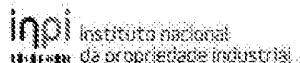

(11) Número de Publicação: **PT 2010501 E**



(51) Classificação Internacional:

C07D 233/54 (2014.01) **A61K 31/4164**

(2014.01)

A61P 29/00 (2014.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2007.02.21**

(30) Prioridade(s): **2006.02.24 US 776473 P**
2006.06.20 US 815221 P
2007.01.25 US 698253

(43) Data de publicação do pedido: **2009.01.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.04.02**
087/2014

(73) Titular(es):

LEXICON PHARMACEUTICALS, INC.
8800 TECHNOLOGY FOREST PLACE THE
WOODLANDS, TX 77381 US

(72) Inventor(es):

DAVID J. AUGERI US
JEFFREY BAGDANOFF US
KENNETH G. CARSON US
THEODORE C. JESSOP US
LAKMAL, W. BOTEJU US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS À BASE DE IMIDAZOLE, COMPOSIÇÕES QUE OS COMPREENDEM E MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO**

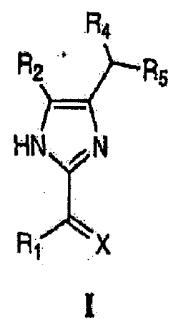
(57) Resumo:

SÃO REVELADOS COMPOSTOS À BASE DE IMIDAZOLE, COMPOSIÇÕES QUE OS COMPREENDEM E MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO PARA O TRATAMENTO, PREVENÇÃO E GESTÃO DE DOENÇAS E DESORDENS INFLAMATÓRIAS E AUTO-IMUNES. OS COMPOSTOS PARTICULARES TÊM A FÓRMULA I.

RESUMO

**“Compostos à base de imidazole, composições que os
compreendem e métodos para a sua utilização”**

São revelados compostos à base de imidazole, composições que os compreendem e métodos para a sua utilização para o tratamento, prevenção e gestão de doenças e desordens inflamatórias e auto-imunes. Os compostos particulares têm a fórmula I.



DESCRIÇÃO

"Compostos à base de imidazole, composições que os compreendem e métodos para a sua utilização"

1. CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a compostos à base de imidazole e a composições farmacêuticas que os compreendem.

2. ANTECEDENTES

A esfingosina-1-fosfato (S1P) é uma molécula bioactiva com efeitos potentes sobre múltiplos sistemas de órgãos. Saba, J.D. e Hla, T. Circ. Res. 94:724-734 (2004). Apesar de haver quem acredite que o composto é um mensageiro secundário intracelular, o seu modo de acção é ainda motivo de debate. *Id.* De facto, mesmo o seu metabolismo é fracamente compreendido. Hla, T., Science 309:1682-3 (2005). Os investigadores acreditam actualmente que a S1P é formada pela fosforilação da esfingosina e degradada por desfosforilação ou clivagem. A sua clivagem em fosfato de etanolamina e um aldeído de cadeia longa é alegadamente catalisada por S1P liase. *Id.*; Pyne & Pyne, Biochem J. 349:385-402 (2000).

A esfingosina-1-fosfato liase é uma enzima dependente da vitamina B₆ localizada na membrana do retículo endoplasmático. Van Veldhoven e Mannaerts, J. Biol. Chem. 266:12502-12507 (1991); Van Veldhoven e Mannaerts, Adv. Lipid. Res. 26:69 (1993). As sequências de polinucleótido e aminoácido da SP1 liase humana e os seus produtos gene são descritas no Pedido de Patente PCT No. WO 99/16888.

Recentemente, Schwab e os seus colaboradores concluíram que um componente de cor de caramelo III, 2-acetil-4-tetra-hidroxibutilimidazole (THI), inibe a actividade da S1P liase quando administrado a ratinhos. Schwab, S. et al., Science 309:1735-1739 (2005). Apesar de outros terem postulado que o THI exerce os seus efeitos por um mecanismo diferente (ver, e.g., Pyne, S.G., ACGC Chem. Res. Comm. 11: 108-112 (2000)), é evidente que a administração do composto a ratos e ratinhos induz linfopenia e provoca a acumulação de células T maduras

no timo. Ver, e.g., Schwab, *supra*; Pyne, S. G., ACGC Chem. Res. Comm. 11: 108-112 (2000); Gugsyan, R., et al, Immunology 93(3):398-404 (1998); Halweg, K.M. e Büchi, G., J. Org. Chem. 50:1134-1136 (1985); patente dos E.U.A. 4 567 194 de Kroeplien e Rosdorfer. Contudo, não há relatos conhecidos sobre a existência de um efeito imunológico do THI noutrios animais que não os ratinhos e ratos. Apesar da patente dos E.U.A. 4 567 194 alegar que o THI e alguns compostos relacionados podem ser úteis como agentes medicinais imunossupressores, os estudos do composto em humanos não encontraram efeitos imunossupressores. Ver Thuvander, A. e Oskarsson, A., Fd. Chem. Toxic. 32(1):7- 13 (1994); Houben, G.F., et al, Fd. Chem. Toxic. 30(9):749-757 (1992).

3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção é dirigida a compostos, a composições que compreendem estes compostos e à utilização destes compostos para o fabrico de um medicamento, de acordo com as reivindicações.

4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

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

A Figura 1 proporciona um gráfico de pontos de citometria de fluxo (FACS) representativo que mostra o efeito do veículo de controlo (VC), de um composto da invenção (Composto 1) e de THI sobre uma composição de células (CD4+ e CD8+) de timo, e a média/Dp para todos os ratinhos (n = 3).

A Figura 2 proporciona um gráfico de pontos de FACS representativo que mostra o efeito do veículo de controlo (VC), de um composto da invenção (Composto 1) e de THI sobre um subconjunto de células CD4+ (emigradas recentemente do timo) em ratinhos.

A Figura 3 proporciona um gráfico de pontos de FACS representativo que mostra o efeito do veículo de controlo (VC), de um composto da invenção (Composto 1) e de THI sobre

um subconjunto de células CD8+ (emigradas recentemente do timo) em ratinhos.

A Figura 4 mostra os efeitos do veículo de controlo, THI, Composto 1, e 1-(4-metil-5-((1S,2R,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)tiazol-2-il)etanona (Composto 2) sobre as contagens de sangue total de ratinhos.

A Figura 5 mostra o efeito de uma dosagem oral única de um composto da invenção sobre a artrite induzida por colagénio em ratinhos.

A Figura 6 mostra o efeito de uma dosagem oral única de um composto da invenção sobre as contagens de leucócitos e de linfócitos de macacos cinomolgos.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA

Esta invenção resulta, em parte, de estudos de ratinhos com interrupção do gene de S1P liase, e refere-se principalmente a compostos que se crê serem úteis no tratamento, prevenção e/ou gestão de doenças e perturbações auto-imunes e inflamatórias

5.1. Definições

Salvo indicação em contrário, o termo "alcenilo" significa um hidrocarboneto de cadeia linear, ramificada e/ou cíclica possuindo de 2 a 20 (e.g., 2 a 10 ou 2 a 6) átomos de carbono e incluindo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono. As porções alcenilo representativas incluem vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 1-heptenilo, 2-heptenilo, 3-heptenilo, 1-octenilo, 2-octenilo, 3-octenilo, 1-noneno, 2-noneno, 3-noneno, 1-decenilo, 2-decenilo e 3-decenilo.

Salvo indicação em contrário, o termo "alquilo" significa um hidrocarboneto de cadeia linear, ramificada e/ou cíclica ("cicloalquilo") possuindo de 1 a 20 (e.g., 1 a 10 ou 1 a 4) átomos de carbono. As porções alquilo que possuem de 1

a 4 carbonos são referidas como "alquilo inferior". Exemplos de grupos alquilo incluem, mas não estão limitados a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, 4,4-dimetilpentilo, octilo, 2,2,4-trimetilpentilo, nonilo, decilo, undecilo e dodecilo. As porções cicloalquilo podem ser monocíclicas ou multicíclicas e exemplos incluem ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, cyclohexilo e adamantilo. Exemplos adicionais de porções alquilo têm porções lineares, ramificadas e/ou cíclicas (e.g., 1-etil-4-metilcyclohexilo). O termo "alquilo" inclui hidrocarbonetos saturados assim como porções alcenilo e alcinilo.

Salvo indicação em contrário, o termo "alquilarilo" ou "alquilo-arilo" significa uma porção alquilo ligada a uma porção arilo.

Salvo indicação em contrário, o termo "alquil heteroarilo" ou "alquil-heteroarilo" significa uma porção alquilo ligada a uma porção heteroarilo.

Salvo indicação em contrário, o termo "alquil heterociclo" ou "alquil-heterociclo" significa uma porção alquilo ligada a uma porção heterociclo.

Salvo indicação em contrário, o termo "alcinilo" significa um hidrocarboneto de cadeia linear, ramificada ou cíclica possuindo de 2 a 20 (e.g., 2 a 20 ou 2 a 6) átomos de carbono, e incluindo pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono. As porções alcinilo representativas incluem acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo, 4-pentinilo, 1-hexinilo, 2-hexinilo, 5-hexinilo, 1-heptinilo, 2-heptinilo, 6-heptinilo, 1-octinilo, 2-octinilo, 7-octinilo, 1-noninilo, 2-noninilo, 8-noninilo, 1-decinilo, 2-decinilo e 9-decinilo.

Salvo indicação em contrário, o termo "alcoxi" significa um grupo $-O-$ alquilo. Exemplos de grupos alcoxi incluem, mas não estão limitados a, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-O(CH_2)_2CH_3$, $-O(CH_2)_3CH_3$, $-O(CH_2)_4CH_3$ e $-O(CH_2)_5CH_3$.

Salvo indicação em contrário, o termo "arilo" significa um anel aromático ou um sistema de anel aromático ou parcialmente aromático composto por átomos de carbono e de hidrogénio. Uma porção arilo pode compreender vários anéis ligados ou fundidos uns com os outros. Exemplos de porções arilo incluem, mas não estão limitados a, antracenilo, azulenilo, bifenilo, fluorenilo, indano, indenilo, naftilo, fenantrenilo, fenilo, 1,2,3,4-tetra-hidronaftaleno e tolilo.

Salvo indicação em contrário, o termo "arilalquilo" ou "aril-alquilo" significa uma porção arilo ligada a uma porção alquilo.

Salvo indicação em contrário, o termo "agente de redução de linfócitos em circulação" significa um composto que tem um CLRF maior do que cerca de 20 por cento.

Salvo indicação em contrário, o termo "factor de redução de linfócitos em circulação" ou "CLRF" significa a diminuição no número de linfócitos em circulação em ratinhos provocado pela administração oral de uma dose simples de um composto a 100 mg/kg, tal como determinado pelo método descrito nos Exemplos, abaixo.

Salvo indicação em contrário, o termo "halogéneo" e "halo" compreende flúor, cloro, bromo e iodo.

Salvo indicação em contrário, o termo "heteroalquilo" refere-se a uma porção alquilo (e.g., linear, ramificada ou cíclica) em que pelo menos um dos seus átomos de carbono foi substituído por um heteroátomo (e.g., N, O ou S).

Salvo indicação em contrário, o termo "heteroarilo" significa uma porção arilo em que pelo menos um dos seus átomos de carbono foi substituído por um heteroátomo (e.g., N, O ou S). Exemplos incluem, mas não estão limitados a, acridinilo, benzimidazolilo, benzofuranilo, benzoisotiazolilo, benzoisoxazolilo, benzoquinazolinilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, furilo, imidazolilo, indolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo, ftalazinilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridilo,

pirimidinilo, pirimidilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, tetrazolilo, tiazolilo e triazinilo.

Salvo indicação em contrário, o termo "heteroarilalquilo" ou "heteroaril-alquilo" significa uma porção heteroarilo ligada a uma porção alquilo.

Salvo indicação em contrário, o termo "heterociclo" refere-se a um anel ou sistema de anel, monocíclico ou policíclico, aromático, parcialmente aromático ou não aromático constituído por carbono, hidrogénio e por pelo menos um heteroátomo (e.g., N, O ou S). Um heterociclo pode compreender múltiplos (i.e., dois ou mais) anéis fundidos ou ligados uns aos outros. Os heterociclos incluem heteroarilos. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, benzo[1,3]dioxolilo, 2,3-di-hidrobenzo[1,4]dioxinilo, cinolinilo, furanilo, hidantoinilo, morfolinilo, oxetanilo, oxiranilo, piperazinilo, piperidinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, tetra-hidrofuranilo, tetra-hidropiranilo, tetra-hidropiridinilo, tetra-hidropirimidinilo, tetra-hidrotiofenilo, tetra-hidrotiopiranilo e valerolactamilo.

Salvo indicação em contrário, o termo "heterocicloalquilo" ou "heterociclo-alquilo" refere-se a uma porção heterociclo ligada a uma porção alquilo.

Salvo indicação em contrário, o termo "heterocicloalquilo" refere-se a um heterociclo não aromático.

Salvo indicação em contrário, o termo "heterocicloalquilalquilo" ou "heterocicloalquil-alquilo" refere-se a uma porção heterocicloalquilo ligada a uma porção alquilo.

Salvo indicação em contrário, os termos "gerir" e "gestão" compreendem a prevenção da recorrência da doença ou desordem especificada num paciente que tenha já sofrido da doença ou desordem, e/ou o prolongamento do tempo que um paciente que tenha sofrido da doença ou desordem permanece em remissão. Os termos compreendem a modulação do limiar, desenvolvimento e/ou duração da doença ou desordem, ou

alteração da forma como um paciente responde à doença ou desordem.

Salvo indicação em contrário, o termo "saís farmaceuticamente aceitáveis" refere-se a saís preparados a partir de ácidos ou bases não tóxicos farmaceuticamente aceitáveis, incluindo ácidos e bases inorgânicos e ácidos e bases orgânicos. Os saís de adição de base farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, saís metálicos feitos a partir de alumínio, cálcio, lítio, magnésio, potássio, sódio e zinco, ou saís orgânicos feitos a partir de lisina, N,N' -dibenziletlenodiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, meglumina (N-metilglucamina) e procaína. Os ácidos não tóxicos adequados incluem, mas não estão limitados a, ácidos inorgânicos e orgânicos tais como ácido acético, algínico, antranílico, benzenossulfônico, benzólico, canforsulfônico, cítrico, etenossulfônico, fórmico, fumárico, furólico, galacturônico, glucônico, glucurônico, glutâmico, glicólico, bromídrico, clorídrico, isetônico, láctico, maleico, mállico, mandélico, metanossulfônico, mágico, nítrico, pamólico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, propiónico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, sulfúrico, tartárico e p-toluenossulfônico. Ácidos não tóxicos específicos incluem os ácidos clorídrico, bromídrico, fosfórico, sulfúrico e metanossulfônico. Exemplos de saís específicos incluem assim os saís cloridrato e mesilato. Outros são bem conhecidos na técnica. Ver, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences (18^a ed., Mack Publishing, Easton PA: 1990) e Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19^a ed., Mack Publishing, Easton PA: 1995).

Salvo indicação em contrário, os termos "prevenir", "prevenindo" e "prevenção" contemplam uma acção que ocorre antes de um paciente começar a sofrer da doença ou desordem especificada, a qual inibe ou reduz a severidade da doença ou desordem. Por outras palavras, os termos compreendem a profilaxia.

Salvo indicação em contrário, uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um composto é uma quantidade suficiente para prevenir uma doença ou condição, ou um ou

mais sintomas associados com a doença ou condição, ou para prevenir a sua recorrência. Uma quantidade profilaticamente eficaz de um composto significa uma quantidade de agente terapêutico, sozinho ou em combinação com outros agentes, que proporciona um benefício profilático na prevenção de uma doença. O termo "quantidades profilaticamente eficazes" pode compreender uma quantidade que melhora a profilaxia global ou melhora a eficácia profilática de outro agente profilático.

Salvo indicação em contrário, o termo "agente intensificador do nível de S1P" significa um composto que tem um SLEF de pelo menos cerca de 10 vezes.

Salvo indicação em contrário, o termo "factor de intensificação do nível de S1P" ou "SLEF" significa o aumento em S1P no baço em ratinhos provocado pela administração oral de uma dose única de um composto a 100 mg/kg, tal como determinado pelo método descrito nos Exemplos, abaixo.

Salvo indicação em contrário, o termo "mistura esteroisomérica" compreende misturas racémicas, assim como misturas enriquecidas estereomericamente (e.g., R/S = 30/70, 35/65, 40/60, 45/55, 55/45, 60/40, 65/35 e 70/30).

