

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

(21) PI0616687-3 A2



\* B R P I 0 6 1 6 6 8 7 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 28/09/2006  
(43) Data da Publicação: 28/06/2011  
(RPI 2112)

(51) Int.CI.:

C07D 405/12 2006.01  
C07D 409/12 2006.01  
C07D 417/12 2006.01  
C07D 239/50 2006.01  
C07D 401/12 2006.01  
A61K 31/506 2006.01  
A61P 29/00 2006.01

(54) Título: COMPOSTOS DE PIRIMIDINIL AMIDA QUE INIBEM A ADESÃO LEUCOCITÁRIA MEDIADA POR VLA-4

(30) Prioridade Unionista: 29/09/2005 US 60/722.358

(73) Titular(es): ELAN PHARMACEUTICALS INC, WYETH

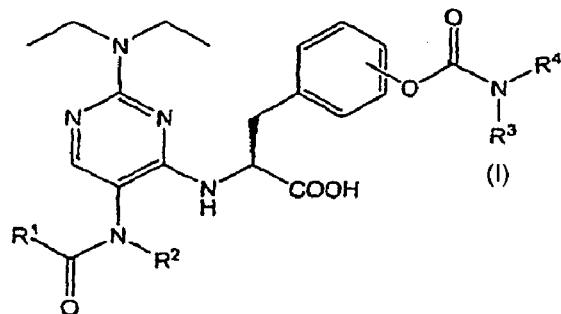
(72) Inventor(es): ANDREI W. KONRADI, CHRISTOPHER MICHAEL SEMKO, FRANK STAPPENBECK, JENIFER LEA SMITH, JURI Y. FUKUDA, KASSANDRA INEZ ROSSITER, YING-ZI XU

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT US2006038009 de 28/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/041270 de 12/04/2007

(57) Resumo: COMPOSTOS DE PIRIMIDINIL AMIDA QUE INIBEM A ADESÃO LEUCOCITÁRIA MEDIADA POR VLA-4 SÃO REVELADOS compostos que se ligam à VLA-4. alguns desses compostos também inibem a adesão leucocitária e, em particular, a adesão leucocitária mediada por VLA-4. Tais compostos são úteis no tratamento de doenças inflamatórias em um indivíduo humano ou animal, por exemplo, asma, doença de Alzheimer, aterosclerose, demência por AIDS, diabetes, doença inflamatória do intestino, artrite reumatóide, transplante de tecidos, metástase tumoral e isquemia miocárdica. Os compostos também podem ser administrados para o tratamento de doenças cerebrais inflamatórias como, por exemplo, esclerose múltipla (Fórmula I).



PI-06166687-3

Ref-020080045499

1/113

Data-19/05/08

COMPOSTOS DE PIRIMIDINIL AMIDA QUE INIBEM A ADESÃO  
LEUCOCITÁRIA MEDIADA POR VLA-4

REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDO RELACIONADO

Este pedido reivindica os benefícios sob 35 U.S.C.

5 119(e) para o pedido U.S. provisório co-pendente N° de  
Série 60/722.358, depositado em 29 de setembro de 2005, que  
é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Campo da invenção

10 Esta invenção está relacionada aos compostos que  
inibem a adesão leucocitária e, em particular, a adesão  
leucocitária mediada por integrinas  $\alpha 4$ , em que a integrina  
 $\alpha 4$  é, de preferência, VLA-4. Esta invenção também está  
relacionada às composições farmacêuticas que compreendem  
15 esses compostos, além de métodos para o tratamento, por  
exemplo, de inflamação, com o uso de um dos compostos ou  
das composições farmacêuticas desta invenção.

Referências

As publicações a seguir são citadas neste pedido como  
20 números sobrescritos:

- 1 Hemler e Takada, Publicação de Patente Européia  
N° 330.506, publicada em 30 de agosto de 1989
- 2 Elices, e cols., *Cell*, 60: 577-584 (1990)
- 3 Springer, *Nature*, 346: 425-434 (1990)
- 25 4 Osborn, *Cell*, 62: 3-6 (1990)
- 5 Vedder, e cols., *Surgery*, 106: 509 (1989)
- 6 Pretolani, e cols., *J. Exp. Med.*, 180: 795 (1994)
- 7 Abraham, e cols., *J. Clin. Invest.*, 93: 776  
(1994)
- 30 8 Mulligan, e cols., *J. Immunology*, 150: 2.407

- } )
- (1993)
- 9 Cybulsky, e cols., *Science*, 251: 788 (1991)
- 10 Li, e cols., *Arterioscler. Thromb.*, 13: 197
- (1993)
- 5 11 Sasseville, e cols., *Am. J. Path.*, 144: 27 (1994)
- 12 Yang, e cols., *Proc. Nat. Acad. Science (USA)*, 90: 10.494 (1993)
- 13 Burkly, e cols., *Diabetes*, 43: 529 (1994)
- 14 Baron, e cols., *J. Clin. Invest.*, 93: 1.700
- 10 (1994)
- 15 Hamann, e cols., *J. Immunology*, 152: 3.238 (1994)
- 16 Yednock, e cols., *Nature*, 356: 63 (1992)
- 17 Baron, e cols., *J. Exp. Med.*, 177: 57 (1993)
- 18 van Dinther-Janssen, e cols., *J. Immunology*, 147:
- 15 4.207 (1991)
- 19 van Dinther-Janssen, e cols., *Annals. Rheumatic Dis.*, 52: 672 (1993)
- 20 Elices, e cols., *J. Clin. Invest.*, 93: 405 (1994)
- 21 Postigo, e cols., *J. Clin. Invest.*, 89: 1.445
- 20 (1991)
- 22 Paul, e cols., *Transpl. Proceed.*, 25:813 (1993)
- 23 Okarhara, e cols., *Can. Res.*, 54: 3.233 (1994)
- 24 Paavonen, e cols., *Int. J. Can.*, 58: 298 (1994)
- 25 Schadendorf, e cols., *J. Path.*, 170: 429 (1993)
- 25 26 Bao, e cols., *Diff.*, 52: 239 (1993)
- 27 Lauri, e cols., *British J. Cancer*, 68: 862 (1993)
- 28 Kawaguchi, e cols., *Japanese J. Cancer Res.*, 83:
- 1.304 (1992)
- 29 Konradi, e cols., PCT/US00/01686, depositado em
- 30 21 de janeiro de 2000

Todas as publicações acima são aqui incorporadas por referência em sua totalidade, na mesma extensão como se cada publicação individual fosse específica e individualmente indicada para ser incorporada por referência em sua totalidade.

#### **Técnica estabelecida**

VLA-4 (também denominada integrina  $\alpha 4\beta 1$  e CD49d/CD29), identificada inicialmente por Hemler e Takada,<sup>1</sup> é um membro da família de integrina  $\beta 1$  de receptores da superfície celular, cada um dos quais compreende duas subunidades, uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$ . VLA-4 contém uma cadeia  $\alpha 4$  e uma cadeia  $\beta 1$ . Há pelo menos nove integrinas  $\beta 1$ , todas compartilhando a mesma cadeia  $\beta 1$  e cada uma tendo uma cadeia  $\alpha$  distinta. Todos esses nove receptores se ligam a um complemento diferente das várias moléculas da matriz celular, por exemplo, fibronectina, laminina e colágeno. VLA-4, por exemplo, se liga à fibronectina. VLA-4 também se liga às moléculas que não são da matriz que são expressas por células endoteliais e outras células. Essas moléculas que não são da matriz incluem VCAM-1, que é expressa em células endoteliais da veia umbilical humana ativadas por citocina, em cultura. Epitopos distintos de VLA-4 são responsáveis pelas fibronectina e atividades de ligação de VCAM-1, e foi demonstrado que cada atividade era inibida independentemente.<sup>2</sup>

A adesão intercelular mediada por VLA-4 e por outros receptores da superfície celular está associada a diversas respostas inflamatórias. No local de uma lesão ou de outro estímulo inflamatório, células endoteliais vasculares ativadas expressam moléculas que são adesivas para

leucócitos. A mecânica da adesão leucocitária às células endoteliais envolve, em parte, o reconhecimento e a ligação de receptores da superfície celular em leucócitos às moléculas da superfície celular correspondentes em células endoteliais. Uma vez ligados, os leucócitos migram através da parede do vaso sanguíneo para entrar no local lesado e liberar mediadores químicos para combater a infecção. Para revisões sobre receptores de adesão do sistema imunológico, veja, por exemplo, Springer<sup>3</sup> e Osborn.<sup>4</sup>

Distúrbios cerebrais inflamatórios como, por exemplo, encefalomielite autoimune experimental (EAE), esclerose múltipla (EM) e meningite, são exemplos de distúrbios do sistema nervoso central nos quais o mecanismo de adesão endotélio/leucócito causa a destruição de tecido cerebral até então saudável. Grandes números de leucócitos migram através da barreira hematencefálica (BHC) em indivíduos com essas doenças inflamatórias. Os leucócitos liberam mediadores tóxicos que causam dano tecidual extenso que produzem prejuízo à condução nervosa e paralisia.

Em outros sistemas orgânicos, o dano tecidual também ocorre através de um mecanismo de adesão que causa a migração ou ativação de leucócitos. Por exemplo, foi demonstrado que a agressão inicial após isquemia miocárdica ao tecido cardíaco pode ser ainda mais agravada pela entrada de leucócitos no tecido danificado, causando ainda mais agressão (Vedder, e cols.).<sup>5</sup> Outras condições inflamatórias ou médicas mediadas por um mecanismo de adesão incluem, por exemplo, asma,<sup>6-8</sup> doença de Alzheimer, aterosclerose,<sup>9-10</sup> demência por AIDS,<sup>11</sup> diabetes<sup>12-14</sup> (incluindo diabetes agudo de surgimento juvenil), doença

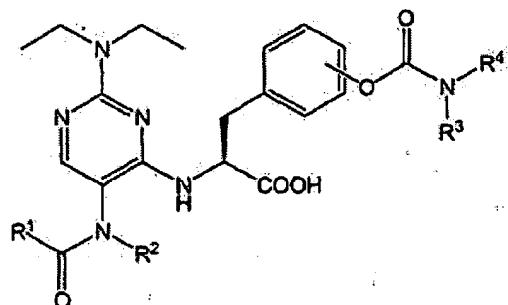
inflamatória do intestino (incluindo colite ulcerativa e doença de Crohn), esclerose múltipla,<sup>16-17</sup> artrite reumatóide,<sup>18-21</sup> transplante de tecidos,<sup>22</sup> metástase tumoral,<sup>23-28</sup> meningite, encefalite, acidente vascular cerebral e outros traumas cerebrais, nefrite, retinite, dermatite atópica, psoriase, isquemia miocárdica e lesão pulmonar aguda mediada por leucócitos, como a que ocorre na síndrome de sofrimento respiratório do adulto.

Aminopirimidinas substituídas, como uma classe, foram descobertas como inibidoras de ligação de VLA-4 ao VCAM-1 e, consequentemente, exibem propriedades antiinflamatórias.<sup>29</sup> Embora esses compostos possuam propriedades antagonistas para tal ligação, a biodisponibilidade aumentada desses compostos aumentaria sua eficácia.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção fornece compostos, sais farmaceuticamente aceitáveis destes, composições destes, as sínteses destes, e métodos para o tratamento de doenças mediadas por VLA-4.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece compostos de fórmula I:



em que:

I

$R^1$  é selecionado do grupo que consiste em  $C_1$  a  $C_4$  alquil,  $C_1$  a  $C_4$  haloalquil, heteroaril e  $N(R^5)(R^6)$ , em que  $R^5$  e  $R^6$  são selecionados independentemente do grupo que

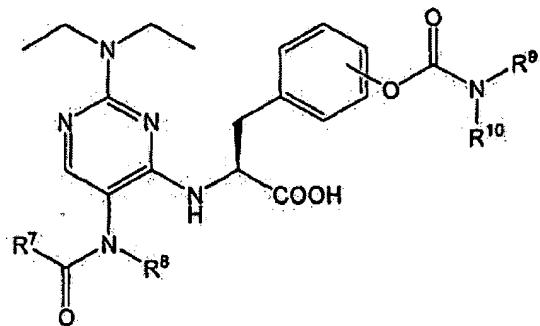
consiste em hidrogênio, C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil, ou R<sup>5</sup> e R<sup>6</sup>, juntos com o nitrogênio a eles pendente, se unem para formar um anel heterocíclico;

R<sup>2</sup> é selecionado do grupo que consiste em C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> 5 alquil, C<sub>2</sub> a C<sub>4</sub> alquenil e C<sub>2</sub> a C<sub>4</sub> alquinil; e

R<sup>3</sup> e R<sup>4</sup> são independentemente C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> alquil, ou R<sup>3</sup> e R<sup>4</sup>, juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, se unem para formar um anel heterocíclico;

ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente 10 aceitável destes.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um composto de fórmula II:



em que:

II

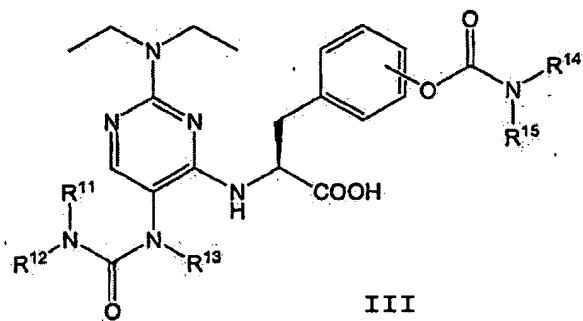
R<sup>7</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil, C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> haloalquil ou heteroaril;

R<sup>8</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil;

R<sup>9</sup> e R<sup>10</sup> são independentemente C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> alquil, ou R<sup>9</sup> e R<sup>10</sup>, juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, se unem para formar um anel heterocíclico;

ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável destes.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece 25 compostos de fórmula III:



III

em que:

$R^{11}$  e  $R^{12}$  são independentemente  $C_1$  a  $C_4$  alquil, ou  $R^{11}$  e  $R^{12}$ , juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, se unem para formar um anel heterocíclico;

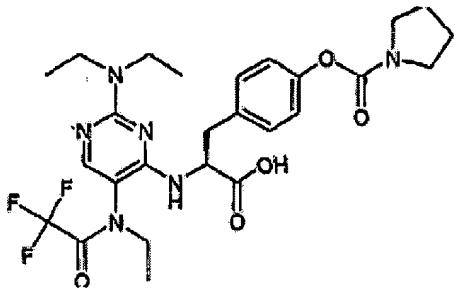
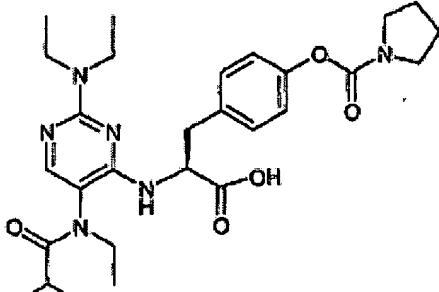
5  $R^{13}$  é  $C_1$  a  $C_4$  alquil; e

$R^{14}$  e  $R^{15}$  são independentemente  $C_1$  a  $C_3$  alquil, ou  $R^{14}$  e  $R^{15}$ , juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, se unem para formar um anel heterocíclico;

ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente 10 aceitável destes.

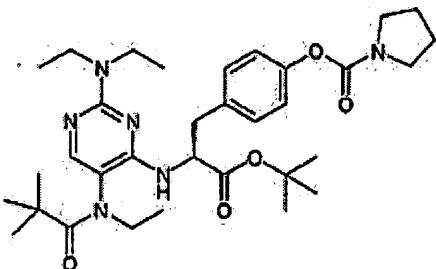
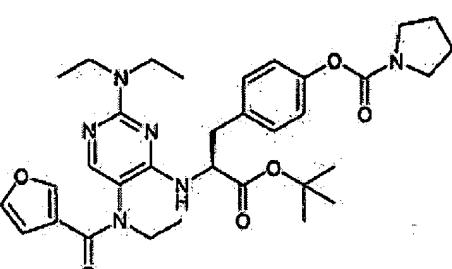
A presente invenção também fornece os compostos na Tabela 4.

**Tabela 4**

	Estrutura	Nome
1		<p>N- [2-diethylamino-5-{N- etil-N- (trifluoracetyl)amino} pirimidin-4-il]-L-4'- {(pirrolidin-1- il)carboniloxi} fenilalanina</p>
2		<p>N- [2-diethylamino-5-{N- etil-N- (iso- propilcarbonil)amino} pirimidin-4-il]-L-4'- {(pirrolidin- 1-il)carboniloxi} fenilalanina</p>

3		N- [2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(t-butilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina
4		N- [2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(furan-2-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina
5		N- [2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(piperidin-1-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina
6		N- [2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(N-ethyl-N-isopropilaminocarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina
7		N- [2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(tien-3-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina

		carbonilóxi}fenilalanina
8		N-[2-dietilamino-5-{N-ethyl-N-(tien-2-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina
9		N-[2-dietilamino-5-{N-ethyl-N-(furan-3-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina
10		N-[2-dietilamino-5-{N-ethyl-N-(3-tiapiroloolidin-1-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina
11		Éster t-butílico de N-[2-dietilamino-5-{N-ethyl-N-(tien-2-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}-fenilalanina
12		Éster t-butílico de N-[2-dietilamino-5-{N-ethyl-N-(trifluormetilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}-fenilalanina

		carbonilóxi}-fenilalanina
13		Éster <i>t</i> -butílico de N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-( <i>t</i> -butilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}-fenilalanina
14		Éster <i>t</i> -butílico de N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(furan-3-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}-fenilalanina

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Como citado anteriormente, esta invenção está relacionada a compostos que inibem a adesão leucocitária e, em particular, a adesão leucocitária mediada, pelo menos em parte, por integrinas  $\alpha 4$ , preferivelmente VLA-4. No entanto, antes de descrever esta invenção com mais detalhes, inicialmente serão definidos os seguintes termos.

#### **Definições**

A menos que especificado de forma diferente, os seguintes termos usados na especificação e nas reivindicações possuem os significados apresentados abaixo:

Como aqui usado, e a menos que definido de forma diferente, "alquil" refere-se a grupos alquil lineares, ramificados e cílicos que preferivelmente possuem de 1 a 4 átomos de carbono e, mais preferivelmente, 1 a 3 átomos de carbono. Esse termo é exemplificado por grupos como metil, etil, *n*-propil, *iso*-propil, *n*-butil, *iso*-butil, *sec*-butil,

*t*-butil, ciclopropil, ciclobutil e metileno-ciclopropil.

"Alquenil" refere-se a um grupo alquenil linear e ramificado que possui de 2 a 4 átomos de carbono e, preferivelmente, 2 a 3 átomos de carbono, e que possui pelo menos 1 e, preferivelmente, 1 sítio de insaturação de alquenil. Exemplos de tais grupos alquenil incluem vinil (-CH=CH<sub>2</sub>), alil (-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), *n*-propen-1-il (-CH=CHCH<sub>3</sub>), *n*-buten-2-il (CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>3</sub>), e semelhantes. Estão incluídos dentro desse termo os isômeros *cis* e *trans* ou misturas desses isômeros.

"Alquinil" refere-se a um grupo alquinil linear e ramificado que possui de 2 a 4 átomos de carbono e, preferivelmente, 2 a 3 átomos de carbono, e que possui pelo menos 1 e, preferivelmente, 1 sítio de insaturação de alquinil. Exemplos desses grupos alquinil incluem acetilenil (C=CH), propargil (-CH<sub>2</sub>C-CH), *n*-propin-1-il (-CH-CHCH<sub>3</sub>), e semelhantes.

"Aril" ou "Ar" refere-se a um grupo carbocíclico aromático monovalente de 6 a 14 átomos de carbono, que possui um anel único (por exemplo, fenil) ou múltiplos anéis condensados (por exemplo, naftil ou antril), cujos anéis condensados podem ser ou não aromáticos (por exemplo, 2-benzoxazolinona, 2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona-7-il, e semelhantes), desde que o ponto de adesão esteja em um átomo de carbono aromático. Aris preferidos incluem fenil e naftil.

"Aril substituído" refere-se a grupos aril que são substituídos com de 1 a 3 substituintes e, preferivelmente, 1 a 2 substituintes, selecionados do grupo que consiste em hidroxil, acil, acilamino, acilóxi, alquil, alquil

substituído, alcóxi, alcóxi substituído, alquenil, alquenil substituído, alquinil, alquinil substituído, amino, amino substituído, aminoacil, aril, aril substituído, arilóxi, arilóxi substituído, carboxil, ésteres carboxílicos, ciano, 5 tiol, tioalquil, tioalquil substituído, tioaril, tioaril substituído, tioheteroaril, tioheteroaril substituído, tiocicloalquil, tiocicloalquil substituído, tioheterocíclico, tioheterocíclico substituído, cicloalquil, cicloalquil substituído, halo, nitro, 10 heteroaril, heteroaril substituído, heterocíclico, heterocíclico substituído, heteroariloxi, heteroariloxi substituído, heterocicliloxi, heterocicliloxi substituído, amino sulfonil ( $\text{NH}_2\text{-SO}_2^-$ ), e amino sulfonil substituído.

"Halo" ou "halogênio" refere-se a flúor, cloro, bromo 15 e iodo e, preferivelmente, é flúor ou cloro.

"Haloalquil" refere-se aos grupos alquil que possuem de 1 a 5 grupos halo. De preferência, esses grupos possuem de 1 a 3 grupos halo e 1 a 2 átomos de carbono. Grupos haloalquil particularmente preferidos incluem trihalometil 20 (por exemplo, trifluormetil) e trihaloetil (por exemplo, 2,2,2-trifluoret-1-il).

"Heteroaril" refere-se a um grupo carbocíclico aromático de 2 a 10 átomos de carbono e 1 a 4 heteroátomos selecionados de oxigênio, nitrogênio e enxofre dentro do 25 anel. Esses grupos heteroaril podem ter um anel único (por exemplo, piridil ou furil) ou múltiplos anéis condensados, em que o anel condensado pode ser aril ou heteroaril. Exemplos desses heteroarils incluem, por exemplo, furan-2-il, furan-3-il, tien-2-il, tien-3-il, pirrol-2-il, pirrol-30 3-il, piridil (2-, 3- e 4-piridilis), e semelhantes. Em uma

modalidade, os átomos de enxofre e/ou nitrogênio do heteroaril são opcionalmente oxidados (ou seja, -S(O)- ou -S(O)<sub>2</sub>- e/ou N-óxidos).

5 "Heterociclo" ou "heterocíclico" refere-se a um grupo não-heteroaromático saturado ou insaturado que possui um anel único ou múltiplos anéis condensados, de 1 a 10 átomos de carbono e de 1 a 4 heteroátomos selecionados de nitrogênio, enxofre ou oxigênio dentro do anel, em que, em sistemas de anéis fundidos, um ou mais dos anéis podem ser 10 aril ou heteroaril. Em uma modalidade, os átomos de enxofre e/ou nitrogênio do heterociclo são opcionalmente oxidados (ou seja, -S(O)- ou -S(O)<sub>2</sub>- e/ou N-óxidos).

15 "Veículo farmaceuticamente aceitável" significa um veículo que é útil na preparação de uma composição farmacêutica que seja geralmente segura, atóxica e não seja biologicamente ou de algum outro modo indesejável, e inclui um veículo que seja aceitável para uso veterinário, bem como para uso farmacêutico humano. Um "veículo farmaceuticamente aceitável", como usado na especificação e 20 nas reivindicações, inclui um ou mais desses veículos.

25 "Pró-fármaco" refere-se a qualquer derivado farmaceuticamente aceitável de um composto desta invenção que seja capaz, direta ou indiretamente, de fornecer um composto desta invenção ou um metabólito ativo, ou resíduo deste, quando administrado a um indivíduo. Derivados e pró-fármacos particularmente preferidos são aqueles que aumentam a biodisponibilidade dos compostos desta invenção quando esses compostos são administrados a um indivíduo (por exemplo, permitindo que um composto administrado 30 oralmente seja mais facilmente absorvido na corrente

sangüínea) ou que aumente a liberação do composto original a um compartimento biológico (por exemplo, o cérebro ou o sistema linfático) em relação à espécie original. Pró-fármacos incluem as formas de éster dos compostos da invenção. Exemplos de pró-fármacos de éster incluem derivados de formato, acetato, propionato, butirato, acrilato e etilsuccinato. Uma visão geral de pró-fármacos é fornecida em T. Higuchi e V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14 da "A.C.S. Symposium Series", e em Edward B. Roche, ed., "Bioreversible Carriers in Drug Design", "American Pharmaceutical Association and Pergamon Press", 1987, ambos aqui incorporados por referência.

"Sal farmaceuticamente aceitável" refere-se aos sais que retêm a eficácia e as propriedades biológicas dos compostos desta invenção, e que não são biologicamente ou de algum outro modo indesejáveis. Em muitos casos, os compostos desta invenção são capazes de formar sais de ácidos e/ou de bases em virtude da presença de grupos amino e/ou carboxil ou grupos similares a esses.

Sais de adição de bases farmaceuticamente aceitáveis podem ser preparados a partir de bases inorgânicas e orgânicas. Sais derivados de bases inorgânicas incluem, apenas como exemplo, sais de sódio, potássio, lítio, amônio, cálcio e magnésio. Sais derivados de bases orgânicas incluem, sem limitação, sais de aminas primárias, secundárias e terciárias, tais como alquil aminas, dialquil aminas, trialquil aminas, alquil aminas substituídas, di(alquil substituído) aminas, tri(alquil substituído) aminas, alquenil aminas, dialquenil aminas, trialquenil aminas, alquenil aminas substituídas, di(alquenil

substituído) aminas, tri(alquenil substituído) aminas, cicloalquil aminas, di(cicloalquil) aminas, tri(cicloalquil) aminas, cicloalquil aminas substituídas, cicloalquil aminas dissustituídas, cicloalquil aminas 5 trissubstituídas, cicloalquenil aminas, di(cicloalquenil) aminas, tri(cicloalquenil) aminas, cicloalquenil aminas substituídas, cicloalquenil aminas dissustituídas, cicloalquenil aminas trissubstituídas, aril aminas, diaril aminas, triaril aminas, heteroaril aminas, diheteroaril 10 aminas, triheteroaril aminas, aminas heterocíclicas, aminas diheterocíclicas, aminas triheterocíclicas, di- e tri- aminas mistas nas quais pelo menos dois dos substituintes na amina são diferentes, e são selecionados do grupo que 15 consiste em alquil, alquil substituído, alquenil, alquenil substituído, cicloalquil, cicloalquil substituído, cicloalquenil, cicloalquenil substituído, aril, heteroaril, heterocíclico, e semelhantes. Também estão incluídas aminas nas quais dois ou três substituintes, juntos com o 20 nitrogênio de amino, formam um grupo heterocíclico ou heteroaril.

Exemplos de aminas adequadas incluem, apenas como exemplo, isopropilamina, trimetil amina, dietil amina, tri(iso-propil) amina, tri(n-propil) amina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, trometamina, lisina, arginina, 25 histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilenodiamina, glicosamina, N-alquilglucaminas, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, morfolino, N-etilpiperidina, e semelhantes. Deve-se entender também que outros derivados do ácido carboxílico seriam úteis na 30 prática desta invenção, por exemplo, amidas de ácido

carboxílico, incluindo carboxamidas, carboxamidas de alquil inferior, dialquil carboxamidas, e semelhantes.

