



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0910541-7 B1



(22) Data do Depósito: 30/04/2009

(45) Data de Concessão: 03/12/2019

(54) Título: COMPOSTOS DE TETRAZOL

(51) Int.Cl.: A61K 31/41; A01N 43/64.

(30) Prioridade Unionista: 03/09/2008 US 61/093,743; 30/04/2008 US 61/049,167.

(73) Titular(es): WELLSTAT THERAPEUTICS CORPORATION.

(72) Inventor(es): JAMES DENNEN O'NEIL; SHALINI SHARMA; RAMACHANDRAN ARUDCHANDRAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2009042298 de 30/04/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/134995 de 05/11/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/10/2010

(57) Resumo: COMPOSTOS DE TETRAZOL A presente invenção refere-se a redução de ácido úrico em indivíduos mamíferos e aumento da excreção de ácido úrico através da administração de um composto da fórmula I. Os efeitos da diminuição do ácido úrico dos compostos da invenção são usados para tratar ou prevenir uma variedade de condições incluindo gota, hiperuricemia, níveis elevados de ácido úrico que não encontram níveis costumeiramente justificando um diagnóstico de hiperuricemia, disfunção renal, pedras nos rins, doença cardiovascular, risco para desenvolver doença cardiovascular, síndrome de lise tumoral, comprometimento cognitivo, hipertensão essencial com início precoce, e inflamação induzida por Plasmodium falciparum. Na fórmula I, x é 1 ou 2; y é 0, 1, 2 ou 3; e R1 é selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, alquila tendo 1 ou 2 átomos de carbono, hidróxi, alcóxi tendo 1 ou 2 átomos de carbono, flúor, cloro, bromo, e amino. A é fenila, substituída ou não substituída por um, dois ou três grupos selecionados do grupo consistindo em halo, alquila tendo 1 ou 2 átomos de carbono, perfluorometila, alcóxi tendo 1 ou 2 átomos de carbono, e perfluorometóxi; ou cicloalquila tendo de 3 a 6 átomos de anel em que a cicloalquila é não-substituída ou um ou dois carbonos de anel são independentemente monossubstituídos por metila ou etila; ou (...).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COM-
POSTOS DE TETRAZOL**".

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[001] Doenças causadas por níveis elevados de ácido úrico se classificam em duas categorias principais: distúrbios causados pela precipitação de cristais de ácido úrico e doenças relacionadas com os efeitos patológicos do ácido úrico solúvel. A artrite gotosa é o exemplo clássico do primeiro. Deposição de cristais de urato no rim é também uma causa comum de disfunção renal. Níveis elevados de ácido úrico solúvel estão associados com uma variedade de distúrbios, incluindo doenças cardiovasculares e renais.

[002] A gota é mais comumente manifestada como inflamação de uma ou mais das articulações do corpo, resultando em dor leve a severa. Estes eventos podem ser episódicos e/ou crônicos. Com o tempo, a gota pode resultar em destruição da cartilagem e de osso, desenvolvimento de depósitos de cristais de ácido úrico, dor e disfunção renal como também pedras nos rins. A gota pode também afetar outros órgãos.

[003] A gota é causada por hiperuricemia e a consequente formação e deposição de cristais de ácido úrico nos tecidos, articulações, rins e outros órgãos. O ácido úrico provém do metabolismo celular normal e de alguns tipos de alimentos e bebidas. Os níveis excessivos de ácido úrico são o resultado da produção excessiva de ácido úrico, depuração deficiente pelos rins (ou uma combinação de excesso de produção e excreção diminuída), e também por alguns tipos de medicamentos tomados para outras condições de saúde. (Os exemplos incluem diuréticos, pirazinamida, ciclosporina, aspirina em baixas doses, ácido nicotínico e levodopa.). Muitos tipos de condições de saúde também podem contribuir para hiperuricemia e gota, incluindo alcoolismo, leucemia, linfoma, câncer de pulmão, síndrome de lise tumoral,

fumo, psoríase, obesidade, disfunção renal, insuficiência cardíaca congestiva, fome, anemia, pressão alta, diabetes, imobilidade, Síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome de Down, e disfunções da tireóide e paratireóide.

[004] A gota é geralmente dividida em quatro categorias com base nos sintomas progressivamente mais graves:

1) Assintomática. Elevados níveis de ácido úrico no sangue, mas sem sintomas evidentes.

2) Artrite gotosa aguda: início súbito de sintomas, muitas vezes em uma única articulação (geralmente um dedão do pé), e depois que envolvam outras articulações. Os sintomas incluem dor, inchaço, vermelhidão e febre.

3) Gota intercrítica: fases assintomáticas entre as crises de gota.

4) Gota tofosa crônica: Uma condição crônica que pode incluir crises frequentes, dor leve e inflamação constante das articulações, destruição de cartilagem e de osso, desenvolvimento de depósitos de cristais de ácido úrico, disfunção renal e pedras nos rins.

[005] Os medicamentos usados atualmente para tratar os sintomas agudos de gota incluem fármacos anti-inflamatórios não esteróides, colchicina e corticosteróides. Todos esses medicamentos podem causar efeitos colaterais de leves a graves. Outros tratamentos para esses sintomas agudos estão sendo estudados, incluindo anticorpos até antagonistas de citocinas inflamatórias, como interleucina-1.

[006] Outros tipos de medicação são usados a fim de tentar reduzir a incidência ou a severidade de crises futuras, através da redução dos níveis de ácido úrico. As três principais classes de medicamentos são inibidores da xantina oxidase (por exemplo, alopurinol), que reduzem a produção de ácido úrico de xantina, agentes uricossúricos (por exemplo, sulfinpirazona, probenecida, benzbromarona, e lo-

sartan), que se destinam a melhorar a excreção de ácido úrico por inibir a absorção do ácido úrico secretado nos túbulos renais através da inibição do transportador de ácido úrico 1 (URAT1) (Vide também Pedido de Patente US Publicação nº 2007/0010670, publicado em 11 de janeiro de 2007 (Japan Tobacco Inc.)) ou outros elementos de absorção de ácido úrico, e uricases, por exemplo, uma uricase peguilada tal como Puricase (uricase recombinante de mamíferos pegilada da Savi-ent). Estes fármacos também frequentemente resultam em efeitos colaterais significativos e indesejáveis. Por exemplo, alopurinol foi relatado por causar pelo menos 100 casos de Síndrome de Stevens-Johnson/Necrólise Epidérmica Tóxica e cerca de 30 mortes a cada ano na Europa (Halevy et al. Alopurinol é a causa mais comum da síndrome de Stevens-Johnson e necrólise epidérmica tóxica na Europa e Israel. J Am Acad. Dermatol. 58 (1) :25-32, 2008). Probenicida e benzbromarona foram retirados do mercado em vários países devido aos efeitos colaterais indesejáveis, tais como insuficiência hepática, no caso de benzbromarona. A aquiescência dos pacientes para tomar esses medicamentos é relatadamente muito pobre (AA Reidel et al "Compliance with Allopurinol Therapy among Managed Care Enrollees with Gout: A Retrospective Analysis of Administrative Claims.". Journal of Rheumatology 2004; 31:1575-1581), presumivelmente por causa dos efeitos colaterais e/ou ausência de benefício.

[007] Mais de 5 milhões de pessoas nos EUA tem gota (National Health and Nutrition Examination Survey 111, 1988-1994). A prevalência de hiperuricemia e gota nos EUA em 1999, foi relatada como sendo 41 por 1000 e 14 por mil no Reino Unido (TR Mikuls et al, "Gout Epidemiology: Results for the UK General Practice Research Database, 1990-1999". Annals of the Rheumatic Diseases, 64:267-272). Relatórios subsequentes indicam que a prevalência dos EUA, Reino Unido e outros países foi subindo de forma constante. (KL Wallace et al,

"Increasing Prevalence of Gout and Hyperuricemia over 10 Years Among Older Adults in a Managed Care Population." *Journal of Rheumatology* 2004; 31: 1582-1587). Os dados mais recentes sugerem que mais de 5 milhões de americanos têm agora a gota diagnosticável. (E. Krishnan et al, "Gout in Ambulatory Care Settings in the United States." *Journal of Rheumatology* 2008; 35 (3): 498-501).

[008] Hiperuricemia e gota são questões particularmente importantes em receptores de transplantes de órgãos (Stamp, L., et al, "Gout in solid organ transplantation: a challenging clinical problem", *Drugs* (2005) 65 (18): 2593-2611). O ácido úrico é frequentemente elevado em pacientes com transplante renal, e fármacos imunossupressores comuns, como a ciclosporina, podem causar hiperuricemia particularmente grave. Em pacientes transplantados, o alopurinol é contra-indicado devido às interações com alguns imunossupressores como a azatioprina, e devido à falência da medula óssea causada pela combinação. Além do mais, o ácido úrico elevado pode contribuir para a falência do enxerto (Armstrong, K.A. et al., "Does Uric Acid Have a Pathogenetic Role in Graft Dysfunction and Hypertension in Renal Transplant Patients?" *Transplantation* (2005) 80 (11): 1565-1571). Portanto, há uma necessidade particularmente aguda para os agentes de segurança que reduzam a hiperuricemia em receptores de transplante.

[009] As doenças relacionadas ao ácido úrico solúvel elevado geralmente envolvem problemas vasculares: hipertensão arterial (Sundstrom et al., Relations of serum uric acid to longitudinal blood pressure tracking and hypertension incidence. *Hypertension*. 45 (1):28-33, de 2005.), pré-hipertensão (Syamela, S. et al., Association between serum uric acid and prehypertension among US adults. *J Hypertens*. 25 (8) 1583-1589, (2007)), aterosclerose (Ishizaka et al., Association between serum uric acid, metabolic syndrome, and carotid atherosclerosis in Japanese individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (5)

:1038-44, 2005), doença arterial periférica (Shankar, A. et al., Association between serum uric acid level and peripheral artery disease. *Atherosclerosis* doi 10: 1016 , 2007), inflamação vascular (Zoccali et al., Uric acid and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 17 (5) :1466-71, 2006), insuficiência cardíaca (Strasak, A.M. et al., Serum uric acid and risk of cardiovascular mortality: A prospective, long-term study of 83,683 Austrian men, *Clin Chem.* 54 (2) 273-284, 2008; Pascual-Figal, Hyperuricaemia and long-term outcome after hospital discharge in acute heart failure patients. *Eur J Heart Fail.* 2006 Oct 23; [Epub ahead of print]; Cengel, A., et al., "Serum uric Acid Levels as a Predictor of In-hospital Death in Patients Hospitalized for Decompensated Heart Failure." *Acta Cardiol.* (Oct. 2005) 60 (5): 489-492), infarto do miocárdio (Strasak, A.M. et al.; Bos et al., Uric acid is a risk factor for myocardial infarction and stroke: the Rotterdam study. *Stroke.* 2006. jun; 37 (6) :1503-7), disfunção renal (Cirillo et al., Uric Acid, the metabolic syndrome, and renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 17 (12 Suppl 3...): S165-8, de 2006; Z . Avram e E. Krishnan, Hyperuricemia – where nephrology meets rheumatology. *Rheumatology (Oxford)*, 47 (7): 960-964, 2008), e acidentes vasculares cerebrais (Bos et al, 2006). O ácido úrico causa diretamente a disfunção endotelial (Kanellis, et al., Uric acid as a mediator of endothelial dysfunction, inflammation, and vascular disease. *Semin Nephrol.* 25(1):39-42, 2005; Khosla et al, Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int.* 67 (5) :1739-42, 2005). Em crianças e adolescentes, o início precoce da hipertensão essencial é associado com nível sérico de ácido úrico elevado, e redução do ácido úrico com alopurinol reduz a pressão arterial nesses pacientes (Feig and Johnson, The role of uric acid in pediatric hypertension. *J Ren Nutrition* 17(1): 79-83, 2007; D.I. Feig et al., Effect of allopurinol on blood pressure of adolescents with newly diagnosed essential hypertension. *JAMA* 300 (8): 924-932, 2008. Feig

et al. também enunciaram que esta é uma nova abordagem terapêutica, mas que os efeitos colaterais dos medicamentos existentes para reduzir o ácido úrico podem limitar ou impedir a sua utilização. A hiperuricemia é um fator de risco independente em todas estas doenças.

[0010] Ácido úrico solúvel elevado também está associado ou diretamente induz respostas inflamatórias. Por exemplo, o ácido úrico é transportado para células musculares lisas vasculares através de transportadores ácidos orgânicos, especialmente os transportadores de urato URAT1 e, em seguida estimula células musculares lisas vasculares para produzir a proteína C reativa, MCP-1 e outras citocinas, estimulando com isso a proliferação e outras alterações associadas à aterosclerose (Price et al., Human vascular smooth muscle cells express a urate transporter. *J Am Soc Nephrol.* 17(7):1791-5, 2006; Kang et al., Uric acid causes vascular smooth muscle cell proliferation by entering cells via a functional urate transporter. *Am J Nephrol.* 2005 25 (5) :425-33 (2005); Yamamoto et al, Allopurinol reduces neointimal hyperplasia in the carotid artery ligation model in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 29 (11) 915-921, 2006), estimula as células mononucleares humanas para produzir IL-1 β , IL-6 e TNF- α , provoca significativos aumentos de TNF- α quando infundido em ratos, ativa as células endoteliais e plaquetas, e aumenta a adesividade plaquetária ((Coutinho et al., "Associations of Serum Uric Acid with Markers of Inflammation, Metabolic Syndrome, and Subclinical Coronary Atherosclerosis", *Amer. J. Hypertens.* (2007) 20: 83-89; Levya, F., et al., "Uric Acid in Chronic Heart Failure: A Marker of Chronic Inflammation", *Eur. Heart J.* (1998) 19 (12): 1814-1822). O ácido úrico também mostrou inibir a biodisponibilidade do óxido nítrico endotelial e ativar o sistema renina-angiotensina. (T.S. Perlstein et al., Uric acid and the state of the intrarenal renin-angiotensin system in humans. *Kidney International.* 66:1465-1470, 2004). Inokuchi et al. demonstraram que a

Interleucina 18 (IL-18) e outros agentes inflamatórios refletem inflamação local associada à gota e que os cristais de urato aceleram a ativação de IL-18 (T. Inokuchi et al., Plasma IL-18 and other inflammatory cytokines in patients with gouty arthritis and monosodium urate monohydrate crystal-induced secretion of IL-18. *Cytokine*. 33(1): 21-27, 206), que parecem ter um papel causal na insuficiência renal. IL-18 e outras citocinas são também significativamente elevadas em pessoas que não têm a gota, por si só, mas que apenas têm níveis elevados de ácido úrico (C. Ruggiero et al. Uric acid and inflammatory markers. (C. Ruggiero et al., Uric acid and inflammatory markers. *European Heart Journal*. 27: 1174-1181, 2006).

[0011] A hiperuricemia também está associada com déficit cognitivo e de outras formas de disfunção do sistema nervoso central. (Schretlen, D.J. et al., "Serum Uric Acid and Cognitive Function in Community-Dwelling Older Adults", *Neuropsychology* (Jan. 2007) 21(1): 136-140; Watanabe, S., et al., "Cerebral Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Oxonate-Induced Hyperuricemic Mice", *J. Health Science* (2006) 52: 730-737).

[0012] Níveis elevados de ácido úrico sérico também estão associados com o maior risco de câncer e mortalidade por câncer. (Strasak, AM et al. (2007) Serum uric acid and risk of cancer mortality in a large prospective male cohort. *Cancer Causes Control* 18 (9) 1021-1029; Strasak, AM et al. (2007) The role of serum uric acid as an antioxidant protecting against cancer: prospective study in more than 28,000 older Austrian women. *Annals Oncol* 18 (11) 1893-1897; Jee, SA et al. (2004) Serum uric acid and risk of death from cancer, cardiovascular disease or all causes in men *Eur. J. Cardiovascular Prev. Rehab.* 11 (3) 185-191)

[0013] Níveis elevados de ácido úrico estão associado com pré-diabetes, resistência à insulina, o desenvolvimento da diabetes tipo 2,

e um aumento da probabilidade de uma variedade de condições indesejáveis em pessoas com diabetes, como doença arterial periférica, acidente vascular cerebral, e aumento do risco de mortalidade, (Ioachimescu, A.G. et al. (2007) Serum uric acid, mortality and glucose control in patients with Type 2 diabetes mellitus: a PreCIS database study Diabet. Med. 24 (12) 1369-1374; Perry, I.J. et al (1995) Prospective study of risk factors for development of non-insulin dependent diabetes in middle aged British men BMJ 310 (6979) 560-564; Chien, K-L et al. (2008) Plasma uric acid and the risk of Type 2 diabetes in a Chinese community Clin. Chem. 54 (2) 310-316; Sautin, Y. Y. et al. (2007) Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress Am. J. Physiol. Cell Physiol. 293: C584-C596; Tseng, C.H. (2004) Independent association of uric acid levels with peripheral artery disease in Taiwanese patients with Type 2 diabetes Diabet. Med. 21 (7) 724-729; Lehto, S. et al. (1998) Serum uric acid is a strong predictor of stroke in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus Stroke 29: 635-639.

[0014] Níveis elevados de ácido úrico são uma característica que define a Síndrome de Lesch-Nyhan. Pessoas com apnéia do sono ou distúrbios respiratórios do sono também têm ácido úrico elevado (Saito, H. et al., Tissue hypoxia in sleep apnea syndrome assessed by uric acid and adenosine. Chest 122: 1686-1694, 2002; Verhulst, S.L., et al., Sleep-disordered breathing and uric acid in overweight and obese children and adolescents. Chest 132: 76-80, 2007)

[0015] Ácido úrico elevado está associado com pré-eclâmpsia (Bainbridge, S.A. and Roberts, J.M., Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. Placenta Dec. 17 2007 epub ahead of print).

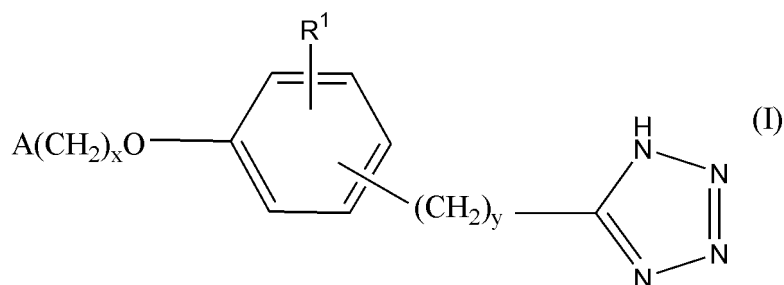
[0016] "O ácido úrico é um dos principais contribuintes da resposta inflamatória provocada por *P. falciparum* em células mononucleares de sangue humano periférico. A reação inflamatória induzida pelo *P. falciparum*

parum é considerada uma das principais causas de patogenia da malária. " PLoS ONE 2009; 4 (4): e5194. Epub 2009 Apr 17.

[0017] Há uma necessidade médica significativa de novas medicações que podem seguramente, convenientemente e eficazmente tratar e prevenir distúrbios relacionados com a elevação de ácido úrico no sangue, independentemente de tais doenças serem devido à cristalização de ácido úrico ou a efeitos de níveis supranormais (seja por um indivíduo ou um padrão de base populacional) de ácido úrico solúvel.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0018] Esta invenção provê um composto representado pela fórmula I.



[0019] Na fórmula I, x é 1 ou 2; y é 0, 1, 2 ou 3, R1 é selecionado do grupo composto de hidrogênio, alquila com 1 ou 2 átomos de carbono, hidróxi, alcóxi tendo 1 ou 2 átomos de carbono, flúor, cloro, bromo, e amino. A é fenila, insubstituído ou substituído por um, dois ou três grupos selecionados do grupo consistindo em halo, alquila com 1 ou 2 átomos de carbono, e perfluorometil, alcóxi tendo 1 ou 2 átomos de carbono, e perfluorometóxi, ou cicloalquila tendo de 3 a 6 átomos de anel onde a cicloalquila é não substituída ou um ou dois carbonos de anel são independentemente mono-substituídos por metila ou etila, ou um anel heteroaromático, de 5 ou 6 elementos, tendo 1 ou 2 heteroátomos selecionados de N, S e O e o anel heteroaromático é covalentemente ligado ao restante do composto por um anel de carbono.

[0020] Esta invenção fornece um método de reduzir a concentração de ácido úrico no sangue, ou aumentar a excreção de ácido úrico,

de um mamífero, compreendendo a administração ao sujeito de composto desta invenção em uma quantidade eficaz para reduzir a concentração de ácido úrico no sangue, ou aumentar a excreção de ácido úrico do sujeito. Esta invenção provê um composto da presente invenção para uso na redução da concentração de ácido úrico no sangue, ou aumento da excreção de ácido úrico de um mamífero. Esta invenção provê a utilização de um composto desta invenção na fabricação de um medicamento para reduzir a concentração de ácido úrico no sangue, ou aumentar a excreção de ácido úrico de um mamífero. Esta invenção provê uma composição farmacêutica para uso na redução da concentração de ácido úrico no sangue, ou aumento da excreção de ácido úrico de um mamífero compreendendo um composto desta invenção em uma quantidade eficaz para reduzir a concentração de ácido úrico no sangue, ou aumentar a excreção de ácido úrico de um sujeito. Esta invenção fornece um kit composto por uma ou mais doses unitárias orais de um composto desta invenção, e instruções para administrar o composto para reduzir a concentração de ácido úrico no sangue, ou aumentar a excreção de ácido úrico de um mamífero.

[0021] Reduzir o ácido úrico como aqui descrito pode ser usado para tratar ou prevenir uma variedade de condições, incluindo a gota (qualquer uma ou todas de: gota assintomática, artrite gotosa aguda, gota intercrítica e gota tofosa crônica), hiperuricemia, níveis elevados de ácido úrico que não cumprem os níveis que habitualmente justificam um diagnóstico de hiperuricemia, disfunção renal, pedras nos rins, doenças cardiovasculares, o risco de desenvolver doenças cardiovasculares e outras consequências da hiperuricemia, déficit cognitivo, início precoce de hipertensão essencial, e inflamação induzida por *Plasmodium falciparum*.