Salvo indicação em contrário, o termo "estereomericamente pura" significa uma composição que compreende um esteroisómero de um composto e que é substancialmente livre de outros esteroisómeros desse composto. Por exemplo, uma composição estereomericamente pura de um composto que tenha um estereocentro será substancialmente livre do esteroisómero oposto do composto. Uma composição estereomericamente pura de um composto que tenha dois estereocentros será substancialmente livre de outros diastereómeros do composto. Um composto estereomericamente puro típico compreende mais do que cerca de 80% em peso de um esteroisómero do composto e menos do que cerca de 20% em peso de outros esteroisómeros do composto, mais do que cerca de 90% de um esteroisómero do composto e menos do que cerca de 10% em peso dos outros esteroisómeros do composto, mais do que cerca de 95% em peso de um esteroisómero do composto e menos do que cerca de 5% em peso dos outros esteroisómeros do composto, mais do que

cerca de 97% em peso de um estereoisómero do composto e menos do que cerca de 3% em peso dos outros estereoisómeros do composto, ou mais do que cerca de 99% em peso de um estereoisómero do composto e menos do que cerca de 1% em peso dos outros estereoisómeros do composto.

Salvo indicação em contrário, o termo "substituído", quando utilizado para descrever uma estrutura ou porção química refere-se a um derivado dessa estrutura ou porção em que um ou mais dos seus átomos de hidrogénio estão substituídos por uma porção química ou grupo funcional tal como, mas não limitado a, álcool, aldeído, alcoxi, alcanoiloxi, alcoxcarbonilo, alcenilo, alquilo (e.g., metilo, etilo, propilo, t-butilo), alcinilo, alquilcarboniloxi (-OC(O)alquilo), amida (-C(O)NH-alquil- ou -alquilNHC(O)alquilo), amidinilo (-C(NH)NH-alquilo ou -C(NR)NH₂), amina (primária, secundária e terciária, tal como alquilamino, arilamino, arilalquilamino), aroílo, arilo, ariloxi, azo, carbamoílo (-NHC(O)O-alquil- ou -OC(O)NH-alquilo), carbamilo (e.g., CONH₂, assim como CONH-alquilo, CONH-arilo, e CONH-arilalquilo), carbonilo, carboxilo, ácido carboxílico, anidrido de ácido carboxílico, cloreto de ácido carboxílico, ciano, éster, epóxido, éter (e.g., metoxi, etoxi), guanidino, halo, haloalquilo (e.g., -CCl₃, -CF₃, -C(CF₃)₃), heteroalquilo, hemiacetal, imina (primária e secundária), isocianato, isotiocianato, cetona, nitrilo, nitro, oxo, fosfodiéster, sulfureto, sulfonamido (e.g., SO₂NH₂), sulfona, sulfonilo (incluindo alquilsulfonilo, arilsulfonilo e arilalquilsulfonilo), sulfóxido, tiol (e.g., sulfidrilo, tioéter) e ureia (-NHCONH-alquil-).

Salvo indicação em contrário, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de um composto é uma quantidade suficiente para proporcionar um benefício terapêutico no tratamento ou gestão de uma doença ou condição, ou para atrasar ou minimizar um ou mais sintomas associados com a doença ou condição. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto significa uma quantidade de agente terapêutico, sozinho ou em combinação com outras terapias, que proporciona um benefício terapêutico no tratamento ou gestão da doença ou condição. O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" pode compreender uma quantidade que melhore a terapia global,

reduza ou evite sintomas ou causas de uma doença ou condição, ou aumente a eficácia terapêutica de outro agente terapêutico.

Salvo indicação em contrário, os termos "tratar", "tratando" e "tratamento" contemplam uma acção que ocorre enquanto um paciente sofre de uma doença ou desordem especificada, a qual reduz a severidade da doença ou desordem ou retarda ou abranda a progressão da doença ou desordem.

Salvo indicação em contrário, o termo "incluem" tem o mesmo significado que "incluem mas não estão limitados a" e o termo "inclui" tem o mesmo significado que "inclui, mas não está limitado a". Da mesma forma, o termo "tal como" tem o mesmo significado que "tal como, mas não limitado a".

Salvo indicação em contrário, um ou mais adjetivos que sucedam imediatamente uma série de nomes devem ser entendidos como sendo aplicáveis a cada um dos nomes. Por exemplo, a frase "alquilo, arilo ou heteroarilo opcionalmente substituído", tem o mesmo significado que "alquilo opcionalmente substituído, arilo opcionalmente substituído ou heteroarilo opcionalmente substituído".

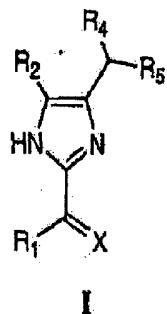
Deverá ser notado que uma porção química que faz parte de um composto maior pode ser descrita naquele utilizando um nome que lhe é comumente conferido quando existe como uma molécula singular ou um nome comumente conferido ao seu radical. Por exemplo, aos termos "piridina" e "piridilo" é conferido o mesmo significado quando utilizados para descrever uma porção ligada a outras porções químicas. Assim, às duas frases "XOH, em que X é piridilo" e "XOH, em que X é piridina" é conferido o mesmo significado e compreendem os compostos piridin-2-ol, piridin-3-ol e piridin-4-ol.

Deverá também ser notado que se a estereoquímica de uma estrutura ou uma porção de uma estrutura não for indicada com, por exemplo, linhas a cheio ou tracejadas, a estrutura ou a porção da estrutura deve ser interpretada como compreendendo todos os seus estereoisómeros. Além disso, qualquer átomo apresentado num desenho com valências incompletas é assumido como estando ligado a átomos de

hidrogénio suficientes para completar as valências. Adicionalmente, as ligações químicas representadas com uma linha a cheio paralela a uma linha a tracejado compreendem tanto ligações simples como duplas (e.g., aromáticas), se as valências o permitirem.

5.2. Compostos

Esta invenção não engloba compostos de fórmula I:



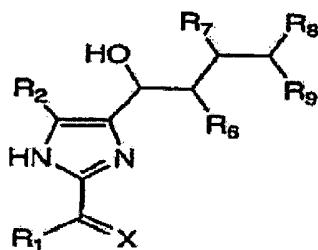
e seus sais e solvatos (e.g., hidratos) farmaceuticamente aceitáveis em que: X é O ou NR₃; R₁ é OR_{1A}, NHOH, hidrogénio, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído; R₂ é OR_{2A}, C(O)OR_{2A}, hidrogénio, halogéneo, nitrilo, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído; R₃ é OR_{3A}, N(R_{3A})₂, NHC(O)R_{3A}, NHSO₂R_{3A}, ou hidrogénio; R₄ é OR_{4A}, OC(O)R_{4A}, hidrogénio, halogéneo, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído; R₅ é N(R_{5A})₂, hidrogénio, hidroxi, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído; e cada um de R_{1A}, R_{2A}, R_{3A}, R_{4A}, e R_{5A} é independentemente hidrogénio, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído.

Os compostos de fórmula I particulares são tais que se X é O; R₁ é alquilo de 1 a 4 carbonos, fenilo, benzilo ou feniletílo; R₂ é hidrogénio; e um de R₄ e R₅ é hidroxilo; o outro de R₄ e R₅ não é alquilo de 1 a 6 carbonos,

hidroxialquilo de 1 a 6 carbonos, poli-hidroxialquilo de 1 a 6 carbonos tendo até um hidroxilo por carbono, poliacetilo alquilo de 1 a 6 carbonos tendo até um acetilo por carbono, fenilo, benzilo ou feniletilo.

Em concretizações particulares, o composto não é 2-acetil-4-tetra-hidroxibutilimidazole, 1-(4-(1,1,2,2,4-penta-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona, tetraacetato de 1-(2-acetil-1H-imidazol-4-il)butano-1,1,2,2-tetraailo, ou pentaacetato de 1-(2-acetil-1H-imidazol-4-il)butano-1,1,2,2,4-pentailo.

A invenção engloba compostos de fórmula II:



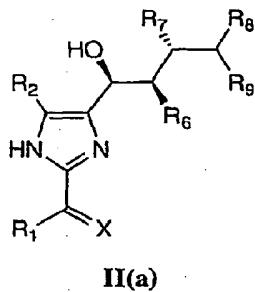
II

e seus sais e solvatos farmaceuticamente aceitáveis, em que: X é O ou NR₃; R₁ é OR_{1A}, NHOH, hidrogénio, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído; R₂ é OR_{2A}, C(O)OR_{2A}, hidrogénio, halogéneo, nitrilo, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído; R₃ é OR_{3A}, N(R_{3A})₂, NHC(O)R_{3A}, NH₂SO₂R_{3A}, ou hidrogénio; R₆ é OR_{6A}, OC(O)R_{6A}, N(R_{6B})₂, NHC(O)R_{6B}, hidrogénio, ou halogéneo; R₇ é OR_{7A}, OC(O)R_{7A}, N(R_{7B})₂, NHC(O)R_{7B}, hidrogénio, ou halogéneo; R₈ é OR_{8A}, OC(O)R_{8A}, N(R_{8B})₂, NHC(O)R_{8B}, hidrogénio, ou halogéneo; R₉ é CH₂OR_{9A}, CH₂OC(O)R_{9A}, N(R_{9B})₂, NHC(O)R_{9B}, hidrogénio, ou halogéneo; cada um de R_{1A}, R_{2A}, R_{3A}, R_{6A}, R_{7A}, R_{8A} e R_{9A} é independentemente hidrogénio ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído; e cada um de R_{6B}, R_{7B}, R_{8B} e R_{9B} é independentemente hidrogénio ou alquilo opcionalmente substituído com um ou mais grupos hidroxi ou halogéneo;

Os compostos particulares de fórmula II são tais que:

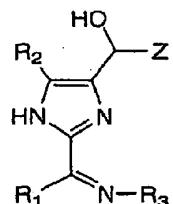
1) se X é 0, R₁ é alquilo de 1 a 4 carbonos, fenilo, benzilo ou feniletílo, e R₂ é hidrogénio, pelo menos dois de entre R₆, R₇, R₈ e R₉ não são hidroxilo ou acetato; 2) se X é 0, R₁ é metilo, R₂ é hidrogénio, R₆ e R₇ são ambos hidroxilo, e um de entre R₈ e R₉ é hidrogénio, o outro não é NHC(O)R_{9B}; 3) se X é 0, R₁ é OR_{1A}, R_{1A} é hidrogénio ou alquilo inferior, e R₂ é hidrogénio, pelo menos um, mas não todos, de R₆, R₇, R₈ e R₉ é hidroxilo ou acetato.

Os compostos particulares da invenção têm a fórmula II(a):



II(a)

Outros têm a fórmula III:

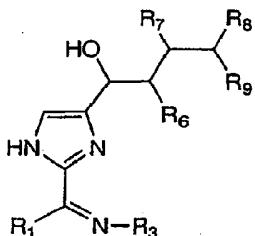


III

em que: Z é alquilo opcionalmente substituído; R₁ é OR_{1A}, NHOH, hidrogénio, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído; R₂ é OR_{2A}, C(O)OR_{2A}, hidrogénio, halogéneo, nitrilo, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído; R₃ é OR_{3A}, N(R_{3A})₂, NHC(O)R_{3A}, NHSO₂R_{3A}, ou hidrogénio; e cada um de entre R_{1A}, R_{2A}, e R_{3A} é independentemente hidrogénio ou

alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído.

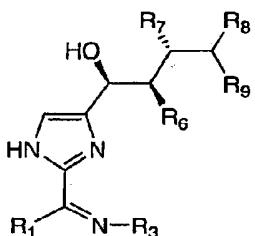
Outra concretização da invenção engloba compostos de fórmula IV:



IV

e seus sais e solvatos farmaceuticamente aceitáveis, em que: R₁ é OR_{1A}, NHOH, hidrogénio, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído; R₃ é OR_{3A}, N(R_{3A})₂, NHC(O)R_{3A}, NHSO₂R_{3A}, ou hidrogénio; R₆ é OR_{6A}, OC(O)R_{6A}, N(R_{6B})₂, NHC(O)R_{6B}, hidrogénio, ou halogéneo; R₇ é OR_{7A}, OC(O)R_{7A}, N(R_{7B})₂, NHC(O)R_{7B}, hidrogénio, ou halogéneo; R₈ é OR_{8A}, OC(O)R_{8A}, N(R_{8B})₂, NHC(O)R_{8B}, hidrogénio, ou halogéneo; R₉ é CH₂OR_{9A}, CH₂OC(O)R_{9A}, N(R_{9B})₂, NHC(O)R_{9B}, hidrogénio, ou halogéneo; e cada um de entre R_{1A}, R_{3A}, R_{6A}, R_{7A}, R_{8A} e R_{9A} é independentemente hidrogénio ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído.

Os compostos particulares têm a fórmula IV(a):



IV(a)

Relativamente a cada uma das fórmulas apresentadas acima que contêm as porções descritas abaixo, certas concretizações da invenção são tais que:

Nalgumas concretizações X é O. Noutras, X é NR₃.

Nalgumas concretizações R₁ é hidrogénio. Noutras, R₁ é alquilo inferior opcionalmente substituído. Noutras, R₁ é NHOH. Noutras, R₁ é OR_{1A} e R_{1A} é, por exemplo, hidrogénio ou alquilo inferior opcionalmente substituído.

Nalgumas concretizações R₂ é hidrogénio. Noutras, R₂ não é hidrogénio. Noutras, R₂ é nitrilo. Noutras, R₂ é alquilo inferior opcionalmente substituído. Noutras, R₂ é OR_{2A}. Noutras, R₂ é C(O)OR_{2A}. Nalgumas concretizações, R_{2A} é hidrogénio ou alquilo inferior opcionalmente substituído.

Nalgumas concretizações R₃ é OR_{3A}. Noutras, R₃ é N(R_{3A})₂ ou NHC(O)R_{3A}. Noutras, R₃ é NHSO₂R_{3A}. Nalgumas concretizações, R_{3A} é hidrogénio ou alquilo inferior opcionalmente substituído. Noutras, R_{3A} é arilo ou heterociclo opcionalmente substituído.

Nalgumas concretizações R₄ é OR_{4A}. Noutras, R₄ é halogéneo.

Nalgumas concretizações R₅ é N(R_{5A})₂. Noutras, R₅ é hidrogénio. Noutras, R₅ é hidroxilo. Noutras, R₅ é heteroalquilo (e.g., alcoxi). Noutras, R₅ é alquilo opcionalmente substituído. Noutras, R₅ é arilo opcionalmente substituído.

Nalgumas concretizações, um ou mais de entre R₆, R₇, R₈ e R₉ é hidroxi ou halogéneo. Nalgumas concretizações, todos de entre R₆, R₇, R₈, e R₉ são hidroxilo ou acetato.

Nalgumas concretizações Z é alquilo opcionalmente substituído com uma ou mais porções hidroxilo, acetato ou halogéneo.

Os compostos da invenção podem conter um ou mais estereocentros e podem existir como misturas racémicas de enantiómeros ou misturas de diastereómeros. Esta invenção engloba as formas estereometricamente puras desses compostos, assim como misturas dessas formas. Os estereoisómeros podem

ser assimetricamente sintetizados ou resolvidos utilizando técnicas padrão tais como colunas quirais ou agentes de resolução quirais. Ver, e.g., Jacques, J., et al., Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley Interscience, Nova Iorque, 1981); Wilen, S. H., et al., Tetrahedron 33:2725 (1977); Eliel, E. L., Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw Hill, NY, 1962); e Wilen, S. H., Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions, p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

Esta invenção engloba ainda misturas estereoisoméricas de compostos aqui revelados. Engloba também isómeros configuracionais de compostos aqui revelados, quer em mistura quer em forma pura ou substancialmente pura, tal como isómeros alceno cis (Z) e trans (E) e isómeros oxima syn e anti.

Os compostos preferidos da invenção são agentes de redução dos linfócitos em circulação. Certos compostos inibem a quantidade de linfócitos em circulação, tal como determinado utilizando o método descrito nos Exemplos, em mais do que cerca de 20, 50, 75, 100, 150 ou 200 por cento. A este respeito, verificou-se que enquanto o THI é capaz de reduzir os linfócitos em circulação em ratinhos, muitos análogos e derivados de THI, tais como 1-(4-metil-5-((1S,2R,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)tiazol-2-il)etanona, têm pouco ou nenhum efeito sobre os linfócitos em circulação, apesar de relatos em contrário. Ver WO 97/46543.

Sem pretender ficar ligado a uma teoria, os compostos da invenção crê-se que afectam a via metabólica da S1P e podem inibir a S1P liase directamente ou indirectamente *in vivo*. Os compostos particulares são agentes que intensificam o nível de S1P. Certos compostos aumentam a quantidade de S1P, tal como determinado utilizando o método descrito abaixo nos Exemplos, em mais do que cerca de 10, 15, 20, 25, ou 30 vezes.

Os compostos da invenção podem ser preparados por métodos conhecidos na técnica (e.g., fazendo variações e adições às abordagens descritas em Pyne, S.G., ACGC Chem. Res. Comm. 11:108-112 (2000); Halweg, K.M. e Büchi, G., J.

Org. Chem. 50:1134-1136 (1985)). Os compostos podem também ser preparados pelos métodos revelados abaixo e suas variantes, as quais serão evidentes para aqueles que têm prática na técnica.