Sais de adição de ácidos farmaceuticamente aceitáveis podem ser preparados a partir de ácidos inorgânicos e orgânicos. Sais derivados de ácidos inorgânicos incluem ácido clorídrico, ácido hidrobrômico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, e semelhantes. Sais derivados de ácidos orgânicos incluem ácido acético, ácido propiônico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malônico, ácido succínico, ácido maléico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzólico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido p-tolueno-sulfônico, ácido salicílico, e semelhantes.

O termo "cátion farmaceuticamente aceitável" refere-se ao cátion de um sal farmaceuticamente aceitável.

Entende-se que, em todos os grupos substituídos aqui definidos, polímeros produzidos pela definição de substituintes com substituintes adicionais para eles próprios (por exemplo, aril substituído que possui um grupo aril substituído como substituinte, o qual, ele próprio, é substituído com um grupo aril substituído etc.) não são aqui incluídos. Nesses casos, o número máximo desses substituintes é de três. Isso equivale a dizer que cada uma das definições acima é restrita por uma limitação de que, por exemplo, grupos aril substituídos se limitam a -aril substituído-(aril substituído)-(aril substituído).

"Tratar" ou "tratamento" de uma doença inclui:

(1) a prevenção da doença, ou seja, fazer com que os sintomas clínicos da doença não se desenvolvam em um

mamífero que pode estar exposto ou predisposto à doença, mas que ainda não apresenta ou exibe os sintomas da doença,

(2) a inibição da doença, ou seja, interromper ou reduzir o desenvolvimento da doença ou de seus sintomas 5 clínicos, ou

(3) o alívio da doença, ou seja, causar a regressão da doença ou de seus sintomas clínicos.

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" significa a quantidade de um composto que, quando administrada a um 10 mamífero para o tratamento de uma doença, é suficiente para efetuar tal tratamento para a doença. A "quantidade terapeuticamente eficaz" irá variar, dependendo do composto, da doença e de sua gravidade, e da idade, peso etc., do mamífero a ser tratado.

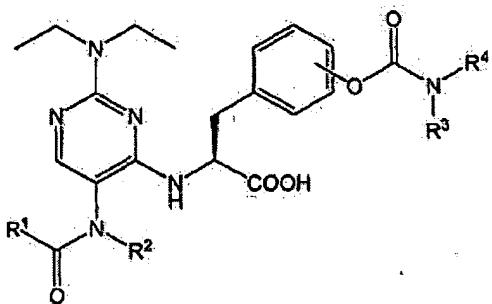
15 "Sal farmaceuticamente aceitável" refere-se aos sais farmaceuticamente aceitáveis de um composto de fórmula I cujos sais são derivados de diversos contra-íons orgânicos e inorgânicos bem conhecidos na técnica, e incluem, apenas como exemplo, sódio, potássio, cálcio, magnésio, amônio, 20 tetraalquilamônio, e semelhantes; e, quando a molécula contém uma funcionalidade básica, sais de ácidos orgânicos ou inorgânicos, tais como cloridrato, hidrobrometo, tartarato, mesilato, acetato, maleato, oxalato e semelhantes.

25 As integrinas são uma grande família de proteínas homólogas de ligação transmembrana que são os receptores principais em células animais para ligação da maioria das proteínas da matriz extracelular como, por exemplo, colágeno, fibronectina e laminina. As integrinas são 30 heterodímeros compostos por uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$ .

Até hoje, vinte heterodímeros de integrina diferentes, feitos de 9 subunidades  $\alpha$  diferentes e 14 subunidades  $\beta$  diferentes, foram identificados. O termo "integrinas  $\alpha 4$ " refere-se à classe de receptores da superfície celular de heterodímeros, ligados à enzima, que contêm a subunidade  $\alpha 4$  pareada com qualquer uma das subunidades  $\beta$ . VLA-4 é um exemplo de uma integrina  $\alpha 4$ , e é um heterodímero das subunidades  $\alpha 4$  e  $\beta 1$ , e é também denominada integrina  $\alpha 4 \beta 1$ .

Esta invenção fornece compostos, sais farmaceuticamente aceitáveis destes, composições destes, as sínteses destes, e métodos para o tratamento de doenças mediadas por VLA-4.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece compostos de fórmula I:



em que:

I

$R^1$  é selecionado do grupo que consiste em  $C_1$  a  $C_4$  alquil,  $C_1$  a  $C_4$  haloalquil, heteroaril e  $-N(R^5)(R^6)$ , em que  $R^5$  e  $R^6$  são selecionados independentemente do grupo que consiste em hidrogênio,  $C_1$  a  $C_4$  alquil, ou  $R^5$  e  $R^6$ , juntos com o nitrogênio a eles pendente, se unem para formar um anel heterocíclico;

$R^2$  é selecionado do grupo que consiste em  $C_1$  a  $C_4$  alquil,  $C_2$  a  $C_4$  alquenil, e  $C_2$  a  $C_4$  alquinil; e

$R^3$  e  $R^4$  são independentemente  $C_1$  a  $C_3$  alquil, ou  $R^3$ ,  $R^4$ , juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, se unem

para formar um anel heterocíclico;

ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável destes.

Em algumas modalidades, o grupo  $-\text{OC(O)NR}^3\text{R}^4$  está na 5 posição para do anel fenila.

Em algumas modalidades,  $\text{R}^3$  e  $\text{R}^4$  são unidos para formar um anel heterocíclico. Em outras modalidades,  $\text{R}^3$  e  $\text{R}^4$  são unidos para formar um anel pirrolidinil.

Em algumas modalidades,  $\text{R}^2$  é  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_4$  alquil. Em outras 10 modalidades,  $\text{R}^2$  é etil.

Ainda em outras modalidades,  $\text{R}^3$  e  $\text{R}^4$  são unidos para formar um anel heterocíclico, e  $\text{R}^2$  é  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_4$  alquil. Ainda em outras modalidades,  $\text{R}^3$  e  $\text{R}^4$  são unidos para formar um anel pirrolidinil, e  $\text{R}^2$  é etil.

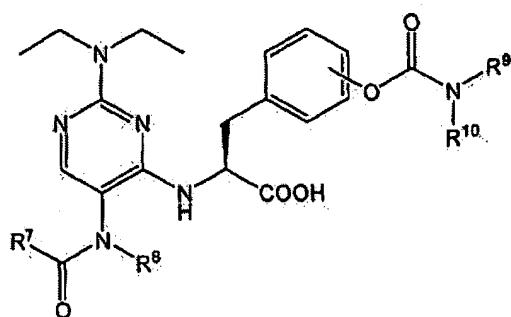
15 Exemplos de compostos desta invenção incluem aqueles que possuem os grupos  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$  e  $\text{R}^4$  citados na Tabela 1.

**Tabela 1**

$\text{R}^1$	$\text{R}^2$	$\text{R}^3$ $\text{R}^4$
trifluormetil	etil	$\text{R}^3$ e $\text{R}^4$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
iso-propil	etil	$\text{R}^3$ e $\text{R}^4$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
t-butil	etil	$\text{R}^3$ e $\text{R}^4$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
furan-2-il	etil	$\text{R}^3$ e $\text{R}^4$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina

piperidin-1-il.	etil	R <sup>3</sup> e R <sup>4</sup> , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
N-etil-N-iso-propilamino	etil	R <sup>3</sup> e R <sup>4</sup> , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
tien-3-il	etil	R <sup>3</sup> e R <sup>4</sup> , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
tien-2-il	etil	R <sup>3</sup> e R <sup>4</sup> , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
furan-3-il	etil	R <sup>3</sup> e R <sup>4</sup> , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
3-tiapirrolidin-1-il	etil	R <sup>3</sup> e R <sup>4</sup> , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um composto de fórmula II:



em que:

II

R<sup>7</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil, C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> haloalquil ou heteroaril;

R<sup>8</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil;

R<sup>9</sup> e R<sup>10</sup> são independentemente C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> alquil, ou R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, se unem para formar um anel heterocíclico;

ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável destes.

Em algumas modalidades, o grupo  $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^9\text{R}^{10}$  está na posição para do anel fenila.

5 Em algumas modalidades,  $\text{R}^9$  e  $\text{R}^{10}$  são unidos para formar um anel heterocíclico. Em outras modalidades,  $\text{R}^9$  e  $\text{R}^{10}$  são unidos para formar um anel pirrolidinil.

Em algumas modalidades,  $\text{R}^8$  é  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_4$  alquil. Em outras modalidades,  $\text{R}^8$  é etil.

10 Em algumas modalidades,  $\text{R}^7$  é  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_4$  alquil. Em outras modalidades,  $\text{R}^7$  é selecionado do grupo que consiste em isopropil e *t*-butil.

Em algumas modalidades,  $\text{R}^7$  é  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_4$  haloalquil. Em outras modalidades  $\text{R}^7$  é trifluormetil.

15 Em algumas modalidades,  $\text{R}^7$  é heteroaril. Em outras modalidades,  $\text{R}^7$  é selecionado do grupo que consiste em furan-2-il, furan-3-il, tien-2-il e tien-3-il.

Em algumas modalidades,  $\text{R}^9$  e  $\text{R}^{10}$  são unidos para formar um anel heterocíclico,  $\text{R}^8$  é  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_4$  alquil, e  $\text{R}^7$  é heteroaril. Em outras modalidades,  $\text{R}^9$  e  $\text{R}^{10}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina,  $\text{R}^8$  é etil, e  $\text{R}^7$  é heteroaril.

Em algumas modalidades,  $\text{R}^9$  e  $\text{R}^{10}$  são unidos para formar um anel heterocíclico,  $\text{R}^8$  é  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_4$  alquil, e  $\text{R}^7$  é alquil. Em outras modalidades,  $\text{R}^9$  e  $\text{R}^{10}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina,  $\text{R}^8$  é etil, e  $\text{R}^7$  é alquil.

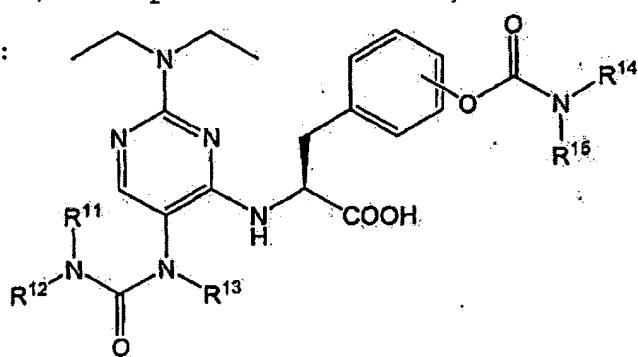
A presente invenção ainda fornece os compostos de Fórmula II que possuem os grupos  $\text{R}^7$ ,  $\text{R}^8$ ,  $\text{R}^9$  e  $\text{R}^{10}$  citados na

30 Tabela 2.

Tabela 2

$R^7$	$R^8$	$R^9$ $R^{10}$
trifluormetil	etil	$R^9$ e $R^{10}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
iso-propil	etil	$R^9$ e $R^{10}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
t-butil	etil	$R^9$ e $R^{10}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
furan-2-il	etil	$R^9$ e $R^{10}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
tien-3-il	etil	$R^9$ e $R^{10}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
tien-2-il	etil	$R^9$ e $R^{10}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina
furan-3-il	etil	$R^9$ e $R^{10}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina

Em outra modalidade, a presente invenção fornece compostos de fórmula III:



III

em que:

R<sup>11</sup> e R<sup>12</sup> são independentemente C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil, ou R<sup>11</sup> e R<sup>12</sup>, juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, se unem para formar um anel heterocíclico;

5 R<sup>13</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil; e

R<sup>14</sup> e R<sup>15</sup> são independentemente C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> alquil, ou R<sup>14</sup> e R<sup>15</sup>, juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, se unem para formar um anel heterocíclico;

ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente 10 aceitável destes.

Em algumas modalidades, o grupo -OC(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> está na posição para do anel fenila.

Em algumas modalidades, R<sup>14</sup> e R<sup>15</sup> são unidos para formar um anel heterocíclico. Em outras modalidades, R<sup>14</sup> e 15 R<sup>15</sup> são unidos para formar um anel pirrolidinil.

Em algumas modalidades, R<sup>13</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil. Em outras modalidades, R<sup>13</sup> é etil.

Em algumas modalidades, R<sup>11</sup> e R<sup>12</sup> são independentemente C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil. Em outras modalidades, R<sup>11</sup> é etil e R<sup>12</sup> é 20 isopropil.

Em algumas modalidades, R<sup>11</sup> e R<sup>12</sup>, juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, se unem para formar um anel heterocíclico. Em outras modalidades, o anel heterocíclico é selecionado do grupo que consiste em piperidin-1-il e 3-25 tiapirrolidin-1-il.

Ainda em outras modalidades, R<sup>14</sup> e R<sup>15</sup> são unidos para formar um anel heterocíclico, R<sup>13</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil, e R<sup>11</sup> e R<sup>12</sup>, juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, se unem para formar um anel heterocíclico.

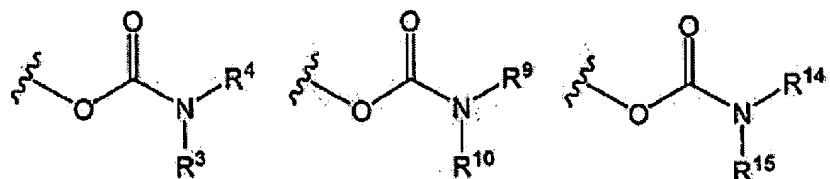
30 A presente invenção ainda fornece compostos de fórmula

III que possuem os grupos  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$  e  $R^{15}$  citados na Tabela 3.

Tabela 3

$R^{11}$	$R^{12}$	$R^{13}$	$R^{14}$	$R^{15}$
$R^{11}$ e $R^{12}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel piperidina		etil	$R^{14}$ e $R^{15}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina	
iso-propil	etil	etil	$R^{14}$ e $R^{15}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina	
$R^{11}$ e $R^{12}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel 3- tiapirrolidina		etil	$R^{14}$ e $R^{15}$ , juntos com o nitrogênio pendente, formam um anel pirrolidina	

Em algumas modalidades, a presente invenção fornece compostos de fórmula I, II e III que possuem substituintes carbamil:



em suas respectivas fórmulas anexados ao anel fenila na posição para. Ainda em outras modalidades, os compostos nas Tabelas 1, 2, e 3 possuem os substituintes carbamil anexados na posição para.

Em algumas modalidades, a presente invenção também fornece compostos de fórmula I, II e III, incluindo aqueles nas Tabelas 1, 2 e 3, que possuem os substituintes carbamil anexados nas posições orto ou meta.

A presente invenção também fornece os compostos na

Tabela 4.

Tabela 4

	Estrutura	Nome
1		N- [2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(trifluoracetyl)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carboniloxi]fenilalanina
2		N- [2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(isopropylcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carboniloxi]fenilalanina
3		N- [2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(t-butilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carboniloxi]fenilalanina
4		N- [2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(furan-2-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carboniloxi]fenilalanina
5		N- [2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(piperidin-1-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carboniloxi]fenilalanina

6		N-[2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(3-phenylpropyl)aminocarbonil}amino]pirimidin-4-il-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi]fenilalanina
7		N-[2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(3-phenylpropyl)aminocarbonil}amino]pirimidin-4-il-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi]fenilalanina
8		N-[2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(3-phenylpropyl)aminocarbonil}amino]pirimidin-4-il-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi]fenilalanina
9		N-[2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(3-phenylpropyl)aminocarbonil}amino]pirimidin-4-il-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi]fenilalanina
10		N-[2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(3-phenylpropyl)aminocarbonil}amino]pirimidin-4-il-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi]fenilalanina
11		Éster t-butílico de N-[2-diethylamino-5-{N-ethyl-N-(3-phenylpropyl)aminocarbonil}amino]pirimidin-4-il-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi]fenilalanina

		{(pirrolidin-1-il) carbonilóxi}-fenilalanina
12		Éster <i>t</i> -butílico de N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(trifluormetilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}-fenilalanina
13		Éster <i>t</i> -butílico de N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-( <i>t</i> -butilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}-fenilalanina
14		Éster <i>t</i> -butílico N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(furan-3-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}-fenilalanina

Em outro aspecto, esta invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem um veículo farmaceuticamente aceitável e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais dos compostos aqui definidos.

5 Em um dos aspectos do seu método, esta invenção é dirigida a um método para o tratamento de uma doença mediada, pelo menos em parte, pela integrina  $\alpha 4$ , preferivelmente VLA-4, em um paciente, cujo método compreende a administração de uma composição farmacêutica  
10 que compreende um veículo farmaceuticamente aceitável e uma

quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais dos compostos desta invenção. Em outro aspecto, esta invenção é dirigida ao uso de uma composição farmacêutica que compreende um composto desta invenção para a fabricação de 5 um medicamento para o tratamento de uma doença mediada por integrina  $\alpha 4$ .

Os compostos e as composições farmacêuticas desta invenção são úteis para o tratamento de condições de doença mediadas, pelo menos em parte, pelas integrinas  $\alpha 4$ , em que 10 a integrina  $\alpha 4$  é, de preferência, VLA-4 ou de adesão leucocitária. Essas condições de doença incluem, por exemplo, asma, doença de Alzheimer, aterosclerose, demência por AIDS, diabetes (incluindo diabetes agudo de surgimento juvenil), doença inflamatória do intestino (incluindo 15 colite ulcerativa e doença de Crohn), esclerose múltipla, artrite reumatóide, transplante de tecidos, metástase tumoral, meningite, encefalite, acidente vascular cerebral e outros traumas cerebrais, nefrite, retinite, dermatite atópica, psoriase, isquemia miocárdica e lesão pulmonar 20 aguda mediada por leucócitos como, por exemplo, a que ocorre na síndrome de sofrimento respiratório do adulto.

Outras condições de doença incluem, sem limitação, condições inflamatórias como, por exemplo, eritema nodoso, conjuntivite alérgica, neurite óptica, uveíte, rinite 25 alérgica, espondilite anquilosante, artrite psoriática, vasculite, síndrome de Reiter, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica progressiva, polimiosite, dermatomiosite, granulomatose de Wegner, aortite, sarcoidose, linfocitopenia, arterite temporal, pericardite, 30 miocardite, insuficiência cardíaca congestiva, poliarterite

nodosa, síndromes de hipersensibilidade, alergia, síndromes hipereosinofílicas, síndrome de Churg-Strauss, doença pulmonar obstrutiva crônica, hipersensibilidade pneumonite, hepatite crônica ativa, cistite intersticial, 5 falência endócrina autoimune, cirrose biliar primária, anemia aplásica autoimune, hepatite crônica persistente, e tireoidite.

Em uma modalidade preferida, a condição de doença mediada pela integrina  $\alpha 4$  é uma doença inflamatória.

10 Os compostos desta invenção incluem, por exemplo, os seguintes:

N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(trifluoracetil)amino} pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi} fenilalanina;

15 N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(iso-propilcarbonil)amino} pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi} fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(t-butilcarbonil)amino} pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi} fenilalanina;

20 fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(furan-2-ilcarbonil)amino} pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi} fenilalanina;

25 N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(piperidin-1-ilcarbonil)amino} pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi} fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(N-etyl-N-iso-propilaminocarbonil)amino}-pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi} fenilalanina;

30 N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(tien-3-ilcarbonil)amino}]

pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}  
 fenilalanina;  
 N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(tien-2-ilcarbonil)amino}  
 pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}  
 5 fenilalanina;  
 N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(furan-3-ilcarbonil)  
 amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}  
 fenilalanina;  
 N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(3-tiapiroolidin-1-  
 10 ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)  
 carbonilóxi}fenilalanina;  
 Éster t-butílico de N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(tien-2-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}-fenilalanina;  
 15 Éster t-butílico de N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(trifluormetilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}-fenilalanina;  
 Éster t-butílico de N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(t-  
 20 butilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}-fenilalanina; e  
 Éster t-butílico de N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(furan-3-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}-fenilalanina;  
 ou o sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente  
 25 aceitável destes.

#### Preparação do composto

Os compostos desta invenção podem ser preparados a  
 partir de materiais de partida facilmente disponíveis com o  
 uso dos seguintes métodos e procedimentos gerais. Será  
 30 observado que, quando forem fornecidas condições de

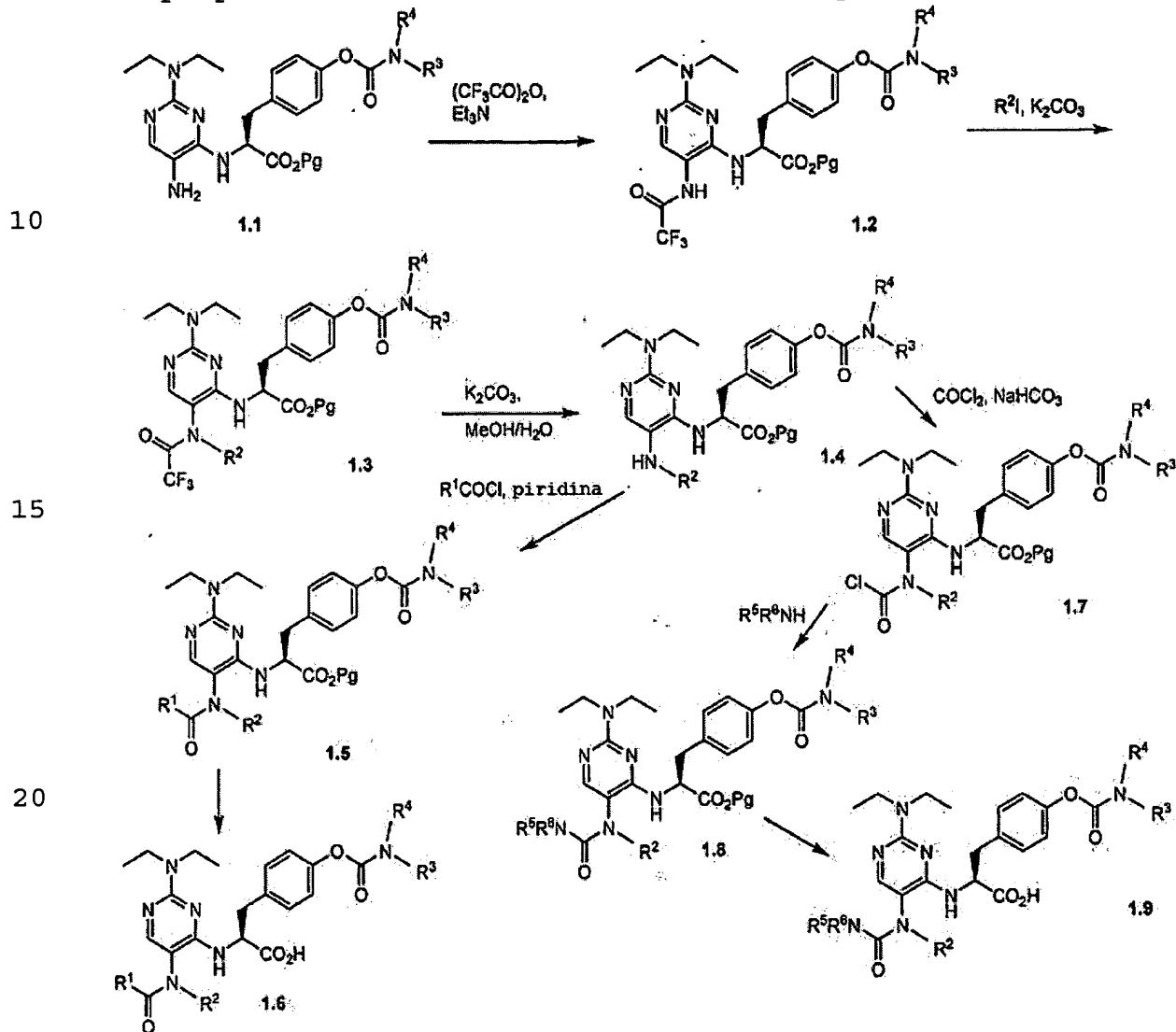
processo típicas ou preferidas (ou seja, temperaturas da reação, tempos, proporções molares de reagentes, solventes, pressões etc.), outras condições de processo também poderão ser usadas, a menos que especificado de forma diferente. As 5 condições de reação ótimas podem variar de acordo com os reagentes ou solventes específicos usados, mas essas condições podem ser determinadas por aqueles habilitados na técnica, por procedimentos de otimização de rotina.

Adicionalmente, como ficará evidente para aqueles 10 habilitados na técnica, podem ser necessários grupos protetores convencionais para evitar que certos grupos funcionais sejam submetidos a reações indesejadas. Grupos protetores adequados para vários grupos funcionais, além de condições adequadas para a proteção e desproteção de grupos 15 funcionais específicos, são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, diversos grupos protetores são descritos em T.W. Greene e G.M. Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", Segunda Edição, Wiley, Nova York, 1991, e referências nele citadas.

20 Além disso, os compostos desta invenção tipicamente conterão um ou mais centros quirais. Consequentemente, caso desejado, tais compostos podem ser preparados ou isolados como estereoisômeros puros, ou seja, como enantiômeros ou diastereoisômeros individuais, ou como misturas 25 enriquecidas em estereoisômeros. Todos esses estereoisômeros (e misturas enriquecidas) estão incluídos dentro do escopo desta invenção, a menos que indicado de forma diferente. Estereoisômeros puros (ou misturas enriquecidas) podem ser preparados, por exemplo, com o uso 30 de materiais de partida opticamente ativos ou reagentes

estéreo-seletivos bem conhecidos na técnica. Alternativamente, misturas racêmicas desses compostos podem ser separadas, por exemplo, com o uso de cromatografia de coluna quiral, agentes de resolução quiral, e semelhantes.

5 Em uma modalidade, os compostos desta invenção podem ser preparados como descrito abaixo no Esquema 1:



### 25 Esquema 1

em que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  e  $R^6$  são como definidos acima, e Pg é um grupo protetor carboxil como, por exemplo, benzil, *t*-butil, e semelhantes.

30 No Esquema 1, os intermediários de partida 5-aminopirimidina, composto 1.1, são descritos em detalhe em

WO 03/099809 e, apenas como forma de ilustração, são mostrados nesse esquema como derivados de fenilalanina 4-substituídos. Deve-se entender, evidentemente, que derivados de fenilalanina 2- e 3-substituídos seguiriam uma 5 via de reação similar.

Especificamente, no Esquema 1, pirimidina 5-amino-2-dietilamino-4-substituída, composto 1.1 (preparada a partir da 5-nitro-pirimidina correspondente por redução com Pd/C 5% ou PtO<sub>2</sub> 5% por peso) é convertida na trifluoracetamida 10 correspondente, composto 1.2, por métodos convencionais. Por exemplo, um ligeiro excesso de anidrido trifluoracético é combinado com o composto 1.1 em um diluente inerte adequado, por exemplo, tetrahidrofurano, cloreto de metíleno, piridina, e semelhantes. A reação é mantida em de 15 cerca de 0°C a cerca de 30°C, até que a reação esteja substancialmente completa, o que tipicamente ocorre em até cerca de 0,5 a 24 horas. Após o término da reação, o composto 1.2 é recuperado por métodos convencionais, incluindo neutralização, evaporação, extração, 20 precipitação, cromatografia, filtração, e semelhantes, ou, alternativamente, é empregado na etapa seguinte sem purificação e/ou isolamento.

