



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

(11) PI 0412314-0 B1



(22) Data do Depósito: 06/07/2004

(45) Data de Concessão: 06/03/2019

(54) Título: COMPOSTO 3-[2(R)-{HIDROXICARBONILPROPILO-AMINO}-2-FENILETIL]-5-(2-FLÚOR-3-METOXIFENIL)-1-[2-FLÚOR-6-(TRIFLUOROMETIL)BENZIL]-6-METIL-PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO DITO COMPOSTO E USO DO MESMO PARA O TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO RELACIONADA AO HORMÔNIO SEXUAL

(51) Int.Cl.: A61K 31/513; C07D 239/54; C07D 401/12; C07D 405/04; A61P 5/02.

(30) Prioridade Unionista: 07/07/2003 US 60/485,434.

(73) Titular(es): NEUROCRINE BIOSCIENCES, INC..

(72) Inventor(es): ZHIQIANG GUO; YONGSHENG CHEN; DONGPEI WU; CHEN CHEN; WARREN WADE; WESLEY J. DWIGHT; CHARLES Q. HUANG; FABIO C. TUCCI.

(86) Pedido PCT: PCT US2004021593 de 06/07/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/007165 de 27/01/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/01/2006

(57) Resumo: "DERIVADOS DE PIRIMIDINA-2,4-DIONA COMO AXTAGONISTAS DE RECEPTOR DE HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROPINA". São descritos antagonistas de receptor de GnRH, os quais têm utilidade no tratamento de uma variedade de condições relacionadas a hormônios sexuais, tanto em homens como em mulheres. Os compostos dessa invenção têm a estrutura: em que R~ 1a~, R~ 1b~, R~ 1c~, R~ 2a~, R~ 2b~, R~ 3~, R~ 4~, R~ 5~, R~ 6~, e X são como definidos aqui, incluindo estereoisômeros, pró-drogas e sais farmaceuticamente aceitáveis destes. São também descritas composições contendo um composto dessa invenção em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável, bem como métodos relacionados ao uso das mesmas para antagonizar hormônio liberador de gonadotropina em um paciente que necessite destes.

“COMPOSTO 3-[2(R)-{HIDROXICARBONILPROPIL-AMINO}-2-FENILETIL]-5-(2-FLÚOR-3-METOXIFENIL)-1-[2-FLÚOR-6-(TRIFLUOROMETIL)BENZIL]-6-METIL-PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO DITO COMPOSTO E USO DO MESMO PARA O TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO RELACIONADA AO HORMÔNIO SEXUAL”

DECLARAÇÃO DE INTERESSE DO GOVERNO

[001]O financiamento parcial para esse trabalho aqui descrito foi fornecido pelo Governo dos E.U.A. sob a Concessão Nº 1-R43-HD38625 e 2R44-HD38625-02 fornecidas pelo National Institutes of Health. O Governo norte-americano pode ter determinados direitos sobre essa invenção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

[002]Essa invenção refere-se genericamente a antagonis-tas de receptor de hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), e a métodos para tratar distúrbios pela administração de tais antagonistas a um animal de sangue quente que necessita dos mesmos.

Descrição da Técnica Relacionada

[003]Hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), também conhecido como hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH), é um decapeptídeo (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) que desempenha um papel importante na reprodução humana. GnRH é liberado do hipotálamo e age na glândula pituitária para estimular a biossíntese e liberação de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH). LH liberado da glândula pituitária é responsável pela regulação de produção de esteróides gonadais tanto em machos como em fêmeas, enquanto FSH regula espermatogênese em macho e desenvolvimento folicular em fêmeas.

[004]Devido a sua importância biológica, antagonistas e agonistas sintéticos para GnRH têm sido o foco de atenção considerável, particularmente no contexto de câncer de próstata, câncer de mama, endometriose, leiomioma uterino (fibróides), câncer do ovário, hiperplasia da próstata, terapia reprodutiva assistida e puberdade precoce (The Lancet 358:1793-1803, 2001; Mol. Cell. Endo. 166:9-14, 2000). Por exemplo, agonistas do GnRH peptídicos, tais como leuprorelina (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-d-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt), têm sido usados para tratar tais condições. Tais agonistas parecem funcionar por ligação ao receptor de GnRH nas gonadotropinas pituitárias, induzindo, assim, a síntese e liberação de gonadotropinas. Administração crônica de agonistas GnRH esgota as gonadotropinas e subseqüentemente infra-regula o receptor, resultando em supressão de hormônios esteróides após algum período de tempo (por exemplo, da ordem de 2 a 3 semanas depois da administração crônica).

[005]Em contraste, acredita-se que antagonistas de GnRH suprimem gonadotropinas desde o início, e assim têm recebido maior atenção durante as duas décadas passadas. Até esta data, alguns dos obstáculos primários para o uso clínico de tais antagonistas têm sido sua biodisponibilidade relativamente baixa e efeitos colaterais adversos provocados por liberação de histamina. Contudo, vários antagonistas peptídicos com propriedades de baixa liberação de histamina foram reportados, embora eles ainda devam ser distribuídos via rotas de distribuição controlada (tal como injeção subcutânea ou spray intranasal) devido a biodisponibilidade limitada.

[006]Em vista das limitações associadas aos antagonistas de GnRH peptídicos, vários compostos não-peptídicos foram propostos. Por exemplo, Cho et al. (J. Med. Chem. 41:4190-4195, 1998) descrevem tieno[2,3-b]piridin-4-onas para uso como antagonistas de receptor de GnRH; as patentes US 5.780.437 e US 5.849.765 ensinam indóis substituídos como antagonistas de receptor de GnRH

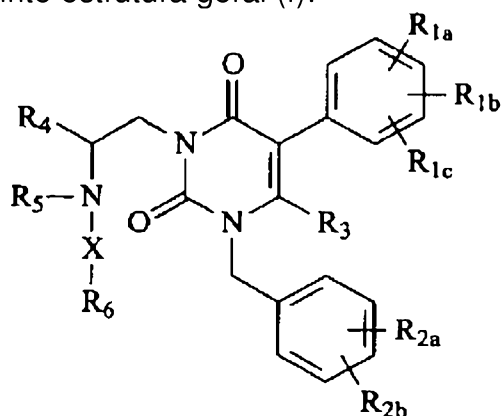
(como também publicados nos pedidos PCT WO 97/21704, 98/55479, 98/55470, 98/55119, 97/21707, 97/21703 e 97/21435); PCT publicado WO 96/38438 descreve diazepinas tricíclicas como antagonistas de receptor de GnRH; pedidos publicados PCT WO 97/14682, 97/14697 e 99/09033 descrevem derivados de quinolina e tienopiridina como antagonistas de GnRH; pedidos publicados PCT WO 97/44037, 97/44041, 97/44321 e 97/44339 ensinam quinolin-2-onas substituídas como antagonistas de receptor de GnRH; e o pedido publicado PCT WO 99/33831 descreve compostos bicíclicos contendo nitrogênio, fundidos substituídos com fenila como antagonistas de receptor de GnRH. Pedidos PCT recentemente publicados WO 02/066459 e WO 02/11732 descrevem o uso de derivados de indol e novos derivados de pirrolidina bicíclicos e tricíclicos como antagonistas de GnRH, respectivamente. Outros pedidos PCT recentemente publicados, que descrevem compostos e seu uso como antagonistas de GnRH incluem WO 00/69859, WO 01/29044, WO 01/55119, WO 03/013528, WO 03/011870, WO 03/011841, WO 03/011839 e WO 03/011293.

[007]Embora passos significativos tenham sido dados nesse campo, ainda existe uma necessidade na técnica por antagonistas de receptor de GnRH de molécula pequena eficazes. Há também uma necessidade por composições farmacêuticas contendo antagonistas de receptor de GnRH, bem como por métodos relativos ao uso destes para tratar, por exemplo, condições relacionadas a hormônios sexuais. A presente invenção preenche essas necessidades e proporciona outras vantagens relacionadas.

BREVE RESUMO DA INVENÇÃO

[008]Em resumo, essa invenção é genericamente relacionada a antagonistas de receptor de hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), bem como a métodos para sua preparação e uso, e a composições farmacêuticas contendo os mesmos.

Mais especificamente, os antagonistas de receptor de GnRH desta invenção são compostos tendo a seguinte estrutura geral (I):



(I)

incluindo estereoisômeros, pró-drogas e sais farmaceuticamente aceitáveis destes, em que R_{1a}, R_{1b}, R_{1c}, R_{2a}, R_{2b}, R₃, R₄, R₅, R₆ e X são conforme definidos abaixo.

[009] Os antagonistas de receptor de GnRH dessa invenção têm utilidade em uma grande extensão de aplicações terapêuticas, e podem ser usados para tratar uma variedade de condições relacionadas a hormônios sexuais, tanto em homens como em mulheres, bem como em um mamífero em geral (também referido aqui como um “paciente”). Por exemplo, tais condições incluem endometriose, fibróides uterinos, doença de ovário policístico, hirsutismo, puberdade precoce, neoplasia dependente de esteróide gonadal, tais como cânceres da próstata, mama e ovário, adenomas pituitários gonadotróficos, apnéia do sono, síndrome do intestino irritável, síndrome pré-menstrual, hipertrofia prostática benigna, contracepção e infertilidade (por exemplo, terapia reprodutiva assistida tal como fertilização *in vitro*). Os compostos dessa invenção são também úteis como um adjuvante no tratamento de deficiência de hormônio do crescimento e estatura pequena, e para o tratamento de lúpus eritematoso sistêmico. Os compostos são também úteis em combinação com androgênios, estrogênios e progesteronas, e antiestrogênios e antiprogestógenos para o tratamento de endometriose, fibróides, e na contracepção, bem como em

combinação com um inibidor da enzima conversora de angiotensina, um antagonista de receptor da angiotensina II, ou um inibidor de renina para o tratamento de fibróides uterinos. Adicionalmente, os compostos podem ser usados em combinação com bisfosfonatos e outros agentes para o tratamento e/ ou prevenção de distúrbios do metabolismo do cálcio, fosfato e ósseo, e em combinação com estrogênios, progesteronas e/ ou androgênios para a prevenção ou tratamento de perda óssea ou de sintomas hipogonadais, tais como calores repentinos durante a terapia com um antagonista de GnRH.