5.3. Métodos de utilização

Os compostos reivindicados podem ser utilizados no que se segue:

- num método de modulação (e.g., aumento) da quantidade de S1P num paciente (e.g., um ratinho, rato, cão, gato ou humano) dela necessitado, que compreende a administração ao paciente de uma quantidade eficaz de um composto da invenção (i.e., um composto aqui revelado),

- num método de redução do número de células T no sangue de um paciente, que compreende a administração ao paciente de uma quantidade eficaz de um composto da invenção,

- num método de tratamento, gestão ou prevenção de uma doença afectada por (ou que tenha sintomas afectados por) níveis de S1P, que compreende a administração a um paciente necessitado de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um composto da invenção.

- num método de supressão da resposta imune num paciente, que compreende a administração ao paciente de uma quantidade eficaz de um composto da invenção.

- num método de tratamento, gestão ou prevenção de uma doença ou desordem autoimune ou inflamatória, que compreende a administração a um paciente necessitado de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um composto da invenção. Exemplos de doenças e desordens incluem espondilite anquilosante, asma (e.g., asma brônquica), dermatite atópica, doença de Behcet, doença enxerto versus hospedeiro, síndrome de Kawasaki, lúpus eritematoso, esclerose múltipla, miastenia gravis, polinose, psoriase, artrite psoriática, artrite reumatóide, escleroderma, rejeição de transplante (e.g., de órgãos, células ou medula óssea), diabetes tipo 1 e uveíte.

Doenças e desordens adicionais incluem Doença de Addison, síndrome anti-fosfolípidos, gastrite atrófica auto-imune, acloridria auto-imune, Doença Celiaca, Doença de Crohn, Síndrome de Cushing, dermatomiosite, Síndrome de Goodpasture, Doença de Grave, tiroidite de Hashimoto, atrofia adrenal idiopática, trombocitopenia idiopática, Síndrome de Lambert-Eaton, penfigoide, penfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarterite nodosa, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, doença de Raynaud, Síndrome de Reiter, policondrite recidivante, Síndrome de Schmidt, Síndrome de Sjogren, oftalmia simpática, Arterite de Takayasu, arterite temporal, tirotoxicose, colite ulcerativa, e granulomatose de Wegener.

A quantidade, via de administração e esquema de dosagem de um composto dependerão de factores tais como a indicação específica a ser tratada, prevenida ou gerida e da idade, sexo e condição do paciente. Os papéis desempenhados por esses factores são bem conhecidos na técnica e podem ser ajustados por experimentação de rotina. Numa concretização particular, um composto da invenção é administrado a um paciente humano numa quantidade de cerca de 0,5, 1, 2,5 ou 5 mpk.

5.4. Formulações Farmacêuticas

Esta invenção engloba composições farmacêuticas que compreendem um ou mais compostos da invenção. Certas composições farmacêuticas são unidades de dosagem singulares adequadas para administração oral, via mucosa (e.g., nasal, sublingual, vaginal, bucal, ou rectal), parentérica (e.g., subcutânea, intravenosa, injecção em bolus, intramuscular, ou intraarterial), ou transdérmica a um paciente. Exemplos de formas de dosagem incluem, mas não estão limitadas a: comprimidos; comprimidos ovais revestidos; cápsulas, tais como cápsulas de gelatina elástica macia; hóstias; trociscos; pastilhas; dispersões; supositórios; ungamentos; cataplasmas; pastas; pós; revestimentos; cremes; emplastros; soluções; pachos; aerossóis (e.g., pulverizadores ou inaladores nasais); geles; formas de dosagem líquidas adequadas para administração oral ou via mucosas a um paciente, incluindo suspensões (e.g., suspensões líquidas aquosas ou não aquosas,

emulsões de óleo em água ou emulsões de água em óleo), soluções e elixires; formas de dosagem líquidas adequadas para administração parentérica a um paciente; e sólidos estéreis (e.g., sólidos cristalinos ou amorfos) que podem ser reconstituídos para proporcionar formas de dosagem líquidas adequadas para administração parentérica a um paciente.

A formulação deve ser adequada ao modo de administração. Por exemplo, a administração oral requer revestimentos entéricos para proteger os compostos desta invenção da degradação no tracto gastrointestinal. Do mesmo modo, uma formulação pode conter ingredientes que facilitam a administração do(s) ingrediente(s) activo(s) ao sítio de acção. Por exemplo, os compostos podem ser administrados em formulações lipossomais, de modo a protegê-los de enzimas degradativas, facilitar o transporte no sistema circulatório e efectuar a administração através das membranas celulares para sítios intracelulares.

Do mesmo modo, os compostos fracamente solúveis podem ser incorporados em formas de dosagem líquidas (e em formas de dosagem adequadas para reconstituição) com o auxílio de agentes de solubilização, emulsionantes e tensioactivos, tais como, mas não limitados a, ciclodextrinas (e.g., -ciclodextrina, -ciclodextrina, Captisol® e Encapsin™ (ver, e.g., Davis e Brewster, 2004, Nat. Rev. Drug Disc. 3:1023-1034), Labrasol®, Labrafil®, Labrafac®, cremafor, e solventes não aquosos tais como, mas não limitados a, álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, álcool benzílico, benzoato de benzilo, propilenoglicol, 1,3-butilenoglicol, dimetilformamida, dimetilsulfóxido (DMSO), óleos biocompatíveis (e.g., óleos de semente de algodão, amendoim, milho, gérmen, azeite, rícino e sésamo), glicerol, álcool tetra-hidrofurfurílico, polietilenoglicóis, ésteres de ácidos gordos de sorbitano, e misturas destes (e.g., DMSO:óleo de milho).

Os compostos fracamente solúveis podem também ser incorporados em suspensões utilizando outras técnicas conhecidas na técnica. Por exemplo, nanopartículas de um composto podem ser suspensas num líquido para proporcionar uma nanossuspensão (ver, e.g., Rabinow, 2004, Nature Rev.

Drug Disc. 3:785-796). As formas de nanopartículas de compostos descritos aqui podem ser preparadas pelos métodos descritos nas Patentes dos E.U.A. com os Nº de Publicação 2004-0164194, 2004-0195413, 2004-0251332, 2005-0042177 A1, 2005-0031691 A1, e nas Patentes dos E.U.A. Nos. 5145684, 5510118, 5518187, 5534270, 5543133, 5662883, 5665331, 5718388, 5718919, 5834025, 5862999, 6431478, 6742734, 6745962, que são aqui incorporadas na sua totalidade por referência. Numa concretização, a forma de nanopartículas compreende partículas que têm um tamanho médio de partículas de menos do que cerca de 2000 nm, menos do que cerca de 1000 nm, ou menos do que cerca de 500 nm.

A composição, forma e tipo de uma forma de dosagem variará, dependendo da sua utilização. Por exemplo, uma forma de dosagem utilizada no tratamento agudo de uma doença pode conter quantidades maiores de um ou mais dos ingredientes activos que compreende, do que uma forma de dosagem utilizada no tratamento crónico da mesma doença. Do mesmo modo, uma forma de dosagem parentérica pode conter quantidades mais pequenas de um ou mais dos ingredientes activos que compreende do que uma forma de dosagem oral utilizada para tratar a mesma doença. Esta e outras maneiras segundo as quais as formas de dosagem específicas englobadas por esta invenção variarão umas em relação às outras, serão prontamente evidentes para os técnicos com experiência na técnica. Ver, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing, Easton PA (1990).

5.4.1. Formas de Dosagem Oral

As composições farmacêuticas da invenção adequadas para administração oral pode ser apresentadas como formas de dosagem discretas, tais como, mas não estando limitadas a, comprimidos (e.g., comprimidos mastigáveis), comprimidos orais revestidos, cápsulas, e líquidos (e.g., xaropes aromatizados). Essas formas de dosagem contêm quantidades pré-determinadas de ingredientes activos e podem ser preparadas por métodos de farmácia bem conhecidos dos peritos na técnica. Ver, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing, Easton PA (1990).

As formas de dosagem oral típicas são preparadas por combinação do(s) ingrediente(s) activo(s) em mistura íntima com pelo menos um excipiente, de acordo com técnicas de formulação farmacêutica convencionais. Os excipientes podem tomar uma vasta variedade de formas, dependendo da forma de preparação desejada para administração.

Devido à sua facilidade de administração, os comprimidos e cápsulas representam as formas de unidade de dosagem mais vantajosas. Se desejado, os comprimidos podem ser revestidos por técnicas aquosas ou não aquosas padrão. Essas formas de dosagem podem ser preparadas por métodos convencionais de farmácia. Em geral, as composições farmacêuticas e as formas de dosagem são preparadas misturando uniforme e intimamente os ingredientes activos com veículos líquidos, com veículos sólidos finamente divididos, ou ambos, e conformando em seguida o produto na apresentação desejada, se necessário. Podem ser integrados desintegrantes nas formas de dosagem sólidas para facilitar a dissolução rápida. Podem também ser incorporados lubrificantes para facilitar a preparação de formas de dosagem (e.g., comprimidos).

5.4.2. Formas de Dosagem Parentéricas

As formas de dosagem parentéricas podem ser administradas a pacientes por várias vias incluindo mas não limitadas a, subcutânea, intravenosa (incluindo injecção em bolus), intramuscular e intraarterial. Uma vez que a sua administração ultrapassa as defesas naturais dos pacientes contra contaminantes, as formas de dosagem parentérica são especificamente estéreis ou capazes de serem esterilizadas antes da administração a um paciente. Exemplos de formas de dosagem parentéricas incluem, mas não estão limitados a, soluções prontas para injecção, produtos secos prontos para serem dissolvidos ou suspensos num veículo farmaceuticamente aceitável para injecção, suspensões prontas para injecção e emulsões.

Os veículos adequados que podem ser utilizados para proporcionar formas de dosagem parentérica da invenção são bem conhecidos dos peritos na técnica. Exemplos incluem, mas não estão limitados a: Água para Injecção USP; veículos

aquosos tais como, mas não limitados a, Injecção de Cloreto de Sódio, Injecção de Ringer, Injecção de Dextrose, Injecção de Dextrose e Cloreto de Sódio, e Injecção de Ringer Lactada; veículos miscíveis em água tais como, mas não limitados a, álcool etílico, polietilenoglicol, e polipropilenoglicol; e veículos não aquosos tais como, mas não limitados a óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de amendoim, óleo de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo e benzoato de benzilo.

5.4.3. Formas de Dosagem Transdérmica, Tópicas e via Mucosa

As formas de dosagem transdérmica, tópica e via mucosas incluem, mas não estão limitadas a, soluções oftálmicas, pulverizações, aerossóis, cremes, loções, ungamentos, geles, soluções, emulsões, suspensões ou outras formas conhecidas dos peritos na técnica. Ver, e.g., Remington' s Pharmaceutical Sciences, 16^a e 18^a eds., Mack Publishing, Easton PA (1980 & 1990); e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4^a ed., Lea & Febiger, Filadélfia (1985). As formas de dosagem transdérmica incluem pensos do "tipo reservatório" ou do "tipo matriz", os quais podem ser aplicados na pele e utilizados durante um período de tempo específico para permitir a penetração de uma quantidade desejada de ingredientes activos.

Os excipientes adequados (e.g., veículos e diluentes) e outros materiais que podem ser utilizados para proporcionar formas de dosagem transdérmica, tópica e via mucosas são bem conhecidas dos peritos em técnicas farmacêuticas e dependem do tecido particular ao qual será aplicada uma determinada composição farmacêutica ou forma de dosagem.

Dependendo do tecido específico a ser tratado, podem ser utilizados componentes adicionais antes de, em conjunto com ou subsequentemente ao tratamento com ingredientes activos da invenção. Por exemplo, podem ser utilizados intensificadores de penetração para auxiliar na administração de ingredientes activos ao tecido.

O pH de uma composição farmacêutica ou forma de dosagem ou o do tecido ao qual a composição farmacêutica ou forma de

dosagem é aplicado, pode também ser ajustado para melhorar a administração de um ou mais ingredientes activos. Do mesmo modo, a polaridade de um veículo solvante, a sua força iônica ou tonicidade podem ser ajustadas para melhorar a administração. Podem também ser adicionados compostos tais como estearatos a composições farmacêuticas ou formas de dosagem para alterar vantajosamente a hidrofilicidade ou lipofilicidade de um ou mais ingredientes activos de modo a melhorar a administração. A este respeito, os estearatos podem actuar como veículo lípido para a formulação, como agente emulsionante ou tensioactivo e como agente intensificador de administração ou intensificador de penetração. Podem ser utilizados sais, hidratos ou solvatos diferentes dos ingredientes activos para ajustar adicionalmente as propriedades da composição resultante.

6. EXEMPLOS

Aspectos desta invenção podem ser entendidos a partir dos exemplos que se seguem, os quais não limitam o seu âmbito.

6.1. Ratinhos com Interrupção de genes de S1P Lisase

O gene *trapping* é um método de mutagénese de inserção aleatória que utiliza um fragmento de ADN que codifica para um gene repórter ou marcador seleccionável como mutagene. Os vectores *gene trap* foram concebidos para se integrarem em intrões ou exões de uma maneira que possibilite à maquinaria de *splicing* celular a ligação de exões codificados pelo vector a mARNs celulares. Os vectores *gene trap* contêm tipicamente sequências marcadoras seleccionáveis que são precedidas por sequências aceitadoras de ligação forte e não são precedidas por um promotor. Assim, quando esses vectores se integram num gene, a maquinaria de *splicing* celular liga os exões do gene aprisionado ao terminal 5' da sequência marcadora seleccionável. Tipicamente, esses genes marcadores seleccionáveis apenas podem ser expressos se o vector que codifica o gene estiver integrado num intrão. Os eventos de *gene trap* resultantes são subsequentemente identificados seleccionando células que possam sobreviver em cultura selectiva.

Células estaminais embrionárias (derivadas da estirpe de murino A129) foram mutadas por um processo que envolve a inserção de pelo menos uma porção de uma sequência de vector de engenharia genética no gene de SP1 liase. As células estaminais embrionárias mutadas foram então microinjectedas em blastócitos, os quais foram subsequentemente introduzidos em hospedeiros fêmea pseudográvidos e levadas a termo utilizando métodos estabelecidos. Neste caso, o vírus inseriu-se entre os exões 1 e 2 e interrompeu o gene SP1 liase. Os animais quiméricos resultantes foram subsequentemente reproduzidos para produzir descendência capaz de transmissão por linha germinal de um alelo contendo a mutação resultante de engenharia no gene de SP1 liase.

As técnicas úteis para interromper um gene numa célula e especialmente numa célula ES, que pode já ter um gene interrompido, são reveladas nas Patentes dos E.U.A. Nos. 6 136 566; 6 139 833 e 6 207 371 e no Pedido de Patente dos E.U.A. No. 08/728 963, cada um dos quais é aqui incorporado como referência na sua totalidade.

6.2. Efeitos Hematológicos da Interrupção do Gene de SP1 Liase

O sangue completo foi recolhido por sangria retrororbital e colocado num tubo de recolha de sangue capilar que continha EDTA. O sangue foi analisado utilizando o analisador Cell-Dyn 3500R (Abbott Diagnostics). O analisador emprega tecnologias duais para proporcionar a base para uma identificação diferencial dos cinco tipos de leucócitos (WBC). A tecnologia de multi-ângulo de dispersão e separação da luz polarizada (M.A.P.S.S.) proporciona a contagem total de leucócitos e informação diferencial, enquanto a impedância proporciona informação adicional na presença de linfócitos frágeis e glóbulos vermelhos hipotonicamente resistentes.

Aproximadamente 135 microlitros de sangue completo foram aspirados para o analisador utilizando uma bomba peristáltica. Foram utilizadas quatro técnicas de medição independentes pelo sistema Cell-Dyn 3500R System (Abbott, IL) para obter os parâmetros hematológicos. A contagem óptica de

WBC (WOC) e os resultados diferenciais de WBC foram medidos no canal de fluxo óptico, resultando na identificação das subpopulações de WBC (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) para as cinco partes diferenciais de WBC. A Contagem de Impedância de WBC (WIC) foi medida num canal de impedância eléctrica. Os resultados de RBC e plaquetas foram medidos num segundo canal de impedância eléctrica. A hemoglobina foi medida no canal espectrofotométrico. A amostra foi aspirada, diluída, misturada e as medições para cada parâmetro foram obtidas durante cada ciclo do instrumento. Os parâmetros finais de análise hematológica obtidos foram contagem de glóbulos brancos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, largura da distribuição de glóbulos vermelhos, volume corpuscular médio e volume médio de plaquetas.

As amostras de sangue foram obtidas de um total de 16 ratinhos. A análise e comparação das amostras de sangue foram obtidas a partir de sete ratinhos de tipo selvagem, seis ratinhos heterozigotos e três ratinhos homozigotos. Não houve diferenças significativas associadas ao genotípico entre ratinhos de grupos diferentes no que se refere às contagens médias de glóbulos vermelhos (RBC), níveis de hemoglobina, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração média de hemoglobina corpuscular, contagens de plaquetas ou volume médio de plaquetas. Houve diferenças no hematócrito e na largura da distribuição de glóbulos vermelhos. O hematócrito médio em ratinhos homozigotos (-/-) foi $37 \pm 2,56$ por cento, em ratinhos heterozigotos (+/-) $40,9 \pm 4$ por cento e em ratinhos de tipo selvagem (+/+) foi de $44,7 \pm 2,7$ por cento. A largura da distribuição de glóbulos vermelhos em ratinhos homozigotos (-/-) foi $25,2 \pm 4,2$ por cento, em ratinhos heterozigotos (+/-) $17,6 \pm 1,9$ e em ratinhos de tipo selvagem (+/+) foi de $17,2 \pm 2$ por cento.