A conversão do composto 1.2 na N(R<sup>2</sup>),N-trifluoracetamidopirimidina correspondente, 25 composto 1.3, novamente é feita através de técnicas convencionais. Por exemplo, um excesso do haleto, R<sup>2</sup>-I, é combinado com o composto 1.2 em um diluente inerte adequado, por exemplo, DMF, na presença de um excesso de uma base adequada, por exemplo, carbonato de potássio. Em 30 uma modalidade preferida, aproximadamente dois equivalentes

de  $R^2$ -I e carbonato de potássio são empregados. A reação é mantida sob condições ambientes em um recipiente lacrado e é continuada até que a reação esteja substancialmente completa, o que tipicamente ocorre em 20-72 horas. Após o 5 término da reação, o composto 1.3 é recuperado por métodos convencionais, incluindo neutralização, evaporação, extração, precipitação, cromatografia, filtração, e semelhantes ou, alternativamente, é empregado na etapa seguinte sem purificação e/ou isolamento.

10 O grupo protetor carboxil do composto 1.3 pode ser removido por condições convencionais para gerar um composto de Fórmula I (não mostrado). Em uma modalidade, um grupo protetor *t*-butil pode ser removido por contato com ácido fórmico. Em outra modalidade, um grupo protetor benzil pode 15 ser removido por contato com hidrogênio na presença de um catalisador de paládio/carbono, tipicamente em um solvente prótico como, por exemplo, metanol, sob pressões elevadas de hidrogênio.

Alternativamente, o grupo trifluoracetil pode ser 20 removido para gerar a amina correspondente, composto 1.4. Nessa modalidade, o grupo trifluoracetil atua como um grupo protetor amina. Como acima, essa reação convencionalmente avança, por exemplo, por contato do composto 1.3 com um excesso grande de uma base adequada, por exemplo, carbonato 25 de potássio, em uma mistura de água e um solvente prótico como, por exemplo, metanol. A reação é realizada em temperaturas elevadas como, por exemplo, 40° a 60°C, e é continuada até que a reação esteja substancialmente completa. Após o término da reação, o composto 1.4 é 30 recuperado por métodos convencionais, incluindo

neutralização, evaporação, extração, precipitação, cromatografia, filtração, e semelhantes, ou, alternativamente, é empregado na etapa seguinte sem purificação e/ou isolamento.

5 No Esquema 1, o composto 1.4 pode ser usado para preparar derivados de uréia em que  $R^1 = -NR^5R^6$ , ou derivados de acilamino em que  $R^1$  é  $C_1$  a  $C_4$  alquil,  $C_1$  a  $C_4$  haloalquil ou heteroaril ligados ao grupo carbonil por outro meio que não através de um átomo de nitrogênio. Na primeira  
10 modalidade, os derivados de uréia são preparados por métodos convencionais como, por exemplo, preparando-se inicialmente o cloreto de amido, composto 1.7. Esse composto é preparado por contato do composto 1.4 com um excesso de fosgênio na presença de uma base adequada, por  
15 exemplo, carbonato de potássio, bicarbonato de potássio, carbonato de sódio, e semelhantes. Após o término da reação, o composto 1.7 pode ser recuperado por métodos convencionais, incluindo neutralização, evaporação, extração, precipitação, cromatografia, filtração, e  
20 semelhantes, mas, preferivelmente, é empregado na etapa seguinte sem purificação e/ou isolamento.

O cloreto de amido, composto 1.7, é então convertido no derivado de uréia correspondente, composto 1.8, por reação com uma amina adequada,  $R^5R^6NH$ , sob condições  
25 convencionais. De preferência, a reação com uma quantidade eqüimolar ou excesso da amina é colocada em contato com o composto 1.7 em um solvente adequado como, por exemplo, tetrahidrofurano, dioxano, clorofórmio, e semelhantes. Após o término da reação, o composto 1.8 pode ser recuperado por  
30 métodos convencionais, incluindo neutralização, evaporação,

extração, precipitação, cromatografia, filtração, e semelhantes, ou, alternativamente, é empregado na etapa seguinte sem purificação e/ou isolamento.

O grupo protetor carboxil do composto 1.8 pode ser 5 removido por condições convencionais para gerar o composto 1.9, um composto de Fórmula I. Em uma modalidade, um grupo protetor *t*-butil pode ser removido por contato com ácido fórmico. Em outra modalidade, um grupo protetor benzil pode ser removido por contato com hidrogênio na presença de um 10 catalisador de paládio/carbono, tipicamente em um solvente prótico como, por exemplo, metanol, sob pressões elevadas de hidrogênio. Após o término da reação, o composto 1.9 pode ser recuperado por métodos convencionais, incluindo 15 neutralização, evaporação, extração, precipitação, cromatografia, filtração, e semelhantes.

Na segunda modalidade, derivados de acilamino, composto 1.5, são preparados por contato do composto 1.4 com um ligeiro excesso de um haleto de acila na presença de uma base adequada, por exemplo, trietilamina, 20 diisopropiletilamina, e semelhantes, a fim de remover o ácido gerado. A reação é realizada, de preferência, em um solvente inerte adequado como, por exemplo, tetrahidrofurano, dioxano, clorofórmio, e semelhantes. A reação é realizada, de preferência, a de cerca de 0°C a 25 30°C, e é continuada até que a reação esteja substancialmente completa, o que tipicamente ocorre em 2-48 horas. Após o término da reação, o composto 1.5 pode ser recuperado por métodos convencionais, incluindo 30 neutralização, evaporação, extração, precipitação, cromatografia, filtração, e semelhantes, ou,

alternativamente, é empregado na etapa seguinte sem purificação e/ou isolamento.

O grupo protetor carboxil do composto 1.5 pode ser removido por condições convencionais para gerar o composto 5 1.6, um composto de Fórmula I. Em uma modalidade, um grupo protetor *t*-butil pode ser removido por contato com ácido fórmico. Em outra modalidade, um grupo protetor benzil pode ser removido por contato com hidrogênio na presença de um catalisador de paládio/carbono, tipicamente em um solvente 10 prótico como, por exemplo, metanol, sob pressões elevadas de hidrogênio. Após o término da reação, o composto 1.6 pode ser recuperado por métodos convencionais, incluindo neutralização, evaporação, extração, precipitação, cromatografia, filtração, e semelhantes.

## 15 Formulações farmacêuticas

Quando empregados como substâncias farmacêuticas, os compostos desta invenção são normalmente administrados na forma de composições farmacêuticas. Esses compostos podem ser administrados por diversas vias, incluindo a via oral, 20 retal, transdérmica, subcutânea, intravenosa, intramuscular e intranasal. Esses compostos são eficazes como composições tanto injetáveis quanto orais. Essas composições são preparadas de uma forma bem conhecida na técnica farmacêutica, e compreendem pelo menos um composto ativo.

25 Esta invenção também inclui composições farmacêuticas que contêm, como ingrediente ativo, um ou mais dos compostos de Fórmula I-III acima, associados a veículos farmaceuticamente aceitáveis. Na fabricação das composições desta invenção, o ingrediente ativo é normalmente misturado 30 com um excipiente, diluído por um excipiente, ou englobado

dentro desse veículo, que pode estar na forma de uma cápsula, sachê, papel ou outro recipiente. O excipiente empregado é tipicamente um excipiente adequado para administração a seres humanos ou a outros mamíferos. Quando 5 o excipiente serve como diluente, ele pode ser um material sólido, semi-sólido ou líquido, que atua como um veículo, transportador ou meio para o ingrediente ativo. Dessa forma, as composições podem estar na forma de comprimidos, pílulas, pós, pastilhas, sachês, sinetes, elixires, 10 suspensões, emulsões, soluções, xaropes, aerossóis (como um sólido ou em um meio líquido), pomadas contendo, por exemplo, até 10% por peso do composto ativo, cápsulas de gelatina macia e dura, supositórios, soluções injetáveis estéreis, e pós embalados estéreis.

15 Na preparação de uma formulação, pode ser necessário triturar o composto ativo para gerar o tamanho de partícula apropriado, antes da combinação com os outros ingredientes. Caso o composto ativo seja substancialmente insolúvel, ele normalmente será triturado até um tamanho de partícula de 20 menos de 200 mesh. Caso o composto ativo seja substancialmente hidrossolúvel, o tamanho de partícula será normalmente ajustado por trituração, para gerar uma distribuição substancialmente uniforme na formulação, por exemplo, cerca de 40 mesh.

25 Alguns exemplos de excipientes adequados incluem lactose, dextrose, sacarose, sorbitol, manitol, amidos, goma acácia, fosfato de cálcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de cálcio, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, celulose, água, xarope e metil 30 celulose. As formulações podem adicionalmente incluir:

agentes lubrificantes, tais como talco, estearato de magnésio e óleo mineral; agentes umidificantes; agentes emulsificantes e de suspensão; agentes conservantes, tais como metil- e propil-hidróxi-benzoatos; agentes adoçantes; 5 e agentes flavorizantes. As composições da invenção podem ser formuladas de forma a fornecer uma liberação rápida, sustentada ou retardada do ingrediente ativo após administração ao paciente pelo emprego de procedimentos conhecidos na técnica.

10 A administração de agentes terapêuticos por formulação intravenosa é bem conhecida na indústria farmacêutica. Uma formulação intravenosa deve possuir certas qualidades além de ser apenas uma composição na qual o agente terapêutico é solúvel. Por exemplo, a formulação deve promover a 15 estabilidade global do ingrediente(s) ativo(s) e, além disso, a fabricação da formulação deve ser economicamente viável. Todos esses fatores em última análise determinam o sucesso global e a utilidade de uma formulação intravenosa. Outros aditivos acessórios que podem ser incluídos em 20 formulações farmacêuticas de compostos da presente invenção são os seguintes: solventes: etanol, glicerol, propileno glicol; estabilizantes: ácido etileno diamina tetra-acético (EDTA), ácido cítrico; conservantes antimicrobianos: álcool benzílico, metil parabeno, propil parabeno; agentes de 25 tamponamento: ácido cítrico/citrato de sódio, tartarato de potássio hidrogênio, tartarato de sódio hidrogênio, ácido acético/acetato de sódio, ácido maléico/maleato de sódio, hidrogênio ftalato de sódio, ácido fosfórico/fosfato de potássio dihidrogênio, ácido fosfórico/fosfato dissódico de 30 hidrogênio; e modificadores da tonicidade: cloreto de

sódio, manitol, dextrose.

A presença de um tampão pode ser necessária para manter o pH aquoso na faixa de cerca de 4 a cerca de 8 e, mais preferivelmente, em uma faixa de cerca de 4 a cerca de 5 6. O sistema tampão é geralmente uma mistura de um ácido fraco e um sal solúvel deste, por exemplo, citrato de sódio/ácido cítrico; ou o sal de monocátion ou dicátion de um ácido dibásico, por exemplo, tartarato de potássio hidrogênio; tartarato de sódio hidrogênio, ácido fosfórico/fosfato de potássio dihidrogênio e ácido fosfórico/fosfato dissódico de hidrogênio. 10

A quantidade de sistema tampão usada depende: (1) do pH desejado; e (2) da quantidade de fármaco. Geralmente, a quantidade de tampão usada está em uma proporção molar 15 0,5:1 a 50:1 de tampão:fármaco (em que os moles de tampão são considerados como os moles combinados dos ingredientes do tampão, por exemplo, citrato de sódio e ácido cítrico) de formulação para manter um pH na faixa de 4 a 8 e, geralmente, é usada uma proporção molar de 1:1 a 10:1 de 20 tampão (combinado) para o fármaco presente.

Um tampão útil na invenção é citrato de sódio/ácido cítrico na faixa de 5 a 50 mg por ml de citrato de sódio para 1 a 15 mg por ml de ácido cítrico, suficiente para manter um pH aquoso de 4-6 da composição.

25 O agente tampão também pode estar presente para evitar a precipitação do fármaco através da formação de complexo metálico solúvel com íons metálicos dissolvidos, por exemplo, Ca, Mg, Fe, Al, Ba, que podem se desprender de recipientes de vidro ou tampas de borracha ou estar 30 presentes na água corrente comum. O agente pode atuar como

um agente competitivo de formação de complexos com o fármaco e produzir um complexo metálico solúvel, levando à presença de particulados indesejáveis.

Além disso, a presença de um agente, por exemplo, 5 cloreto de sódio, em uma quantidade de cerca de 1-8 mg/ml, para ajustar a tonicidade no mesmo valor do sangue humano, pode ser necessária para evitar o edema ou o encolhimento de eritrócitos mediante a administração da formulação intravenosa, causando efeitos colaterais indesejáveis como, 10 por exemplo, náuseas ou diarréia e, possivelmente, distúrbios sangüíneos associados. Em geral, a tonicidade da formulação combina com a do sangue humano, que é de cerca de 282 a 288 mOsm/kg e, em geral, é de 285 mOsm/kg, o que é equivalente à pressão osmótica que corresponde a uma 15 solução 0,9% de cloreto de sódio.

A formulação intravenosa pode ser administrada por injeção intravenosa direta, i.v. em bolo, ou pode ser administrada por infusão por adição a uma solução de infusão apropriada como, por exemplo, injeção de cloreto de 20 sódio 0,9% ou outra solução de infusão compatível.

As composições são formuladas preferivelmente em uma forma de dosagem unitária, cada dosagem contendo de cerca de 5 a cerca de 100 mg, mais normalmente de cerca de 10 a cerca de 30 mg do ingrediente ativo. O termo "formas de 25 dosagem unitária" refere-se às unidades fisicamente distintas adequadas às dosagens unitárias para seres humanos e outros mamíferos, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de material ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, associado a um 30 excipiente farmacêutico adequado.

O composto ativo é eficaz em uma ampla faixa de dosagens, e é geralmente administrado em uma quantidade farmaceuticamente eficaz. Subentende-se, no entanto, que a quantidade do composto realmente administrada será 5 determinada por um médico, à luz das circunstâncias relevantes, incluindo a condição a ser tratada, a via de administração escolhida, o composto específico administrado, a idade, o peso e a resposta do paciente individual, a gravidade dos sintomas do paciente, e 10 semelhantes.

Para a preparação de composições sólidas como, por exemplo, comprimidos, o ingrediente ativo principal é misturado com um excipiente farmacêutico para formar uma composição de pré-formulação sólida que contém uma mistura 15 homogênea de um composto da presente invenção. Quando se diz que essas composições de pré-formulação são homogêneas, isso significa que o ingrediente ativo está disperso igualmente por toda a composição, de forma que a composição pode ser facilmente subdividida em formas de dosagem 20 unitária igualmente eficazes, tais como comprimidos, pílulas e cápsulas. Essa pré-formulação sólida é então subdividida em formas de dosagem unitária do tipo descrito acima, contendo, por exemplo, de 0,1 a cerca de 500 mg do ingrediente ativo da presente invenção.

25 Os comprimidos ou as pílulas da presente invenção podem ser revestidos ou de algum outro modo compostos para fornecer uma forma de dosagem, gerando a vantagem da ação prolongada. Por exemplo, o comprimido ou a pílula pode compreender um componente de dosagem interno e um 30 componente de dosagem externo, esse último estando na forma

de um envelope sobre o primeiro. Os dois componentes podem ser separados por uma camada entérica que serve para resistir à desintegração no estômago, e permitir que o componente interno passe intacto para o duodeno ou que 5 tenha a sua liberação retardada. Diversos materiais podem ser usados para essas camadas ou revestimentos entéricos, tais materiais incluindo vários ácidos poliméricos e misturas de ácidos poliméricos com materiais como goma laca, álcool cetílico e acetato de celulose.

10 As formas líquidas nas quais as composições inéditas da presente invenção podem ser incorporadas para administração por via oral ou por injeção incluem soluções aquosas, adequadamente xaropes flavorizados, suspensões aquosas ou oleosas, e emulsões flavorizadas com óleos 15 comestíveis como, por exemplo, óleo de semente de algodão, óleo de gergelim, óleo de coco ou óleo de amendoim, além de elixires, e veículos farmacêuticos similares.

Composições para inalação ou insuflação incluem soluções e suspensões em solventes aquosos ou orgânicos 20 farmaceuticamente aceitáveis, ou misturas destes, e pós. As composições líquidas ou sólidas podem conter excipientes farmaceuticamente aceitáveis adequados, como descrito supra. De preferência, as composições são administradas 25 pela via respiratória oral ou nasal para efeito local ou sistêmico. As composições, preferivelmente em solventes farmaceuticamente aceitáveis, podem ser nebulizadas pelo uso de gases inertes. Soluções nebulizadas podem ser inaladas diretamente do dispositivo de nebulização, ou o dispositivo de nebulização pode ser anexado a uma tenda de 30 máscaras, ou a um respirador de pressão positiva

intermitente. De preferência, composições de solução, suspensão ou pó podem ser administradas oral ou nasalmente, por dispositivos que liberam a formulação de forma adequada.

5 Os seguintes exemplos de formulações ilustram as composições farmacêuticas da presente invenção.

**Exemplo de formulação 1**

São preparadas cápsulas de gelatina dura contendo os seguintes ingredientes:

10	<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade (mg/cápsula)</u>
	Ingrediente ativo	30,0
	Amido	305,0
	Estearato de magnésio	5,0

Os ingredientes acima são misturados e preenchidos em 15 cápsulas de gelatina dura em quantidades de 340 mg.

**Exemplo de formulação 2**

Uma fórmula de comprimido é preparada com o uso dos ingredientes abaixo:

Quantidade (mg/comprimido)

20	Ingrediente ativo	25,0
	Celulose, microcristalina	200,0
	Dióxido de silício coloidal	10,0
	Ácido esteárico	5,0

Os componentes são misturados e compactados para 25 formar comprimidos, cada um pesando 240 mg.

**Exemplo de formulação 3**

É preparada uma formulação de inalador de pó seco contendo os seguintes componentes:

Ingrediente Peso %

30	Ingrediente ativo	5
----	-------------------	---

Lactose	95
---------	----

O ingrediente ativo é misturado com a lactose, e a mistura é adicionada a um aparelho de inalação de pó seco.

**Exemplo de formulação 4**

5 Comprimidos, cada um contendo 30 mg de ingrediente ativo, são preparados da seguinte forma:

Quantidade (mg/comprimido)

Ingrediente ativo	30,0 mg
-------------------	---------

Amido	45,0 mg
-------	---------

10 Celulose microcristalina	35,0 mg
-----------------------------	---------

Polivinilpirrolidona	4,0 mg
----------------------	--------

(como solução 10% em água estéril)

Amido de carboximetil sódico	4,5 mg
------------------------------	--------

Estearato de magnésio	0,5 mg
-----------------------	--------

15 Talco	1,0 mg
----------	--------

O ingrediente ativo, o amido e a celulose são passados através de uma peneira U.S. de trama N° 20 e misturados cuidadosamente. A solução de polivinilpirrolidona é misturada com os resultantes, que são então passados através de uma peneira U.S. de trama 16. Os grânulos assim produzidos são secos a 50°C a 60°C, e passados através de uma peneira U.S. de trama 16. O amido de carboximetil sódico, o estearato de magnésio e o talco, passados previamente através de uma peneira U.S. de trama N° 30, são então adicionados aos grânulos, os quais, após mistura, são compactados em uma máquina de comprimidos para gerar comprimidos, cada um pesando 120 mg.

**Exemplo de formulação 5**

30 Cápsulas, cada uma contendo 40 mg de medicamento, são feitas da seguinte forma:

<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade (mg/cápsula)</u>
Ingrediente ativo	40,0 mg
Amido	109,0 mg
Estearato de magnésio	1,0 mg
5 Total	150,0 mg

O ingrediente ativo, o amido e o estearato de magnésio são misturados, passados através de uma peneira U.S. de trama N° 20, e preenchidos em cápsulas de gelatina dura em quantidades de 150 mg.

#### 10 Exemplo de formulação 6

Supositórios, cada um contendo 25 mg de ingrediente ativo, são feitos da seguinte forma:

<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade</u>
Ingrediente ativo	25 mg
15 Glicerídeos de ácido graxo	
saturado até	2.000 mg

O ingrediente ativo é passado através de uma peneira de trama N° 60 e suspenso nos glicerídeos de ácido graxo saturado previamente derretidos com o uso do mínimo de calor necessário. A mistura é então despejada em um molde de supositório de capacidade nominal de 2,0 g, e permite-se que resfrie.

#### Exemplo de formulação 7

Suspensões, cada uma contendo 50 mg de medicamento por dose de 5,0 ml, são feitas da seguinte forma:

<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade</u>
Ingrediente ativo	50,0 mg
Goma xantana	4,0 mg
Carboximetil celulose sódica (11%)	
30 Celulose microcristalina (89%)	50,0 mg

Sacarose	1,75 g
Benzoato de sódio	10,0 mg
Flavorizante e corante	q.v.
Água purificada até	5,0 ml

5 O ingrediente ativo, a sacarose e a goma xantana são misturados, passados através de uma peneira U.S. de trama N° 10, e depois misturados com uma solução feita previamente da celulose microcristalina e da carboximetil celulose sódica em água. O benzoato de sódio, o 10 flavorizante e o corante são diluídos com um pouco da água e adicionados com agitação. É então adicionada água suficiente para a produção do volume necessário.

**Exemplo de formulação 8**

<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade (mg/cápsula)</u>
Ingrediente ativo	15,0 mg
Amido	407,0 mg
Estearato de magnésio	3,0 mg
Total	425,0 mg

20 O ingrediente ativo, o amido e o estearato de magnésio são misturados, passados através de uma peneira U.S. de trama N° 20, e preenchidos em cápsulas de gelatina dura em quantidades de 425,0 mg.

**Exemplo de formulação 9**

Uma formulação subcutânea pode ser preparada da 25 seguinte forma:

<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade</u>
Ingrediente ativo	5,0 mg
Óleo de milho	1,0 ml

**Exemplo de formulação 10**

30 Uma formulação tópica pode ser preparada da seguinte

forma:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade</u>
	Ingrediente ativo	1-10 g
	Cera emulsificante	30 g
5	Parafina líquida	20 g
	Parafina macia branca	até 100 g

A parafina macia branca é aquecida até derreter. A parafina líquida e a cera emulsificante são incorporadas e agitadas até dissolvidas. O ingrediente ativo é adicionado, 10 e a agitação é continuada até a dispersão. A mistura é então resfriada até ficar sólida.

#### **Exemplo de formulação 11**

Uma formulação intravenosa pode ser preparada da seguinte forma:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade</u>
15	Ingrediente ativo	250 mg
	Soro fisiológico isotônico	1.000 ml

Outra formulação preferida empregada nos métodos da presente invenção emprega dispositivos de liberação transdérmica ("emplastros"). Esses emplastros transdérmicos podem ser usados para fornecer infusão contínua ou descontínua dos compostos da presente invenção em quantidades controladas. A construção e o uso de emplastros transdérmicos para a liberação de agentes farmacêuticos são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, a Patente U.S. 5.023.252, emitida em 11 de junho de 1991, aqui incorporada por referência. Esses emplastros podem ser construídos para liberação contínua, pulsátil ou sob demanda de agentes farmacêuticos.

30 Freqüentemente, será desejável ou necessário

introduzir a composição farmacêutica no cérebro, direta ou indiretamente. As técnicas diretas normalmente evolvem a colocação de um cateter de liberação de fármaco no sistema ventricular do hospedeiro para ultrapassar a barreira hematencefálica. Um desses sistemas de liberação implantáveis usado para o transporte de fatores biológicos para regiões anatômicas do corpo específicas é descrito na Patente U.S. 5.011.472, que é aqui incorporada por referência.

Técnicas indiretas, que são geralmente preferidas, normalmente envolvem a formulação das composições para gerar uma latência do fármaco pela conversão de fármacos hidrofílicos em fármacos lipossolúveis. Essa latência é geralmente obtida através do bloqueio dos grupos hidroxil, carbonil, sulfato e amina primária presente no fármaco para torná-los mais lipossolúveis e passíveis de transporte através da barreira hematencefálica. Alternativamente, a liberação de fármacos hidrofílicos pode ser aumentada por infusão intra-arterial de soluções hipertônicas que podem abrir transitoriamente a barreira hematencefálica.

Outras formulações adequadas para uso na presente invenção podem ser encontradas em "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17<sup>a</sup> ed. (1985).

Como observado acima, os compostos aqui descritos são adequados para uso em diversos sistemas de liberação de fármacos descritos acima. Adicionalmente, a fim de aumentar a meia-vida sérica *in vivo* do composto administrado, os compostos podem ser encapsulados, introduzidos no lúmen de lipossomos, preparados como um colóide, ou podem ser

empregadas outras técnicas convencionais que fornecem um aumento da meia-vida sérica dos compostos. Vários métodos são disponíveis para a preparação de lipossomos, como descrito, por exemplo, em Szoka, e cols., Patentes U.S. N°s 5 4.235.871, 4.501.728 e 4.837.028, cada uma delas aqui incorporada por referência.

Os conjugados desta invenção são antagonistas de VLA-4 e são contemplados por fornecerem aumento da retenção *in vivo*, quando comparados com os compostos não conjugados. 10 Esse aumento da retenção do conjugado dentro do corpo resultaria na redução das dosagens do fármaco necessárias, o que, por sua vez, resultaria em menos efeitos colaterais e probabilidade reduzida de toxicidade. Além disso, a formulação do fármaco pode ser administrada menos 15 freqüentemente ao paciente, embora obtendo um efeito terapêutico similar ou aprimorado.

Prevê-se que os conjugados desta invenção exibam inibição, *in vivo*, da adesão de leucócitos às células endoteliais mediada por VLA-4 por ligação competitiva à 20 VLA-4. De preferência, os compostos desta invenção podem ser usados em formulações intravenosas para o tratamento de doenças mediadas por VLA-4 ou por adesão leucocitária. Essas doenças incluem doenças inflamatórias em pacientes 25 mamíferos como, por exemplo, asma, doença de Alzheimer, aterosclerose, demência por AIDS, diabetes (incluindo diabetes agudo de surgimento juvenil), doença inflamatória do intestino (incluindo colite ulcerativa e doença de Crohn), esclerose múltipla, artrite reumatóide, transplante de tecidos, metástase tumoral, meningite, encefalite, 30 acidente vascular cerebral e outros traumas cerebrais,

nefrite, retinite, dermatite atópica, psoríase, isquemia miocárdica e lesão pulmonar aguda mediada por leucócitos como, por exemplo, a que ocorre na síndrome de sofrimento respiratório do adulto. As formulações da presente invenção 5 são especialmente úteis no tratamento de esclerose múltipla e artrite reumatóide.

Modelos *in vivo* adequados para a demonstração da eficácia no tratamento de condições inflamatórias incluem EAE (encefalomielite autoimune experimental) em 10 camundongos, ratos, porquinhos-da-índia ou primatas, além de outros modelos inflamatórios que dependem das integrinas  $\alpha 4$ .

A doença inflamatória do intestino é um termo coletivo para duas doenças similares denominadas doença de Crohn e 15 colite ulcerativa. A doença de Crohn é uma doença inflamatória idiopática crônica, úlcero-constritiva, caracterizada por envolvimento nitidamente delimitado e tipicamente transmural de todas as camadas da parede intestinal por uma reação inflamatória granulomatosa. 20 Qualquer segmento do trato gastrintestinal, da boca ao ânus, pode estar envolvido, embora a doença mais comumente afete o íleo terminal e/ou o cólon. A colite ulcerativa é uma resposta inflamatória limitada grandemente à mucosa e submucosa do cólon. Os linfócitos e macrófagos são 25 numerosos nas lesões da doença inflamatória do intestino, e podem contribuir para a lesão inflamatória.

