



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

(21) **PI 0712417-1 A2**

(22) Data de Depósito: 06/06/2007
(43) Data da Publicação: 04/09/2012
(RPI 2174)



(51) Int.Cl.:
C07C 219/14
A61K 31/24
A61P 29/00
C07C 213/08
C07C 327/48
C07D 339/04

(54) Título: SAIS DE TRIMEBUTINA E N-DESMETIL TRIMEBUTINA

(30) Prioridade Unionista: 06/06/2006 US 60/804.067

(73) Titular(es): Antibe Therapeutics Inc.

(72) Inventor(es): Giuseppe Caliendo, Giuseppe Cirino, John L. Wallace, Vincenzo Santagada

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

(86) Pedido Internacional: PCT CA2007001008 de 06/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/140611 de 13/12/2007

(57) Resumo: Patente de Invenção: "SAIS DE TRIMEBUTINA E N-DESMETIL TRIMEBUTINA".

A presente invenção refere-se ao fornecimento de sais excepcionais de trimebutina e N-desmetil trimebutina, e seus estereoisômeros correspondentes, contendo propriedades analgésicas aperfeiçoadas úteis no tratamento de dor visceral. Os sais da presente invenção são particularmente úteis no tratamento de condições caracterizadas por dor abdominal, tais como doença inflamatória do intestino (IBD) e síndrome do intestino irritável (IBS), gastroparese diabética, e dispepsia.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**SAIS DE TRIMEBUTINA E N-DESMETIL TRIMEBUTINA**".

Este pedido de patente reivindica o benefício do pedido de patente provisório US No 60 / 804.067, depositado em 6 de Junho 2006.

5 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a sais excepcionais de trimebutina e N-monodesmetila, e a seus estereoisômeros correspondentes, com propriedades analgésicas aperfeiçoadas úteis no tratamento da dor visceral em geral e mais particularmente no tratamento de condições caracterizadas por dor abdominal, por exemplo em pacientes com doenças intestinais, tais como doença inflamatória intestinal (IBD) e síndrome do intestino irritável (IBS), gastroparese diabética, e dispepsia.

Fundamento da Invenção

Trimebutina [ácido 3,4,5-trimetóxicibenzóico 2-(dimetilamino)-2-fenilbutiléster e seu sal de maleato] tem sido usada em muitos países desde 1969 para o tratamento de distúrbios funcionais do intestino, incluindo IBS. A eficácia de trimebutina para o alívio da dor abdominal tem sido demonstrada em diversos estudos clínicos (ver por exemplo, Ghidini et al (1986) "Single drug treatment for irritable colon: Rociverine versus trimebutine maleate. *Curr Ther Res* 39: 541-548). Trimebutina mostrou ser eficaz no tratamento da dor abdominal aguda e crônica em pacientes com distúrbios funcionais do intestino, especialmente IBS, em doses que variam de 300 até 600 mg/dia. Ela também é eficaz em crianças que apresentam dor abdominal.

Acredita-se que as ações de trimebutina no trato gastrointestinal são mediadas em parte via (i) um efeito agonista nos receptores periféricos mu, capa e delta de opiato e (ii) desprendimento de peptídeos gastrointestinais, tais como motilina, e modulação do desprendimento de outros peptídeos, incluindo peptídeos intestinais vasoativos, gastrina e glucagônio. Além disso, trimebutina acelera a evacuação gástrica, induz a uma fase prematura III do complexo motor de migração no intestino, e modula a atividade contrátil do cólon. Recentemente, mostrou-se que trimebutina também diminui reflexos induzidos por distensão do lúmen do intestino em animais, para modu-

lar a sensibilidade visceral.

Mostrou-se recentemente que óxido nítrico (NO) exerce muitos efeitos anti-inflamatórios, incluindo a redução da aderência de leucócitos ao endotélio vascular (Gauthier et al (1994) Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* **267**: G562-G568) e supressão da produção de vários fatores quimiotáticos (Walford e Loscalzo (2003) Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost* **1**: 2112-2118). Além disso, mostrou-se que a incorporação de um componente desprendedor de NO em determinados medicamentos, tais como NSAIDs, acetaminofeno e ácido ursodexicólico, aumenta a atividade desses medicamentos e reduz a toxidez relativa ao medicamento de origem.

Sulfeto de hidrogênio (H₂S) é outro tipo de mediador gasoso que pode exercer efeitos anti-inflamatórios. Recentemente mostrou-se que agentes de desprendimento de H₂S exibem atividade analgésica em modelos de dor visceral (Distrutti et al (2005) Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating K_{ATP} channels. *J Pharmacol Exp Ther* **316**: 325-335. Além disso, mostrou-se que H₂S é um relaxante muscular suave em tecidos intestinais (ver Teague, B. et al. (2002) The Smooth Muscle Relaxant effect of Hydrogen Sulfide *In Vitro*: Evidence for a Physiological Role to Control Intestinal Contractility. *Br. J. Pharmacol.* **137**: 139-145.

Os inventores mostraram, no presente pedido de patente, que a atividade de trimebutina é significativamente aumentada quando sais de trimebutina ou N-monodesmetil trimebutina, e seus estereoisômeros correspondentes, são formados com vários componentes de desprendimento de NO, desprendimento de H₂S ou de desprendimento combinado de NO e H₂S. Em particular, a administração desses sais de trimebutina e N-monodesmetil trimebutina com desprendimento de NO, desprendimento de H₂S, ou desprendimento combinado de NO e H₂S, resulta em propriedades analgésicas aperfeiçoadas, quando comparado a trimebutina (maleato de trimebutina) ou seu metabólito N-monodesmetil trimebutina individualmente

e quando comparado a componente de desprendimento de NO, desprendimento de H₂S ou desprendimento de NO e de H₂S individualmente. Esses sais são particularmente úteis no tratamento de condições caracterizadas por dor abdominal, tal como síndrome de intestino irritável, doença intestinal inflamatória, gastroparese diabética, dispepsia e semelhantes.

Resumo da Invenção

Em geral são fornecidos sais de trimebutina (TMB) e seu metabólito ativo N-desmetil trimebutina (Nor-TMB) e seus estereoisômeros correspondentes, (*R*)-TMB, (*S*)-TMB, (*R*)-Nor-TMB e (*S*)-Nor-TMB, os referidos sais sendo formados empregando componentes de desprendimento de NO, desprendimento de H₂S, ou desprendimento combinado de NO e de H₂S. Formando um sal com um componente de desprendimento de NO, desprendimento de H₂S ou desprendimento combinado de NO e H₂S, aumentou-se surpreendentemente o efeito anti-nociceptivo de TMB e Nor-TMB.

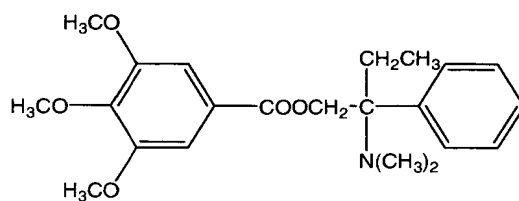
Mais particularmente, os sais TMB e Nor-TMB da presente invenção são superiores a TMB e Nor-TMB individualmente e a um componente de desprendimento de NO, desprendimento de H₂S ou desprendimento combinado de NO e H₂S individualmente na redução da dor visceral associada a uma distensão coloretal. Os componentes de desprendimento de NO, desprendimento de H₂S ou desprendimento combinado de NO e H₂S não parecem ter quaisquer efeitos significativos na dor visceral associada à distensão coloretal quando administrados individualmente. Portanto, em um aspecto da invenção, os sais da presente invenção são úteis em aliviar a dor associada a qualquer distúrbio do sistema digestivo que está associado com dor abdominal.

De um modo geral, os sais da invenção têm a seguinte fórmula geral:



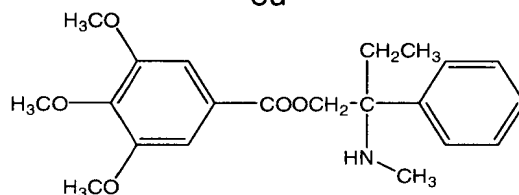
na qual:

A é



Trimebutina

OU

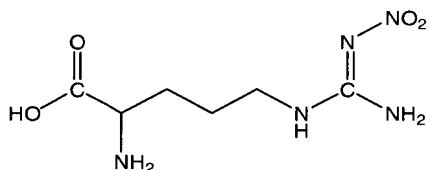


N-desmetil trimebutina,

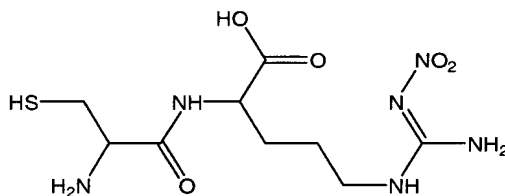
e seus estereoisômeros correspondentes;

- 5 e X é um componente de desprendimento de NO, desprendimento de H₂S ou de desprendimento combinado de NO e H₂S.

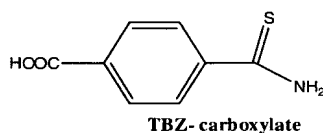
Em um modo de execução preferido, X é selecionado do grupo que consiste de:



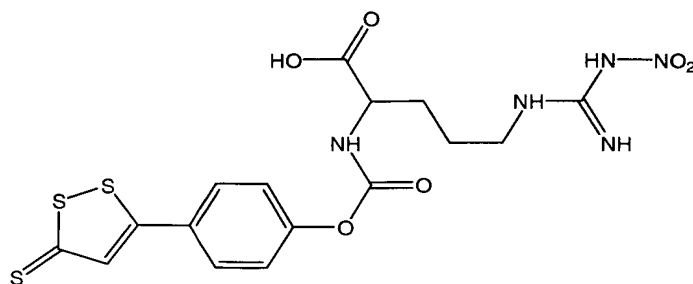
nitroarginina,



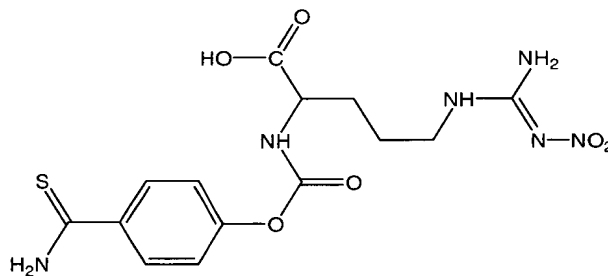
- 10 cisteinila-nitroarginina,



ácido 4-(tiocarbamoil) benzóico



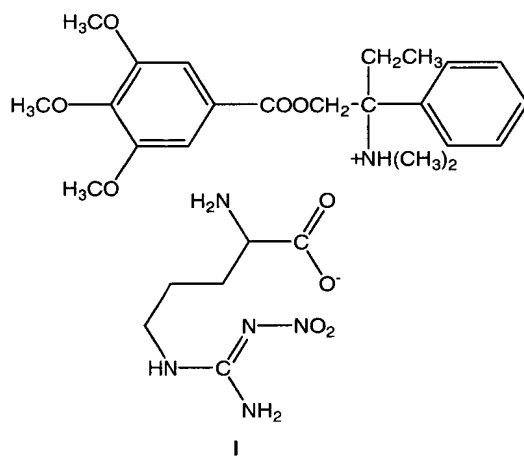
5-fenil-1,2-ditiona-3-tiona (ADT)-nitroarginina, e



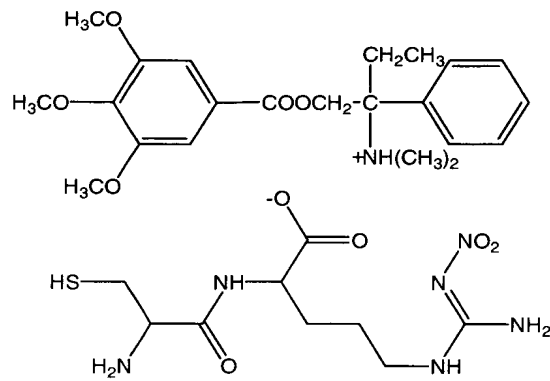
p-hidroxitiobenzamida-nitroarginina.

5 Compreende-se que qualquer componente não-tóxico de desprendimento eficaz de NO, desprendimento de H₂S ou de desprendimento combinado de NO e H₂S, pode ser usado na presente invenção.

Compostos preferidos são aqueles das seguintes fórmulas:

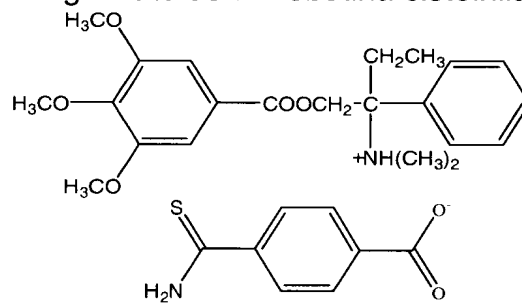


Nitroargininato de trimebutina (I)



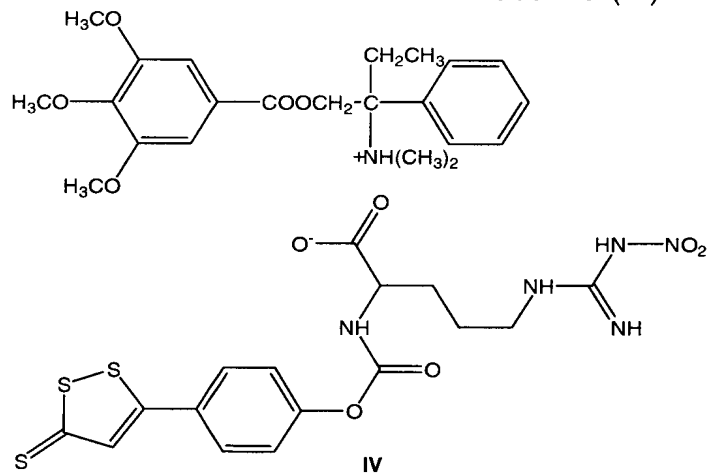
II

Nitroargininato de trimebutina cisteinila (II)



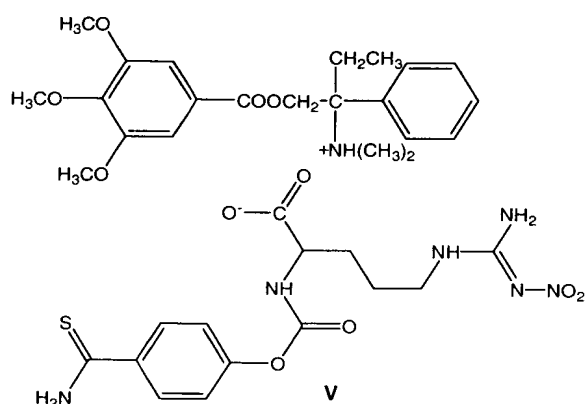
III

Tiocarbamoilbenzoato de trimebutina (III)

