



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

(21) PI 1015727-1 A2

(22) Data do Depósito: 08/09/2010

(43) Data da Publicação: 03/05/2016
(RPI 2365)



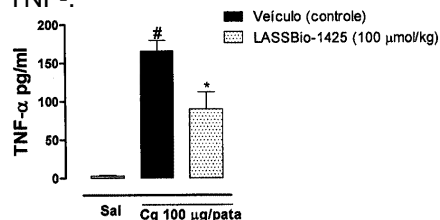
(54) **Título:** COMPOSTOS FENIL-PIRAZÓIS FTALIMÍDICOS BIOATIVOS, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS, SEU USO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/4035; A61K 31/4155; A61P 29/00

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

(72) **Inventor(es):** ELIEZER JESUS DE LACERDA BARREIROS, CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA, ANA LUISA PALHARES DE MIRANDA, CLEVERTON KLEITON FREITAS DE LIMA, MILLA MACHADO FUMIAN, RODOLFO DO COUTO MAIA, UROS LABAN

(57) **Resumo:** COMPOSTOS FENIL-PIRAZÓIS FTALIMÍDICOS BIOATIVOS, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS, SEU USO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS. A inovação ora proposta diz respeito a novos compostos fenil pirazóis ftalimídicos capazes de atuarem como anti-inflamatório e analgésico. A presente invenção se refere também a composições farmacêuticas contendo tais compostos e seu uso no tratamento e modulação de condições e doenças mediadas por TNF-.



**COMPOSTOS FENIL-PIRAZÓIS FTALIMÍDICOS BIOATIVOS, PROCESSO
PARA PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS, SEU USO E COMPOSIÇÕES
FARMACÊUTICAS**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção se refere a novos compostos fenil pirazóis ftalimídicos capazes de atuarem como antiinflamatório e analgésico. A presente invenção se refere também a composições farmacêuticas contendo tais compostos e seu uso no tratamento e modulação de condições e doenças mediadas por TNF- α .

10 **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

O fator de necrose tumoral (TNF) consiste em uma citocina pleiotrópica, regulando diversos eventos celulares e biológicos, dentre eles as respostas imunológica e inflamatória, a diferenciação e a proliferação celular, a apoptose e o metabolismo energético (CAWTHORN & SETHI, 2008).

15 Atualmente são conhecidos dois tipos de fator de necrose tumoral: o TNF- α e o TNF- β (ou linfotóxina), os quais apresentam uma similaridade notória em sua estrutura tridimensional, a despeito da baixa homologia sequencial (c.a. 33%) encontrada na estrutura primária de suas proteínas (GRAY *et al.*, 1984; PENNICA *et al.*, 1984; BANNER *et al.*, 1993). As
20 atividades de ambas as citocinas, TNF- α e TNF- β , são muito semelhantes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, embora elas sejam antigenicamente distintas (SACK, 2002).

O TNF- α é a citocina mais amplamente estudada pertencente à superfamília dos TNFs. As principais fontes de TNF- α *in vivo* são monócitos
25 ativados, fibroblastos e células endoteliais. Macrófagos, células T, linfócitos B, granulócitos, células da musculatura lisa, eosinófilos, condrócitos, osteoblastos, mastócitos, células da glia e queratinócitos também produzem TNF- α após estimulação (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2006).

O TNF- α é uma citocina versátil que altera a remodelagem tecidual, aumenta a permeabilidade da barreira celular epitelial, induz a ativação de macrófagos, o recrutamento de células inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão. Exerce, ainda, um papel fundamental no desenvolvimento, na homeostase e na resposta adaptativa do sistema imunológico (SURYAPRASAD & PRINDIVILLE, 2003).

Por outro lado, a despeito da relevância fisiológica desta citocina para o funcionamento adequado do organismo, é sabido que o aumento de sua biossíntese e liberação conduzem à exacerbação das respostas inflamatória e oxidativa, as quais estão relacionadas à patogênese de uma ampla gama de doenças, e.g. artrite reumatóide, psoríase, doença de Crohn, eritema nodoso leproso e mieloma múltiplo (HASHIMOTO, 2002; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2008).

Evidências consistentes mostram a inibição do TNF- α como um alvo para o controle de dor inflamatória. Neste contexto diferentes fármacos têm sido desenvolvidos para o tratamento de doenças inflamatórias como a artrite reumatóide, lúpus eritematoso, psoríase, câncer (MARRIOT *et al.*, 1997; SAMPAIO *et al.*, 2002; PALLADINO *et al.*, 2003; CUNHA *et al.*, 2005; DASGUPTA *et al.*, 2009;).

Doenças inflamatórias crônicas podem ser divididas em doenças auto-imunes como artrite reumatóide, doença de Crohn e lúpus eritematoso, e doenças que são causadas pela presença de inflamação persistente como aterosclerose e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (McCULLOCH, *et al.*, 2006). Em geral essas doenças são caracterizadas pela presença anormal de neutrófilos, macrófagos ativados, monócitos e de linfócitos ativados, especialmente linfócitos T. Entre os mediadores envolvidos destacam-se elevados níveis de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (O'SHEA, *et al.*, 2002).

As doenças inflamatórias crônicas afetam cerca de 5% da população mundial, com destaque para a artrite reumatóide, doença pulmonar obstrutiva crônica, aterosclerose e doença de Crohn.