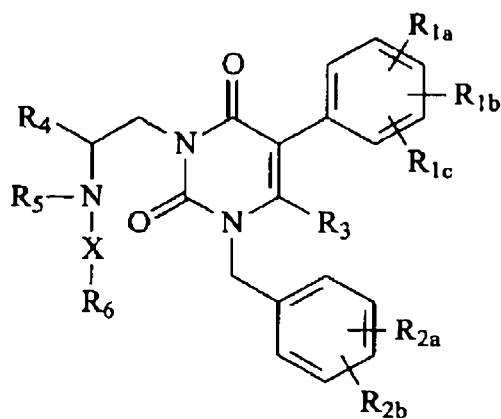
[0010]Os compostos da presente invenção, além de sua atividade de antagonista de receptor de GnRH, possuem uma interação reduzida com as principais enzimas metabólicas no fígado, isto é, as enzimas Citocromo P450. Essa família de enzimas, que inclui os subtipos CYP2D6 e CYP3A4, é responsável pelo metabolismo de drogas e toxinas levando a sua eliminação do corpo. Inibição dessas enzimas pode levar a condições ameaçadoras da saúde, onde a enzima não é capaz de realizar essa função.

[0011]Os métodos dessa invenção incluem a administração de uma quantidade eficaz de um antagonista de receptor de GnRH, preferivelmente na forma de uma composição farmacêutica, a um mamífero que necessite deste. Assim, uma outra modalidade refere-se a composições farmacêuticas contendo um ou mais antagonistas de receptor de GnRH dessa invenção em combinação com um veículo e/ ou diluente farmacêuticamente aceitável.

[0012]Esses e outros aspectos da invenção tornar-se-ão aparentes mediante referência à seguinte descrição detalhada. Para essa finalidade, várias referências são mostradas aqui, as quais descrevem em mais detalhes certas informações fundamentais, procedimentos, compostos e/ ou composições, e são aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0013] Como mencionado acima, a presente invenção refere-se genericamente a compostos úteis como antagonistas de receptor de hormônio liberador de gonadotropina (GnRH). Os compostos dessa invenção têm a seguinte estrutura (I):



(I)

ou um estereoisômero, pró-droga ou sal farmaceuticamente aceitável deste, em que:

R_{1a}, R_{1b} e R_{1c} são os mesmos ou diferentes e, independentemente, hidrogênio, halogênio, alquila C₁₋₄ ou alcóxi; ou R_{1a} e R_{1b} tomados juntos formam –OCH₂O– ou –OCH₂CH₂–;

R_{2a} e R_{2b} são os mesmos ou diferentes e, independentemente, hidrogênio, halogênio, trifluormetila, ciano ou –SO₂CH₃;

R₃ é hidrogênio ou metila;

R₄ é fenila ou alquila C₃₋₇;

R₅ é hidrogênio ou alquila C₁₋₄;

R₆ é –COOH ou um isómero ácido; e

X é –O–(alcanodiila C₁₋₆) opcionalmente substituída com de 1 a 3 grupos alquila C₁₋₆.

[0014] Como usado aqui, os termos acima têm os seguintes significados:

[0015] “Alquila C₁₋₆” significa um hidrocarboneto alifático, saturado ou insaturado, não-cíclico ou cíclico, de cadeia reta ou ramificada contendo de 1 a 6

átomos de carbono. Alquilas de cadeia reta, saturada, representativas incluem metila, etila, n-propila, n-butila, n-pentila, n-hexila e similares; enquanto alquilas, ramificadas, saturadas incluem isopropila, sec-butila, isobutila, ter-butila, isopentila e similares. Alquilas cíclicas, saturadas, representativas, incluem ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, cicloexila e similares; enquanto alquilas, cíclicas, insaturadas incluem ciclopentenila e cicloexenila e similares. Alquilas insaturadas contêm pelo menos uma ligação dupla ou tripla entre átomos de carbono adjacentes (referidas como uma “alquenila” ou “alquinila”, respectivamente). Alquenilas de cadeia reta e ramificada representativas incluem etilenila, propilenila, 1-butenila, 2-butenila, isobutilenila, 1-pentenila, 2-pentenila, 3-metil-1-butenila, 2-metil-2-butenila, 2,3-dimetil-2-butenila e similares; enquanto alquinilas de cadeia reta ou ramificada representativas incluem acetilenila, propinila, 1-butinila, 2-butinila, 1-pentinila, 2-pentinila, 3-metil-1-butinila e similares.

[0016]“Alquila C₁₋₄” significa um hidrocarboneto não-cíclico ou cíclico, de cadeia reta ou ramificada contendo de 1 a 4 átomos de carbono. Alquilas de cadeia reta representativas incluem metila, etila, n-propila, n-butila e similares; alquilas ramificadas incluem isopropila, sec-butila, isobutila, ter-butila e similares; enquanto alquilas cíclicas incluem ciclopropila e similares.

[0017]“Alquila C₃₋₇” significa um hidrocarboneto não-cíclico ou cíclico, de cadeia reta ou ramificada contendo de 3 a 7 átomos de carbono. Alquilas de cadeia reta ou ramificada representativas incluem n-propila, n-butila, n-hexila e similares; enquanto alquilas ramificadas incluem isopropila, sec-butila, isobutila, ter-butila, isopentila e similares. Alquilas cíclicas representativas incluem ciclopropila, ciclopentila, cicloexila e similares.

[0018]“Alcanodiila C₁₋₆” significa uma alquila C₁₋₆ divalente a partir da qual dois átomos de hidrogênio são tomados do mesmo átomo de carbono ou de

diferentes átomos de carbono, tais como $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-$ e similares.

[0019]“Halogênio” significa flúor, cloro, bromo ou iodo, tipicamente, flúor e cloro.

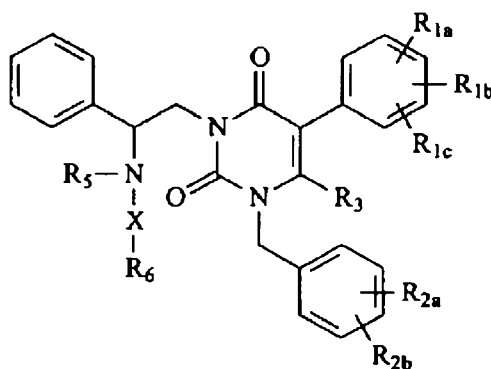
[0020]“Hidróxi” significa $-\text{OH}$.

[0021]“Alcóxi” significa $-\text{O}$ -(alquila C_{1-6}).

[0022]“Ciano” significa $-\text{CN}$.

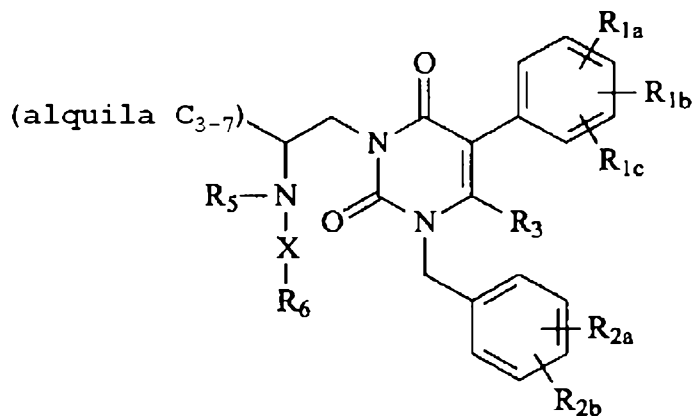
[0023]“Isóstero ácido” significa uma fração que exhibe propriedades similares a ácido carboxílico e que tem um pK_a de menos que 8, e, preferivelmente, menos que 7. Isósteros ácidos representativos incluem tetrazol, 3H-[1,3,4]oxadiazol-2-ona, [1,2,4]oxadiazol-3-ona, 1,2-diidro-[1,2,4]triazol -3-ona, 2H-[1,2,4]oxadiazol-5-ona, triazol substituído com um grupo sulfonila ou grupo sulfóxido, imidazol substituído com um grupo sulfonila ou sulfóxido, [1,2,4]-oxadiazolidina-3,5-diona, [1,2,4]-tiadiazolidina-3,5-diona, imidazolidina-2,4-diona, imidazolidina-2,4,5-triona, pirrolidina-2,5-diona e pirrolidina-2,3,5-triona. Isósteros ácidos incluem também $-\text{C}(=\text{O})\text{NHSO}_2\text{NR}_a\text{R}_b$, $\text{C}(=\text{O})\text{NHSO}_2\text{R}_b$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHC}(=\text{O})\text{NR}_a\text{R}_b$ e $-\text{C}(=\text{O})\text{NHC}(=\text{O})\text{R}_b$, onde R_a é hidrogênio ou alquila C_{1-4} e R_b é alquila C_{1-4} .

[0024]Em uma modalidade da invenção, R_4 é fenila e antagonistas de GnRH representativos da presente invenção incluem compostos tendo a seguinte estrutura (II):



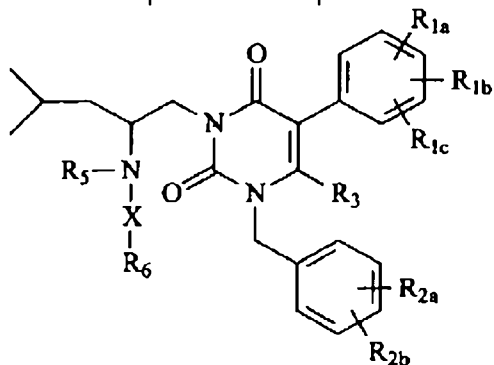
(II)

[0025] Em uma outra modalidade, R_4 é alquila C_{3-7} e antagonistas de GnRH representativos da presente invenção incluem compostos tendo a seguinte estrutura (III).

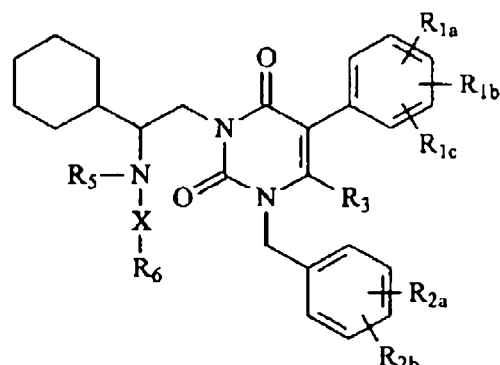


(III)

[0026] Em modalidades mais específicas de estrutura (III), alquila C_{3-7} inclui uma alquila C_{3-7} de cadeia reta ou ramificada tal como isobutila conforme representada pela estrutura (IV), ou é uma alquila cíclica C_{3-7} , tal como cicloexila conforme representada pela estrutura (V):



(IV)



(V)

[0027] Em uma outra modalidade, R_{1a} , R_{1b} e R_{1c} são hidrogênio, alcóxi ou halogênio, respectivamente. Um padrão representativo de substituição inclui 2-halo-3-alcóxi-fenila. Grupos alcóxi representativos incluem metóxi e etóxi, enquanto frações de halogênio representativas incluem flúor e cloro.