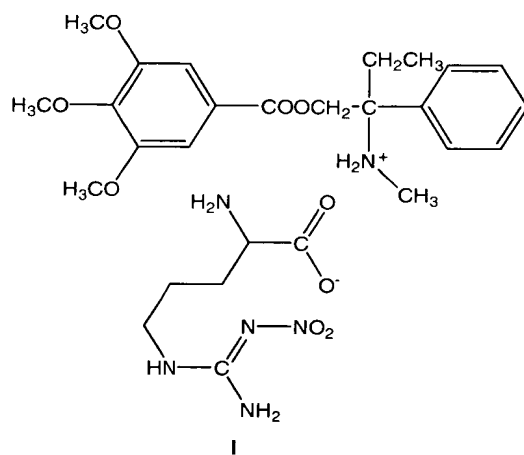


IV

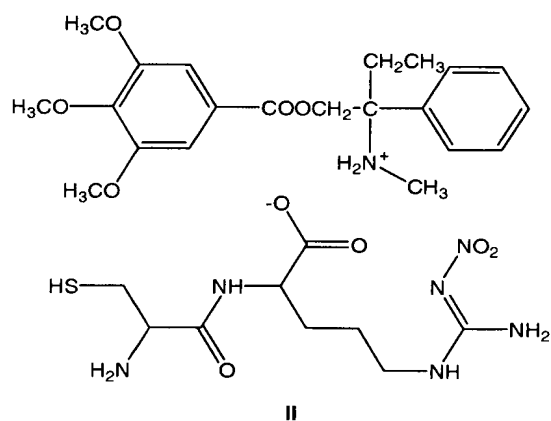
Nitroargininato de 5-fenil-1,2-ditiona-3-tiona (ADT)- trimebutina (IV)



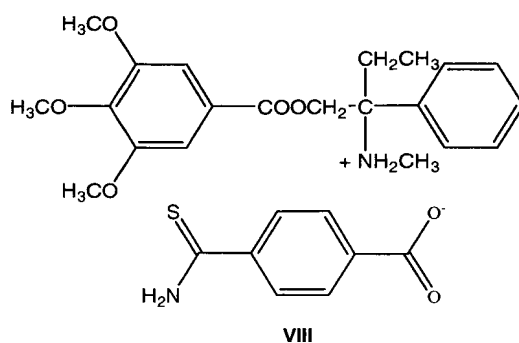
Nitroargininato de trimebutina *p*-hidroxitiobenzamida (V)



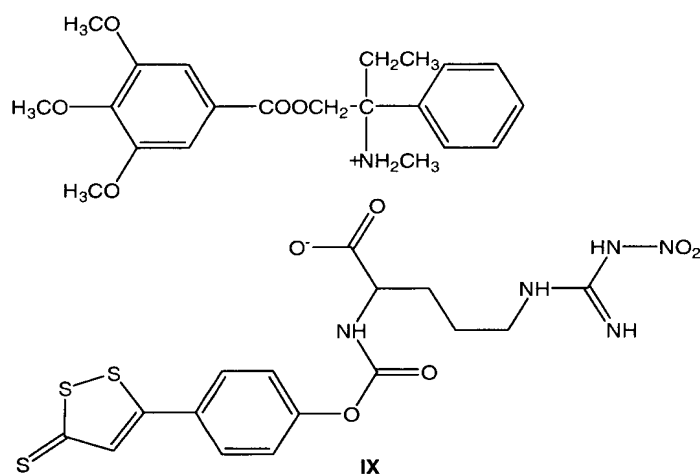
Nitroargininato de N-desmetiltrimebutina (VI)



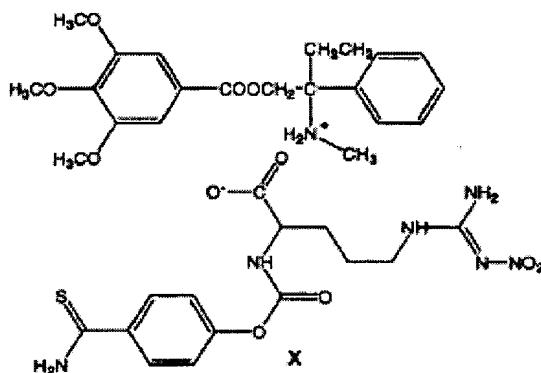
Nitroargininato de N-desmetiltrimebutina cisteinila (VII)



Tiocarbamoilbenzoato de N-desmetiltribebutina (VIII)

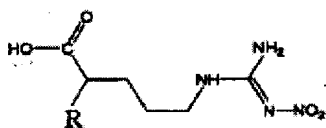


N-desmetiltribebutina 5-fenil-1,2-ditiona-3-tiona (ADT)-nitroargininato (IX)



Nitroargininato de N-desmetiltribebutina p-hidroxitiobenzamida (X)

Além disso, novos componentes de desprendimento combinado de NO e
 5 H₂S são fornecidos contendo a fórmula geral, nitroarginina-R, de preferência:



na qual R é um componente de desprendimento de H₂S. Em um modo de execução preferido, R é selecionado do grupo que consiste de 5-*p*-hidróxifenil-1,2-ditiona-3-tiona, cisteína, e ácido 4-(tiocarbamoil) benzóico. Além disso, é fornecido um método para tratamento da dor visceral em um indivíduo com necessidade de um tal tratamento, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade de um composto da presente invenção para alívio da dor visceral. Em um outro modo de execução, a dor visceral é uma dor abdominal. Em outro modo de execução, a dor abdominal é causada por doenças intestinais, tais como doenças inflamatórias do intestino (IBD), síndrome do intestino irritável (IBS), gastroparese diabética, e dispepsia.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 (a) mostra a escore da percepção (Escore AWR) em um modelo de rato de percepção de dor visceral usando veículo e maleato de trimebutina;

a figura 1 (b) mostra a pressão coloretal (mmHg) em um modelo de rato de percepção de dor visceral usando veículo e maleato de trimebutina individualmente;

a figura 2 (a) mostra a escore da percepção (Escore AWR) em um modelo de rato de percepção de dor visceral usando veículo e nitroarginina individualmente;

a figura 2 (b) mostra a pressão coloretal (mmHg) em um modelo de rato de percepção de dor visceral usando veículo e nitroarginina individualmente;

a figura 3 (a) mostra a escore da percepção (Escore AWR) em um modelo de rato de percepção de dor visceral usando veículo e nitroargininato de trimebutina (sal I);

a figura 3 (b) mostra a pressão coloretal (mmHg) em um modelo de rato de percepção de dor visceral usando veículo e nitroargininato de trimebutina (sal I);

a figura 4 (a) mostra a escore da percepção (Escore AWR) em um modelo de rato de percepção de dor visceral usando veículo ou nitroargininato de trimebutina (sal I), com ou sem pré-tratamento com L-NAME;

5 a figura 4 (b) mostra a escore da percepção (Escore AWR) em um modelo de rato de percepção de dor visceral usando veículo ou nitroargininato de trimebutina (sal I), com ou sem pré-tratamento com azul de metileno;

10 a figura 5 (a) mostra a escore da percepção (Escore AWR) em um modelo de rato de percepção de dor visceral usando veículo e maleato de trimebutina e tiocarbamoilbenzoato de trimebutina (sal III);

a figura 5 (b) mostra a escore da percepção (Escore AWR) em um modelo de rato de percepção de dor visceral usando veículo e tiocarbamoilbenzoato (TBZ) individualmente; e

15 figura 6 é um gráfico de barras mostrando a geração de H₂S de ácido 4-(tiocarbamoil) benzóico (TBZ) e 5-(4-amino-fenil)-[1,2]ditiol-3-tiona (ADT-OH).

Descrição Detalhada do Modo de Realização Preferido

20 A invenção será agora descrita no que diz respeito aos modos de realização preferidos descritos aqui. Deve ser considerado entretanto que esses modos de realização são para fins de ilustração da invenção, e não devem ser considerados como limitantes do escopo da invenção conforme definido pelas reivindicações.

25 Os compostos da presente invenção contêm dois componentes ativos, (1) tanto TMB ou Nor-TMB, quanto seus estereoisômeros, e (2) um componente desprendedor de NO, um componente desprendedor de H₂S, ou componentes de desprendimento combinado de NO- e H₂S. Em muitos casos, os sais da presente invenção podem ser preparados usando materiais de partida e reagentes conhecidos.

30 Compostos da presente invenção podem ser utilizados para o tratamento de dor visceral, tal como dor abdominal, associada com várias doenças, incluindo, mas não limitado a, doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome do intestino irritável, colite infecciosa (p.ex., colite pseudomembra-

nosa tal como *Clostridium difficile* colitis, salmonella enteritis, infecções shigella, yersiniose, criptosporidiose, infecções microsporidiais, e infecções virais), colite induzida por radiação, colite no hospedeiro imunocomprometido, gastroparese diabética e dispepsia.

5 Dependendo da condição específica ou estado de doença a ser tratado, os indivíduos podem receber compostos da presente invenção em qualquer dosagem apropriada terapeuticamente efetiva e segura, como pode ser rapidamente determinada dentro do conhecimento da técnica. Esses compostos são, de preferência, administrados em dosagens variando de
10 aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 mg por dia, em uma dose única ou doses divididas, ainda que variações necessariamente ocorram dependendo do peso e condição do indivíduo que está sendo tratado e a rota de administração particular escolhida. Entretanto, um nível de dosagem que esteja na faixa de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg, de
15 preferência entre aproximadamente 5 e 90 mg/kg, e mais preferentemente entre aproximadamente 5 e 50 mg/kg, é mais desejável. Variações podem, entretanto ocorrer, dependendo do peso e condições das pessoas que estão sendo tratadas e de suas respostas individuais aos referidos medicamentos, assim como do tipo da formulação farmacêutica escolhida e o período e in-
20 tervalo de tempo durante o qual tal administração é efetuada. Em alguns casos, níveis de dosagem abaixo do limite mínimo da faixa referida acima podem ser mais do que adequados, enquanto que em outros casos dosagens ainda maiores podem ser empregadas sem causar quaisquer efeitos colaterais nocivos, contanto que tais doses elevadas sejam primeiramente
25 divididas em várias pequenas doses para administração ao longo do dia.

Os compostos da presente invenção podem ser administrados na forma de qualquer formulação farmacêutica, cuja natureza dependerá da via de administração. Essas composições farmacêuticas podem ser preparadas por métodos convencionais, usando excipientes ou veículos compatí-
30 veis, farmacêuticamente aceitáveis. Exemplos de tais composições incluem tabletes, adesivos transdérmicos, losangos, trociscos, sprays, xaropes, pós, granulados, géis, elixires, supositórios, e semelhantes para a preparação de

soluções extemporâneas, preparados injetáveis, retais, nasais, oculares, vaginais etc. Uma via preferida de administração é a via oral e retal.

Para a administração oral, tabletes contendo vários excipientes tais como celulose microcristalina, citrato de sódio, carbonato de sódio, fosfato de dicálcio e glicinas podem ser empregados juntamente com vários desintegrantes tais como amido (de preferência milho, batata, ou amido de tapioca), ácido algínico e certos silicatos complexos, juntamente com aglutinantes de granulação como polivinilpirrolidona, sucrose, gelatina e acácia. Adicionalmente, agentes lubrificantes tais como estearato de magnésio, lauril sulfato de sódio, e talco podem ser usados para propósito de preparação de tabletes. Composições sólidas do tipo similar também podem ser empregadas como preenchedores em cápsulas de gelatina; materiais preferidos neste contexto também incluem lactose ou açúcar lácteo, bem como polietileno glicóis de alto peso molecular. Quando suspensões aquosas e/ou elixires são desejados para administração oral o ingrediente ativo pode ser combinado com adoçante ou agentes aromatizantes, matéria colorante, e se desejado, emulsificante e/ou agentes de suspensão, juntamente com tais diluentes como água, etanol, propileno glicol, glicerina e suas várias combinações.

A forma de dosagem pode ser projetada para desprendimento imediato, desprendimento controlado, desprendimento prolongado, desprendimento retardado, ou desprendimento objetivamente retardado. As definições desses termos são conhecidas por aqueles com conhecimento na técnica. Além disso, o perfil de desprendimento da forma de dosagem pode ser efetuado por uma composição de mistura polimérica, uma composição de matriz revestida, uma composição de multiparticulados, uma composição de multiparticulados revestidos, uma composição à base de resina trocadora de íons, uma composição à base de osmose, ou uma composição polimérica biodegradável. Sem querermos estar ligados à teoria, acredita-se que o desprendimento pode ser efetuado através de difusão favorável, erosão, troca iônica, osmose, ou suas combinações.

Para administração parenteral, pode ser empregada uma solução de um sal ativo tanto em óleo de gergelim ou óleo de amendoim, ou em

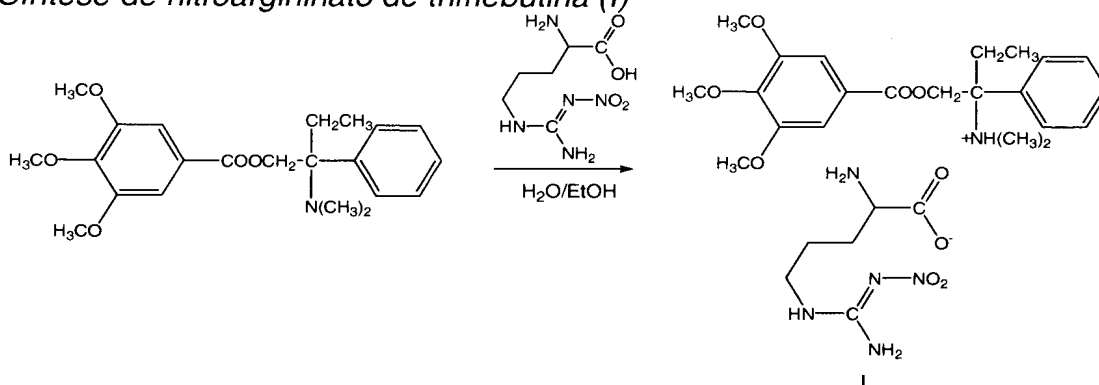
propileno glicol aquoso. As soluções aquosas deveriam ser apropriadamente tamponadas (de preferência em um pH maior do que 8), se necessário, e o diluente líquido é primeiramente tornado isotônico. As soluções aquosas são apropriadas para propósitos de injeção endovenosa. A preparação de todas essas soluções sob condições estéreis é prontamente realizada por técnicas farmacêuticas padrão bem conhecidas daqueles com conhecimento na técnica.

Os seguintes exemplos não-limitativos descrevem ainda mais e permitem que um indivíduo com conhecimento comum na técnica prepare e utilize a invenção.