O funcionamento do sistema imunológico é finamente modulado
5 pela atividade de citocinas e mediadores pró e anti-inflamatórios (PALLADINO
et al., 2003). Desequilíbrios presentes neste sistema podem conduzir ao
desenvolvimento de quadros inflamatórios crônicos, doenças auto-imunes e ao
aumento da susceptibilidade e/ou não resolução de infecções (HANADA &
YOSHIMURA, 2002). Nos distúrbios inflamatórios imunomediados (do inglês,
10 *immune-mediated inflammatory disorders*, IMIDs), o equilíbrio imunológico
tecidual é rompido e, por conseguinte, não há resolução do quadro inflamatório,
que evolui promovendo dano tecidual (LIN *et al.*, 2008).

As abordagens terapêuticas atualmente empregadas no
tratamento destes distúrbios focam, em sua maioria, na supressão da produção
15 de mediadores pró-inflamatórios e na inibição do desencadeamento da
resposta imunológica, utilizando, por exemplo, a modulação das vias de
sinalização de citocinas.

Em particular, o emprego de moduladores da produção e
atividade biológica do TNF- α tem sido amplamente descrito e discutido na
20 literatura (LIN *et al.*, 2008), uma vez que o aumento da concentração tecidual
e/ou plasmática desta citocina está associado ao estabelecimento e à evolução
de diversas doenças de origem autoimune – e.g. doença de Crohn, diabetes,
psoríase, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico; infecciosa – e.g.
hepatite C, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), choque séptico e
25 eritema nodoso leproso; e tumoral – e.g. mieloma múltiplo e câncer ovariano
(MARRIOT *et al.*, 1997; SAMPAIO *et al.*, 2002; PALLADINO *et al.*, 2003;
STEINWURZ, 2003; SIROHI & POWLES, 2004; PAUL *et al.*, 2006;
DASGUPTA *et al.*, 2009).

Neste contexto, a busca de abordagens terapêuticas eficientes na modulação do TNF- α tem sido alvo de diversos esforços de pesquisa. Aproximadamente um milhão de pessoas ao redor do mundo estão em tratamento ou já foram tratadas com inibidores desta citocina disponíveis no mercado farmacêutico, englobando indicações que incluem a artrite reumatóide, a artrite psoriática, a psoríase e as doenças inflamatórias intestinais, além de inúmeras aplicações clínicas potenciais atualmente em diferentes estágios de avaliação (SURYAPRASAD & PRINDIVILLE, 2003; FELDMANN *et al.*, 2005; HOCHBERG *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2008).

Compostos N-fenil, 5-heteroaril, 4-amino pirazólicos e seus efeitos anti-inflamatórios foram descritos por Barreiro e Colaboradores (Velooso, M. P., 2000, Tese de Doutorado).

Durante sua tese de doutorado, Velooso (2000) foi responsável pelo planejamento e síntese de uma série de derivados amino-bipirazólicos, dentre eles, LASSBio-455 e LASSBio-715, propostos como inibidores da enzima prostaglandina endoperoxido sintase-2 (PGHS-2). Estudos farmacológicos realizados para estes derivados confirmaram a capacidade dos mesmos em inibir o edema de pata de rato induzido por carragenina, a hipernocicepção induzida por formalina e carragenina e a produção de PGE₂, mas de forma não seletiva (dados não divulgados).

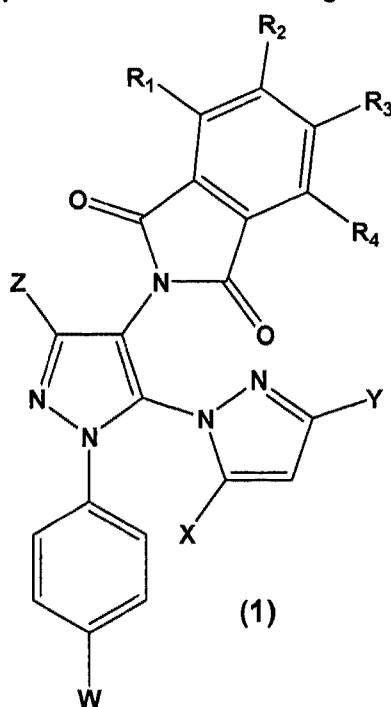
Compostos estruturalmente semelhantes foram descritos por Laban (2009), durante seu projeto de pós-doutoramento, responsável pela síntese de uma série de derivados tendo como protótipo o derivado LASSBio-715, promovendo diferentes modificações estruturais e originando uma nova série de derivados fenilpirazólicos entre eles o derivado LASSBio-1425, objeto deste invenção.

As principais modificações estruturais foram realizadas no anel aromático e no grupo amino ligados à subunidade fenilpirazólica, além da obtenção de diferentes tipos de sal formados para alguns dos derivados.

Os presentes inventores verificaram que, interessadamente, a substituição do grupo 4-amino ligado ao anel pirazólico por grupo ftalimídico, levou a uma nova classe de compostos com efeito inibitório sobre a produção de TNF- α . Efeito esse que foi comprovado tanto em modelo de cultura celular de macrófagos murinos como em modelo de inflamação induzida por carragenina, em camundongos.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Em um primeiro e principal aspecto, a presente invenção se refere a novos compostos que apresentam a estrutura geral (1):



10

Onde:

W pode ser hidrogênio, C1-C6 alquila ou cicloalquila, hidroxila, metoxila, cloro, flúor, bromo, ciano.