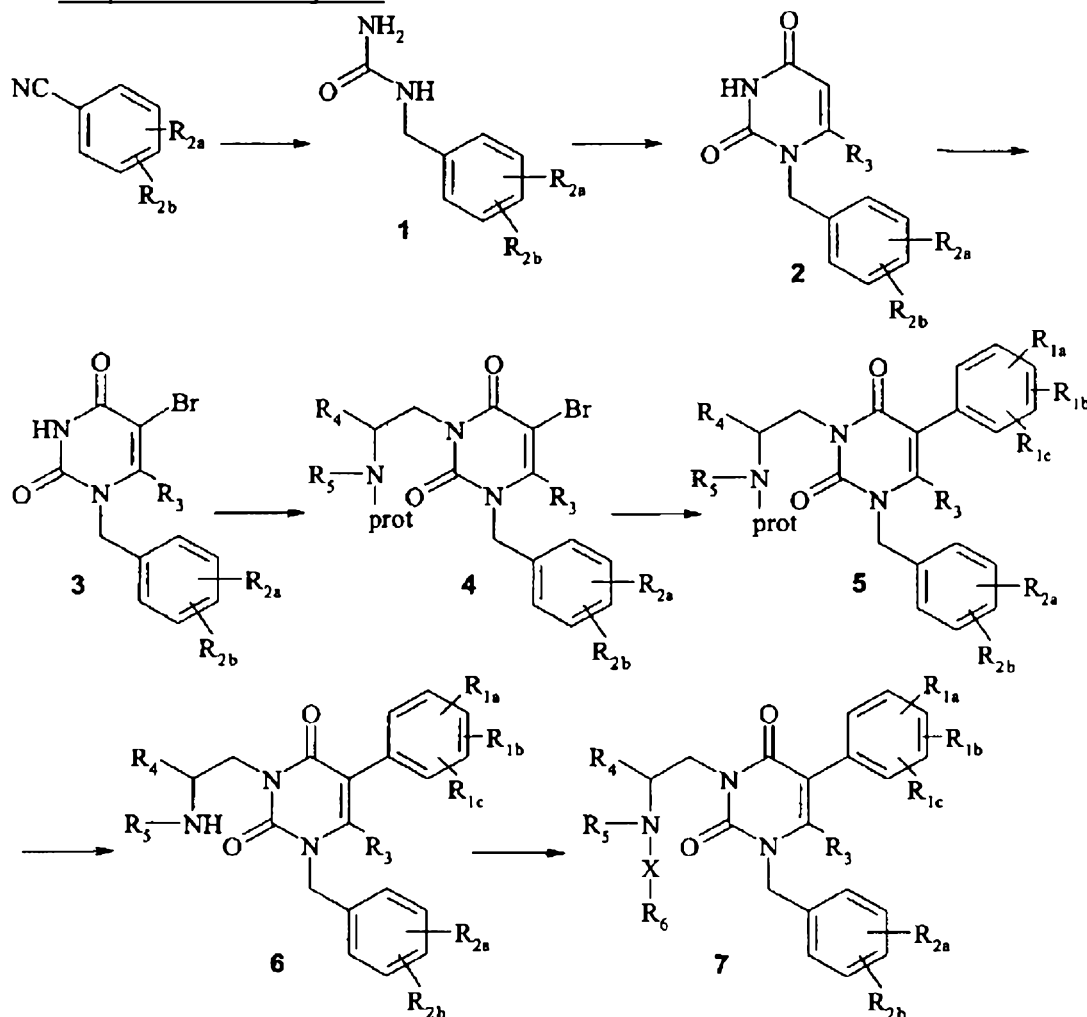
[0028] Em uma outra modalidade alternativa, R_{1a} e R_{1b} tomados juntos formam $-OCH_2O-$, tal como 3,4-metileno-dióxi.

[0029] Em uma outra modalidade, R_{2a} e R_{2b} são hidrogênio, trifluormetila, halogênio ou $-\text{SO}_2\text{CH}_3$. Um padrão de substituição representativo inclui R_{2a} como halogênio na posição 2 e R_{2b} como hidrogênio, trifluormetila, halogênio ou $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ na posição 6.

[0030] Outras modalidades incluem aquelas em que R_5 é H ou metila; R_6 é $-\text{COOH}$ e/ ou X é $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ou $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

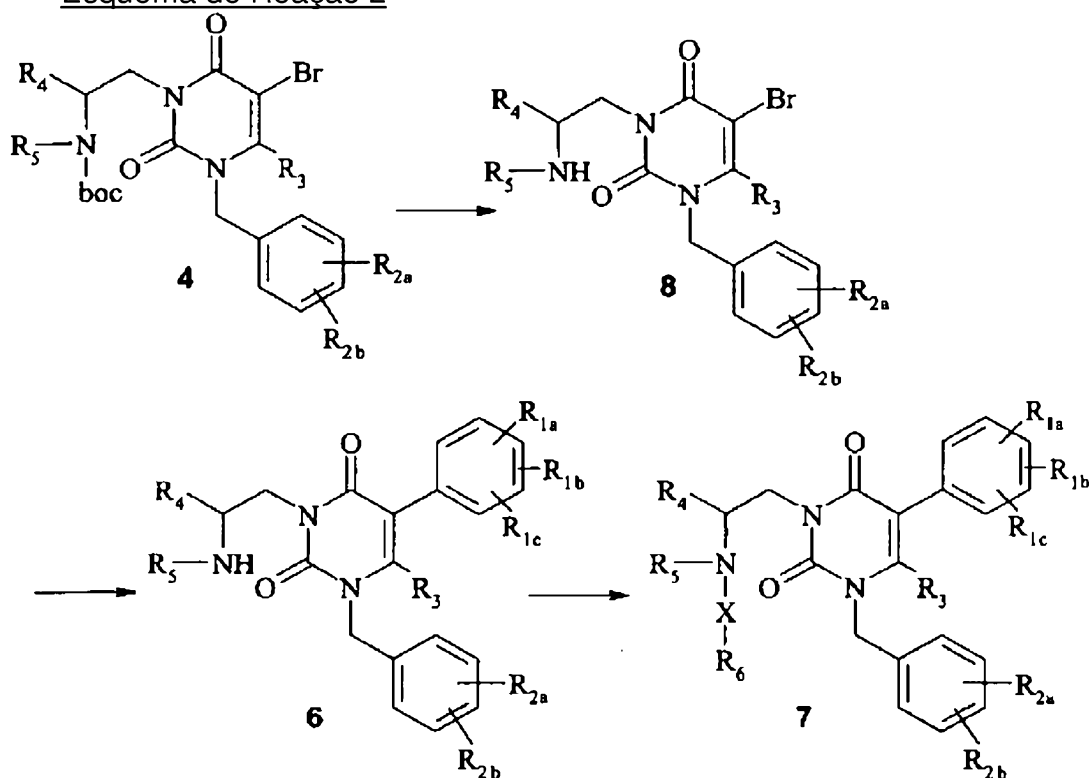
[0031] Os compostos da presente invenção podem ser preparados por técnicas de síntese orgânica conhecidas, incluindo os métodos descritos em maiores detalhes nos Exemplos. Em geral, os compostos de estrutura (I) acima podem ser feitos pelos seguintes esquemas de reação, em que todos os substituintes são como definidos acima, a menos que indicado de outro modo.

Esquema de Reação 1



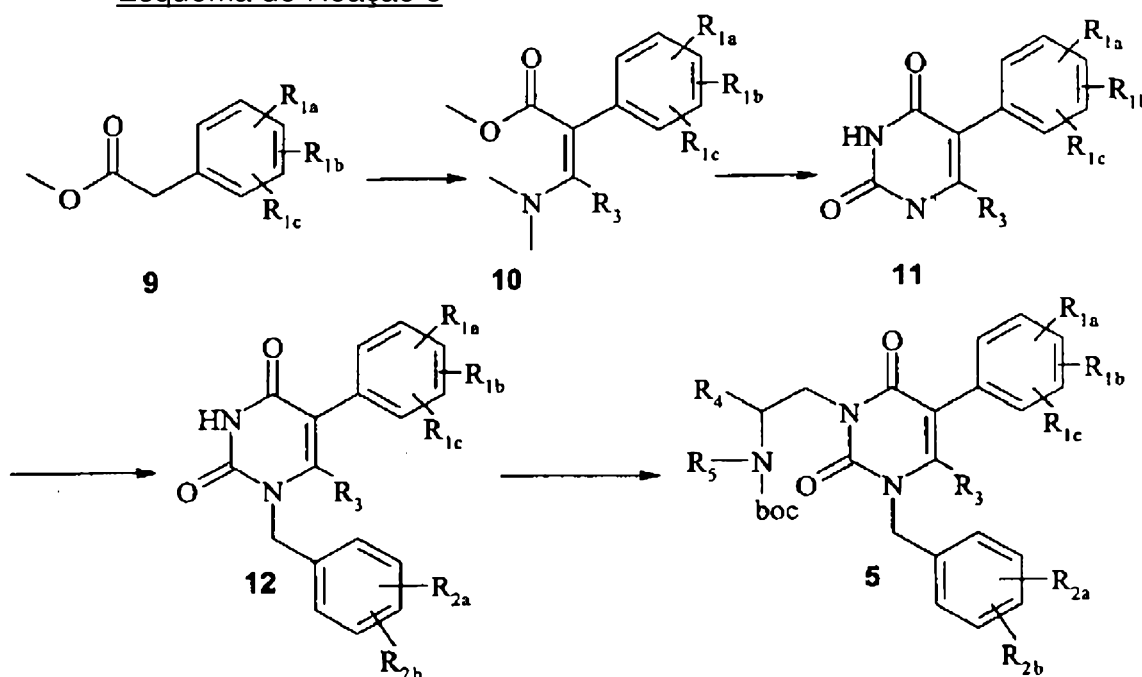
[0032] Uma benzonitrila substituída apropriadamente pode ser reduzida usando-se um reagente apropriado tal como borano em THF à amina correspondente e então forma uréia 1. Ciclização com um reagente tal como diceteno rende o composto 2, que pode ser brominado com bromo em ácido acético, N-bromossuccinimida ou outro agente de brominação pode render o composto 3. Alquilação rende o composto 4 e a condensação de Suzuki com um ácido borônico ou um éster de ácido borônico rende o composto 5. Desproteção da amina protegida usando um reagente típico, (tal como ácido trifluoracético em cloreto de metileno no caso de um grupo Boc) rende o composto 6, que pode ser alquilado ou condensado com um aldeído via condições de aminaçãõ redutora para dar um composto de fórmula 7. É possível alterar a ordem das várias etapas de aminaçãõ redutora, alquilação, brominação e condensação de Suzuki para render os compostos da presente invenção.

