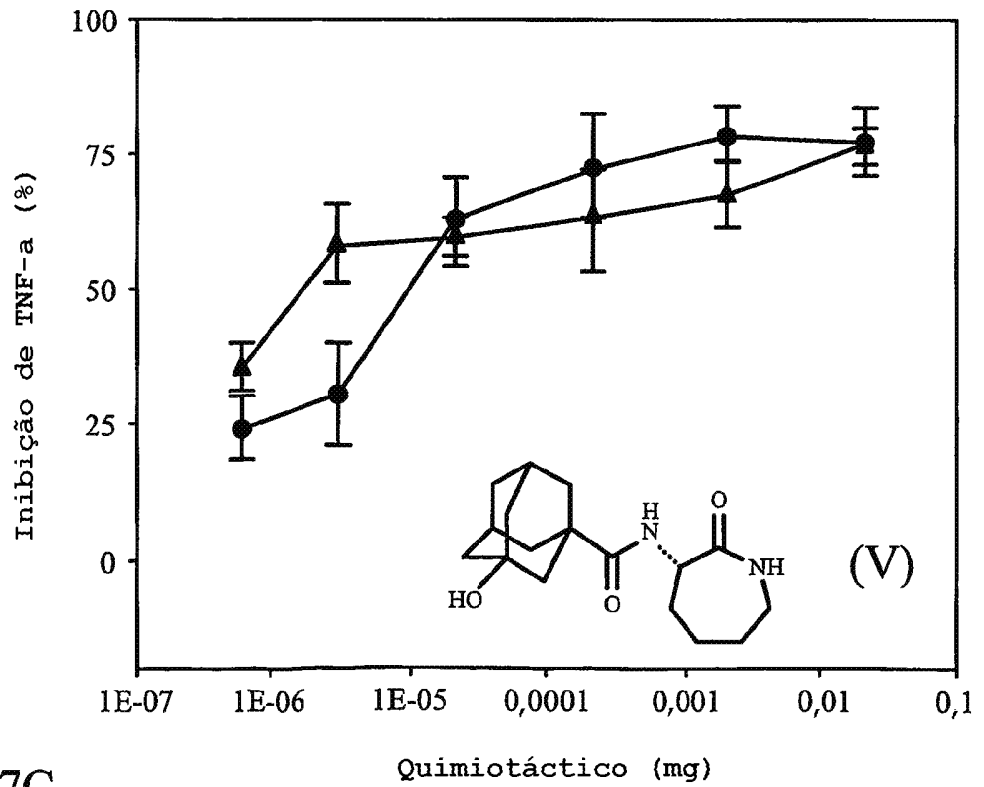


FIG. 7C

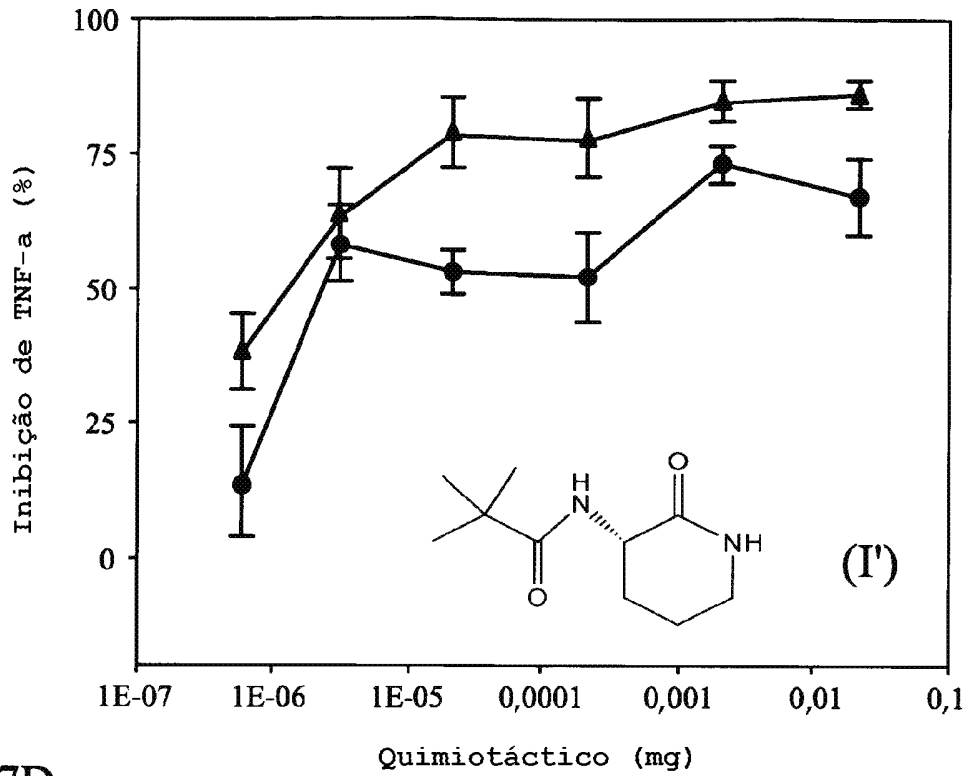


FIG. 7D