De modo semelhante, os ratinhos deficientes em SP1 liase não tiveram diferenças significativas nas contagens de leucócitos totais em comparação com os ratinhos homozigotos ou do tipo selvagem. Os ratinhos homozigotos (-/-) tiveram uma contagem de leucócitos total de 7200 ± 700 células/ μ l. Os ratinhos heterozigotos (+/-) tiveram uma contagem de

leucócitos total de 6200 ± 1800 células/ μ l e os ratinhos do tipo selvagem (+/+) tiveram uma contagem de leucócitos total de 7200 ± 2600 células/ μ l.

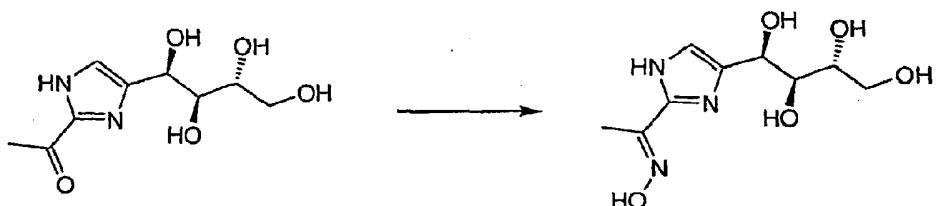
Nos ratinhos que eram homozigotos para interrupção de SP1 liase, as contagens de linfócitos foram diminuídas, enquanto o número de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos foi aumentado. A contagem de linfócitos no sangue de ratinhos homozigotos (-/-) para interrupção no gene SP1 liase foi grandemente reduzida. A contagem média de linfócitos em ratinhos homozigotos (-/-) foi de 847 ± 139 células/ μ l, em ratinhos heterozigotos (+/-) a contagem média de linfócitos foi de 4582 ± 2364 células/ μ l, em oposição à contagem média de linfócitos e ratinhos do tipo selvagem (+/+) que foi de 6126 ± 2151 células/ μ l.

Em contraste, a contagem média de neutrófilos em ratinhos homozigotos (-/-) foi de 5020 ± 612 células/ μ l, enquanto em ratinhos heterozigotos (+/-) a contagem média de neutrófilos foi de 1380 ± 1140 células/ μ l e os ratinhos do tipo selvagem (+/+) tinham uma contagem média de neutrófilos de apenas 886 ± 479 células/ μ l. De modo semelhante, a contagem média de monócitos em ratinhos homozigotos (-/-) foi de 950 ± 218 células/ μ l, enquanto em ratinhos heterozigotos (+/-) a contagem média de monócitos foi de 250 ± 108 células/ μ l e em ratinhos do tipo selvagem (+/+) a contagem média de monócitos foi de apenas 146 ± 92 células/ μ l. Da mesma forma com os eosinófilos, a contagem média de eosinófilos em ratinhos homozigotos (-/-) foi de 247 ± 297 células/ μ l, enquanto em ratinhos heterozigotos (+/-) a contagem média de eosinófilos foi de 8 ± 8 células/ μ l e em ratinhos do tipo selvagem (+/+) a contagem média de eosinófilos foi de apenas 14 ± 21 células/ μ l.

O mesmo é verdade para os basófilos. A contagem média de basófilos em ratinhos homozigotos (-/-) foi de 130 ± 90 células/ μ l, em ratinhos heterozigotos (+/-) a contagem média de basófilos foi de 7 ± 5 células/ μ l e em ratinhos do tipo selvagem (+/+) a contagem média de basófilos foi de apenas 16 ± 11 células/ μ l.

De modo semelhante, a contagem média de monócitos em ratinhos homozigotos (-/-) foi de 950 ± 218 células/ μ l, enquanto em ratinhos heterozigotos (+/-) a contagem média de monócitos foi de 250 ± 108 células/ μ l e em ratinhos de tipo selvagem (+/+) a contagem média de monócitos foi de apenas 146 ± 92 células/ μ l. Da mesma forma com os eosinófilos, a contagem média de eosinófilos em ratinhos homozigotos (-/-) foi de 247 ± 297 células/ μ l, enquanto em ratinhos heterozigotos (+/-) a contagem média de eosinófilos foi de 8 ± 8 células/ μ l e nos ratinhos de tipo selvagem (+/+) a contagem média de eosinófilos foi de apenas 14 ± 21 células/ μ l.

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

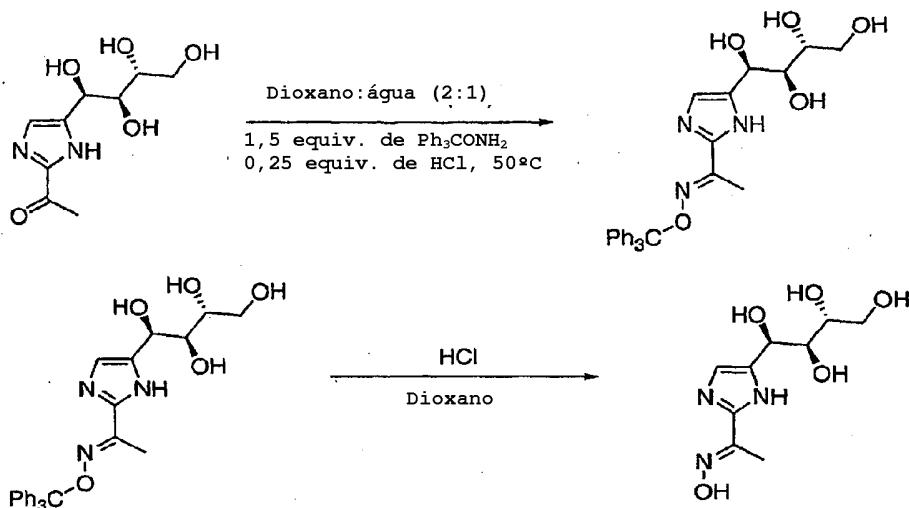


1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-Tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il]etanona (THI, preparada de acordo com Halweg, K.M. e Büchi, G., *J. Org. Chem.* 50:1134-1136 (1985)) (350 mg, 1,52 mmol) foi suspensa em água (10 ml). Adicionou-se cloridrato de hidroxilamina (126,8 mg, 1,82 mmol, 1,2 eq.) e acetato de sódio (247,3 mg, 3,04 mmol. 2 eq.) e a suspensão foi agitada a 50°C. A mistura de reacção tornou-se límpida após aproximadamente 4 horas. A agitação foi continuada a 50°C durante 16 horas. A análise por LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura de reacção foi deixada atingir a temperatura ambiente e passada através de um filtro de porosidade fina. Esta solução foi utilizada directamente para purificar o produto utilizando HPLC preparativa: coluna de sílica Atlantis HILIC 30 x 100 mm; 2% - 21% de água em acetonitrilo durante 6 minutos; 45 ml/min; com detecção a 254 nm. As fracções de produto foram recolhidas e o acetonitrilo foi evaporado sob pressão reduzida. A solução aquosa foi lyophilizada para originar o produto, uma mistura de aproximadamente 3:1 de isómeros anti:syn, como um sólido branco: 284 mg (77%).

LCMS: Coluna Sunfire C-18, 4,6 x 50 mm; 0- 17% de MeOH (0,1% de TFA) em água (0,1% de TFA) durante 5 min; caudal = 3 ml/min; Detecção 220 nm; Tempos de retenção: 0,6 min (isómero syn, 246,0 (M+1)) e 0,69 min (isómero anti, 246,0 (M+1)). ¹H RMN (D₂O e DCI) 2,15 e 2,22 (singletos, 3H), 3,5 - 3,72 (m, 4H), 4,76 (largo, protões OH e H-₂O), 4,95 e 4,97 (singletos, 1H), 7,17 e 7,25 (singletos, 1H). ¹³C RMN (D₂O e DCI) 10,80, 16,76, 63,06, 64,59, 64,75, 70,86, 72,75, 72,85, 117,22, 117,64, 135,32, 138,39, 141,35, 144,12.

6.4. Síntese de (E)-1-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona oxima

Este composto foi preparado em dois passos, como mostrado abaixo



Em primeiro lugar, a um balão carregado com THI (21,20 mmol, 4,88g) é adicionada água (25 ml) e HCl aquoso 1N (21,2 ml, 21,2 mmol). Depois de todos os sólidos estarem dissolvidos, adicionou-se uma solução de tritil-hidroxilamina (25,44 mmol, 7,00 g) em dioxano (55 ml) e a reacção foi mantida a 50°C durante 4h. Após estar completa, a reacção foi arrefecida para a temperatura ambiente e a solução foi ajustada a pH=7 por adição de NaOH aquoso 1N. A solução neutralizada foi então concentrada a uma massa plástica que foi purificada por cromatografia flash sobre sílica [10% de MeOH/1% de NH₄OH (solução a 5% em peso em água) em DCM] para

proporcionar o éter tritílico como plástico límpido. O tratamento da massa plástica com hexano e concentração proporcionaram uma espuma branca que foi seca sob vácuo a um sólido escamoso (10,00 g, 97% de rendimento).

Em segundo lugar, a uma solução agitada vigorosamente, à temperatura ambiente do éter-oxima de tritílio (4,8 g, 10 mmol) em dioxano (90 ml) é adicionada uma solução de HCl em dioxano (4M, 60 ml). Após alguns minutos, observou-se um precipitado branco e a agitação foi continuada durante um total de 30 minutos, antes da filtração sobre um filtro de frita de vidro e lavagem do bolo com dioxano e éter. O bolo foi redissolvido em água (200 ml), sonicado durante 5 minutos, em seguida arrefecido para 0°C, tratado com celite (5 g) e filtrado sobre um filtro de frita de vidro. A solução aquosa foi concentrada à secura e depois isolada a partir de metanol (30 ml) / éter dietílico (60 ml) para dar a E-oxima como um pó branco analiticamente puro (3,8 g, 80% de rendimento).

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



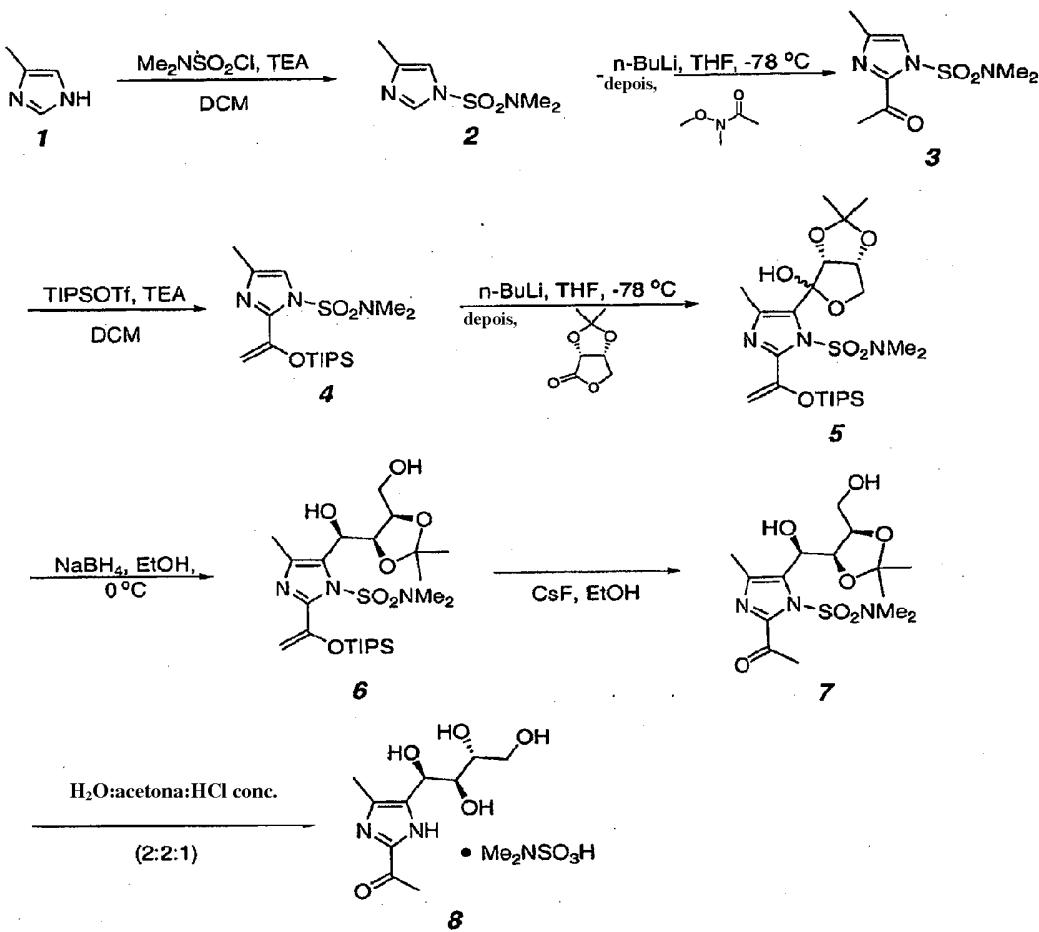
O composto em título foi preparado como descrito acima no Exemplo 6.3, utilizando cloridrato de metoxilamina em vez de cloridrato de hidroxilamina, com 74% de rendimento. O produto era um sólido branco fofo.

LCMS: Coluna C-18 Sunfire, 4,6 x 50 mm; 0 - 17% de MeOH (0,1% de TFA) em água (0,1% de TFA) durante 5 min; caudal = 3 ml/min; Detecção 220 nm; Tempos de retenção: 1,59 minutos (isómero syn, 260,1 (M+1)) e 1,73 min (isómero anti, 260,1 (M+1)). ¹H RMN (D₂O) 2,18 e 2,22 (singletos, 3H), 3,54 - 3,60 (m, 1H), 3,66 - 3,79 (m, 3H), 3,94 e 3,95 (singletos, 3H), 4,76 (largo, protões OH e H₂O), 4,93 e 4,97 (singletos, 1H), 7,17 e 7,25 (singletos, 1H). ¹³C RMN (D₂O) 11,55,

17, 56, 62, 32, 62, 38, 62, 99, 63, 07, 67, 09, 71, 54, 73, 86, 119, 09, 138, 64, 139, 79, 142, 95, 144, 98, 148, 97.

6.6. Síntese de 1-(5-metil-4-((1R,2S,3R)-1.2,3,4-tetrahidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona

O produto do título foi preparado em sete passos, utilizando o processo delineado abaixo.



4-Metilimidazole-1-dimetilaminossulfonamida (2): A uma solução à temperatura ambiente de 4-metilimidazole 1 (3,00 g, 36,54 mmol) em tolueno (200 ml) adicionou-se consecutivamente trietilamina 5,6 ml, 40,20 mmol) e cloreto de N,N -dimetilaminossulfamoílo (3,9 ml, 36,54 mmol). O balão foi armazenado num frigorífico a 5°C durante 48 horas, em seguida os sólidos foram removidos da reacção por filtração e o licor foi concentrado para obter uma mistura 2,5:1 de regioisómeros 2 e 2a. O produto bruto foi purificado por cromatografia flash sobre sílica gel (80-100% de acetato de

etilo:hexano como eluente) para se obter uma **2:2a** numa mistura 5,5:1 de regioisómeros (4,31 g, 62% de rendimento): M+1=190,1

4-Metil-2-acetilimidazole-1-dimetilaminossulfonamida

(3): A uma solução a -78°C do imidazole **2** (1,99 g, 10,54 mmol) em tetra-hidrofuran (70 ml) adicionou-se lentamente uma solução de *n*-BuLi em hexano (2,5 M, 11,60 ml). Após 40 minutos, adicionou-se gota a gota *N*-metoxi-*N*-metilacetamida (1,30 g, 12,65 mmol) à solução arrefecida. A reacção foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e mantida durante 2 horas. Após estar completa, a reacção foi neutralizada pela adição de NH₄Cl aquoso saturado (20 ml) e em seguida diluída com água (20 ml). As camadas foram separadas e a camada orgânica foi lavada com acetato de etilo (2 x 30 ml). Os extractos orgânicos combinados foram lavados com salmoura (20 ml), depois secos sobre MgSO₄ e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia flash sobre sílica (60-80% de acetato de etilo:hexano como eluente) para dar **3** como um óleo (1,85 g, 76% de rendimento): M+1 = 232,1.