Z, X e Y podem ser hidrogênio, C1-C6 alquila ou cicloalquila, trifluormetila, fenila.

R₁ pode ser hidrogênio, flúor, cloro, bromo, metila, nitro, amino, metoxila, hidroxila, carboxila.

R₂ pode ser hidrogênio, flúor, cloro, bromo, metila, metoxila, hidroxila.

R₃ pode ser hidrogênio, flúor, cloro, bromo, metoxila.

R₄ pode ser hidrogênio, flúor, cloro, bromo.

Ou sais e solvatos farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos.

Os novos compostos de fórmula (1) foram obtidos em
5 rendimentos químicos que variaram de bom a excelente, empregando-se
metodologia sintética aqui descrita, que caracteriza-se por apresentar poucas
etapas, com elevados rendimentos, partindo-se de compostos comercialmente
disponíveis, o que qualifica esta metodologia sintética para utilização industrial.
Os compostos de fórmula (1) da presente invenção podem ser preparados por
10 um processo que compreende as etapas sintéticas de:

- Nitração de derivados 5-cloro-fenil-1H-pirazólicos adequados, de forma regioseletiva, com ácido nítrico fumegante em anidrido acético;
- Acoplamento carbono-nitrogênio, através de substituição nucleofílica aromática, para inserção do segundo núcleo pirazólico adequado na
15 posição 5 do núcleo fenil-1H-pirazólico de partida em meio básico utilizando como solventes dimetilssulfóxido (DMSO) e tetrahidrofurano (THF);
- Redução quimiosseletiva do grupo nitro inserido em etapa anterior ao grupo amino com ferro metálico em meio ácido utilizando como
20 solventes etanol e água destilada;
- Acoplamento com os respectivos anidridos ftálicos através de fusão térmica (130°C) para a obtenção dos derivados bipirazolo-isoindolinodiônicos. Esta reação é feita sem a presença de solventes.

Em outro aspecto, a presente invenção se refere ao uso dos
25 compostos acima descritos para a produção de medicamentos úteis para o tratamento ou modulação de doenças e condições mediadas por TNF- α , ou seja, a utilização dos ditos compostos, nas formulações de medicamentos, em diferentes formas farmacêuticas úteis, orais ou não, para o tratamento de condições dolorosas de várias origens e inflamatórias, crônicas e agudas, de

naturezas diversas, mediadas ou não, por citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α).

A produção de medicamentos contendo os novos compostos ora descritos pode ser realizada com base em formulações e processos de
5 manufatura usuais e atualmente disponíveis no estado da técnica, sendo sua utilização, proposta, na preparação de medicamentos, para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas e hiperalgesia em mamíferos, preferencialmente humanos, mais especificamente, no tratamento das doenças inflamatórias, que são doenças inflamatórias crônico degenerativas,
10 exemplificadas na artrite reumatóide, espondilite, doença de Crohn, psoríase e asma.

A título de exemplificação serão descritas a síntese dos seguintes compostos:

- a) 5-cloro-3-metil-4-nitro-1-fenil-1H-pirazol;
- b) 5-(3,5-dimetil-1H-pirazolil)-3-metil-4-nitro-1-fenil-1H-pirazol;
- 15 c) 5-(3,5-dimetil-1H-pirazolil)-3-metil-1-fenil-4-amino-1H-pirazol;
- d) 2-(5-(3,5-dimetil-1H-pirazolil)-3-metil-1-fenil-1H-pirazolil)isoindolino-1,3-diona.

Os seguintes exemplos experimentais servem para ilustrar a presente invenção sem, contudo, limitar o escopo da invenção ora apresentada.

20 **EXEMPLO 1: PREPARAÇÃO DO DERIVADO 5-CLORO-3-METIL-4-NITRO-1-FENIL-1H-PIRAZOL**

Procedimento: Em um balão de 3 bocas (2 L), equipado com termômetro sustentado por um septo de borracha posicionando o bulbo em direção ao centro do balão, foram adicionados 100 g de 5-cloro-1-fenil-3-metilpirazol (0.51 mol). Em seguida adicionou-se 580 ml de anidrido acético
25 previamente resfriado a 4 °C. Imergiu-se o balão num banho de etilenoglicol e gelo seco (-18 °C) e sob agitação magnética foram adicionados 100 ml de ácido nítrico fumegante por 20 minutos gota a gota. Após meia hora o frasco de reação foi transferido para um banho de gelo e cloreto de sódio (-4 °C). A

temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow -4\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi mantida durante mais uma hora através da adição de pequenos pedaços de gelo seco. Depois desse tempo, permitiu-se que a temperatura subisse gradualmente até $13\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde ocorreu a precipitação de um sólido amarelo que foi vertido sobre 1,3 L de gelo moído em um béquer de 4 L. Após derretido o gelo, o sólido foi filtrado, lavado com 1 L de água e seco por filtração (1 h). O sólido amarelo obtido foi recristalizado em etanol para fornecer a nitropirazola (35 g) como agulhas brancas. Da solução amarela etanólica restante foram obtidos após outra recristalização, 8,8 g adicionais, totalizando 43,8 g (0,18 mols) do produto desejado. Esse material foi usado na etapa subsequente depois de secado sob vácuo por 4 horas.