A asma é uma doença caracterizada por aumento da capacidade de resposta da árvore traqueobrônquica a vários estímulos que potencializam a constrição paroxísmica das 30 vias aéreas brônquicas. Os estímulos causam a liberação de

vários mediadores da inflamação dos mastócitos cobertos por IgE, incluindo histamina, fatores quimiotáticos eosinofílicos e neutrofílicos, leucotrineos, prostaglandina, e fator de ativação plaquetária. A 5 liberação desses fatores recruta basófilos, eosinófilos e neutrófilos, que causam a lesão inflamatória.

A aterosclerose é uma doença das artérias (por exemplo, coronárias, carótidas, aorta e ilíacas). A lesão básica, o ateroma, consiste em uma placa focal elevada 10 dentro da íntima, que possui um núcleo de lipídeo e uma capa fibrosa de cobertura. Os ateromas comprometem o fluxo sangüíneo arterial e enfraquecem as artérias afetadas. Infartos do miocárdio e cerebrais são as consequências principais dessa doença. Macrófagos e leucócitos são 15 recrutados para os ateromas e contribuem para a lesão inflamatória.

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crônica, recidivante, que primariamente causa a deterioração e destruição das articulações. A artrite 20 reumatóide normalmente afeta primeiro as pequenas articulações das mãos e dos pés, mas então pode envolver os punhos, cotovelos, tornozelos e joelhos. A artrite resulta da interação de células sinoviais com leucócitos que se infiltram da circulação para dentro do revestimento 25 sinovial das articulações. Veja, por exemplo, Paul, *Immunology* (3<sup>a</sup> ed., Raven Press, 1993).

Outra indicação para os compostos desta invenção é no tratamento de rejeição de órgãos ou enxertos mediada por VLA-4. Nos últimos anos, houve uma melhora considerável na 30 eficiência de técnicas cirúrgicas para o transplante de

tecidos e órgãos como a pele, o rim, fígado, coração, pulmão, pâncreas e medula óssea. Talvez o principal problema existente seja a ausência de agentes satisfatórios para a indução de imunotolerância no receptor ao aloenxerto 5 ou órgão transplantado. Quando células alogênicas ou órgãos são transplantados em um hospedeiro (ou seja, o doador e o receptor são indivíduos diferentes da mesma espécie), o sistema imunológico tem tendência a montar uma resposta imunológica contra os抗ígenos estranhos presentes no 10 transplante (doença enxerto versus hospedeiro), levando à destruição do tecido transplantado. As células CD8<sup>+</sup>, as células CD4 e os monócitos estão envolvidos na rejeição de tecidos transplantados. Os compostos desta invenção que se 15 ligam à integrina alfa-4 são úteis, *inter alia*, para o bloqueio das respostas imunológicas induzidas por aloantígenos no receptor, evitando, dessa forma, que essas células participem na destruição do tecido ou órgão transplantado. Veja, por exemplo, Paul e cols., *Transplant International* 9, 420-425 (1996); Georczynski e cols., 20 *Immunology* 87, 573-580 (1996); Georczynski e cols., *Transplant. Immunol.* 3, 55-61 (1995); Yang e cols., *Transplantation* 60, 71-76 (1995); Anderson e cols., *APMIS* 102, 23-27 (1994).

Um uso relacionado para os compostos desta invenção 25 que se ligam à VLA-4 é na modulação da resposta imunológica envolvida na doença "enxerto versus hospedeiro" (DEVH). Veja, por exemplo, Schlegel e cols., *J. Immunol.* 155, 3.856-3.865 (1995). A DEVH é uma doença potencialmente fatal que ocorre quando células imunologicamente 30 competentes são transferidas para um receptor alogênico.

Nessa situação, as células imunocompetentes do doador podem atacar tecidos no receptor. Tecidos da pele, epitélios intestinais e do fígado são alvos freqüentes, e podem ser destruídos durante a evolução da DEVH. A doença apresenta 5 um problema especialmente grave no caso de transplante de tecido imunológico, como, por exemplo, no transplante de medula óssea; mas também há relatos de DEVH menos grave também em outros casos, incluindo transplantes cardíacos e hepáticos. Os agentes terapêuticos da presente invenção são 10 usados, *inter alia*, para bloquear a ativação das células T do doador, interferindo, dessa forma, com sua habilidade para lisar células-alvo no hospedeiro.

Um uso adicional dos compostos desta invenção é na inibição de metástase tumoral. Há relatos de que várias 15 células tumorais expressam VLA-4, e os compostos que se ligam à VLA-4 bloqueiam a adesão dessas células às células endoteliais. Steinback e cols., *Urol. Res.* 23, 175-83 (1995); Orosz e cols., *Int. J. Cancer* 60, 867-71 (1995); Freedman e cols., *Leuk. Lymphoma* 13, 47-52 (1994); Okahara 20 e cols., *Cancer Res.* 54, 3.233-6 (1994).

Os compostos que possuem a atividade biológica desejada podem ser modificados da forma necessária para fornecerem as propriedades desejadas como, por exemplo, propriedades farmacológicas aprimoradas (por exemplo, 25 estabilidade *in vivo*, biodisponibilidade), ou a habilidade para serem detectados em aplicações diagnósticas. A estabilidade pode ser testada de diversas formas como, por exemplo, pela determinação da meia-vida das proteínas durante incubação com peptidases ou plasma ou soro humano. 30 Foram descritos vários desses ensaios de estabilidade de

proteínas (veja, por exemplo, Verhoef e cols., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 1990, 15(2):83-93).

Um uso adicional dos compostos desta invenção é no tratamento de esclerose múltipla. A esclerose múltipla é uma doença autoimune neurológica progressiva que afeta um número estimado de 250.000 a 350.000 pessoas nos Estados Unidos. Acredita-se que a esclerose múltipla seja o resultado de uma reação autoimune específica na qual alguns leucócitos atacam e iniciam a destruição de mielina, a bainha de isolamento que cobre as fibras nervosas. Em um modelo animal para esclerose múltipla, demonstrou-se que anticorpos monoclonais murídeos dirigidos contra VLA-4 bloqueiam a adesão de leucócitos ao endotélio e, dessa forma, evitam a inflamação do sistema nervoso central e a subseqüente paralisia nos animais.<sup>16</sup>

As composições farmacêuticas da invenção são adequadas ao uso em diversos sistemas de liberação de fármacos. Formulações adequadas para uso na presente invenção são encontradas em "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17<sup>a</sup> ed. (1985).

A quantidade administrada ao paciente irá variar, dependendo do composto administrado, da finalidade da administração, por exemplo, profilaxia ou terapia, do estado do paciente, da forma de administração, e semelhantes. Em aplicações terapêuticas, as composições são administradas a um paciente que já sofre de uma doença em uma quantidade suficiente para curar, ou pelo menos interromper parcialmente, os sintomas da doença e suas complicações. Uma quantidade adequada para atingir esse objetivo é definida como "dose terapeuticamente eficaz". As

quantidades eficazes para esse uso dependerão da condição de doença que estiver sendo tratada, bem como da avaliação do médico assistente, levando em consideração fatores como a gravidade da inflamação, da idade, peso e condição geral 5 do paciente, e semelhantes, com referência aos dados do modelo animal apropriado, como aqueles aqui apresentados. Métodos para se estimar dosagens humanas adequadas com base nesses dados são conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Wagner, J.G. "Pharmacokinetics for the Pharmaceutical 10 Scientist". Technomic, Inc., Lancaster, PA 1993).

As composições administradas a um paciente estão na forma de composições farmacêuticas descritas acima. Essas composições podem ser esterilizadas por técnicas convencionais de esterilização, ou podem ser filtradas de 15 forma estéril. As soluções aquosas resultantes podem ser embaladas para uso imediato, ou liofilizadas, a preparação liofilizada sendo combinada com um veículo aquoso estéril, antes da administração.

A dosagem terapêutica dos compostos da presente 20 invenção irá variar de acordo, por exemplo, com o uso em particular para o qual o tratamento é feito, a forma de administração do composto, a saúde e a condição do paciente, e a avaliação do médico responsável pela prescrição. Por exemplo, para administração intravenosa, a 25 dose estará tipicamente na faixa de cerca de 20 µg a cerca de 2.000 µg por quilograma de peso corporal, preferivelmente cerca de 20 µg a cerca de 500 µg, mais preferivelmente, cerca de 100 µg a cerca de 300 µg por quilograma de peso corporal. Faixas de dosagens adequadas 30 para administração intranasal são geralmente de cerca de

0,1 pg a 1 mg por quilograma de peso corporal. Doses eficazes podem ser extrapoladas a partir de curvas de dose-resposta derivadas de sistemas de teste *in vitro* ou em modelo animal.

5 Os compostos desta invenção também são capazes de se ligar ou antagonizar as ações das integrinas  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_7$ ,  $\alpha_d\beta_2$ ,  $\alpha_e\beta_1$  (embora  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_9\beta_1$  sejam preferidas nesta invenção). Conseqüentemente, os compostos desta invenção também são úteis para a prevenção ou reversão dos sintomas, 10 distúrbios ou doenças induzidos pela ligação dessas integrinas aos seus respectivos ligantes.

Por exemplo, a Publicação Internacional Número WO 98/53817, publicada em 3 de dezembro de 1998 (cuja revelação é aqui incorporada por referência em sua 15 totalidade) e as referências nela citadas descrevem distúrbios mediados por  $\alpha_4\beta_7$ . Essa referência também descreve um ensaio para determinação do antagonismo da ligação dependente de  $\alpha_4\beta_7$  à proteína de fusão VCAM-Ig.

Adicionalmente, compostos que se ligam às integrinas 20  $\alpha_d\beta_2$  e  $\alpha_e\beta_7$ , são particularmente úteis para o tratamento de asma e doenças pulmonares relacionadas. Veja, por exemplo, M. H. Grayson e cols., *J. Exp. Med.* 1998, 188(11) 2.187-2.191. Os compostos que se ligam à integrina  $\alpha_e\beta_7$  também são úteis para o tratamento de lúpus eritematoso sistêmico 25 (veja, por exemplo, M. Pang e cols., *Arthritis Rheum.* 1998, 41(8), 1.456-1.463); doença de Crohn, colite ulcerativa e doença inflamatória do intestino (DII) (veja, por exemplo, D. Elewaut e cols., *Scand. J. Gastroenterol.* 1998, 33(7) 743-748); síndrome de Sjögren (veja, por exemplo, U. 30 Kroneld e cols., *Scand. J. Gastroenterol.* 1998, 27(3), 215-

218); e artrite reumatóide (veja, por exemplo, *Scand. J. Gastroenterol.* 1996, 44(3), 293-298), e compostos que se ligam à  $\alpha_6\beta_1$  podem ser úteis na prevenção da fertilização (veja, por exemplo, H. Chen e cols., *Chem. Biol.* 1999, 6, 5 1-10).

Em outro aspecto da invenção, os compostos e as composições aqui descritos podem ser usados para inibir a migração de células imunológicas da corrente sanguínea para o sistema nervoso central no caso, por exemplo, de 10 esclerose múltipla, ou para áreas que resultam na destruição induzida por inflamação da mielina. De preferência, esses reagentes inibem a migração de células imunológicas de um modo que inibe a desmielinização e ainda podem promover a remielinização. Os reagentes também podem 15 evitar a desmielinização e promover a remielinização do sistema nervoso central para distúrbios metabólicos congênitos nos quais a infiltração de células imunológicas afeta o desenvolvimento da bainha de mielina, principalmente no SNC. Os reagentes preferivelmente também 20 reduzem paralisia quando administrados a um indivíduo com paralisia induzida por uma doença ou condição desmielinizante.

Doenças inflamatórias que estão incluídas para o tratamento pelas composições, compostos e métodos aqui 25 revelados incluem geralmente condições relacionadas à desmielinização. Histologicamente, as anormalidades de mielina são desmielinizantes ou dismielinizantes. A desmielinização implica na destruição de mielina. A dismielinização refere-se à formação ou manutenção 30 defeituosa da mielina causada por disfunção dos

oligodendróцитos. De preferência, as composições e os métodos aqui revelados são contemplados para o tratamento de doenças e condições relacionadas à desmielinização e auxiliam a remielinização. Doenças ou condições adicionais 5 contempladas para o tratamento incluem meningite, encefalite e lesões da medula vertebral e condições que geralmente induzem a desmielinização em consequência de uma resposta inflamatória.

As composições, os compostos e os coquetéis aqui 10 revelados são contemplados para uso no tratamento de condições e doenças associadas à desmielinização. As doenças e condições que envolvem a desmielinização incluem, sem limitação, esclerose múltipla, distúrbios metabólicos congênitos (por exemplo, fenilcetonúria, doença de Tay-Sachs, doença de Niemann-Pick, doença de Gaucher, síndrome de Hurler, doença de Krabbe e outras leucodistrofias), neuropatias com mielinização anormal (por exemplo, Guillain Barré, polineuropatia desmielinizante imune crônica (PDIC), PDIC multifocal, síndrome anti-MAG, síndrome GALOP, 15 síndrome do anticorpo anti-sulfatida, síndrome do anticorpo anti-GM2, síndrome POEMS, perineurite, síndrome do anticorpo IgM anti-GD 1b), desmielinização relacionada a fármacos (por exemplo, causada pela administração de cloroquina, FK506, perhexilina, procainamida e zimeldina), 20 outras condições desmielinizantes hereditárias (por exemplo, glicoproteína deficiente em carboidratos, síndrome de Cockayne, hipomielinização congênita, distrofia muscular congênita, doença de Farber, síndrome de Marinesco-Sjögren, leucodistrofia metacromática, doença de Pelizaeus- 25 Merzbacher, doença de Refsum, condições relacionadas a 30

príons, e doença de Salla), e outras condições ou doenças desmielinizantes (por exemplo, meningite, encefalite ou lesão da medula vertebral).

Há vários modelos de doença que podem ser usados para 5 estudar essas doenças *in vivo*. Por exemplo, modelos animais incluem, sem limitação:

**Tabela 4**

	<b>Modelo de doença</b>	<b>Espécie</b>
	Camundongo, rato, porquinho-da-índia	
10	EAE induzida por glicoproteína	
	mielina-oligodendrócito (MOG)	Rato
	Modelo de desmielinização	
	de TNF- $\alpha$ transgênico	Camundongo

**Esclerose múltipla**

15 A doença desmielinizante mais comum é a esclerose múltipla, mas muitos outros distúrbios metabólicos e inflamatórios causam mielinização deficiente ou anormal. A EM é uma doença neurológica crônica, que aparece no início da vida adulta e progride até uma incapacidade 20 significativa, na maioria dos casos. Há aproximadamente 350.000 casos de EM apenas nos Estados Unidos. Não considerando os traumas, a EM é a causa mais freqüente de incapacidade neurológica no início e meio da vida adulta.

A causa da EM ainda não foi determinada. Ela é 25 caracterizada por inflamação crônica, desmielinização e gliose (cicatrização). A desmielinização pode resultar em efeitos negativos ou positivos sobre a condução axonal. As anormalidades positivas da condução incluem condução axonal mais lenta, bloqueio variável da condução que ocorre na 30 presença de seqüências de impulsos de alta freqüência, mas

não de baixa freqüência, ou bloqueio completo da condução. As anormalidades positivas da condução incluem geração ectópica de impulso, espontaneamente ou após estresse mecânico, e "cross-talk" anormal entre exons 5 desmielinizados.

Observou-se que as células T reativas contra proteínas de mielina, tanto a proteína básica de mielina (MPB) quanto a proteína proteolipídica de mielina (PLP), medeiam a inflamação do SNC na encefalomielite alérgica experimental. 10 Também se observou que os pacientes possuem níveis elevados de imunoglobulina (Ig) no SNC. É ainda possível que alguns dos danos teciduais observados na EM sejam mediados por produtos de citocina de células T ativadas, macrófagos ou astrócitos.

15 Hoje, 80% dos pacientes diagnosticados com EM vivem 20 anos após o surgimento da doença. Os tratamentos para a EM incluem: (1) tratamento dirigido à modificação da evolução da doença, incluindo tratamento de exacerbações agudas, e dirigido à supressão de longo prazo da doença; (2) 20 tratamento dos sintomas da EM; (3) prevenção e tratamento de complicações médicas; e (4) gerenciamento dos problemas pessoais e sociais secundários.

O surgimento da EM pode ser dramático ou tão discreto a ponto de fazer com que o paciente não procure atendimento 25 médico. Os sintomas mais comuns incluem fraqueza em um ou mais membros, turvação visual causada por neurite óptica, distúrbios sensoriais, diplopia e ataxia. A evolução da doença pode ser classificada em três categorias gerais: (1) EM recidivada, (2) EM progressiva crônica, e (3) EM 30 inativa. A EM recidivada é caracterizada por ataques

recorrentes de disfunção neurológica. Os ataques da EM geralmente duram dias a semanas, e podem ser seguidos por recuperação completa, parcial, ou sem recuperação. A recuperação dos ataques geralmente ocorre no intervalo de 5 semanas a vários meses a partir do pico dos sintomas, embora raramente algum tipo de recuperação continue por 2 ou mais anos.

A EM progressiva crônica resulta em piora gradualmente progressiva, sem períodos de estabilização ou remissão. 10 Essa forma se desenvolve em pacientes com uma história prévia de EM recidivada, embora em 20% dos pacientes não haja relatos de recidivas. As recaídas agudas também podem ocorrer durante a evolução progressiva.

A terceira forma é a EM inativa. A EM inativa é 15 caracterizada por déficits neurológicos fixos de magnitude variável. A maioria dos pacientes com EM inativa possui uma história anterior de EM recidivada.

A evolução da doença também depende da idade do paciente. Por exemplo, fatores prognósticos favoráveis 20 incluem surgimento precoce (excluindo a infância), uma evolução em recidivas, e pouca incapacidade residual 5 anos após o surgimento. Em contraste, um prognóstico ruim está associado ao surgimento em uma idade tardia (ou seja, aos 40 ou mais) e uma evolução progressiva. Essas variáveis são 25 interdependentes, na medida em que a EM progressiva crônica tende a começar em uma idade mais avançada do que a EM recidivada. A incapacidade da EM progressiva crônica é normalmente causada por paraplegia progressiva ou quadriplegia (paralisia) nos pacientes. Em um aspecto da 30 invenção, os pacientes preferivelmente serão tratados

quando estiverem em remissão, e não em um estágio de recaída da doença.

O uso por curto prazo de hormônio adrenocorticotrópico ou corticosteróides orais (por exemplo, prednisona oral ou 5 metilprednisolona intravenosa) é a única medida terapêutica específica para o tratamento de pacientes com exacerbação aguda da EM.

As terapias mais novas para EM incluem o tratamento do paciente com interferon beta-1b, interferon beta-1a e 10 Copaxone® (anteriormente conhecido como copolímero 1). Esses três fármacos demonstraram reduzir significativamente a taxa de recidiva da doença. Esses fármacos são auto-administrados por via intramuscular ou subcutânea.

No entanto, nenhuma das modalidades atuais de 15 tratamento inibe a desmielinização, isoladamente promove ou permite a remielinização espontânea, ou reduz a paralisia. Um aspecto da invenção contempla o tratamento de EM com agentes aqui revelados, tanto isoladamente quanto em combinação com outras modalidades padronizadas de 20 tratamento.

#### **Distúrbios metabólicos congênitos**

Os distúrbios metabólicos congênitos incluem fenilcetonúria (FCU) e outras aminoacidúrias, doença de Tay-Sachs, doença de Niemann-Pick, doença de Gaucher, 25 síndrome de Hurler, doença de Krabbe, e outras leucodistrofias que interferem com o desenvolvimento da bainha, como descrito com mais detalhes abaixo.

A FCU é um erro hereditário do metabolismo causado por uma deficiência na enzima fenilalanina hidroxilase. A perda 30 dessa enzima causa retardo mental, danos orgânicos, postura

incomum, e pode, em casos de FCU materna, comprometer gravemente a gravidez. Foi descoberto um modelo para o estudo de FCU em camundongos. De preferência, os bebês identificados com FCU são mantidos em uma dieta sem 5 fenilalanina ou com redução de fenilalanina. Um aspecto da invenção seria a combinação dessas dietas com os compostos e as composições aqui reveladas para evitar a desmielinização e remielinizar as células danificadas pela FCU.

10 A doença de Tay-Sachs clássica aparece no indivíduo por volta dos 6 meses de idade, e eventualmente resulta na morte do indivíduo por volta dos 5 anos de idade. A doença é causada pela ausência da enzima hexoaminidase A (hex A), que é necessária para a degradação de certas substâncias 15 gordurosas no cérebro e nas células nervosas. Essas substâncias, na ausência da enzima, se acumulam e levam à destruição das células nervosas. Outras formas de deficiência da enzima hex A ocorrem em uma idade mais avançada, e são denominadas formas juvenis, crônicas e 20 adultas de deficiência de hex A. Os sintomas são similares àqueles que caracterizam a doença de Tay-Sachs clássica. Também existe uma forma de surgimento adulto da deficiência da enzima. Atualmente, não há cura ou tratamento para a doença/deficiência, apenas a medida preventiva de testar o 25 feto no útero quanto à doença. Dessa forma, os compostos e as composições aqui reveladas podem ser úteis na atenuação ou prevenção da destruição de células nervosas nesses pacientes.

A doença de Niemann-Pick se divide em três categorias: 30 a forma infantil aguda, o Tipo B, que é uma forma menos

comum, crônica, não neurológica, e o Tipo C, uma forma bioquímica e geneticamente distinta da doença. Em um indivíduo normal, o colesterol celular é importado em lisossomos para processamento, após o qual é liberado. Foi 5 demonstrado que células retiradas de indivíduos com Niemann-Pick apresentam defeitos na liberação de colesterol dos lisossomos. Isso leva a um acúmulo excessivo de colesterol dentro dos lisossomos, causando erros de processamento. Verificou-se que NPC<sub>1</sub> possui regiões 10 conhecidas sensíveis ao esterol similares àquelas em outras proteínas, o que sugere sua participação na regulação do tráfego de colesterol. Não foram identificadas terapias bem sucedidas para as formas dos Tipos A e C de Niemann-Pick. Para o Tipo C, recomenda-se que os pacientes adotem uma 15 dieta pobre em colesterol. Dessa forma, os compostos e as composições aqui reveladas podem ser úteis na atenuação ou prevenção da destruição das células.

A doença de Gaucher é uma doença hereditária causada por uma mutação gênica. Normalmente, esse gene é 20 responsável por uma enzima chamada glucocerebrosidase, a qual é necessária para que o corpo degrade a gordura, glucocerebrosídeo. Em pacientes com doença de Gaucher, o corpo não é capaz de produzir adequadamente essa enzima, e a gordura não pode ser degradada. Da mesma forma que a 25 doença de Tay-Sachs, a doença de Gaucher é consideravelmente mais comum nos descendentes de pessoas judias do leste europeu (Ashkenazi), embora indivíduos de qualquer grupo étnico possam ser afetados. Dentre a população judia Ashkenazi, a doença de Gaucher é o 30 distúrbio genético mais comum, com uma incidência de

aproximadamente uma em cada 450 pessoas. No público em geral, a doença de Gaucher afeta aproximadamente uma em cada 100.000 pessoas.

Em 1991, tornou-se disponível uma terapia de reposição da enzima como o primeiro tratamento eficaz para a doença de Gaucher. O tratamento consiste em uma forma modificada da enzima glucocerebrosidase administrada por via intravenosa. Contempla-se que as composições e os compostos aqui revelados podem ser usados isoladamente ou, de preferência, em combinação com a administração de glucocerebrosidase para o tratamento da doença em uma pessoa com a doença.

A síndrome de Hurler, também conhecida como mucopolissacaridose do tipo I, é uma classe de doenças superpostas. Essas doenças genéticas dividem em comum o acúmulo celular de mucopolissacarídeos em fibroblastos. As doenças são geneticamente distinguíveis. O transplante de fibroblastos e de medula óssea não parece ser útil e, dessa forma, são necessários compostos e composições úteis na atenuação da gravidade e progressão da doença. Os compostos e as composições aqui reveladas podem ser administrados a um indivíduo para atenuar a progressão e/ou a gravidade da doença.

A doença de Krabbe (também conhecida como leucodistrofia de células globóides) é uma condição autossômica recessiva causada por deficiência de galactosilceramidase (ou galactocerebrosidase), uma enzima lipossômica que cataboliza um componente lipídico importante da mielina. Estima-se que a incidência na França seja de 1:150.000 nascimentos. A doença leva à

desmielinização do sistema nervoso central e periférico. O surgimento geralmente ocorre durante o primeiro ano de vida, e a condição é rapidamente progressiva, mas formas juvenis, adolescentes ou adultas também foram relatadas, 5 com uma taxa de progressão mais variável. O diagnóstico é estabelecido por um ensaio enzimático (deficiência de galactosilceramidase). Há vários modelos animais naturais (camundongo, cachorro, macaco). A doença de Krabbe, como todas as leucodistrofias, não tem cura ou tratamentos 10 eficazes conhecidos. Uma modalidade da presente invenção consiste na utilização das composições e dos compostos aqui revelados para tratar ou atenuar a doença de Krabbe e outras leucodistrofias.

As leucodistrofias são um grupo de distúrbios 15 progressivos geneticamente determinados que afetam o cérebro, a medula vertebral e os nervos periféricos. Elas podem incluir adrenoleucodistrofia (ALD), adrenomieloneuropatia (AMN), síndrome de Aicardi-Goutiers, doença de Alexander, CACH (ou seja, ataxia infantil com 20 hipomielinização do sistema nervoso central ou doença do desaparecimento da substância branca), CADASIL (ou seja, arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia), doença de Canavan (degeneração esponjosa), Xantomatose Cerebrotendinosa 25 (CTX), doença de Krabbe (discutida acima), leucodistrofia metacromática (MLD), adrenoleucodistrofia neonatal, síndrome de ovário-leucodistrofia, doença de Pelizaeus-Merzbacher (paraplegia espástica ligada ao X), doença de Refsum, síndrome de van der Knaap (leucodistrofia 30 vacuolizante com cistos subcorticais), e síndrome de

Zellweger. Nenhuma das doenças possui cura através de tratamentos isolados eficazes. Conseqüentemente, são necessários meios de tratamento ou atenuação dos sintomas da doença, por exemplo, pela utilização das composições e 5 dos compostos aqui revelados.