4-Metil-2-(1-(triisopropilsiloxi)vinil)-1-

dimetilaminossulfonamida (4): A uma solução de imidazole **3** (1,65 g, 7,14 mmol) em diclorometano (45 ml) adicionou-se consecutivamente trietilamina (1,00 ml, 14,28 mmol) e trifluorometanossulfonato de triisopropilsiloxi (2,12 ml, 7,86 mmol). A reacção foi mantida à temperatura ambiente durante 20 horas e em seguida neutralizada pela adição de NaHCO₃ aquoso saturado (20 ml). A mistura foi diluída com água (20 ml) e as camadas foram separadas. A camada aquosa foi lavada com diclorometano (2 x 20 ml) e os extractos orgânicos combinados foram lavados com solução de salmoura (20 ml), depois secos sobre MgSO₄ e concentrados. O óleo resultante foi purificado por cromatografia flash sobre sílica gel (1-2% de metanol:diclorometano como eluente) para dar o enol éter de siloxo **4** como um óleo laranja (2,26 g, 83% de rendimento): M+1= 388,2.

Lactol (5): A uma solução a -78°C de imidazole **4** (2,26 g, 5,84 mmol) em tetra-hidrofuran (40 ml) adicionou-se lentamente uma solução em hexano de *n*-BuLi (2,5 M, 3,27 ml). Após 30 minutos, adicionou-se lentamente uma solução de (-)-

2,3-O-isopropilidina-D-eritronolactona (1,66 g, 10,51 mmol) em tetra-hidrofuran (10 ml) à solução a -78°C. A solução foi mantida a -78°C durante 2 horas, depois deixada aquecer para 0°C antes de neutralizar a reacção por adição de NH₄Cl aquoso saturado (20 ml). A mistura foi diluída com água (10 ml) e as camadas foram separadas. As fracções orgânicas foram lavadas com acetato de etilo (2 x 20 ml) e as fracções orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura (20 ml), depois secas sobre MgSO₄ e concentradas. O produto bruto foi purificado sobre sílica gel (30-50% de acetato de etilo:hexano como eluente) para dar o lactol 5 (2,69 g, 85% de rendimento) como uma espuma branca: M+1 = 546,4.

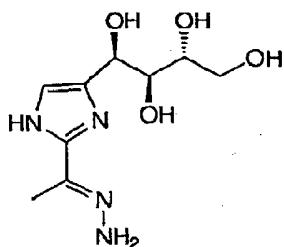
Diol (6): A uma solução a 0°C do lactol 5 (2,09 g, 3,83 mmol) em etanol (70 ml) adicionou-se NaBH₄ granular (1,4 g, 38,32 mmol) em algumas porções. Após 2 horas, a reacção foi aquecida para a temperatura ambiente durante 30 minutos e depois concentrada. O resíduo foi redissolvido em água (40 ml) e acetato de etilo (40 ml). A mistura bifásica foi agitada vigorosamente durante 10 minutos e em seguida as camadas foram separadas. A camada aquosa foi lavada com acetato de etilo (2 x 40 ml) e as camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura (30 ml), depois secas sobre MgSO₄ e concentradas. A espuma bruta foi purificada por cromatografia flash sobre sílica (5% de metanol :diclorometano como eluente) para dar o diol 6 (1,88 g, 90% de rendimento) como uma mistura 3:1 de diastereómeros inseparáveis na posição benzílica: M+1 = 547,4.

Imidazole (7): Adicionou-se fluoreto de céssio (315 mg, 2,08 mmol) a uma solução do imidazole 6 (567 mg, 1,04 mmol) em etanol (10 ml) e aqueceu-se a 65°C. Após 1 hora, a reacção foi arrefecida para a temperatura ambiente e tratada com NH₄Cl aquoso saturado (1 ml) e depois concentrada. O produto bruto foi purificado por cromatografia flash sobre sílica gel (metanol a 5%:diclorometano como eluente) para dar o imidazole 7 (380 mg, 94% de rendimento) como uma espuma branca: M+1=392,1.

Produto Final (8): O imidazole protegido 7 (380 mg, 0,97 mmol) foi dissolvido em acetona (6 ml) e tratado consecutivamente com água (6 ml) e HCl aquoso concentrado (3

ml). O balão foi aquecido para 40°C durante 45 minutos, depois arrefecido para a temperatura ambiente e concentrado. O material bruto foi purificado por cromatografia preparativa de fase inversa utilizando uma coluna Zorbax C-6 de 150mm x 30 mm utilizando solventes não tamponados de acordo com o método seguinte: ciclo isocrático de 1% de acetonitrilo:água durante 5 minutos ($T_R=1,52$ minutos). Após liofilização, o composto **8** foi obtido como o sal de ácido dimetilaminossulfâmico, um sólido amorfó: $M+1= 245,1$; 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) *major* 5,04 (d, 1H), 3,62 (comp, m, 2H), 3,42 (comp, m, 2H), 2,62 (s, 6H), 2,43 (s, 3H), 2,21 (s, 3H); *minor* 5,01 (d, 1H), 3,79 (comp, m, 2H), 3,55 (comp, m, 2H), 2,62 (s, 6H), 2,43 (s, 3H), 2,21 (s, 3H).

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

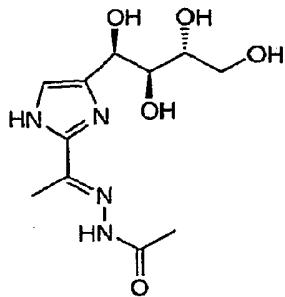


Suspendeu-se 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxi-butil)-1H-imidazol-2-il]etanona (THI, preparada de acordo com Halweg, K.M. e Büchi, G., *J. Org. Chem.* 50:1134-1136 (1985)) (148 mg, 0,64 mmol) em metanol (3 ml) e água (1 ml). Adicionaram-se hidrato de hidrazina (35 mg, 0,7 mmol, 1,2 eq.) e ácido acético (uma gota) e a suspensão foi agitada a 50°C durante 6 horas. A análise por LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura de reacção foi arrefecida para a temperatura ambiente e diluída com tetra-hidrofuran. O precipitado branco resultante foi recolhido e lavado com tetra-hidrofuran para originar o produto, uma mistura de isómeros E:Z aproximadamente 3:1, como um sólido branco: 90 mg (58%).

LCMS: Coluna Zorbax C-8, 4,6 x 150 mm; 10 - 90% em água (10 mM de acetato de amónio) durante 6 min; caudal = 2 ml/min; Detecção 220 nm; Tempos de retenção: 0,576 min (isómero *syn*, 245,0 ($M+1$)) e 1,08 min (isómero *anti*, 245,0

(M+1)). ^1H RMN (DMSO-d6) 2,5 (singlet, 3H sob DMSO), 3,4 - 3,7 (m, 4H), 4,3 (m, 2H), 4,6 (m, 2H), 4,8 (m, 1H), 4,9 e 5,0 (dupletos, 1H), 7,04 e 7,21 (singletos, 1H).

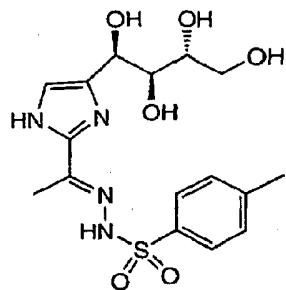
6.8. Síntese de N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)aceto-hidrazida



Suspendeu-se 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il]etanona (160 mg, 0,70 mmol) em metanol (3 ml) e água (1 ml). Adicionaram-se hidrazida acética (56 mg, 0,75 mmol, 1,2 eq.) e ácido clorídrico (uma gota, 12 N) e a suspensão foi agitada a 50°C durante 48 horas. A análise por LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura de reacção foi arrefecida para a temperatura ambiente e diluída com tetra-hidrofuran. O precipitado branco resultante foi recolhido e lavado com tetra-hidrofuran para originar o produto, uma mistura de isómeros E:Z aproximadamente 3:1, como um sólido branco: 129 mg (65%).

LCMS: Coluna Sunfire C-18, 4,6 x 50 mm; 2 - 20% em água (acetato de amónio 10 mM) durante 2,5 min; caudal = 3,5 ml/min; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 0,53 min (287,1 (M+1)). ^1H RMN (DMSO-d6) 2,2 (singletos, 3H), 2,5 (singletos, 3H sob DMSO), 3,4 - 3,7 (m, 4H), 4,3 (largo, 2H), 4,6-5,0 (largo, 4H), 7,0 (largo, 1H), 10,30 e 10,37 (singletos, 1H).

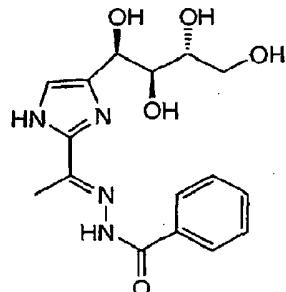
6.9. Síntese de (E)-4-metil-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzenossulfono-hidrazida



Suspendeu-se 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutyl)-1H-imidazol-2-il]etanona (153 mg, 0,67 mmol) em metanol (3 ml) e água (1 ml). Adicionaram-se p-tolueno-sulfonil-hidrazida (140 mg, 0,75 mmol, 1,2 eq.) e ácido clorídrico (uma gota, 12 N) e a suspensão foi agitada a 50°C durante 24 horas. A análise por LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura de reacção foi arrefecida para a temperatura ambiente e carregada em seco sobre sílica gel (10 g de SiO₂, acetato de etilo:metanol 4:1) para dar o produto, uma mistura de isómeros E:Z aproximadamente 85:15, como um sólido branco: 142 mg (53%).

LCMS: Coluna Sunfire C-18, 4,6 x 50 mm; 10-90% em água (acetato de amónio 10 mM) durante 2,5 min; caudal = 3,5 ml/min; Detecção 220 nm; Tempos de retenção: 0,50 min (399,2 (M+1)) e 0,66 min (399,3 (M+1)). ¹H RMN (Metanol-d4) 2,2 (singletos, 3H), 2,41 e 2,45 (singletos, 3H), 3,6 - 3,85 (m, 4H), 4,99 e 5,05 (singletos, 1H), 7,09 (s largo, 1H), 7,39 (d, 2H, *j* =8 Hz), 7,77 e 7,87 (d, 2H, *j* =8 Hz).

6.10. Síntese de N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutyl)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzo-hidrazida

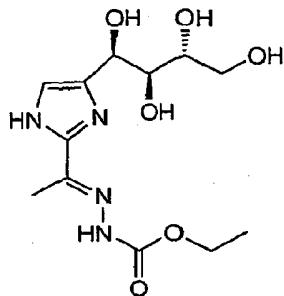


Suspendeu-se 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutyl)-1H-imidazol-2-il]etanona (150 mg, 0,65 mmol) em

metanol (3 ml) e água (1 ml). Adicionaram-se hidrazida de ácido benzóico (102 mg, 0,75 mmol, 1,2 eq.) e ácido clorídrico (uma gota, 12 N) e a suspensão foi agitada a 50°C durante 18 horas. A análise por LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura de reacção homogénea foi arrefecida para a temperatura ambiente e concentrada em vácuo. A SPE de Fase Inversa em C-18 (10 g Alltech Alta carga C18, gradiente desde água a metanol a 20%/água) originou o produto, uma mistura de isómeros E:Z aproximadamente 1:1, como um sólido incolor: 193 mg (85%).

LCMS: Coluna Sunfire C-18, 4,6 x 50 mm; 10-90% em água (acetato de amónio 10 mM) durante 2,5 min; caudal = 3,5 ml/min; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 0,49 min (349,2 (M+1)). ¹H RMN (Metanol-d4) 2,2 (singletos, 3H), 2,42 e 2,45 (singletos, 3H), 3,6 - 3,85 (m, 4H), 5,11 e 5,14 (singletos, 1H), 7,30 (s largo, 1H), 7,40-7,7 (m, 4H), 7,80 e 7,95 (m, 2H), 8,1 (s largo, 1H).

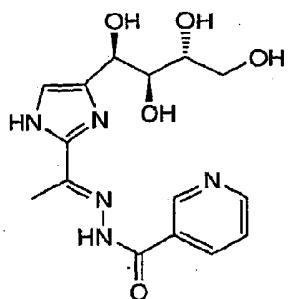
6.11. Síntese de (E)-2-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)hidrazinacarboxilato de etilo



Suspendeu-se 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il]etanona (150 mg, 0,65 mmol) em metanol (3 ml) e água (1 ml). Adicionaram-se carbazato de etilo (78 mg, 0,75 mmol, 1,2 eq.) e ácido clorídrico (uma gota, 12 N) e a suspensão foi agitada a 50°C durante 18 horas. A análise por LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura de reacção foi arrefecida para a temperatura ambiente, concentrada em vácuo e diluída com acetona. O precipitado branco resultante foi recolhido e lavado com acetona para dar o produto, um isómero aparente, como um sólido branco: 96 mg (47%).

LCMS: Coluna Sunfire C-18, 4,6 x 50 mm; 2 - 20% em água (acetato de amónio 10 mM) durante 2,5 min; caudal = 3,5 ml/min; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 0,25 min (317,35 (M+1)). ^1H RMN (Metanol-d4) 1,36 (t, 3H, $\text{j} = 8$ Hz), 2,28 (s, 3H), 2,42 e 2,45 (singletos, 3H), 3,60 - 3,85 (m, 4H), 4,34 (dd, 2H, $\text{j} = 8$ Hz), 5,08 (s, 1H), 7,27 (s, 1H).

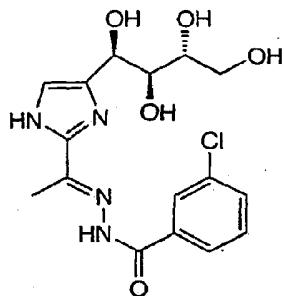
6.12. Síntese de (E)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)nicotino-hidrazida



Suspendeu-se 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il]etanona (215 mg, 0,93 mmol) em metanol (3 ml) e água (1 ml). Adicionaram-se hidrazida de ácido nicotínico (137 mg, 1,0 mmol, 1,1 eq.) e ácido clorídrico (uma gota, 12 N) e a suspensão foi agitada a 50°C durante 48 horas. A análise por LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura de reacção foi arrefecida para a temperatura ambiente e parcialmente concentrada em vácuo. O precipitado branco resultante foi recolhido e lavado com água para originar o produto, um isómero aparente, como um sólido branco: 311 mg (95%).

LCMS: Coluna Sunfire C-18, 4.6 x 50mm; 10 - 90% em água (acetato de amónio 10 mM) durante 2,5 min; caudal = 3,5 ml/min; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 0,22 min (350,27 (M+1)). ^1H RMN (DMSO-d₆) 2,37 (s, 3H), 3,60 - 3,85 (m, 4H), 4,40 (m, 2H), 4,71 (m, 1H), 5,01 (m, 2H), 5,16 (m, 1H), 7,25 (largo, 1H), 7,64 (largo, 1H), 8,35 (largo, 1H), 8,80 (largo, 1H), 9,14 (largo, 1H).

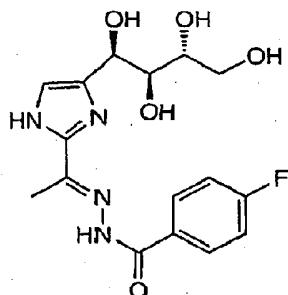
6.13. Síntese de 3-cloro-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzo-hidrazida



Suspendeu-se 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutyl)-1H-imidazol-2-il]etanona (194 mg, 0,84 mmol) em etanol (4 ml) e água (1 ml). Adicionaram-se hidrazida de ácido 3-clorobenzóico (170 mg, 1,0 mmol, 1,2 eq.) e ácido clorídrico (uma gota, 12 N) e a suspensão foi agitada a 50°C durante 48 horas. A análise por LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura de reacção foi arrefecida para a temperatura ambiente e parcialmente concentrada em vácuo. O precipitado branco resultante foi recolhido e lavado com etanol para dar o produto como uma mistura de E:Z ~3:1, como um sólido branco: 108 mg (33%).

LCMS: Coluna Sunfire C-18, 4,6 x 50 mm; 10- 90% em água (acetato de amónio 10 mM) durante 2,5 min; caudal = 3,5 ml/min; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 0,63 min (383,23 (M+1)). ¹H RMN (Metanol-d4) 2,44 (s, 3H), 3,60 - 3,90 (m, 4H), 5,12 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,65 (m, 2H), 8,04 (m, 2H).

6.14. Síntese de (E)-4-fluoro-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutyl)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzohidrazida

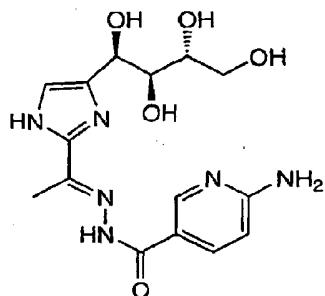


Suspendeu-se 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutyl)-1H-imidazol-2-il]etanona (172 mg, 0,74 mmol) em etanol (4 ml) e água (1 ml). Adicionaram-se hidrazida de ácido 4-

fluorobenzóico (131 mg, 0,85 mmol, 1,1 eq.) e ácido clorídrico (uma gota, 12 N) e a suspensão foi agitada a 55°C durante 48 horas. A análise por LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura de reacção foi arrefecida para a temperatura ambiente e parcialmente concentrada em vácuo. O precipitado branco resultante foi recolhido e lavado com etanol para dar o produto, como um isómero aparente, como um sólido branco: 97 mg (35%).