Preparação de Compostos

Exemplo 1

Síntese de nitroargininato de trimebutina (I)

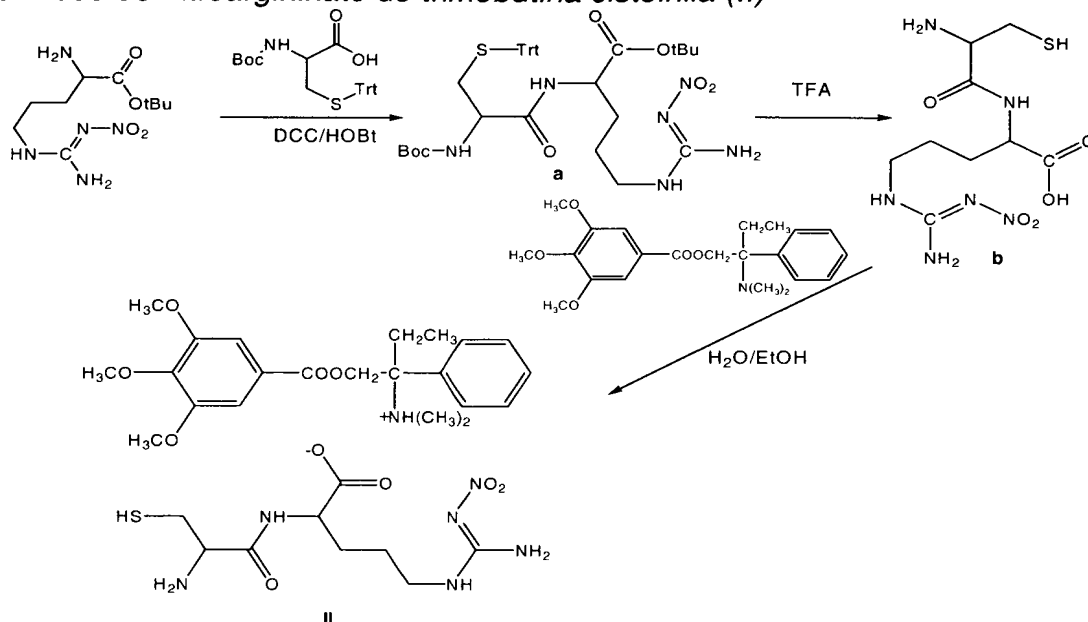


Adicionou-se a uma mistura de H-Arg(NO₂)-OH (0,1 moles) e trimebutina (0,1 moles), água (200 mL) e álcool etílico (20 mL) e a suspensão resultante foi agitada à temperatura ambiente até clarear. Depois a solução foi congelada e liofilizada fornecendo o sal desejado (rendimento quantitativo).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0,60 (t, 3H), 1,45-1,75 (m, 4H), 1,80-1,90 (m, 2H), 2,25 (s, 6H), 2,90-3,40 (m, 2H), 3,75 (s, 9H), 3,95 (m, 1H), 4,64 (dd, 2H), 7,15 (s, 2H), 7,22 (t, 1H), 7,35 (t, 2H), 7,46 (d, 2H).

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,07, 22,8, 26,4, 28,9, 29,1, 47,9, 56,4, 60,8, 64,4, 65,8, 107,3, 125,2, 127,4, 128,0, 128,5, 141,7, 142,5, 153,4, 158,3, 165,9, 170,2.

pf 183°C (dec).

Exemplo 2**Síntese de nitroargininato de trimebutina cisteinila (II)****Síntese de ácido 2-(2-amino-3-mercapto-propionilamino)-5-nitroguanidino-pentanóico (b)**

- 5 A uma solução de Boc-Cys(Trt)-OH (3,0 mmol) em 50 mL de dimetilformamida, adicionou-se hidróxibenzotriazola (3,3 mmol) e DCC (3,3 mmol) com agitação a 0° C por 1 h. À mistura de reação adicionou-se H-Arg(NO₂)-OtBu (3,0 mmoles) e agitou-se mecanicamente por 3 h a 0° C e 24 h à temperatura ambiente. Após filtração, o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida para remover o solvente. O resíduo oleoso assim obtido foi dissolvido em acetato de etila; a camada orgânica foi lavada com salmoura, secada em MgSO₄ anidro, filtrada e o solvente foi evaporado. O produto intermediário cru **a** foi tratado com uma solução de ácido trifluoracético em diclorometano (40% TFA em DCM). Após 1 h o solvente foi removido para obter H-Cys-Arg(NO₂)-OH. TFA como um resíduo cru que foi precipitado com dietil éter; o sólido obtido foi dissolvido em água e NaOH 1 N lentamente para obter ácido 2-(2-amino-3-mercapto-propionilamino)-5-nitroguanidino-pentanóico (**b**) como um sólido branco que foi recuperado por filtração.

Síntese de trimebutina cisteinil-nitroargininato (II)

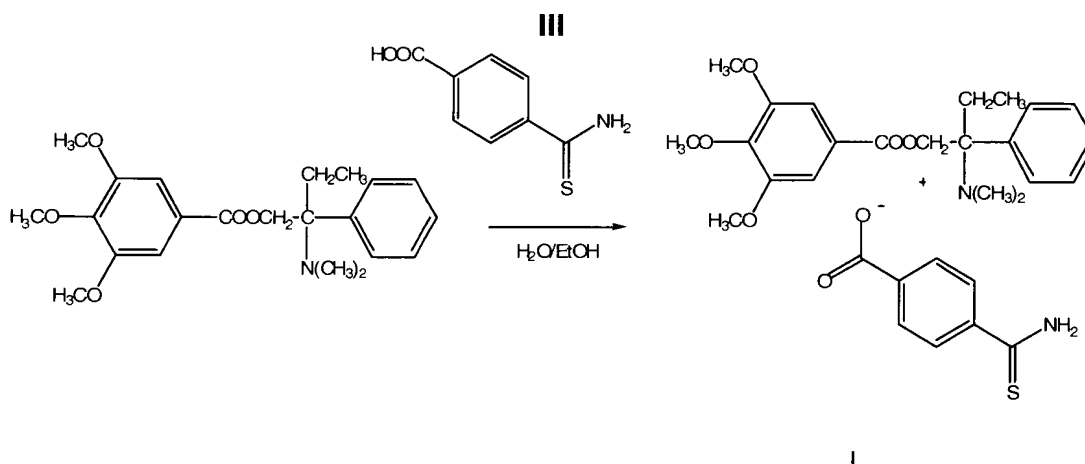
- 20 A uma mistura de ácido 2-(2-amino-3-mercapto-propionilamino)-

5-nitroguanidino-pentanóico (**b**; 0,1 moles) e trimebutina (0,1 moles), adicionou-se água (200 mL) e álcool etílico (20 mL) e a suspensão resultante foi agitada à temperatura ambiente até ficar clara. Depois a solução foi congelada e liofilizada fornecendo o sal desejado (rendimento quantitativo).

5 Exemplo 3

Síntese de benzoato de trimebutina tiocarbamoíla (III)

Preparação de ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico 2-(dimetilamino)-2-fenilbutil éster de benzoato de 4-tiocarbamoíla (Trimebutina tiocarbamoilbenzoato)



10 Adicionou-se a uma mistura de ácido 4-(tiocarbamoil) benzóico (0,1 mol) e trimebutina (0,1 mol), água (200 ml) e álcool etílico (20 mL) e a suspensão resultante foi agitada à temperatura ambiente até clarear. Depois a solução foi congelada à temperatura ambiente e liofilizada fornecendo o sal desejado (rendimento quantitativo).

15 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): \square 0,60 (t, 3H), 1,45-1,75 (m, 4H), 1,80-1,90 (m, 2H), 2,28 (s, 6H), 2,90-3,40 (m, 2H), 3,69 (s, 9H), 3,95 (m, 1H), 4,73 (dd, 2H), 7,01 (s, 2H), 7,22 (t, 1H), 7,35 (t, 2H), 7,46 (d, 2H) 7,93 (dd, 4H), 9,65 (bs, 1H, NH), 10,05 (bs, 1H, NH).

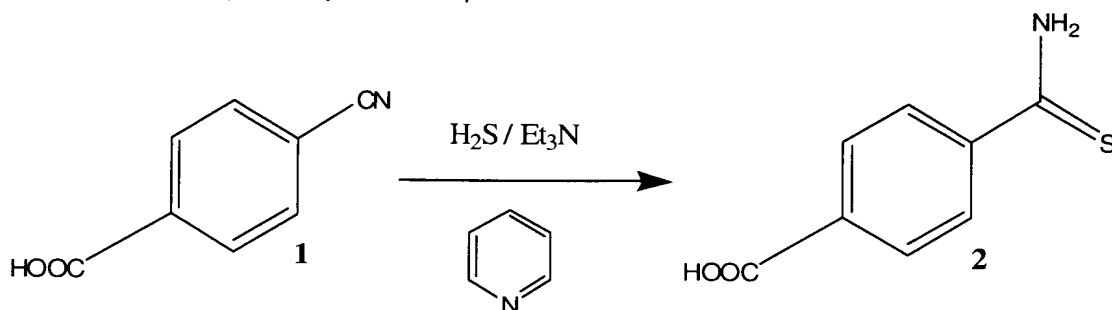
20 $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): \square 9,07, 28,9, 56,5, 60,8, 64,5, 65,7, 107,1, 125,3, 127,4, 128,1, 128,6, 129,5, 129,7, 132,3, 141,8, 142,5, 148,5, 153,4, 154,8, 165,9, 169,4, 172,5, 188,6.

mp 66-68°C (dec).

Síntese de ácido 4-(tiocarbamoil) benzóico

O composto foi sintetizado de acordo com um procedimento já

mencionado na literatura (Fairfull, E. S., Lowe J. L., Peak D. A. *J. Chem. Soc.* 1952, 742), incorporado aqui como referência.



Ácido 4-(tiocarbamoil) benzóico (2)

Dissolveu-se 3 g de ácido 4-cianobenzóico **1** (20,4 mmol) em 40 mL de piridina e adicionou-se 2,1 mL de trietilamina (20,4 mmoles). Sulfeto de hidrogênio seco foi passado através da solução em um vapor constante por 4h. A mistura foi então entornada em água e o sólido coletado por filtração. A recristalização de éter de petróleo produziu 2,51 g do **2** (rendimento 68%).

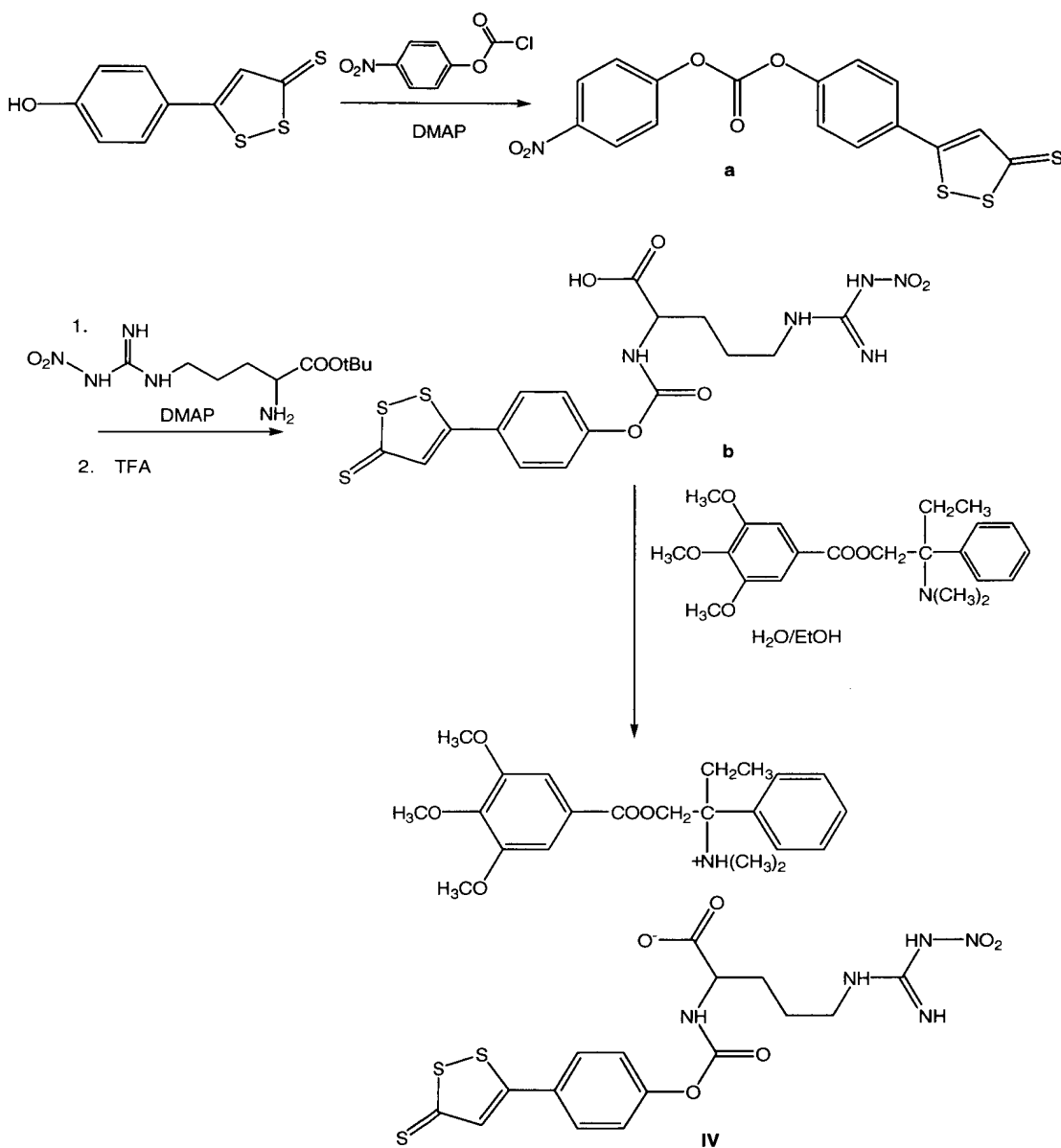
10 MS (ESI), m/e 182,2 (M^+).

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 7,92 (dd, 4H), 9,68 (s, 1H, NH), 10,12 (s, 1H, NH), 13,25 (s, 1H, OH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 127,3, 129, 6, 132,0, 148,5, 169,4, 188, m.p. 296-298°C (dec.)

15 Exemplo 4

Síntese de trimebutina ADT- nitroargininato (IV)



Síntese de ácido carboxílico 4-nitro-fenil éster 4-(5-tioxo-5H-[1,2]ditiol-3-il)-fenil éster (a)

A uma suspensão agitada de ADT-OH (1,04 mmol) em CH₂Cl₂ (10 ml) foi levemente adicionado 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 1,16 mmol) e cloroformato de 4-nitrofenila (1,15 mmol). A mistura de reação foi agitada por 10 horas à temperatura ambiente. A cromatografia de camada fina indicou que a formação do produto desejado foi completada. O solvente foi removido e o resíduo foi tratado com dietil éter; o produto a foi recuperado por filtração e usado sem maior purificação (rendimento 81%).