#### **Neuropatias com mielinização anormal**

Há várias polineuropatias imunes crônicas que causam desmielinização no paciente. A idade de surgimento das condições varia de acordo com a condição. Existem 10 tratamentos padronizados para essas doenças, e esses poderiam ser combinados com as composições e os compostos aqui revelados. Alternativamente, as composições e os compostos revelados podem ser usados isoladamente. As terapias padronizadas incluem as seguintes:

15 **Tabela 5**

<b>Neuropatia</b>	<b>Características clínicas</b>	<b>Tratamento</b>
Polineuropatia desmielinizante (PDIC)	Surgimento entre 1-80 anos. Caracterizada por fraqueza, perda sensorial e hipertrofia nervosa.	Imunossupressão de células T com prednisona, ciclosporina A ou metotrexato, imunoglobulina humana (HIG), plasmaferese
PDIC Multifocal	Surgimento entre 28 a 58 anos caracterizada por fraqueza assimétrica, perda sensorial com evolução	Imunossupressão de células T com prednisona, HIG

Neuropatia	Características clínicas	Tratamento
	lentamente progressiva ou em recidivas-remissões.	
Neuropatia motora multifocal (MMN)	Surgimento varia de 25 a 70 anos, com o dobro de homens em relação às mulheres. As características incluem fraqueza, atrofia muscular, fasciculações e câimbras que são progressivas acima de 1-30 anos.	Imunossupressão de Ciclofosfamida, plasmaferese B com
Neuropatia com ligação de IgM à glicoproteína mielina (MAG)	Surgimento ànormalmente acima de 50 anos, e caracterizada por perda sensorial (100%), fraqueza, distúrbio de ganho, tremor, lentamente progressivos.	Imunossupressão de Ciclofosfamida, plasmaferese B, Rituxan, Interferon a, Cladribina ou fludarabina, Prednisona
Síndrome (distúrbio marcha, antícorpo, GALOP)	Um distúrbio da marcha, auto-polineuropatia	da HIG com Plasmaferese Ciclofosfamida

Neuropatia	Características clínicas	Tratamento
surgimento em idade avançada, polineuropatia)		
Síndrome POEMS (polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, Proteína M alterações cutâneas), conhecida como síndrome de Crow-Fukase e doença de Takatsuki	Surgimento POEMS entre 27 e 80 anos. As lesões osteoclásticas são com fraqueza, perda de reflexos e irradiação. As lesões sensorial, reduzidos disseminadas com ausentes, quimioterapia (melfalan e prednisona). As características.	

#### Desmielinização induzida por fármacos e radiação

Certos fármacos e radiação podem induzir a desmielinização nos indivíduos. Fármacos responsáveis pela desmielinização incluem, sem limitação, cloroquina, FK506, perhexilina, procainamida e zimeldina.

A radiação também pode induzir desmielinização. Acredita-se que a toxicidade do sistema nervoso central (SNC) seja causada por: (1) lesão de estruturas vasculares, (2) eliminação de progenitores de oligodendrócito-2 astrócito e oligodendrócitos maduros; (3) eliminação de populações de célula-tronco neurais no hipocampo, cerebelo e córtex, e alterações generalizadas da expressão de citocina. A maioria das lesões por radiação é causada por radioterapias administrada durante o tratamento de certos

cânceres. Para uma revisão sobre o tema, veja Belka e cols., 2001 *Br. J. Cancer* 85: 1.233-9. No entanto, a exposição à radiação também pode ser um problema para astronautas (Hopewell, 1994 *Adv. Space Res.* 14: 433-42), bem como no caso de exposição às substâncias radioativas.

5 Pacientes que receberam fármacos ou que foram expostos acidental ou intencionalmente à radiação podem se beneficiar com a administração de um dos compostos ou das composições aqui reveladas para evitar a desmielinização ou 10 para promover a remielinização.

#### **Condições que envolvem a desmielinização**

Síndromes/doenças hereditárias adicionais que causam desmielinização incluem a síndrome de Cockayne, hipomielinização congênita, doença de Farber, 15 leucodistrofia metacromática, doença de Pelizaeus-Merzbacher, doença de Refsum, condições relacionadas a príons e doença de Salla.

A síndrome de Cockayne (SC) é um distúrbio hereditário raro no qual as pessoas são sensíveis à luz solar, possuem 20 baixa estatura e têm a aparência envelhecida prematuro. Na forma clássica da síndrome de Cockayne (Tipo I), os sintomas são progressivos e tipicamente se tornam evidentes após a idade de um ano. Um surgimento precoce ou a forma congênita de síndrome de Cockayne (Tipo II) é aparente ao 25 nascimento. Curiosamente, diferentemente de outras doenças do reparo do DNA, a síndrome de Cockayne não está ligada ao câncer. A SC é um distúrbio multissistêmico que causa tanto falhas profundas do crescimento do soma e do cérebro quanto caquexia progressiva, degeneração retiniana, coclear e 30 neurológica, com uma leucodistrofia e neuropatia

desmielinizante, sem um aumento da incidência de câncer. Após exposição ao UV (por exemplo, luz solar), os indivíduos com síndrome de Cockayne não conseguem realizar o reparo acoplado à transcrição. Até agora, foram 5 identificados dois genes defeituosos na síndrome de Cockayne, CSA e CSB. O gene CSA é encontrado no cromossomo 5. Ambos os genes codificam proteínas que interagem com componentes do maquinário da transcrição e com proteínas de reparo do DNA.

10 Até hoje, não foram identificadas curas ou tratamentos eficazes para pacientes com essa doença. Dessa forma, um aspecto da invenção consiste no tratamento dessa doença com os compostos e as composições aqui revelados.

A hipomielinização congênita tem vários nomes, 15 incluindo neuropatia dismielinizante congênita, polineuropatia por hipomielinização congênita, hipomielinização congênita ("bulbo de cebola"), polineuropatia, neuropatia por hipomielinização congênita, neuropatia congênita causada por hipomielinização, 20 neuropatia por hipomielinização e CHN. Neuropatias periféricas hereditárias, dentre os distúrbios genéticos mais comuns em humanos, são um grupo complexo, clínica e geneticamente heterogêneo, de distúrbios que produzem deterioração progressiva dos nervos periféricos. A 25 hipomielinização congênita é um de um grupo de distúrbios. Esse grupo inclui neuropatia hereditária com probabilidade de paralisias por pressão, doença de Charcot-Marie-Tooth, síndrome de Dejerine-Sottas, e neuropatia por hipomielinização congênita. Não há curas ou tratamentos 30 eficazes conhecidos para nenhum desses distúrbios.

A doença de Farber tem vários nomes, incluindo: lipogranulomatose de Farber, deficiência de ceremidase, deficiência de ácido ceramidase, deficiência AC, deficiência de N-laurilesfingosina deacilase e N-5 acilesfingosina amidohidrolase. Como certos nomes revelam, a doença ocorre por causa de uma deficiência de ácido ceramidase (também conhecida como N-acilesfingosina amidohidrolase, ASA). A ausência da enzima resulta em um acúmulo de mucopolissacarídeo ácido não sulfonado nos 10 neurônios e nas células gliais. Os pacientes com a doença normalmente morrem antes dos 2 anos de idade.

A leucodistrofia metacromática (MLD) é um distúrbio genético causado por uma deficiência da enzima arilsulfatase A. É de um grupo de distúrbios genéticos 15 denominados "leucodistrofias" que afetam o crescimento da bainha de mielina. Há três formas de MLD: infantil tardia, juvenil e adulta. Na forma late infantil tardia, que é a mais comum, o surgimento de sintomas começa entre 6 meses e 20 2 anos de idade. O bebê é habitualmente normal ao nascimento, mas eventualmente perde as habilidades adquiridas previamente. Os sintomas incluem hipotonía (baixo tônus muscular), anormalidades da fala, perda das habilidades mentais, cegueira, rigidez (ou seja, força muscular descontrolada), convulsões, deglutição alterada, 25 paralisia e demência. Os sintomas da forma juvenil começam entre 4 e 14 de idade, e incluem desempenho escolar deficiente, deterioração mental, ataxia, convulsões e demência. Na forma adulta, os sintomas, que começam após os 16 anos de idade, podem incluir déficit de concentração, 30 depressão, alterações psiquiátricas, ataxia, tremor e

demência. As convulsões podem ocorrer na forma adulta, mas são menos comuns nas outras formas. Em todas as três formas, a deterioração mental é normalmente o primeiro sinal.

5 A doença de Pelizaeus-Merzbacher (também conhecida como leucodistrofia perinatal sudanofílica) é um distúrbio genético ligado ao X que causa uma anormalidade de uma proteína proteolipídica. A anormalidade causa a morte do bebê, tipicamente antes de um ano de idade. Não há 10 tratamentos ou curas conhecidas para a doença.

A doença de Refsum (também conhecida como deficiência de ácido fitânico oxidase, heredopatia atática polineuritiforme ou neuropatia motora e sensorial hereditária IV, HMSN IV) é causada por mutações no gene que 15 codifica fitanoil-CoA hidroxilase (PAHX ou PHYH). As características clínicas principais são retinite pigmentosa, polineuropatia crônica e sinais cerebelares. O ácido fitânico, um ácido graxo de cadeia ramificada incomum (ácido 3,7,11,15-tetrametil-hexadecanoíco) se acumula nos 20 tecidos e fluidos corpóreos de pacientes com a doença, e é incapaz de ser metabolizado em função da ausência de PAHX. A plasmaferese realizada uma ou duas vezes ao mês remove eficazmente o ácido do corpo e permite a liberalização de restrições dietéticas que limitam a ingestão de ácido 25 fitânico.

Condições relacionadas a príons incluem doença de Gerstmann-Straussler (GSD), doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), insônia familiar fatal. Isoformas aberrantes da proteína de príon podem atuar como agentes infecciosos 30 nesses distúrbios, além de kuru e scrapie (uma doença

encontrada em carneiros). O termo "príon" deriva de "agente infeccioso protéico" (Prusiner, *Science* 216: 136-44, 1982). Há uma clivagem proteolítica da proteína relacionada ao príon (PRP) que resulta em um peptídeo amiloidogênico que 5 se polimeriza em fibrilas insolúveis.

A doença de Salla e outros tipos de sialúrias são doenças que envolvem problemas com a estocagem de ácido siálico. São distúrbios neurodegenerativos autossômicos recessivos que podem se apresentar como uma forma infantil 10 grave (ou seja, ISSD) ou como uma forma adulta lentamente progressiva que é prevalente na Finlândia (ou seja, doença de Salla). Os sintomas principais são hipotonía, ataxia cerebelar e retardo mental. Essas condições e doenças 15 também são contempladas para tratamentos paliativos ou atenuantes.

Outras condições que causam desmielinização incluem encefalite pós-infecciosa (também conhecida como encefalomielite aguda disseminada, ADEM), meningite e lesões da medula vertebral. As composições e os compostos 20 aqui revelados também são contemplados para uso no tratamento dessas outras condições desmielinizantes.

Os exemplos sintéticos e biológicos a seguir são oferecidos para ilustrar esta invenção, e não devem ser considerados de forma alguma como limitantes do escopo 25 desta invenção. A menos que especificado de forma diferente, todas as temperaturas estão em graus Celsius.

#### **EXEMPLOS**

Nos exemplos abaixo, as seguintes abreviações possuem as definições a seguir. Caso uma abreviação não seja 30 definida, ela possui seu significado geralmente aceito.

	Å	=	Angstroms
	br s	=	singletos amplos
	BSA	=	albumina sérica bovina
	d	=	dupletos
5	dd	=	dupletos de dupletos
	dq	=	dupletos de quartetos
	dsextet	=	dupletos de sextetos
	DMF	=	dimetilformamida
	EDTA	=	ácido etileno diamina tetra-acético
10	EtOAc	=	acetato de etila
	EM	=	comprimento de onda de emissão (em nm)
	EX	=	comprimento de onda de excitação (em nm)
	g	=	grama
15	HBSS	=	solução salina balanceada de Hank
	HEPES	=	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico
	HPLC	=	cromatografia líquida de alto rendimento
20	h	=	horas
	i-PrOH	=	isopropanol
	kg	=	quilograma
	L	=	litros
	LC/MS	=	cromatografia líquida/espectroscopia de massa
25	m	=	multipletos
	m <sup>2</sup>	=	metros quadrados
	M	=	molar
	mbar	=	milibar
30	mg	=	miligramas

	MHz	=	megahertz
	min	=	minutos
	ml	=	mililitros
	mm	=	milímetros
5	mM	=	milimolar
	mmol	=	milimol
	mOsm	=	miliosmol
	m/z	=	proporção massa/carga
	N	=	normal
10	ng	=	nanogramas
	nm	=	nanômetros
	RMN	=	ressonância magnética nuclear
	Pa	=	Pascal
	PBS	=	soro fisiológico tamponado com fosfato
15	PBS++	=	PBS com cálcio e magnésio
	ppm	=	partes por milhão
	q	=	quarteto
	Rf	=	fator de retenção (proporção da distância percorrida por substância/distância percorrida por frente de solvente)
20	rpm	=	rotações por minuto
	TA	=	temperatura ambiente
	s	=	singleto
	t	=	tripletó
25	TFA	=	ácido trifluoracético
	THF	=	tetrahidrofurano
	TLC	=	cromatografia de camada delgada
	UV	=	ultravioleta
	p/p	=	proporção peso/peso
30	p/v	=	proporção peso/volume

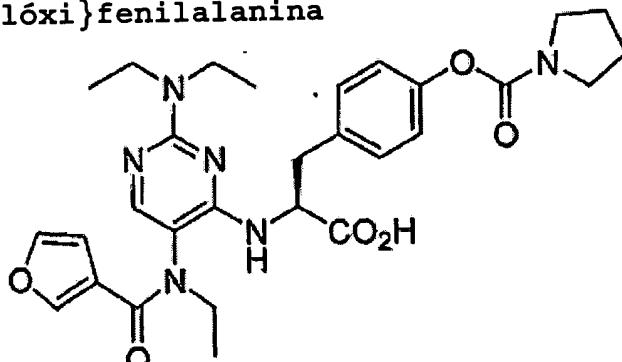
$\mu\text{g}$  = microgramas  
 $\mu\text{m}$  = mícrons  
 $\mu\text{M}$  = micromolar

**Métodos gerais.** Cromatografia instantânea (*flash*) foi realizada com o uso de um Biotage Flash 75L, usando 800 g de cartuchos de sílica KP-Sil (32-63  $\mu\text{M}$ , 60 Å, 500-550  $\text{m}^2/\text{g}$ ). Os Rf são relatados para TLC analítica, com o uso de Sílica Gel 60 F(254) da EM Sciences, placas com espessura de 250  $\mu\text{M}$  para fase normal. Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Varian Gemini de 300 MHz (300 MHz para espectros  $^1\text{H}$  e 75 MHz para espectros  $^{13}\text{C}$ ). HPLC analítica foi realizada em um HPLC Agilent Série 1100 com um Phenomenex Luna, de 3  $\mu\text{m}$ , coluna C-18, de 30 x 4.6 mm. O detector era de UV a 210 nm. Os solventes foram TFA 0,1% em água e TFA 0,1% em acetonitrila. A taxa de fluxo padronizada foi de 1,5 ml/min, e no método-padrão o gradiente de solvente foi alterado de  $\text{CH}_3\text{CN}$  20% para  $\text{CH}_3\text{CN}$  70% ao longo de 2,33 minutos. Um segundo método alternativo tinha uma taxa de fluxo de 2 ml/min e uma mudança de gradiente de  $\text{CH}_3\text{CN}$  20% para  $\text{CH}_3\text{CN}$  70% ao longo de 1,75 minutos. Um terceiro método tinha uma taxa de fluxo de 1,5 ml/min com a composição de solvente mudando de  $\text{CH}_3\text{CN}$  20% para  $\text{CH}_3\text{CN}$  70% ao longo de 10 minutos, mantido em 70% por 2 minutos, depois se elevando até 95% por 1 minuto, e mantendo em 95% por 2 minutos. LC/MS foi realizada em uma HPLC Agilent Série 1100 com um MSD Série 1100 com ionização por eletrospray (a menos que indicado de forma diferente como ionização química). A coluna e as condições combinavam com a HPLC auto-suficiente.  $^1\text{H}$  RMN de amidas tipicamente mostram rotâmeros, e a integração de alguns picos é

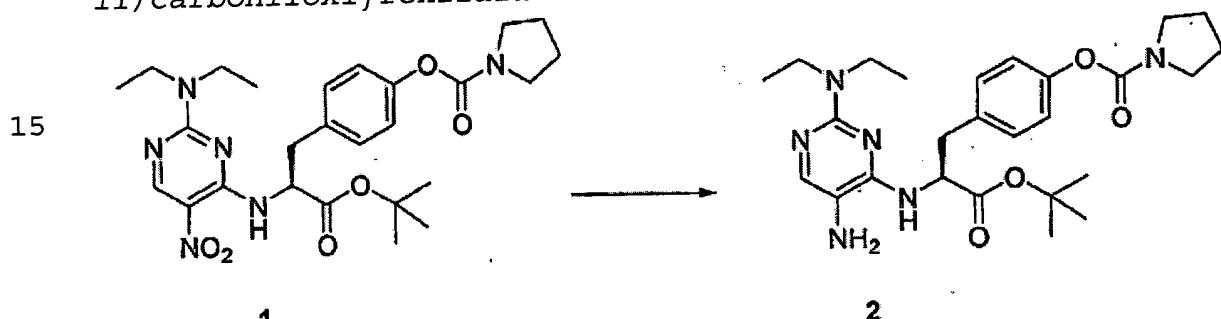
relatada em valores fracionados de prótons.

### Exemplo 1

Preparação de N-[2-dietilamino-5-{N-etil-N-(furan-3-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina



Etapa 1: Preparação de éster terc-butílico de N-[2-dietilamino-5-*{N*-amino}pirimidin-4-il]-L-4'--(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina 2.

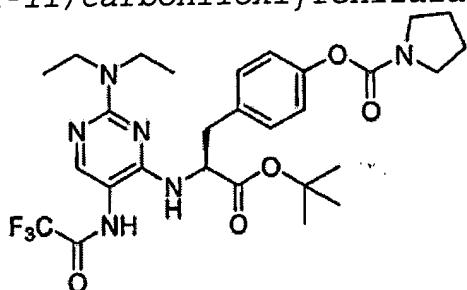


Uma mistura de nitropirimidina-carbamato 1 (160,25 g, 0,3035 mol; preparada como em WO 03/099809) e Pd/C 5% (15 g, 50/50 p/p com H<sub>2</sub>O, Degussa E 101 R/W) em solução THF-água (1 litro de THF e 50 ml de H<sub>2</sub>O) foi agitada sob 413,68 kPa de hidrogênio em temperatura ambiente. Após 22 horas, TLC (EtOAc 50%/hexanos em sílica gel) mostrou 100% de conversão em produto. A mistura de reação foi filtrada através de um absorvente de celite (200 ml). O frasco de hidrogenação e o absorvente de celite foram enxaguados com THF anidro fresco (500 ml), para gerar uma solução do filtrado verde. O filtrado foi concentrado *in vacuo* para gerar o produto bruto como um óleo pegajoso preto

esverdeado. O evaporador rotatório foi descarregado sob N<sub>2</sub>, e THF anidro fresco (600 ml) foi adicionado. A solução foi concentrada *in vácuo*, e descarregada sob nitrogênio (o processo de dissolução em THF anidro fresco e concentração 5 foi repetido duas vezes mais para remover de forma azeotrópica água residual). Esse material é usado imediatamente na Etapa 2 por causa da sensibilidade aparente ao ar. m/z = 499,5 for [M+1]<sup>+</sup> para o produto desejado.

10 *Etapa 2: Preparação de éster terc-butílico de N-[2-dietilamino-5-{N-trifluoracetilamino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi]fenilalanina 3.*

15



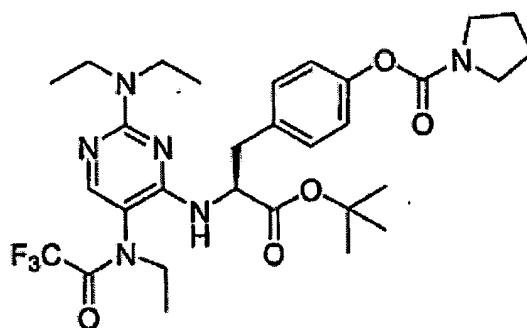
3

O carbamato de aminopirimidina bruto 2 da Etapa 1 foi dissolvido em 600 ml de THF anidro. A solução foi resfriada 20 até 0°C sob nitrogênio. Anidrido trifluoracético (45,5 ml, 1,51 g/ml, 327 3 mmol) foi adicionado lentamente à solução gelada de amina por meio de uma bomba de seringa ao longo de 45 minutos. Permitiu-se que a solução aquecesse até a temperatura ambiente, e ela foi agitada de um dia para o 25 outro. TLC (EtOAc 40% em Hexanos, sílica gel) indicou que a reação estava essencialmente completa. A análise por LC/MS confirmou a reação, e não mostrou nenhum material de partida. A reação foi diluída com acetato de etila (1,4 litro) e foi lavada com uma mistura de água (400 ml) e 30 NaHCO<sub>3</sub> aquoso saturado (700 ml, 0°C). A solução orgânica

foi lavada com salmoura (700 ml) e seca sobre  $MgSO_4$  (105 g) para gerar uma solução marrom-castanha. A solução seca foi filtrada através de um absorvente de sílica gel (400 ml) para gerar uma solução cinza esverdeada (a impureza de cor castanha foi retida na sílica gel). A sílica gel foi enxaguada com  $EtOAc$  (400 ml). A solução do filtrado foi concentrada *in vácuo*, e o frasco foi descarregado sob nitrogênio para minimizar a exposição ao oxigênio. Foi acrescentado tolueno anidro (600 ml). A solução foi 10 concentrada *in vacuo* e foi submetida à azeotropia uma segunda vez por tolueno anidro (400 ml), para gerar um óleo pegajoso preto esverdeado. O frasco foi descarregado sob  $N_2$ . Esse produto bruto,  $m/z = 595,5$  para  $[M+1]^+$ , foi encaminhado à Etapa 3.

15 *Etapa 3: Preparação de éster terc-butílico de N-{2-dietilamino-5-{N-etil-N-trifluoracetilamino}pirimidin-4-il}-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina 4.*

20



4

O carbamato de trifluoracetamidopirimidina bruto 3 da 25 Etapa 2 foi dissolvido em DMF (350 ml). Carbonato de potássio sólido anidro (79,6 g, 575,7 mmol) moído até um pó fino com um pilão e almofariz, e depois colocado em um forno a vácuo a 110°C sob vácuo de 711,20 mmHg de um dia para o outro) foi adicionado. Iodeto de etila (46,5 ml, 30 89,8 g, 575,7 mmol) foi adicionado rapidamente em

temperatura ambiente. O frasco de reação foi tampado firmemente, e o caldo foi agitado vigorosamente. Após agitação em temperatura ambiente por 20 horas, a reação foi testada (TLC, LC/MS). A reação foi agitada por mais 18 5 horas para assegurar o término da reação. Novamente, a reação foi testada e um pequeno exame foi realizado, no qual a análise por TLC indicou o consumo do material de partida. A reação foi diluída com 2,7 litros de acetato de etila e foi agitada vigorosamente. O caldo foi filtrado 10 através de papel de filtro Whatman #1 para a remoção de  $K_2CO_3$  sólido. A solução orgânica foi colocada em um funil de separação de 6 litros. Água (2,5 litros) foi adicionada e misturada vigorosamente. As camadas foram separadas lentamente, depois foi acrescentada (200 ml) para quebrar a 15 emulsão. A camada orgânica foi lavada com mais 1 litro de água, e depois com 2 litros de salmoura.

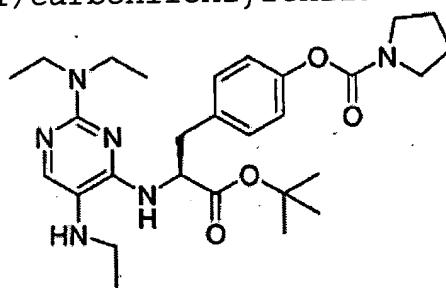
A camada orgânica foi seca sobre  $MgSO_4$  (50 g) e  $Na_2SO_4$  (200 g). A solução seca orgânica foi filtrada através de um tampão de sílica gel (700 ml) para obter uma solução turva 20 de cor verde-oliva acastanhada (uma impureza de base roxa/vermelha foi removida). A sílica gel foi enxaguada com EtOAc (800 ml). A solução orgânica foi concentrada para gerar um sólido verde-oliva (194,3 g, 103% do bruto). Hexano (300 ml) foi adicionado. As laterais do frasco foram 25 raspadas com uma espátula de metal para soltar o produto sólido, e uma barra de agitação magnética foi adicionada ao frasco. A mistura foi girada lentamente por 30 minutos para quebrar os pedaços sólidos, e depois rapidamente por 30 minutos, até que se formasse um caldo fino. O caldo foi 30 filtrado através de papel de filtro Whatman #1, e o

precipitado foi enxaguado com hexano (1,2 litro), para gerar um sólido branco (141 g, 74% de rendimento, 92% puro por LC/MS). O filtrado foi concentrado para gerar uma goma verde acastanhada (33,3 g), a qual, através de análise por 5 TLC, contém um pouco do produto desejado.

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ, ppm: 7,80 (d aparente, 1H), 7,18 (d aparente, AA'XX', 2H), 7,03 (dd aparente, AA'XX', 2H), 5,00 (d aparente, 1H), 4,80 (dq aparente, 1H), 3,95 (dsexto aparente, 1H), 3,4-3,7 (m, 8,5H), 3,0-3,3 (m, 10 3H), 2,78 (sexteto, 0,7H), 1,93 (AA'BB', 4H), 1,38 (d aparente, 9H), 1,24-1,05 (m, 9H). A <sup>1</sup>H RMN mostra rotâmeros, o que é evidenciado pela duplicação da maioria dos picos.

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ, ppm: 166,5, 166,3, 155,6, 152,7, 150,9, 146,0, 145,9, 128,7, 128,3, 125,44, 125,39, 117,18, 77,66, (72,82, 72,28, 71,97 - CDCl<sub>3</sub>), 50,23, 49,74, 41,72, 41,64, 40,16, 39,90, 37,28, 32,60, 32,44, 23,24, 23,17, 21,05, 20,23, 8,50, 8,47, 7,32.

Etapa 4: Preparação de éster terc-butílico de N-[2-dietilamino-5-{N-etylamino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina 5.



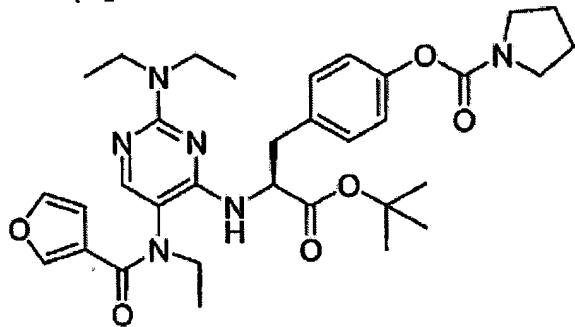
5

A trifluoracetamida 4 (140 g) foi suspensa/dissolvida em metanol (1,6 litro). Uma solução aquosa de carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7%) (480 ml) foi adicionada (a 30 trifluoracetamida se precipitou parcialmente e formou um

gel). O frasco de reação foi reduzido em um banho-maria a 55°C. A solução foi misturada a 55°C, com monitoramento por TLC, ao longo de 9 horas. A reação foi concentrada *in vacuo* muito cuidadosamente, até que 1,2 litro de metanol fosse 5 coletado. A solução foi diluída com água (200 ml) e salmoura (600 ml), e foi extraída com EtOAc (2 litros) para gerar uma solução de cor laranja. A camada de EtOAc foi lavada com água (1 litro), e depois salmoura (400 ml). Cada 10 uma das três camadas aquosas/lavagens foi extraída de volta em ordem seqüencial com um único litro de EtOAc, para obter uma solução amarelo brilhante. Os extratos orgânicos foram combinados e secos sobre MgSO<sub>4</sub> (126 g). A solução orgânica seca foi filtrada através de um absorvente de alumina básica (300 ml), e concentrada *in vacuo* para gerar uma goma 15 marrom. Após azeotropia por 600 ml de tolueno, um sólido avermelhado (117,1 g) foi obtido.