LCMS: Coluna Sunfire C-18, 4,6 x 50 mm; 10- 90% em água (acetato de amónio 10 mM) durante 2,5 min; caudal = 3,5 ml/min; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 0,55 min (367,24 (M+1)). ¹H RMN (Metanol-d4, uma gota de DCl) 2,55 (s, 3H), 3,60 - 3,90 (m, 4H), 5,22 (s, 1H), 7,30 (m, 2H), 7,54 (s, 1H), 8,08 (m, 2H).

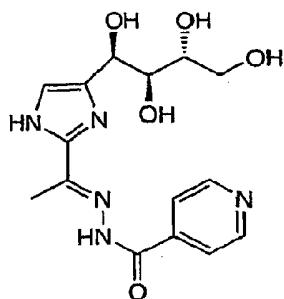
6.15. Síntese de (E)-6-amino-N'-(1-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)nicotinohidrazida



Suspendeu-se 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il]etanona (115 mg, 0,50 mmol) em etanol (4 ml) e água (1 ml). Adicionaram-se hidrazida substituída (91 mg, 0,6 mmol, 1,2 eq.) e ácido clorídrico (uma gota, 12 N) e a suspensão foi agitada a 55°C durante 48 horas. A análise por LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura de reacção foi arrefecida para a temperatura ambiente e parcialmente concentrada em vácuo. O precipitado branco resultante foi recolhido e lavado com etanol para dar o produto, como um isómero aparente, como um sólido branco: 136 mg (75%).

LCMS: Coluna Sunfire C-18, 4,6 x 50 mm; 10- 90% em água (acetato de amónio 10 mM) durante 2,5 min; caudal = 3,5 ml/min; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 0,15 min (365,32 (M+1)). 1 H RMN (Metanol-d4, uma gota de DCl) 2,58 (s, 3H), 3,60 - 3,90 (m, 4H), 5,22 (s, 1H), 7,17 (m, 1H), 7,54 (m, 1H), 8,44 (m, 1H), 8,68 (m, 1H).

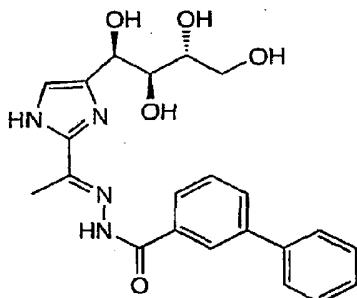
6.16. Síntese de (E)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)isonicotinohidrazida



Suspendeu-se 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il]etanona (168 mg, 0,73 mmol) em etanol (4 ml) e água (1 ml). Adicionaram-se hidrazida isonicotínica (110 mg, 0,80 mmol, 1,1 eq.) e ácido clorídrico (uma gota, 12 N) e a suspensão foi agitada a 55°C durante 24 horas. A análise por LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura de reacção foi arrefecida para a temperatura ambiente e parcialmente concentrada em vácuo. O precipitado branco resultante foi recolhido e lavado com etanol para dar o produto, como um isómero aparente, como um sólido branco: 136 mg (75%).

LCMS: Coluna Sunfire C-18, 4,6 x 50 mm; 10-90% em água (Acetato de Amónio 10 mM) durante 2,5 min; caudal = 3,5 ml/min; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 0,15 min (365,32 (M+1)). 1 H RMN (Metanol-d4, uma gota de DCl) 2,63 (s, 3H), 3,60 - 3,90 (m, 4H), 5,12 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 8,63 (d, 2H, j = 8 Hz), 9,14 (d, 2H, j = 8 Hz).

6.17. Síntese de (E)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)bifenil-3-carbohidrazida



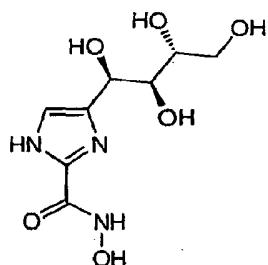
Suspenderam-se 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxi-butil)-1H-imidazol-2-il]etanona (315 mg, 1,36 mmol) e bifenil-3-carbo-hidrazida (360 mg, 1,81 mmol) em DMSO (2 ml). Adicionou-se ácido clorídrico concentrado (duas gotas) e a suspensão foi agitada a 40°C durante 5 horas. A análise por LCMS indicou a formação do produto e a ausência de material de partida. A mistura de reacção foi arrefecida para a temperatura ambiente, diluída com metanol e purificada por HPLC de fase inversa (NH₄OAc 10 mM/acetonitrilo). Duas fracções (isómeros E e Z) da massa desejada foram recolhidas separadamente e liofilizadas. A fracção um originou um sólido branco, 95 mg (16%). A fracção dois era um sólido branco, 82 mg (14%).

Fracção um: Coluna Zorbax C-8 para HPLC Analítica, 4,6 x 150 mm; Solvente A = acetato de amónio 10 mM; Solvente B = MeCN; 5% de B a 0 min, 5% de B a 1 min, 90% de B a 3 min, 4 min paragem; caudal = 3 ml/min; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 2,9 min (nota: contém ~5% do outro isómero). M+H = 425,28. ¹H RMN (DMSO-d₆ com 2 gotas de D₂O) 2,3 (singuleto, 3H), 3,3 - 3,7 (m, 4H), 4,9 (m, 1H), 7,19 (s, 1H), 7,37 (m, 1H) 7,47 (m, 2H), 7,67 (m, 3H), 7,85-7,92 (m, 2H) e 8,15 (s, 1H). HSQC da mesma amostra correlacionou o sinal de protão a 2,3 (CH₃) com um sinal de carbono a 20 ppm.

Fracção dois: Coluna Zorbax C-8 para HPLC Analítica, 4,6 x 150 mm; Solvente A = acetato de amónio 10 mM; Solvente B = MeCN; 5% de B a 0 min, 5% de B a 1 min, 90% de B a 3 min, 4 min paragem; caudal = 3 ml/min; Detecção 220 nm; Tempo de retenção: 2,963 min (nota: contém ~6% do outro isómero). M+H = 425,28. ¹H RMN (DMSO-d₆ com 2 gotas de D₂O) 2,4 (singuleto, 3H), 3,4 - 3,6 (m, 4H), 4,77 e 4,86 (singletos largos, combinado = 1H), 6,9 e 7,1 (singletos largos, combinado =

1H), 7,40 (m, 1H) 7,50 (m, 2H), 7,61 (m, 1H), 7,73 (m, 2H), 7,87 (m, 2H) e 8,10 (s, 1H). HSQC da mesma amostra correlacionou o sinal do protão a 2,4 (CH₃) com um sinal de carbono a 13 ppm.

6.18. Síntese de N-hidroxi-4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazole-2-carboxamida



Suspendeu-se 1-[4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il]etanona (18 g, 78,3 mmol) em dicloroetano (160 ml) e 2,2-dimetoxipropano (160 ml). Adicionou-se ácido 4-toluenossulfónico (3 g) e a mistura foi agitada a 70°C durante 18 horas. A reacção foi diluída com diclorometano e lavada com água, bicarbonato a 5%, salmoura a em seguida carregada em seco sobre SiO₂. A purificação por cromatografia flash (hexano/acetato de etilo) originou 1-(4-((4S,4'R,5R)-2,2',2',2' -tetrametil-4,4' -bi(1,3-dioxolan)-5-il)-1H-imidazol-2-il)etanona como um óleo incolor (18,8 g, 60,6 mmol, 77%; M+H calc: 311,4, obs: 311,3).

O produto obtido acima (20 g, 64,5 mmol) foi dissolvido em DMF. Adicionou-se K₂CO₃ (12,5 g, 90,3 mmol) seguido por brometo de benzilo (10,7 ml, 90,3 mmol). A reacção foi aquecida a 50°C durante 18 h. A análise por LC/MS indicou que ainda restava material de partida. Adicionou-se uma porção adicional de brometo de benzilo (5 ml, 42 mmol) e a temperatura aumentou para 60°C. Após 3 horas, a reacção foi neutralizada com água fria e extraída com acetato de etilo. Os extractos orgânicos foram lavados com água, em seguida salmoura, secos sobre sulfato de sódio e carregados sobre sílica gel. A cromatografia flash (20 a 40% de acetato de etilo em hexano) originou 1-(1-benzil-4-((4S,4'R,5R)-2,2',2',2' -tetrametil-4,4' -bi(1,3-dioxolan)-5-il)-1H-imidazol-2-il)etanona (16,1 g, 62%).

O intermediário obtido (13 g, 32,5 mmol) foi dissolvido em dioxano (120 ml) e tratado com NaOH (13,2 g) dissolvido em lixívia comercial (200 ml, NaOCl a 6%). Após 2 h de agitação vigorosa, a reacção foi extraída com acetato de etilo. Os extractos orgânicos foram lavados com salmoura e em seguida secos sobre celite. A filtração e evaporação originaram um sólido que foi ainda seco em vácuo para originar ácido 1-benzil-4-((4S,4'R,5R)-2,2,2',2'-tetrametil-4,4'-bi(1,3-dioxolan)-5-il)-1H-imidazole-2-carboxílico (13 g, rendimento quantitativo, M+H calc: 403,2, obs: 403,2).

O produto obtido acima (600 mg, 1,49 mmol), O-tritil-hidroxilamina (820 mg, 2,98 mmol), EDAC (430 mg, 2,24 mmol) e HOBr (305 mg, 2,24 mmol) foram combinados com DMF (8 ml) e trietilamina (622 μ l, 4,47 mmol). A reacção foi agitada à temperatura ambiente durante 22 h, concentrada e em seguida carregada sobre sílica utilizando DCM/MeOH. A cromatografia flash (MeOH/DCM) originou 1-benzil-4-((4S,4'R,5R)-2,2,2',2'-tetrametil-4,4'-bi(1,3-dioxolan)-5-il)-N-(tritiloxi)-1H-imidazole-2-carboxamida (480 mg, 0,73 mmol, 49%, M+H calc: 660,3, obs: 660,4).

O produto obtido acima (480 mg, 0,73 mmol) foi dissolvido em etanol (50 ml). Adicionou-se Pd(OH)₂ (500 mg, 20% sobre carvão, húmido) e a reacção foi agitada sob H₂ (65 psi) durante 18 h e filtrada. O etanol foi removido em vácuo. O resíduo foi dissolvido em DCM e purificado por cromatografia flash (MeOH/DCM) para originar N-hidroxi-4-((4S,4'R,5R)-2,2,2',2'-tetrametil-4,4'-bi(1,3-dioxolan)-5-il)-1H-imidazole-2-carboxamida (150 mg, 0,46 mmol, 63%, M+H calc: 328,1, obs: 328,3).

O produto obtido acima (150 mg, 0,46 mmol) foi dissolvido em acetona (8 ml) e água (8 ml). A reacção foi arrefecida para uma temperatura interna de -15°C utilizando um banho de gelo seco/acetona. Adicionou-se HCl concentrado (3 ml) a uma velocidade tal que a temperatura interna permaneceu abaixo de -10°C. O banho frio foi removido e a reacção foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas, a 4°C durante 18 h e novamente à temperatura ambiente durante 7 horas. Após remoção da acetona e de alguma água em vácuo, formou-se um precipitado. Adicionou-se dioxano (20 ml),

seguido por THF (10 ml). O sólido foi isolado por filtração, lavado com THF/dioxano e seco em vácuo para originar N-hidroxi-4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazole-2-carboxamida como o sal cloridrato (98 mg, 0,40 mmol), 87%.

Espectro de massa: M+H calc: 248,1, obs: 248,2. HPLC Analítica: Luna Phenyl-Hexyl, 5 um, 4,6x50 mm, acetato de amónio 10 mM isocrático com 1% de acetonitrilo, caudal = 3 ml/min, detecção a 220 nm, tempo de retenção = 0,245 min. ¹H RMN (DMSO-d6) 3,37-3,64 (m, 4H), 4,96 (singuleto largo, 1H), 7,47 (s, 1H), 11,9 (singuleto largo, 1H).

6.19. Medição dos Efeitos sobre os Linfócitos em Ratinhos

Os compostos foram administrados por gavagem oral ou na água de beber. Para experiências de dosagem oral, os compostos foram ressuspensos a partir dos cristais a 10 mg/ml em veículo (e.g., água). Os ratinhos (híbridos F1 da estirpe 129/B6) receberam uma gavagem de uma dose única de 100 mg/kg de composto (equivalente a 100 mpk da base livre para cada composto) ou um controlo constituído apenas por veículo, e retornaram às suas gaiolas. Os ratinhos foram anestesiados utilizando isofluorano, dezoito horas após a dosagem e foram recolhidos tecidos para análise tal como descrito abaixo. Para estudos com a água de beber, os compostos foram dissolvidos a 50 mg/L em água acidificada (pH = 2,8) contendo 10 g/L de glucose. Os ratinhos foram deixados com livre acesso à água contendo composto (ou solução de glucose como controlo) durante 72 horas. No final das 72 horas, os tecidos foram recolhidos para análise.

As medições de CBC foram obtidas como se segue. Os ratinhos foram anestesiados com isofluorano e o sangue foi recolhido a partir do plexo retroorbital para tubos de recolha de sangue com EDTA (Capiject-MQK, Terumo Medical Corp., Elkton, MD). A análise automatizada de CBC foi efectuada utilizando um instrumento Cell-Dyn 3500 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL) ou um instrumento HemaVet 850 (Drew Scientific, Inc., Oxford, CT).

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

Foram seguidos procedimentos padrão para a remoção não estéril do baço e do timo. Os órgãos foram dispersos em suspensões de células singulares forçando o tecido através de um filtro de células de 70 μ m (Falcon, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Para análise por FACS, os RBCs foram lisados por lise hipotônica, lavados e 1×10^6 células foram incubadas com 10 μ l de anti-CD16/CD32 (Fc Block™, BD-PharMingen, San Diego, CA) (diluição 1/10 em FWB) durante 15 minutos a 4°C. As células foram coradas com uma combinação de anticorpos conjugados com fluorocromo, diluídos em 50-100 μ l de FWB, adicionados directamente às células em Fc Block, durante 30 minutos a 4°C no escuro. Após a coloração, as células foram lavadas uma vez com 1 ml de FWB, e ressuspensas em 300 μ l de FWB para aquisição. Todos os anticorpos foram adquiridos de BD-PharMingen, San Diego, CA a menos que seja especificado o contrário. As amostras foram analisadas utilizando um citómetro de fluxo FACSCalibur e software CellQuest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

As misturas de anticorpos utilizadas para o timo foram: TCRb APC Cy7; CD4 APC; CD8 PerCP; CD69 FITC; e CD62L PE1. As misturas de anticorpos utilizadas para o baço e sangue foram: B220 PerCP; TCRb APC; CD4 APC Cy7; CD8 PE Cy7; CD69 FITC; e CD62L PE.

6.20. Medição dos Efeitos sobre os Níveis de S1P em Ratinhos

Os níveis de S1P no baço de ratos (híbridos F1 da estirpe 129/B6) foram medidos utilizando uma adaptação do ensaio de ligação radio-receptor descrito em Murata, N., et al., Anal. Biochem. 282:115-120 (2000). Este método utilizou

células HEK293F que sobre-expressam Edg-1, um dos subtipos do receptor de S1P, e tem por base a competição de S1P marcado com S1P não marcado numa dada amostra.

Células HEK293F foram transfetadas com um vector de expressão do receptor de S1P pEFneo (Edg-1) e foi seleccionado um clone celular resistente a G418. As células HEK293F que expressam Edg-1 foram cultivadas em 12 multiplacas em DMEM contendo 5% (v/v) de FBS numa atmosfera de ar humidificado:CO₂ (19:1). Vinte e quatro horas antes da experiência, o meio foi trocado para DMEM fresco (sem soro) contendo 0,1% (p/v) de BSA.

Dezoito horas após a administração do composto em análise, os ratinhos foram sacrificados e os seus baços foram removidos e congelados. O S1P foi obtido a partir do tecido congelado utilizando métodos conhecidos. Ver, e.g., Yatomi, Y., et al., FEBS Lett. 404:173-174 (1997). Em particular, 10 baços de rato em 1 ml de tampão fosfato 50 mM arrefecido em gelo (pH 7,5) contendo EGTA 1 mM, DTT 1mM e inibidores de protease completos da Roche foram homogeneizados três vezes a intervalos de um minuto sobre gelo. O resultado é centrifugado a 2500 rpm e 4°C durante 10 minutos para remover os detritos celulares. O sobrenadante foi então ultracentrifugado a 45000 rpm e 4°C num rotor 70Ti durante 1 hora para empurrar as proteínas associadas à membrana. O sobrenadante foi rejeitado e o pelete foi ressuspenso num volume mínimo (~1 ml) de tampão fosfato 50 mM arrefecido em gelo (pH 7,5) contendo EGTA 1 mM, DTT 1 mM e glicerol a 33% com inibidores de protease completos da Roche presentes. A concentração total em proteína foi medida utilizando a análise de Bradford.