[0022] Esta invenção é baseada na observação de que os compostos da presente invenção inibiram URAT1 *in vitro*, como mostrado

no exemplo 7. A inibição de URAT1 é um modelo estabelecido *in vitro* para a redução do ácido úrico *in vivo*.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0023] Figura 1: Efeitos Inibidores Dependentes da Concentração do Composto EB, na absorção de ^{14}C -urato em Células hURAT1-HEK

[0024] Figura 2: Efeitos Inibidores Dependentes da Concentração do Composto EB, na absorção de ^4C -urato em Células hURAT1-HEK

[0025] Figura 3: Concentração do Composto EB em plasma de camundongo

[0026] Figura 4: Curva de calibragem do Composto EB em plasma de rato, LC-MS

[0027] Figura 5: Concentração do Composto EB em plasma de rato

[0028] Figura 6: Curva de calibragem de Composto EC em plasma de rato, LC-MS

[0029] Figura 7: Concentração do Composto EC em plasma de rato

[0030] Figura 8: Curva de calibragem de Composto EG em plasma de rato, LC-MS

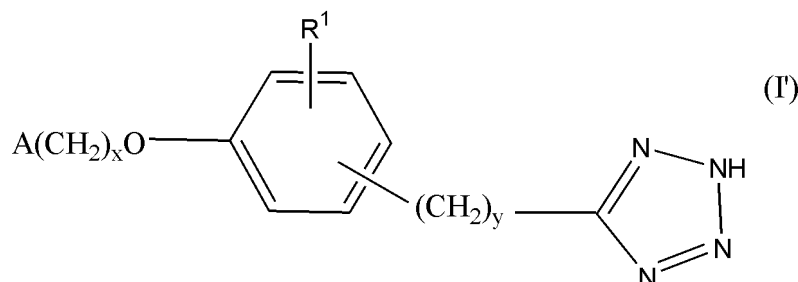
[0031] Figura 9: Concentração do Composto EG em plasma de rato

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

DEFINIÇÕES

[0032] Uma porção 1*H*-tetrazolil-5-il e a porção de 2*H*-tetrazolil-5-il correspondente podem existir como tautômeros. Neste documento, os compostos são denominados e as fórmulas estruturais são escritas com referência a 1*H*-tautômero. Todas tais referências devem ser entendidas como incluindo ambas as formas tautoméricas. Assim, por exemplo, "5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi) fenil)-1*H*-tetrazol" inclui ambos 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)fenil)-1*H*-tetrazol e 5-(3-(2,6-Dimetilbenziló-

xi)fenil)-2*H*-tetrazol. E a fórmula I inclui tanto a fórmula I como descrito acima e sua forma tautomérica 2*H*-tetrazolil-5-il representada na fórmula I' abaixo.



[0033] Conforme utilizado aqui o termo "alquila" designa um grupo alquila linear ou de cadeia ramificada. Um grupo alquila identificado como tendo um certo número de átomos de carbono significa qualquer grupo alquila tendo o número especificado de carbonos. Por exemplo, uma alquila tendo três átomos de carbono pode ser propila ou isopropila e uma alquila tendo quatro átomos de carbono pode ser n-butila, 1-metilpropila, 2-metilpropila ou t-butila.

[0034] Conforme utilizado aqui o termo "halo" refere-se a um ou mais de flúor, cloro bromo e iodo.

[0035] Conforme utilizado aqui o termo "perfluoro" como em perfluorometila ou perfluorometoxi, significa que o grupo em questão tem átomos de flúor no lugar de todos os átomos de hidrogênio.

[0036] Certos compostos químicos são aqui referidos pelo seu nome químico ou pelo código de duas letras mostrado abaixo. Compostos EB até EI e compostos BD estão incluídos no escopo da fórmula I acima.

- EB 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)fenil)-1*H*-tetrazol
- EC 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)benzil)-1*H*-tetrazol
- ED 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metoxibenzil)-1*H*-tetrazol
- EF 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)fenetil)-1*H*-tetrazol
- EG 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metilbenzil)-1*H*-tetrazol
- BD 5-(4-(2,6-Difluorobenzilóxi)benzil)-1*H*-tetrazol
- EH 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilbenzil)-1*H*-tetrazol

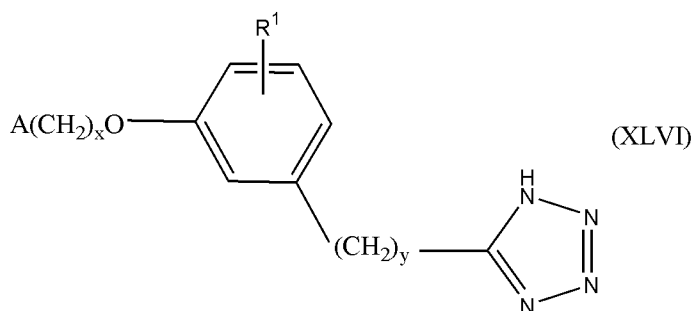
El 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metoxibenzil)-1*H*-tetrazol

[0037] Conforme utilizado aqui o termo transiconal "compreendendo" está em aberto. Uma reivindicação que utilize este termo pode conter elementos para além dos citados em tal reivindicação.

[0038] Como usado nas reivindicações a palavra "ou" significa "e/ou" a menos que tal leitura não faça sentido no contexto. Assim, por exemplo, a frase "redução da concentração de ácido úrico no sangue ou aumento da excreção de ácido úrico de um mamífero" é equivalente a "reduzir a concentração de ácido úrico no sangue e/ou aumentar a excreção de ácido úrico de mamíferos.

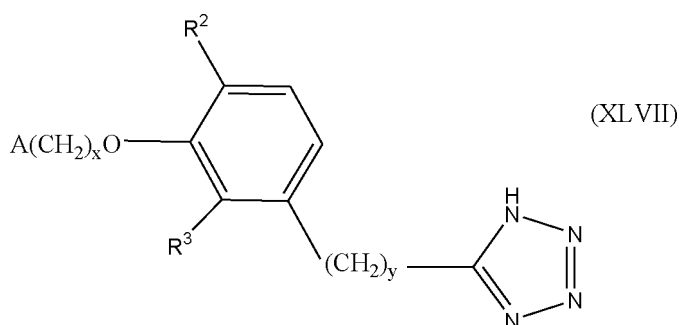
COMPOSTOS DA INVENÇÃO

[0039] Em uma modalidade do composto, método, uso ou composição farmacêutica descritos no resumo acima, o composto é representado pela fórmula XLVI.



[0040] em que x , y , R^1 e A são como descrito acima para a fórmula I.

[0041] Em uma outra modalidade desta invenção o composto é representado pela fórmula XLVII

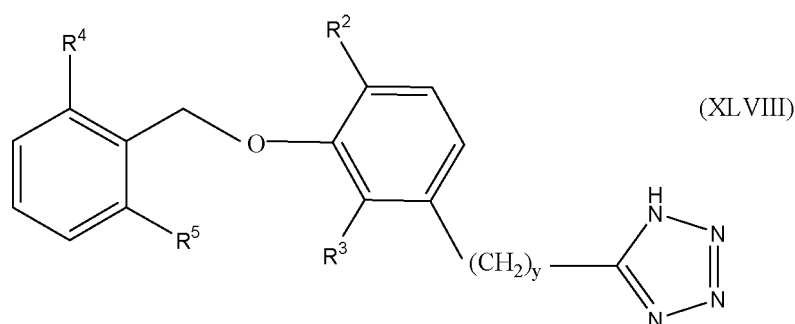


[0042] em que x , y , e A são como descrito acima para a fórmula I, e um de R^2 e R^3 é hidrogênio e o outro é selecionado do grupo com-

posto de hidrogênio, alquila com 1 ou 2 átomos de carbono, hidróxi, alcóxi tendo 1 ou 2 átomos de carbono, flúor, cloro, bromo, e amino.

[0043] Em uma modalidade desta invenção, na fórmula I, XLVI e XLVII, x é 1. Em outra modalidade, A é fenila, insubstituída ou substituída por um, dois ou três grupos selecionados do grupo consistindo em halo, alquila com 1 ou 2 átomos de carbono, perfluorometila, alcóxi tendo 1 ou 2 átomos de carbono, e perfluorometóxi. Em uma modalidade mais específica, A é 2,6-dimetilfenila ou 2,6-difluorofenila. Preferivelmente, A é 2,6-dimetilfenila.

[0044] Em uma modalidade desta invenção o composto é representado pela fórmula XLVIII



[0045] em que y é 0, 1, 2 ou 3, um de R^2 e R^3 é hidrogênio e o outro é selecionado do grupo composto de hidrogênio, alquila com 1 ou 2 átomos de carbono, hidróxi, alcóxi tendo 1 ou 2 átomos de carbono, flúor, cloro, bromo, e amino, e R^4 e R^5 são independentemente selecionados do grupo consistindo em metila, fluor, e cloro.

[0046] Em uma modalidade desta invenção, na fórmula I, XLVI, XLVII e XLVIII, y é 0, 1 ou 2. Em uma modalidade desta invenção, na fórmula XLVII e XLVIII, R^3 é hidrogênio e R^2 é selecionado do grupo composto de hidrogênio, alquila com 1 ou 2 átomos de carbono, hidróxi, alcóxi tendo 1 ou 2 átomos de carbono, flúor, cloro, bromo e amino. Em uma modalidade mais específica R^3 é hidrogênio e R^2 é selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, metila e metóxi. Em uma modalidade diferente dessa invenção, na fórmula XLVII e XLVIII, R^2 é hidrogênio e R^3 é selecionado do grupo que consiste em, alquila com 1

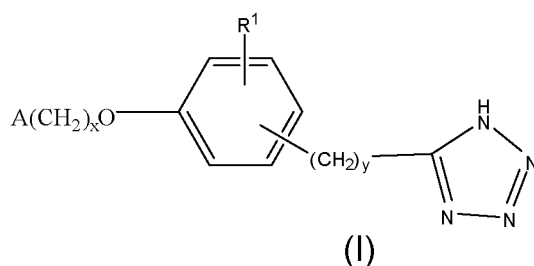
ou 2 átomos de carbono, hidróxi, alcóxi tendo 1 ou 2 átomos de carbono, flúor, cloro, bromo e amino. Em uma modalidade mais específica R^2 é hidrogênio e R^3 é selecionado do grupo consistindo em metila e metóxi. Em uma modalidade adicional da fórmula XLVIII, tanto R^4 e R^5 são metila ou ambos são flúor. De preferência, ambos são metila.

[0047] Em modalidades específicas da presente invenção o composto é selecionado do grupo constituído por: 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)Fenil)-1*H*-tetrazol, 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)benzil)-1*H*-tetrazol, 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metoxibenzil)-1*H*-tetrazol, 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)fenetil)-1*H*-tetrazol, 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4 metilbenzil)-1*H*-tetrazol, 5-(4-(2,6-Difluorobenzilóxi) benzil)-1*H*-tetrazol, 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilbenzil)-1*H*-tetrazol e 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metoxibenzil)-1*H*-tetrazol.

[0048] Em uma modalidade do composto desta invenção, o composto está substancialmente (pelo menos 98%) na forma pura.

ESQUEMAS DE REAÇÃO

[0049] O composto da fórmula I onde x é 1 ou 2, y é 0 a 3, R^1 é hidrogenio, flúor, bromo, cloro, alcóxi tendo de 1 a 2 átomos de carbono ou alquila tendo de 1 a 2 átomos de carbono, ou seja, compostos da fórmula:



[0050] em que A é descrito como acima, pode ser preparado através da reação do esquema 1. Na reação do esquema 1, A, x, y, e R^1 são como acima. L é um grupo lábil.

[0051] O composto de fórmula II pode ser convertido para o composto de fórmula V através da reação da etapa (a) usando condensação Mitsunobu de II com III utilizando trifenilfosfina e dietil azodicarbo-

xilato ou azodicarboxilato diisopropílico. A reação é realizada em um solvente adequado, por exemplo, tetra-hidrofurano. Qualquer uma das condições convencionalmente utilizadas em reações Mitsunobu pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (a).

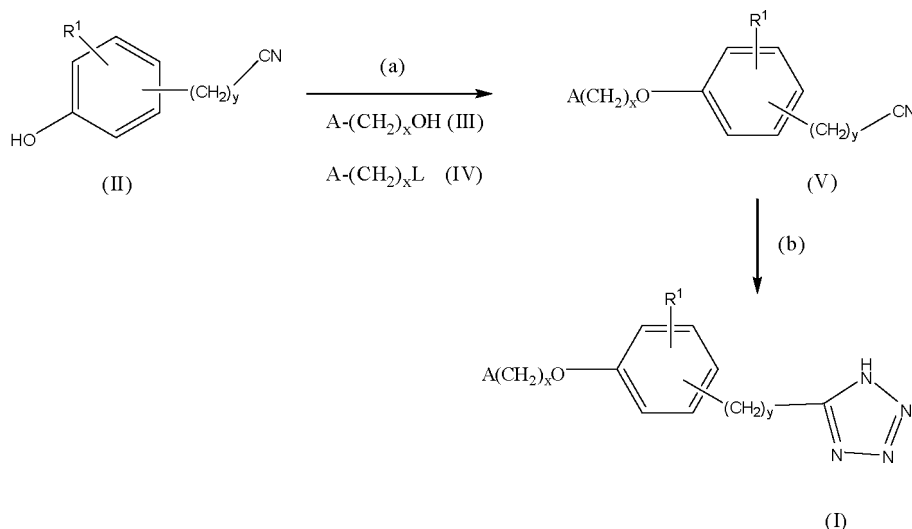
[0052] O composto da fórmula V também pode ser preparado por esterificação ou alquilando o composto da fórmula II, com o composto da fórmula IV, como na reação da etapa (a) usando base adequada, por exemplo, carbonato de potássio, trietilamina, piridina e similares. A reação é realizada em solventes apróticos, por exemplo, N, N-dimetilformamida, acetonitrila, diclorometano e similares. No composto de fórmula IV, L, inclui, mas não está limitado a mesilóxi, tosilóxi, cloro, bromo, iodo, e similares. Qualquer método convencional de esterificação de um grupo hidroxila por reação com um haleto ou grupo lábil pode ser utilizado para realizar a reação da etapa (a).

[0053] O composto da fórmula V pode ser convertido para o composto de fórmula I por meio da reação da etapa (b) reagindo a nitrila com uma azida, por exemplo, trimetilsilil azida ou com azida metálica por exemplo azida de sódio, azida de potássio, azida de lítio, sendo preferida a azida de sódio na presença de ácido de Lewis, por exemplo, cloreto de zinco, cloreto de magnésio, cloreto de alumínio, tetracloreto de estanho e similares. A reação é realizada em um solvente, por exemplo, N, N-dimetilformamida a uma temperatura variando de 80° C a 145° C por 6 a 60 horas. A reação ideal utiliza nitrila reagindo com azida de sódio/cloreto de amônio/N, N-dimetilformamida a 120° C por 24 horas. Os produtos podem ser isolados e purificados através de técnicas como extração, evaporação, cromatografia e recristalização.

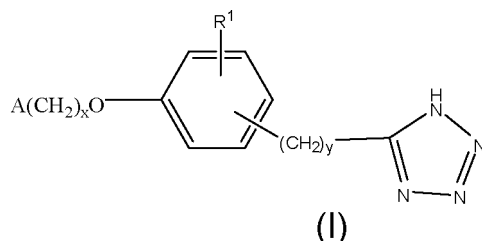
[0054] Se A é fenila substituída por 1 ou 2 grupos de hidroxilas, é geralmente preferido proteger os grupos hidroxila. O grupo de proteção adequado pode ser descrito em "Protective Groups in Organic

Synthesis by T. Greene". O grupo de proteção pode ser desprotegido após a reação da etapa (b) utilizando reagentes de desproteção adequados tais como aqueles descritos em "Protective Groups in Organic Synthesis por T. Greene".

Esquema de reação I



[0055] O composto da fórmula I onde x é 1 ou 2, y é 0 a 3, R^1 é hidroxila, ou seja, compostos da fórmula:

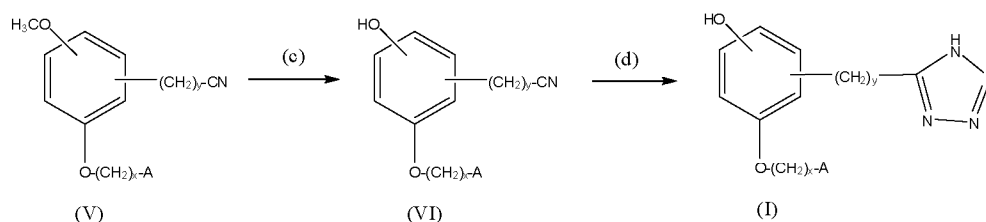


[0056] em que A é descrito como acima, pode ser preparado através da reação do esquema 2. Na reação do esquema 2, A , x , e y são como acima.

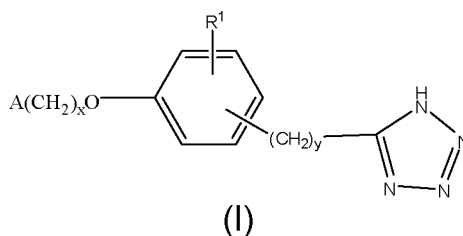
[0057] O composto da fórmula V pode ser convertido para o composto de fórmula VI através da reação da etapa (c) por tratamento do composto da fórmula V com tribrometo de boro ou tricloreto de boro usando um solvente, por exemplo, diclorometano, por 4 a 48 horas, a temperatura variando entre -72°C a 0°C . Qualquer uma das condições convencionais em tais reações de desmetilação podem ser utilizadas para realizar a reação da etapa (c).

[0058] O composto de fórmula IV pode ser convertido para o composto de fórmula I, onde R^1 é hidroxila através da reação da etapa (d) da mesma forma como acima descrito na reação da etapa (b). Os produtos podem ser isolados e purificados por meio de técnicas como extração, evaporação, cromatografia e recristalização.

Esquema de reação 2



[0059] O composto da fórmula I onde x é 1 ou 2, y é 0 a 3, R^1 é amino, ou seja, compostos da fórmula:

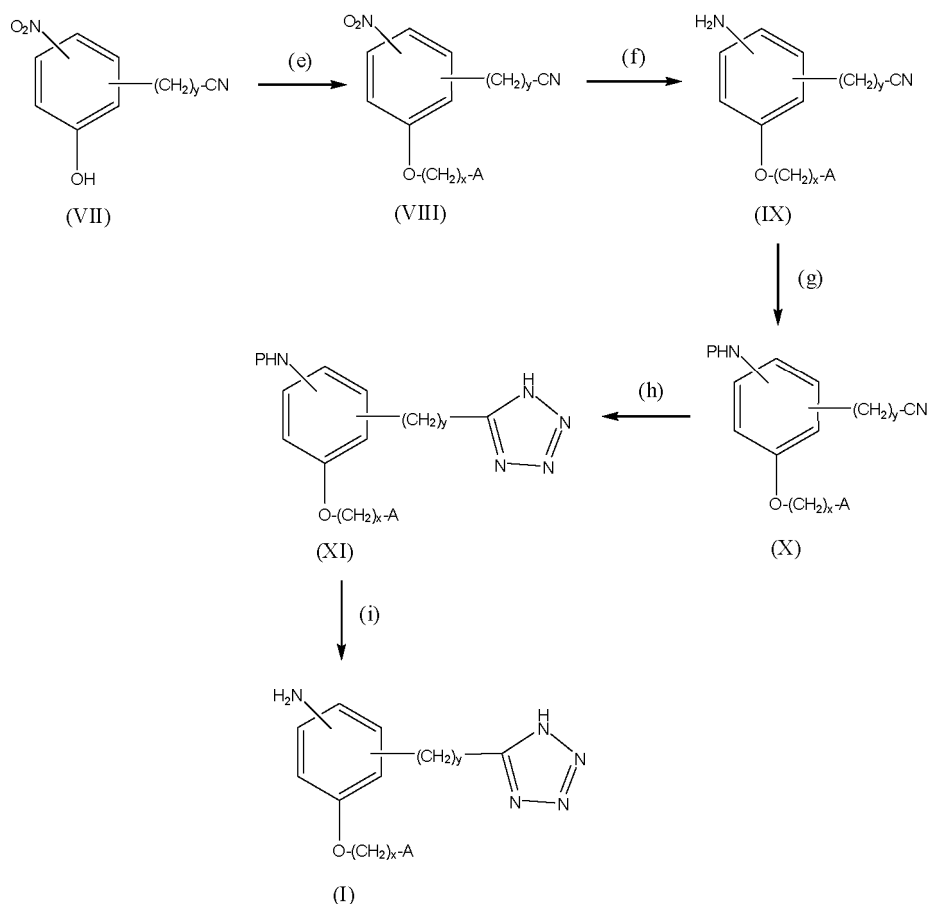


[0060] em que A é descrito como acima, pode ser preparado através da reação do esquema 3. Na reação do esquema 3, A, x , e y são como acima. P é um grupo de proteção.

[0061] O composto de fórmula VII pode ser convertido para o composto de fórmula VIII através da reação da etapa (e) da mesma forma como acima descrito na reação da etapa (a). O composto de VIII pode ser convertido para o composto de fórmula IX através da reação da etapa (f), pela redução do grupo nitro para amino. Os agentes redutores podem ser metais, por exemplo, Zn, Sn, ou Fe e similares e ácido. O grupo nitro também pode ser reduzido por hidrogenação catalítica para dar aminas. O método preferido de redução é a hidrogenação catalítica. Qualquer uma das condições convencionais em tais reações de redução pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (f).

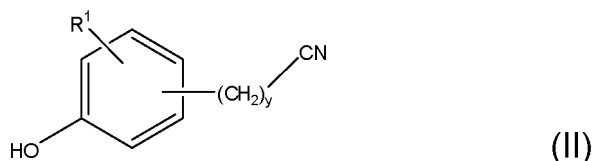
[0062] O composto de fórmula IX pode ser convertido para o composto de fórmula X através da reação da etapa (g), protegendo o grupo amino. O grupo de proteção adequado pode estar descrito em "Protective Groups in Organic Synthesis, por T. Greene". O composto da fórmula X pode ser convertido para o composto de fórmula XI através da reação da etapa (h) da mesma forma como acima descrito na reação da etapa (b). O composto de fórmula XI pode ser convertido para o composto de fórmula I, onde R¹ é amino através da reação da etapa (i) desprotegendo o grupo amino de proteção. Os reagentes adequados de desproteção podem estar descritos em "Protective Groups in Organic Synthesis, por T. Greene". Os produtos podem ser isolados e purificados através de técnicas tais como extração, evaporação, cromatografia e recristalização.