Esquema de Reação 2



[0033] Em uma variação do Esquema 1, o composto 4 é submetido a desproteção para dar o composto 8, que sob condições de Suzuki rende o composto 6. O grupo $-X-R_6$ pode ser adicionado por alquilação, aminação redutora ou outra reação para dar o composto 7.

Esquema de Reação 3



[0034] Éster de ácido fenilacético substituído 9 (feito do ácido correspondente ou comprado) e reagente tal como dimetilformamida dimetilacetal são condensados para dar 10. Ciclização com uréia rende um composto de fórmula 11. Alquilação usando, por exemplo, um brometo de benzila substituído rende 12, que pode ser alquilado com um halogeneto de alquila, submeter-se à reação de acoplamento de Mitsunobu com um álcool apropriado, ou reagir com um mesilato ou sulfonato para dar 5.

[0035] Os compostos da presente invenção podem ser geralmente utilizados como o ácido livre ou a base livre. Alternativamente, os compostos dessa invenção podem ser usados na forma de sais de adição de ácido ou de adição de base. Sais de adição de ácido dos compostos de amino livre da presente invenção podem ser preparados por métodos bem conhecidos da técnica, e podem ser formados a partir

de ácidos orgânicos e inorgânicos. Tais ácidos orgânicos adequados incluem ácidos maléico, fumárico, benzóico, ascórbico, succínico, metanossulfônico, acético, trifluoracético, oxálico, propiônico, tartárico, salicílico, cítrico, glicônico, láctico, mandélico, cinâmico, aspártico, esteárico, palmítico, glicólico, glutâmico e benzenosulfônico. Ácidos inorgânicos adequados incluem ácidos clorídrico, bromídrico, sulfúrico, fosfórico e nítrico. Sais de adição de base incluem aqueles sais que se formam com o ânion carboxilato e incluem sais formados com cátions orgânicos e inorgânicos tais como aqueles escolhidos dos metais alcalinos e alcalinoterrosos (por exemplo, lítio, sódio, potássio, magnésio, bário e cálcio), bem como o íon amônio e derivados substituídos deste (por exemplo, dibenzilamônio, benzilamônio, 2-hidróxi-etil-amônio e similares). Assim, o termo “sal farmaceuticamente aceitável” de estrutura (I) tem a intenção de englobar qualquer uma e todas as formas de sais aceitáveis.

[0036] Além disso, pró-drogas são também incluídas no contexto dessa invenção. Pró-drogas são quaisquer veículos covalentemente ligados, que liberam um composto de estrutura (I) *in vivo* quando tal pró-droga é administrada a um paciente. Pró-drogas são geralmente preparadas por modificação de grupos funcionais em uma maneira tal que a modificação é clivada, ou por manipulação de rotina ou *in vivo*, rendendo o composto parente. Pró-drogas incluem, por exemplo, os compostos dessa invenção, em que grupos hidróxi, amina ou sulfidril são ligados a qualquer grupo que, quando administrado a um paciente, cliva-se para formar os grupos hidróxi, amina ou sulfidril. Assim, exemplos representativos de pró-drogas incluem (mas sem limitação) derivados de acetato, formiato e benzoato de grupos funcionais álcool e amina dos compostos de estrutura (I). Subseqüentemente, no caso de um ácido carboxílico (-COOH), ésteres podem ser empregados tais como ésteres metílicos, ésteres etílicos e similares.

[0037] Com respeito a estereoisômeros, os compostos de estrutura (I) podem ter centros quirais e podem ocorrer como racematos, misturas racêmicas e como enantiômeros ou diastereômeros individuais. Todas tais formas isoméricas são incluídas na presente invenção, incluindo misturas destas. Além disso, algumas das formas cristalinas dos compostos de estrutura (I) podem existir como polimorfos, os quais estão incluídos na presente invenção. Ainda, alguns dos compostos de estrutura (I) podem também formar solvatos com água ou outros solventes orgânicos. Tais solvatos estão similarmente incluídos no escopo dessa invenção.

[0038] A eficácia de um composto como um antagonista de receptor de GnRH pode ser determinada por várias técnicas de ensaio. Técnicas de ensaio, bem conhecidas no campo, incluem o uso de células pituitárias cultivadas para medir a atividade de GnRH (Vale et al., *Endocrinology* 91:562-572, 1972) e a medição de radioligante ligando-se a membranas pituitárias de rato (Perrin et al., *Mol. Pharmacol.* 23:44-51, 1983) ou a membranas provenientes de células que expressam receptores clonados, conforme descritas abaixo. Outras técnicas de ensaio incluem (mas sem limitação) medição dos efeitos dos antagonistas de receptor de GnRH na inibição de fluxo de cálcio estimulado com GnRH, modulação de hidrólise de fosfoinositol, e concentrações de circulação de gonadotropinas no animal castrado. Descrições dessas técnicas, a síntese de ligante radiomarcado, o emprego de ligante radiomarcado em radioimunoensaio e a medição da eficácia de um composto como um antagonista de receptor de GnRH são dados a seguir.

Inibição de liberação de LH estimulada com GnRH

[0039] Antagonistas de GnRH adequados são capazes de inibir a ligação específica de GnRH ao seu receptor e antagonizar atividades associadas com GnRH. Por exemplo, inibição de liberação de LH estimulada com GnRH em ratos imaturos pode ser medida de acordo com o método de Vilchez-Martinez (*Endocrinology* 96:1130-1134, 1975). Em resumo, a ratos machos Sprague-Dawley,

de vinte e cinco dias de idade é administrado um antagonista de GnRH em solução salina ou outra formulação adequada por gavagem oral, injeção subcutânea ou injeção intravenosa. Isto é seguido por injeção subcutânea de 200 ng de GnRH em 0,2 mL de solução salina. Trinta minutos depois da última injeção, os animais são decapitados e o sangue do tronco é coletado. Depois de centrifugação, o plasma separado é estocado a -20°C, até determinação das concentrações de LH e/ ou FSH por radioimunoensaio (vide abaixo).

Ensaio de Cultura de Células Pituitárias Anteriores de Rato de Antagonistas de GnRH

[0040]Glândulas pituitárias anteriores são coletadas de ratos fêmeas Sprague-Dawley, de 7 semanas de idade e as glândulas colhidas são digeridas com collagenase em um frasco de dispersão, por 1,5 h, a 37°C. Depois da digestão com collagenase, as glândulas são ainda digeridas com neuraminidase, por 9 minutos, a 37°C. O tecido digerido é então lavado com BSA a 0,1%/meio de McCoy 5A e as células lavadas são suspensas em FBS a 3%/BSA a 0,1%/meio de McCoy 5A e plaqueamento sobre placas de cultura de tecido com 96 poços, em uma densidade celular de 40.000 células por poço em 200 µL de meio. As células são então incubadas a 37°C, por 3 dias. Para ensaio de um antagonista de GnRH, as células incubadas são primeiro lavadas com BSA a 0,1%/meio de McCoy 5A, uma vez, seguido de adição da amostra teste mais GnRH 1nM em 200 µL de BSA a 0,1%/meio de McCoy 5A em poços em triplicata. Cada amostra é ensaiada em níveis de 5 doses para gerar uma curva de dose-resposta para determinação da potência na inibição de LH estimulado com GnRH e/ ou liberação de FSH. Depois de 4 horas de incubação a 37°C, o meio é colhido e o nível de LH e/ ou FSH secretado no meio é determinado por RIA.

Ensaio 1 de Ligação de Membrana

[0041]Células estável ou transitoriamente transfectadas com vetores de expressão de receptor de GnRH são colhidas, re-suspensas em sacarose a 5% e homogeneizadas usando-se um homogeneizador Polytron (2x15 s). Os núcleos são removidos por centrifugação (3.000 x g por 5 minutos), e o sobrenadante é centrifugado (20.000 x g por 30 minutos, a 4°C) para coletar a fração de membrana. A preparação final da membrana é re-suspensa em tampão de ligação (HEPES 10mM (pH 7,5), NaCl 150 mM e BSA a 0,1%) e estocada a -70°C. Reações de ligação são realizadas em uma montagem de placa de filtração de 96 poços, Millipore MultiScreen, com membranas GF/C revestidas com polietilenoimina. A reação é iniciada pela adição de membranas (40 µg de proteína em 130 µL de tampão de ligação) a 50 µL de peptídeo de GnRH marcado com [¹²⁵I] (~100.000 cpm) e 20 µL de competidor, em concentrações variadas. A reação é terminada depois de 90 minutos por aplicação de vácuo e lavagem (2 vezes) com solução salina tamponada com fosfato. Radioatividade envolvida é medida usando-se um contador de cintilação de 96 poços (Packard Topcount) ou pela remoção dos filtros da placa e contagem direta de gama. Valores K_i são calculados a partir dos dados de ligação de competição usando regressão não-linear de mínimos quadrados empregando o pacote de software Prism (GraphPad Software).

Ensaio 2 de Ligação de Membrana

[0042]Para ensaios de ligação de membrana adicionais, células HEK293 estavelmente transfectadas são colhidas batendo-se os frascos de cultura de tecido contra uma superfície firme e coletadas por centrifugação a 1.000xg, por 5 minutos. Precipitados de células são re-suspensos em sacarose a 5% e homogeneizados em um homogeneizador Polytron, em duas etapas de 15 segundos de homogeneização. Os homogeneizados de células são, então, centrifugados por 5 minutos a 3.000xg para remover os núcleos, e o sobrenadante é subsequenteemente centrifugado por 30 minutos a 44.000xg para coletar a fração de membrana. O precipitado de

membrana é re-suspenso em tampão de ligação de GnRH (HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM e BSA a 0,1%) e alíquotas são imediatamente congeladas, por impacto de frio, em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C. O teor de proteína da suspensão de membrana é determinado usando o kit de ensaio de proteína Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA).