Etapa 5: Preparação de éster terc-butílico de *N*-[2-dietilamino-5-*{N*-etil-*N*-(furan-3-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-*{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}*

20 fenilalanina 6.



25

6

A amino-pirimidina 5 (117,1 g, 222,2 mmol) foi dissolvida em THF anidro (1,5 litro). Base de Hunig, diisopropiletil amina, (115 ml, 3 eq., 666,6 mmol) foi adicionada. A solução foi resfriada até 0°C sob N<sub>2</sub>. O 30 frasco de reação foi equipado com um funil de adição para

igualar a pressão, e o funil de adição foi carregado com uma solução de cloreto de 3-furoila (32 g; Yamamoto & Maruoka; *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 6.133-6.136) em THF (90 ml). A solução de cloreto de furoila foi adicionada 5 lentamente à solução gelada de amina ao longo de duas horas. Permitiu-se que a reação atingisse lentamente a temperatura ambiente, e ela foi agitada por 36 horas. A reação foi diluída com EtOAc (2 litros) e lavada duas vezes com 0,2 N de ácido cítrico (1,2 litro e 1,0 litro), uma vez 10 com salmoura (1,8 litro), e uma vez com NaHCO<sub>3</sub> aquoso saturado (1,3 litro). A solução orgânica de cor laranja-rosa brilhante foi seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (250 g) e MgSO<sub>4</sub> (51 g). A solução seca foi filtrada através de um absorvente de 15 sílica gel (1 litro), e o frasco e a sílica foram enxaguados com EtOAc (1 litro). A solução foi concentrada *in vacuo*. Durante o processo de evaporação, cristalizou-se um sólido branco. Após a solução estar totalmente concentrada, foi obtido um sólido da cor laranja, rosa e branca. Foram acrescentados éter (400 ml) e hexanos (500 20 ml). O caldo foi misturado cuidadosamente, e filtrado através de papel de filtro Whatman #1, para obter um sólido de coloração pêssego-rosa e um filtrado vermelho brilhante. O precipitado foi enxaguado com hexanos (500 ml), éter (800 ml), e novamente hexanos (400 ml), para obter um sólido de 25 coloração pêssego-alaranjada. O filtrado e os enxágües foram combinados, concentrados, e colocados de lado para serem usados posteriormente. O sólido foi seco em um forno a vácuo a 60°C por dois dias, sob um vácuo de 711,20 mmHg (49 Torr), para gerar 100,0 g. LC/MS mostrou que o sólido 30 era 92% puro. O éster bruto 6 foi submetido à cromatografia

em 2 litros (1 kg) de sílica gel que havia sido embalada com 3 litros de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . O éster do produto de cor de pêssego foi dissolvido em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml) e foi aplicado à coluna de sílica de 2 litros. A coluna foi eluída com 5  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 litros), EtOAc 50% em hexanos (4 litros) e EtOAc 75% em hexanos (4 litros). Em poucos minutos, éster do produto desejado começou a se cristalizar de várias das frações de EtOAc-hexano. As frações que foram constatadas puras por TLC foram concentradas, para gerar um sólido 10 branco (82,5 g, pureza >99% por LC/MS). Esse material puro foi encaminhado à etapa final de desproteção. As frações que se mostraram por TLC contaminadas foram combinadas com o resíduo dos enxágües originais de filtrado/hexano e éter. Esse material foi submetido à cromatografia instantânea de 15 forma similar àquela descrita acima, para gerar um sólido com coloração ligeiramente de pêssego (13,2 g;  $m/z$  = 621,5 para  $[\text{M}+1]^+$ ).

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ , ppm: 7,58 (d aparente, 1H), 7.35-6.90 (AB aparente superposto com ABX, 6H), 6,45 (d aparente, 1H), 5,25 (d aparente, 1H), 4,85 (dq aparente, 1H), 4.05 (octeto aparente, 1H), 3,7-3,4 (m, 8H), 3,0-3,3 (m, 2,5H), 2,90 (sexteto, 0,5H), 1,93 (AA'BB', 4H), 1,38 (d aparente, 9H), 1,24-1,05 (m, 9H). A  $^1\text{H}$  RMN mostra rotâmeros, o que é evidenciado pela duplicação da maioria 25 dos picos.

*Etapa 6. Preparação de N-[2-dietilamino-5-{N-etil-N-(furan-3-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'--{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina.*

Ao éster *t*-butílico 6 da Etapa 5 (82,5 g, 132,7 mmol), 30 foi adicionado ácido fórmico (2 litros). A solução

resultante foi aquecida até 50°C de um dia para o outro. A análise por TLC verificou a reação completa, e a solução foi concentrada *in vacuo*. Água (~200 ml) foi adicionada ao produto bruto, e a mistura foi concentrada até seca. Mais 5 150 ml de água foram acrescentados, e o produto bruto foi concentrado *in vacuo* novamente. O produto sólido branco bruto foi concentrado por iPrOH, e duas vezes por THF anidro, e depois seco no evaporador rotatório a 45°C e 35-40 mbar (26-30 Torr) de um dia para o outro, para obter 90 10 g de sólido branco. LC/MS mostrou que o produto bruto era 97,7% puro.

15  $^1\text{H}$  RMN (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta$ , ppm: 7,65 (s, 0,55H), 7,45 (s, 0,45H), 7,38 (m, 2H), 7,25 (d, 1,3H), 7,18 (d, 1H), 7,05 (d, 1,2H), 6,90 (d, 1H), 6,55 (s, 0,55H), 6,22 (s amplo, 0,45H), 4,9-4,8 de pico de solvente residual superposto com pico da amostra, 4,10 (septeto aparente, 1,1H), 3,7 (m, 3,3H), 3,58 (m, 7H), 3,45-2,9 (in, 6H), 2,78 (sexteto aparente, 0,7H), 1,90 (AA'BB', 4,5H), 1,85 (m, 3,16H), 1,23-1,0 (m, 10,3H).

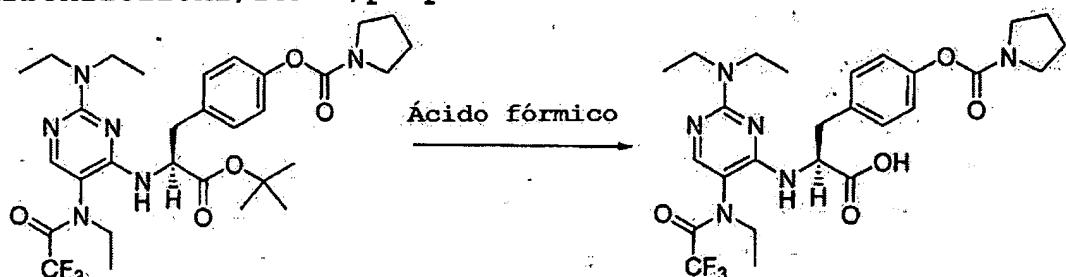
20  $^{13}\text{C}$  RMN (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz)  $\delta$ , ppm: 169,6, 169,2, 160,8, 153,9, 153,6, 148,8, 145,8, 145,2, 145,1, 140,7, 140,5, 138,0, 137,9, 130,3, 130,2, 124,7, 124,6, 116,5, 116,4, 116,2, 116,1, 106,9, 106,6, 105,1, 105,0, 62,4, 50,7, 50,1, 41,0, 37,9, 37,2, 30,5, 20,2, 20,0, 19,4, 6,9, 6,8, 6,1, 25 5,9.

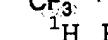
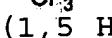
Os Exemplos 2-7 abaixo foram preparados de forma similar ao Exemplo 1.

#### Exemplo 2

30 Preparação de ácido (S)-2-(2-(dietilamino)-5-(N-etyl-2,2,2-trifluoracetamido)pirimidin-4-ilamino)-3-(4-(pirrolidina-1-

### carboxiloiloxi)fenil)propanóico

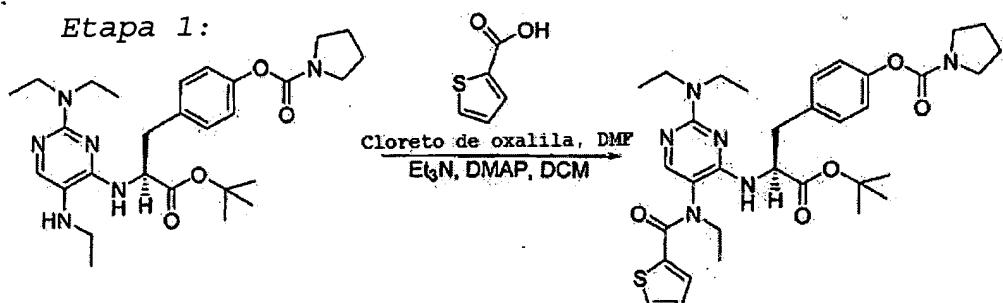


5   <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1,03 (1,5 H, t, J = 7,2 Hz), 1,10-1,28 (7,5H, m), 1,98 (4H, m), 2,67-2,85 (0,5 H, m), 2,90-3,05 (0,5 H, m), 3,05-3,38 (2H, m, superposto com CD<sub>3</sub>OD), 3,41 (2H, m), 3,58 (6H, m), 3,90-4,11 (1H, m), 4,85-4,90 (1H, superposto com CD<sub>3</sub>OD), 7,02 (2H, m), 7,26 (2H, m), 7,66 (1H, d, J = 8,7 Hz).  
10 HPLC/EM: MH<sup>+</sup> = 567,1.

### Exemplo 3

Preparação de N-[2-dietilamino-5-{N-etil-N-(tien-2-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina

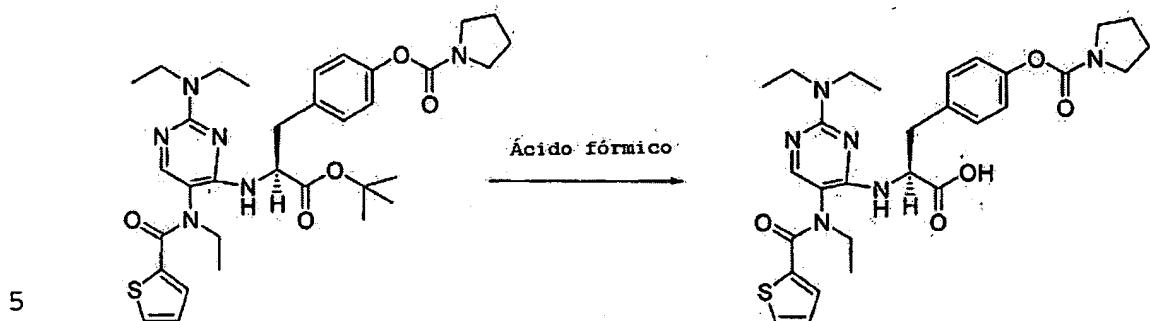
### *Etapa 1:*



<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,09-1,17 (3H, m), 1,23-1,26  
 (3H, m), 1,47 (12H, m), 1,87-1,99 (4H, m), 2,80 (0,4H, br  
 s), 3,10 (1,6H, m), 3,20 (1H, m), 3,44 (2H, t, J = 6,0 Hz),  
 3,54 (2H, t, J = 6,0 Hz), 3,88-4,15 (3H, m), 4,80-4,85 (1H,  
 m), 6,48 (0,6H, br s), 6,75 (0,4H, s), 6,69-7,08 (5H, m),  
 7,41 (1H, s), 7,50 (1H, s), 7,78 (0,4 H, br s), 7,85 (0,6H,  
 br s).

HPLC/EM:  $\text{MH}^+ = 637, 2.$

30 *Etapa 2:*

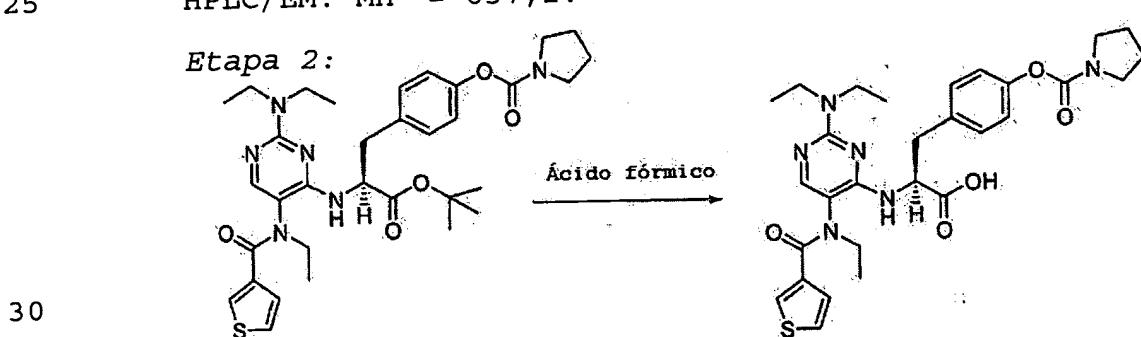
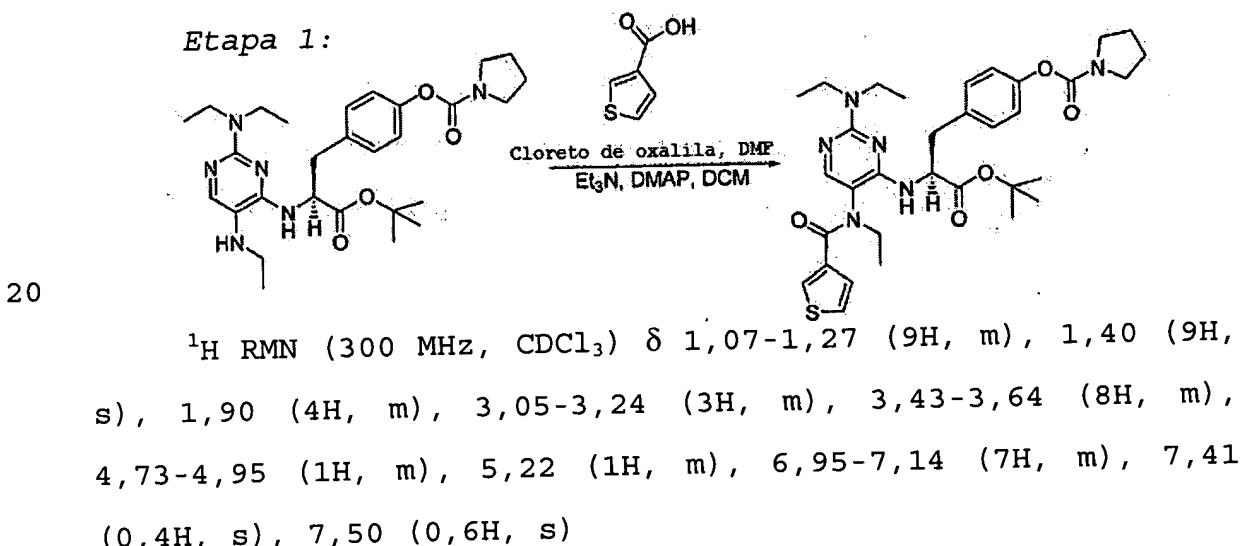


10  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,90 (3H, t,  $J$  = 6,9 Hz), 1,10-1,30 (6H, m); 1,85-1,94 (4H, m), 2,85-3,24 (2,4H, m), 3,35 (8,6H, m), 4,00-4,15 (1H, m), 4,55 (0,4H, br s), 4,73 (0,6H, br s), 5,85 (0,6H, d,  $J$  = 5,7 Hz), 5,87 (0,4H, br s), 6,60-7,12 (5,4H, m), 7,39 (1H, m), 7,60-7,68 (1,6H, m).

15 HPLC/EM:  $\text{MH}^+ = 581,2$ .

#### Exemplo 4

Preparação de N-[2-dietilamino-5-{N-ethyl-N-(tien-3-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina



<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ 0,70-1,4 (9H, m), 1,81-2,08 (4H, m), 2,62-4,10 (12H, m), 4,95 (1H, br s), 6,90-8,07 (8H, m).

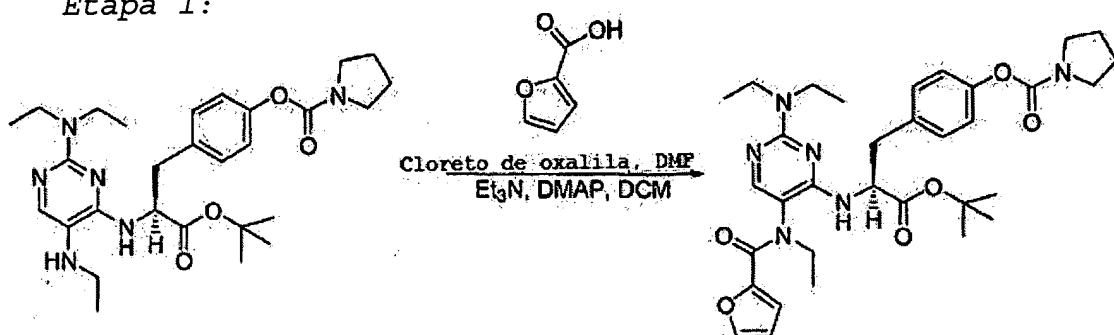
HPLC/EM: MH<sup>+</sup> = 581,2.

5 Exemplo 5

Preparação de N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(furan-2-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'--{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina

Etapa 1:

10



15

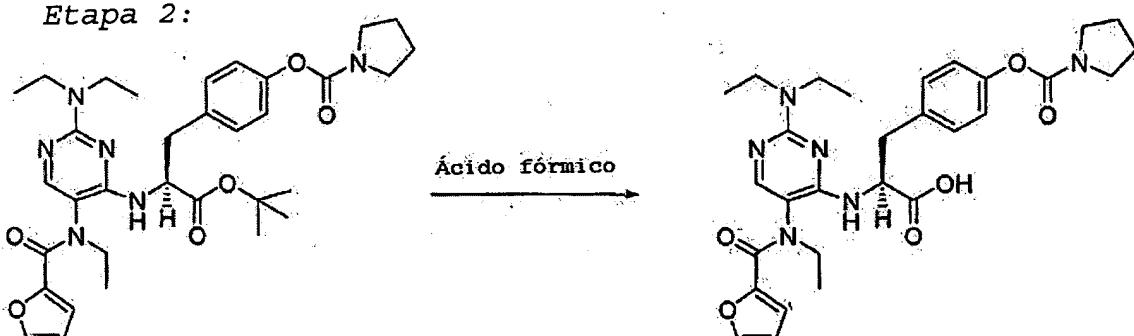
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,15-1,28 (9H, m), 1,37 (3,6H, s), 1,42 (5,4H, s), 1,93- 2,05 (4H, m), 2,85-3,15 (2 H, m), 3,19-3,35 (1 H, m), 3,45-3,75 (8H, m), 3,90-4,15 (1H, m), 4,76-4,85 (0,4H, m), 4,90-5,00 (0,6H, m), 5,15- 5,22 (1 H, m), 6,20-6,40 (2H, m), 6,91-7,18 (4H, m), 7,39 (1 H, s), 7,58 (0,4H, s), 7,65 (0,6H, s).

20

HPLC/EM: MH<sup>+</sup> = 621,3.

Etapa 2:

25



<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0,84-1,25 (9H, m), 1,85-1,92

(4H, m), 2,70-2,81 (0,5H, m), 2,92-3,30 (2,5 H, m,

30 superposto com CD<sub>3</sub>OD), 3,30-3,38 (2H, m), 3,45-3,59 (6H,

m), 4,04-4,12 (1 H, m), 4,80-4,89 (1 H, superposto com CD<sub>3</sub>OD), 6,18 (1H, m), 6,58 (0,5H, br s), 6,78 (0,5H, br s), 6,83 (1H, d, *J* = 8,1 Hz), 6,92 (1H, d, *J* = 8,1 Hz), 7,06 (1 H, d, *J* = 8,1 Hz), 7,19 (1H, d, *J* = 8,1 Hz), 7,38 (0,5H, br s), 7,44 (0,5H, s), 7,47 (0,5H, br s), 7,48 (0,5H, s).

HPLC/EM:  $\text{MH}^+ = 565, 2.$

### Exemplo 6

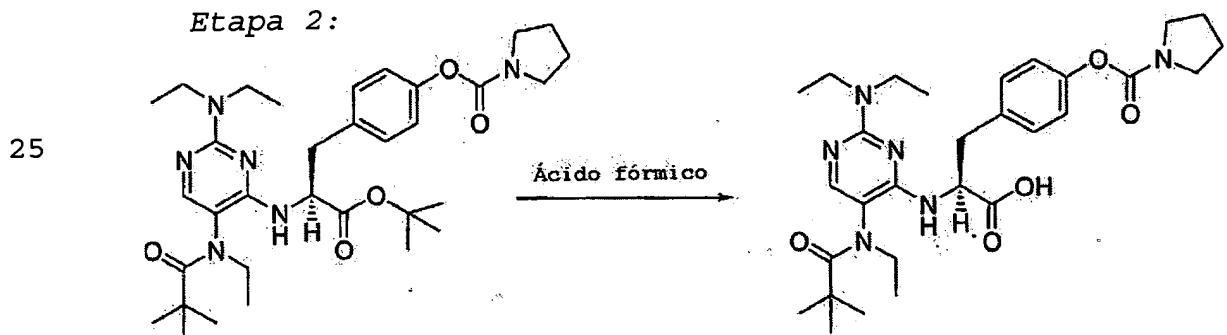
Preparação de N-[2-dietilamino-5-{N-etil-N-(t-butilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi]fenilalanina

### Etapa 1:



HPLC/EM:  $MH^+$  = 611,3.

### *Etapa 2:*



<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0,86-1,20 (18H, m), 1,87  
 30 (4H, m), 2,32-2,45 (0,5H, m), 2,56-2,68 (0,6H, m), 3,05-

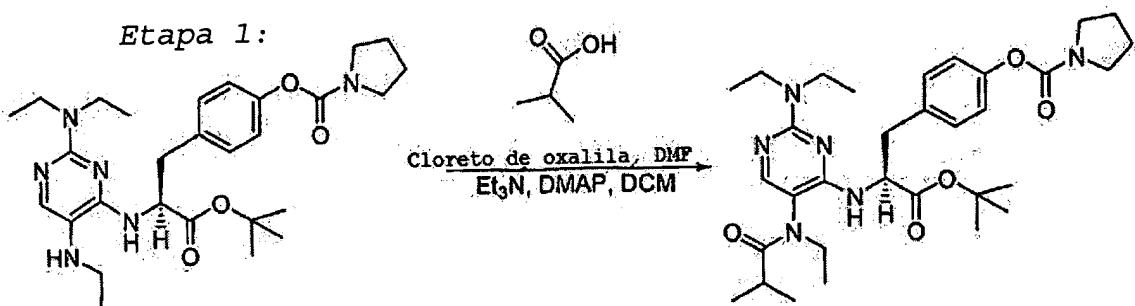
3,20 (2H, m), 3,29-3,38 (2H, m), 3,43-3,52 (6H, m), 3,8-3,99 (1H, m), 4,75-4,82 (1H, superposto com CD<sub>3</sub>OD), 6,90 (2H, d, *J* = 9,0 Hz), 7,15 (2H, d, *J* = 9,0 Hz), 7,43 (1H, s).

5 HPLC/EM: MH<sup>+</sup> = 555,2.

**Exemplo 7**

**Preparação de N-[2-dietilamino-5-{N-etil-N-(isopropilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina**

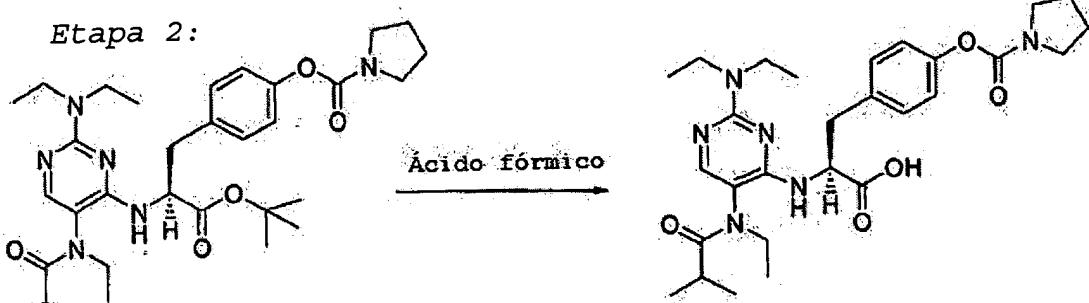
10 **Etapa 1:**



15 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,90-1,21 (15H, m), 1,38 (9H, s), 1,92 (4H, m), 2,28-2,50 (1H, m), 2,80-3,16 (3H, m), 3,41-3,70 (8H, m), 3,80-3,95 (1H, m), 4,71-4,85 (1H, m), 5,05-5,11 (1H, m), 7,00-7,08 (2H, m), 7,08-7,16 (2H, m), 7,65 (1H, d, *J* = 5,0 Hz).

20 HPLC/EM: MH<sup>+</sup> = 597,3 10.

**Etapa 2:**



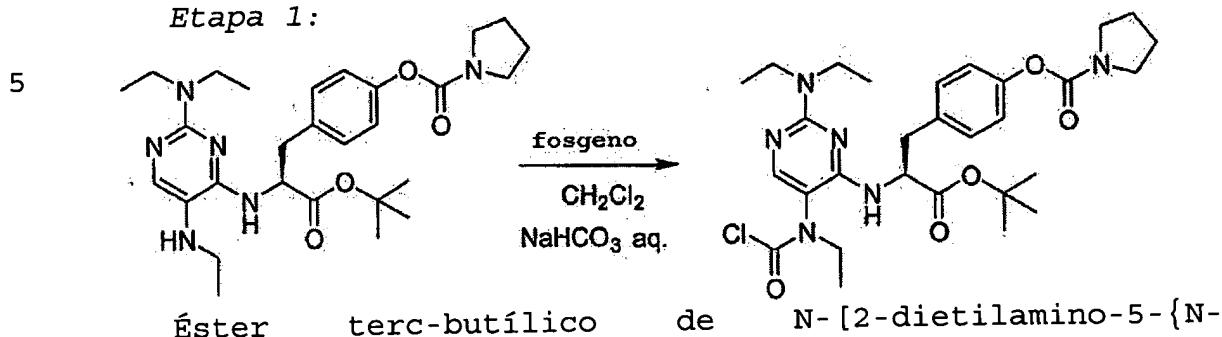
25 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0,80-0,98 (9H, m), 1,15-1,19 (6H, m), 1,88 (4H, m), 2,20-2,42 (1H, m), 2,65-2,83 (1H, m), 3,08-3,25 (2H, m), 3,26-3,59 (8H, m), 3,88-3,97 (1H, m), 4,70-5,05 (1H, superposto com CD<sub>3</sub>OD), 6,92 (2H, d, *J* = 7,8 Hz), 7,17 (2H, m), 7,63 (1H, d, *J* = 5,0 Hz).

HPLC/EM:  $MH^+$  = 541,3.