Sólido amarelo, pf. $99\text{-}102\text{ }^{\circ}\text{C}$. RMN ^1H (200MHz, CDCl_3 , TMS) δ (ppm): 2,62 (s, 3H, CH_3); 7,53 (s, 5H). RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3 , TMS) δ (ppm): 14,7; 125,6; 128,1; 129,5; 129,9; 137,0; 147,7. IV (ν_{max} , KBr) ν (cm^{-1}): 3111, 3076, 3002, 2935, 2977, 1596, 1542, 1358.

15 **EXEMPLO 2: PREPARAÇÃO DO DERIVADO 5-(3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOLIL)-3-METIL-4-NITRO-1-FENIL-1H-PIRAZOL**

Em um balão de 1 L foram adicionados 6 g NaOH (0,15 mols), 13 g (0,14 mols) 3,5-dimetilpirazol em 265 mL DMSO. A solução foi exposta a ultra-som (opcional) por 30 minutos sobre atmosfera de argônio. O balão foi transferido num banho de gelo e 5-cloro-1-fenil-3-metil-4-nitropirazol (30,4 g; 0,13 mols) em 120 mL THF foi adicionado com seringa. O frasco foi exposto a ultra-som mais uma vez até o CDD indicou o término de reação (30-50 min.). A solução foi vertida sobre 1L de gelo e após o sólido escuro foi coletado por filtração. A solução filtrada foi extraída com diclorometano (3 x 200 mL), lavada com água (3 x 200 mL), solução saturada de cloreto de sódio (2 x 300 mL) e seca com MgSO_4 anidro. O sólido escuro obtido previamente foi dissolvido nessa solução e filtrada (200 mL celite) para remover impurezas insolúveis. Após de remoção do solvente foi obtido um óleo marrom-vermelho que foi seco em alto vácuo por 2 horas. O material semi-solificado obtido foi dissolvido em

EtOH (100-150 mL) e precipitado com adição lenta de água destilada com agitação magnética. Após de secado no alto vácuo, 30,9 g (0,104 mols; 80 %) do produto desejado foram obtidos na forma de um pó bege que foi utilizado na etapa subsequente sem purificações adicionais.

5 Sólido bege, pf. 84-87°C. RMN ¹H (200MHz, CDCl₃, TMS) δ (ppm): 1,92 (s, 3H, CH₃); 2,18 (s, 3H, CH₃); 2,61 (s, 3H, CH₃); 5,94 (s, 1H); 7,18 (m, 2H); 7,30 (m, 3H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃, TMS) δ (ppm): 11,0; 13,8; 14,6; 107,8; 123,2; 129,1; 129,5; 134,5; 137,2; 143,3; 146,9; 152,8. IV (ν_{max}, KBr) ν (cm⁻¹): 3110, 3074, 3022, 2998, 2972, 2928, 1603, 1582, 1502,
10 1426, 1365.

EXEMPLO 3: PREPARAÇÃO DO DERIVADO 5-(3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOLIL)-3-METIL-1-FENIL-4-AMINO-1H-PIRAZOL

Em um balão de 1 L imerso num banho de gelo contendo 280 mL de monohidrato de hidrazina (98%) (5,44 mols) sobre agitação magnética, foi
15 adicionado, ácido fórmico (201,6 ml; 5,34 mols) gota a gota pelo condensador (50 cm). Diretamente após de término da adição, essa solução de monoformato de hidrazina foi transferida pela decantação para um frasco contendo 16 g (53,85 mmols) de 5-(3,5-dimetilpirazol-1H-il)-1-fenil-3-metil-4-nitropirazol, 2,5 g Pd/C 10%, 15 g Zn, 100 mL EtOH e 200 mL MeOH. A suspensão resultante foi
20 mantida em banho de ultrassom até o término da reação (30-45 min.) indicado pelo CCD. A suspensão foi filtrada em celite (500 mL) que foi posteriormente lavado com a solução alcoólica MeOH/EtOH 1:1 (200 mL). Os solventes alcoólicos foram removidos à vácuo e a solução aquosa restante foi extraída com acetato de etila (3 x 150 ml). A fase orgânica foi lavada com água (3x100
25 mL), solução saturada de cloreto de sódio (2 x 100 mL), seca (MgSO₄), filtrada e evaporada à vácuo para se obter um óleo amarelo que foi seco em alto vácuo (2h). O óleo obtido foi dissolvido em 1.5 L de dietil éter em um balão de 2L com agitação magnética e HCl gasoso (~30 min) foi introduzido promovendo a precipitação de cloridrato como um pó branco. A agitação magnética foi

interrompida e o solvente amarelo foi descartado. Mais um litro de éter foi adicionado, e a solução agitada brevemente e enquanto o produto se deposita no fundo de após que solvente ácido foi descartado. Esse processo foi repetido mais uma vez com acetato de etila. O produto foi filtrado e recristalizado
 5 (EtOH/EtOAc.) para fornecer 13,6 g (40,12 mols; 75%) o produto desejado na forma de dicloridrato. Pf: 199-209 °C.

Sólido bege, pf. 84-87°C. RMN ¹H (200MHz, CDCl₃, TMS) δ (ppm): 1,73 (s, 3H, CH₃); 2,20 (s, 3H, CH₃); 2,21 (s, 3H, CH₃); 2,86 (s, 2H, NH₂) 5,85 (s, 1H); 6,97 (m, 2H); 7,11 (m, 3H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃, TMS) δ
 10 (ppm): 10,8; 11,6; 14,1; 106,8; 121,1; 123,8; 125,2; 126,2; 129,2; 139,0; 139,6; 143,0; 151,5. IV (ν_{max}, KBr) ν (cm⁻¹): 3404, 3322, 3214, 3067, 2954, 2923, 1638, 1597, 1503.