Esquema de reação 3

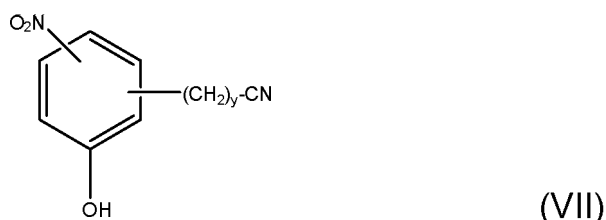


[0063] O composto da fórmula II onde y é 1 a 3, R¹ é hidrogênio,

flúor, bromo, cloro, alcóxi tendo de 1 a 2 átomos de carbono ou alquila tendo de 1 a 2 átomos de carbono, ou seja, compostos da fórmula:



[0064] e o composto da fórmula VII onde y é 1 a 3, ou seja, compostos da fórmula:



[0065] pode ser preparado através da reação do esquema 4. Na reação do esquema 4, R³ é hidrogênio, flúor, bromo, cloro, nitro, alcóxi tendo 1 a 2 átomos de carbono ou alquila com 1 a 2 átomos de carbono. P é um grupo hidróxi protetor. R² é um grupo alquila tendo 1 a 2 átomos de carbono. Y é um haleto.

[0066] O composto de fórmula XII pode ser convertido para o composto de fórmula XIII através da reação da etapa (j), em primeiro lugar protegendo os grupos carboxílicos e hidróxi, utilizando grupos de proteção adequados, tais como aqueles descritos em "Protective Groups in Organic Synthesis, por T. Greene".

[0067] O composto de fórmula XIII pode ser reduzido para o composto de fórmula XIV, onde R³ é hidrogênio, flúor, bromo, cloro, alcóxi tendo 1 a 2 átomos de carbono ou alquila tendo de 1 a 2 átomos de carbono utilizando reagente de redução convencional que converte grupo éster para um álcool através da reação da etapa (k). Para a realização desta reação é geralmente preferível, mas não limitado a, utilizar hidreto de alumínio lítio. A reação é realizada em um solvente adequado, como tetra-hidrofurano e similares. Qualquer uma das condições convencionais em tais reações de redução pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (k).

[0068] O composto de fórmula XIII pode ser reduzido para o composto de fórmula XIV, onde R^3 é nitro, utilizando reagente de redução que converte éster para um álcool, mas não reduz grupo nitro, por exemplo, BH_3 -THF, $NaBH_4$ - $AlCl_3$ e similares. Qualquer uma das condições convencionais em tais reações de redução pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (k). O composto da fórmula XIV pode ser convertido para o composto da fórmula XV deslocando o grupo hidróxi com um halogênio, sendo o halogênio preferível bromo ou cloro. Reagentes apropriados de halogenação incluem, mas não estão limitados a, cloreto de tionila, cloreto oxalila, bromo, tribrometo de fósforo, tetrabrometo de carbono e similares. Qualquer uma das condições convencionais em tais reações de halogenação pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (l).

[0069] O composto da XV fórmula pode ser convertido para o composto da fórmula XVI reagindo XV com um metal alcalino de cianeto, por exemplo, cianeto de de sódio ou de potássio, ou cianeto de cobre. A reação pode ser realizada em um solvente adequado, por exemplo, de dimetil sulfóxido, N, N-dimetilformamida e similares. Qualquer uma das condições convencionalmente utilizadas na preparação de nitrilas a partir de haletos pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (m).

[0070] O composto da fórmula XVI pode ser convertido para o composto da fórmula XVII por meio da reação da etapa (n) pela remoção do grupo de proteção hidroxila utilizando os reagentes adequados de desproteção tais como aqueles descritos em "Protective Groups in Organic Synthesis, por T. Greene". O composto de fórmula XVII é o composto de fórmula II onde y é 1 e R^1 é hidrogênio, flúor, bromo, cloro, alcóxi tendo de 1 a 2 átomos de carbono ou alquila tendo de 1 a 2 átomos de carbono. O composto de fórmula XVII é também o composto de fórmula VII onde y é 1 e R^3 é nitro. O composto de fórmula XVI

pode ser convertido para o composto de fórmula XVIII através etapa de reação (o) por hidrólise ácida ou básica. Para a realização desta reação, é geralmente preferido utilizar a hidrólise básica, por exemplo, hidróxido de sódio aquoso em etanol e similares. Qualquer uma das condições convencionais na hidrólise de nitrilas para ácidos carboxílicos pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (o).

[0071] O composto de fórmula XVIII pode ser reduzido para dar o composto de fórmula XIX através de reação da etapa (p). Essa reação pode ser realizada da mesma maneira como descrito antes na reação da etapa (k). O composto da fórmula XIX pode ser convertido para o composto da fórmula XX por meio da reação da etapa (q) da mesma maneira como descrito antes aqui na reação da etapa (l). O composto da fórmula XX pode ser convertido para o composto da fórmula XXI por meio da reação da etapa (r) da mesma forma como acima descrito na reação da etapa (m). O composto da fórmula XXI pode ser convertido para o composto de fórmula XXII através da reação da etapa (s) da mesma forma como acima descrito na reação da etapa (n).

[0072] O composto da fórmula XXII é o composto de fórmula II onde y é 2 e R¹ é hidrogênio, flúor, bromo, cloro, alcóxi tendo de 1 a 2 átomos de carbono ou alquila com 1 a 2 átomos de carbono. O composto de fórmula XVII é também composto da fórmula VII onde y é 2 e R³ é nitro.

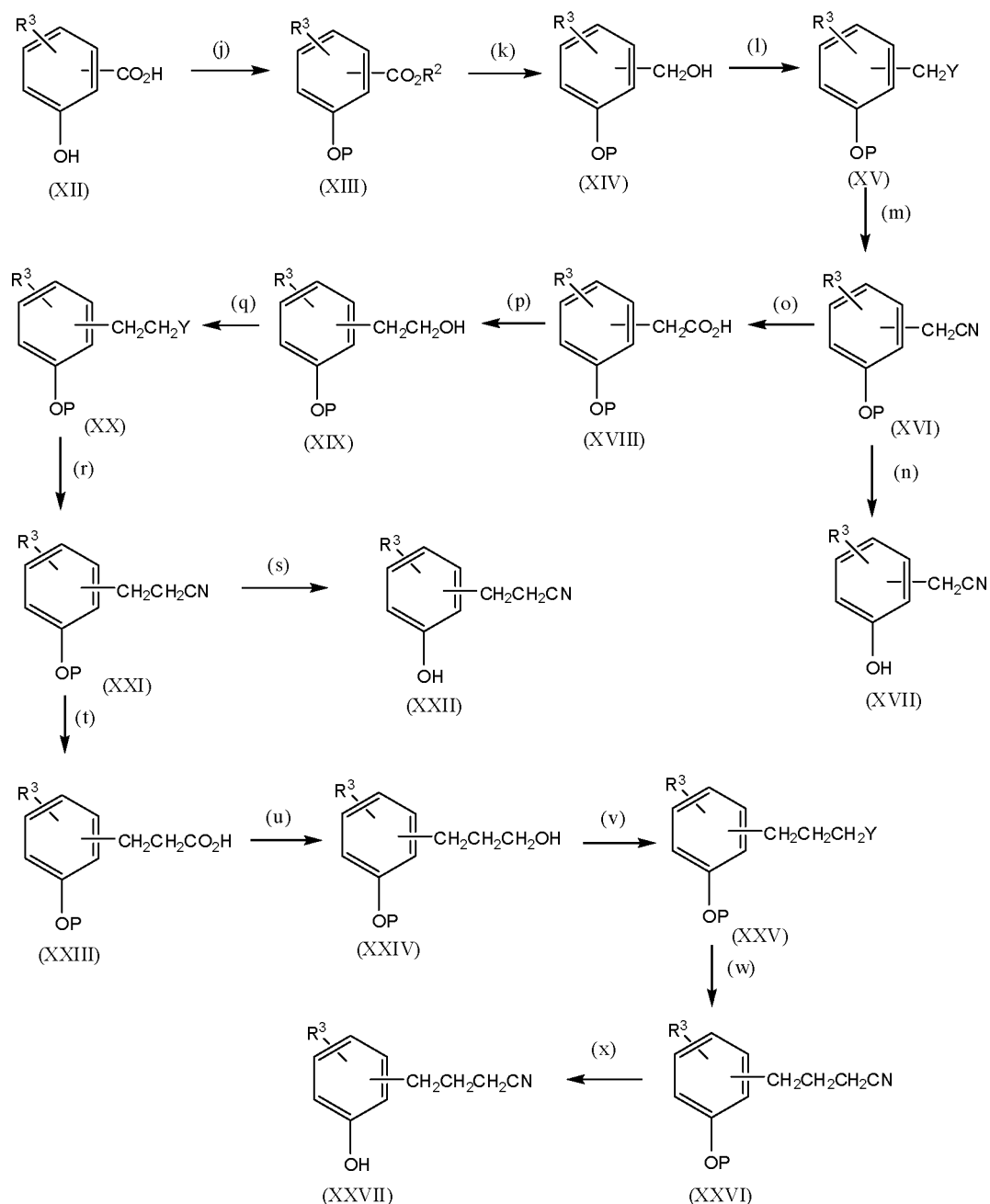
[0073] O composto de fórmula XXI pode ser hidrolisado da mesma forma como acima descrito na reação da etapa (o) para dar o composto de fórmula XXIII por meio da reação da etapa (t).

[0074] O composto da fórmula XXIII pode ser reduzido para dar o composto de fórmula XXIV por meio da reação da etapa (u). Essa reação pode ser realizada da mesma maneira como descrito antes na reação da etapa (k). O composto da fórmula XXIV pode ser convertido para o composto da fórmula XXV por meio da reação da etapa (v) da

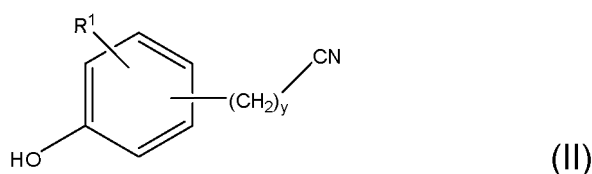
mesma forma como acima descrito na reação da etapa (l). O composto da fórmula XXV pode ser convertido para o composto de fórmula XXVI por meio da reação da etapa (w) da mesma forma como acima descrito na reação da etapa (m). O composto de fórmula XXVI pode ser convertido para o composto de fórmula XXVII por meio da reação da etapa (x) da mesma forma como acima descrito na reação da etapa (n). O composto de fórmula XXVII é o composto de fórmula II onde y é 3 e R¹ é hidrogênio, flúor, bromo, cloro, alcóxi tendo de 1 a 2 átomos de carbono ou alquila com 1 a 2 átomos de carbono. O composto de fórmula XXVII é também o composto de fórmula VII onde y é 3 e R³ é nitro.

[0075] Os produtos podem ser isolados e purificados através de técnicas como extração, evaporação, cromatografia e recristalização.

Esquema de reação 4

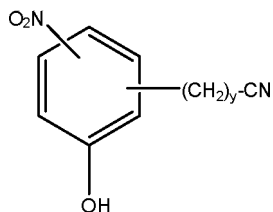


[0076] O composto de fórmula II onde y é 0, R¹ é hidrogênio, flúor, bromo, cloro, alcóxi tendo 1 a 2 átomos de carbono ou alquila com 1 a 2 átomos de carbono, ou seja, compostos da seguinte fórmula:



[0077] e o composto da fórmula VII onde y é 0, ou seja, compostos

da fórmula:



(VII)

[0078] podem ser preparados através de reação do esquema 5. Na reação do esquema 5, R^3 é hidrogênio, nitro, flúor, bromo, cloro, alcóxi tendo 1 a 2 átomos de carbono ou alquila tendo de 1 a 2 átomos de carbono. P é um grupo hidróxi protetor. R^2 é um grupo alquila tendo de 1 a 2 átomos de carbono. R^4 é H, cloro ou bromo.

[0079] O composto de fórmula XXVIII pode ser convertido para o composto de fórmula XXIX por meio da reação da etapa (y), em primeiro lugar protegendo o grupo hidróxi, utilizando grupos de proteção adequados, tais como aqueles descritos em "Protective Groups in Organic Synthesis, por T. Greene" e em seguida por hidrólise de ésteres para dar o composto de fórmula, onde XXIX onde R^4 é H.

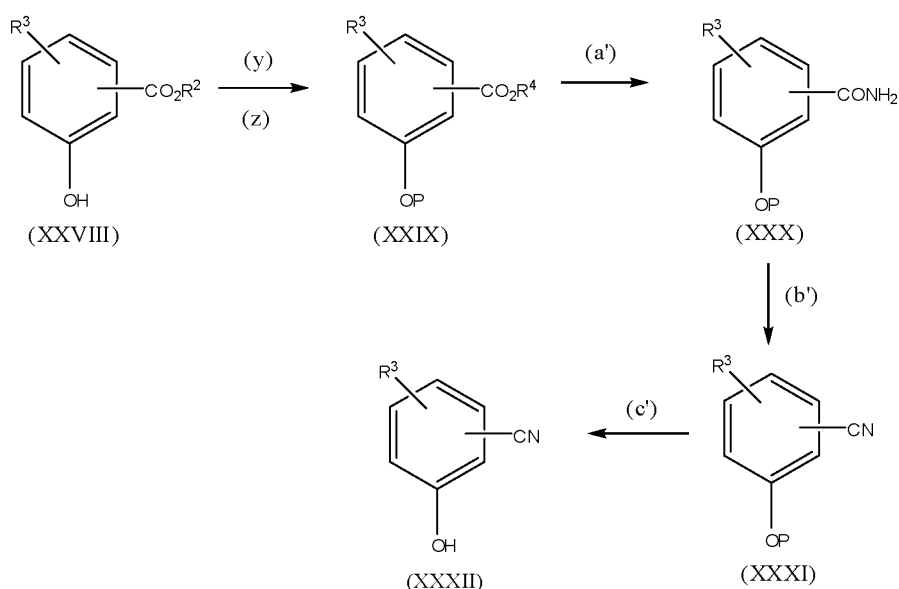
[0080] O composto de fórmula XXVIII pode ser convertido para o composto de fórmula XXIX, onde R^4 é cloro ou bromo reagindo o composto da fórmula a partir da etapa (y) com reagente de halogenação, por exemplo, cloreto de tionila, pentacloreto de fósforo, tricloreto de fósforo, bromo, tetrabrometo de carbono e similares. Qualquer uma das condições convencionais em tais reações de halogenação de ácidos carboxílicos pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (z).

[0081] O composto de fórmula XXIX pode ser convertido para o composto de fórmula XXX por meio da reação de (a') reagindo com a amônia diretamente ou por primeiro tratando o composto de fórmula XXIX com o reagente de acoplamento, por exemplo, diciclohexilcarbodiimida, benzotriazolyloxy) tris (dimetilamino) hexafluorofosfato fosfônio e, em seguida, reagindo com a amônia e similares. Qualquer uma das condições convencionais de acilação de amônia pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (a'). O composto de fórmula XXX pode

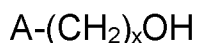
ser convertido para o composto de fórmula XXXI por meio da reação da etapa (b') por desidratação utilizando reagentes, por exemplo, o cloreto de tionila, pentóxido de fósforo, pentacloreto de fósforo, oxicloreto de fósforo, tetracloreto de carbono trifenilfosfina, cloreto cianúrico, e similares. A reação é realizada tanto pura ou em solvente apropriado, por exemplo, N, N-dimetilformamida e similares. Qualquer uma das condições convencionais, em tais reação de desidratação pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (b').

[0082] O composto de fórmula XXXI pode ser convertido para o composto de fórmula XXXII por meio da reação da etapa (c') por remoção de grupos de proteção hidróxi utilizando os reagentes adequados de desproteção tais como aqueles descritos em Protective Groups in Organic Synthesis, por T. Greene. O composto de fórmula XXXII é o composto de fórmula II onde y é 0 e R¹ é hidrogênio, flúor, bromo, cloreto, alcóxi tendo de 1 a 2 átomos de carbono ou alquila com 1 a 2 átomos de carbono. O composto de fórmula XXXII também é o composto de fórmula VII onde y é 0 e R³ é nitro. Os produtos podem ser isolados e purificados através de técnicas como extração, evaporação, cromatografia e recristalização.

Esquema de reação 5



[0083] O composto da fórmula III, onde x é 1 ou 2, ou seja, compostos da fórmula:



[0084] e o composto da fórmula IV, onde x é 1 ou 2, ou seja, compostos da fórmula:



[0085] pode ser preparado através da reação do esquema 6. Na reação do esquema 6, A é descrito como acima, L é um grupo lábil ou haleto. O composto da fórmula XXXIII pode ser reduzido para o composto da fórmula XXXIV através da reação da etapa (d'). A reação é realizada utilizando um agente de redução convencional, por exemplo, hidreto de metal alcalino tal como hidreto de alumínio lítio. A reação é realizada em um solvente adequado, tal como tetra-hidrofurano. Qualquer uma das condições convencionais em tais reações de redução pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (d').

[0086] O composto da fórmula XXXIV é o composto da fórmula III onde x é 1.

[0087] O composto da fórmula XXXIV pode ser convertido para o composto da fórmula XXXV pelo deslocamento do grupo hidroxila com um grupo lábil ou haleto, sendo preferido o grupo bromo ou cloro. Reagentes apropriados para halogenação incluem, mas não estão limitados a, cloreto de tionila, cloreto de oxalila, bromo, tribrometo de fósforo, tetrabrometo de carbono e similares. Os grupos lábeis incluem tosilato, mesilato e similares. Quaisquer condições convencionais em tais reações podem ser utilizadas para realizar a reação da etapa (e'). O composto da fórmula XXXV é o composto da fórmula IV onde x é 1.

[0088] O composto da fórmula XXXV pode ser convertido para o composto de fórmula XXXVI reagindo XXXV com um cianeto de metal alcalino, por exemplo, cianeto de sódio ou de potássio. A reação é realizada em solvente apropriado, como o etanol, dimetilsulfóxido, N, N-

dimetilformamida e similares. Qualquer uma das condições convencionalmente utilizadas na preparação de nitrilas pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (f').

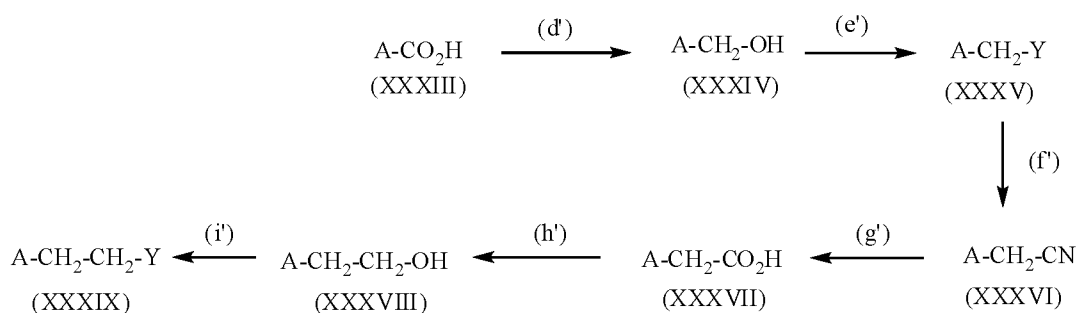
[0089] O composto de fórmula XXXVI pode ser convertido para o composto de fórmula XXXVII através da reação da etapa (g') por hidrólise ácida ou base. Para a realização desta reação é geralmente preferível utilizar a hidrólise básica, por exemplo, hidróxido de sódio aquoso. Qualquer uma das condições convencionalmente utilizadas na hidrólise da nitrila pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (g').

[0090] O composto de fórmula XXXVII pode ser reduzido para dar ao composto de fórmula XXXVIII via a reação da etapa (h'). Essa reação pode ser realizada da mesma maneira como descrito anteriormente aqui na reação da etapa (d'). O composto de fórmula XXXVIII é o composto de fórmula III onde x é 2.

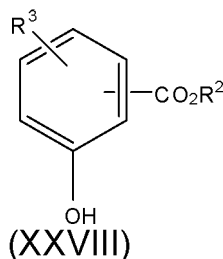
[0091] O composto de fórmula XXXVIII pode ser convertido para o composto de fórmula XXXIX através da reação da etapa (i) da mesma forma como acima descrito na reação da etapa (e'). O composto de fórmula XXXIX é o composto de fórmula IV, onde x é 2.

[0092] Os produtos podem ser isolados e purificados através de técnicas como extração, evaporação, cromatografia e recristalização. Se A é fenila substituída por 1 ou 2 grupos de hidroxila, é geralmente preferido proteger o grupo hidroxila do composto de fórmula XXXIII. O grupo de proteção adequado pode ser descrito em "Protective Groups in Organic Synthesis, por T. Greene".

Esquema de reação 6



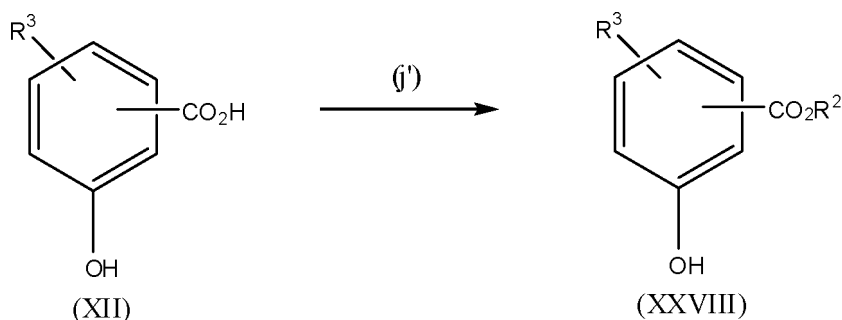
[0093] O composto da fórmula XXVIII, onde R^3 é hidrogênio, nitro, flúor, bromo, cloro, alcóxi tendo 1 a 2 átomos de carbono ou alquila com 1 a 2 átomos de carbono, R^2 é um grupo alquila tendo 1 a 2 átomos de carbono, ou seja, compostos da seguinte fórmula:



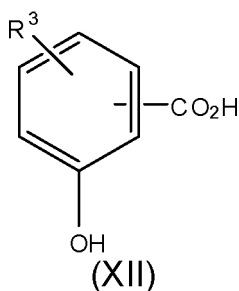
[0094] pode ser preparado através da reação do esquema 7. Na reação do esquema 7, R^2 e R^3 são como acima.