[0043]Ensaio de ligação de radioligantes competitivos com preparações de membrana são realizados em placas de filtração de 96 poços, Millipore, com filtros de membrana GF/C, que são pré-revestidos com 200 µL de polietilenoimina a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO). Antes do uso, as placas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato. A fração de membrana em tampão de ligação de GnRH (130 µL contendo 25 µg de proteína para receptores de humano e de macaco ou 12 µg para receptores de rato) é adicionada aos poços juntamente com 20 µL de ligante de competição, em concentrações variadas. A reação de ligação é iniciada pela adição de radioligante (0,1 nM em 50 µL de tampão de ligação de GnRH). A reação é deixada prosseguir por 90 minutos em um agitador de plataforma, em temperatura ambiente e então terminada pela colocação de placa de ensaio em uma tubulação de vácuo Millipore (Millipore, Bedford, MA), aspiração do solvente e lavagem, duas vezes, dos poços com 200 µL de solução salina tamponada com fosfato gelada (PBS). Os filtros nos poços são removidos e contado em um contador de gama. Os valores K_i são calculados a partir de cada curva de ligação usando regressão não-linear de mínimos quadrados e corrigidos para concentração de radioligante usando a equação de Cheng-Prusoff (Prism, GraphPad Software, São Diego, CA) assumindo-se uma afinidade de radioligante de 0,5 nM. Valores K_i médios são calculados do antilogaritmo da média dos valores pK_i para cada par de ligantes de receptor.

Ensaio 3 de Ligação de Membrana

[0044]Células RBL de receptor de GnRH humano estavelmente transfectadas são crescidas para confluência. O meio é removido e a monocamada de células é lavada uma vez com DPBS. Uma solução de EDTA 0,5 mM/PBS (livre de Ca^{++} Mg^{++}) é adicionada à placa que é então incubada a 37°C, por 10 minutos. As células são deslocadas por leves batidinhas nos frascos. As células são coletadas e precipitadas por centrifugação a 800g, por 10 minutos, a 4°C. O precipitado de células é, então, re-suspenso em tampão [DPBS (KH_2PO_4 1,5mM, Na_2HPO_4 8,1mM, KCl 2,7 Mm e NaCl 138mM) suplementado com MgCl_2 10mM, EGTA 2mM, pH = 7,4 com NaOH]. Foi então realizada lise das células usando uma célula de pressão e aplicação de N_2 a uma pressão de 60,27 kgf/cm² (900 psi), por 30 minutos, a 4°C. Células não rompidas e detritos maiores são removidos por centrifugação a 1.200g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante de membrana celular é então centrifugado a 45.000g e o precipitado de membrana resultante é re-suspenso em tampão de ensaio e homogeneizado em gelo usando um homogeneizador de tecido. Concentrações protéicas são determinadas usando o kit de reagentes Coomassie Plus Protein (Pierce, Rockford, IL) usando albumina sérica bovina como um padrão. São feitas alíquotas dos precipitados e estocadas a -80°C, até uso. Análise por titulação usando uma faixa de concentrações protéicas determinou a concentração protéica ótima como sendo concentração final de 15 µg por poço.

[0045]Placas com filtros Unifilter GF/C (Perkin Elmer, Boston MA) são pré-tratadas com uma solução de polietilenoimina a 0,5% em água destilada, por 30 minutos. Os filtros são pré-enxaguados com 200 µL por poço de PBS, BSA a 1% (Fração V) e Tween-20 a 0,01%, pH = 7,4) usando um coletor de células (UniFilter-96 Filtermate; Packard). Membranas são colhidas por filtração a vácuo rápido e lavadas três vezes com 250 µL de tampão gelado (PBS, Tween-20 a 0,01%, pH = 7,4). Placas são secadas ao ar, 50 µL de fluido de cintilação (Microscint 20; Packard)

são adicionados, e a placa é monitorada quanto à radioatividade usando um TopCount NXT (Packard Instruments, IL).

[0046] Experimentos de ligação são realizados em tampão contendo HEPES 10mM, NaCl 150mM e BSA a 0,1%, pH = 7,5. Membranas são incubadas com 50 µL [¹²⁵I] His⁵, D-Tyr⁶ GnRH (concentração final de 0,2nM) e 50 µL de competidores de moléculas pequenas, em concentrações variando de 30pM a 10µM, para um volume total, em cada poço, de 200 µL. Incubações foram realizadas por 2 horas, em temperatura ambiente. A reação é terminada por filtração rápida em filtros GF/C, como descrição acima. Adaptação de curvas é feita usando-se um Excel Fit Software (IDBS, Emeryville, CA). Os valores K_i são calculados usando o método de Cheng e Prusoff (Cheng e Prusoff, 1973) usando um valor K_d de 0,7nM para o radioligante, que foi previamente determinado em experimentos de ligação por saturação.

Medição do fluxo de Ca⁺⁺

[0047] Para determinar a inibição de fluxo de cálcio estimulado com GnRH em células que expressam o receptor de GnRH humano, uma placa de 96 poços é semeada com células RBL estavelmente transfectadas com o receptor de GnRH humano, em uma densidade de 50.000 células/poço e deixadas se ligarem durante a noite. As células são carregadas por 1 hora, a 37°C, no seguinte meio: DMEM com HEPES 20 mM, FBS a 10%, Fluo-4 2 µM, ácido plurônico a 0,02% e Probenecid 2,5mM. As células foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem (sal balanceado de Hanks, HEPES 20mM, Probenecid 2,5 mM) depois de carregadas, deixando 150 µL no poço depois da última lavagem. GnRH é diluída em tampão FLIPR contendo BSA a 0,1% (sal balanceado de Hanks, HEPES 20 mM) a uma concentração de 20nM e distribuída em uma placa de 96 poços (Baixa ligação de proteína). Várias concentrações de antagonistas são preparadas em BSA a 0,1%/tampão FLIPR em uma terceira placa de 96 poços. Medição de fluorescência devido ao fluxo de Ca⁺⁺

(50 µL de 20nM ou 4nM finais) estimulado com GnRH é realizada de acordo com as instruções do fabricante em um sistema FLIPR (Molecular Devices, FLIPR384 system, Sunnyvale, CA) seguindo-se 1 minuto de incubação com 50 µL de antagonista em concentrações variadas.

Ensaio de hidrólise de fosfoinositol

[0048]O procedimento é modificado de acordo com protocolos publicados (W.Zhou et al., J.Biol.Chem. 270(32), pp. 18853-18857, 1995). Em resumo, células RBL estavelmente transfectadas com receptores de GnRH humano são semeadas em placas de 24 poços, em uma densidade de 200.000 células/poço, durante 24 horas. As células foram lavadas, uma vez, com meio isento de inositol contendo FBS dialisado a 10% e então marcadas com 1µCi/mL de [*myo*-³H]-inositol. Depois de 20 a 24 horas, as células foram lavadas com tampão (NaCl 140mM, KCl 4 mM, HEPES 20 mM, glicose 8,3 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1mM e BSA a 0,1%) e tratadas com peptídeo de GnRH nativo com ou sem várias concentrações de antagonista e LiCl 10 mM, por 1 hora, a 37°C. As células foram extraídas com ácido fórmico 10 mM a 4°C por 30 minutos e carregadas em uma coluna Dowex AGF1-X18, lavadas e eluídas com formiato de amônio 1M e ácido fórmico 0,1M. O eluato foi contado em um contador de cintilação. Dados do ensaio de hidrólise de PI são plotados usando regressão não-linear de mínimos quadrados pelo programa Prism (Graphpad, GraphPad Software, São Diego, CA), a partir do que a razão de doses é também calculada. O gráfico linear de Schild é gerado a partir das razões de doses obtidas em quatro experimentos independentes por regressão linear, e a intercepção X é usada para determinar a afinidade do antagonista.

Estudos em animais castrados

[0049]Estudos em animais castrados proporcionaram um ensaio sensitivo *in vivo* para os efeitos de antagonista de GnRH (Andrology 25: 141-147, 1993). Receptores de GnRH na glândula pituitária medeiam liberação de LH estimulada

com GnRH na circulação. Castração resulta em altos níveis de LH em circulação devido à redução da retroalimentação negativa de esteróides gonadais resultando no melhoramento de liberação de LH estimulada com GnRH. Conseqüentemente, medição de supressão de níveis de LH em circulação em macacos castrados pode ser usada como uma medida sensitiva *in vivo* de antagonismo de GnRH. Portanto, macacos machos são cirurgicamente castrados e deixados em recuperação por quatro semanas nas quais os níveis elevados de picos de LH estão presentes. Aos animais são então administrados o composto teste como uma dose oral ou dose i.v. e amostras de sangue em série são tiradas para medição de LH. Concentrações de LH no soro desses animais podem ser determinadas por técnicas de imunoensaio ou de bioensaio (Endocrinology 107:902-907, 1980).

Preparação de radioligante para GnRH

[0050]O análogo de GnRH é marcado com o método de cloramina-T. A 10 µg de peptídeo em 20 µL de tampão de fosfato de sódio 0,5M, pH 7,6 é adicionado 1 mCi de Na¹²⁵I, seguido de 22,5 µg de cloramina-T em 15 µL de tampão de fosfato de sódio 0,05M e a mistura é turbilhonada por 20 segundos. A reação é interrompida por adição de 60 µg de metabissulfito de sódio em 30 µL de tampão de fosfato de sódio 0,05M e o iodo livre é removido por passagem da mistura de reação através de um cartucho C-8 Sep-Pak (Millipore Corp., Milford, MA). O peptídeo é eluído com um pequeno volume de acetonitrila a 80%/água. O peptídeo marcado recuperado é ainda purificado por HPLC de fase reversa em uma coluna analítica Vydac C-18 (The Separations Group, Hesperia, CA) em um sistema de HPLC gradiente Beckman 334 usando um gradiente de acetonitrila em TFA a 0,1%. O peptídeo radioativo purificado é estocado em BSA a 0,1%/acetonitrila a 20%/TFA a 0,1%, a -80°C e pode ser usado por até quatro semanas.