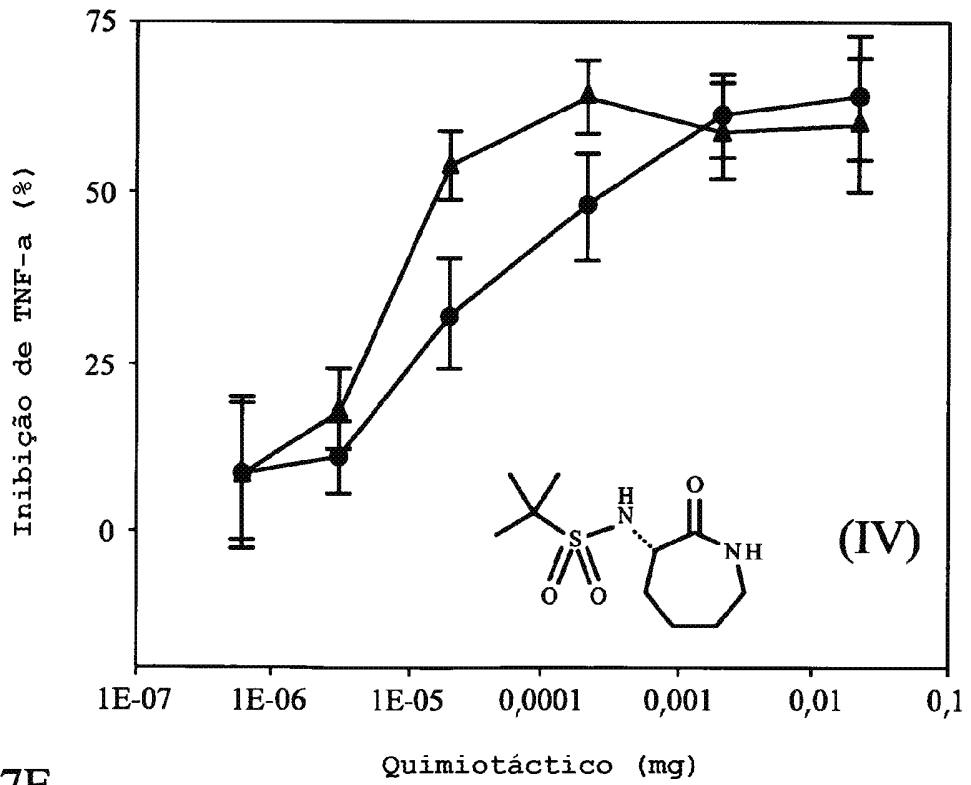
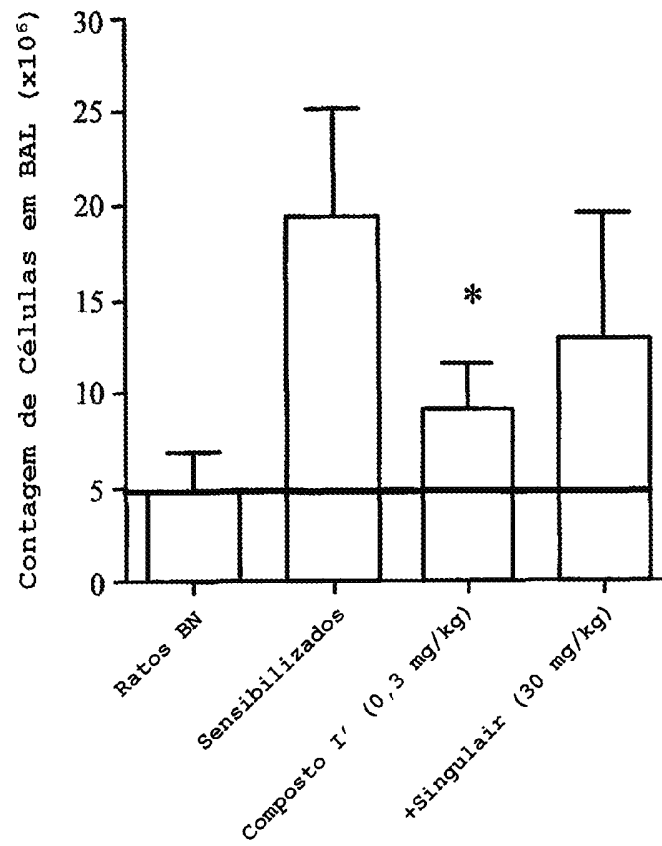
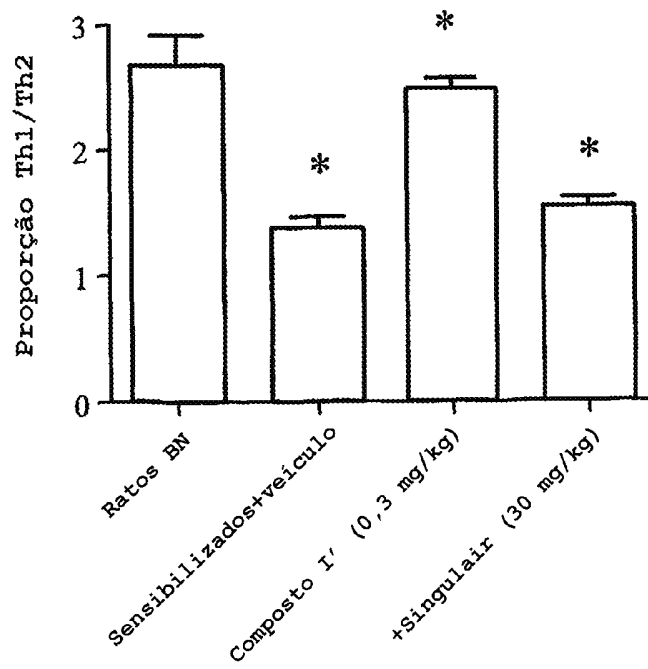