[0095] O composto de fórmula XII pode ser convertido para o composto de fórmula XXVIII através da reação da etapa (j') por esterificação de compostos de fórmula XII com metanol ou etanol. A reação pode ser realizada utilizando-se catalisadores, por exemplo, H_2SO_4 , TsOH e similares ou através de agente de desidratação, por exemplo, diciclohexilcarbodiimida e similares. Qualquer uma das condições convencionais em tais reações de esterificação pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (j'). O produto pode ser isolado e purificado através de técnicas como extração, evaporação, cromatografia e recristalização.

Esquema de reação 7



[0096] O composto da fórmula XII, onde R^3 é cloro, bromo ou flúor, ou seja, compostos da fórmula:



[0097] ou está comercialmente disponível ou pode ser preparado de acordo com os métodos descritos na literatura como a seguir:

1. 3-Br ou F-2-OHC₆H₃CO₂H

Canadian Journal of Chemistry (2001), 79(11) 1541-1545.

2. 4-Br-2-OHC₆H₃CO₂H

WO 9916747 or JP 04154773.

3. 2-Br-6-OHC₆H₃CO₂H

JP 47039101.

4. 2-Br-3-OHC₆H₃CO₂H

WO 9628423.

5. 4-Br-3-OHC₆H₃CO₂H

WO 2001002388.

6. 3-Br-5-OHC₆H₃CO₂H

Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals (1992), 31 (3), 175-82.

7. 2-Br-5-OHC₆H₃CO₂H and 3-Cl-4-OHC₆H₃CO₂H

WO 9405153 and US 5519133.

8. 2-Br-4-OHC₆H₃CO₂H and 3-Br-4-OHC₆H₃CO₂H

WO 20022018323

9. 2-Cl-6-OHC₆H₃CO₂H

JP 06293700

10. 2-Cl-3-OHC₆H₃CO₂H

Proceedings of the Indiana Academy of Science (1983), Volume date 1982, 92, 145-51.

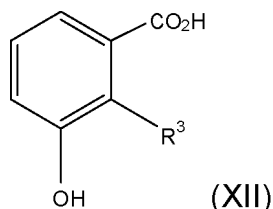
11. 3-Cl-5-OHC₆H₃CO₂H

WO 2002000633 and WO 2002044145.

12. 2-Cl-5-OHC₆H₃CO₂H

WO 9745400.

[0098] O composto da fórmula XII, onde R³ é alcóxi tendo de 1 a 2 átomos de carbono, ou seja, compostos da fórmula:



[0099] pode ser preparado através da reação do esquema 8. Na reação do esquema 8, R² é um grupo alquila tendo de 1 a 2 átomos de carbono. P é um grupo de proteção de hidroxila. O composto de fórmula XL pode ser convertido para o composto da fórmula XLI através da reação da etapa (k'), protegendo o grupo fenol por grupo de proteção adequado. As condições adequadas para o grupo de proteção podem ser descritas em "Protective Groups in Organic Synthesis, por T. Greene".

[00100] O composto de fórmula XLI pode ser convertido para o composto de fórmula XLII por oxidação de aldeídos para ácido carboxílico. A reação pode ser realizada utilizando os reagentes oxidantes apropriados, por exemplo, clorocromato piridínio, permanganato de potássio, permanganato de sódio e similares. Qualquer uma das condições adequadas em tais reações de oxidação pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (l').

[00101] O composto de fórmula XLII pode ser convertido para o composto de fórmula XII através da reação da etapa (m'), onde R³ é alcóxi tendo 1 átomo de carbono para desproteção do grupo de proteção. As condições adequadas de desproteção podem ser descritas em "Protective Groups in Organic Synthesis, por T Greene".

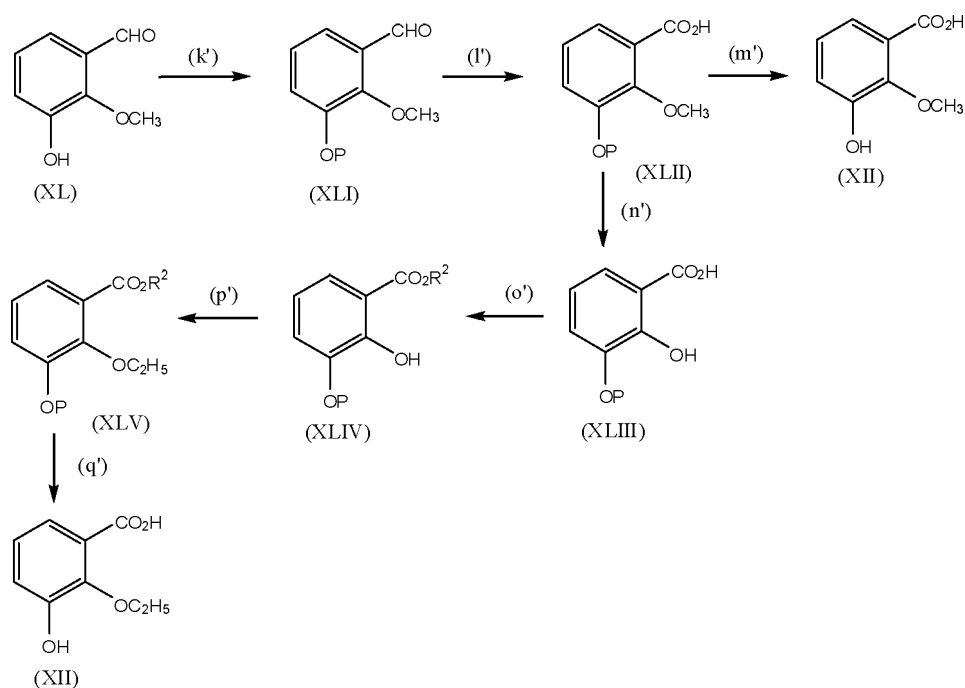
[00102] O composto de fórmula XLII pode ser convertido para o composto de fórmula XLIII pelo tratamento do composto da fórmula

XLII com tribrometo ou tricloreto de boro com solvente, por exemplo, diclorometano por 4 a 48 horas a uma temperatura de -72° C a 0° C. Qualquer uma das condições convencionais em reações de desmetilação pode ser usada para realizar a reação da etapa (n').

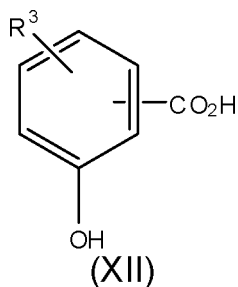
[00103] O composto de fórmula XLIII pode ser convertido para o composto de fórmula XLIV por esterificação de compostos de fórmula XLIII com metanol ou etanol. A reação pode ser realizada utilizando-se catalisadores, por exemplo, H₂SO₄, TsOH e similares ou através de agente de desidratação, por exemplo, dicitclohexilcarbodiimida e similares. Qualquer uma das condições convencionais em tais reações de esterificação pode ser usada para realizar a reação da etapa (o').

[00104] O composto de fórmula XLIV pode ser convertido para o composto de fórmula XLV eterificando ou alquilando o composto de fórmula XLIV com haleto de etila utilizando base adequada, por exemplo, carbonato de potássio, hidreto de sódio, piridina e similares. A reação pode ser realizada em solventes convencionais, tais como o tetra-hidrofurano, N, N-dimetilformamida, diclorometano e similares. A reação é geralmente realizada em temperaturas de 0° C a 40° C. Qualquer uma das condições adequadas em tais reações de alquilação pode ser utilizada para realizar a reação da etapa (p').

[00105] O composto da XLV fórmula pode ser convertido para o composto de fórmula XII através da reação da etapa (q'), onde R³ é alcóxi tendo 2 átomos de carbono por desproteção do grupo de proteção. As condições adequadas de desproteção podem ser descritas em "Protective Groups in Organic Synthesis, por T. Greene". O produto pode ser isolado e purificado através de técnicas como extração, evaporação, cromatografia e recristalização.

Esquema de reação 8

[00106] O composto de fórmula XII onde R^3 é alcóxi tendo de 1 a 2 átomos de carbono, ou seja, compostos da fórmula:



[00107] ou estão comercialmente disponíveis ou podem ser preparados de acordo com os métodos descritos na literatura como a seguir:

1. 2-OMe-4-OHC₆H₃CO₂H

US 2001034343 or WO 9725992.

2. 5-OMe-3-OHC₆H₃CO₂H

J.O.C (2001), 66(23), 7883-88.

3. 2-OMe-5-OHC₆H₃CO₂H

US 6194406 (Page 96) e Journal of the American Chemical Society (1985), 107(8), 2571-3.

4. 3-OEt-5-OHC₆H₃CO₂H

Taiwan Kexue (1996), 49(1), 51-56.

5. 4-OEt-3-OHC₆H₃CO₂H

WO 9626176

6. 2-OEt-4-OHC₆H₃CO₂H

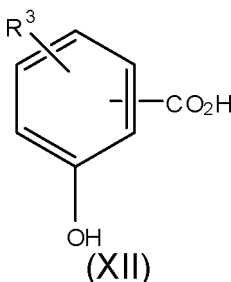
Takeda Kenkyusho Nempo (1965), 24,221-8.

JP 07070025.

7. 3-OEt-4-OHC₆H₃CO₂H

WO 9626176.

[00108] O composto da fórmula XII onde R³ é alquila tendo 1 a 2 átomos de carbono, ou seja, compostos da fórmula:



[00109] ou está comercialmente disponível ou pode ser preparado de acordo com os métodos descritos na literatura como a seguir:

1. 5-Me-3-OHC₆H₃CO₂H e 2-Me-5-OHC₆H₃CO₂H

WO 9619437.

J.O.C. 2001, 66, 7883-88.

2. 2-Me-4-OHC₆H₃CO₂H

WO 8503701.

3. 3-Et-2-OHC₆H₃CO₂H and 5-Et-2-OHC₆H₃CO₂H

J. Med. Chem. (1971), 14(3), 265.

4. 4-Et-2-OHC₆H₃CO₂H

Yaoxue Xuebao (1998), 33(1), 67-71.

5. 2-Et-6-OHC₆H₃CO₂H and 2-n-Pr-6-OHC₆H₃CO₂H

J. Chem. Soc., Perkin Trans 1 (1979), (8), 2069-78.

6. 2-Et-3-OHC₆H₃CO₂H

JP 10087489 and WO 9628423.

7. 4-Et-3-OHC₆H₃CO₂H

J.O.C. 2001, 66, 7883-88.

WO 9504046.

8. 2-Et-5-OHC₆H₃CO₂H

J.A.C.S (1974), 96(7), 2121-9.

9. 2-Et-4-OHC₆H₃CO₂H and 3-Et-4-OHC₆H₃CO₂H

JP 04282345.

10. 1. 3-Et-5-OHC₆H₃CO₂H

Adapt synthesis from J.O.C. 2001, 66, 7883-88 by using 2-Ethylacrolein.

USO EM MÉTODOS DE TRATAMENTO

[00110] Esta invenção fornece um método para reduzir os níveis de ácido úrico em um mamífero ou aumentar a excreção de ácido úrico de um mamífero. O nível de ácido úrico em um mamífero pode ser determinado por meio de qualquer medida convencional. Normalmente o nível de ácido úrico no sangue é determinado. O ácido úrico pode também ser depositado ou precipitado em tecidos, resultando em depósitos (por exemplo, tophi) que podem ser afetados pela elevação ou diminuição da concentração de ácido úrico no sangue, e que por outro lado pode contribuir para a circulação de ácido úrico. O método desta invenção para reduzir o ácido úrico pode ser usado para tratar ou prevenir uma variedade de condições, incluindo gota, hiperuricemia, níveis elevados de ácido úrico que não cumprem os níveis que habitualmente justificam um diagnóstico de hiperuricemia, pedras nos rins, disfunção renal, doença cardiovascular, fator de risco cardiovascular e disfunção cognitiva. Ao reduzir os níveis de ácido úrico, a administração dos compostos da presente invenção retarda a progressão da doença renal. Um nível elevado de ácido úrico tem sido identificado como um fator de risco para doença cardiovascular. Uma correlação significativa foi demonstrada entre o ácido úrico elevado e disfunção cognitiva em adultos mais velhos. (Schretlen, D.J. et al., "Serum Uric Acid

and Cognitive Function in Community-Dwelling Older Adults", *Neuropsychology* (Jan. 2007) 21(1): 136-140). Assim, o método da presente invenção para reduzir o ácido úrico pode ser usado para tratar ou prevenir a disfunção cognitiva, incluindo disfunção cognitiva em adultos idosos. É sabido que as pessoas com Síndrome de Lesch-Nyhan têm níveis elevados de ácido úrico e sofrem as numerosas consequências dessa hiperuricemia, incluindo gota. Assim, essa invenção para reduzir os níveis sanguíneos e aumentar a eliminação de ácido úrico pode ser usada para tratar pessoas com Síndrome de Lesch-Nyhan.

[00111] O intervalo normal de ácido úrico no sangue é entre 3,4 mg/dL e 7,0 mg/dL em homens, entre 2,4 mg/dL e 6,0 mg/dL em mulheres na pré-menopausa, e a partir de 2,5 mg/dL até 5,5 mg/dL em crianças. A formação/precipitação de cristais de urato ocorre geralmente em homens com níveis de 6,6 mg/dL ou superior, e em mulheres com níveis de 6,0 mg/dL ou superior. Isso mostra que os níveis de ácido úrico que estão dentro da chamada faixa normal podem ter consequências indesejáveis à saúde, mesmo produzindo gota. Além disso, o que pode estar na faixa normal para a população como um todo pode ser elevado para o indivíduo. Problemas cardiovasculares e outras consequências de ácido úrico elevado podem ocorrer com os níveis sanguíneos dentro desses intervalos "normais". Portanto, o diagnóstico de hiperuricemia não é necessariamente um pré-requisito para os efeitos benéficos dos compostos da invenção.

[00112] Esta invenção inclui o tratamento de hiperuricemia associada com gota, hipertensão, inflamação vascular, insuficiência cardíaca, doenças artério-venosas, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, pré-eclâmpsia, eclâmpsia, apnéia do sono, disfunção renal (incluindo insuficiência renal, doença renal em fase terminal [ESRD]), transplante de órgãos, diuréticos, tiazidas, ciclosporina, aspirina, vitamina C, ácido nicotínico, levodopa (L-DOPA), fármacos citotóxicos, e alguns

agentes antibacterianos (como pirozinamida), cirrose, disfunção da tireóide, disfunção da paratireóide, câncer de pulmão, anemia, leucemia, linfoma, mieloma múltiplo, síndrome de lise tumoral, disfunções da tireóide ou paratireóide, Síndrome de Lesch-Nyhan, tabagismo, consumo de álcool e psoríase. Esta invenção inclui o tratamento de hiperuricemia, que pode levar a gota, formação de cristais de urato, disfunção renal, falência de enxerto ou órgão após transplante, distúrbios endoteliais (tais como inflamação), insuficiência cardíaca crônica, distúrbios arterio-venosos, pré-eclâmpsia, eclâmpsia, hipertensão arterial e déficit cognitivo. Em modalidades do método da presente invenção para tratamento de gota, os depósitos de tecido de ácido úrico, incluindo mas não limitado a ofos, são reduzidos, bem como a incidência e a gravidade das crises de gota também são reduzidos.

[00113] Os compostos desta invenção podem ser administrados por qualquer via convencional de administração sistêmica. De preferência, eles são administrados por via oral. Assim, é preferível para o medicamento ser formulado para a administração oral. Outras vias de administração que podem ser utilizadas nos termos da presente invenção incluem retal, parenteral, por injeção (por exemplo, injeção intravenosa, subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal), ou por via nasal.

[00114] Outras modalidades de cada um dos usos e os métodos de tratamento da presente invenção compreendem administrar qualquer uma das modalidades dos compostos acima descritos. No interesse de evitar a redundância desnecessária, cada um desses compostos e grupo de compostos não está sendo repetido, mas eles estão incorporados a esta descrição dos usos e métodos de tratamento como se fossem repetidos.

[00115] Ambos os seres humanos e mamíferos não-humanos podem ser tratados de acordo com o método de tratamento da presente invenção. A dose ideal de um composto particular da invenção para

um determinado sujeito pode ser determinada na clínica por um médico especializado. No caso da administração oral do composto desta invenção é geralmente administrado em adultos em uma dose diária de 1 mg a 2500 mg, de mais preferência de 1 mg a 1.200 mg. Em outras modalidades da presente invenção, o composto é administrado em uma dose a partir de 400 mg a 1000 mg, de 600 mg a 800 mg, de 600 mg a 1.000 mg, ou de 100 a 300 mg, administrada uma ou duas vezes por dia. O peso médio de um adulto normal é de 60 a 70 kg, de modo que as faixas de dosagens adequadas, expressas em mg/kg são aproximadamente de 0,015 a 42 mg/kg, de 0,015 a 20 mg/kg, de 6,6 a 13 mg/kg, de 10 a 13 mg/kg, de 10 a 16 mg/kg, ou de 1,67 a 4,3 mg/kg, administradas uma ou duas vezes por dia. Quando tratando crianças a dose ótima é determinada pelo médico do paciente. No caso de administração oral a um rato, o composto desta invenção é geralmente administrado em uma dose diária de 1 a 300 mg do composto por quilograma de peso corporal.

[00116] O composto desta invenção pode ser administrado em combinação com outros fármacos para diminuição de ácido úrico. Nesses casos, a dose do composto desta invenção é como descrito acima. Qualquer fármaco convencional ou de investigação para redução de ácido úrico pode ser utilizado em combinação com o composto da presente invenção. Exemplos de tais fármacos incluem inibidores da xantina oxidase tais como o alopurinol (de 100 mg/dia até 1000 mg/dia, mais geralmente a partir de 100 mg/dia até 300 mg/dia), febuxostate (de 40 mg/dia a 120 mg/dia; mais especificamente a partir de 60 mg/dia a 80 mg/dia) e Oxipurinol; Puricase/PEG-uricase (de 4 mg a 12 mg a cada duas semanas por infusão); agentes uricosúricos tais como sulfinpirazona (de 100 mg/dia a 800 mg/dia), probenecida (500 mg/dia), losartan (de 25 mg/dia a 200 mg/dia, mais tipicamente de 50 mg/dia a 100 mg/dia), fenofibrato, JTT-552 (um inibidor URAT-1), ben-

zbromarona (de 70mg/day a 150 mg/dia), e as estatinas, tais como atorvastatina (Lipitor ®). Outro fármaco de redução de ácido úrico pode ser administrado em sua quantidade normal ou em uma quantidade que é menor do que o normal, quer através da administração de doses mais baixas de tais outros fármacos, ou por doses menos frequentes de administração de tais outros fármacos.

[00117] Os compostos desta invenção podem ser administrados concomitantemente com outros medicamentos utilizados para diminuir a dor associada com as crises de gota, por exemplo, fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), colchicina, corticosteróides e outros analgésicos.

[00118] No decurso da redução dos níveis de ácido úrico no sangue é de se esperar que os compostos da presente invenção aumentarão os níveis de ácido úrico na urina. Para aumentar o pH da urina e, assim, melhorar a solubilidade do ácido úrico, citrato ou bicarbonato, por exemplo, podem ser administrados em conjunto com os compostos da presente invenção.

[00119] Uma mistura do composto ou o sal da presente invenção com um ou mais outros medicamentos para baixar o ácido úrico, analgésicos e agentes para aumentar o pH, pode ser administrada ao assunto. Alternativamente, o composto ou o sal da presente invenção e um ou mais outros medicamentos para baixar o ácido úrico, analgésicos e agentes de aumento do pH não são misturados para formar uma mistura, mas são administrados de forma independente para o sujeito. Quando os ingredientes ativos não são misturados para formar uma mistura única ou composição, é conveniente fornecer-los na forma de um kit que inclui uma ou mais unidade de doses orais de um composto desta invenção, uma ou mais doses orais unitárias de outros medicamentos para baixar o ácido úrico, analgésicos e agentes de aumento do pH, e instruções para administrar o composto desta invenção em

combinação com outros ingredientes ativos. De preferência, os componentes do kit são embalados em conjunto, como em uma caixa ou uma embalagem blister.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[00120] Esta invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo um composto desta invenção e, opcionalmente, um veículo farmaceuticamente aceitável. Outras modalidades da composição farmacêutica da presente invenção compreendem qualquer uma das modalidades dos compostos acima descritos. No interesse de evitar redundância desnecessária, cada um desses compostos e grupo de compostos não está sendo repetido, mas eles estão incorporados a esta descrição de composições farmacêuticas, como se fossem repetidos.

[00121] De preferência, a composição é adaptada para a administração oral, por exemplo, sob a forma de um comprimido, comprimido revestido, drágea, cápsula gelatinosa dura ou mole, emulsão, solução ou suspensão. Em geral, a composição oral será composta de 1 mg a 2.500 mg, de mais preferência de 1 mg a 1.200 mg do composto da presente invenção. Em modalidades mais específicas da presente invenção a composição oral será composta de 400 mg a 1.000 mg, de 600 mg a 800 mg, de 600 mg a 1.000 mg ou de 100 a 300 mg, do composto da presente invenção. É conveniente para o paciente engolir um ou dois comprimidos, comprimidos revestidos, drágeas ou cápsulas de gelatina por dia. No entanto, a composição pode também ser adaptada para administração por quaisquer outros meios convencionais de administração sistêmica, incluindo por via retal, por exemplo, sob na forma de supositórios, parenteralmente, por exemplo, na forma de soluções injetáveis ou por via nasal.

[00122] Os ingredientes ativos podem ser processados com veículos farmaceuticamente inertes, inorgânicos ou orgânicos para a produ-

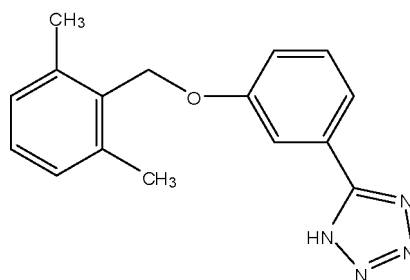
ção de composições farmacêuticas. A lactose, amido de milho ou seus derivados, talco, ácido esteárico ou seus sais e similares podem ser usados, por exemplo, como tais veículos, para os comprimidos, comprimidos revestidos, drágeas e cápsulas de gelatina dura. Veículos indicados para cápsulas gelatinosas moles são, por exemplo, óleos vegetais, ceras, gorduras, polióis semi-sólidos e líquidos e similares. Dependendo da natureza do ingrediente ativo nenhum veículo é, no entanto, geralmente necessário no caso de cápsulas gelatinosas moles, com exceção da gelatina mole em si. Veículos apropriados para a produção de soluções e xaropes são, por exemplo, água, polióis, glicerol, óleos vegetais e similares. Veículos adequados para supositórios são, por exemplo, óleos naturais ou endurecidos, ceras, gorduras, polióis semi-líquidos ou líquidos e similares.