EXEMPLO 4: PREPARAÇÃO DO DERIVADO 2-(5-(3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOLIL)-3-METIL-1-FENIL-1H-PIRAZOLIL)ISOINDOLINO-1,3-DIONA (LASSBio-1425)

15 Em um balão foram colocados 8,8 g (33,0 mmols) de 5-(3,5-dimetil-1H-pirazolil)-3-metil-1-fenil-4-amino-1H-pirazol e 4,9 g (33,0 mmols) de anidrido ftálico, após isso, o balão foi acoplado a um condensador e aquecido até 130°C, o balão foi mantido sob este aquecimento por uma hora. Em seguida, a mistura reacional foi dissolvida em acetato de etila e lavado com
 20 solução 10% de HCl. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e em seguida evaporada a vácuo. O produto foi purificado em coluna cromatográfica (hexano/acetato de etila 9:1) fornecendo 10,48 g (36,4 mmols, 80%) de LASSBio-1425 como um sólido branco.

Sólido branco, pf. 201-202°C. RMN ¹H (200MHz, CDCl₃, TMS) δ
 25 (ppm): 1,81 (s, 3H, CH₃); 2,04 (s, 3H, CH₃); 2,27 (s, 3H, CH₃); 5,96 (s, 1H); 7,07 (d, 2H); 7,41 (m, 3H); 7,87 (m, 4H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃, TMS) δ (ppm): 10,7; 12,4; 13,8; 107,7; 110,65; 122,3; 124,4; 128,4; 130,0; 131,7; 134,4; 135,7; 138,3; 143,0; 147,2; 151,3; 166,5. IV (ν_{max}, KBr) ν (cm⁻¹): 1722, 1510, 1399, 1372, 718.

EXEMPLO 5: AÇÃO INIBITÓRIA DE LASSBIO-1425 SOBRE A PRODUÇÃO DE TNF- α EM MODELO DE CULTURA CELULAR DE MACRÓFAGOS MURINOS

O derivado LASSBio-1425 foi capaz de inibir a produção de TNF- α em modelo *in vitro* de dosagem de TNF- α em cultura de macrófagos murinos estimulados com LPS (100 ng/mL) utilizando a metodologia descrita por GALLILY e colaboradores (1997) onde camundongos suíços (25g a 30g) foram estimulados com uma solução de tioglicolato 3% administrada por via intraperitoneal. Após 3 dias, os macrófagos foram coletados por lavagem do peritônio com RPMI, as células foram então contadas em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 100.000 células/ml. Posteriormente, 300 μ l desta suspensão de células foram plaqueados em placa de 96 poços e incubados por 1 hora em estufa de CO₂ (5% CO₂, temperatura 37°C, umidade 80-90 %) para permitir a adesão dos macrófagos à superfície dos poços. Após este período, os poços foram lavados por 2 vezes com PBS para a retirada das células que não aderiram, adicionados de 300 μ L de RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado, estreptomicina e penicilina (50 U/mL), incubando-os com 1 μ l de DMSO ou da solução estoque das substâncias teste por 1 hora nas mesmas condições citadas acima. Após este período, os macrófagos foram estimulados com LPS (100 ng/ml) por 24 horas. Após 24 horas de estímulo, o sobrenadante foi coletado e o TNF- α dosado por ensaio imunoenzimático, utilizando o kit adequado conforme as instruções do fabricante. LASSBio-1425 apresentou uma potência superior ao fármaco talidomida, apresentando uma CI₅₀ de 44,7 μ M enquanto que a talidomida apresentou uma CI₅₀ superior a 200 μ M.

Tabela 1: Potência anti-TNF- α de LASSBio-1425, no modelo de dosagem de TNF- α em macrófagos peritoneais de camundongos

Compostos	Faixa de Concentração (μM)	CI₅₀ (μM)	Efeito máximo (% de inibição)
Talidomida	100 - 300	>200	-
LASSBio-1425	10 - 200	44,7	80

CI₅₀ = concentração inibitória correspondente a 50% do efeito máximo.

O efeito de LASSBio-1425 em inibir a produção de TNF- α foi confirmado pois LASSBio-1425 não apresentou toxicidade (não promoveu morte celular) no estudo da viabilidade celular pelo teste do MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) que foi avaliada adaptando-se um protocolo descrito por MOSMANN e colaboradores (1983) onde uma suspensão de macrófagos peritoneais de camundongos suíços foram extraídos e plaqueados em placas de 96 poços (30.000 cels/poço) seguindo a mesma metodologia descrita para dosagem de TNF- α em cultura de macrófagos até o estímulo das células com LPS. Após 18 horas de estímulo com LPS, adiciona-se 20 μ l de uma solução de MTT (5 mg/ml) à cultura de macrófagos, seguida pela incubação por mais 4 horas a 37°C. Ao final deste tempo, foram adicionados 200 μ l de DMSO para a solubilização de toda a substância depositada. A leitura da densidade óptica foi realizada em leitor de microplaca a 490 nm.