### Exemplo 8

## Método geral para a preparação de pirimidinil uréias.

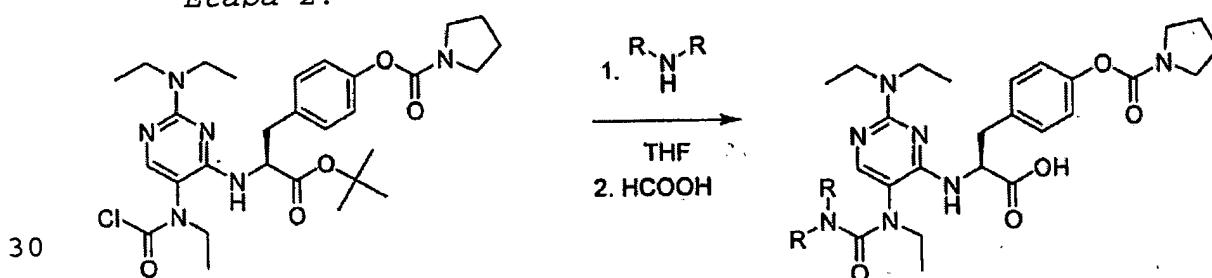
### *Etapa 1:*



10 etilamino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)  
 carbonilóxi}fenilalanina (0,436 g, 0,83 mmol) foi  
 dissolvido em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0,35 ml) e  $\text{NaHCO}_3$  saturado (0,7 ml). A  
 solução foi resfriada até zero grau, e agitada  
 vigorosamente por 10 minutos. Após 10 minutos, a agitação  
 15 foi interrompida e permitiu-se que as camadas imiscíveis se  
 separassem. Fosgeno (0,52 ml, 4,97 mmol) foi adicionado à  
 camada do fundo por meio de uma seringa. A mistura de  
 reação foi agitada sob  $\text{N}_2$  por três horas. Com o término, a  
 camada orgânica foi separada e foi concentrada *in vacuo* em  
 20 temperatura ambiente. Ela foi re-dissolvida em EtOAc e  
 lavada com água deionizada e extraída de volta duas vezes.  
 A camada orgânica foi seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrada *in  
 vacuo*. O óleo bruto foi encaminhado à etapa seguinte sem  
 purificação.

25 HPLC/MS:  $MH^+ = 589,0.$

## Etapa 2:

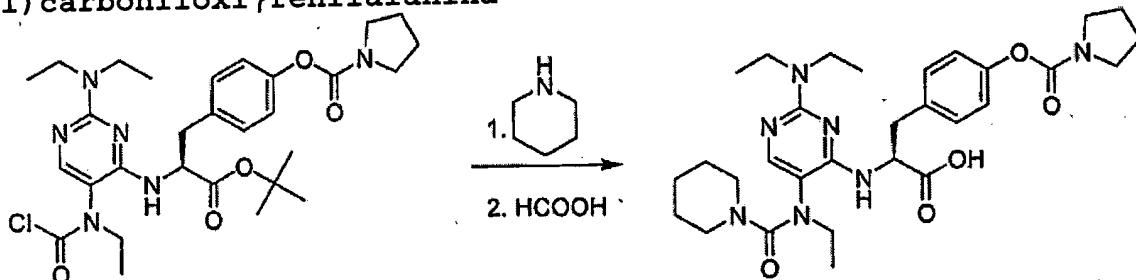


Cloreto de carbamila bruto (1 eq.) e amina (5 eq.) foram dissolvidos em THF (0,2 M) e agitados de um dia para o outro sob N<sub>2</sub>. A mistura de reação foi concentrada *in vacuo* e re-dissolvida em acetato de etila. A camada orgânica foi lavada com água, seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrada *in vacuo*. Os produtos foram purificados por HPLC. Os produtos foram tratados com HCOOH como solvente a 40°C de um dia para o outro. O solvente foi removido sob pressão reduzida e os produtos foram obtidos.

Exemplos 9-11 foram preparados de acordo com o Exemplo 8.

**Exemplo 9**

Preparação de N-[2-dietilamino-5-{N-etil-N-(piperidin-1-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina

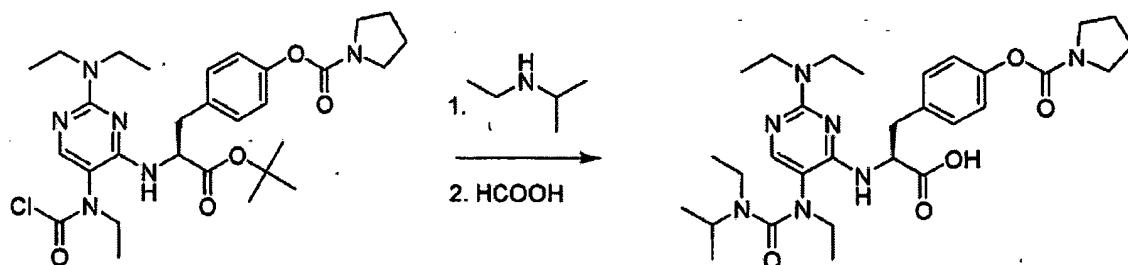


<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,01 (3 H, t, J = 7 Hz), 1,22 (6 H, t, J = 7 Hz), 1,36 (4 H, m), 1,49 (2 H, m), 1,95 (4 H, m), 3,10-3,66 (16 H, m), 4,86-4,92 (1 H, m), 6,75 (1 H, d, J = 7,2 Hz), 7,25 (2 H, d, J = 8,4 Hz), 7,14 (2 H, d, J = 8,4 Hz), 7,64 (1 H, s).

HPLC/MS: MH<sup>+</sup> = 582,3.

**Exemplo 10**

Preparação de N-[2-dietilamino-5-{N-etil-N-(N-etil-N-isopropilaminocarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina

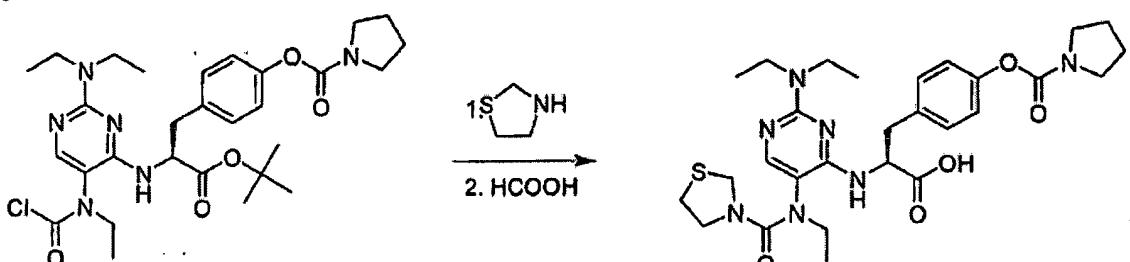


5         <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,01 (9 H, br s), 1,21 (9 H, m), 1,90-1,99 (4 H, m), 2,98 (2 H, m), 3,15 (3 H, m), 3,33 (1 H, m), 3,45 (2 H, m), 3,52-3,60 (6 H, m), 3,76 (1 H, m), 4,91-4,97 (1 H, br s), 6,64 (1 H, br s), 7,04 (2 H, d, *J* = 8 Hz), 7,14 (2 H, d, *J* = 8 Hz), 7,66 (1 H, s).

10         HPLC/MS: MH<sup>+</sup> = 584,4.

### Exemplo 11

Preparação de N-[2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(3-tiapirrolidin-1-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}fenilalanina



15         <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,03 (3 H, t, *J* = 6,6 Hz), 1,21 (6 H, t, *J* = 6,6 Hz), 1,90-1,99 (4 H, m), 2,84 (2 H, t, *J* = 6 Hz), 3,09-3,63 (14 H, m), 4,06-4,14 (2 H, q, *J* = 7,8 Hz), 4,91-4,97 (1 H, m), 6,64 (1 H, d, *J* = 7 Hz), 7,04 (2 H, d, *J* = 8,4 Hz), 7,13 (2 H, d, *J* = 8,4 Hz), 7,75 (1 H, s).

20         HPLC/MS: MH<sup>+</sup> = 586,2.

### Exemplo A

Ensaio de adesão de integrina α4β1: adesão celular de Jurkat<sup>TM</sup> à fibronectina do plasma humano

#### Procedimento

30         Placas de 96 poços (placas Costar 3590 EIA) foram

revestidas com fibronectina humana (Gibco/BRL, cat. # 33016-023) em uma concentração de 10 µg/ml de um dia para o outro a 4°C. As placas foram então bloqueadas com uma solução de albumina sérica bovina (BSA; 0,3%) em soro fisiológico. Células Jurkat™ (mantidas em crescimento em fase log) foram marcadas com Calceína AM de acordo com as instruções do fabricante, e suspensas em uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/ml em Hepes/soro fisiológico/BSA. As células foram então expostas aos compostos de teste e de controle por 30 minutos em temperatura ambiente, antes de serem transferidas para poços individuais da placa revestida com fibronectina. Permitiu-se a ocorrência da adesão por 35 minutos a 37°C. Os poços foram então lavados por aspiração e pipetagem suaves com soro fisiológico fresco. A fluorescência associada às células aderentes restantes foi quantificada com a utilização de uma leitora de fluorescência de placas a EX 485/EM 530.

Foram preparadas culturas de células inicialmente dividindo-se as células Jurkat™ em fase estacionária a 1:10 no primeiro dia, e 1:2 no segundo dia, para realizar o ensaio no 3º dia. As células divididas a 1:10 no primeiro dia foram divididas a 1:4 no 3º dia para um ensaio no 4º dia.

As placas do ensaio foram preparadas fazendo-se inicialmente uma solução de trabalho de Fibronectina Humana GibcoBRL (cat. # 33016-023) em PBS++, a 10 µg/ml. Uma placa Costar 3590 EIA foi então revestida com 50 µl/poço por 2 horas em temperatura ambiente (embora ela também possa ser deixada de um dia para o outro a 4°C). Finalmente, a placa foi aspirada e bloqueada com tampão de Hepes/soro

fisiológico, 100  $\mu$ l/poço, por 1 hora em temperatura ambiente seguida por lavagem três vezes com 150  $\mu$ l de PBS++.

As diluições dos compostos foram feitas preparando-se 5 diluições seriais 1:3 dos compostos da seguinte forma: para cada placa (4 compostos/placa), 600  $\mu$ l foram adicionados a 4 Titertubes Bio-Rad em uma prateleira de Titertubes. Foi adicionada uma quantidade suficiente de composto a cada tubo apropriado para gerar uma concentração de 2X com o uso 10 de métodos bem conhecidos na técnica. Utilizando-se Flexiplates Falcon, 100  $\mu$ l de tampão de Hepes/soro fisiológico ou soro humano foram adicionados às Fileiras B a G. Foi usado um pipetador de multicanais ajustado em 180  $\mu$ l com quatro pontas espaçadas igualmente no pipetador. 15 Cada conjunto de quatro tubos foi misturado 5 vezes, e 180  $\mu$ l de composto 2X foram transferidos para a primeira coluna de cada diluição do composto na Fileira B, deixando a Fileira A vazia. Foram adicionados 180  $\mu$ l aos outros poços na Fileira A. Foram realizadas diluições seriais na placa 20 transferindo-se 50  $\mu$ l à diluição seguinte e misturando-se 5 vezes, mudando as pontas a cada vez após a mistura. As diluições foram interrompidas na Fileira F. A Fileira G não tinha composto presente.

Uma solução de 20  $\mu$ g/ml em tampão de Hepes/soro 25 fisiológico ou soro humano, de anticorpo 21/6, foi o controle positivo e foi colocado de lado em um reagente para ser adicionada à placa de suspensão de células.

A coloração das células foi obtida colhendo-se 30 inicialmente as células Jurkat<sup>TM</sup> em fase log por centrifugação em tubos de 50 ml (1.100 rpm por 5 minutos).

As células foram re-suspensas em 50 ml de PBS++, centrifugadas e re-suspensas em 20 ml de PBS++. As células foram coradas pela adição de 20  $\mu$ l de Calceína AM por 30 minutos em temperatura ambiente. O volume foi trazido até 5 50 ml com tampão de Hepes/soro fisiológico, e as células foram contadas, centrifugadas e re-suspensas até  $2 \times 10^6$  células/ml em tampão de Hepes/soro fisiológico ou soro humano.

Os compostos foram incubados com o uso do seguinte 10 procedimento: em uma nova *flexiplate*, 65  $\mu$ l de células coradas foram adicionados às Fileiras B a H. A seguir, 65  $\mu$ l de compostos 2X foram adicionados às fileiras apropriadas de acordo com a disposição das placas, e misturados 3X. Foram adicionados 65  $\mu$ l de anticorpo 2X-21/6 15 à Fileira H, e misturados 3X. Finalmente, a placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos.

A adesão de fibronectina foi medida com o uso de uma leitora de placas fluorescentes a EX 485/EM 530 após o procedimento de desenvolvimento seguinte. Após incubação, 20 as células foram misturadas 3X, e 100  $\mu$ l foram transferidos para as placas revestidas com fibronectina, e incubadas a 37°C por cerca de 35 minutos. Cada placa foi lavada, fileira a fileira, pipetando-se suavemente 100  $\mu$ l de PBS++ 25 em temperatura ambiente pelas laterais dos poços, e virando-se a placa 90 graus para aspiração. Esse procedimento foi repetido por um total de 3 lavagens. Cada poço foi preenchido com 100  $\mu$ l após a lavagem por pipetagem pela lateral do poço.

Foi calculado um valor de  $IC_{50}$  para cada composto, 30 tanto na presença do soro humano quanto na sua ausência. A

$IC_{50}$  é a concentração na qual o crescimento ou a atividade é inibido em 50%. Verificou-se que todos os compostos aqui revelados têm uma  $IC_{50}$  de menos de 10  $\mu M$ , quando testados de acordo com o ensaio de fibronectina.

5   **Exemplo B**

**Adesão celular à fibronectina do plasma humano. Ensaio de saturação *in vitro* para determinação da ligação de compostos candidatos à  $\alpha 4\beta 1$**

A seguir, será descrito um ensaio *in vitro* para 10 determinar os níveis plasmáticos necessários para que um composto seja ativo no modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental ("EAE"), descrito no exemplo seguinte, ou em outros modelos *in vivo*. Células Jurkat<sup>TM</sup> em crescimento log são lavadas e re-suspensas em plasma animal normal contendo 15 20  $\mu g/ml$  do anticorpo 15/7 (Yednock, e cols., *J. Biol. Chem.*, (1995) 270(48): 2.8740).

As células Jurkat<sup>TM</sup> são diluídas duas vezes em amostras de plasma normal contendo quantidades conhecidas do composto candidato em várias concentrações que variam de 20 66  $\mu M$  a 0,01  $\mu M$ , com o uso de uma diluição serial padronizada de 12 pontos para uma curva-padrão, ou em amostras de plasma obtido do sangue periférico de animais tratados com o composto candidato.

As células são então incubadas por 30 minutos em 25 temperatura ambiente, lavadas duas vezes com soro fisiológico tamponado com fosfato ("PBS") contendo soro fetal bovino 2% e 1 mM de cada um de cloreto de cálcio e cloreto de magnésio (meio de ensaio) para a remoção de anticorpo 15/7 não ligado.

30       As células são então expostas a Fc de  $F(ab')_2$  anti-

camundongo de IgG de cabra conjugado à ficoeritrina (Immunotech, Westbrook, ME), que foi adsorvido para qualquer reatividade cruzada inespecífica por co-incubação com soro 5% da espécie animal que estiver sendo estudada, a 5 1:200, e incubadas no escuro a 4°C por 30 minutos.

As células são lavadas duas vezes com meio de ensaio, e re-suspensas no mesmo. Elas são então analisadas com uma análise por classificador-padrão de células ativadas por fluorescência ("FACS"), como descrito em Yednock e cols., 10 *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 28.740.

Os dados são então colocados em um gráfico de fluorescência versus dose, por exemplo, na forma de uma dose-resposta normal. Os níveis de dose que resultam no platô superior da curva representam os níveis necessários 15 para se obter eficácia em um modelo *in vivo*.

Esse ensaio também pode ser usado para determinar os níveis plasmáticos necessários para saturar os sítios de ligação de outras integrinas como, por exemplo, a integrina  $\alpha_9\beta_1$ , que é a integrina mais intimamente relacionada à  $\alpha_4\beta_1$  20 (Palmer e cols., 1993, *J. Cell Bio.*, 123: 1.289). Essa ligação é preditiva da utilidade *in vivo* para as condições inflamatórias mediadas pela integrina  $\alpha_9\beta_1$ , incluindo, como exemplo, a hiper-reatividade das vias aéreas e a oclusão 25 que ocorrem com asma crônica, proliferação de células de músculo liso na aterosclerose, oclusão vascular após angioplastia, fibrose e cicatrização glomerular em consequência de doença renal, estenose aórtica, hipertrofia de membranas sinoviais na artrite reumatóide e inflamação e cicatrização que ocorrem com a progressão da colite 30 ulcerativa e da doença de Crohn.

Conseqüentemente, o ensaio descrito acima pode ser realizado com uma linhagem de células de carcinoma de cólon humano, SW 480 (ATTC # CCL228) transfectadas com cDNA que codifica integrina  $\alpha_9$  (Yokosaki e cols., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 26.691), no lugar das células Jurkat, para medir a ligação da integrina  $\alpha_9\beta_1$ . Como controle, podem ser usadas células SW 480 que expressam outras subunidades  $\alpha$  e  $\beta_1$ .

Conseqüentemente, outro aspecto desta invenção é dirigido a um método para o tratamento de uma doença em um paciente mamífero, cuja doença é mediada por  $\alpha_9\beta_1$ , e cujo método compreende a administração ao referido paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto desta invenção. Esses compostos são administrados preferivelmente em uma composição farmacêutica aqui descrita acima. A dosagem diária eficaz dependerá da idade, do peso, da condição do paciente, e esses fatores podem ser facilmente verificados pelo médico assistente. No entanto, em uma modalidade preferida, os compostos são administrados em uma dose de cerca de 20 a 500 pg/kg por dia.

#### **Exemplo C**

#### **Dosagem do cassete e análise sérica para determinação de biodisponibilidade**

A biodisponibilidade oral é verificada por dosagem de 25 ratos com um cassete, ou seja, uma mistura de 6 compostos por solução de dosagem. O cassete inclui 5 artigos de teste e um composto-padrão, para uma dose total de 10 mg/kg. Cada composto/artigo de teste é convertido no sal sódico com 1 N de NaOH eqüimolar, e dissolvido em água a 2 mg/ml. O cassete é preparado por mistura de volumes iguais de cada

uma das seis soluções. A solução de dosagem do cassete é bem misturada, e depois o pH era ajustado em 7,5-9. A solução de dosagem é preparada no dia anterior ao estudo, e é agitada de um dia para o outro em temperatura ambiente.

5        Machos de ratos Sprague Dawley (SD) de "Charles River Laboratories", com 6-8 semanas de idade, foram usados nesse estudo. Os ratos foram colocados em quarentena por pelo menos um dia, e tinham acesso contínuo a alimentos e água. Na noite anterior à administração do cassete, os ratos  
10       faziam um jejum de aproximadamente 16 horas.

Quatro ratos SD foram distribuídos em cada cassete. Uma dose única da solução de dosagem foi administrada oralmente a cada rato. O volume de dosagem (5 ml/kg) e o momento foram registrados, e os ratos foram alimentados 2  
15       horas após a dosagem.

Foram coletadas amostras de sangue por meio de punção cardíaca nos seguintes momentos: 4 horas, 8 horas e 12 horas. Imediatamente antes da coleta de sangue, os ratos eram anestesiados com gás CO<sub>2</sub> em até 10-20 segundos. Depois  
20       da coleta das amostras de 12 horas, os ratos foram submetidos à eutanásia por meio de asfixia com CO<sub>2</sub>, seguida por deslocamento cervical.

As amostras de sangue foram mantidas em tubos *microtainer* heparinizados sob temperatura abaixo da  
25       temperatura ambiente (4°C) antes de serem processadas. Elas foram centrifugadas (10.000 rpm por 5 minutos), e as amostras de plasma foram removidas e estocadas em um congelador a -20°C até serem analisadas quanto aos níveis de fármaco. Os níveis de fármaco no plasma foram analisados  
30       com a utilização do protocolo a seguir para precipitação

direta do plasma.

As amostras de plasma *in vivo* foram preparadas em uma placa de 1,5 ml de 96 poços, por adição, em ordem, de 100  $\mu$ l do plasma de teste, 150  $\mu$ l de metanol, seguido por 5 turbilhonamento por 10-20 segundos. Cento e cinqüenta  $\mu$ l de 0,05 ng/ $\mu$ l de um Padrão Interno em acetonitrila foram acrescentados e turbilhonados por 30 segundos.

As amostras da curva-padrão foram preparadas em uma placa de 1,5 ml de 96 poços, por adição, em ordem, de 100 10  $\mu$ l de plasma de camundongo de controle, seguidos por 150  $\mu$ l de metanol e turbilhonamento por 10-20 segundos. Cento e cinqüenta 150  $\mu$ l de 0,05 ng/ $\mu$ l de um Padrão Interno em acetonitrila foram adicionados e turbilhonados por 30 segundos. As amostras receberam 0-200 ng (10 concentrações) 15 do composto de interesse em metanol 50% para obter uma faixa da curva-padrão de 0,5 ng/ml a 2.000 ng/ml. Novamente, a amostra é turbilhonada por 30 segundos.

As amostras são centrifugadas por 20-30 minutos a 3.000 rpm em uma microcentrífuga Eppendorf, antes de 20-90% de sobrenadante serem transferidos em uma placa limpa de 96 poços. O solvente orgânico é então evaporado até que as amostras estejam secas (sob N<sub>2</sub> a 40°C/30-60 minutos (ZymarkTurbovap)).

O resíduo é então dissolvido em fase móvel de 200-600 25 litros (CH<sub>3</sub>OH 50%/TFA 0,1%). É então executada LC/MS/MS com o uso de um espectrômetro de massa triplo quadripolar PE-Sciex API-3000 (SN0749707), Perkin-Elmer, autosampler Série 200 e uma bomba Shimadzu 10A. A aquisição é feita com um Analisador PE-Sciex (v 1.1) e a análise e a quantificação 30 dos dados foram feitas com o uso de um Analisador PE-Sciex

(v 1.1). Um volume de amostra de 5-50  $\mu$ l foi injetado em uma coluna de fase reversa Thermo Hypersil DASH-18 (Keystone 2,0 x 20 mm, 5  $\mu$ m, PN: 8823025-701) usando uma fase móvel de CH<sub>3</sub>OH 25%, TFA 0,1%- CH<sub>3</sub>OH 100%, TFA 0,1%. O tempo de execução é de cerca de 8 minutos, em uma taxa de fluxo de cerca de 300  $\mu$ l/minutos.

A Área Sob a Curva (AUC) é calculada com o uso de uma regra trapezoidal linear de t = 0 para o último tempo de amostragem t<sub>x</sub> (veja "Handbook of Basic Pharmacokinetics", 10 Wolfgang A. Ritschel e Gregory L. Kearns, 5<sup>a</sup> ed, 1999).

$$AUC^{0 \rightarrow t_x} = \chi((C_n + C_{n+1})/2) \chi (t_{n+1} - t_n) [(\mu\text{g/mL})\text{h}]$$

No caso do paradigma da dosagem do cassete, amostras em 4, 8 e 12 horas após a dosagem extravascular, a AUC é calculada de t = 0 a t = 12 horas.

## 15 Exemplo D

### Modelos de asma

Condições inflamatórias mediadas pela integrina  $\alpha_4\beta_1$  incluem, por exemplo, influxo de eosinófilos, hiper-reatividade das vias aéreas e oclusão que ocorre com asma crônica. A seguir, serão descritos modelos animais de asma que são usados para estudos os efeitos *in vivo* dos compostos desta invenção para uso no tratamento de asma.

### Modelo de rato em asma

De acordo com os procedimentos descritos por Chapman, 25 e cols., *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 153-4, A219 (1996) e Chapman, e cols., *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 155: 4, A881 (1997), ambos aqui incorporados por referência em sua totalidade.

Ovalbumina (OA; 10  $\mu$ g/ml) é misturada com hidróxido de 30 alumínio (10 mg/ml) e injetada (intraperitoneal, i.p.) em

ratos Brown Norway no dia 0. As injeções de OA, junto com adjuvante, são repetidas no 7º e 14º dias. No 21º dia, os animais sensibilizados são contidos em tubos plásticos e expostos (60 minutos) a um aerossol de OA (10 mg/kg) em um sistema de exposição somente nasal. Os animais são sacrificados 72 horas mais tarde, com pentobarbital (250 mg/kg, i.p.). Os pulmões são lavados através de uma cânula traqueal com o uso de 3 alíquotas (4 ml) de solução de Hank (HBSS x 10, 100 ml; 100 mM de EDTA, 100 ml; 1 M de HEPES, 25 ml; trazida até 1 litro com H<sub>2</sub>O); as células recuperadas são reunidas em um pool e o volume total de fluido recuperado ajustado até 12 ml por adição de solução de Hank. As células totais são contadas (contador de microcélula Sysmex F-500, TOA Medical Electronics Otd., Japan) e são feitos esfregaços por diluição de fluido recuperado (até aproximadamente 10<sup>6</sup> células/ml) e pipetagem de uma alíquota (100 µl) em uma centrífuga (Cytospin, Shandon, G.B.). Os esfregaços são secos ao ar, fixados usando uma solução de verde rápido em metanol (2 mg/ml) por 5 segundos, e corados com eosina G (5 segundos) e tiazina (5 segundos) (Diff-Quick, Browne Ltd. G.B.) a fim de diferenciar eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Um total de 500 células por esfregaço é contado por microscopia óptica sob imersão em óleo (x 100). Os compostos desta invenção podem ser formulados em uma suspensão de carboximetilcelulose 0,5% e Tween 80 2%, e administrados oralmente aos ratos que haviam sido sensibilizados ao alérgeno, ovalbumina. Os compostos que inibiram o acúmulo de leucócitos induzido por alérgeno nas vias aéreas de ratos Brown Norway sensibilizadosativamente

são considerados como ativos nesse modelo.

**Modelo de asma em camundongos**

Os compostos também foram avaliados em um modelo de camundongo de inflamação pulmonar aguda seguindo os 5 procedimentos descritos por Dung, e cols., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 13: 360-365, (1995) e Schneider, e cols., (1999). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20: 448-457, (1999), que são individualmente aqui incorporados por referência em sua totalidade. Seis fêmeas de camundongos pretos (8-12 10 semanas de idade) são sensibilizadas no 1º dia por uma injeção intraperitoneal (i.p.) de 0,2 ml de uma mistura ova/alum contendo 20 µg de ova (Grau 4, Sigma) e 2 mg de Alum injetável (Pierce). Uma injeção de reforço é administrada no 14º dia. Os camundongos são atacados nos 15 28º e 29º dias com ova 1% em aerossol (em soro fisiológico 0,9%) por 20 minutos. Os camundongos são submetidos à eutanásia, e são coletadas amostras de lavado bronco-aveolar (3 ml) no 30º dia, 48 horas após o primeiro ataque. Os eosinófilos são quantificados por um método de coloração 20 FACs/FITC. Os compostos desta invenção são formulados em uma suspensão de carboximetilcelulose 0,5% e Tween 80 2%, e administrados oralmente aos camundongos que haviam sido sensibilizados ao alérgeno, ovalbumina. Os compostos que inibiam o acúmulo de leucócitos induzido por alérgeno nas 25 vias aéreas de camundongos C57BL/6 sensibilizados ativamente são considerados como ativos nesse modelo.