RIA de LH e FSH

[0051] Para determinação dos níveis de LH, cada meio de amostra é ensaiado em duplicata e todas as diluições são feitas com tampão RIA (tampão de fosfato de sódio 0,01M/ NaCl 0,15M/BSA a 1%/NaN₃ a 0,01%, pH 7,5) e o kit de ensaio é obtido do Nation Hormone and Pituitary Program patrocinado por NIDDK. A um tubo de teste de polietileno, 12 por 75 mm, são adicionados 100 µL de meio de amostra diluído 1:5 ou padrão de rLH em tampão RIA e 100 µL de rLH (~30.000 cpm) marcado com [¹²⁵I] mais 100 µL de anticorpo anti-rLH de coelho diluídos 1:187.500 e 100 µL de tampão RIA. A mistura foi incubada em temperatura ambiente, durante a noite. No dia seguinte, 100 µL de IgG anti-coelho de bode diluída 1:20 e 100 µL de soro de coelho normal diluído 1:1000 são adicionados e a mistura incubada por outras 3 horas, em temperatura ambiente. Os tubos incubados são então centrifugados a 3.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante removido por sucção. O precipitado remanescente nos tubos é contado em um contador de gama. RIA de FSH é feito em um modo similar ao ensaio para LH com substituição do anticorpo de LH pelo anticorpo de FSH diluído com 1:30.000 e o rLH marcado por rFSH marcado.

Atividades de antagonistas de receptor de GnRH

[0052] A atividade de antagonistas de receptor de GnRH é tipicamente calculada a partir da IC₅₀ como a concentração de um composto necessária para deslocar 50% do ligante radiomarcado do receptor de GnRH e é reportada como um valor “K_i” calculado pela seguinte equação:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + L / K_D}$$

onde L = radioligante e K_D = afinidade de radio-ligante a receptor (Cheng e Prusoff, Biochem. Pharmacol. 22:3099, 1973). Antagonistas de receptor de GnRH desta invenção têm uma K_i de 100 µM ou menos. Em uma modalidade preferida dessa invenção, os antagonistas de receptor de GnRH têm uma K_i de menos que 10 µM e, mais preferivelmente, menos que 1 µM, e ainda de maior preferência menos

que 0,1 μ M (i.e., 100nM). Para essa finalidade, todos os compostos especificamente mostrados nos Exemplos têm valores de K_i menores que 100nM em um ou mais Ensaio 1 a 3 de Ligação de Membrana, acima.

[0053]A capacidade dos antagonistas de GnRH de inibir as principais enzimas metabolizadoras de drogas no fígado humano, ou seja, CYP2D6 e CYP3A4, pode ser avaliada *in vitro* de acordo com um método fluorimétrico com base em placa de microtitulação descrito por Crespi et al. (Anal. Biochem. 248:188-190; 1997). AMMC (i.e., 3-[2-(N,N-dietil-N-metilamônio)etil]-7-metóxi-4-metilcumarina) e BFC (i.e., 7-benzilóxi -4-(trifluormetil)cumarina) em uma concentração igual a K_m (ou seja, a concentração de substrato que produz metade da velocidade máxima) são usadas como substratos marcadores para CYP2D6 e CYP3A4, respectivamente. Em resumo, CYP2D6 ou CYP3A4 recombinante é incubada com substrato marcador e sistema gerador de NADPH (consistindo em NADP⁺ 1mM, glicose-6-fosfato 46mM e 3 unidades/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase), a 37°C, em ausência ou presença de 0,03, 0,09, 0,27, 0,82, 2,5, 7,4, 22, 67 e 200 μ M de uma amostra de antagonista de GnRH. Reações são interrompidas pela adição de um volume igual de acetonitrila. A proteína precipitada é removida por centrifugação e o fluido sobrenadante transparente é analisado usando-se um fluorímetro de placa de microtitulação. Antagonistas de GnRH da presente invenção têm, preferivelmente, valores de K_i maiores que 250 nM, mais preferivelmente maiores que 1 μ M e de maior preferência maiores que 5 μ M.

[0054]Como mencionado acima, os antagonistas de receptor de GnRH dessa invenção têm utilidade em uma ampla gama de aplicações terapêuticas, e podem ser usados para tratar uma variedade de condições relacionadas a hormônios sexuais, tanto em homens como em mulheres, bem como em mamíferos em geral. Por exemplo, tais condições incluem endometriose, fibróides uterinos, doença do ovário policístico, hirsutismo, puberdade precoce, neoplasia dependente de

esteróides gonadais tais como cânceres da próstata, da mama e do ovário, adenomas pituitários gonadotróficos, apnéia do sono, síndrome do intestino irritável, síndrome pré-menstrual, hipertrofia prostática benigna, contracepção e infertilidade (por exemplo, terapia reprodutiva assistida, tal como fertilização *in vitro*).

[0055]Os compostos dessa invenção são também úteis como um adjuvante no tratamento de deficiência do hormônio de crescimento e pequena estatura, e para o tratamento de lúpus eritematoso sistêmico.

[0056]Adicionalmente, os compostos são úteis em combinação com androgênios, estrogênios, progesteronas, e antiestrogênios e antiprogestógenos para o tratamento de endometriose, fibróides e em contracepção, bem como em combinação com um inibidor da enzima de conversão da angiotensina, um antagonista de receptor da angiotensina II, ou um inibidor de renina para o tratamento de fibróides uterinos. Os compostos podem ser ainda usados em combinação com bisfosfonatos e outros agentes para o tratamento e/ ou prevenção de distúrbios do metabolismo do cálcio, fosfato e ósseo, e em combinação com estrogênios, progesteronas e/ ou androgênios para a prevenção ou o tratamento de perda óssea ou de sintomas hipogonadais, tais como calores repentinos durante a terapia com antagonista de GnRH.

[0057]Em uma outra modalidade da invenção, são descritas composições farmacêuticas contendo um ou mais antagonistas de receptor de GnRH. Para fins de administração, os compostos da presente invenção podem ser formulados como composições farmacêuticas. As composições farmacêuticas da presente invenção compreendem um antagonista de receptor de GnRH da presente invenção e um veículo e/ ou diluente farmaceuticamente aceitável. O antagonista de receptor de GnRH está presente na composição em uma quantidade que é eficaz para tratar uma doença particular, ou seja, em uma quantidade suficiente para obtenção da atividade do antagonista de receptor de GnRH, e preferivelmente com toxidez

aceitável para o paciente. Tipicamente, as composições farmacêuticas da presente invenção podem incluir um antagonista de receptor de GnRH em uma quantidade de 0,1 mg a 250 mg por dosagem, dependendo da via de administração, e, mais tipicamente, de 1 mg a 60 mg. Concentrações e dosagens apropriadas podem ser prontamente determinadas por aquele versado na técnica.

[0058]Veículos e/ ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis são familiares àqueles versados na técnica. Para composições formuladas como soluções líquidas, veículos e/ ou diluentes aceitáveis incluem solução salina e água estéril, e podem incluir opcionalmente antioxidantes, tampões, bacteriostáticos e outros aditivos comuns. As composições podem ser também formuladas como pílulas, cápsulas, grânulos ou comprimidos, que contêm, além de um antagonista de receptor de GnRH, diluentes, agentes dispersantes e agentes tensoativos, ligantes e lubrificantes. Aquele versado na técnica pode formular ainda o antagonista de receptor de GnRH de uma maneira apropriada, e de acordo com práticas aceitas, tais como aquelas mostradas em Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

[0059]Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar condições relacionadas a hormônios sexuais, conforme discutido acima. Tais métodos incluem administrar um composto da presente invenção a um animal de sangue quente, em uma quantidade suficiente para tratar a condição. Neste contexto, "tratar" inclui administração profilática. Tais métodos incluem administração sistêmica de um antagonista de receptor de GnRH desta invenção, preferivelmente na forma de uma composição farmacêutica, como discutido acima. Conforme usada aqui, "administração sistêmica" inclui métodos de administração oral e parenteral. Para administração oral, composições farmacêuticas adequadas de antagonistas de receptor de GnRH incluem pós, grânulos, pílulas, comprimidos e cápsulas, bem como líquidos, xaropes, suspensões e emulsões. Essas composições podem incluir

também flavorizantes, conservantes, agentes de suspensão, espes-santes e emulsificantes, e outros aditivos farmacêuticamente aceitáveis. Para administração parenteral, os compostos da presente invenção podem ser preparados em soluções de injeção aquosas, que podem conter, além do antagonista de receptor de GnRH, tampões, antioxidantes, bacteriostáticos e outros aditivos comumente empregados em tais soluções.

[0060]Os seguintes exemplos são fornecidos para fins de ilustração, e não de limitação. Em resumo, os antagonistas de receptor de GnRH dessa invenção podem ser ensaiados pelos métodos gerais relatados acima, enquanto os seguintes Exemplos descrevem a síntese de compostos representativos dessa invenção.

EXEMPLOS

A. Métodos HPLC para análise das amostras

Tempo de retenção, t_R em minutos

Método 1 – Espectro de Massa de Cromatografia de Fluido Supercrítico (SFC-MS)

[0061]Coluna: 4,6 x 150 mm Deltabond Cyano 5 μ M de Thermo-Hypersil-Keystone.

[0062]Fase móvel: dióxido de carbono de grau SFC e metanol de grau ótimo com modificador de dietilmalonato dissódico 1mM.

[0063]Temperatura: 50°C

[0064]Pressão: 120 x 10⁵ Pa (120 bar)

[0065]Vazão: 4,8 mL/ min

[0066]Gradiente: metanol a 5% para 55% durante 1,7 min e mantido a 55% por 0,8 min, então retorna para 5% em 0,1 min para o tempo total de corrida de 2,6 min.

Método 2 (HPLC-MS)

[0067]Coluna: Waters ODS-AQ, 2,0 x 50 mm

[0068]Fase móvel: A = água com ácido trifluoracético a 0,05%; B = acetonitrila com ácido trifluoracético a 0,05%

[0069]Gradiente: 95%A/5%B a 5%A/95%B durante 13,25 minutos e mantido em 5%A/95%B durante 2 min, então retorno para 95%A/5%B durante 0,25 min.