10 *Síntese de ácido 5-nitroguanidino-2-[4-(5-tioxo-5H-[1,2]ditiol-3-il)-*

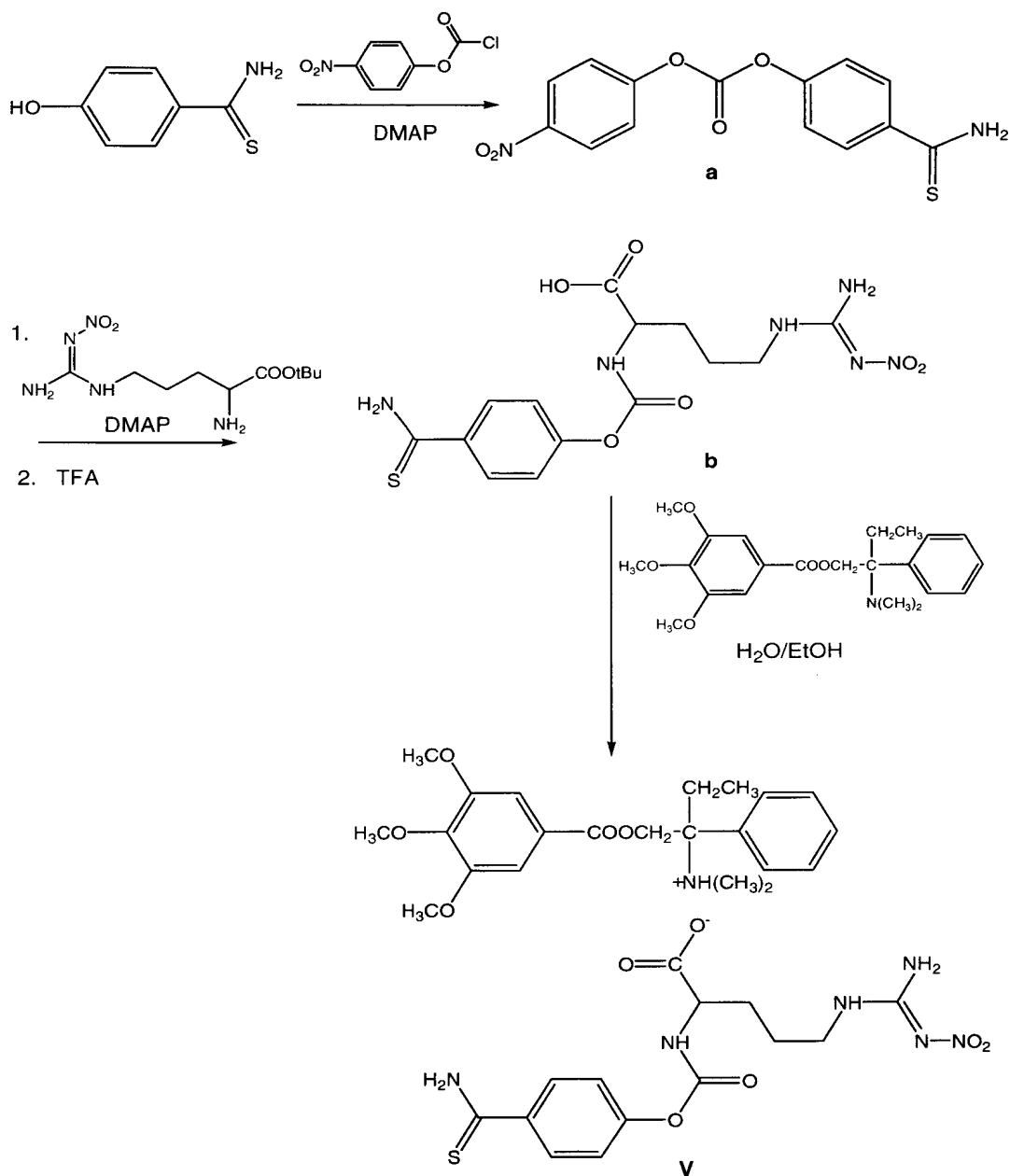
fenoxicarbonil-amino]-pentanóico (b)

Adicionou-se a uma solução de **a** (1,04 mmol) em 50 mL de CH₂Cl₂ 4-dimetilaminopiridina (1,16 mmol) e H-Arg(NO₂)-OtBu (1,02 mmol) e a solução foi agitada por 20 h a temperatura ambiente. Depois, a mistura de reação foi diluída com CH₂Cl₂, lavada com NaHCO₃ sat. NaCl sat., e secada em MgSO₄. O produto intermediário cru foi tratado com uma solução de ácido trifluoracético em diclorometano (40% TFA em DCM). Após 1 h o solvente foi removido para obter o produto **b** como um resíduo cru que foi precipitado com dietil éter; o sólido obtido foi dissolvido em água e NaOH 1N foi lentamente adicionado para se obter ácido 5-nitroguanidino-2-[4-(5-tioxo-5H-[1,2]ditiol-3-il)-fenoxicarbonil-amino]-pentanóico (**b**) como um sólido branco que foi recuperado por filtração.

Síntese de trimebutina ADT-nitroargininato (IV)

A uma mistura de ácido 5-nitroguanidino-2-[4-(5-tioxo-5H-[1,2]ditiol-3-il)-fenoxicarbonil-amino]-pentanóico (**b**; 0,1 mol) e trimebutina (0,1 mol), adicionou-se água (200 mL) e álcool etílico (20 mL) e a suspensão resultante foi agitada à temperatura ambiente até ficar clara. Depois a solução foi congelada e liofilizada fornecendo o sal desejado (rendimento quantitativo).

20 Exemplo 5*Síntese de trimebutina p-hidróxitiobenzamida-nitroargininato (V)*



Síntese de ácido carboxílico 4-nitro-fenil éster 4-tiocarbamoil-fenil éster (a)

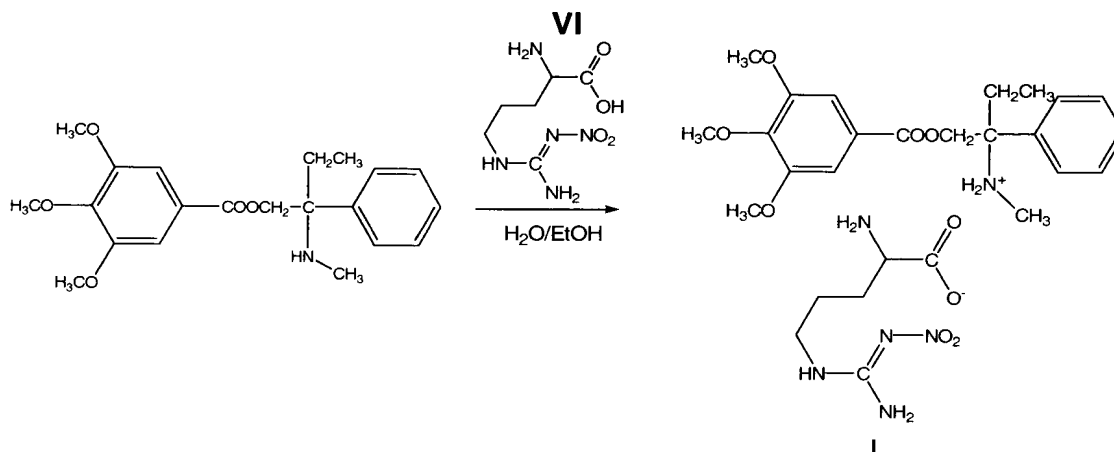
- Adicionou-se a uma suspensão agitada de p-hidróxitiobenzamida (1,04 mmol) em CH₂Cl₂ (10 ml) 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 1,16 mmol) e 4-nitrofenil cloroformato (1,15 mmol). A mistura de reação foi agitada por 10 h à temperatura ambiente. A cromatografia de camada fina indicou que a formação do produto desejado foi completada. O solvente foi recuperado e o resíduo foi tratado com dietil éter; o produto a foi recuperado por filtração e usado sem maior purificação (rendimento 81%).
- 5

Síntese de ácido 5-nitroguanidino-2-(4-tiocarbamoil-fenoxicarbonilamino)-pentanóico (b)

Adicionou-se à solução de **a** (1,04 mmol) em 50 mL de CH₂Cl₂ 4-dimetilaminopiridina (1,16 mmol) e H-Arg(NO₂)-OtBu (1,02 mmol) e a solução foi agitada por 20 hs à temperatura ambiente. Depois, a mistura de reação foi diluída com CH₂Cl₂, lavada com NaHCO₃ sat. e NaCl sat., e secada em MgSO₄. O produto intermediário crú foi tratado com uma solução de ácido trifluoracético em diclorometano (TFA 40% em DCM). Após 1 h o solvente foi removido para se obter o produto **b** como um resíduo crú que foi precipitado com dietil éter; o sólido obtido foi dissolvido em água e NaOH 1N foi lentamente adicionado para se obter ácido 5-nitroguanidino-2-(4-tiocarbamoil-fenoxicarbonilamino)-pentanóico (**b**) como um sólido branco que foi recuperado por filtração.

Síntese de trimebutina p-hidróxitiobenzamida-nitroargininato (V)

A uma mistura de ácido 5-nitroguanidino-2-(4-tiocarbamoil-fenoxicarbonilamino)-pentanóico (**b**; 0,1 moles) e trimebutina (0,1 moles), adicionou-se água (200 mL) e álcool etílico (20 mL) e a suspensão resultante foi agitada à temperatura ambiente até ficar clara. Depois a solução foi resfriada e liofilizada fornecendo o sal desejado (rendimento quantitativo).

Exemplo 6**Síntese de nitroargininato de N-desmetiltribebutina (VI)**

5 A uma mistura de H-Arg(NO₂)-OH (0,1 mol) e N-desmetiltribebutina (0,1 mol), adicionou-se água (200 mL) e álcool etílico (20 mL) e a suspensão resultante foi agitada à temperatura ambiente até ficar clara. Depois a solução foi congelada e liofilizada fornecendo o sal desejado (rendimento quantitativo).

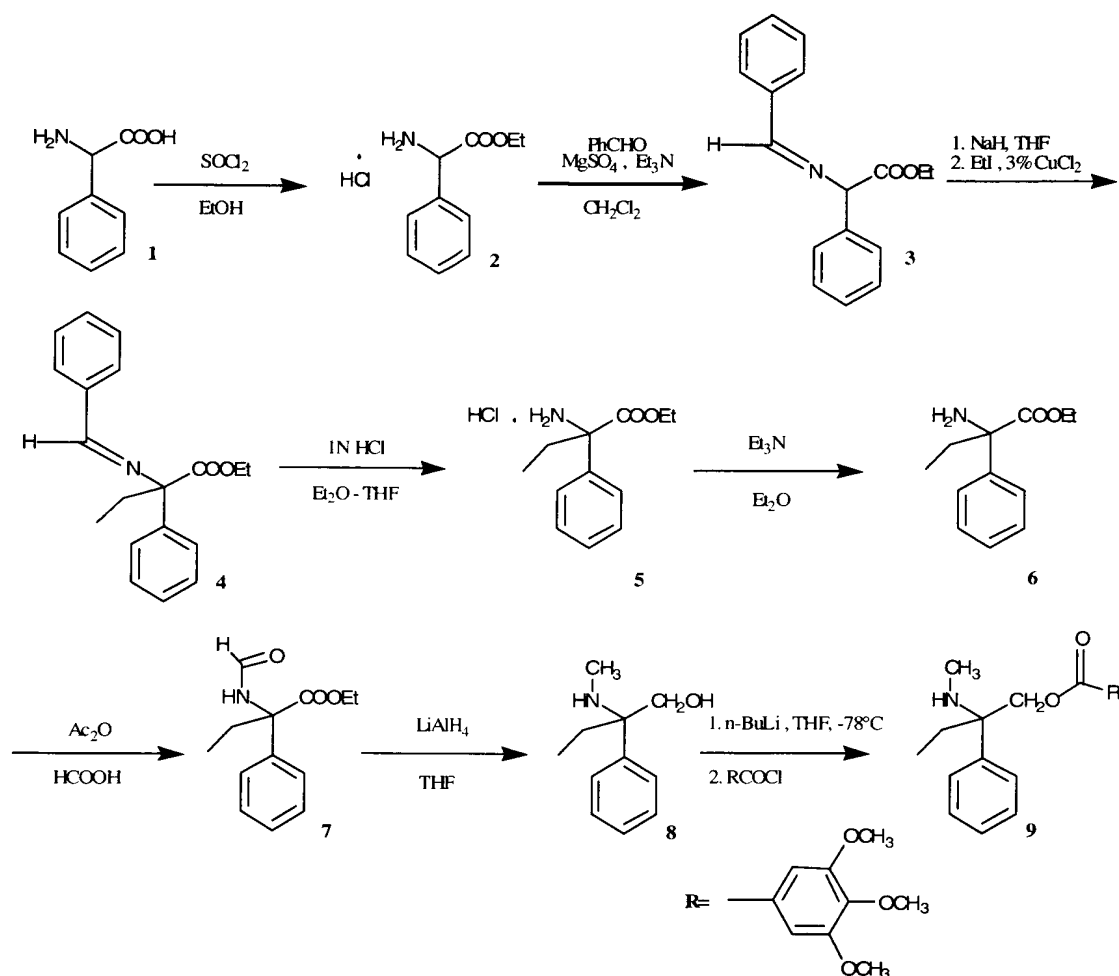
10 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0,72 (t, 3H), 1,45-1,75 (m, 4H), 1,80-1,90 (m, 2H), 2,07 (s, 3H), 2,90-3,40 (m, 2H), 3,75 (s, 9H), 3,95 (m, 1H), 4,64 (dd, 2H), 7,07 (s, 2H), 7,22 (t, 1H), 7,35 (t, 2H), 7,51 (d, 2H).

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,07, 22,8, 26,4, 28,9, 29,1, 47,9, 56,4, 60,8, 64,4, 65,8, 107,3, 125,2, 127,4, 128,0, 128,5, 141,7, 142,5, 153,4, 158,3, 165,9, 170,2.

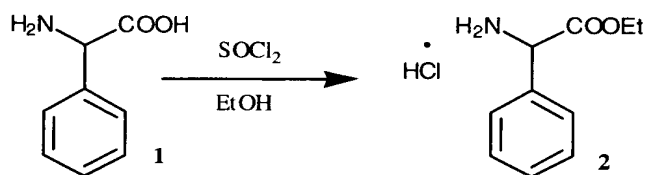
15 p.f. 78-80°C (dec)

Síntese de N-desmetiltribebutina

O composto foi sintetizado seguindo com leves modificações o procedimento reportado na literatura (Martin, A., Figadère B., Saivin S., Houin G., Chomard J. M., Cahiez G. *Arzneim.-Forsch. / Drug Res.* 2000 (50), 20 544).