[00123] As composições farmacêuticas podem, além disso, conter conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes umectantes, emulsificantes, edulcorantes, corantes, flavorizantes, sais para variar a pressão osmótica, tampões, agentes de revestimento ou antioxidantes.

[00124] A invenção será melhor entendida por referência aos seguintes exemplos, que ilustram, mas não limitam a invenção aqui descrita.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1



5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)fenil)-1H-tetrazol

Etapa A: Preparação de 3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)benzonitrila:

[00125] Uma solução de álcool 2,6-Dimetilbenzila (6,27 g, 46,1 mmol) e azodicarboxilato diisopropila (DIAD, 9,24 g, 45,7 mmol) em

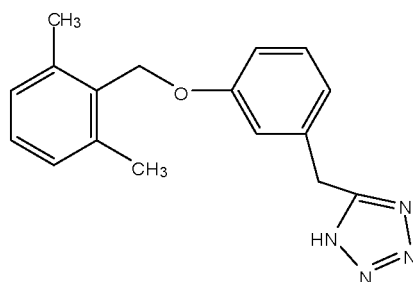
THF seco (30 ml) foram adicionadas gota a gota a uma solução de 3-Hidroxibenzonitrila (5 g, 37 mmol) e trifenilfosfina (TPP, 11,99 g, 45,7 mmol) em THF (100 ml) a 0° C. A mistura de reação foi aquecida à temperatura ambiente por 4 horas ou até que todos os materiais de partida sejam consumidos, diluídos com éter e lavados com água (2X). A camada orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(hex: acetato de etila 2:1) para dar o composto título como um sólido branco.

Etapa B: Preparação de 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)fenil)-1H-tetrazol:

[00126] Uma mistura de 3-(2,6-Dimetilbenzilóxi) benzonitrila (Etapa A, 3 g, 11,8 mmol), azida de sódio (0,847 g, 13 mmol) e cloreto de amônio (0,697 g, 13 mmol) em dimetilformamida seca (30 ml) foi aquecida sob argônio a 110 ° C por 14 horas ou até que todo o material de partida é consumido. Água foi adicionada à mistura de reação para dissolver todos os sólidos, a solução foi tomada em salmoura e extraída com acetato de etila (2X). A camada combinada orgânica foi lavada com salmoura, seca sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(clorofórmio: metanol 95:5) para dar o composto título como um sólido branco.

[00127] ¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO): 2.4 (s, 6H); 5.15 (s, 2H); 7.1 (d, 2H); 7.15 (m, 1H); 7.3 (dd, 1H); 7.5 (t, 1H); 7.65 (m, 1H); 7.7 (m, 1H).

EXEMPLO 2



5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)benzil)-1H-tetrazol

Etapa A: Preparação de 2-(3-Hidroxifenil)acetona:

[00128] Para uma solução de 2-(3-metoxifenil) acetonitrila (3,6 g, 25,4 mmol) em cloreto de metileno seco (20 ml) foi adicionado BBr₃ (55 ml, 1M em CH₂Cl₂, 55 mmol) a -78° C sob atmosfera de argônio. A mistura de reação foi aquecida até à temperatura ambiente por 48 horas, extinto por gelo picado, e extraído com cloreto de metileno. A camada orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(CH₂Cl₂: acetato de etila 4:1) para dar o composto título como óleo.

Etapa B: Preparação de 2-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi) Fenil) acetonitrila:

[00129] Uma solução de 2-(3-hidroxifenil)acetonitrila (Etapa A, 5 g, 37 mmol) e azodicarboxilato diisopropila (DIAD, 3,38 g, 16,7 mmol) em THF seco (20 ml) foi adicionada gota a gota para uma solução de 2, 6-Dimetilbenzil álcool (2,25 g, 16,5 mmol) e trifenilfosfina (TPP, 4,3 g, 16,4 mmol) em THF (30 ml) a 0° C sob argônio. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 16 horas ou até que todo o material de partida é consumido. Sílica gel (25 g) foi adicionada à mistura, os solventes foram removidos sob pressão reduzida, carregado em coluna de sílica-gel eluída com cloreto de metileno: hexano (1:1) para dar um sólido cristalino amarelo claro.

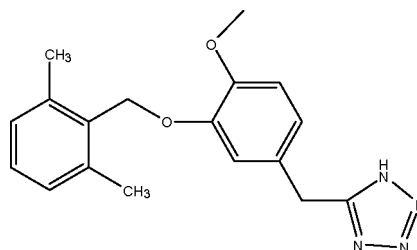
Etapa C: Preparação de 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)benzil)-1H-tetrazol:

[00130] A mistura de 2-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi) fenil)acetonitrila (Etapa B, 3,2 g, 12,7 mmol), azida de sódio (1,28 g, 16,7 mmol) e cloreto de amônio (1,08 g, 20,2 mmol) em dimetilformamida seca (30 ml) foi aquecida sob argônio, a 90° C durante 9 horas ou até que todo o material de partida é consumido e a mistura foi concentrada sob pressão reduzida. A mistura de reação foi tomada em acetato de etila e lavada com água (2X), seca sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(cloreto de metileno: 9:1 metanol) para dar ao produto oleoso. O óleo foi agitado com 1: 2 acetato de etila: hexano por 10 minutos, e o sólido foi fil-

trado para dar um produto como um sólido branco.

[00131] ^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): 2.3 (s, 6H); 4.25 (s, 2H); 5.15 (s, 2H); 6.84 (d, 1H); 6.96 (m, 2H); 7.08 (d, 2H); 7.18 (m, 1H); 7.28 (m, 1H).

EXEMPLO 3



5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metoxibenzil)-1H-tetrazol

Etapa A: Preparação de Etil 3-hidroxi-4-metoxibenzoato:

[00132] Uma solução de ácido 3-hidróxi-4-metoxibenzóico (25 g, 148,67 mmol) e monohidrato ácido p-toluenossulfônico (3,17 g, 16,66 mmol) em etanol abs (300 ml) foi refluxada por 6 horas ou até que todo o material de partida é consumido. A mistura de reação foi concentrado, diluído com EtOAc (60 ml) e lavada com água (20 ml). A camada orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel (hex: acetato de etila 2:1) para dar o composto título.

Etapa B: Preparação de etil 3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metoxibenzoato:

[00133] Uma solução de etil 3-hidroxi-4-metoxibenzoato (etapa A, 9,10 g, 46,4 mmols) e azodicarboxilato diisopropila (DIAD, 10,23 g, 50 mmols) em THF seco (20 ml) foi adicionado gota a gota para uma solução de 2, 6-Dimetilbenzil álcool (6,94 g, 51 mmols) e trifenilfosfina (TPP, 13,27 g, 50 mmol) em THF seco (60 ml) a 0°C sob argônio. A mistura foi aquecida à temperatura ambiente por 4 horas ou até que todo o material de partida é consumido, diluída com éter e lavada com água (2X). A camada orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel (hex: acetato de etila 2:1) para dar o composto de título.

Etapa C: Preparação de (3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metoxifenil) metanol:

[00134] Para uma solução de etil 3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metoxibenzoato (Etapa B, 6,04 g, 19,23 mmol) em THF seco (30 ml) LiAlH₄ foi adicionado gota a gota (1M em THF, 0,803 g, 21,16 mmol) a 0° C sob argônio. A mistura foi agitada por 4 horas ou até que todo o material de partida é consumido, então extinta lentamente com 0,1 N HCl, EtOAc (20 ml) foi adicionada à mistura de reação. A mistura foi filtrada e o precipitado foi lavado com EtOAc (25 ml x 2). A camada combinada orgânica foi lavada com 0,1 N HCl, salmoura, seca sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel (hex: acetato de etila 4:1) para dar o composto de título.

Etapa D: Preparação de 2-((5-(bromometil)-2-metoxifenóxi) metil)-1,3-dimetilbenzeno:

[00135] Para uma solução de (3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metoxifenil) metanol (Etapa C, 5,23 g, 20,4 mmol) e CBr₄ (10,16 g, 30,6 mmol) em CH₂Cl₂ seco (20 ml) trifenilfosfina foi adicionada porção a porção (8,03 g, 30,64 mmol) a 0° C. A mistura foi agitada por 1,5 horas, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel (hex: acetato de etila 2:1) para dar o composto de título.

[00136] ¹H RMN (400 MHz, (CDCl₃): 2.43 (s, 6H); 3.83 (s, 3H); 4.53 (s, 2H); 5.08 (s, 2H); 6.84 (d, 1H); 7.0- 7.03 (dd, 1H); 7.06-7.09 (m, 3H); 7.14-7.18 (m, 1H).

Etapa E: Preparação de 2-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metoxifenil) acetonitrila:

[00137] A solução de 2-((5-(bromometil)-2-metoxifenóxi)metil)-1,3-dimetilbenzeno (Etapa D, 3,28 g, 9,7 mmol) e NaCN (0,624 g, 12,7 mmol) em DMF seco (20) foi aquecida a 120 ° C por 2,5 horas, em seguida, resfriada e diluída com EtOAc (50 ml). A camada orgânica foi

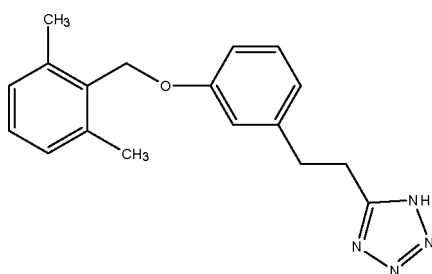
lavada com água (30 ml), salmoura, secas sobre Na_2SO_4 , filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(hex: acetato de etila 2:1) para dar o composto de título.

Etapa F: Preparação de 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metoxibenzil)-1H-tetrazol:

[00138] Uma mistura de 2-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metoxifenil) acetonitrila (Etapa E, 2,17 g, 7,5 mmol), azida de sódio (0,590 g, 9,1 mmol) e cloreto de amônio (0,486 g, 9,1 mmol) em DMF seco (20 ml) foi aquecida sob argônio, a 90°C por 16 horas ou até que todo o material de partida é consumido, a reação foi resfriada, diluída em água e extraída com EtOAc (30 x 4 ml). A camada combinada orgânica foi lavada com salmoura, secas sobre Na_2SO_4 , filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(clorofórmio: metanol 95:5) para dar um produto semi-sólido. O semi-sólido foi agitado com 1: 2 acetato de etila: hexano (15 ml) por 10 minutos, e filtrado para dar um produto como um sólido branco.

[00139] ^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): 2.3 (s, 6H); 3.68 (s, 3H); 4.22 (s, 2H); 4.98 (s, 2H); 6.78-6.81 (dd, 1H); 6.91-6.93 (d, 1H); 7.05-7.07 (d, 2H); 7.13-7.16 (m, 2H). MS: m/z 325.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

EXEMPLO 4



5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)fenetil)-1H- tetrazol

Etapa A: Preparação de 3-(3-metoxifenil)propanonitrila:

[00140] Para uma solução agitada de 3-(3-metoxifenil) propanonitrila (Etapa A, 1,71 g, 10,6 mmols) em CH_2Cl_2 seco (20 ml) foi adicionado BBr_3 (1M em CH_2Cl_2 , 5,32 g, 21,2 mmol) em -78°C sob argônio. A mistura de reação foi agitada a mesma temperatura durante 2 horas e

depois a 0 ° C por 4 horas ou até que todo o material de partida é consumido, temperada com gelo, extraída com EtOAc (30 x 3 ml), a camada orgânica combinada foi lavada cuidadosamente com NaHCO₃ saturado, salmoura e seca sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(hex: acetato de etila 2:1) para dar o composto de título.

Etapa C: Preparação de 3-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)fenil) propanonitrila:

[00141] Uma solução de 3-(3-hidroxifenil)propanonitrila (Etapa B, 1,25 g, 8,5 mmol) e azodicarboxilato diisopropila (DIAD, 1,87 g, 9,26 mmol) em THF seco (10 ml) foi adicionada gota a gota para uma solução de 2, 6-Dimetilbenzil álcool (1,27 g, 9,3 mmol) e trifenilfosfina (TPP, 2,43 g, 9,26 mmol) em THF seco (30 ml) a 0° C sob argônio. A mistura de reação foi aquecida à temperatura ambiente por 4 horas ou até que todo o material de partida é consumido, diluída com éter e lavada com água (2X). A camada orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(hex: acetato de etila 2:1) para dar o composto de título.

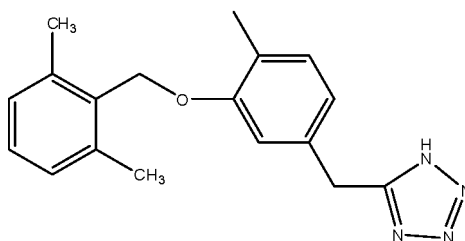
Etapa D: Preparação de 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)fenetil)-1H-tetrazol:

[00142] Uma mistura de 3-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)fenil) propanonitrila (Etapa C, 2,62 g, 9,9 mmol), azida de sódio (0,899 g, 13,8 mmol) e cloreto de amônio (0,740 g, 13,8 mmol) em DMF seco (20 ml) foi aquecida sob argônio, a 90° C por 16 horas ou até que todo o material de partida é consumido, a reação foi resfriada, diluída em água e extraída com EtOAc (30 x 4 ml). A camada orgânica combinada foi lavada com salmoura, secas sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel (clorofórmio: metanol 95:5→92.5: 7.5) para dar um produto semi-sólido. O semi-sólido foi agitado com 1: 2 acetato de etila: hexano (15 ml) por 10 minutos, e filtrado para dar um produto como um sólido branco.

[00143] ¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO): 2.48 (s, 6H); 3.02 (t, 2H);

3.19 (t, 2H); 4.98 (s, 2H); 6.80-6.81 (d, 1H); 6.86-6.89 (m, 2H); 7.05-7.07 (d, 2H); 7.14-7.23 (m, 2H). MS: m/z 309.2 [M + H]⁺.

EXEMPLO 5



5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metilbenzil)-1H-tetrazol

Etapa A: Preparação de 2-(3-Hidroxi-4-metilfenil)acetonitrila:

[00144] Para uma solução agitada de 2-(3-metoxi-4-metilfenil) acetoneitrila (5 g, 31 mmol) em CH₂Cl₂ seco (20 ml) foi adicionado BBr₃ gota a gota (1M em CH₂Cl₂, 10,02 g, 40 mmol) em -78° C, sob argônio. A mistura foi agitada a mesma temperatura durante duas horas e depois a 0 ° C por 5 horas ou até que todo o material de partida é consumido, temperada com gelo, extraída com EtOAc (30 x 3 ml), a camada orgânica combinada foi lavada cuidadosamente com NaHCO₃ saturado, salmoura, e secas sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel (hex: acetato de etila 4:1→CH₂Cl₂: hex 1:1) para dar o composto título como um sólido branco acinzentado.

Etapa B: Preparação de 2-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metilfenil) acetoneitrila:

[00145] Para uma solução agitada de 2-(3-hidroxi-4-metilfenil) acetoneitrila (Etapa A, 2,18 g, 14,8 mmol), K₂CO₃ (2,66 g, 19,2 mmol) em DMF seco (20 ml) foi adicionado cloreto de 2,6-Dimetilbenzila (2,97 g, 19,2 mmol) à temperatura ambiente sob argônio. A mistura de reação foi agitada por 16 horas, diluída com EtOAc (40 ml), lavada com água (20 ml) e salmoura. A camada orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(hex: acetato de etila 2:1) para dar o composto título como um

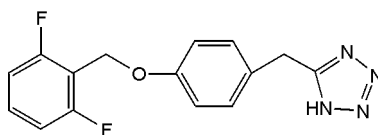
sólido branco.

Etapa C: Preparação de 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metilbenzil)-1H-tetrazol:

[00146] Uma mistura de 2-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metilfenil) acetonitrila (Etapa B, 1,12 g, 4,2 mmol), azida de sódio (0,400 g, 6,1 mmol) e cloreto de amônio (0,350 g, 6,5 mmol) em DMF seco (15 ml) foi aquecido sob argônio, a 90° C por 16 horas ou até que todo o material de partida é consumido, a mistura de reação foi resfriada, diluída em água e extraída com EtOAc (30 x 4 ml). A camada combinada orgânica foi lavada com salmoura, seca sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel (clorofórmio: metanol 95:5→92,5: 7,5) para dar um produto semi-sólido. O semi-sólido foi agitado com acetato de etila: hexano (15 ml) 1: 2 por 10 minutos, e filtrado para dar um produto como um sólido branco.

[00147] ¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO): 2.0 (s, 3H); 2.35 (s, 6H); 4.27 (s, 2H); 5.0 (s, 2H); 6.73-6.75 (dd, 1H); 7.08-7.1 (m, 3H); 7.15-7.19 (m, 2H). MS: m/z 309.2 [M + H]⁺.

EXEMPLO 6



5-(4-(2,6-Difluorobenzilóxi)benzil)-1H-tetrazol

Etapa A: Preparação de 2-(4-(2,6-Difluorobenzilóxi) fenil) acetonitrila:

[00148] Para uma solução de 2-(4-hidroxifenil) acetonitrila (5 g, 37,5 mmols) e K₂CO₃ (6,74 g, 48,8 mmols) em DMF seco (20 ml) foi adicionado brometo de 2,6-Difluorobenzila (7,77 g, 37,5 mmols). A mistura de reação foi agitada por 4 horas à temperatura ambiente e concentrada no vácuo. O resíduo bruto foi tomado em EtOAc e lavado com água e salmoura. A camada aquosa foi lavada mais uma vez com EtOAc. A camada orgânica combinada foi seca com Na₂SO₄, filtrada e

concentrada para fornecer o composto como um sólido branco.

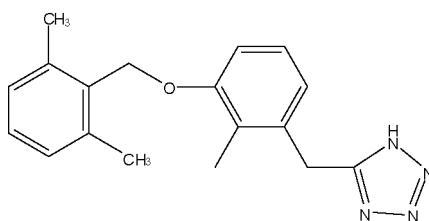
[00149] ^1H RMN (270 MHz, CDCl_3): 3.65 (s, 2H); 5.1 (s, 2H); 6.9-7.0 (m, 4H); 7.2-7.4 (m, 3H).

Etapa B: Preparação de 5-(4-(2,6-Difluorobenzilóxi)benzil)-1H-tetrazol:

[00150] Uma mistura de 2-(4-(2,6-Difluorobenzilóxi)fenil)acetonitrila (Etapa A, 5 g, 19,3 mmol), azida de sódio (1,3 g, 20 mmol) e cloreto de amônio (1,06 g, 20 mmol) em DMF seco (60 ml) foi aquecida a 90° C por 16 horas. O solvente foi removido sob vácuo e o resíduo oleoso foi dividido entre EtOAc e água (acidificada a pH 1 com conc. HCl). A camada orgânica foi lavada com água, seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e concentrada para um semi-sólido marrom. A purificação foi feita por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(clorofórmio: metanol, 9:1) para fornecer o composto título como um sólido leve e cremoso.

[00151] ^1H RMN (270 MHz, CDCl_3): 4.0 (s, 2H); 5.1 (s, 2H); 6.7-6.9 (m, 4H); 7.0 (d, 2H); 7.2 (m, 1H).

EXEMPLO 7



5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilbenzil)-1H-tetrazol

Etapa A: Preparação de Etil 3-hidroxi-2-metilbenzoato:

[00152] Uma solução de ácido 3-hidroxi-2-metilbenzóico (5,04 g, 33,12 mmol) e monohidrato de ácido p-toluenossulfônico (0,741 g, 3,89 mmol) em etanol abs (150 ml) foi refluxado por 16 horas ou até que todo o material de partida é consumido. A mistura de reação foi concentrado, diluído com EtOAc (30 ml) e lavada com água (20 ml). A camada orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(hex: acetato de etila 2:1) para dar o composto de título.

Etapa B: Preparação de 3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilbenzoato de etila:

[00153] Para uma solução agitada de 3-hidroxi-2-metilbenzoato de etila (Etapa A, 3,1 g, 17,22 mmols), K_2CO_3 (3,09 g, 22,38 mmols) em DMF seco (15 ml) foi adicionado cloreto de 2,6-Dimetilbenzila (3,19 g, 20,66 mmols) à temperatura ambiente, sob argônio. A mistura de reação foi agitada por 16 horas, diluída com EtOAc (40 ml), lavada com água (20 ml) e salmoura. A camada orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel (hex: acetato de etila 4:1) para dar o composto título como um sólido branco.

Etapa C: Preparação de (3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilfenil) metanol:

[00154] Para uma solução de 3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilbenzoato de etila (Etapa B, 5,94 g, 19,93 mmols) em THF seco (35 ml) foi adicionado $LiAlH_4$ gota a gota (1M em THF, 0,832 g, 21,92 mmols) a 0°C sob argônio. A mistura de reação foi agitada por 4 horas ou até que todo o material de partida é consumido, em seguida extinta lentamente, com 0,1 N de HCl a 0° C, e EtOAc (20 ml) foi adicionado à mistura de reação. A mistura de reação foi filtrada e o precipitado foi lavado com EtOAc (25 ml x 2). A camada combinada orgânica foi lavada com 0,1 N HCl, salmoura, secas sobre Na_2SO_4 , filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(hex: acetato de etila 2:1) para dar o composto de título.

Etapa D: Preparação de 1-(bromometil)-3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilbenzeno:

[00155] Para uma solução de (3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilfenil) metanol (Etapa C, 3,68 g, 14,37 mmols) e CBr_4 (5,25 g, 15,8 mmols) em CH_2Cl_2 seco (20 ml) foi adicionado trifenilfosfina porção a porção (4,14 g, 15,8 mmols) a 0°C. A mistura de reação foi agitada por 4 horas, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea

em coluna de sílica-gel(hex: acetato de etila 4:1) para dar o composto de título. O sólido foi posteriormente mantido sob vácuo por 6 horas para secar.

Etapa E: Preparação de 2-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilfenil) acetonitrila:

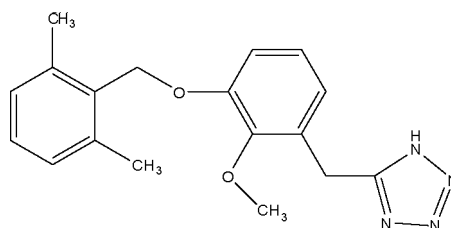
[00156] Uma solução de 1-(bromometil)-3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilbenzeno (Etapa D, 4,28 g, 13,41 mmol) e NaCN (0,789 g, 16,10 mmols) em DMF seco (20 ml) foi aquecida a 120°C por três horas, em seguida, resfriada e diluída com EtOAc (50 ml). A camada orgânica foi lavada com água (30 ml), salmoura, secas sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel(hex: acetato de etila 4:1) para dar o composto de título.