O S1P foi extraído para clorofórmio/KCl/NH₄OH (pH ~ 12), e a fase aquosa superior é mantida. Foi então extraída em clorofórmio/metanol/HCl (pH < 1), e a fase orgânica inferior foi mantida e evaporada para proporcionar S1P, que foi armazenado num congelador até ser utilizado. Imediatamente antes da análise, a amostra seca foi dissolvida por sonicação num tampão de ligação constituído por Tris 20 mM-HCl (pH 7,5), NaCl 100 mM, NaF 15 mM e BSA a 0,4% (p/v).

O teor em S1P de uma amostra foi medido por um ensaio de ligação a radioreceptor com base numa ligação competitiva de [³³P]S1P com S1P na amostra sobre células que expressam Edg-1. As células HEK293F que expressam Edg-1 em 12 multiplacas confluentes foram lavadas duas vezes com o tampão de ligação arrefecido em gelo e em seguida incubadas com o mesmo tampão contendo [³³P]S1P 1 nM (cerca de 18,00 dpm por poço) e doses crescentes de S1P autêntico ou amostra de análise num volume final de 0,4 ml. As placas foram mantidas sobre gelo durante 30 minutos e as células foram lavadas duas vezes com o mesmo tampão de ligação arrefecido em gelo para remover o ligando não ligado. As células foram solubilizadas com uma solução composta por 0,1% de SDS, 0,4% de NaOH e 2% de Na₂CO₃ e a radioactividade foi contada por um contador de cintilação líquida. O teor em S1P no poço em análise foi estimado por extrapolação a partir da curva padrão de deslocamento. O teor em S1P na(s) amostra(s) de ensaio iniciais foi calculado multiplicando o valor obtido a partir da curva padrão pela eficiência de recuperação da extracção de S1P e pelo factor de diluição.

6.21. Efeitos dos Compostos sobre os Linfócitos em Ratinhos

Utilizando os métodos descritos acima, os efeitos *in vivo* de vários compostos foram determinados. Tal como mostrado nas Figuras 1-3, quando administrado a ratinhos (híbridos F1 da estirpe 129/B6) na água de beber, tanto o THI como um composto representativo da invenção (Composto 1) diminuíram a saída de linfócitos do timo.

A Figura 4 mostra os efeitos do veículo de controlo (água de beber), THI, composto 1, e 1-(4-metil-5-((1S,2R,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)tiazol-2-il)etanona (Composto 2) sobre as contagens de sangue totais. De modo interessante, os efeitos *in vivo* reportados por Pyne (WO 97/46543) para o Composto 2 não foram observados.

6.22. Modelo de Artrite Induzida por Colagénio

A artrite induzida por colagénio (CIA) é um modelo largamente utilizado de artrite reumatóide (RA), uma doença das articulações provocada por processos autoimunes e

inflamatórios. Ver na generalidade, Wooley P.H. et al., J. Immunol. 135(4):2443-2451; A. Persidis, Nature Biotechnology 17:726-728; Current Protocols in Immunology (John Wiley & Son, Inc. 1996). Estudos prévios estabeleceram uma hierarquia de capacidade de resposta à CIA ligada a certos haplotipos H-2. Mais recentemente, Campbell e colaboradores reavaliaram a CIA em ratinhos C57BL/129sv (H-2b) e verificaram que os ratinhos derivados de antecedentes C57B6 podem desenvolver CIA. Campbell I. K, et al. Eur. J. Immunol. 30: 1568-1575 (2000).

Aqui, colagénio para injecção, 2 mg/ml de colagénio de galinha tipo II (CII) (Sigma) foi dissolvido em ácido acético 10 mM por agitação durante a noite a 4°C. Adquiriu-se adjuvante completo de Freund (CFA) já preparado (Sigma). Utilizando uma seringa de vidro, o CII foi emulsionado num volume igual de CFA imediatamente antes da imunização. Para imunizar os ratinhos, foram utilizadas uma seringa de vidro e uma agulha 26G e os ratinhos foram injectados com emulsão CII/CFA intradermicamente na base da cauda. O CFA e 100 µg de CII de galinha num volume total de 50 µl de CFA foram utilizados para cada injecção. Uma imunização de reforço de 100 µg de CII emulsionado em CFA foi administrada pela mesma via 3 semanas após a imunização primária.

A injecção do colagénio conduziu o inchaço da planta da pata e das articulações dos ratinhos. Os ratinhos foram inspecionados a cada dois ou três dias quanto ao estabelecimento da artrite, o qual foi avaliado por combinação de medições com compasso da espessura da planta das patas traseiras e avaliação visual das articulações afectadas das patas traseiras. A progressão da CIA foi seguida durante 10 semanas após o estabelecimento inicial da doença, tempo após o qual a doença foi avaliada por histologia das articulações. Os ratinhos foram considerados negativos para artrite se não desenvolvessem CIA no espaço de 150 dias após a imunização com colagénio tipo II.

A presença ou ausência de artrite nos ratinhos foi determinada por um sistema de pontuação estabelecido visualmente. Na CIA em ratos qualquer uma das quatro patas pode ser afectada. A inflamação no seu pico estende-se desde

o tornozelo até aos dedos e é caracterizada por um inchaço e eritema extensos. Uma vez surgida a artrite, cada pata foi examinada 2 a 3 vezes por semana. Para avaliar a severidade da inflamação utilizou-se a pontuação visual de 0 a 4 largamente utilizada, em que: 0 = normal, sem evidência de eritema e inchaço; 1 = eritema e inchaço ligeiro confinado ao meio da pata ou articulação do tornozelo ou dedos individuais; 2 = eritema e inchaço ligeiro que se estende para o tornozelo e meio da pata ou inchaço em mais do que um dedo; 3 = eritema e inchaço moderado que se estende desde o tornozelo às articulações metatársicas; e 4 = eritema e inchaço severo que englobam o tornozelo, pata e dedos.

6.23. Efeito no Modelo de Artrite Induzida por Colagénio

O efeito de um composto da invenção no modelo de CIA foi determinado utilizando 30 ratinhos (híbridos F1 da estirpe 129/B6) no modelo descrito acima. Os ratinhos foram divididos aleatoriamente para dois grupos cegos que receberam 0 mpk (veículo de controlo) ou 100 mpk do composto. O veículo era água destilada estéril. O veículo de controlo foi doseado a 10 μ l/g de peso corporal.

A dosagem foi realizada uma vez por dia por gavagem oral. Começou três dias antes de iniciar a experiência de CIA e continuou ao longo da duração da experiência. A Figura 5 mostra o efeito do composto sobre a CIA ao longo do tempo, em que a pontuação cumulativa é a soma das pontuações do membro anterior e do tornozelo.

6.24. O Efeito de um Composto em Macacos

O efeito de um composto da invenção em vinte macacos cinomólogos, macho não virgens foi investigado por Covance Research Products Inc. (Alice, TX). Cada animal foi identificado com uma tatuagem numerada individualmente. Os animais foram aclimatados durante aproximadamente 11 dias antes da administração da dose. Na altura da administração da dose os animais eram considerados jovens adultos/adultos.

Durante a aclimatação e o período de ensaio, os animais foram alojados em gaiolas individuais. Os animais não foram

misturados durante pelo menos 48 horas após a administração da dose para permitir monitorizar quaisquer efeitos relacionados com o veículo ou artigo em análise. Os animais tinham acesso a dieta para primatas não certificada *ad libitum*, excepto como especificado para a administração da dose. Foram também providenciados frutos e outros regalos, conforme apropriado, durante os períodos em que não foi estabelecido jejum. A água foi providenciada *ad libitum*.

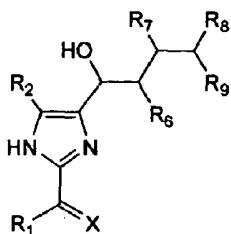
O composto analisado foi armazenado protegido da luz em recipiente selado num exsicador sob condições ambientais (aproximadamente temperatura ambiente). Foi fornecida água destilada por Covance para administração oral aos animais no grupo de veículo de controlo. As formulações de dose do artigo em análise para o ensaio foram preparadas no dia da administração. Para cada grupo, uma quantidade apropriada do artigo em análise foi pesada e um volume apropriado de água destilada.

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

A dose oral foi administrada via intubação nasogástrica. Antes de remover o tubo de gavagem, o tubo foi lavado com aproximadamente 5 ml de água. Para análise de hematologia, o sangue (aproximadamente 0,5 ml) foi recolhido de cada animal pré-dose (Dia -7), pré-dose (Dia -3) e a 8, 16, 24, 32, e 48 horas pós-dose. Os ensaios de hematologia do sangue completo foram realizados utilizando as amostras frescas obtidas no dia da recolha.

Tal como mostrado na Figura 6, uma dose oral simples do composto teve um efeito significativo sobre as contagens de glóbulos brancos e de linfócitos nos macacos, quando medidas 32 horas após a dosagem.

Lisboa, 2014-04-28

REIVINDICAÇÕES1. Composto de fórmula **II**:**II**

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

X é NR₃;

R₁ é OR_{1A}, NHOH, hidrogénio, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído;

R₂ é OR_{2A}, C(O)OR_{2A}, hidrogénio, halogéneo, nitrilo, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído;

R₃ é OR_{3A}, NHC(O)R_{3A}, NH₂SO₂R_{3A}, ou hidrogénio;

R₆ é OR_{6A}, OC(O)R_{6A}, N(R_{6B})₂, NHC(O)R_{6B}, hidrogénio, ou halogéneo;

R₇ é OR_{7A}, OC(O)R_{7A}, N(R_{7B})₂, NHC(O)R_{7B}, hidrogénio, ou halogéneo;

R₈ é OR_{8A}, OC(O)R_{8A}, N(R_{8B})₂, NHC(O)R_{8B}, hidrogénio, ou halogéneo;

R₉ é CH₂OR_{9A}, CH₂OC(O)R_{9A}, N(R_{9B})₂, NHC(O)R_{9B}, hidrogénio, ou halogéneo;

cada um de R_{1A}, R_{2A}, R_{3A}, R_{6A}, R_{7A}, R_{8A} and R_{9A} é independentemente hidrogénio ou alquilo, arilo, alquilarilo,

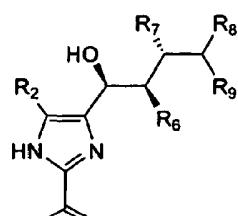
arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído; e

cada um de R_{6B} , R_{7B} , R_{8B} and R_{9B} é independentemente hidrogénio ou alquilo opcionalmente substituído com um ou mais grupos hidroxi ou halogéneo.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, que é um agente de redução dos linfócitos em circulação.

3. Composto de acordo com a reivindicação 1, que é um agente intensificador do nível de S1P.

4. Composto de acordo com a reivindicação 1, que é de fórmula **II(a)**:



II(a)

5. Composto de acordo com a reivindicação 4, em que R_1 é um dos seguintes: hidrogénio; alquilo inferior opcionalmente substituído; $NHOH$; OR_{1A} , em que R_{1A} é hidrogénio ou alquilo inferior opcionalmente substituído, em que alquilo inferior é definido como uma porção alquilo que tem de 2 a 4 átomos de carbono.

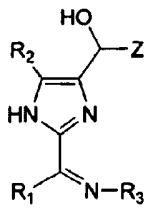
6. Composto de acordo com a reivindicação 4, em que R_2 é alquilo inferior opcionalmente substituído e em que R_{2A} é hidrogénio ou alquilo inferior opcionalmente substituído, em que alquilo inferior é definido como uma porção alquilo que tem de 2 a 4 átomos de carbono.

7. Composto de acordo com a reivindicação 4 em que R_3 é um dos seguintes: OR_{3A} ; $NHC(O)R_{3A}$; $NHSO_2R_{3A}$, em que R_{3A} é hidrogénio ou alquilo inferior opcionalmente substituído, ou em que R_{3A} é arilo ou heterociclo opcionalmente substituído

em que alquilo inferior é definido como uma porção alquilo que tem de 2 a 4 átomos de carbono.

8. Composto de acordo com a reivindicação 4, em que um ou mais de entre R₆, R₇, R₈ e R₉ é hidroxi ou halogéneo, ou em que todos de entre R₆, R₇, R₈ e R₉ são hidroxilo ou acetato.

9. Composto de fórmula **III**:



III

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

Z é alquilo opcionalmente substituído;

R₁ é OR_{1A}, NHOH, hidrogénio, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído;

R₂ é OR_{2A}, C(O)OR_{2A}, hidrogénio, halogéneo, nitrilo, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído;

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

cada um de R_{1A}, R_{2A} e R_{3A} é independentemente hidrogénio ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído.

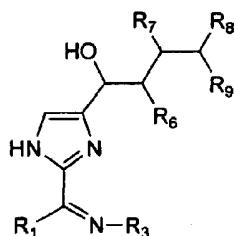
10. Composto de acordo com a reivindicação 9, em que Z é alquilo opcionalmente substituído com uma ou mais porções hidroxilo, acetato ou halogéneo.

11. Composto de acordo com a reivindicação 9, em que R₁ é alquilo inferior opcionalmente substituído ou em que R₁ é NHOH, em que alquilo inferior é definido como uma porção alquilo que tem de 2 a 4 átomos de carbono.

12. Composto de acordo com a reivindicação 9, em que R₂ é hidrogénio ou halogéneo.

13. Composto de acordo com a reivindicação 9, em que R₃ é um dos seguintes: OR_{3A}; NHC(O)R_{3A}; NHSO₂R_{3A}, por exemplo em que R_{3A} é hidrogénio ou alquilo inferior opcionalmente substituído ou em que R_{3A} é arilo ou heterociclo opcionalmente substituído, em que alquilo inferior é definido como uma porção alquilo que tem de 2 a 4 átomos de carbono.

14. Composto de acordo com a reivindicação 1, de fórmula IV:



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

R₁ é OR_{1A}, NHOH, hidrogénio, ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído;

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

R₆ é OR_{6A}, OC(O)R_{6A}, N(R_{6B})₂, NHC(O)R_{6B}, hidrogénio, ou halogéneo;

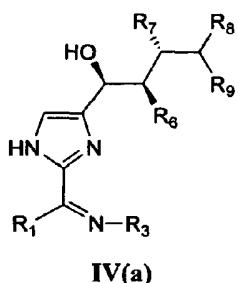
R₇ é OR_{7A}, OC(O)R_{7A}, N(R_{7B})₂, NHC(O)R_{7B}, hidrogénio, ou halogéneo;

R₈ é OR_{8A}, OC(O)R_{8A}, N(R_{8B})₂, NHC(O)R_{8B}, hidrogénio, ou halogéneo;

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

cada um de R_{1A} , R_{3A} , R_{6A} , R_{7A} , R_{8A} e R_{9A} é independentemente hidrogénio ou alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclo, alquil-heterociclo, ou heterocicloalquilo opcionalmente substituído.

15. Composto de acordo com a reivindicação 14, que é de fórmula IV(a):



16. Composto de acordo com a reivindicação 14, em que um ou mais de entre R_6 , R_7 , R_8 e R_9 é hidroxi ou halogéneo ou em que todos de entre R_6 , R_7 , R_8 e R_9 são hidroxilo ou acetato.

17. Composto de acordo com a reivindicação 16, em que todos de entre R_6 , R_7 , R_8 e R_9 são hidroxilo ou acetato.

18. Composto de acordo com a reivindicação 15, em que R_1 é alquilo inferior opcionalmente substituído ou em que R_1 é $NHOH$, em que alquilo inferior é definido como uma porção alquilo que tem de 2 a 4 átomos de carbono.

19. Composto de acordo com a reivindicação 15, em que R_3 é um dos seguintes: OR_{3A} ; $NHC(O)R_{3A}$; $NHSO_2R_{3A}$, em que R_{3A} é hidrogénio ou alquilo inferior opcionalmente substituído ou em que R_{3A} é arilo ou heterociclo opcionalmente substituído, em que alquilo inferior é definido como uma porção alquilo que tem de 2 a 4 átomos de carbono.

20. Composto, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável, de acordo com as reivindicações 1 ou 9, em que o composto é:

1-((4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona oxima;

(E)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona oxima;

(Z)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona oxima;

1-((4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona O-metiloxima;

(E)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona O-metiloxima;

(Z)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etanona O-metiloxima;

4-metil-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzenossulfono-hidrazida;

(E)-4-metil-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzenossulfono-hidrazida;

(Z)-4-metil-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzenossulfono-hidrazida;

N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzo-hidrazida;

N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)nicotino-hidrazida;

(E)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)nicotino-hidrazida;

(Z)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)nicotino-hidrazida;

3-cloro-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzo-hidrazida;

4-fluoro-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzo-hidrazida;

(E)-4-fluoro-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzo-hidrazida;

(Z)-4-fluoro-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)benzo-hidrazida;

6-amino-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)nicotino-hidrazida;

(E)-6-amino-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)nicotino-hidrazida;

(Z)-6-amino-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)nicotino-hidrazida;

N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)isonicotino-hidrazida;

(E)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)isonicotino-hidrazida;

(Z)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)isonicotino-hidrazida;

N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)bifenil-3-carbo-hidrazida;

(E)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)bifenil-3-carbo-hidrazida;

(Z)-N'-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)bifenil-3-carbo-hidrazida; ou

21. Composto, ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável, de acordo com as reivindicações 1 ou 9, em que o composto é:

(1R,2S,3R)-1-(2-(1-hidrazonoetil)-1H-imidazol-4-il)butano-1,2,3,4-tetraol;

N' -(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)aceto-hidrazida;

2-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)hidrazinacarboxilato de etilo;

(E)-2-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)hidrazinacarboxilato de etilo;

(Z)-2-(1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazol-2-il)etilideno)hidrazinacarboxilato de etilo;

N-hidroxi-4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetra-hidroxibutil)-1H-imidazole-2-carboxamida.