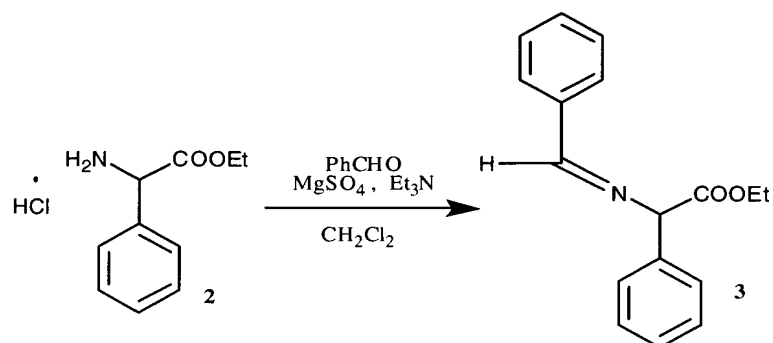
Etiléster hidrocloreto (2) de fenilglicina



Adicionou-se gota a gota 22 mL de SOCl_2 a uma solução de 30 g de fenilglicina **1** (198,5 mmoles) em 200 mL de etanol anidro. Um leve refluxo ocorreu espontaneamente e foi mantido por 3 h. Permitiu-se que a reação esfriasse até a temperatura ambiente e agitou-se durante a noite. O solvente foi removido sob vácuo para se obter 41,8 g de **2** como um pó branco (98 % de rendimento).

MS (ESI), m/e 179,8 (M^+).

Etil N-(fenilmetileno)glicinato (3)



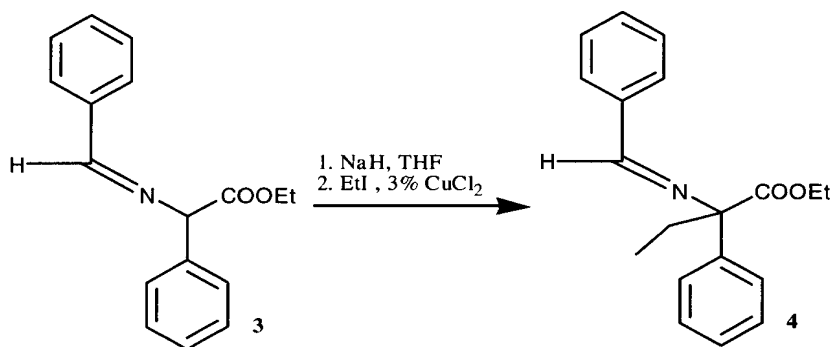
Adicionou-se a uma mistura de 10,6 g de fenilglicinato hidrocloreto de etila **2** (49,3 mmol), 100 mL de diclorometano, 5 ml de benzaldeído (49,2 mmol) e 30 g de sulfato de magnésio (249,2 mmol) à temperatura ambiente, sob uma atmosfera de nitrogênio, 21,25 mL de trietilamina (152,46

5 mmoles). Após agitação por 17h a mistura de reação heterogênea foi filtrada e o sólido foi lavado com 100 mL de diclorometano. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida e o óleo viscoso assim obtido foi agitado com 80 mL de dietil éter e 80 mL de água até a dissolução. Após a decantação, a camada orgânica foi secada em sulfato de sódio e o solvente foi evaporado

10 sob vácuo. O éster de imina **3** (12,4 g, 94% de rendimento) foi obtido como um óleo amarelo claro.

MS (ESI), m/e 268,3 (M⁺).

Etil 2-fenil-2-(N-fenilmetileno)-butanoato (4)



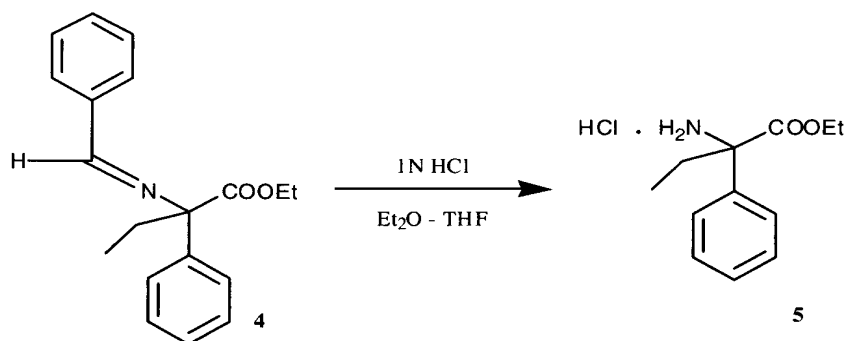
Sob uma atmosfera de nitrogênio, adicionou-se gota a gota uma

15 solução 12,39 g (46,4 mmol) de **3** em 64 mL de THF anidro, sob agitação, a uma mistura de 2,04 g de hidreto de sódio (60% de dispersão de óleo, 85 mmol), 192 mg de CuCl₂ e 128 mL de THF anidro. Após 9h à temperatura ambiente, 4,66 mL (57,7 mmoles) de iodeto de etila foram rapidamente adi-

cionados à mistura de reação. A agitação continuou por 18h e 0,86 mL de etanol anidro foi adicionado cuidadosamente à mistura de reação. Durante a agitação a cor da reação mudou de amarelo para vermelho e laranja e depois para verde. Depois da concentração da mistura de reação sob vácuo, adicionou-se 95,8 ml de dietil éter e 160 ml de água e a mistura resultante foi agitada por 10 minutos, depois filtrada através de celite. Após decantação a camada orgânica foi lavada três vezes com água e secada em sulfato de sódio, depois o dietil éter foi evaporado sob pressão reduzida para fornecer 5,82 g de **4** (43 % de rendimento). O produto bruto obtido como um óleo amarelo alaranjado, era puro o suficiente para ser usado sem maior purificação.

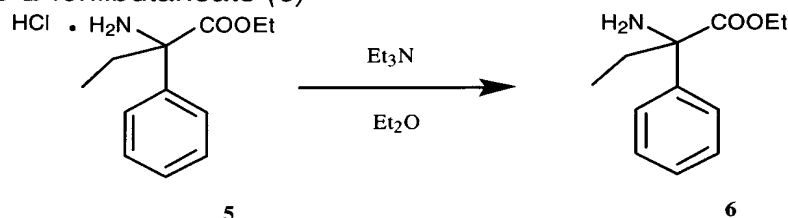
MS (ESI), m/e 296.1 (M^+).

Hidrocloroeto de etil 2-amino-2-fenilbutanoato (5)



5,8 g de **4** (19,73 mmol), 17,6 mL de THF, 35,17 mL de dietil éter, 44 mL de água e 2,64 mL de HCl concentrado foram agitados à temperatura ambiente por 24h. Solventes foram removidos de uma mistura sob vácuo e a solução aquosa resultante foi lavada duas vezes com dietil éter. Água foi então evaporada sob pressão reduzida para originar 3,8 g de **5** como um óleo laranja (79% de rendimento).

20 *Etil 2-amino-2-fenilbutanoato (6)*

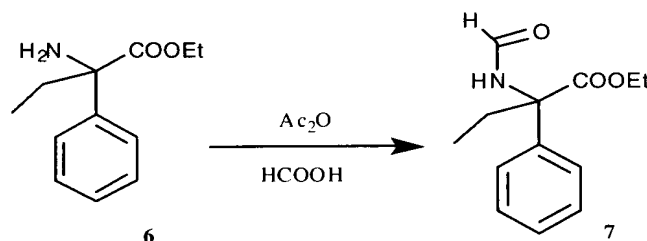


O produto cru **5** foi dissolvido em 22 mL de THF anidro e adicio-

nou-se 2,64 mL de trietil amina. Após agitação por 30 minutos, a mistura foi filtrada através de celite e o sólido lavado com 100 mL de dietil éter anidro. A concentração dos solventes usando um evaporador rotativo obteve 2,49 g de **6** como um óleo azul (77% de rendimento).

5 MS (ESI), m/e 208 (M^+).

Etil 2-Formilamino-2-fenilbutanoato (7)

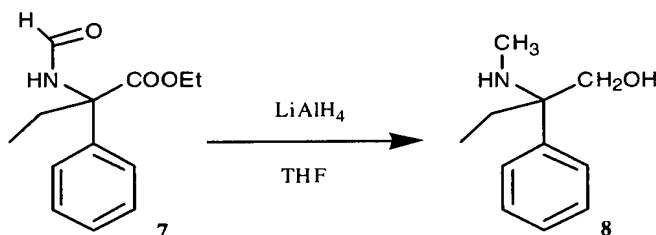


12,72 mL de ácido fórmico depois 25,38 mL de anidrido acético foram adicionados gota a gota, sob agitação, a 2,49 g (12,03 mmol) de amina **6**. Após 15h à temperatura ambiente, os solventes foram removidos sob pressão reduzida originando 3,09 g de **7** como um óleo verde viscoso (100% de rendimento).

R_f = 0,85 (CHCl₃ / MeOH 9,5:0,5)

MS(ESI), m/e 236 (M^+).

15 *2-Metilamino-2-fenilbutanol (8)*

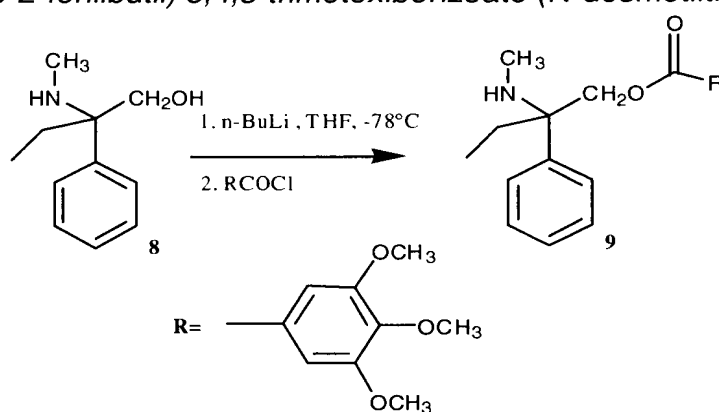


Adicionou-se gota a gota a uma suspensão de 900 mg (23,71 mmol) de hidreto de lítio alumínio (LiAlH₄) em 30 mL de THF anidro, 3,09 g (13,15 mmol) de **7**, previamente preparado em 18 ml de THF anidro. Após 4h sob refluxo, permitiu-se que a mistura de reação resfriasse à temperatura ambiente e uma quantidade adicional de hidreto de lítio alumínio (900 mg) foi introduzida. O refluxo foi mantido por 4 h depois uma solução sulfato de magnésio foi lentamente adicionada a -10°C sob agitação vigorosa até a

formação de um precipitado. O sólido foi filtrado e lavado diversas vezes com THF. O solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida até a obtenção de uma solução aquosa. A solução foi adicionada com 100 mL de dietil éter e a camada orgânica foi secada em sulfato de magnésio. A evaporação do solvente rendeu 1,84 g de **8** como um óleo amarelo. (78% de rendimento).

MS(ESI), m/e 180,1 (M^+).

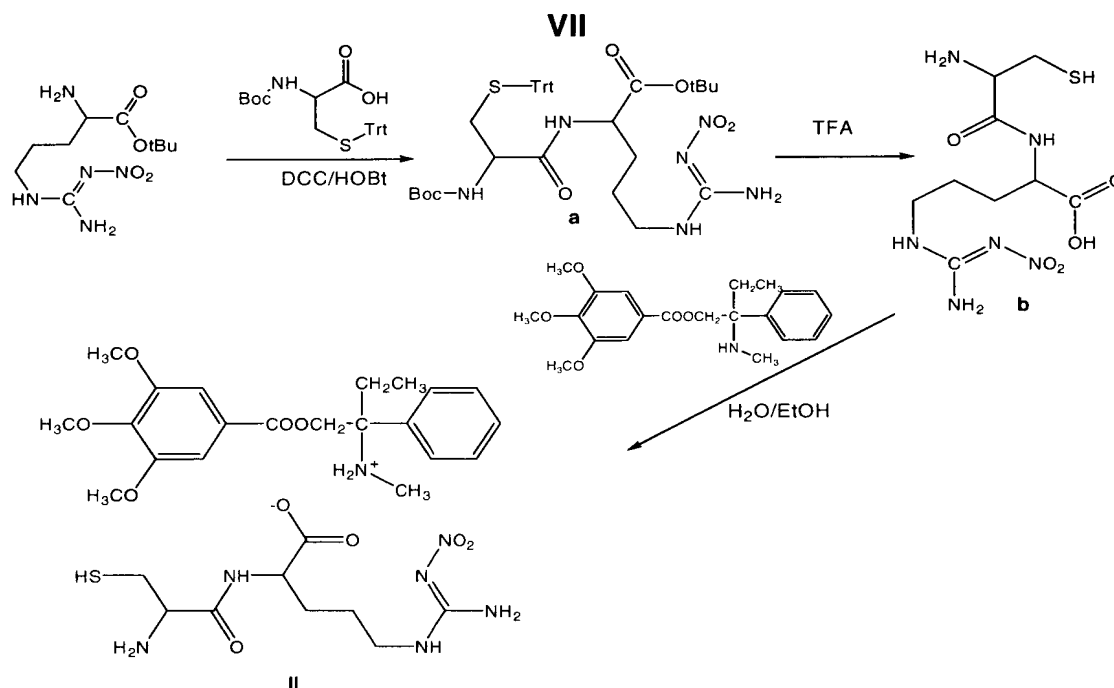
(2-Metilamino-2-fenilbutil) 3,4,5-trimetóxi benzoato (*N*-desmetiltrimebutina (**9**))



Adicionou-se gota a gota a uma solução de 1,84 g de **8** (10,3 mmol) em 28 mL de THF anidro, a -78°C, 4,11 mL de n-BuLi (2,5 mol/L em hexanos). Após 15 minutos, adicionou-se uma solução de 2,31 g (10,01 mmol) de 3,4,5-cloreto de trimetoxibenzoíla em 15,8 mL de THF anidro. Permitiu-se, então, à mistura de reação amornar a -30°C (ca 1h) e adicionou-se cuidadosamente 19 mL de ácido acético. Solventes foram removidos sob vácuo e 55 mL de dietil éter e adicionou-se 55 mL de água ao óleo previamente obtido. Após agitação até a completa dissolução, a mistura resultante foi então decantada e a camada aquosa alcalinizou completamente com Na_2CO_3 sólido e foi re-extraída com dietil éter. As camadas orgânicas foram lavadas duas vezes com uma solução aquosa saturada de carbonato de sódio e com salmoura e depois lavadas com sulfato de sódio. O dietil éter foi evaporado sob vácuo e o éster **9** foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (acetato de etila/ n-hexano, 7,3) para produzir 1,4 g de *N*-desmetiltrimebutina pura **9** (49% de rendimento) como um óleo amarelo claro. MS(ESI), m/e 374,1 (M^+).

^1H NMR (CDCl_3): δ 0,72 (t, 3H), 1,7 (s, 1H, NH), 1,75-1,9 (m, 2H), 2,6 (s, 3H), 3,76 (s, 6H), 3,80 (s, 3H), 4,50 (dd, 2H), 7,07-7.44 (m, 7H).