Etapa F: Preparação de 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilbenzil)-1H-tetrazol:

[00157] Uma mistura de 2-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilfenil) acetonitrila (Etapa E, 2,70 g, 10,19 mmols), azida de sódio (0,795 g, 12,23 mmols) e cloreto de amônio (0,653 g, 12,22 mmols) em DMF seco (20 ml) foi aquecida sob argônio, a 90° C por 16 horas ou até que todo o material de partida é consumido, a mistura de reação foi resfriada, diluída em água e extraída com EtOAc (30 x 4 ml). A camada combinada orgânica foi lavada com salmoura, seca sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel (clorofórmio: metanol 92,5:7,5) para dar um produto semi-sólido. O semi-sólido foi agitado com acetato de etila: hexano (15 ml) 1: 2 por 10 minutos, e filtrado para dar produto como um sólido branco.

[00158] ¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO): 2.01 (s, 3H); 2.32 (s, 6H); 4.24 (s, 2H); 5.01 (s, 2H); 6.78-6.79 (dd, 1H); 7.06-7.08 (d, 2H); 7.12-7.19 (m, 3H).

EXEMPLO 8



5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metoxibenzil)-1H-tetrazol

Etapa A: Preparação de 3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2- metoxibenzaldeído:

[00159] A solução de 3-hidroxi-2-metoxibenzaldeído (5,06 g, 32,7 mmol), cloreto de 2,6-Dimetilbenzil (5,04 g, 33,1 mmol) e K_2CO_3 (4,78 g, 34,6 mmol) em DMF seco (15 ml) foi agitada à temperatura ambiente sob argônio por 16 horas e, em seguida diluída com EtOAc (40 ml) e lavada com água (20 ml). A camada orgânica foi concentrada, e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel (hex: acetato de etila 4:1) para dar o composto como um sólido branco acinzentado.

Etapa B: Preparação de (3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metoxifenil) metanol:

[00160] Para uma solução de 3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metoxibenzaldeído (Etapa B, 10,6 g, 32,7 mmol) em THF seco (40 ml) foi adicionado $LiAlH_4$ gota a gota (1M em THF, 0,95 g, 23,7 mmol) a 0° C sob argônio. A mistura de reação foi agitada por 1 hora ou até que todo o material de partida é consumido, em seguida extinta, adicionando água lentamente, seguido pela adição de 1N de HCl (5 ml), água (10 ml) e EtOAc (20 ml) foi adicionado à mistura de reação. A mistura de reação foi concentrada, e passou por uma pequena coluna de sílica-gel, utilizando acetato de etila para dar o composto título como um sólido branco acinzentado.

Etapa C: Preparação de metanosulfonato de 3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metoxibenzila:

[00161] Para uma solução de (3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metoxifenil) metanol (Etapa B, 9,5 g, 32,7 mmol) e trietilamina (5,80 g, 57,4 mmol) em CH_2Cl_2 seco (100 ml) foi adicionado cloreto de metanossulfonila

gota a gota (3,5 ml, 45 mmol) a 0° C sob argônio. A mistura de reação foi aquecida à temperatura ambiente por 6 horas ou até que todo o material de partida é consumido, neutralizado com Na₂CO₃ 10% resfriada e extraída com CH₂Cl₂. A camada orgânica foi concentrada, e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel (hex: cloreto de metileno 2:1) para dar o composto título como um óleo amarelo claro.

Etapa D: Preparação de 2-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metoxifenil) acetonitrila:

[00162] A solução de metanossulfonato de 3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metoxibenzila (Etapa C, 8,8 g, 30,26 mmol) e NaCN (1,60 g, 32,6 mmol) em DMF seco (40 ml) foi aquecida a 85° C por 18 horas em seguida, resfriada e diluída com EtOAc (50 ml). A camada orgânica foi lavada com água (30 ml), concentrada, e passou por uma coluna curta de sílica-gel com cloreto de metileno para dar o composto título como um sólido amarelo.

Etapa E: preparação de 5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metoxibenzil)-1H-tetrazol:

[00163] A mistura de 2-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metoxifenil) acetonitrila (Etapa D, 3,2 g, 12,7 mmol), azida de sódio (0,86 g, 13,2 mmol) e cloreto de amônio (0,696 g, 13,0 mmol) em DMF seco (10 ml) foi aquecido sob argônio, a 90°C por 16 horas ou até que todo o material de partida é consumido, a mistura de reação foi resfriada, e concentrada sob pressão reduzida e purificada por cromatografia instantânea em coluna de sílica-gel (clorofórmio: metanol, 9:01) para dar um produto semi-sólido. O semi-sólido foi agitado com acetato de etila: hexano (15 ml) 1: 2 por 10 minutos, e filtrado para dar um produto como um sólido branco.

[00164] ¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO): 2.33 (s, 6H); 3.5 (s, 3H); 4.21 (s, 2H); 5.04 (s, 2H); 6.83-6.85 (dd, 1H); 7.05-7.09 (m, 3H); 7.15-

7.23 (m, 2H).

EXEMPLO 9: Ensaio de inibição de URAT1

[00165] URAT1 (veículo de ácido úrico 1) é expresso na membrana do ápice nos túbulos renais. Ela medeia a recaptação de ácido úrico da urina para o sangue. A inibição da URAT1 leva a aumento da excreção de ácido úrico na urina, e é portanto um modo potencial de ação de fármacos que diminuem as concentrações séricas de ácido úrico. A probenecida e benzbromarona, por exemplo, têm sido usadas clinicamente para o tratamento da gota e hiperuricemia, e agem tanto no URAT1 para reduzir recaptação de ácido úrico. No entanto, benzbromarona foi retirada do mercado devido à toxicidade do fígado através de mecanismos independentes de URAT1, e probenecida age sobre numerosos veículos de proteínas, resultando em interações com uma variedade de outros fármacos.

[00166] Um ensaio *in vitro* de URAT1 é útil para a identificação de compostos com atividade potencial na redução sérica do ácido úrico. Um ensaio adequado envolve a transfecção de células (por exemplo, células embrionárias do rim humano, "HEK") com uma codificação de vetores humanos URAT1, seguido por determinação da capacidade das células transfectadas para assumir ácido úrico radiomarcados. A atividade de compostos como inibidores de URAT1 é avaliada pela sua capacidade de bloquear a absorção de ácido úrico por células transfectadas.

Compostos de teste e produtos químicos:

[00167] Benzbromarona (Sigma, Cat.No.B5774), Probenecida (Sigma, Cat.No.P8761)), DMSO (Sigma, Cat.No.D-2650), [8-¹⁴C] Urato (50-60mCi/ mmol; American Radio Chemicals, Cat. No. ARC0513).

Subclonagem de hURAT1 no vetor de expressão:

[00168] O vetor plasmídeo pCMV6-XL5 contendo cDNA de hURAT1 (Nº Cat. SC125624) e o vetor de expressão pCMV6-Neo (Nº Cat.

pCMVNEO) foram obtidos a partir de Origene Technologies, Inc. O cDNA de hURAT1 completo foi obtido a partir do vetor pCMV6- XL5 e subclonado no vetor de expressão pCMV6-Neo para criar o plasmídeo de expressão de hURAT1, pCMV6-hURAT1. As sequências foram verificadas por sequenciamento automático de DNA.

[00169] Cultura de células, transfecção de plasmídeos de expressão URAT1 e a criação de células que expressam estavelmente HEK para hURAT1:

[00170] Células embrionárias de rim humano 293 (HEK) (ATCC, N° Cat CRL-1573) foram cultivadas em EMEM suplementado com SFB 10% e 2mM de L-glutamina e incubados a 37° C e CO2 5%. Para os experimentos de transfecção, as células foram semeadas em pratos de 60 milímetros em um meio de 1 ml por prato. Após uma incubação de 18 - 24, as células foram transfectadas com plasmídeo pCMV6-hURAT1 ou o vetor de expressão pCMV6-Neo, utilizando o agente de transfecção Lipofectin seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen, N° Cat. 18292). Após a transfecção, as células foram cultivadas em meios EMEM por 72 horas e, em seguida, pela adição de 1 mg/ml de Geneticin (GIBCO, N° Cat. 10131) transfectantes estáveis foram selecionados. Transfectantes estáveis expressando hURAT1 (doravante referidos como células HEK-HEK) ou células tendo apenas o vetor de expressão pCMV6-Neo (doravante referidas como células de mock-HEK) foram verificadas por meio de métodos de transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR).

Ensaio de absorção de [8-¹⁴C] Urato:

[00171] Células hURAT1-HEK e células mock-HEK foram semeadas em placas de cultura de células de 24 cavidades poli-D-lisina (Becton Dickinson, N° Cat. 354414) a uma concentração de 3×10^5 em meio EMEM e incubadas durante a noite. Soluções de reação contendo o [8-¹⁴C] urato (55 mCi/mmol) a uma concentração final de 50 μ M

foram preparadas com ou sem compostos de teste em solução salina balanceada de Hanks (HBSS), contendo 125 mM de gluconato de sódio, 4,8 mM de gluconato de potássio, 1,3 mM de cálcio, 5,6 mM de glicose, 1,2 mM de sulfato de magnésio, 1,2 mM de KH_2PO_4 e 25 mM de HEPES (pH 7,4). Antes do ensaio de absorção iniciado, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas por 5 min em 0,6 ml de HBSS. Depois disso, o HBSS foi removido, as soluções de reação preparadas foram adicionadas em cada cavidade e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, a solução de reação foi removida, as células foram lavadas duas vezes com 0,6 ml de HBSS frio e lisadas com 0,2 ml de NaOH 0,1 M por 20 min. Os lisados de células foram transferidos para os frascos de cintilação contendo 1 ml de líquido de cintilação (Opti Phase Supermix, PerkinElmer, N° Cat. 1200-439) e a radioatividade foi contada no contador Microbeta (1450, Wallac Jet, PerkinElmer). Os compostos de ensaio foram dissolvidos em DMSO e mesma concentração de DMSO foi adicionada nas cavidades das células mock-HEK e as células HEK-hURAT1 que não continham compostos de teste. Para cada composto de ensaio, foi realizado duas vezes o ensaio de absorção e realizados em triplicata. A absorção de Urato das células para cada condição de teste foi apresentada como a percentagem média de inibição em relação ao controle DMSO. Os valores de radioatividade obtidos para as cavidades que continham DMSO foram tomados como captação de 100% das células. A concentração observada - dados de inibição percentual foram ajustados a um modelo sigmoidal de concentração-efeito, onde:

$$\% \text{ Inibição} = (100 * \text{Conc}^{\text{Slope}}) / (\text{IC}_{50}^{\text{Slope}} + \text{Conc}^{\text{Slope}})$$

[00172] e as estimativas de inclinação com seus limites de 95% de confiança foram determinados por uma análise de regressão por mínimos quadrados, não linear, usando o Data Analysis Toolbox™ (MDL Information Systems, San Leandro, CA, USA).

[00173] Para avaliação da atividade de compostos como inibidores de URAT1, a percentagem de inibição da absorção de ácido úrico foi tipicamente avaliada a uma concentração de fármacos de 10 micromolar (tabela 1). Concentrações adicionais de fármacos de alguns compostos foram testadas para a determinação dos valores de IC₅₀ (tabela 2). Neste exemplo, os compostos não foram necessariamente testados simultaneamente.

Tabela 1: efeitos inibitórios dos compostos de teste na concentração de 10 µM na absorção de ¹⁴C urato em células hURAT1-HEK

Composto Teste	% de Inibição	S.D.
EB	90,0	0,29
EC	95,2	0,67
ED	96	0,7
EF	92	0,6
EG	95,57	0,39
BD	56,57	2,64
EH	80,00	1,29
EI	44,00	1,53

Tabela 2:

Composto	Valores de IC ₅₀ (µM)
EB	0,93
EC	0,24
ED	0,25
EF	0,74
EG	0,13
Benzbromarona	0,75
Probenecida	174

EXEMPLO 10: Estudo farmacocinético de dose oral única para ratos com o composto EB.

[00174] Determinação do perfil de Plasma do Composto EB após a administração de gavagem oral única a ratos do sexo masculino:

[00175] Os compostos de teste foram suspensos em HPMC 1% usando um homogeneizador de tecido para minimizar e maximizar a uniformidade de partículas da suspensão e armazenados a 4°C. As formulações foram completamente misturadas imediatamente antes da

administração. Uma dose de 100 mg/kg de compostos EB ou veículo (HPMC 1%) foi administrada a camundongos machos via gavagem oral única. Os ratos foram colocados em coletores de urina após a administração por cinco horas, e a saída total de urina foi coletado durante 5 horas. As amostras foram congeladas a -80° C até serem analisadas por LC/MS-MS.

[00176] Nos pontos tempo 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas pós-dose, amostras de sangue (0,4 ml) foram coletadas por sangria do plexo orbital em tubos K₃EDTA. (2 - 8° C) por 7 minutos a 6000 rpm. Após a centrifugação, o plasma foi colhido em tubo único para cada animal em cada ponto de tempo e imediatamente congelado a -80° C até serem analisadas por LC/MS-MS.

[00177] Os dados foram submetidos à análise farmacocinética utilizando WinNonlin Standard (v2.1, Pharsight Corporation) e Microsoft Excel.

Protocolo:

A. Plasma.

1. Ratos receberam gavagem oral única de Composto EB, 100 mg/kg, e o plasma foi coletadas em determinados momentos.
2. O plasma foi armazenado a -80° C até o dia da análise.
3. As amostras foram descongeladas em banho de 37° C por 5 min e centrifugadas à velocidade máxima por 10 seg.
4. O plasma do rato, 0,1 mL foi misturado com 0,2 mL de Acetonitrila, centrifugadas por 1 min, spun down a 14000 rpm, 17000g, a 4° C, por 25 min.
5. Os sobrenadantes foram filtrados através de seringa de membrana filtrante PTFE de 0.45 micron, 4 mm, (Phenomenex # AF0-3102-52), e 13 microL foram injetados e separados sobre em Luna 3 microns, poro 100A, C8 (2), 150x3mm, coluna de fase reversa (Phenomenex # 00F-4248-YO, SN # 259151-7) em 50 min gradiente linear

de 40% para 69%

de (ácido fórmico 1%, Acetonitrila 89,9%, metanol 10%) a 0,25 mL/min, 100 bar,

[00178] Temperatura da coluna 37° C, método 406975M1, Sequência 1029-08A, Agilent 1100 LC-MS.

[00179] Todas as amostras foram testadas em duplicata, absorbâncias 210nm e 230nm, espectrogramas de ionização negativas e positivas registrados.

B. Curva de calibração.

Etapa 1. Plasma de animais "veículo" (conjugados), 0,095 mL, foi misturado com 0,005 ml caldo 20x de composto EB em metanol para fazer concentrações de compostos EB de 500 microM, 250 microM, 125 microM, ..., em plasma.

[00180] Por exemplo: 95 microL de plasma + 5 microL de Composto EB 10 mM em metanol = 0,1 mL de plasma com 500 microM de composto EB.

Etapa 2. Amostras da etapa 1 foram centrifugadas por 10 segundos em velocidade máxima.

Etapa 3. 0,2 mL de acetonitrila foram adicionados em todas as amostras a partir da Etapa 2, e todos os frascos foram centrifugadas à velocidade máxima durante 1 minuto.

Etapa 4. Todas as amostras da etapa 3 foram giradas para baixo a 14000 rpm, 17000g, a 4 ° C, por 25 min.

Etapa 5. Os sobrenadantes foram filtrados através de seringa membrana filtrante PTFE de 0,45 micron, 4 mm (Phenomenex # AF0-3102-52), 13 microL foram injetados e separados em Luna 3 microns, poro 100A, C8 (2), 150x3mm, coluna de fase reversa

(Phenomenex # 00F-4248-YO, SN # 259151-7) em 50 min de gradiente linear de 40% a 69% de (0,1% ácido fórmico, 89,9% acetonitrila, metanol 10%) em 0,25 ml/min, 100 bar, 37° C de temperatura

da coluna, método 406975M1, Agilent 1100 LC-MS.

[00181] Todas as amostras foram testadas em duplicata, absorbâncias 210nm e 230nm, espectrogramas de ionização negativas e positivas registrados.

Condições HPLC:

Tabela 3. Gradiente HPLC

Tempo	Solvente C	Solvente D
Min	%	%
0	60	40
2	60	40
52	31	69
58	31	69
60	60	40
75	60	40

Solvente C: 0.1% ácido fórmico em água
 Solvente D: 0.1% Ácido Fórmico, 89.9% Acetonitrila, 10% Metanol

Resultados:

[00182] EB composto foi facilmente detectado no plasma de rato, tempos de retenção e massas confirmados nos modos de ionização positivo e negativo. AGILENT LC-MS sequência 1029-08A.

"M-" = 279.2 100%,

"M+" = 281.2 100%

Peso da fórmula 280, Tempo Médio de Retenção = 26.5 min.

Tabela 4. Concentração do composto EB no plasma, animais individuais

nº da amostra do plasma de rato	Tempo de sangramento	Concentração do composto EB
	h	µg/mL
1	0	0
2	0	0
3	0	0
6	0,5	206,5
7	0,5	207,5
8	0,5	134,2
9	1	210
10	1	139,7
11	1	157,6

12	2	139,9
13	2	187,6
14	2	82,4
15	4	74,9
16	4	92,1
17	4	39,6
18	6	58,7
19	6	79,9
20	6	48
21	8	18,2
22	8	10,7
23	8	0
24	24	0
25	24	0
26	24	0

Tabela 5. Concentração do composto EB no plasma, média. (Vide também figura 3).

Tempo, h	Média (µg/mL)
0	0
0,5	183
1	169
2	137

continuação

Tempo, h	Média (µg/mL)
4	69
6	62
8	10
24	3

AUC₀₋₂₄: 796 µg/mL

C_{máx}: 210 µg/mL

Componentes lineares em parcela semilog:

t_{1/2} (1-4h): 2,27

t_{1/2} (6-8h): 0,74

t_{1/2} (8-24h): 9,39

EXEMPLO 11: Estudo farmacocinético oral de dose única de piloto de rato com composto EB.

[00183] Determinação do perfil do plasma do composto EB seguindo administração de gavagem oral única para ratos machos.

[00184] O composto de teste foi suspenso em 1% de HPMC usando um homogeneizador de tecido para minimizar as partículas e maximizar

zar uniformidade da suspensão e armazenado a 4°C. As formulações foram totalmente misturadas pouco antes da administração. Uma dose de 100mg/kg dos compostos de teste ou veículo (1% de HPMC) foi administrada a ratos machos Sprague-Dawley por gavagem oral única. Em pontos no tempo pós-dose de 0,1,2,4,6,8 e 24 horas, amostras de sangue (0,4mL) foram coletadas por sangramento do seio orbital em tubos de K₃EDTA. As amostras de sangue foram centrifugadas dentro de 30 minutos de coleção sob refrigeração (2 a 8°C) por 7 minutos a 6000 rpm. Após centrifugação, o plasma foi colhido em um tubo simples para cada animal em cada ponto no tempo e imediatamente congelado a -80°C até análise usando LC/MS-MS. Dados de tempo na concentração do plasma em série foram submetidos a análises farmacocinéticas usando WinNonlin Standard (v2.1, Pharsight Corporation) e Microsoft EXCEL.

Protocolo:**A. Plasma.**

1. Ratos receberam gavagem oral única do composto EB, 100 mg/kg, e plasma foi coletado em determinados momentos.
2. Plasma foi armazenado a -80°C até o dia da análise.
3. Amostras foram descongeladas em banho a 37°C por 5 min e centrifugadas à velocidade máxima de 10 seg.
4. Plasma do rato, 0,1 mL foi misturado com 0,2 mL de acetonitrila, centrifugado a 1 min, girou a 14000 rpm, 17000g, a 4 °C, por 25 min.
5. Subrenadantes foram filtrados através de 0,45 micron, 4 mm, filtro de seringa de membrana PTFE (Phenomenex nº AF0-3102-52), e 13 microL foram injetados e resolvidos em micron Luna 3, 100A pore, C8(2), 150x3mm, coluna de fase reversa (Phenomenex nº 00F-4248-YO, SN nº 259151-7) em 50 min de gradiente linear de 40% a 69% de (0,1% de ácido fórmico, 89,9% de acetonitrila, 10% de meta-

nol) a 0,25 mL/min, 10 mPa (100 bar),

Temperatura de coluna de 37°C, método 406975M1, sequência AGILENT 1015-08A, Agilent 1100 LC-MS.

[00185] Todas as amostras foram processadas em duplicado. 210nm e 230nm de espectrogramas de absorvência, ionização negativa e positiva foram gravados.

B. Curva de calibração.

Etapa 1. Plasma de animais "Veículo" (agrupados), 0,19 mL, foi misturado com 0,01 mL de estoque de 20x de PN2107 em metanol para fazer 500 microM, 250 microM, 125 microM, ..., concentrações do composto EB no plasma.

Por exemplo: plasma de 190 microL + 10 microL de composto EB em 10 mM em metanol= 0,2 mL de plasma com composto EB de 500 microM.

Etapa 2. Amostras da etapa 1 foram centrifugadas por 10 seg à velocidade máxima.

Etapa 3. 0,4 mL de acetonitrila foi adicionada em todas as amostras da etapa 2, e todos os frascos foram centrifugados à velocidade máxima por 1 min.

Etapa 4. Todas as amostras da etapa 3 foram giradas a 14000 rpm, 17000g, a 4 °C, por 25 min.

Etapa 5. Sobrenadantes foram filtrados através de 0.45 micron, filtro da seringa de membrana PTFE de 4 mm, (Phenomenex nº AF0-3102-52), 13 microL foram injetados e resolvidos em micron Luna 3, 100A pore, C8(2), 150x3mm, coluna de fase reversa (Phenomenex nº 00F-4248-YO, SN#259151-7) em 50 min de gradiente linear de 40% a 69% de (0.1% de ácido fórmico, 89,9% de acetonitrila, 10% de metanol) a 0.25 ml/min, 100 bar, temperatura de coluna de 37°C.