[0070]Vazão: 1 mL/ min

[0071]Comprimento de onda no UV: 220 e 254 nM

Método 3 (HPLC-MS)

[0072]Coluna :BHK Lab ODS-O/B, 4,6 x 50 mm, 5 µM

[0073]Fase móvel: A = água com ácido trifluoracético a 0,05%; B = acetonitrila com ácido trifluoracético a 0,05%

[0074]Gradiente: 95%A/5%B durante 0,5 min, então para 90%A/10%B durante 0,05 min, de 90%A/10%B a 5%A/95%B durante 18,94 minutos, então para 1%A/ 99%B por 0,05 min e mantido em 1%A/99%B durante 2,16 min e então retorno para 95%A/5%B durante 0,50 min.

[0075]Vazão: 2,5 mL/ min

[0076]Comprimento de onda no UV: 220 e 254 nM

Método 4 (HPLC-MS)

[0077]Coluna: Waters ODS-AQ, 2,0 x 50 mm

[0078]Fase móvel: A = água com ácido trifluoracético a 0,05%; B = acetonitrila com ácido trifluoracético a 0,05%

[0079]Gradiente: 95%A/5%B a 10%A/90%B por 2,25 min e mantido 10%A/90%B por 1,0 min e então retorno para 95%A/5%B por 0,1 min

[0080]Vazão: 1 mL/ min

[0081]Comprimento de onda no UV: 220 e 254 nM

Método 5 (HPLC)

[0082]Coluna: Agilent, Zorbax SB-C18, 5 µM, 4,6 x 250 mm.

[0083]Fase móvel: A = água com ácido trifluoracético a 0,05%; B = acetonitrila com ácido trifluoracético a 0,05%

[0084]Gradiente: 95%A/5%B a 5%A/95%B durante 50 min, então 5%A/95%B a 1%A/99%B durante 0,1 min, então mantido 1%A/99%B por 0,8 min e de volta para 95%A/5%B durante 0,2 min, mantido tal gradiente por 4 min.

[0085]Vazão: 2,0 mL/min

[0086]Comprimento de onda: 220 e 254 nM.

Método 6 (HPLC-MS)

[0087]Coluna : Phenomenex Synergi 4 μ Max-RP 80A. 50,0 x 2,0 mm.

[0088]Fase móvel: A = água com ácido trifluoracético a 0,025%; B = acetonitrila com ácido trifluoracético a 0,025%.

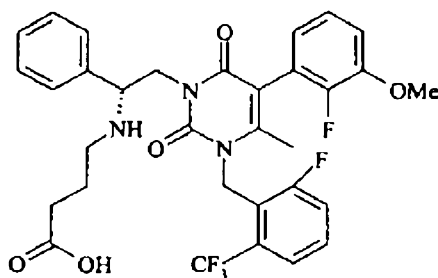
[0089]Gradiente: 95%A/5%B, 0,25 min, então 95%A/5%B a 95%B/5%A durante 13 minutos, mantendo 95%A/5%B a 95%B/5%A durante 2 minutos, então de volta para 95%A/5%B em 0,25 min.

[0090]Vazão: 1 mL/min

[0091]Comprimento de onda no UV: 220 nM e 254 nM.

EXEMPLO 1

3-[2(R)-{HIDROXICARBONILPROPIL-AMINO}-2-FENILETIL]-5-(2-FLÚOR-3-METOXIFENIL)-1-[2-FLÚOR-6-(TRIFLUORMETIL)BENZIL]-6-METIL-PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA



Etapa 1A: Preparação de 2-flúor-6-(trifluormetil)

benzilamina 1a

[0092] A 2-flúor-6-(trifluormetil)benzonitrila (45 g, 0,238 mmols) em 60 mL de THF foi lentamente adicionado BH_3 1M:THF, a 60°C e a solução resultante foi refluxada durante a noite. A mistura foi resfriada para a temperatura ambiente. Metanol (420 mL) foi adicionado lentamente e bem agitados. Os solventes foram então evaporados e o resíduo foi dividido entre EtOAc e água. A camada orgânica foi secada sobre Na_2SO_4 . Evaporação rendeu 1a como um óleo amarelo (46 g, 0,238 mmols). MS (CI) m/z 194,0 (MH^+).

Etapa 1B: Preparação de N-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]uréia 1b

[0093] A 2-flúor-6-(trifluormetil)benzilamina 1a (51,5 g, 0,267 mmols) em um frasco, uréia (64 g, 1,07 mmol), HCl (conc., 30,9 mmols, 0,374 mmols) e água (111 mL) foram adicionados. A mistura foi refluxada por 6 horas. A mistura foi resfriada para a temperatura ambiente, subseqüentemente resfriada com gelo e filtrada para dar um sólido branco. Recristalização com 400 mL de EtOAc rendeu 1b como um sólido branco (46,2 g, 0,196 mmols). MS (CI) m/z 237,0 (MH^+).

Etapa 1C: Preparação de 1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 1c

[0094] NaI (43,9 g, 293 mmols) foi adicionado a N-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]uréia 1b (46,2 g, 19,6 mmols) em 365 mL de acetonitrila. A mistura resultante foi resfriada em um banho de água com gelo. Diceteno (22,5 mL, 293 mmols) foi adicionado lentamente via funil de gotejamento, seguido por adição de TMSCl (37,2 mL, 293 mmols) da mesma maneira. A suspensão amarela resultante foi deixada aquecer para a temperatura ambiente, lentamente e foi agitada por 20 horas. LC-MS mostrou o desaparecimento de material de partida. À mistura amarela, 525 mL de água foram adicionados e agitados durante a noite. Depois de mais 20 horas de agitação, o precipitado foi filtrado via funil de Buchner e o sólido amarelo foi lavado com água e EtOAc para dar 1c como um sólido branco

(48,5 g, 16 mmols). RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,15 (s, 3H), 5,37 (s, 2H), 5,60 (s, 1H), 7,23-7,56 (m, 3H), 9,02 (s, 1H); MS (CI) m/z 303,0 (MH^+).

Etapa 1D: Preparação de 5-bromo-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 1d

[0095]Bromo (16,5 mL, 0,32 mmols) foi adicionado a 1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 1c (48,5 g, 0,16 mol) em 145 mL de ácido acético. A mistura resultante tornou-se transparente, então formou precipitado dentro de 1 hora. Depois de 2 horas de agitação, o sólido amarelo foi filtrado e lavado com EtOAc gelado para um sólido quase branco. O filtrado foi lavado com NaHCO_3 saturado e secado sobre Na_2SO_4 . Evaporação rendeu um sólido amarelo que foi lavado com EtOAc para dar um sólido amarelo claro. Os dois sólidos foram combinados para dar 59,4 g de 1d total (0,156 mol). RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,4 (s, 3H), 5,48 (s, 2H), 7,25-7,58 (m, 3H), 8,61 (s, 1H); MS (CI) m/z 380,9 (MH^+).

[0096]5-Bromo-1-[2,6-difluorbenzil]-6-metilpirimidina-2, 4(1H,3H)-diona 1d.1 foi feita usando os mesmo procedimento.

Etapa 1E: Preparação de 5-bromo-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metil-3-[2(R)-ter-butoxicarbonil-2-feniletil]-pirimidina-2,4-(1H,3H)-diona 1e

[0097]A 5-bromo-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 1d (15g, 39,4 mmols) em 225 mL de THF foram adicionados N-t-Boc-D-fenilglicinol (11,7 g, 4,92 mmols) e trifenilfosfina (15,5 g, 59,1 mmols), seguido por adição de azodicarboxilato de di-ter-butila (13,6 g, 59,1 mmols). A solução amarela resultante foi agitada durante a noite. Os voláteis foram evaporados e o resíduo foi purificado por sílica-gel com 3:7 de EtOAc/Hexano para dar 1e como um sólido branco (23,6 g, 39,4 mmols). MS (CI) m/z 500,0 (MH^+ -Boc).

Etapa 1F: Preparação de 3-[2(R)-amino-2-feniletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 1f

[0098]A 5-bromo-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metil-3-[2-(R)-ter-butoxicarbonilamino-2-feniletil]-pirimi-dina-2,4(1H,3H)-diona 1e (15 g, 25 mmols) em 30 mL/90 mL de H₂O/dioxano em um tubo de pressão foram adicionados ácido 2-flúor-3-metoxifenilborônico (4,25 g, 25 mmols) carbonato de sódio (15,75 g, 150 mmols). N₂ gasoso foi borbulhado aí, por 10 minutos. Tetraquis(trifenilfosfina)paládio (2,9 g, 2,5 mmols) foi adicionado, o tubo foi selado e a mistura resultante foi aquecida com agitação, a 90°C, durante a noite. Depois de resfriamento para a temperatura ambiente, o precipitado foi removido por filtração. Os voláteis foram removidos por evaporação e o resíduo foi dividido entre EtOAc/NaHCO₃ saturado. O solvente orgânico foi evaporado e o resíduo foi cromatografado com 2:3 de EtOAc/Hexano para dar 13,4 de sólido amarelo (20,8 mmols, 83%).

[0099]Esse sólido amarelo (6,9 g, 10,7 mmols) foi dissolvido em 20 mL/20 mL de CH₂Cl₂/TFA. A solução amarela resultante foi agitada a temperatura ambiente, por 2 horas. Os voláteis foram evaporados e o resíduo foi dividido entre EtOAc/NaHCO₃ saturado. A fase orgânica foi secada sobre Na₂SO₄. Evaporação rendeu 1f como um óleo amarelo (4,3 g, 7,9 mmols, 74%). RMN ¹H (CDCl₃) δ 2,03 (s, 3H), 3,72-4,59 (m, 6H), 5,32-5,61 (m, 2H), 6,74-7,56 (m, 11H); MS(Cl) *m/z* (MH⁺). (Cl) *m/z* 546,0 (MH⁺).

[00100]3-[2(R)-amino-2-feniletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2,6-difluorbenzil]-6-metilpirimidina-2,4-(1H,3H)-dio-na 1f.1 foi feita usando o mesmo procedimento descrito nesse exemplo.