^{13}C NMR (DMSO-d_6): δ 7,4, 28,5, 28,6, 55,9, 60,1, 61,1, 66,3, 100,5, 126,5, 127,0, 129,3, 128,0, 142,0, 142,5, 152,7, 165,6.

Exemplo 7*Síntese de cisteinil-nitroargininato de N-desmetiltribebutina (VII)*

5 *Síntese de ácido 2-(2-amino-3-mercapto-propionilamino)-5-nitroguanidino-pentanóico (b)*

A uma solução de Boc-Cys(Trt)-OH (3,0 mmol) em 50 mL de dimetilformamida, adicionou-se hidroxibenzotriazola (3,3 mmol) e DCC (3,3 mmol) com agitação a 0° C por 1 h. À mistura de reação, adicionou-se H-Arg(NO₂)-OtBu (3,0 mmol) e agitou-se mecanicamente por 3 h a 0° C e 24 h a temperatura ambiente. Depois da filtração, o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida para remover o solvente. O resíduo oleoso assim obtido foi dissolvido em acetate de etila; a camada orgânica layer lavada com salmoura, secada sobre MgSO₄ anidro, filtrada e o solvente foi evaporado. O produto intermediário crú **a** foi tratado com uma solução de ácido trifluoracético em diclorometano (40% TFA em DCM). Após 1 h o solvente foi removido para obter H-Cys-Arg(NO₂)-OH □ TFA como um resíduo crú, o qual foi precipitado com dietil éter; o sólido obtido foi dissolvido em água e 1N NaOH foi adicionado vagarosamente para obter ácido 2-(2-amino-3-mercapto-propionilamino)-5-nitroguanidino-pentanóico (**b**) como um sólido branco, o qual foi recuperado por filtração.

10

15

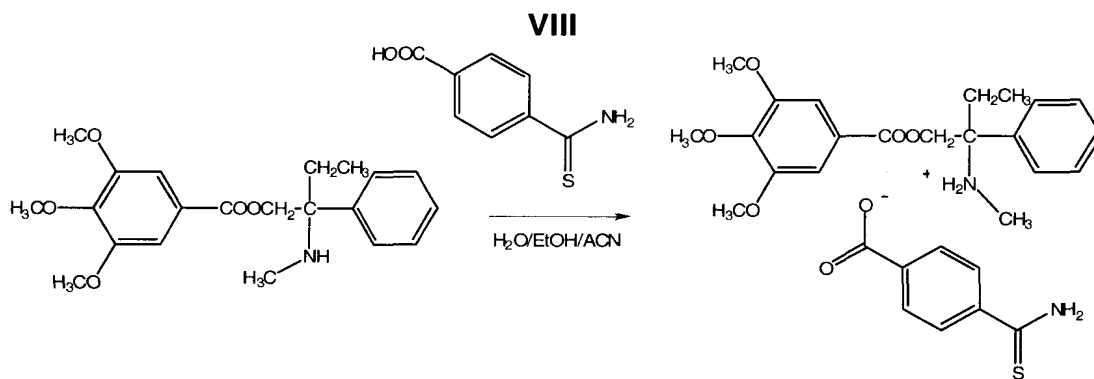
20

Síntese de cisteinil - nitroargininato de N-desmetiltribebutina (VII)

A uma mistura de ácido 2-(2-amino-3-mercaptopropionilamino)-5-nitroguanidino-pentanóico (**b**; 0,1 mol) e N-desmetiltribebutina (0,1 mol), adicionou-se água (200 mL) e álcool etílico (20 mL) e a suspensão resultante foi agitada a temperatura ambiente até tornar-se clara. A solução foi então congelada e liofilizada para fornecer o sal desejado (rendimento quantitativo).

Exemplo 8

Preparação de ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico 2-(metilamino)-2-fenilbutil éster 4-tiocarbamoil benzoato (N-desmetiltribebutina tiocarbamoilbenzoato (VIII))

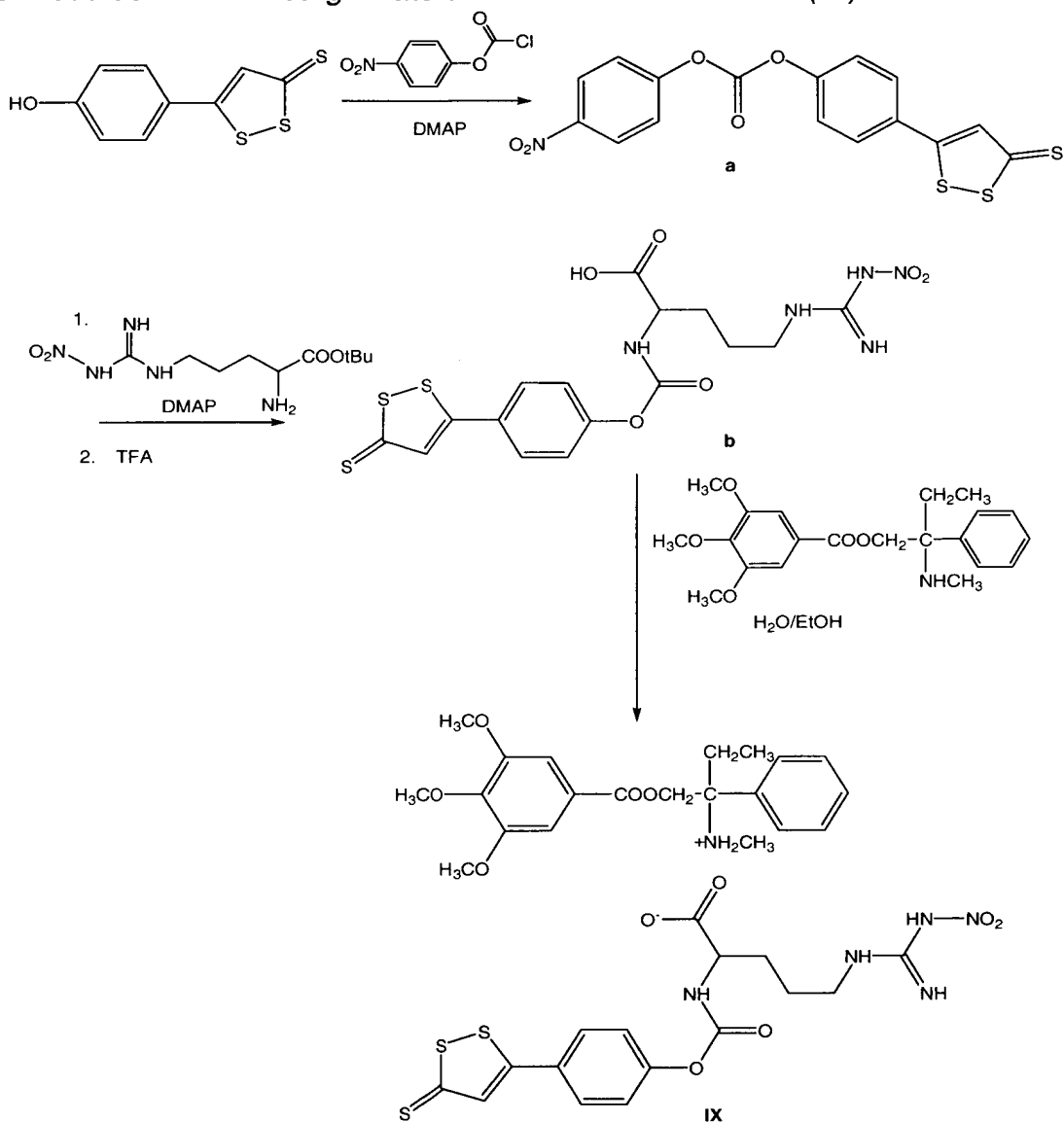


Uma mistura de ácido 4-(tiocarbamoil) benzóico (0,1 mol) e desmetiltribebutina (0,1 mol) foi dissolvida em álcool etílico (20 mL) e acetonitrila (20mL), então adicionou-se água (200mL) e a suspensão resultante foi agitada a temperatura ambiente até tornar-se clara. Então a solução foi congelada e liofilizada para fornecer o sal desejado (rendimento quantitativo).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): \square 0,72 (t, 3H), 1,70-1,80 (m, 4H), 1,80-1,90 (m, 2H), 2,08 (s, 3H), 2,90-3,40 (m, 2H), 3,69 (s, 9H), 3,95 (m, 1H), 4,41 (dd, 2H), 7,07 (s, 2H), 7,22 (t, 1H), 7,33 (t, 2H), 7,52 (d, 2H) 7,93 (dd, 4H), 9,63 (bs, 1H, NH), 10,02 (bs, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): \square 9,07, 28,7, 56,5, 60,5, 64,6, 65,8, 107,2, 125,5, 127,2, 128,2, 128,6, 129,5, 129,4, 132,5, 141,9, 142,4, 148,5, 153,5, 154,7, 165,7, 169,4, 172,5, 188,6.

p.f. 65-67°C (dec.)

Exemplo 9**Síntese de ADT- nitroargininato de N-desmetiltribebutina (IX)****Síntese de ácido carbônico 4-nitro-fenil éster 4-(5-tio-5H-[1,2]ditiol-3-il)-fenil éster (a)**

- 5 A uma suspensão agitada de ADT-OH (1,04 mmol) em CH_2Cl_2 (10 ml) adicionou-se 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 1,16 mmol) e 4-nitrofenil cloroformato (1,15 mmol). A mistura de reação foi agitada por 10 h a temperatura ambiente. Cromatografia de filme fino indicou que a formação do produto desejado se completou. O solvente foi removido e o resíduo foi tratado
- 10 com dietil éter; o produto **a** foi recuperado por filtração e usado sem purifica-

ção posterior (rendimento 81%).

Síntese de ácido 5-nitroguanidino-2-[4-(5-tioxo-5H-[1,2]ditiol-3-il)-fenoxicarbonil-amino]-pentanóico (b)

5 À solução de **a** (1,04 mmol) em 50 mL de CH₂Cl₂ adicionou-se 4-dimetilaminopiridina (1,16 mmol) e H-Arg(NO₂)-OtBu (1,02 mmol) e a solução foi agitada por 20 h a temperatura ambiente. Então, a mistura de reação foi diluída com CH₂Cl₂, lavada com sal. NaHCO₃ e NaCl saturado, e secada sobre MgSO₄. O produto intermediário cru foi tratado com uma solução de ácido trifluoracético em diclorometano (40% TFA em DCM). Após 1 h o sol-
10 vente foi removido para obter o produto **b** como um resíduo cru, o qual foi precipitado com dietil éter; o sólido obtido foi dissolvido em água e 1N NaOH foi adicionado vagarosamente para obter ácido 5-nitroguanidino-2-[4-(5-tioxo-5H-[1,2]ditiol-3-il)-fenoxicarbonil-amino]-pentanóico (**b**) como um sólido branco, o qual foi recuperado por filtração.

15 *Síntese de ADT-nitroargininato de N-desmetiltribebutina (IX)*

A uma mistura de ácido 5-nitroguanidina-2-[4-(5-tioxo-5H-[1,2]ditiol-3-il)-fenoxicarbonil-amino]-pentanóico (**b**; 0,1 mol) e N-desmetiltribebutina (0,1 mol), adicionou-se água (200 mL) e álcool etílico (20 mL) e a suspensão resultante foi agitada a temperatura ambiente até tornar-
20 se clara. Então a solução foi congelada e liofilizada para fornecer o sal desejado (rendimento quantitativo).

Exemplo 10

Síntese de nitro-argininato de N-desmetiltribebutina p-hidroxitiobenzamida (X)

25

X

Síntese de ácido carbônico 4-nitro-fenil éster 4-tiocarbamoil-fenil éster (a)

A uma suspensão agitada de *p*-hidroxitiobenzamida (1,04 mmol) em CH₂Cl₂ (10 ml) adicionou-se 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 1,16 mmol) e 4-nitrofenil cloroformato (1,15 mmol). A mistura de reação foi agitada por 10 h a temperatura ambiente. Cromatografia de filme fino indicou que a formação do produto desejado se completou. O solvente foi removido e o resíduo foi tratado com dietil éter; o produto **a** foi recuperado por filtração e usado sem purificação posterior (rendimento 81%).

10 *Síntese de ácido 5-nitroguanidina-2-(4-tiocarbamoil-fenóxicarbonilamino)-pentanóico (b)*

À solução de **a** (1,04 mmol) em 50 mL de CH₂Cl₂ adicionou-se 4-dimetilaminopiridina (1,16 mmol) e H-Arg(NO₂)-OtBu (1,02 mmol) e a solução foi agitada por 20 h a temperatura ambiente. Então, a mistura de reação foi diluída com CH₂Cl₂, lavada com NaHCO₃ saturado e NaCl saturado, e seca sobre MgSO₄. O produto intermediário cru foi tratado com uma solução de ácido trifluoracético em diclorometano (40% TFA em DCM). Após 1 h o solvente foi removido para obter produto **b** como um resíduo cru, o qual foi precipitado com dietil éter; o sólido obtido foi dissolvido em água e NaOH 1N foi adicionado vagarosamente para obter ácido 5-nitroguanidino-2-(4-tiocarbamoil-fenóxicarbonilamino)-pentanóico (**b**) como um sólido branco, o qual foi recuperado por filtração.

Síntese de p-hidroxitiobenzamida-nitroargininato de N-desmetiltrimebutina (X)

25 A uma mistura de ácido 5-nitroguanidino-2-(4-tiocarbamoil-fenóxicarbonilamino)-pentanóico (**b**; 0,1 mol) e N-desmetiltrimebutina (0,1 mol), adicionou-se água (200 mL) e álcool etílico (20 mL) e a suspensão resultante foi agitada a temperatura ambiente até tornar-se clara. Então a solução foi congelada e liofilizada para fornecer o sal desejado (rendimento quantitativo).

30 Teste dos Compostos

Exemplo 11

Comparação dos Efeitos do Sal I, Trimebutina Nitroargininato, versus Trime-

butina individualmente e Nitroarginina individualmente em um modelo de Rato de percepção de dor visceral

Um modelo de rato de percepção de dor visceral, um modelo pré-clínico de síndrome do intestino irritável, foi usado no exemplo seguinte.

5 Ratos (macho, Wistar, 200-250 g, obtidos de Charles River, Monza, Itália, foram alojados em gaiolas plásticas e mantidos sob condições controladas com um ciclo de 12-horas claro/escuro com luzes acesas a partir de 07:00 h. Água da torneira e padrão de laboratório Chow foram disponibilizados livremente. Antes das experiências, os ratos foram individualmente treinados

10 durante 2-3 horas por dia em uma gaiola de plexiglás por 2-3 dias. Isso possibilitou que eles se adaptassem ao ambiente de movimento restrito. Alimentação foi suspensa por 12 horas antes da execução da gravação da distensão colo-retal (CRD). Experiências foram executadas em ratos acordados e foram conduzidos de uma maneira cega, visto que o observador não tinha

15 conhecimento da identidade da droga administrada a cada animal.