[00186] Todas as amostras foram processadas em duplicado, 210nm e 230nm de espectrogramas de absorvência, ionização negati-

va e positiva foram gravados.

Tabela 6. Condições de HPLC

Gradiente de HLPC		
tempo min	solvente C %	solvente D %
0	60	40
2	60	40
52	31	69
58	31	69
60	60	40
75	60	40

Solvente C: 0,1% de ácido fórmico em água

Solvente D: 0,1% de ácido fórmico, 89,9% de acetonitrila, 10% de metanol

Resultados:

1. Curva de calibração foi construída com ajuste de R^2 à linearidade = 0,9994 (figura 4).

2. Composto EB foi rapidamente detectado no plasma do rato, tempos de retenção e massa confirmados nos modos de ionização positiva e negativa. .

"M-" = 279,2 100%

"M+" = 281,2 100%

[00187] Peso da fórmula 280, média do tempo de retenção = 26,5 min.

[00188] Os dados brutos e cálculos estão listados na tabela 7.

[00189] Concentrações dos compostos no plasma estão listadas na tabela 8.

Tabela 7					
Animal nº	Tempo de sangramento	Composto EB			
		Área de pico em 210 nm			Concentração no plasma
		período 1	período 2	Meio	microM
rato 1 A	15 min	5588	5530	5559	159
rato 1 B	2 h	7110	7168	7139	206
rato 1 C	8 h	7040	6968	7004	202
rato 2 A	15 min	6446	6363	6404,5	184
rato 2 B	2 h	2699	2710	2704,5	75

rato 2 C	8 h	2581	2563	2572	72
rato 3 A	30 min	1382	1413	1397,5	37
rato 3 B	4 h	923	960	941,5	24
rato 3 C	24 h	153	103	128	0
rato 4 A	30 min	4433	4328	4380,5	125
rato 4 B	4 h	3944	3980	3962	112
rato 4 C	24 h	715	723	719	17
rato 5 A	1 h	13094	13441	13267,5	386
rato 5 B	6 h	1028	1022	1025	26
rato 6 A	1 h	3636	3633	3634,5	103
rato 6 B	6 h	3243	3298	3270,5	92

Tabela 8

Rato, macho, Sprague-Dowley, gavagem oral única, composto EB 100 mg/kg		
		Composto EB, peso da fórmula 280
Animal nº	Tempo de coleta de sangue	Concentração no plasma, microM
rato 1	15 min	159
rato 1	2 h	206
rato 1	8 h	202
rato 2	15 min	184
rato 2	2 h	75
rato 2	8 h	72
rato 3	30 min	37
rato 3	4 h	24
rato 3	24 h	0
rato 4	30 min	125
rato 4	4 h	112
rato 4	24 h	17
rato 5	1 h	386
rato 5	6 h	26
rato 6	1 h	103
rato 6	6 h	92

Tabela 9. Concentrações do composto EB, médias. (Vide também Figura 5).

Tempo	Composto EB µM	Composto EB µg/mL
0	0	0
0,25	171,5	48,02
0,5	81,0	22,8
1	244,5	68,46
2	140,5	39,34
4	68,0	19,04
6	59,0	16,52
8	137,0	38,36
24	8,5	2,38

$T_{1/2}$ Composto EB = 3,99 h

AUC 0-24 Composto EB = 566 µg/mL * h

Cmax Composto EB = 108,08 µg/mL

EXEMPLO 12: Estudo farmacocinético oral de dose única de piloto de rato com composto EC.

[00190] Determinação do perfil do plasma do composto EC seguindo administração de gavagem oral única a ratos machos.

[00191] O composto de teste foi suspenso em 1% de HPMC usando homogeneizador de tecido para minimizar as partículas e maximizar uniformidade da suspensão e armazenado a 4°C. As formulações foram totalmente misturadas pouco antes da administração. Uma dose de 100mg/kg dos compostos de teste ou veículo (1% de HPMC) foi administrada a ratos machos Sprague-Dawley por gavagem oral única. Em pontos no tempo pós-dose de 0,1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas, amostras de sangue (0,4mL) foram coletadas por sangramentos do seio orbital em tubos de K₃EDTA. As amostras de sangue foram centrifugadas dentro de 30 minutos da coleção sob refrigeração (2 a 8°C) por 7 minutos a 6000 rpm. Após centrifugação, o plasma foi coletado em um tubo simples para cada animal em cada ponto no tempo e imediatamente congelado a -80°C até análise usando LC/MS-MS. Dados do tempo de concentração do plasma em série foi submetido a análise farmacocinética usando WinNonlin Standard (v2.1, Pharsight Corporation) e Microsoft EXCEL.

Protocolo:

A. Plasma.

1. Ratos receberam gavagem oral única do composto EC, 100 mg/kg, e plasma foi coletado em determinados momentos.
2. Plasma foi armazenado a -80 °C até o dia da análise.
3. Amostras foram descongeladas em banho a 37°C por 5 min e centrifugadas à velocidade máxima por 10 seg.
4. Plasma do rato, 0.1 mL foi misturado com 0.2 mL de acetonitrila, centrifugado por 1 min, girado a 14000 rpm, 17000g, a 4°C, por 25 min.

5. Sobrenadantes foram filtrados através de 0.45 micron, 4 mm, filtro de seringa de membrana de PTFE (Phenomenex nº AF0-3102-52), e 15 microL foram injetados e resolvidos em um micron Luna 3, 100A pore, C8(2), 150x3mm, coluna de fase reversa (Phenomenex nº 00F-4248-YO, SN#259151-7) em 50 min de gradiente linear de 40% a 69% de (0.1% de ácido fórmico, 89.9% de acetonitrila, 10% de metanol) em 0.25 mL/min, 10,7 mPa(107 bar), temperatura de coluna a 37°C, método 406975M1, sequência AGILENT 0226-09A, Agilent 1100 LC-MS.

[00192] Todas as amostras foram processadas em duplicado, 210nm e 230nm de espectogramas de absorvência, ionização positiva e negativa foram gravados.

B. Curva de calibração.

Etapa 1. Plasma de animais "Veículo" (pooled), 0.19 mL, foi misturado com 0.01 mL de estoque de 20x do Composto EC em Metanol para fazer 500 microM, 250 microM, 125 microM, concentrações do Composto EC no plasma.

Por exemplo: 190 microL de plasma + 10 microL de Composto EC a 10 mM em metanol= 0.2 mL de plasma com 500 microM de Composto EC.

Etapa 2. Amostras da etapa 1 foram centrifugadas por 10 seg à velocidade máxima.

Etapa 3. 0.4 mL de acetonitrila foi adicionado em todas as amostras da etapa 2, e todos os frascos foram centrifugados à velocidade máxima por 1 min.

Etapa 4. Todas as amostras da etapa 3 foram giradas a 14000 rpm, 17000g, a 4°C, por 25 min.

Etapa 5. Sobrenadantes foram filtrados através de 0.45 micron, 4 mm, Filtro de seringa de membrana PTFE (Phenomenex nº AF0-3102-52), 15 microL foram injetados e resolvidos em micron Luna

3, 100A pore, C8(2), 150x3mm, coluna de fase reversa (Phenomenex nº 00F-4248-YO, SN#259151-7) em 50 min de gradiente linear de 40% a 69% de (0.1% de ácido fórmico, 89.9% de acetonitrila, 10% de metanol) em 0.25 mL/min, 107 bar, temperatura de coluna de 37°C.

[00193] Todas as amostras foram processadas em duplicado, 210nm e 230nm de espectogramas de absorvência, ionização positiva e negativa foram gravadas.

Tabela 10. Condições de HPLC

gradiente de HLPC		
tempo min	solvente C %	solvente D %
0	60	40
2	60	40
52	31	69
58	31	69
60	60	40
75	60	40

Solvente C: 0.1% de ácido fórmico em água

Solvente D: 0.1% de ácido fórmico, 89.9% de acetonitrila, 10% de metanol

Resultados:

1. Curva de calibração foi construída com ajuste de R^2 à linearidade = 0.9984 (vide figura 6).

2. Composto EC foi rapidamente detectado no plasma, tempos de retenção e massa confirmados em ambos os modos de ionização positiva e negativa. (vide figura 7).

"M-" = 293.2 100%, 527.2 65%

"M+" = 295.2 100%. Peso da fórmula 294, média do tempo de retenção = 23 min.

Tabela 11 AGILENT LC-MS Sequência 0226-09A					
Plasma do rato nº	Tempo de sangramento H	Composto EC FW 294			
		Área de pico a 210 nm			Concentração no plasma microM
		período 1	período 2	Meio	
7-a	0,25	2012	1993	2002,5	67
7-b	2	979	963	971	29
7-c	8	3059	3061	3060	107
8-a	0,25	3263	3252	3257,5	114
8-b	2	10470	10416	10443	384
8-c	8	7201	7180	7190,5	262
9-a	0,5	1401	1405	1403	45
9-b	4	1156	1134	1145	35
9-c	24	0	0	0	0
10-a	0,5	864	862	863	25
10-b	4	495	509	502	11
10-c	24	147	170	158,5	0
11-a	1	661	650	655,5	17
11-b	6	2479	2471	2475	85
12-a	1	6137	6119	6128	222
12-b	6	2119	2167	2143	73
12-c	6	1846	1865	1855,5	62

Tabela 12. Concentração do Composto EC no Plasma do rato					
Tempo de coleção, H				Média microM	Média microg/mL
	1º sangr.	2º sangr.	3º sangr.		
0,25	67	114		90,5	27
0,5	45	25		35	10
1	17	222		119,5	35
2	29	384		206,5	61
4	35	11		23	7
6	85	73	62	73,33333	22
8	107	262		184,5	54
24	0	0		0	0

C max

Tabela 13.

Concentração do Composto EC no Plasma do Rato.

Tempo de coleção, H	Média microg/mL
0	0
0.25	27
0.5	10
1	35
2	61
4	7
6	22
8	54
24	0

Composto EC Cmax = 61 (µg/mL)

Composto EC AUC₀₋₂₄ = 672.3 (µg*h/mL)

EXEMPLO 13: Estudo farmacocinético de dose oral única de piloto de rato com Composto EG.

[00194] Determinação do perfil do plasma do Composto EG seguindo administração de gavagem oral única em ratos machos.

[00195] O composto de teste foi suspenso em 1% de HPMC usando um homogeneizador para minimizar as partículas e maximizar a uniformidade da suspensão e armazenado a 4°C. As formulações foram completamente misturadas pouco antes da administração. Uma dose de 100mg/kg dos compostos de teste ou veículo (1% de HPMC) foi administrada a ratos machos Sprague-Dawley através da gavagem oral única. Em pontos no tempo pós-dose de 0, 1,2,4,6,8 e 24 horas, amostras de sangue (0.4mL) foram coletadas através de sangramento do seio orbital em tubos de K₃EDTA. As amostras de sangue foram centrifugadas dentro de 30 minutos para coleção sob refrigeração (2 a 8°C) por 7 minutos a 6000 rpm. Após centrifugação, o plasma foi colhido em um tubo simples para cada animal em cada ponto no tempo e imediatamente congelados a -80°C até análise usando LC/MS-MS. Dados do tempo de concentração de plasma em série foram submetidos a análises farmacocinéticas usando WinNonlin Standard (v2.1, Pharsight Corporation) e Microsoft EXCEL.

Protocolo:

A. Plasma.

1. Ratos receberam gavagem oral do Composto EG, 100 mg/kg, e plasma foi coletado em determinados momentos.
2. Plasma foi armazenado a -80 °C até o dia da análise.
3. Amostras foram descongeladas em banho a 37°C por 5 min e centrifugadas à velocidade máxima por 10 seg.
4. Plasma do rato, 0.1 mL foi misturado com 0.2 mL de acetonitrila, centrifugado por 1 min, girado a 14000 rpm, 17000g, a 4°C, por 25 min.

5. Sobrenadantes foram filtrados através 0.45 micron, 4 mm, filtro de seringa de membrana PTFE (Phenomenex nº AF0-3102-52), e 15 microL foram injetados e resolvidos em micron Luna 3, 100A pore, C8(2), 150x3mm, coluna de fase reversa (Phenomenex nº 00F-4248-YO, SN#259151-7) em 50 min gradiente linear de 40% a 69% de (0.1% de ácido fórmico, 89.9% de acetonitrila, 10% de metanol) a 0.25 mL/min, 10,7 mPa (107 bar), temperatura da coluna de 37°C, método 406975M1, AGILENT sequência 0226-09A, Agilent 1100 LC-MS.

[00196] Todas as amostras foram processadas em duplicado, 210nm e 230nm de espectrogramas de absorvência, ionização positiva e negativa foram gravadas.

B. Curva de calibração.

Etapa 1. Plasma de animais "Veículo" (poodle), 0.19 mL, foi misturado com 0.01 mL de estoque de 20x do Composto EG em Metanol para fazer 500 microM, 250 microM, 125 microM, ..., concentrações do Composto EG no plasma.

Por exemplo: 190 microL do plasma + 10 microL do Composto EG em 10 mM em metanol= 0.2 mL do plasma com 500 microM do Composto EG.

Etapa 2. Amostras da etapa 1 foram centrifugadas por 10 seg à velocidade máxima.

Etapa 3. 0.4 mL de acetonitrila foi adicionado a todas as amostras da etapa 2, e todos os frascos foram centrifugados à velocidade máxima por 1 min.

Etapa 4. Todas as amostras da etapa 3 foram giradas a 14000 rpm, 17000g, a 4°C, por 25 min.

Etapa 5. Sobrenadantes foram filtrados através 0.45 micron, 4 mm, f de seringa de membrana PTFE (Phenomenex nº AF0-3102-52), 15 microL foram injetados e resolvidos em micron Luna 3, 100A pore, C8(2), 150x3mm, coluna de fase reversa (Phenomenex nº

00F-4248-YO, SN#259151-7) em 50 min gradiente linear de 40% a 69% de (0.1% de ácido fórmico, 89.9% de acetonitrila, 10% de metanol) a 0.25 mL/min, 10,7 mPa (107 bar), temperatura de coluna de 37°C.

[00197] Todas as amostras foram processadas em duplicado, 210nm e 230nm de espectrogramas de absorvência, ionização positiva e negativa foram gravadas.

Tabela 14. Condições de HPLC

Gradiente de HLPC		
tempo min	solvente C %	solvente D %
0	60	40
2	60	40
52	31	69
58	31	69
60	60	40
75	60	40

Solvente C: 0.1% de ácido fórmico em água

Solvente D: 0.1% de ácido fórmico, 89.9% de acetonitrila, 10% de metanol

Resultados:@

1. Curva de calibração foi construída com ajuste de R^2 à linearidade = 0.9997 (vide figura 8).

2. Composto EG foi rapidamente detectado no plasma, tempos de retenção e massas confirmados em ambos os modos de ionização positiva e negativa. (vide figura 9).

"M-" = 307.2 100%

"M+" = 309.2 100%. Peso da fórmula 308, média do tempo de retenção = 30 min.

Dados brutos e cálculos

Tabela 15. Concentração do Composto EG no plasma do rato.					
		Composto EG, peso da fórmula 308			
Plasma do rato nº	Tempo de sangramento h	Área de pico a 210 nm			Concentração no plasma, microM
		período 1	período 2	Meio	
13-a	0,25	1484	1410	1447	27
13-b	2	2799	2739	2769	50
13-c	8	172	191	181,5	5
14-a	0,25	1023	992	1007,5	19
14-b	2	1390	1362	1376	25
14-c	8	989	1029	1009	19
15-a	0,5	1533	1596	1564,5	29
15-b	4	702	764	733	14
15-c	24	0	0	0	2
16-a	0,5	966	979	972,5	18
16-b	4	1234	1206	1220	23
16-c	24	0	0	0	0
17-a	1	5424	5478	5451	101
17-b	6	520	472	496	10
18-a	1	2364	2322	2343	42
18-b	6	887	937	912	17

Tabela 16. Concentração do Composto EG no Plasma do Rato				
Tempo de coleta, h	1º sangr.	2º sangr.	Média microM	Média microg/mL
0,25	27	19	23	7
0,5	29	18	24	7
1	101	42	72	22
2	25	50	38	12
4	14	23	19	6
6	10	17	14	4
8	5	19	12	4
24	2	0	1	0

C max

Tabela 17

Concentração do Composto EG no Plasma do Rato.

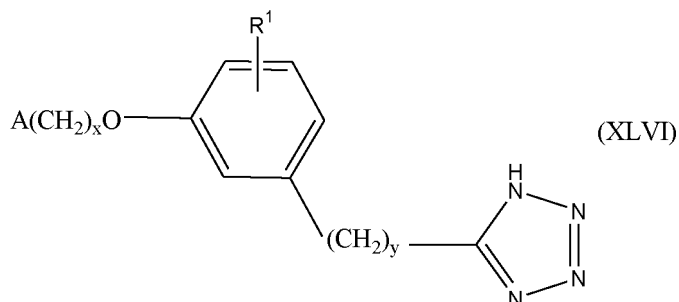
Tempo de coleta, h	Média microg/mL
0	0
0.25	7
0.5	7
1	22
2	12
4	6
6	4
8	4
24	0

Composto EG FW308 Cmax = 22 (µg/mL)

Composto EG FW 308 AUC₀₋₂₄ = 94.9 (µg*h/mL)

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de ser representado pela fórmula XLVI:



na qual

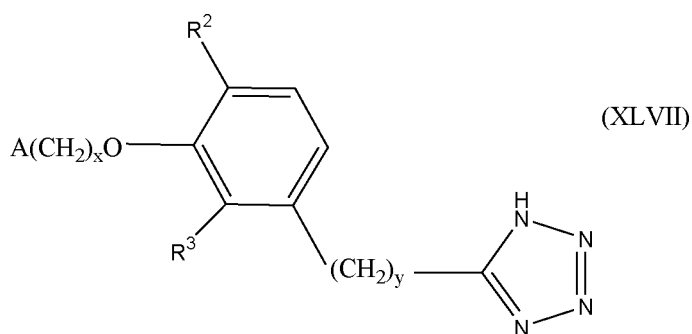
x é 1 ou 2;

y é 0, 1, 2 ou 3;

R¹ é selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, alquila tendo 1 ou 2 átomos de carbono, hidróxi, alcóxi tendo 1 ou 2 átomos de carbono, flúor, cloro, bromo, e amino; e

A é 2,6-dimetilfenila.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser representado pela fórmula XLVII:



na qual

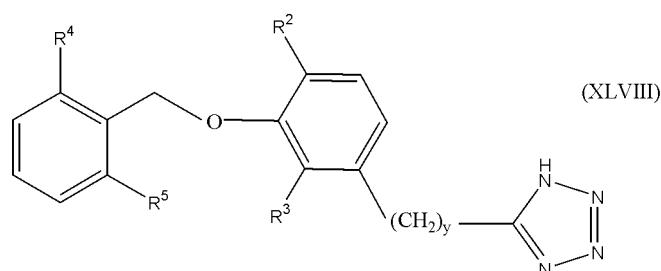
x é 1 ou 2;

y é 0, 1, 2 ou 3;

um de R² e R³ é hidrogênio e o outro é selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, alquila tendo 1 ou 2 átomos de carbono, hidróxi, alcóxi tendo 1 ou 2 átomos de carbono, flúor, cloro, bromo, e amino; e

A é 2,6-dimetilfenila.

3. Composto de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de ser representado pela fórmula XLVIII:



na qual

y é 0, 1 ou 2;

um de R² e R³ é hidrogênio e o outro é selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, alquila tendo 1 ou 2 átomos de carbono, hidróxi, alcóxi tendo 1 ou 2 átomos de carbono, flúor, cloro, bromo, e amino; e

R⁴ é metila, e R⁵ é metila.

4. Composto de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que R³ é hidrogênio; R² é selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, metila, metóxi; R⁴ é metila; e R⁵ é metila.

5. Composto de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo em:

5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)fenil)-1*H*-tetrazol;

5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)benzil)-1*H*-tetrazol;

5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metoxibenzil)-1*H*-tetrazol;

5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)fenetil)-1*H*-tetrazol; e

5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-4-metilbenzil)-1*H*-tetrazol.

6. Composto de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo em:

5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metilbenzil)-1*H*-tetrazol; e

5-(3-(2,6-Dimetilbenzilóxi)-2-metoxibenzil)-1*H*-tetrazol.