EXEMPLO 6: AÇÃO INIBITÓRIA DE LASSBIO-1425 SOBRE A PRODUÇÃO DE TNF- α EM MODELO DE INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR CARRAGENINA

Cinco horas após o estímulo inflamatório pela injeção intraplantar de carragenina (100 μ g/pata), os animais foram sacrificados, os tecidos cutâneos plantar foram retirados. As amostras foram homogeneizadas em 500 μ l de tampão apropriado contendo inibidores de proteases. Os níveis de TNF- α foi determinado por ELISA. LASSBio-1425 foi capaz de inibir a produção de TNF- α em tecido plantar inflamado estimulado com carragenina, reduzindo

desta forma, a produção desta citocina pró-inflamatória no local da inflamação, reduzindo o processo inflamatório e o processo hiperalgésico.

A figura 1 mostra o gráfico 1 onde é representado o efeito de LASBio-1425 sobre a produção de TNF- α após injeção intraplantar de carragenina. A substância LASSBio-1425 foi administrada por via oral em suspensão de goma arábica 5% na dose de 100 μ mol/kg, 1h antes do estímulo com carragenina 100 μ g/pata. 5 h após o estímulo os tecidos foram retirados para dosagem de TNF- α por ELISA. Os resultados são expressos em produção de TNF- α (pg/ml) \pm EPM, $n = 4$ animais, * $p < 0,05$; # $p < 0,001$; (teste "t" de student), comparados com o grupo controle e salina respectivamente.

EXEMPLO 7: AÇÃO INIBITÓRIA DE LASSBIO-1425 SOBRE A HIPERNOCICEPÇÃO MECÂNICA INDUZIDA POR CARRAGENINA

É conhecido que a administração de carragenina (100 μ g/pata) intraplantar em camundongos induz uma hipernocicepção mecânica através da liberação de uma cascata de citocinas de seqüência definida, por células residentes ou migratórias. A primeira citocina a ser liberada é o TNF- α (CUNHA *et al.*, 2005). Desta maneira, com o intuito de avaliar a participação de LASSBio-1425 sobre a produção destas citocinas, foi realizado o estudo da atividade deste derivado fenilpirazólico no modelo de hipernocicepção mecânica induzida por carragenina. LASSBio-1425 nas doses de 100 e 300 μ mol/kg foi capaz de inibir a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina.

A figura 2 mostra o gráfico onde é representado o efeito anti-hipernociceptivo temporal de LASSBio-1425 no modelo de hipernocicepção mecânica induzida por carragenina 100 μ g/pata. A substância LASSBio-1425 foi administrada por via oral em suspensão de goma arábica 5% nas respectivas doses, 1h antes do estímulo. Os resultados são expressos em Δ do limiar de retirada (g) \pm EPM, $n = 10$ animais, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; (teste ANOVA One-way, post test Bonferroni), comparados com o grupo controle.

EXEMPLO 8: AÇÃO INIBITÓRIA DE LASSBIO-1425 SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR NO MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO MECÂNICA INDUZIDA POR CARRAGENINA. EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE LASSBIO-1425

A administração intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos é capaz de induzir a inflamação e o fenômeno hipernociceptivo. Sabe-se também que a administração deste mesmo agente é capaz de induzir a migração de neutrófilos que sustentam os fenômenos citados (POSADAS et al, 2004; CUNHA *et al.*, 2005). Sendo assim, foi avaliada a capacidade de LASSBio-1425 em inibir a migração de neutrófilos nas patas de camundongos submetidas ao estímulo da carragenina, por uma medida indireta, através da dosagem de atividade mieloperoxidase nos tecidos cutâneos plantar. A administração de carragenina promoveu um aumento da atividade mieloperoxidase, aumento este que é inibido pela administração prévia da substância LASSBio-1425 quando administrada por via oral nas doses de 100 µg/kg e 300 µg/kg.

A figura 3 mostra o gráfico 3 onde é representado o efeito de LASSBio-1425 sobre a migração de neutrófilos no modelo de dosagem da atividade mieloperoxidase em patas de camundongos estimuladas com carragenina (100 µg/pata). A substância LASSBio-1425 foi administrada por via oral nas respectivas doses em suspensão de goma arábica 5% 1h antes do estímulo com carragenina. 5h após o estímulo os tecidos foram retirados para avaliação. Os resultados são expressos em nº de neutrófilos / mg. de tecido cutâneo plantar, $n = 4-5$ animais, * $p < 0,05$; (teste "t" de Student) comparados com o grupo controle.

EXEMPLO 9: AÇÃO INIBITÓRIA DE LASSBIO-1425 SOBRE A HIPERNOCICEPÇÃO MECÂNICA INDUZIDA POR TNF-A

A injeção intraplantar de TNF- α (1 ng/pata), promove efeito hipernociceptivo nas primeiras horas. Uma hora após a injeção de TNF- α pode-se observar um efeito hipernociceptivo, na terceira hora após o estímulo este

efeito atingiu um pico de atividade e na quinta hora houve um decaimento da mesma. Foi avaliado o efeito de LASSBio-1425 sobre a hipernocicepção mecânica induzida por TNF- α com o intuito de investigar a participação deste derivado fenilpirazólico sobre a cascata de citocinas envolvida no processo hipernociceptivo. LASSBio-1425 foi capaz de inibir a hipernocicepção induzida por TNF- α nas três primeiras horas do ensaio.