No dia do teste, ratos foram sedados com inalação de éter e um balão de látex com 2 cm de comprimento foi inserido intra-retalmente 2 cm do bordo anal e fixados na base da cauda. O balão foi conectado através de uma cânula de parede dupla a um transdutor de pressão para monitorar continuamente a pressão retal por computador (PowerLab PC, A.D. Instruments, Milford, MA, USA) e a uma seringa para inflar/desinflar o balão. Os ratos foram então alojados em uma pequena gaiola (20 x 8 x 8 cm) em uma plataforma elevada de Plexiglas™ e acordados e adaptados por 1 hora. Após recuperação da sedação, os animais foram submetidos ao procedimento

20 CRD e respostas comportamentais foram testadas. Na noite anterior aos experimentos, os balões foram inflados e deixados assim por toda a noite, de forma que o látex se esticou e os balões se tornaram complacentes.

CRD de 20 segundos, executados a cada 5 minutos, foram aplicados em incrementos de 0,4 ml começando de 0,4 ml até 1,6 ml de água.

30 Para atingir uma medição acurada dos parâmetros e percepção colônicos, as distensões foram repetidas duas vezes para cada intensidade e tirou-se a média dos dados para cada animal para análise. Cada animal foi submetido

a um duplo conjunto de CRD. Vinte minutos após a primeira sequência de CRD (0,4 mL-1,6 ml de água), medicamentos foram administrados intraperitonealmente (i.p.) e um segundo conjunto de CRD foi executado. Respostas comportamentais durante o primeiro e o segundo conjunto de CRD foram avaliados e comparados.

A resposta comportamental ao CRD foi avaliada através da medição do reflexo de retirada abdominal (abdominal withdrawal reflex) (AWR) usando um escore semi-quantitativo (1). O AWR é um reflexo motor involuntário similar ao reflexo visceromotor, mas ele tem a grande vantagem de que, ao contrário deste último, ele não requer cirurgia abdominal para implantar eletrodos de gravação e fios na parede do músculo abdominal, que poderia causar uma sensibilização adicional (ver Ness, T.J. and Gebhart, G.F. (1990) *Pain* **41**:167-234, incorporada aqui por referência).

A medição do AWR consistiu de observação visual da resposta do animal a um CRD graduado por um observador cego e atribuição de um escore AWR de acordo com a escala comportamental conforme descrita previamente em Al-Chaer, E.D. *et al.* (2000) *Gastroenterology* **19**: 1276-85, incorporada aqui por referência, em que o grau 0 corresponde a nenhuma resposta comportamental a CRD, grau 1 corresponde a movimento breve da cabeça no momento do estímulo, seguido por imobilidade, grau 2 corresponde a uma leve contração dos músculos abdominais embora os ratos não levantem o abdômen fora da plataforma, grau 3 corresponde a uma contração forte dos músculos abdominais com a elevação do abdome para fora da plataforma, e grau 4 corresponde a uma severa contração do músculo abdominal manifestada por arqueamento do corpo e a elevação do abdome e das estruturas pélvicas e escroto.

Os efeitos de maleato de trimebutina, nitroarginina e nitroargininato de trimebutina sobre a complacência e sensibilidade colônica foram determinadas usando um total de 15 ratos em jejum. Para investigar se a administração de maleato de trimebutina, nitroarginina e nitroargininato de trimebutina poderiam reduzir a dor induzida por CRD, após a primeira sequência de CRD (tratado com veículo), 5 ratos foram tratados com maleato

de trimebutina a uma dose de 10 mg/kg i.p., nitroarginina a uma dose de 6 mg/kg ou nitroargininato de trimebutina a uma dose de 16 mg/kg i.p., após o que um segundo conjunto de CRD foi repetido. Os resultados desses experimentos são mostrados nas figuras 1(a), 2(a) e 3(a).

5 Para determinar o efeito de maleato de trimebutina, nitroarginina e nitroargininato de trimebutina sobre o músculo liso colônico, a complacência do colo-retal durante CRD foi obtida do volume e pressão intracolo-retais e expressos como mL/mmHg. Esses resultados são mostrados nas figuras 1(b), 2(b) e 3(b).

10 Para determinar o papel do NO nos efeitos analgésicos viscerais de nitroargininato de trimebutina, experiências foram executadas nas quais ratos foram pré-tratados 10 minutos antes da administração do nitroargininato de trimebutina (16 mg/kg i.p.) ou veículo com azul de metileno (1 mg/kg i.p.), L-NAME (25 mg/kg i.v.) ou veículo. Os resultados são mostrados nas
15 figuras 4(a) e 4(b).

Todos os dados são apresentados como a média \pm SEM (desvio padrão), com tamanhos de amostra de 5 ratos/grupo; a comparação estatística dos dados foi executada por um teste emparelhado t de Student. Uma probabilidade associada (p-valor) de menos do que 5% foi considerada sig-
20 nificativa, conforme indicado por um asterisco.

As figuras 1(a), 2(a) e 3(a) mostram que nitroargininato de trimebutina é mais efetivo do que tanto maleato de trimebutina ou nitroarginina para reduzir dor visceral em resposta a distensão colo-retal. Entretanto, nenhum desses compostos foi particularmente efetivo na redução da pressão
25 intra-retal, como mostrado nas figuras 1(b), 2(b) e 3(b). Figuras 4(a) e 4(b) mostram que os efeitos analgésicos viscerais de nitroargininato de trimebutina são largamente abolidos por pré-tratamento com um inibidor de sintase de óxido nítrico (L-NAME) ou com um inibidor de guanilato ciclase solúvel (azul de metileno). Esses resultados sugerem que o desprendimento de óxi-
30 do nítrico de nitroargininato de trimebutina, e o estímulo de guanilato ciclase solúvel, contribui significativamente para os efeitos analgésicos viscerais desse composto.

Assim, nitroargininato de trimebutina é útil no tratamento de dor abdominal associada com várias condições inflamatórias do trato alimentar, assim como distúrbios funcionais gastrointestinais, tal como síndrome do intestino irritável, dispepsia, etc., que são caracterizadas por nocicepção visceral aumentada (com ou sem inflamação de acompanhamento).

Exemplo 12

Comparação dos Efeitos de Sal III, Tiocarbamoilbenzoato de Trimebutina, versus Trimebutina individualmente e Tiocarbamoilbenzoato individualmente, em um Modelo de Rato de percepção de dor visceral

Experiências foram executadas conforme descrito no exemplo 11, exceto pelo fato de que grupos de 5 ratos cada foram tratados com veículo, maleato de trimebutina (10 mg/kg), ou com doses equimolares de tiocarbamoilbenzoato de trimebutina (sal III) ou tiocarbamoilbenzoato apenas. As figuras 5(a) e 5(b) mostram que tiocarbamoilbenzoato de trimebutina é mais efetiva do que tanto maleato de trimebutina ou tiocarbamoilbenzoato na redução de dor visceral em resposta a distensão colo-retal.

Portanto, tiocarbamoilbenzoato de trimebutina é útil no tratamento de dor abdominal associada com várias condições inflamatórias do trato alimentar, assim como distúrbios funcionais gastrointestinais, tal como síndrome do intestino irritável, dispepsia, etc., que são caracterizadas por nocicepção visceral aumentada (com ou sem inflamação de acompanhamento).

Exemplo 13

Geração de H₂S por ácido 4-(tiocarbamoil) benzóico e 5-(4-amino-fenil)-[1,2]ditiolo-3-tiona

Dois compostos foram testados, 5-(4-amino-fenil)-[1,2]ditiolo-3-tiona (ADT-OH) e ácido 4-(tiocarbamoil) benzóico (TBZ) quanto a C H₂S sob três diferentes condições para geração de H₂S. Em particular, concentrações de H₂S gerado dentro de 1 hora a partir de concentrações de ADT-OH e TBZ de 1 mM foram medidas. O desprendimento de H₂S foi testado sob três condições: (i) quando o composto estava em tampão, (ii) quando o composto estava em um homogenato de fígado, e (iii) quando o composto estava em um homogenato de fígado, junto com um inibidor de síntese de H₂S, o qual

bloqueia a atividade da enzima um inibidor de cistationina- γ -liase (PÁG. = DL-propargilglicina; 2 mM). Resultados são mostrados na figura 6. Asterisco (*) indica uma elevação significativa ($p < 0.05$) versus o grupo correspondente tratado com veículo. O alfa (α) representa uma significativa redução na síntese de H_2S como um resultado de incubação na presença de PÁG.

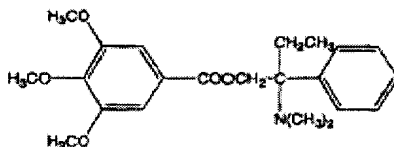
REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula geral:



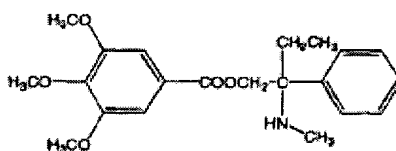
onde:

A é



5

OU

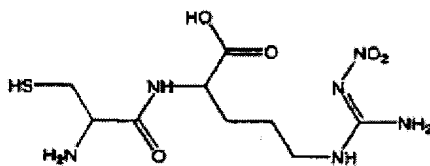
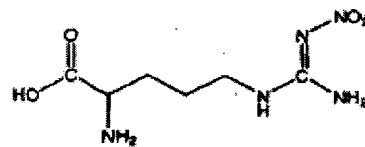


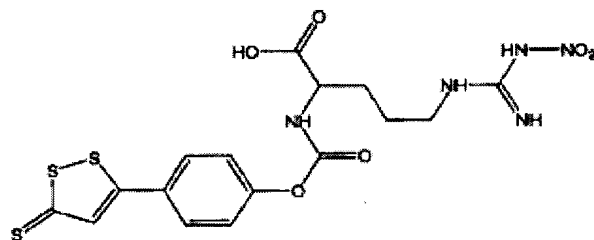
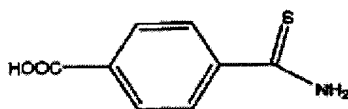
e seus estereoisômeros correspondentes;

e X é um componente de desprendimento de NO, de desprendimento de H₂S, ou de desprendimento combinado de NO e H₂S.

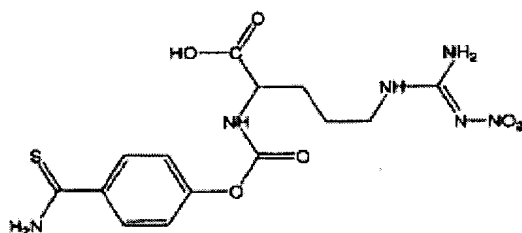
10

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, onde X é selecionado do grupo que consiste de:





e



3. Composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é argininato de trimebutina.
4. Composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é cisteinil-nitroargininato de trimebutina.
- 5 Composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é tiocarbamoil benzoato de trimebutina.
6. Composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é 5-fenil-1,2-ditiona-3-tiona-nitroargininato de trimebutina.
7. Composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é *p*-hidroxi tiobenzamida-nitroargininato de trimebutina.
8. Composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é nitroargininato de N-desmetil trimebutina.
9. Composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é cisteinil-nitroargininato de N-desmetil trimebutina.
- 10 Composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é tiocarbamoil benzoato de N-desmetil trimebutina.
11. Composto de acordo com a reivindicação 2, onde o compos-

to é 5-fenil-1,2-ditiona-3-tiona nitroargininato de N-desmetil trimebutina.

12. Composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é *p*-hidroxi tiobenzamida-nitroargininato de N-desmetil trimebutina.

13. Composição farmacêutica compreendendo um composto de
5 acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e um excipiente ou carreador farmacêuticamente aceitável.

14. Método para tratamento de dor visceral em um indivíduo com
necessidade de um tal tratamento, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade suficiente para aliviar a dor de um composto de
10 acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, onde a dor visceral é dor abdominal.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, onde a dor abdominal é devida a doenças intestinais, tais como doença inflamatória do intestino (IBD), síndrome do intestino irritável (IBS), gastroparese diabética, e
15 dispepsia.

17. Composto contendo a fórmula geral nitroarginina-R, onde R é um componente de desprendimento de H₂S, para a preparação de sais de trimebutina e N-monodesmetil trimebutina.

20 18. Composto de acordo com a reivindicação 17, onde R é selecionado do grupo que consiste de 5-*p*-hidroxifenil-1,2-ditiona-3-tiona, cisteína, e ácido 4-(tiocarbamoil) benzóico.

19. Emprego de um composto de acordo com as reivindicações 1-10 para a preparação de um medicamento para o tratamento de dor visceral em um indivíduo com necessidade de tal tratamento.
25

20. Emprego de acordo com a reivindicação 19, onde a dor visceral é dor abdominal.

21. Emprego de acordo com a reivindicação 20, onde a dor abdominal é devida a doenças intestinais tais como doença inflamatória do intestino (IBD), síndrome do intestino irritável (IBS), gastroparese diabética, e
30 dispepsia.