22. Composição farmacêutica que compreende um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores e um excipiente ou diluente farmaceuticamente aceitável.

23. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 1-21 para utilização como um medicamento.

24. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-21 para utilização na supressão da resposta imune num paciente.

25. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-21 para utilização no tratamento de uma ou mais das seguintes: artrite reumatóide, asma, dermatite atópica, doença de Behcet, doença de enxerto vs hospedeiro, lúpus eritematoso, esclerose múltipla, polinose, psoríase, rejeição de transplantes ou uveíte.

26. Utilização de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-21 para a manufatura de um medicamento, em particular um medicamento para supressão da resposta imune num paciente.

FIG. 1

PERCENTAGEM AUMENTADA DE CÉLULAS T MADDURAS EM TIMO TRATADO

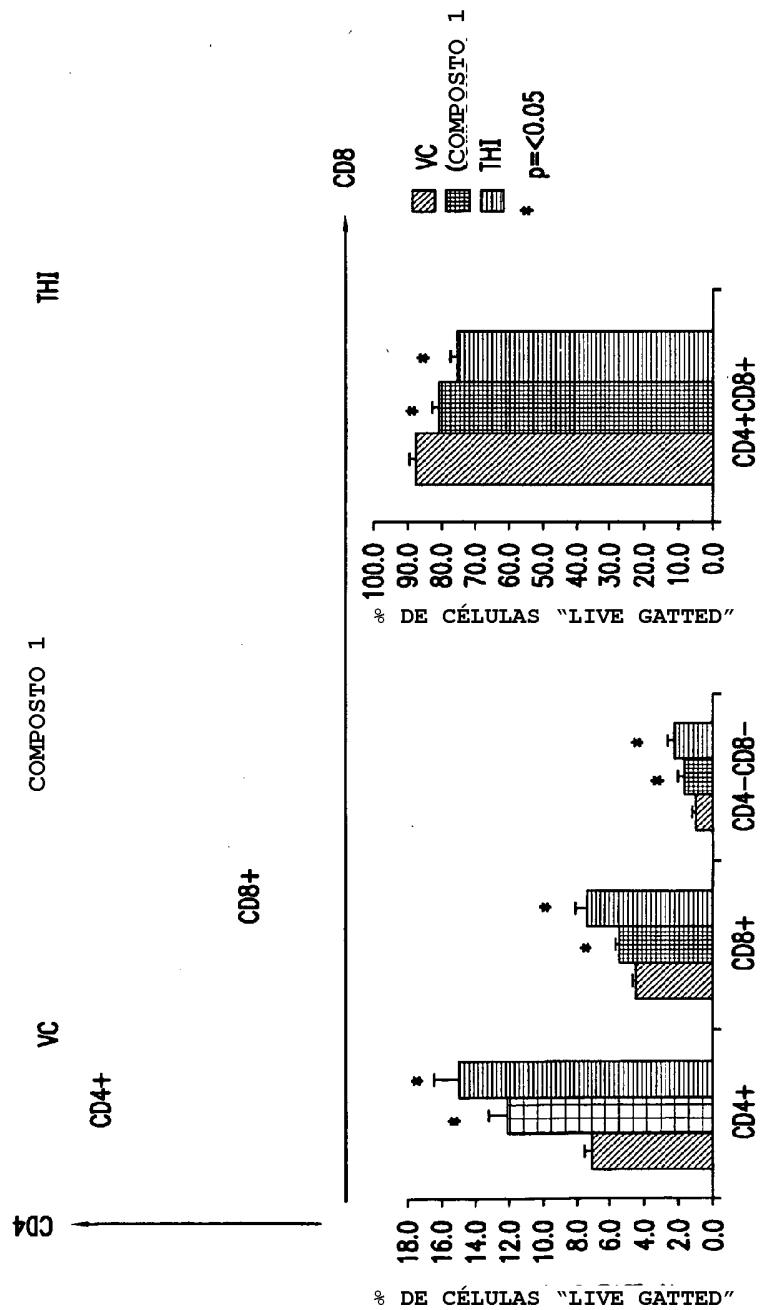


FIG. 2

PERCENTAGEM AUMENTADA DE CD4+ EMIGRANTES RECENTES DO TIMO

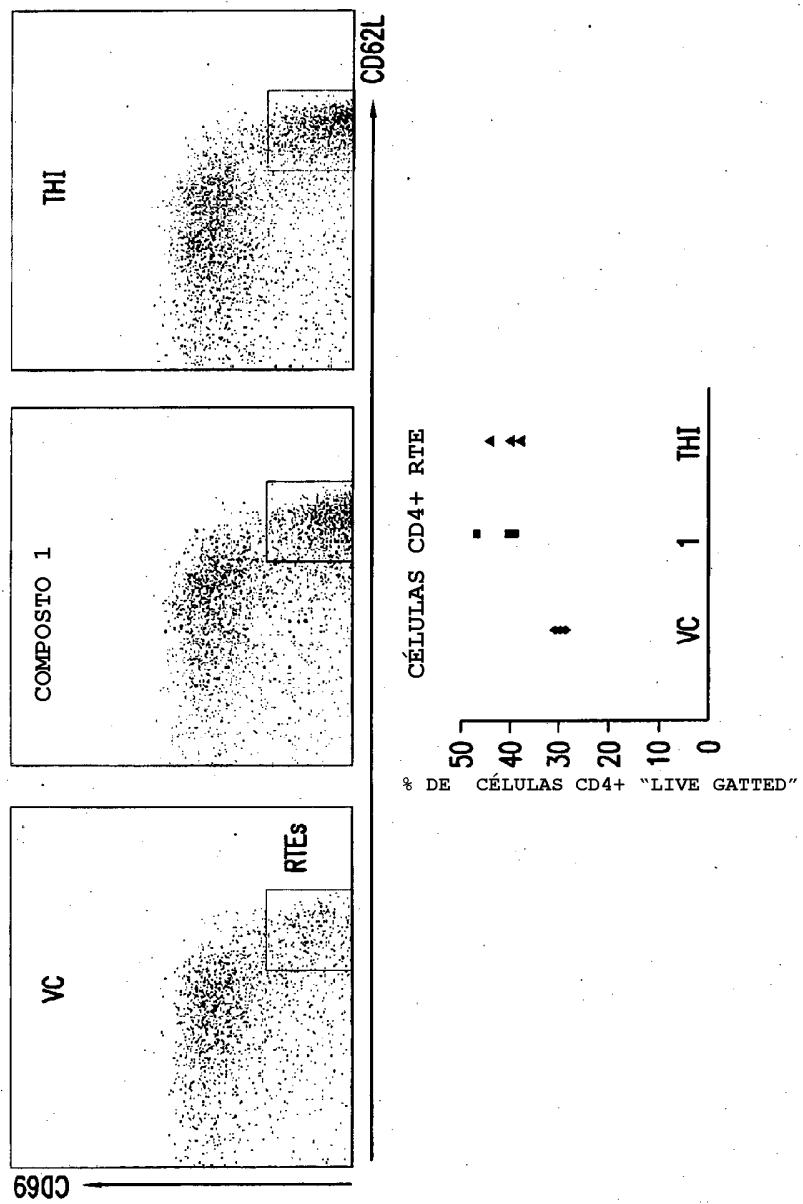


FIG. 3

PERCENTAGEM AUMENTADA DE CD8+ EMIGRANTES RECENTES DO TIMO

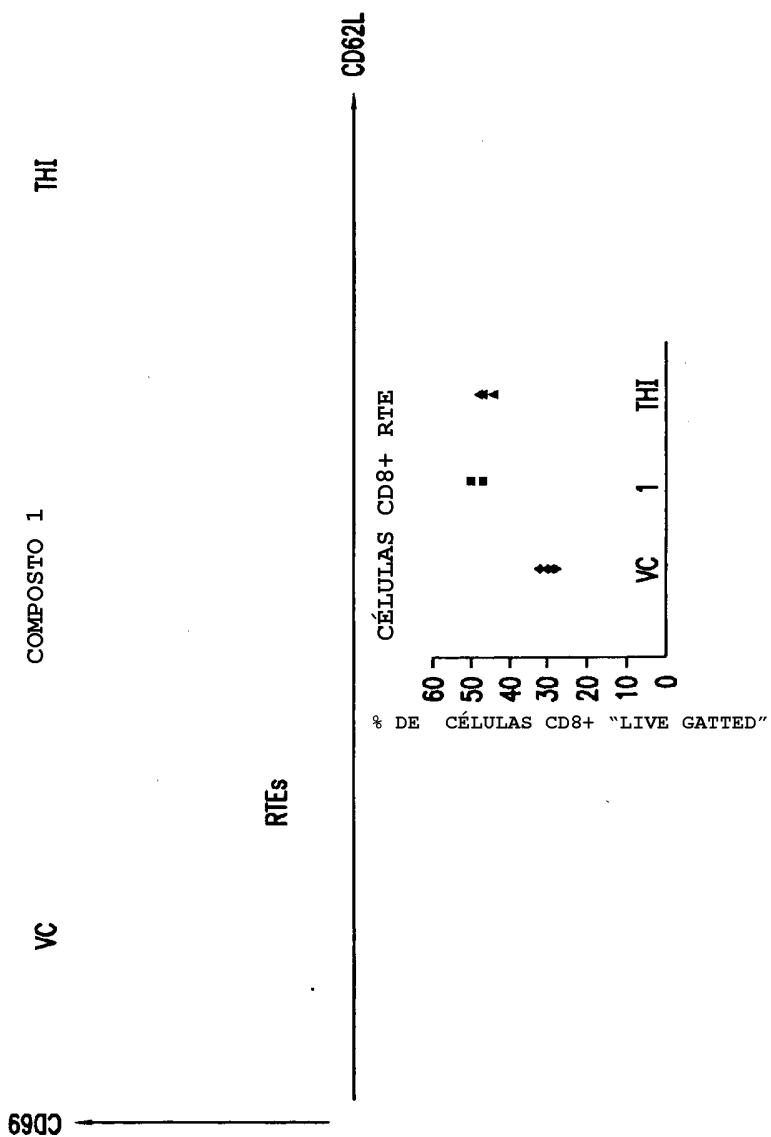
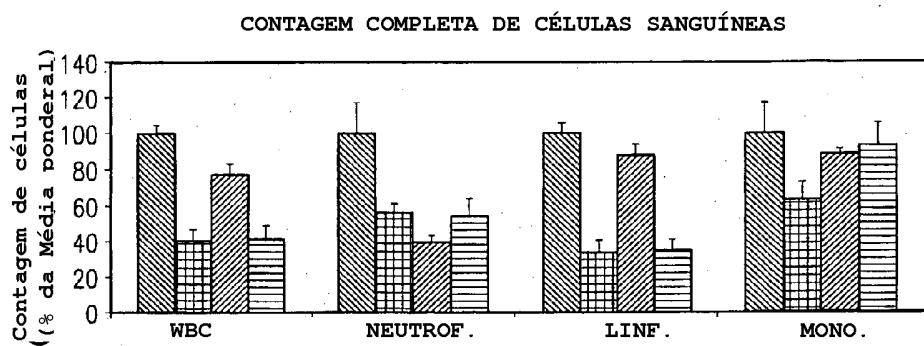
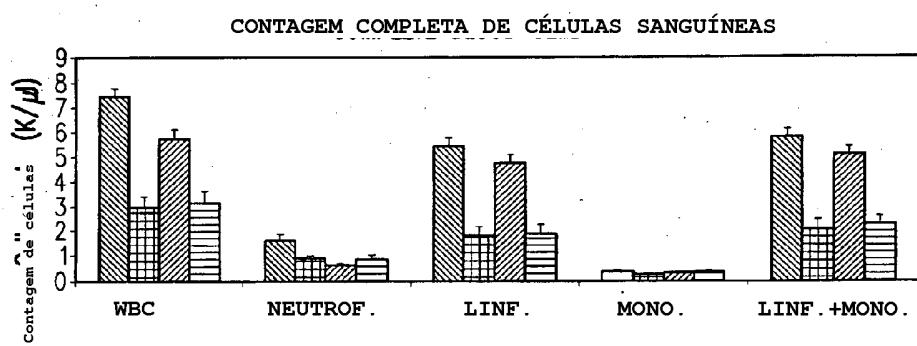
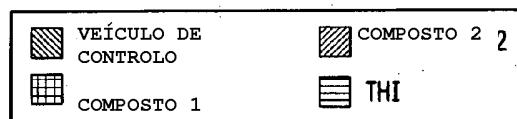


FIG. 4



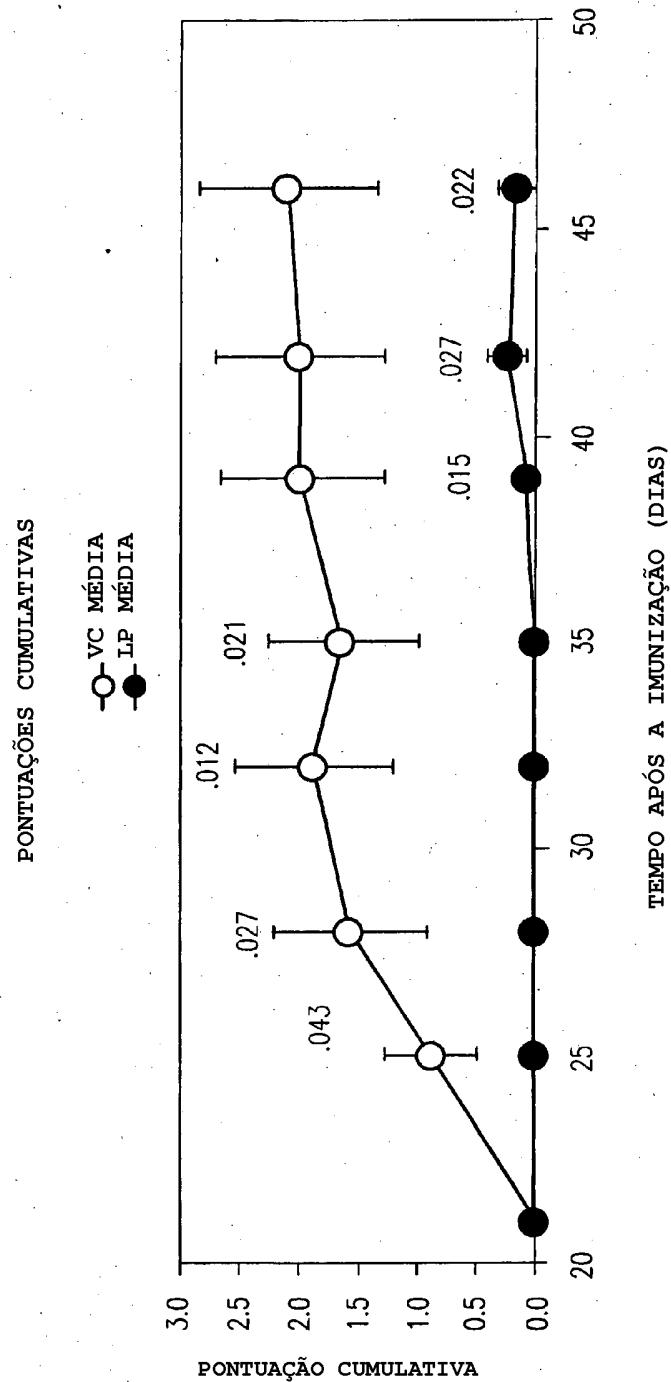
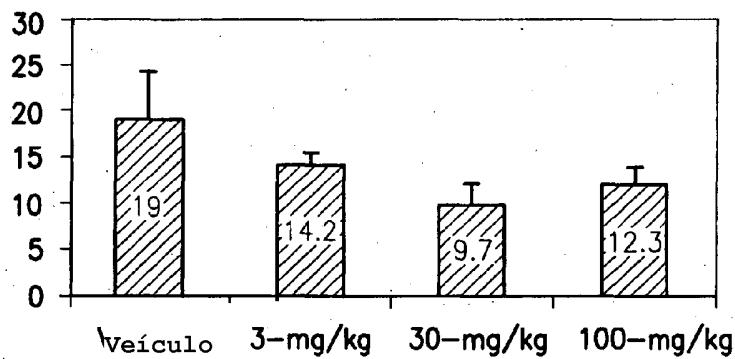


FIG. 5

FIG. 6

 MÉDIA \pm DP

LEUCÓCITOS - 32 HORAS PÓS-DOSE



LINFÓCITOS - 32 HORAS PÓS-DOSE