**Modelo de asma em carneiros**

Esse modelo emprega os procedimentos descritos por Abraham, e cols., *J. Clin. Invest.*, 93: 776-787 (1994) e 30 Abraham, e cols., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 156: 696-

703 (1997), ambos aqui incorporados por referência em sua totalidade. Os compostos desta invenção foram avaliados por administração intravenosa (solução salina aquosa), oral (Tween 80 2%, carboximetilcelulose 0,5%) e por aerossol aos 5 carneiros que são hipersensíveis ao antígeno de *Ascaris suum*. Os compostos que diminuem a resposta brônquica inicial induzida por antígeno e/ou bloqueiam a resposta de fase tardia das vias aéreas, por exemplo, possuem um efeito protetor contra respostas tardias induzidas por antígeno e 10 hiper-sensibilidade das vias aéreas ("AHR"), são considerados como ativos nesse modelo.

Os carneiros alérgicos que comprovadamente desenvolvem respostas brônquicas tanto iniciais quanto tardias ao antígeno inalado de *Ascaris suum* são usados para estudar os 15 efeitos sobre as vias aéreas dos compostos candidatos. Após anestesia tópica dos condutos nasais com lidocaína 2%, um cateter em balão é passado através de uma narina até o esôfago inferior. Os animais são então incubados com um tubo endotraqueal com um balão através da outra narina, 20 tendo um broncoscópio flexível de fibra óptica como guia.

A pressão pleural é estimada de acordo com Abraham (1994). São gerados aerossóis (veja a formulação abaixo) com o uso de um nebulizador médico descartável que fornecia um aerossol com um diâmetro aerodinâmico de massa média de 25 3.2  $\mu\text{m}$ , como determinado com um impactômetro em cascata Andersen. O nebulizador está conectado a um sistema de dosímetro que consiste em uma válvula solenóide de uma fonte de ar comprimido (137,89 kPa). A saída do nebulizador é dirigida a uma divisão em "T" de plástico, uma 30 extremidade da qual é conectada à entrada inspiratória de

um respirador de pistão. A válvula solenóide é ativada por 1 segundo no início do ciclo inspiratório do respirador. Os aerossóis são liberados em VT de 500 ml e uma taxa de 20 respirações/minuto. Uma solução apenas de bicarbonato de 5 sódio 0,5% é usada como controle.

Para avaliar a capacidade de resposta brônquica, são geradas curvas cumulativas de concentração-resposta ao carbacol de acordo com Abraham (1994). São coletadas biópsias brônquicas antes e depois do início do tratamento, 10 e 24 horas após o ataque com antígeno. São feitas biópsias brônquicas de acordo com Abraham (1994).

Também pode ser realizado um estudo *in vitro* de adesão de macrófagos alveolares de acordo com Abraham (1994), e pode ser calculada uma percentagem de células aderentes.

#### 15 Formulação em aerossol

Uma solução do composto candidato em bicarbonato de sódio 0,5%/soro fisiológico (p/v) em uma concentração de 30,0 mg/ml é preparada com o uso do seguinte procedimento:

A. Preparação de uma solução de estoque de bicarbonato de 20 sódio 0,5% /soro fisiológico: 100,0 ml

Ingrediente	Gramas/100,0 ml	Concentração final
Bicarbonato de sódio	0,5 g	0,5%
Soro fisiológico	q.s. até 100,0 ml	q.s. até 100%

*Procedimento:*

1. Adicionar 0,5 g de bicarbonato de sódio em um frasco volumétrico de 100 ml.
2. Adicionar aproximadamente 90,0 ml de soro fisiológico e 25 sonificar até dissolvido.
3. Q.S. até 100,0 ml com soro fisiológico e misturar cuidadosamente.

**B. Preparação de 30,0 mg/ml de composto candidato: 10,0 ml**

Ingrediente	Gramas/10,0 ml	Concentração final
Composto candidato	0,300 g	30,0 mg/ml
Solução de estoque de bicarbonato de sódio 0,5%/soro fisiológico	q.s. até 10,0 ml	q.s até 100%

**Procedimento:**

1. Adicionar 0,300 g do composto candidato em um frasco volumétrico de 10,0 ml.
- 5 2. Adicionar aproximadamente 9,7 ml de solução de estoque de bicarbonato de sódio 0,5%/soro fisiológico.
3. Sonificar até que o composto candidato esteja completamente dissolvido.
4. Q.S. até 10,0 ml com solução de estoque de bicarbonato de sódio 0,5%/soro fisiológico, e misturar cuidadosamente.

**Exemplo E****Estudo de toxicidade de 10 dias em camundongos C57B6**

Foi feito um estudo de 10 dias para avaliar a toxicidade dos compostos da presente invenção em fêmeas de 15 camundongos C57B6. O composto é administrado por engorda em cinco níveis de dose, 0 (controle de veículo), 10, 30, 100, 300 e 1.000 mg/kg (mpk), com cinco camundongos em cada nível de dose. O volume da dose para todos os níveis foi de 10 ml/kg. As soluções ou suspensões das doses são 20 preparadas em Tween 80 2% em carboximetilcelulose 0,5% (CMC), e novas soluções ou suspensões das doses são preparadas a cada dois ou três dias. As observações em vida incluem os pesos corporais (1°, 2°, 3°, 5°, 7°, 8° e 11° dias do estudo), observações clínicas diárias nas gaiolas

(1-2/dia) e observações funcionais periódicas (-1, 2º e 9º dias do estudo).

Ao término, são coletadas amostras por punção cardíaca para exames de patologia clínica (hematologia e bioquímica 5 clínica) e níveis de fármaco. As amostras de sangue com EDTA são analisadas quanto à contagem total de células sangüíneas brancas, contagem de células sangüíneas vermelhas, hemoglobina, hematócrito, índices de eritrócito (MCV, MCH, MCHC), plaquetas e uma contagem diferencial de 10 cinco células sangüíneas brancas (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos). As amostras heparinizadas de plasma são analisadas quanto aos níveis de alanina transaminase, aspartato transaminase, fosfatase alcalina, bilirrubina total, albumina, proteína, cálcio, 15 glicose, uréia nitrogenada, creatinina, colesterol e triglicerídeos.

Após a coleta de sangue, a carcaça é submetida à necropsia, e os órgãos (fígado, baço, rins, coração e timo) 20 são pesados. São coletadas amostras de tecidos (cérebro, glândulas salivares, timo, coração, pulmão, fígado, rim, baço adrenal, estômago, duodeno, íleo, cólon e útero/ovário) e fixadas em formalina. Os tecidos do controle de veículo e dos animais dos grupos de 300 e 1.000 mpk são processados para lâminas de vidro coradas com 25 hematoxilina/eosina, e avaliados quanto a lesões histopatológicas.

As alterações do peso corporal, os pesos absolutos e relativos dos órgãos e os resultados da patologia clínica 30 são analisados quanto à existência de diferenças estatisticamente significativas, comparados com controle de

veículo pelo teste de comparação múltipla de Dunnet com o uso do programa de computador Prism. Os resultados da bateria de observações funcionais são analisados quanto a diferenças com o uso dos testes exatos de Dunnet, de 5 Fisher, e os efeitos da tendência da dose pelo teste de correlação de Cochran-Mantel-Haenszel com o uso do programa de computador SAS.

Com o uso de uma formulação oral convencional, os compostos desta invenção seriam ativos nesse modelo.

10 **Exemplo F**

**Artrite induzida por adjuvante em ratos**

A artrite induzida por adjuvante ("AIA") é um modelo animal útil para o estudo de artrite reumatóide (RA), que é induzida por injeção de *M. tuberculosis* na base do rabo de 15 ratos Lewis. Entre 10 e 15 dias após a injeção, os animais desenvolvem uma artrite grave e progressiva.

Geralmente, os compostos são testados quanto à sua habilidade para alterar o edema da pata traseira e os danos ósseos resultantes do edema induzido por adjuvante em 20 ratos. Para quantificar a inibição do edema da pata traseira resultante da AIA, foram definidas duas fases de inflamação: (1) a primária e secundária da pata traseira injetada, e (2) a secundária da pata traseira não injetada, que geralmente começa a se desenvolver em torno de onze 25 dias a partir da indução de inflamação na pata injetada. A redução desse último tipo de inflamação é uma indicação de atividade imunossupressora. Veja Chang, *Arth. Rheum.*, 20, 1.135-1.141 (1977).

O uso de um modelo animal de RA, por exemplo, a AIA, 30 permite o estudo dos eventos celulares envolvidos nos

estágios iniciais da doença. A expressão de CD44 em macrófagos e linfócitos está supra-regulada durante o desenvolvimento inicial da artrite por adjuvante, enquanto a expressão de LFA 1 está supra-regulada mais tarde no desenvolvimento da doença. A compreensão das interações entre as moléculas de adesão e o endotélio nos estágios mais precoces da artrite por adjuvante poderia levar a avanços significativos nos métodos usados no tratamento de RA.

Verificou-se que todos os compostos a seguir possuem uma  $IC_{50}$  abaixo de 10  $\mu M$ , quando testados de acordo com o Exemplo A do ensaio de fibronectina:

N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(trifluoracetil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}

fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(iso-propilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}

fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(t-butilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}

fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(furan-2-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}

fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(piperidin-1-ilcarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}

fenilalanina;

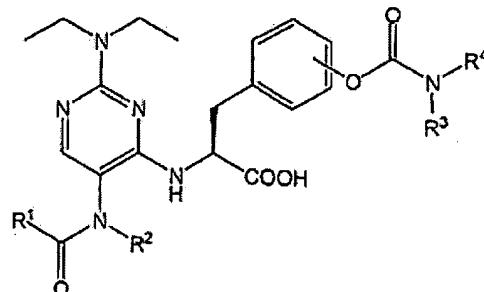
N- [2-dietilamino-5-{N-etyl-N-(N-etyl-N-iso-propilaminocarbonil)amino}pirimidin-4-il]-L-4'-{(pirrolidin-1-il)carbonilóxi}

fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5- {N- etil- N- (tien-3- ilcarbonil) amino} 5  
 pirimidin-4- il] -L-4'- { (pirrolidin-1- il) carbonilóxi}  
 fenilalanina;  
 N- [2-dietilamino-5- {N- etil- N- (tien-2- ilcarbonil) amino} 5  
 pirimidin-4- il] -L-4'- { (pirrolidin-1- il) carbonilóxi}  
 fenilalanina;  
 N- [2-dietilamino-5- {N- etil- N- (furan-3- ilcarbonil) 10  
 amino} pirimidin-4- il] -L-4'- { (pirrolidin-1- il) carbonilóxi}  
 fenilalanina;  
 N- [2-dietilamino-5- {N- etil- N- (3- tiapirrolidin-1- 10  
 ilcarbonil) amino} pirimidin-4- il] -L-4'- { (pirrolidin-1- il) carbonilóxi} fenilalanina;  
 Éster t-butílico de N- [2-dietilamino-5- {N- etil- N- (tien-2- ilcarbonil) amino} pirimidin-4- il] -L-4'- { (pirrolidin- 15  
 1- il) carbonilóxi} -fenilalanina;  
 Éster t-butílico de N- [2-dietilamino-5- {N- etil- N- (trifluormetilcarbonil) amino} pirimidin-4- il] -L-4'- { (pirrolidin-1- il) carbonilóxi} -fenilalanina;  
 Éster t-butílico de N- [2-dietilamino-5- {N- etil- N- (t- 20  
 butilcarbonil) amino} pirimidin-4- il] -L-4'- { (pirrolidin-1- il) carbonilóxi} -fenilalanina; e  
 Éster t-butílico N- [2-dietilamino-5- { (N- etil- N- furan- 3- ilcarbonil) amino} pirimidin-4- il] -L-4'- { (pirrolidin-1- il) carbonilóxi} -fenilalanina.  
 Embora tenham sido ilustradas e descritas modalidades 25  
 preferidas da invenção, será observado que podem ser feitas  
 várias alterações sem se afastar do espírito e do escopo da  
 invenção.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composto caracterizado por ter a fórmula I:



em que:

10  $R^1$  é selecionado do grupo que consiste em  $C_1$  a  $C_4$  alquil,  $C_1$  a  $C_4$  haloalquil, heteroaril e  $-NR^5R^6$ , em que  $R_5$  e  $R_6$  são selecionados independentemente do grupo que consiste em hidrogênio e  $C_1$  a  $C_4$  alquil, ou  $R^5$  e  $R^6$ , juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, formam um anel heterocíclico;

$R^2$  é selecionado do grupo que consiste em  $C_1$  a  $C_4$  alquil,  $C_2$  a  $C_4$  alquenil e  $C_2$  a  $C_4$  alquinil; e

15  $R^3$  e  $R^4$  são independentemente  $C_1$  a  $C_3$  alquil ou  $R^3$  e  $R^4$ , juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, se unem para formar um anel heterocíclico;

ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável destes.

20 2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o grupo  $-OC(O)NR^3R^4$  está na posição para do anel fenila.

25 3. Composto, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que  $R^3$  e  $R^4$ , juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, formam um anel heterocíclico.

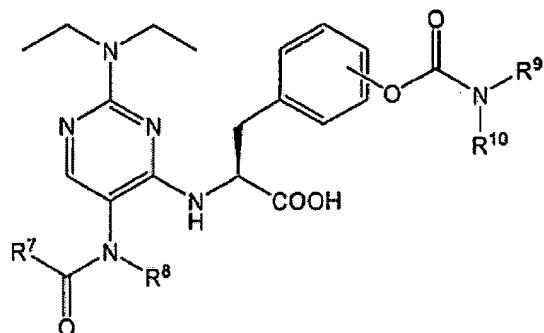
30 4. Composto, de acordo com a reivindicação 3,

caracterizado pelo fato de que o anel heterocíclico é pirrolidinil.

5. Composto, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que R<sup>2</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil.

5 6. Composto, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que R<sup>2</sup> é etil.

7. Composto caracterizado por ter a fórmula II:



15 em que:

R<sup>7</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil, C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> haloalquil, ou heteroaril;

R<sup>8</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil;

20 R<sup>9</sup> e R<sup>10</sup> são independentemente C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> alquil, ou R<sup>9</sup> e R<sup>10</sup>, juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, formam um anel heterocíclico;

ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável destes.

8. Composto, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o grupo -OC(O)NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> está na 25 posição para do anel fenila.

9. Composto, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que R<sup>9</sup> e R<sup>10</sup>, juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, formam um anel heterocíclico.

30 10. Composto, de acordo com a reivindicação 9,

caracterizado pelo fato de que o anel heterocíclico é pirrolidinil.

11. Composto, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que R<sup>8</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil.

5 12. Composto, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que R<sup>8</sup> é etil.

13. Composto, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que R<sup>7</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil.

10 14. Composto, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que R<sup>7</sup> é selecionado do grupo que consiste em isopropil e t-butil.

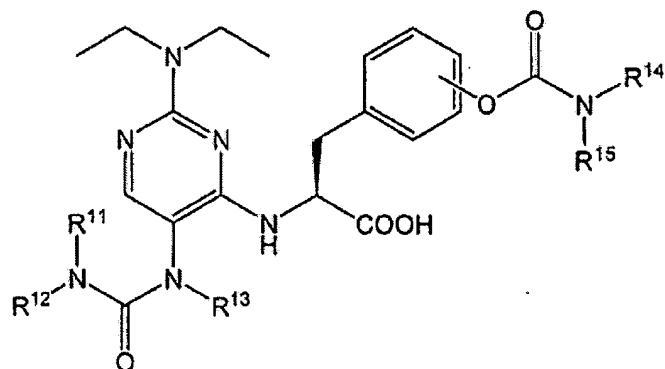
15. Composto, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que R<sup>7</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> haloalquil.

15 16. Composto, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que R<sup>7</sup> é trifluorometil.

17. Composto, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que R<sup>7</sup> é heteroaril.

20 18. Composto, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que R<sup>7</sup> é selecionado do grupo que consiste em furan-2-il, furan-3-il, tien-2-il e tien-3-il.

19. Composto caracterizado por ter a fórmula III:



em que:

R<sup>11</sup> e R<sup>12</sup> são independentemente C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil, ou R<sup>11</sup> e R<sup>12</sup>, juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, formam um anel heterocíclico;

5 R<sup>13</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil; e

R<sup>14</sup> e R<sup>15</sup> são independentemente C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> alquil, ou R<sup>14</sup> e R<sup>15</sup>, juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, formam um anel heterocíclico;

ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente 10 aceitável destes.

20. Composto, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o grupo -OC(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> está na posição para do anel fenila.

21. Composto, de acordo com a reivindicação 20, 15 caracterizado pelo fato de que R<sup>14</sup> e R<sup>15</sup>, juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, formam um anel heterocíclico.

22. Composto, de acordo com a reivindicação 21, 20 caracterizado pelo fato de que o anel heterocíclico é pirrolidinil.

23. Composto, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que R<sup>13</sup> é C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil.

24. Composto, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que R<sup>13</sup> é etil.

25. Composto, de acordo com a reivindicação 24, 25 caracterizado pelo fato de que R<sup>11</sup> e R<sup>12</sup> são independentemente C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> alquil.

26. Composto, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que R<sup>11</sup> é etil e R<sup>12</sup> é isopropil.

30 27. Composto, de acordo com a reivindicação 24,

caracterizado pelo fato de que  $R^{11}$  e  $R^{12}$ , juntos com o átomo de nitrogênio a eles pendente, formam um anel heterocíclico.

28. Composto, de acordo com a reivindicação 27,  
 5 caracterizado pelo fato de que o referido anel heterocíclico é selecionado do grupo que consiste em piperidin-1-il e 3-tiapiroolidin-1-il.

29. Composto caracterizado por ser selecionado do grupo que consiste em:

10 N- [2-dietilamino-5- {N-etyl-N- (trifluoracetil)amino} pirimidin-4-il] -L-4' { (pirrolidin-1-il)carboniloxi } fenilalanina;

15 N- [2-dietilamino-5- {N-etyl-N- (iso-propilcarbonil) amino}pirimidin-4-il] -L-4' - { (pirrolidin-1-il)carboniloxi } fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5- {N-etyl-N- (t-butilcarbonil)amino} pirimidin-4-il] -L-4' - { (pirrolidin-1-il)carboniloxi } fenilalanina;

20 N- [2-dietilamino-5- {N-etyl-N- (furan-2-ilcarbonil) amino}pirimidin-4-il] -L-4' - { (pirrolidin-1-il)carboniloxi } fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5- {N-etyl-N- (piperidin-1-ilcarbonil) amino}pirimidin-4-il] -L-4' - { (pirrolidin-1-il)carboniloxi } fenilalanina;

25 N- [2-dietilamino-5- {N-etyl-N- (N-etyl-N-iso- propilaminocarbonil)amino}pirimidin-4-il] -L-4' - { (pirrolidin-1-il)carboniloxi }fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5- {N-etyl-N- (tien-3-ilcarbonil)amino} pirimidin-4-il] -L-4' - { (pirrolidin-1-il)carboniloxi } 30 fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5- {N- etil- N- (tien-2- ilcarbonil) amino} pirimidin-4- il] -L4'- { (pirrolidin-1- il) carboniloxi} fenilalanina;

5 N- [2-dietilamino-5- {N- etil- N- (furan-3- ilcarbonil) amino} pirimidin-4- il] -L-4'- { (pirrolidin-1- il) carboniloxi} fenilalanina;

N- [2-dietilamino-5- {N- etil- N- (3- tiapirrolidin-1- ilcarbonil) amino} pirimidin-4- il] -L-4'- { (pirrolidin-1- il) carboniloxi} fenilalanina;

10 Éster t- butílico N- [2-dietilamino-5- {N- etil- N- (tien-2- ilcarbonil) amino} pirimidin-4- il] -L4'- { (pirrolidin-1- il) carboniloxi} -fenilalanina;

15 Éster t- butílico N- [2-dietilamino-5- { (N- etil- N- trifluormetilcarbonil) amino} pirimidin-4- il] -1, 4'- { (pirrolidin-1- il) carboniloxi} -fenilalanina;

Éster t- butílico N- [2-dietilamino-5- { (N- etil- N- t- butilcarbonil) amino} pirimidin-4- il] -L-4'- { (pirrolidin-1- il) carboniloxi} -fenilalanina; e

20 Éster t- butílico N- [2-dietilamino-5- { (N- etil- N- furan-3- ilcarbonil) amino} pirimidin-4- il] -L4'- { (pirrolidin-1- il) carboniloxi} -fenilalanina;

ou um sal, éster ou pró- fármaco farmaceuticamente aceitável destes.

30. Composição farmacêutica caracterizada por  
25 compreender um veículo farmaceuticamente aceitável e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais de um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ou 29.

30 31. Método para o tratamento de uma doença mediada por

integrina α4 em um indivíduo humano ou animal caracterizado por compreender a administração ao indivíduo humano ou animal de uma composição farmacêutica da reivindicação 30.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31,  
5 caracterizado pelo fato de que a integrina α4 é VLA-4.

33. Método, de acordo com a reivindicação 31,  
caracterizado pelo fato de que a referida doença é  
selecionada do grupo que consiste em asma, doença de  
Alzheimer, aterosclerose, demência por AIDS, diabetes,  
10 diabetes agudo de surgimento juvenil, doença inflamatória  
do intestino, colite ulcerativa, doença de Crohn, esclerose  
múltipla, artrite, artrite reumatóide, transplante de  
tecidos, metástase tumoral, meningite, encefalite, acidente  
vascular cerebral, traumas cerebrais, nefrite, retinite,  
15 dermatite atópica, psoriase, isquemia miocárdica, lesão  
pulmonar aguda mediada por leucócitos e síndrome de  
sofrimento respiratório do adulto.

34. Método, de acordo com a reivindicação 31,  
caracterizado pelo fato de que a referida doença é uma  
20 doença inflamatória.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34,  
caracterizado pelo fato de que a doença inflamatória é  
selecionada do grupo que consiste em eritema nodoso,  
conjuntivite alérgica, neurite óptica, uveíte, rinite  
25 alérgica, espondilite anquilosante, artrite psoriática,  
vasculite, síndrome de Reiter, lúpus eritematoso sistêmica,  
esclerose sistêmica progressiva, polimiosite,  
dermatomiosite, granulomatose de Wegner, aortite,  
sarcoidose, linfocitopenia, arterite temporal, pericardite,  
30 miocardite, insuficiência cardíaca congestiva, poliarterite

nodosa, síndromes de hipersensibilidade, alergia, síndromes hipereosinofílicas, síndrome de Churg-Strauss, doença pulmonar obstrutiva crônica, pneumonite por hipersensibilidade, hepatite crônica ativa, cistite 5 intersticial, falência endócrina autoimune, cirrose biliar primária, anemia aplásica autoimune, hepatite crônica persistente e tireoidite.

36. Uso de uma composição farmacêutica da reivindicação 30, caracterizada por ser usada para a 10 fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença mediada por integrina α4.

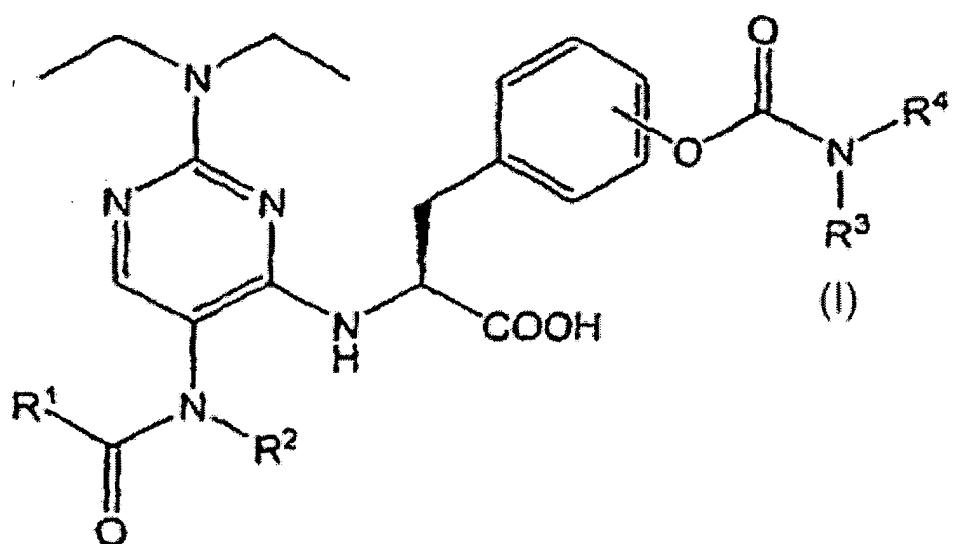
37. Uso, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a integrina α4 é VLA-4.

38. Uso, de acordo com a reivindicação 38, 15 caracterizado pelo fato de que a referida doença é selecionada do grupo que consiste em asma, doença de Alzheimer, aterosclerose, demência por AIDS, diabetes, diabetes agudo de surgimento juvenil, doença inflamatória do intestino, colite ulcerativa, doença de Crohn, esclerose 20 múltipla, artrite, artrite reumatóide, transplante de tecidos, metástase tumoral, meningite, encefalite, acidente vascular cerebral, traumas cerebrais, nefrite, retinite, dermatite atópica, psoríase, isquemia miocárdica, lesão pulmonar aguda mediada por leucócitos e síndrome de 25 sofrimento respiratório do adulto.

39. Uso, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a referida doença é uma doença inflamatória.

40. Uso, de acordo com a reivindicação 40, 30 caracterizado pelo fato de que a doença inflamatória é

selecionada do grupo que consiste em eritema nodoso, conjuntivite alérgica, neurite óptica, uveíte, rinite alérgica, espondilite anquilosante, artrite psoriática, vasculite, síndrome de Reiter, lúpus eritematoso sistêmica, 5 esclerose sistêmica progressiva, polimiosite, dermatomiosite, granulomatose de Wegner, aortite, sarcoidose, linfocitopenia, arterite temporal, pericardite, miocardite, insuficiência cardíaca congestiva, poliarterite nodosa, síndromes de hipersensibilidade, alergia, síndromes 10 hipereosinofílicas, síndrome de Churg-Strauss, doença pulmonar obstrutiva crônica, pneumonite por hipersensibilidade, hepatite crônica ativa, cistite intersticial, falência endócrina autoimune, cirrose biliar primária, anemia aplásica autoimune, hepatite crônica 15 persistente e tireoidite.



## COMPOSTOS DE PIRIMIDINIL AMIDA QUE INIBEM A ADESÃO

## LEUCOCITÁRIA MEDIADA POR VLA-4

SÃO REVELADOS compostos que se ligam à VLA-4. alguns desses compostos também inibem a adesão leucocitária e, em 5 particular, a adesão leucocitária mediada por VLA-4. Tais compostos são úteis no tratamento de doenças inflamatórias em um indivíduo humano ou animal, por exemplo, asma, doença de Alzheimer, aterosclerose, demência por AIDS, diabetes, doença inflamatória do intestino, artrite reumatóide, 10 transplante de tecidos, metástase tumoral e isquemia miocárdica. Os compostos também podem ser administrados para o tratamento de doenças cerebrais inflamatórias como, por exemplo, esclerose múltipla (Fórmula I).

15