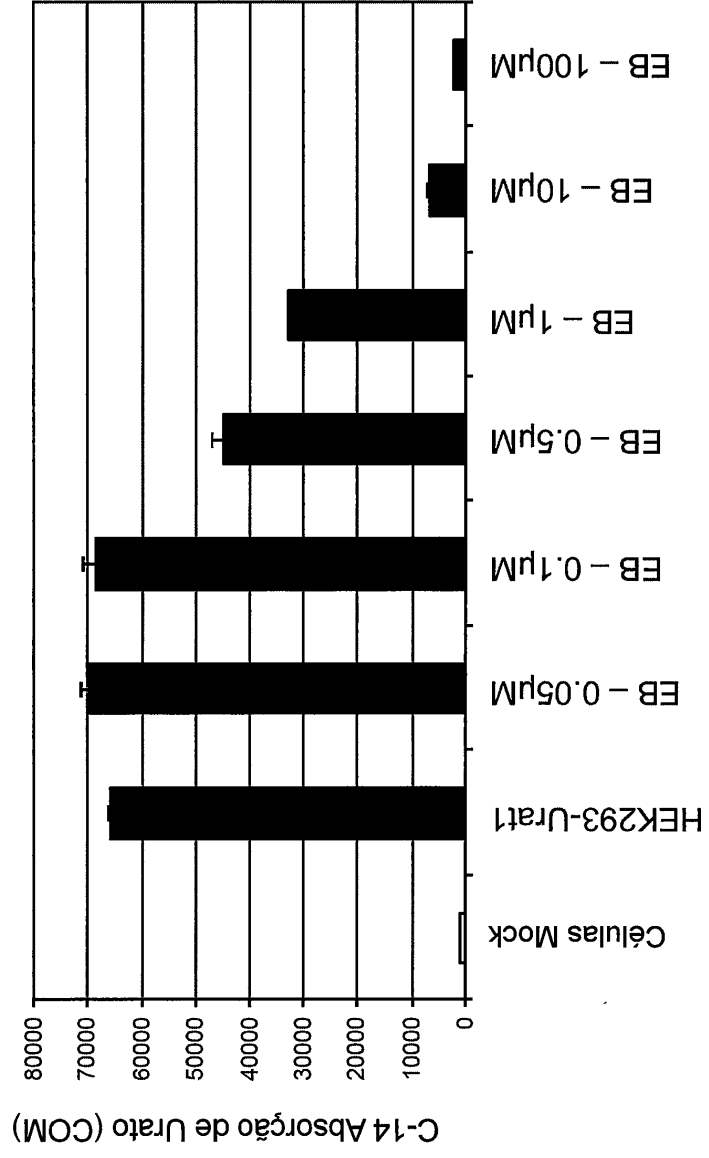


FIG. 1

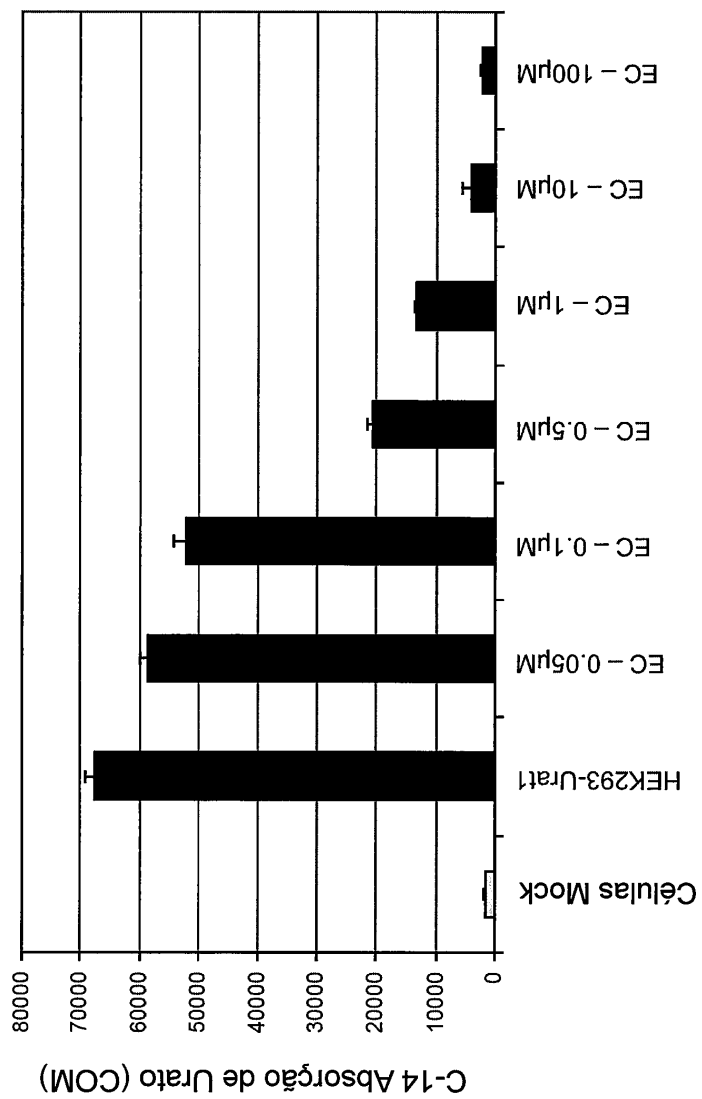


FIG. 2

FIG. 3

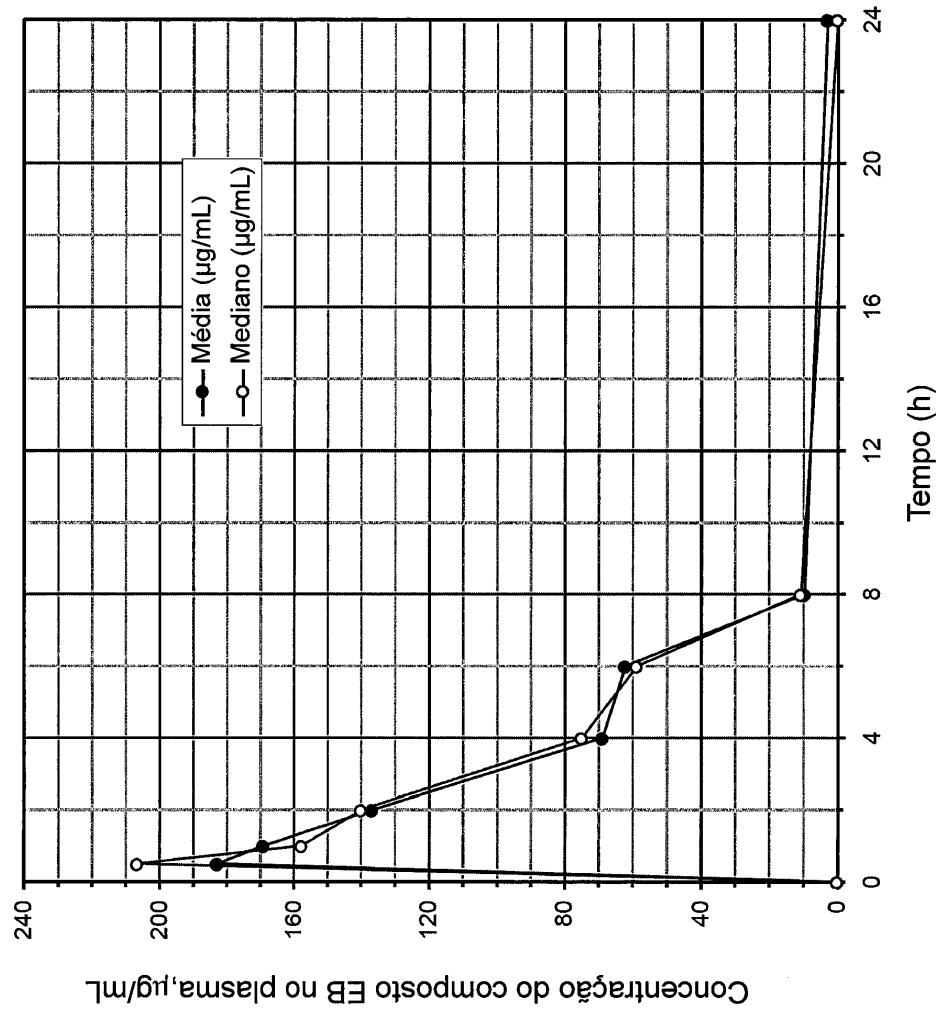


FIG. 4

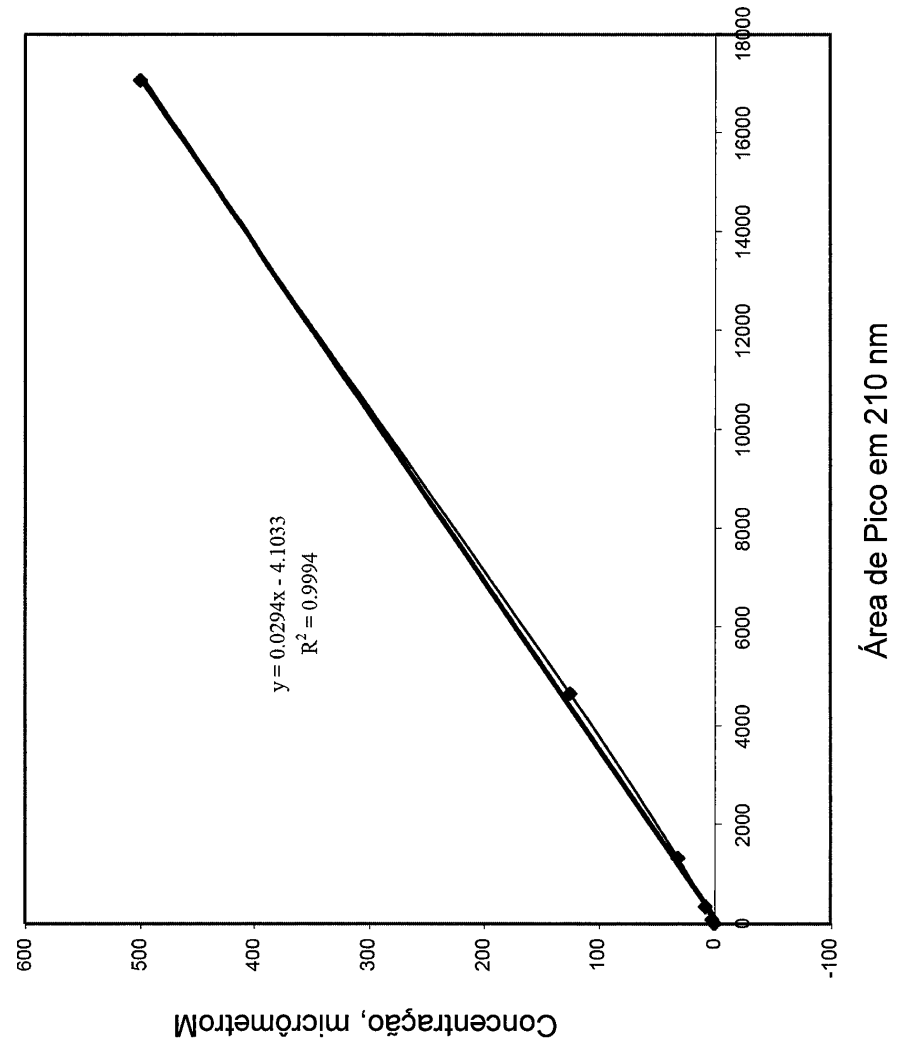


FIG. 5

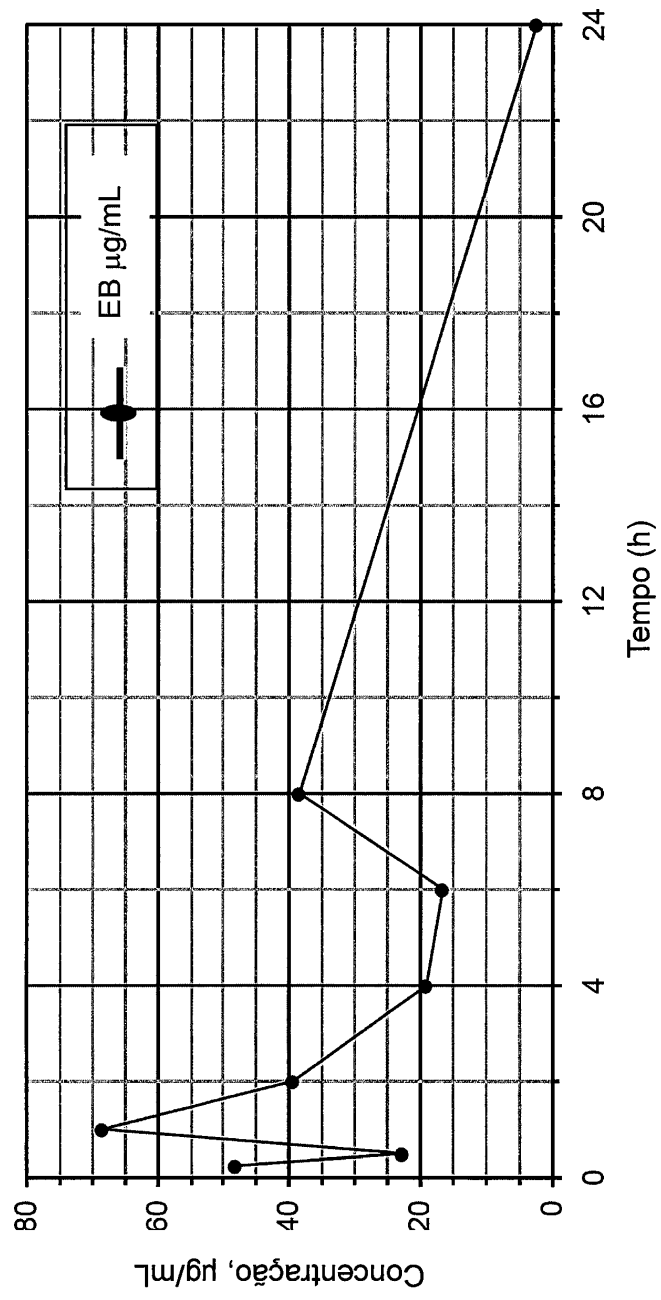
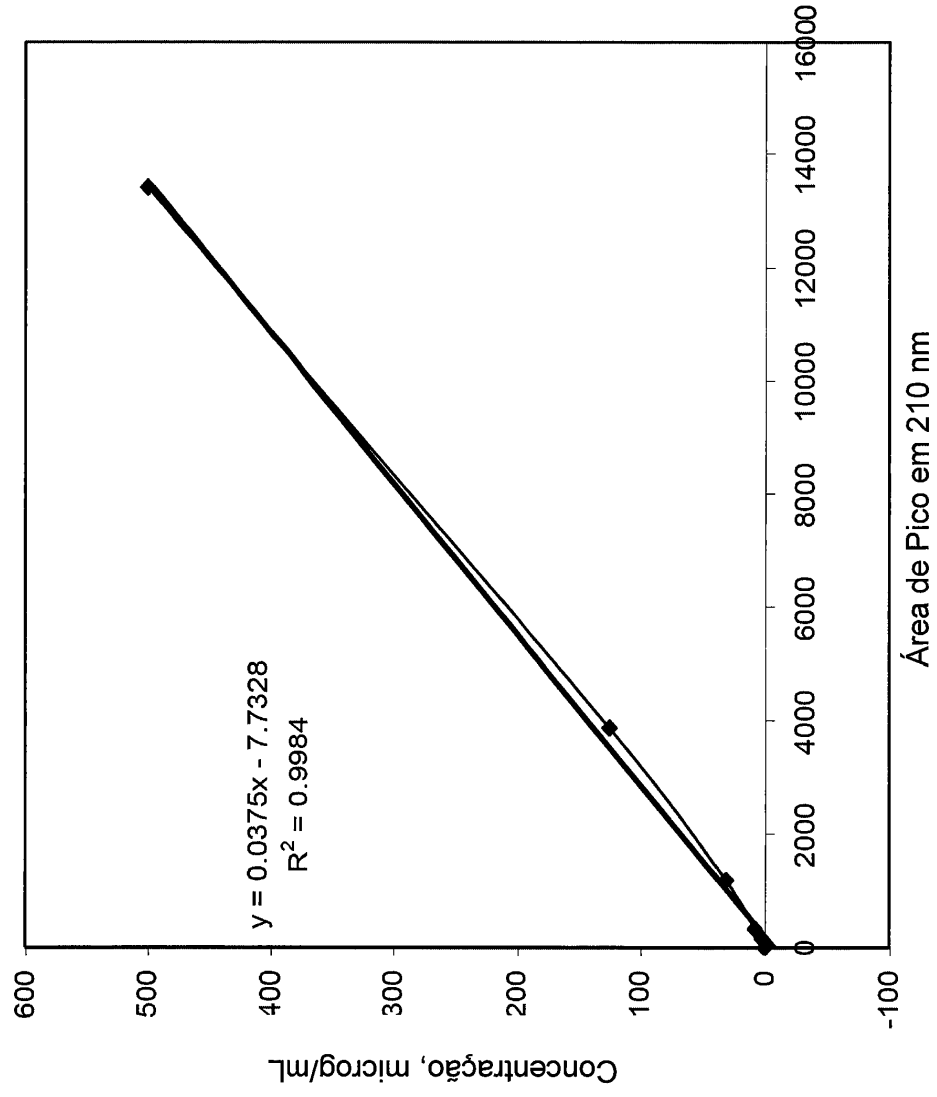


FIG. 6



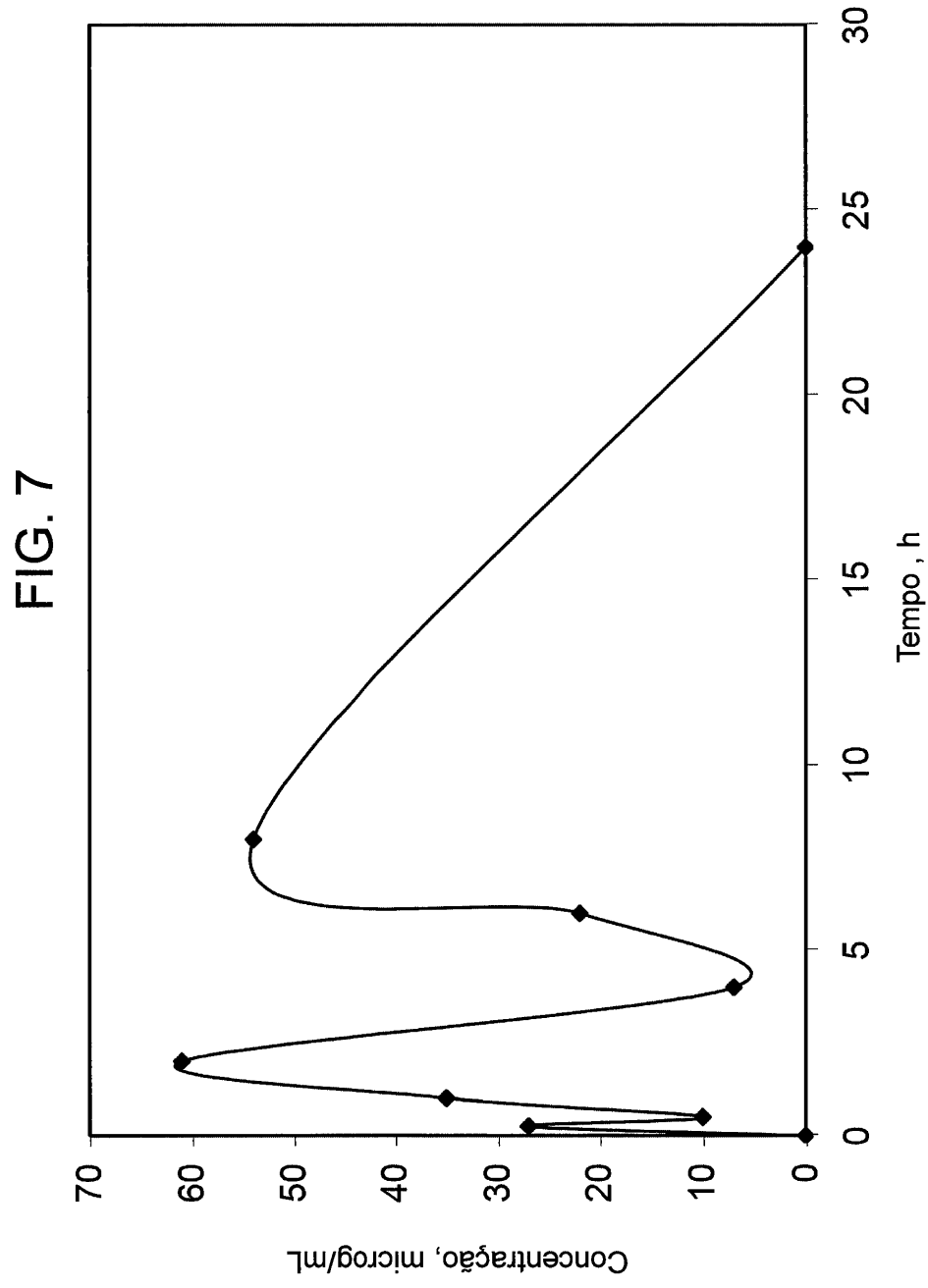


FIG. 8

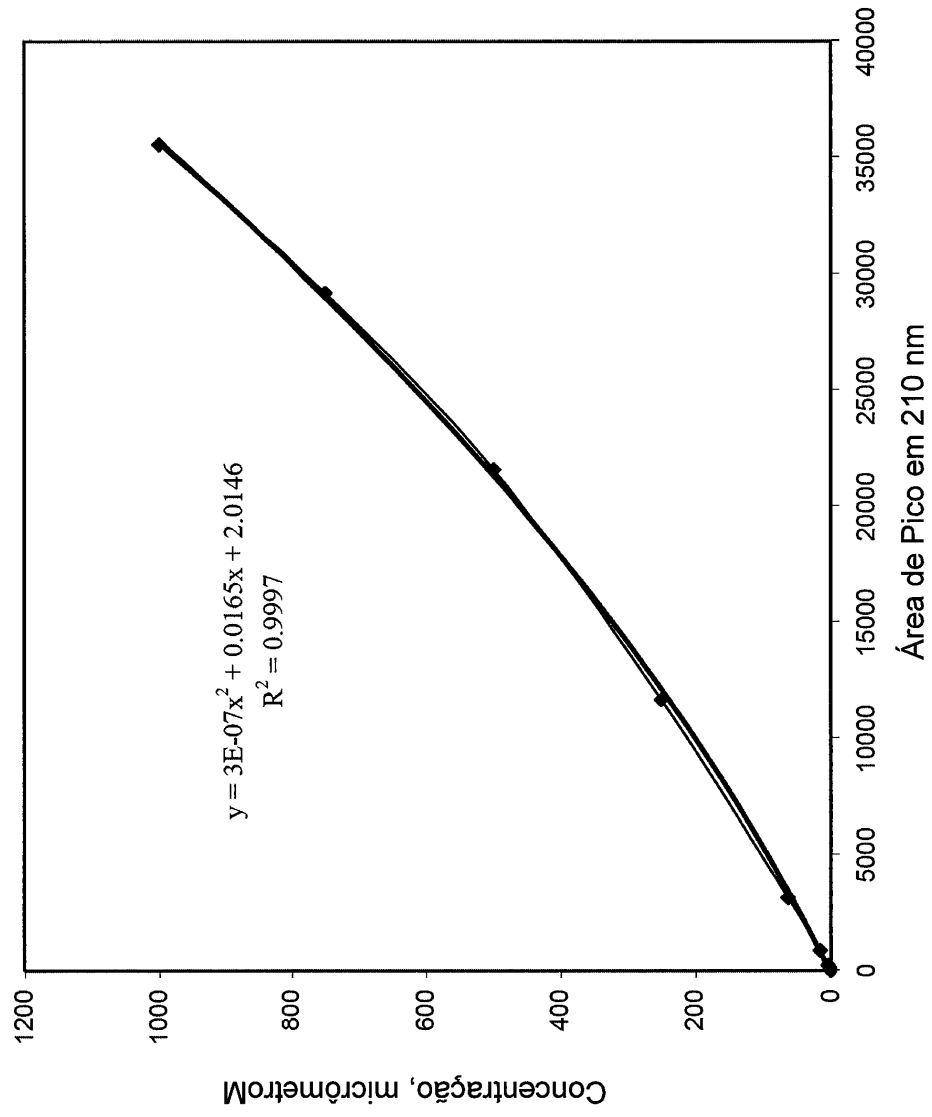


FIG. 9