A figura 4 mostra o Gráfico onde é mostrado o efeito anti-hipernociceptivo temporal de LASSBio-1425 no modelo de hipernocicepção mecânica induzida por TNF- α (1ng/pata). A substância LASSBio-1425 foi administrada por via oral em suspensão de goma arábica 5% na dose de 100 μ mol/kg, 1h antes do estímulo com TNF- α . Os resultados são expressos em Δ do limiar de retirada (g) \pm EPM, $n = 10$ animais, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; (teste ANOVA One-way, post test Bonferroni), comparados com o grupo controle.

EXEMPLO 10: AÇÃO INIBITÓRIA DE LASSBIO-1425 SOBRE A HIPERNOCEPÇÃO MECÂNICA INDUZIDA POR KC (QUIMIOCINA DERIVADA DE QUERATINÓCITO)

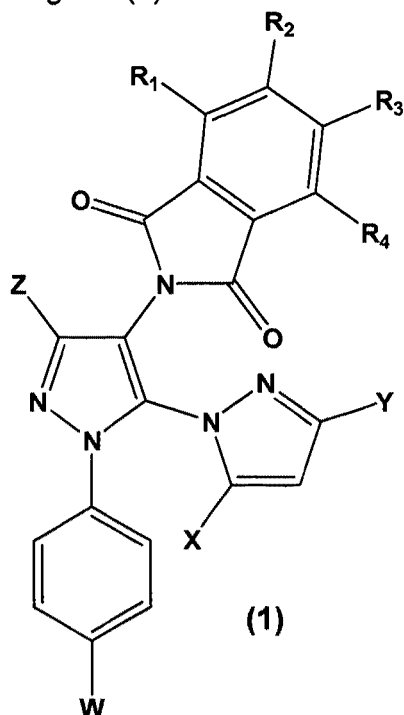
A injeção intraplantar de KC (10 ng/pata) na pata de camundongos promove uma hipernocicepção térmica na terceira hora de ensaio mantendo este efeito até a quinta hora. LASSBio-1425 administrado por via oral na dose de 100 μ mol/kg foi capaz de inibir a hipernocicepção térmica induzida por KC a partir da terceira hora de ensaio.

A figura 5 mostra o gráfico onde é representado o efeito anti-hipernociceptivo temporal de LASSBio-1425 no modelo de hipernocicepção mecânica induzida por KC (10 ng/pata). A substância LASSBio-1425 foi administrada por via oral em suspensão de goma arábica 5% na dose de 100 μ mol/kg, 1h antes do estímulo. Os resultados são expressos em Δ do limiar de retirada (g) \pm EPM, $n = 10$ animais, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; (teste ANOVA One-way, post test Bonferroni), comparados com o grupo controle.

5

REIVINDICAÇÕES

1- Compostosfenil-pirazólicos ftalimidícos bioativos, da classe 2-(1-fenil-5-(1H-1-pirazolil)-1H-4-pirazolil)isoindolino-1,3-diona, caracterizados por apresentarem a fórmula geral (1):



10 Onde:

W pode ser hidrogênio, C1-C6 alquila ou cicloalquila, hidroxila, metoxila, cloro, flúor, bromo, ciano;

Z, X e Y pode ser hidrogênio, C1-C6 alquila ou cicloalquila, trifluormetila, fenila;

15 R₁ pode ser hidrogênio, flúor, cloro, bromo, metila, nitro, amino, metoxila, hidroxila, carboxila;

R₂ pode ser hidrogênio, flúor, cloro, bromo, metila, metoxila, hidroxila;

R₃ pode ser hidrogênio, flúor, cloro, bromo, metoxila;

R₄ pode ser hidrogênio, flúor, cloro, bromo.

20 2- Processo para a preparação dos compostos descritos na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

A Nitração de derivados 5-cloro-fenil-1H-pirazólicos adequados, de forma regioseletiva, com ácido nítrico fumegante em anidrido acético;

- 5 B Acoplamento carbono-nitrogênio, através de substituição nucleofílica aromática, para inserção do segundo núcleo pirazólico adequado na posição 5 do núcleo fenil-1H-pirazólico de partida em meio básico, utilizando como solventes dimetilssulfóxido (DMSO) e tetrahidrofurano (THF);
- 10 C Redução quimiosseletiva do grupo nitro inserido em etapa anterior ao grupo amino com ferro metálico em meio ácido utilizando como solventes etanol e água destilada;
- D Acoplamento com os respectivos anidridos ftálicos através de fusão térmica (130°C) para a obtenção dos derivados bipirazolo-
15 isoindolinodiônicos, sendo esta reação realizada sem a presença de solventes.

3- O uso dos compostos conforme descritos na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de serem utilizados nas formulações de medicamentos, em diferentes formas farmacêuticas úteis, orais ou não, para o tratamento de
20 condições dolorosas de várias origens e inflamatórias, crônicas e agudas, de naturezas diversas, mediadas ou não, por citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α).

4- Composições farmacêuticas, caracterizadas pelo fato de compreenderem os compostos, conforme definidos na reivindicação 1, com
25 pelo menos um carreador e/ou diluente farmacêuticamente aceitável.

5- Uso das composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 4, caracterizadas pelo fato de serem utilizadas na preparação de
medicamentos para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas e hiperalgesia em mamíferos, preferencialmente humanos.

30 6- Uso das composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 5, caracterizadas pelo fato das doenças inflamatórias serem
doenças inflamatórias crônico degenerativas, exemplificadas na artrite reumatóide, espondilite, doença de Crohn, psoríase, asma.