●- Veículo
○- Maleato de trimebutina (10 mg/kg)

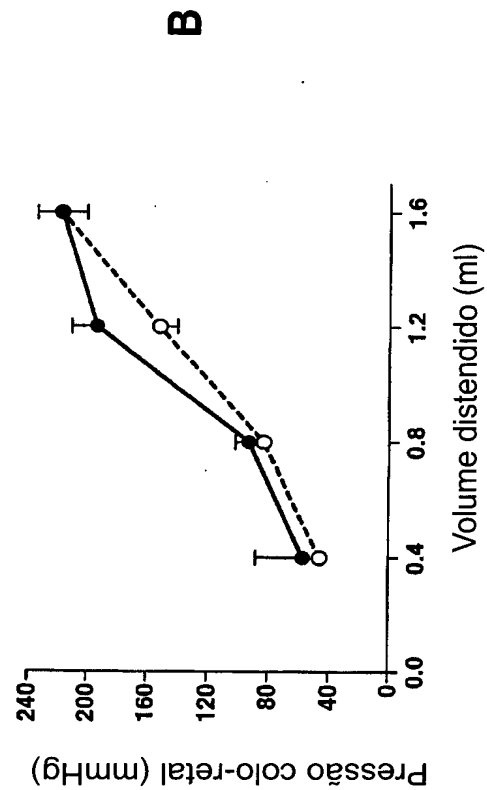
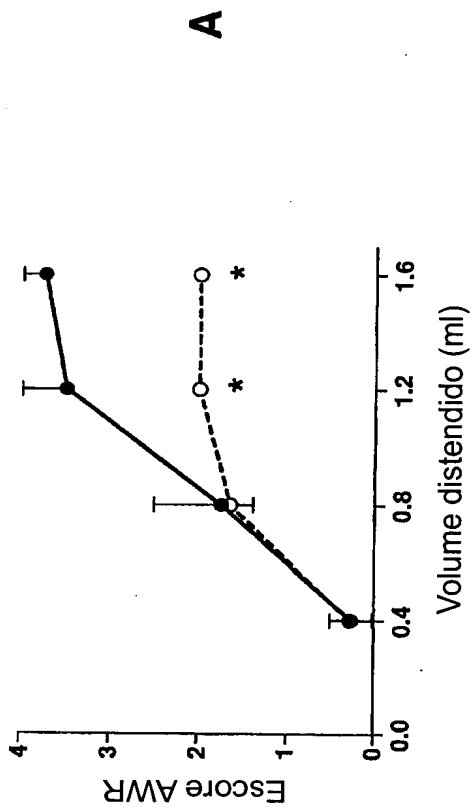


Fig. 1

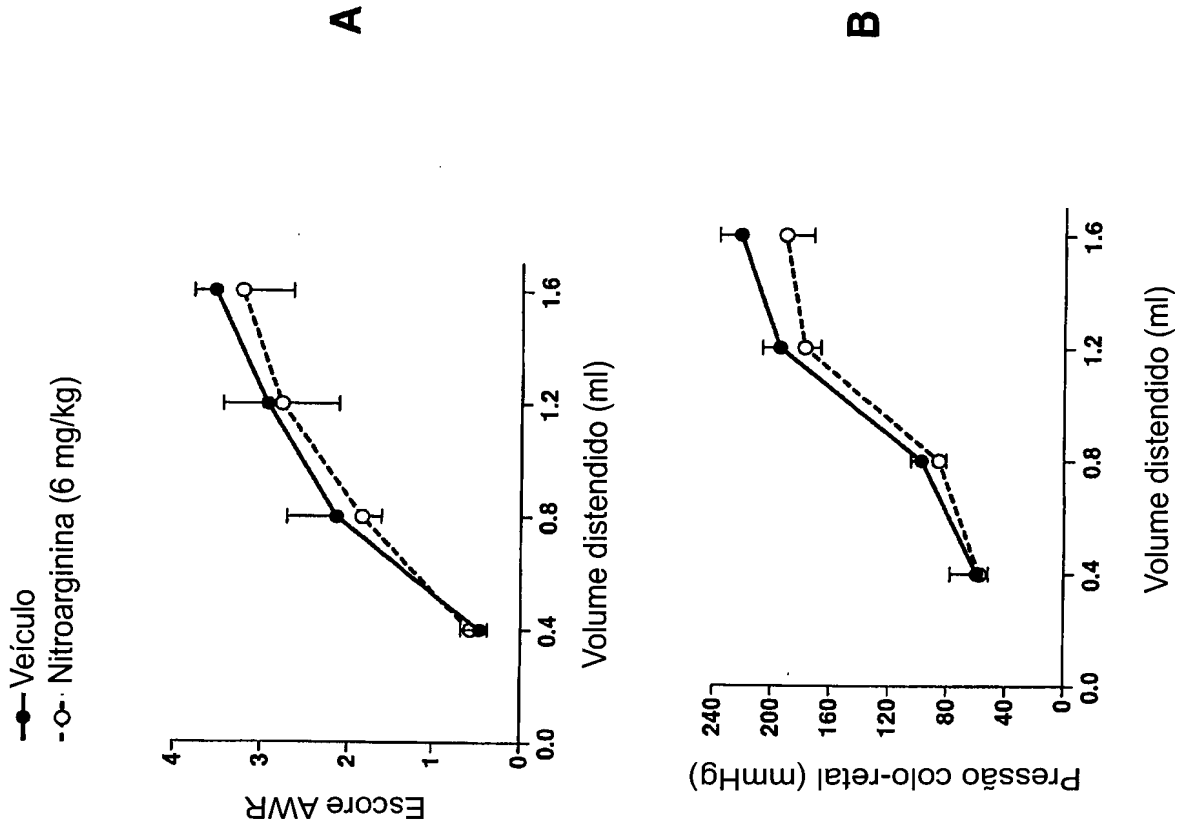


Fig.2

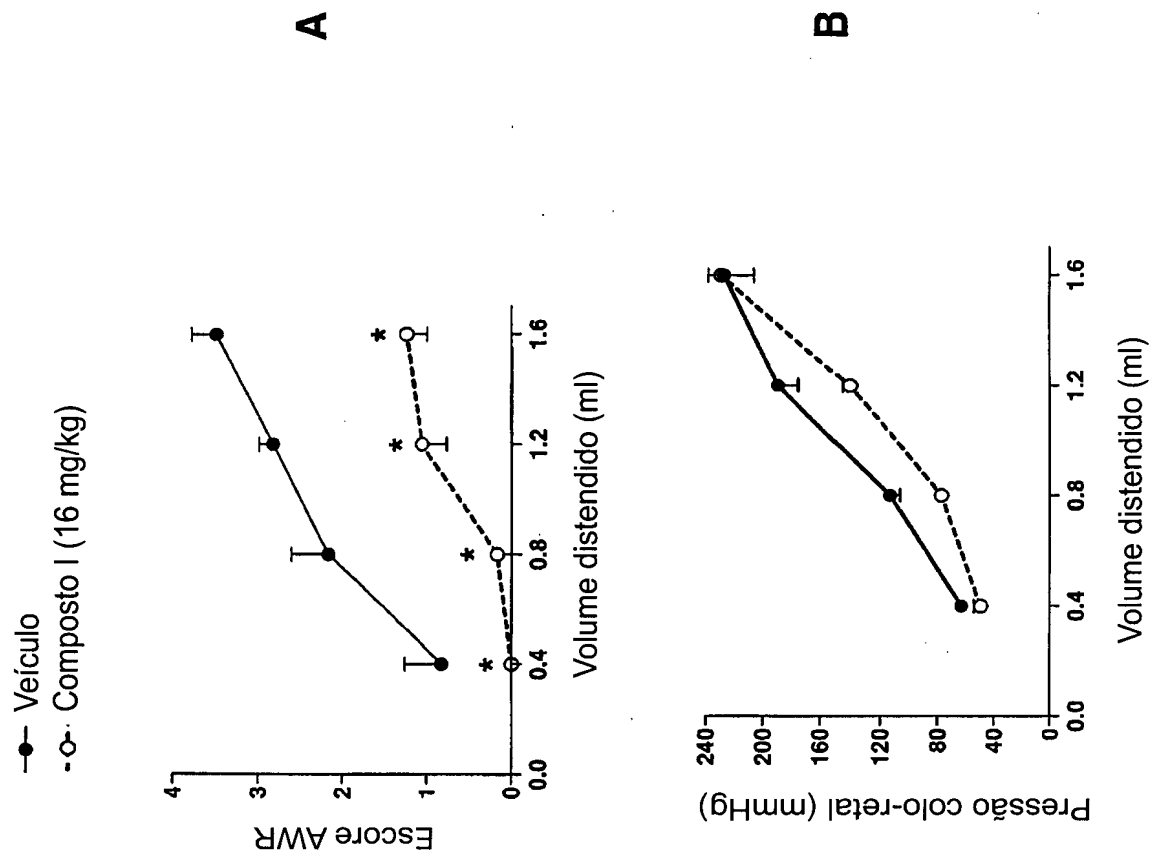


Fig.3

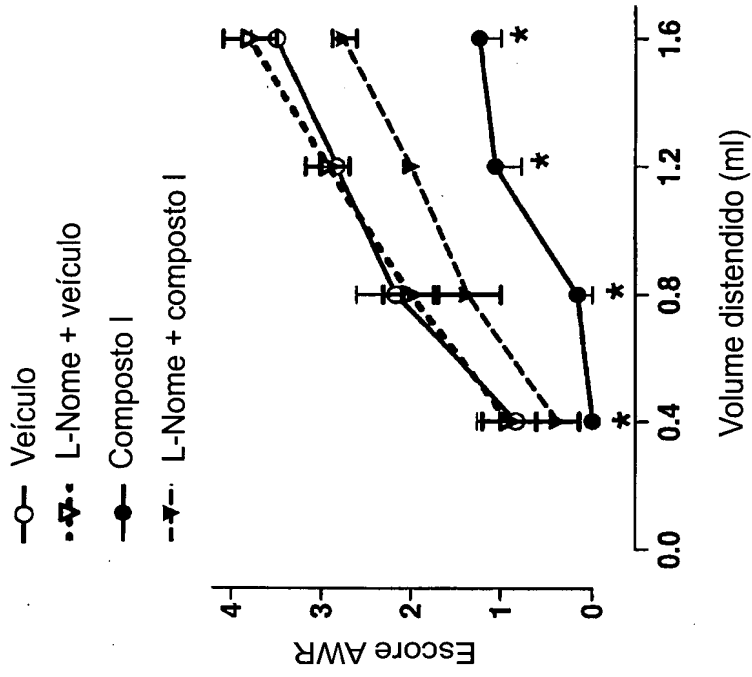


Fig. 4a

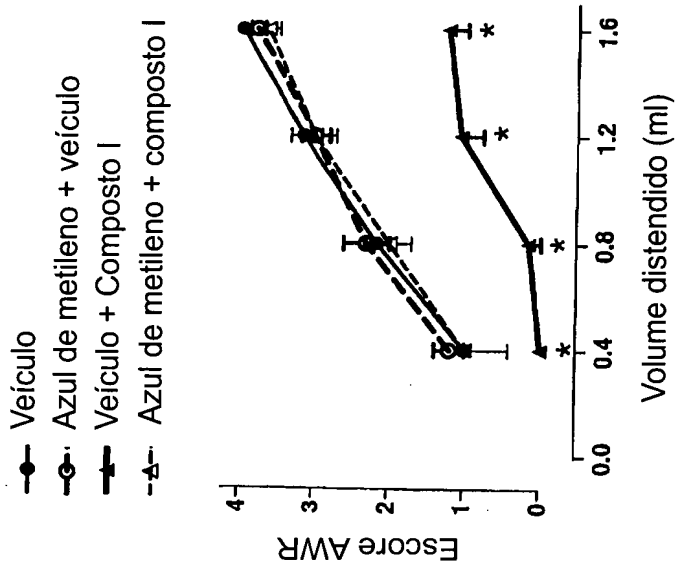


Fig. 4b

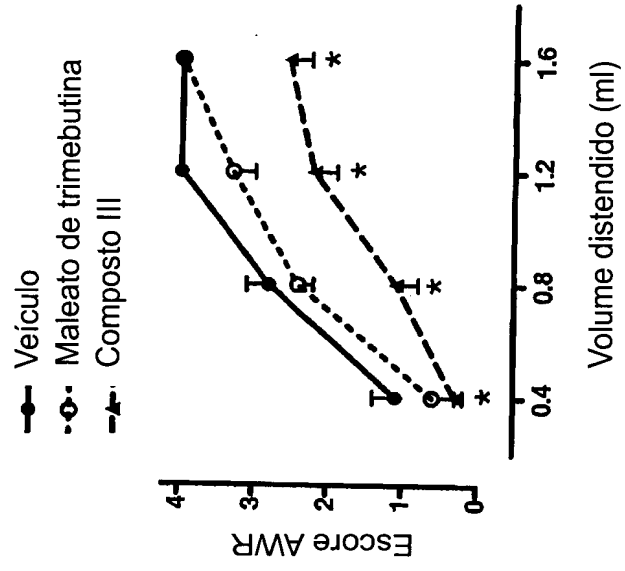


Fig. 5a

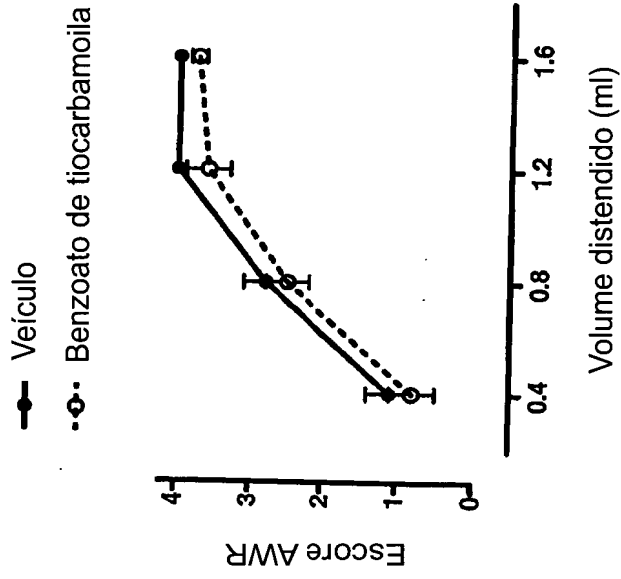


Fig. 5b

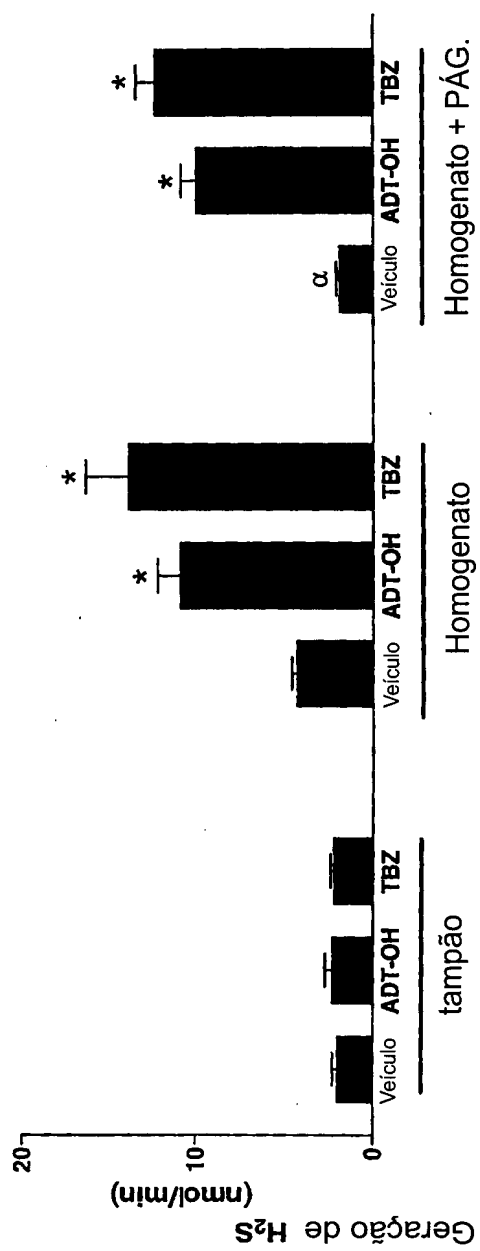


Fig. 6

RESUMO

Patente de Invenção: **"SAIS DE TRIMEBUTINA E N-DESMETIL TRIMEBUTINA"**.

5 A presente invenção refere-se ao fornecimento de sais excepcionais de trimebutina e N-desmetil trimebutina, e seus estereoisômeros correspondentes, contendo propriedades analgésicas aperfeiçoadas úteis no tratamento de dor visceral. Os sais da presente invenção são particularmente úteis no tratamento de condições caracterizadas por dor abdominal, tais como doença inflamatória do intestino (IBD) e síndrome do intestino irritável
10 (IBS), gastroparese diabética, e dispepsia.