FIG. 7E

FIG. 8FIG. 9

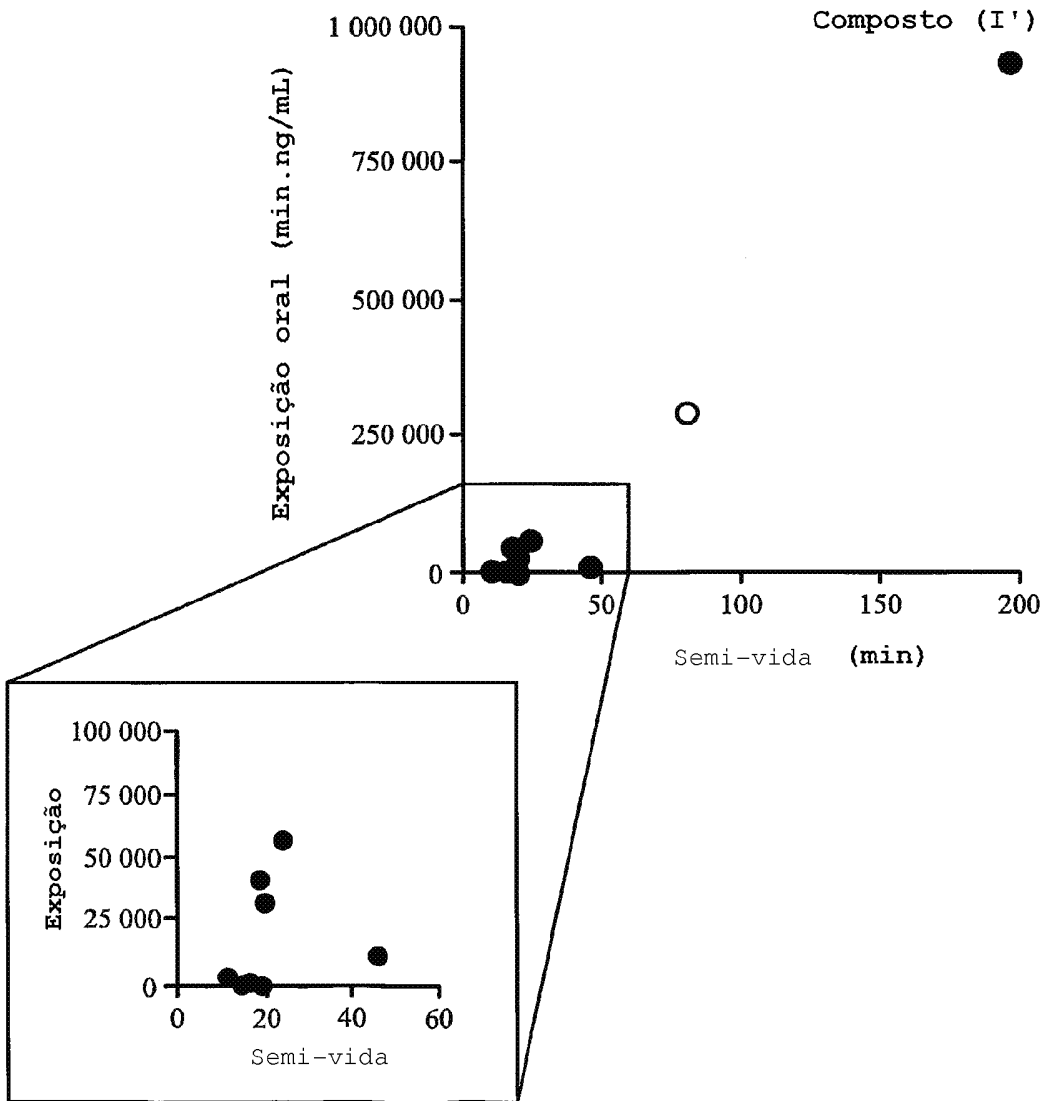


FIG. 10