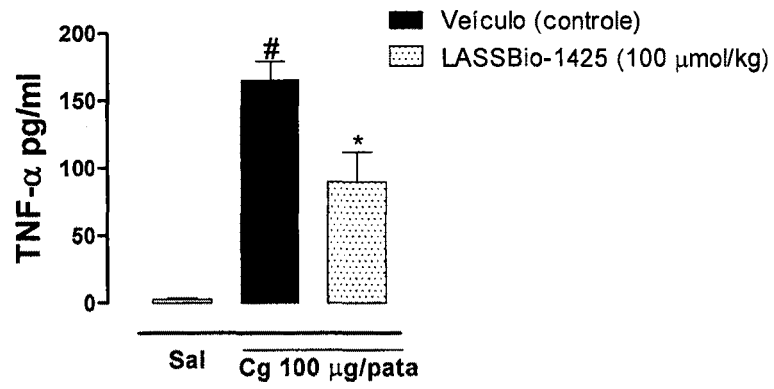
FIGURAS

Figura 1

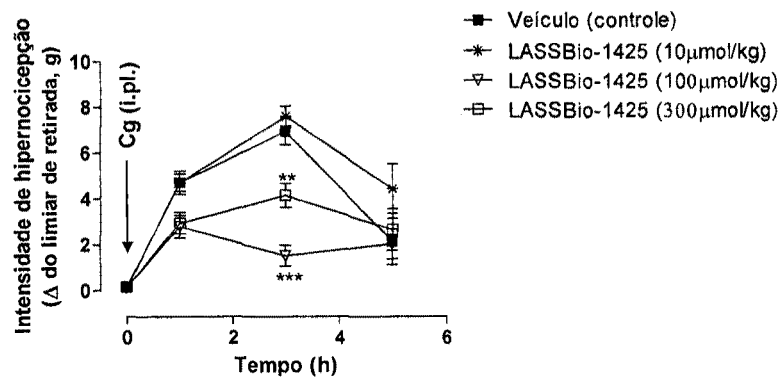


Figura 2

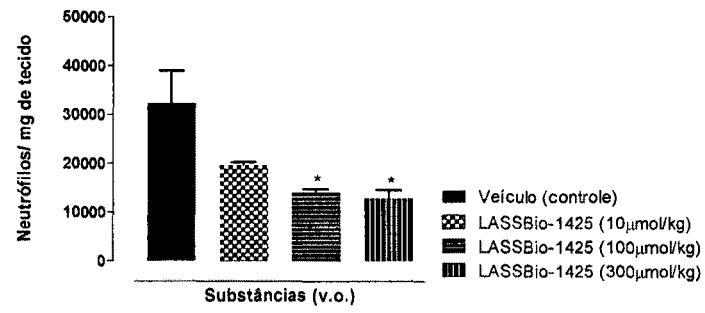


Figura 3

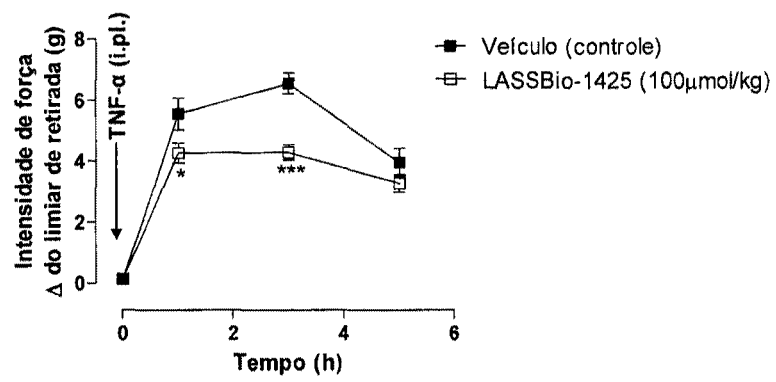


Figura 4

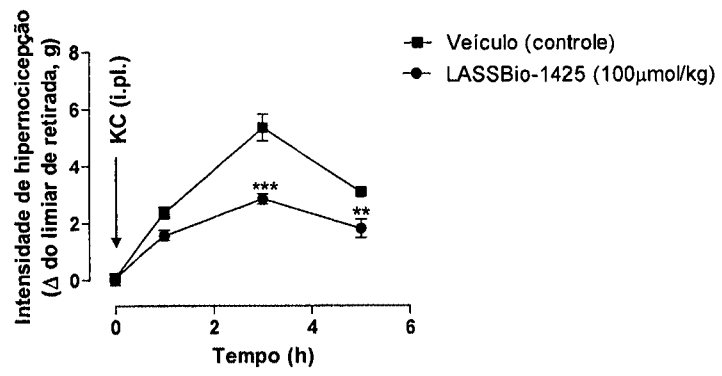


Figura 5

5

RESUMO

**COMPOSTOS FENIL-PIRAZÓIS FTALIMÍDICOS BIOATIVOS, PROCESSO
PARA PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS, SEU USO E COMPOSIÇÕES
FARMACÊUTICAS**

10 A inovação ora proposta diz respeito a novos compostos fenil
pirazóis ftalimídicos capazes de atuarem como anti-inflamatório e analgésico. A
presente invenção se refere também a composições farmacêuticas contendo tais
compostos e seu uso no tratamento e modulação de condições e doenças
mediadas por TNF- α .