Etapas 1G: Preparação de 3-[2(R)-{etoxicarbonilpropil-amino}-2-feniletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)—[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 1g

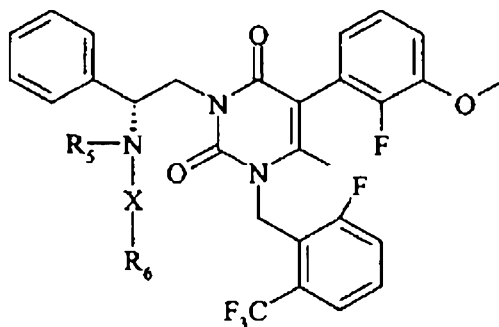
[00101]Ao composto 3-[2(R)-amino-2-feniletil]-5(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-trifluormetil)benzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 1f (5g, 9,4 mmols) em 100 mL de acetonitrila foram adicionados 4-bromobutirato de etila (4 mL, 28,2

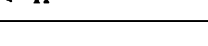
mmols) e base de Hunig (1,6 mL, 9,4 mmols). Depois de refluxo a 95°C durante a noite, a mistura de reação foi resfriada para a temperatura ambiente e os voláteis foram removidos. O resíduo foi cromatografado com 10:10:1 de EtOAc/Hexano/Et₃N para dar 1g como um óleo amarelo (3,0 g, 4,65 mmols). MS (CI) m/z 646,2 (MH⁺).

Etapa 1H: Preparação de 3-[2(R)-{hidroxicarbonilpropil-amino} -2-feniletil-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(tri-fluormetil)benzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 1-1

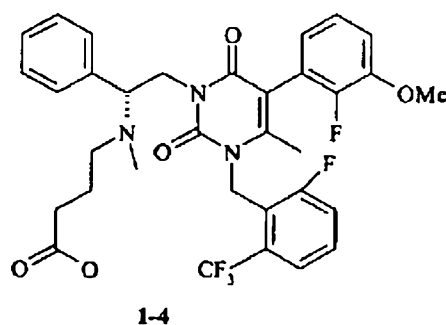
[00102]O composto 3-[2(R)-{etoxicarbonilpropil-amino}-2-feniletil]-5-(2-flúor-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluorme-til)benzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (2,6 g, 4,0 mmols) foi dissolvido em 30 mL/30 mL de THF/água. NaOH sólido foi adicionado e a mistura resultante foi aquecida a 50°C, durante a noite. A mistura foi resfriada para a temperatura ambiente e os voláteis foram evaporados. Ácido cítrico foi adicionado à solução aquosa até pH = 3. Extração com EtOAc seguida de evaporação de solvente renderam 1,96 g de um gel branco. O gel foi passado através de uma coluna de troca catiônica, forte, macroporosa Dowex MSC-1 para converter-se em sal de sódio. Liofilização deu um sólido branco 1-1 como o sal de sódio (1,58 g, 2,47 mmols). RMN ¹H (CD₃OD) δ 1,69-1,77 (m, 2H), 2,09 (s, 3H), 2,09-2,19 (t, J = 7,35 Hz, 2H), 2,49-2,53 (t, J = 7,35 Hz, 2H), 3,88 (s, 3H), 4,15-4,32 (m, 3H), 5,36-5,52 (m, 2H), 6,60-7,63 (m, 11H); HPLC-MS (CI) m/z 632,2 (MH⁺), t_R = 26,45, (método 5).

[00103]Os seguintes compostos foram sintetizados de acordo com o procedimento acima.



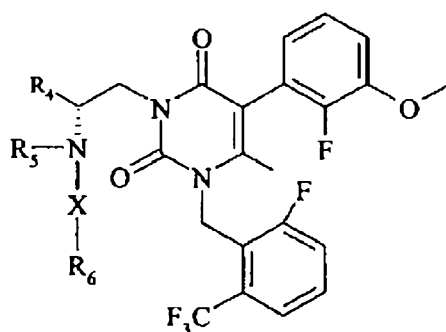
Nº	-N(R ₅)-X-R ₆	p.m.	Massa	t _R (Método #)
1-1		631,60	632,2	26,45 (5)
1-2		617,57	618,0	2,777 (4)
1-3		645,62	646,0	2,789 (4)

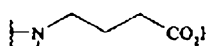
Etapa 11: Preparação de 3-[2(R)-{N-metil-N-hidroxicarbonil-amino}-2-feniletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 1-4

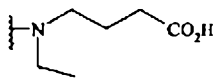
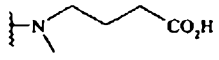
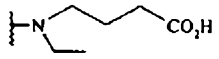
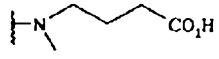


[00104]Ao composto 1-1 (0,045 mmols) em MeOH 1mL, formaldeído (0,0475 mmols) foi adicionado seguido de adição de BH₃ 8M:Piridina (0,475 mmols). Depois de agitação durante a noite, o composto 1-4 foi purificado por LC prep.-MS (CI) *m/z* 645,5 (MH⁺), t_R = 2,231, (método 4).

[00105]Os seguintes compostos foram sintetizados de acordo com o procedimento acima.

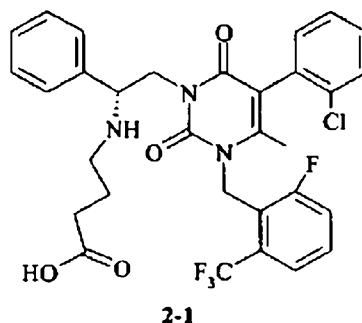


Nº	-N(R ₅)-X-R ₆	R ₄	p.m.	Massa	t _R (Método #)
1-4		Ph	645,62	646,2	2,231 (4)

1-5		Ph	659,65	660,2	2,235 (4)
1-6		Ciclopentila	637,64	638,3	2,259 (4)
1-7		Ciclopentila	651,67	652,3	2,294 (4)
1-8		Isobutila	625,63	626,0	2,594 (4)

EXEMPLO 2

3-[2(R)-{HIDROXICARBONILPROPIL-AMINO}-2-FENILETIL]-5-(2-CLOROFENIL)-1-[2-FLÚOR-6-(TRIFLUORMETIL)BENZIL]-6-METIL-PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA



Etapa 2A: Preparação de 5-bromo-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metil-3-[2(R)-amino-2-feniletil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 2a

[00106] 5-Bromo-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metil-3-[2(R)-ter-butoxicarbonilamino-2-feniletil]-pirimidina-2,4 (1H,3H)-diona 1e foi dissolvido em 20 mL/mL de CH₂Cl₂/TFA. A solução amarela resultante foi agitada a temperatura ambiente, por 2 horas. Os voláteis foram evaporados e o resíduo foi dividido entre EtOAc/NHCO₃ saturado. A fase orgânica foi secada sobre Na₂SO₄. Evaporação rendeu 2a como um óleo amarelo.

Etapa 2B: Preparação de 5-(2-clorofenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metil-3-(2(R)-amino-2-feniletil)-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 2b

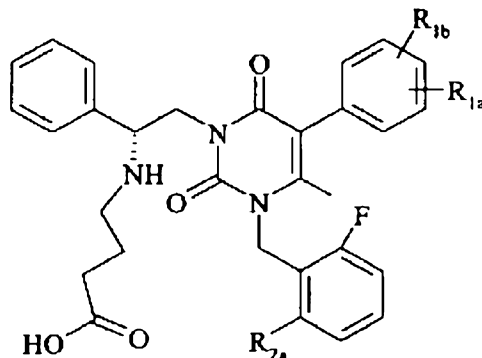
[00107] Ao composto 2a (40 mg, 0,08 mmols) em 0,25 mL/0,75 mL de H₂O/dioxano em uma frasco de 4 mL foi adicionado ácido 2-clorofenil borônico (0,12 mmols) e carbonato de sódio (51 mg, 0,48 mmols, 6 eq). Nitrogênio foi borbulhado

através da solução por 1 minuto e tetraquis(trifenilfosfina)paládio (9,24 mg, 0,008 mmols) foi adicionado. A mistura resultante foi selada e aquecida a 90°C, durante a noite. Depois de resfriamento para a temperatura ambiente, o precipitado foi removido por filtração e foi purificado por LC prep.-MS para dar 2b.

Etapa 2C: 3-[2(R)-{hidroxicarbonilpropil-amino}-2-feniletil]-5-(2-clorofenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 2-1

[00108]Ao composto 2b (0,03 mmols) em 1 mL de MeOH, semialdeído succínico (0,03 mmols) foi adicionado, seguido da adição de BH₃ 8M:Piridina (0,03 mmols). Depois de agitação durante a noite, o composto 2-1 foi purificado por LC prep.-MS (CI)*m/z* 618,2 (MH⁺) *t_R* = 1,005 (método 1).

[00109]Os seguintes compostos foram sintetizados de acordo com o procedimento acima.

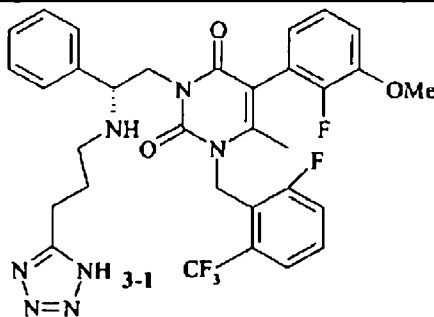


Nº	R _{2a}	R _{1a}	R _{1b}	p.m.	Massa	<i>t_R</i> (Método #)
2-1	CF ₃	2-Cl	H	618,02	618,02	1,005 (1)
2-2	CF ₃	2-F	H	601,57	602,2	0,976 (1) 5,194 (6)
2-3	CF ₃	H	H	583,58	584,3	1,000 (1) 5,572 (6)
2-4	CF ₃	3-isopropila	H	625,66	626,3	6,882 (1)
2-5	CF ₃	3-etóxi	H	627,63	628,3	0,913 (1)

2-6	CF ₃	3,4-metil-enodioxi		627,59	628,2	0,932 (1)
2-7	CF ₃	2-F	3-OH	617,57	618,2	0,979 (1)
2-8	CF ₃	3-metila	H	597,61	598,2	5,455 (6)
2-9	SO ₂ CH ₃	2-F	3-metóxi	641,69	642,1	4,820 (6)
2-10	F	2-F	3-metóxi	581,59	582,2	5,532 (6)
2-11	CF ₃	3-Cl	H	618,02	617,9	5,216 (6)
2-12	CF ₃	3,4-O-CH ₂ -CH ₂		625,62	626,0	4,774 (6)
2-13	CF ₃	2-F	3-metila	615,60	616,2	6,381 (6)
2-14	CF ₃	3-isopropilóxi	H	641,66	642,2	6,676 (6)

EXEMPLO 3

3-[2-(R)-{2-[5-TETRAZOLILPROPIL]-AMINO}-2-FENILETIL]-5-(2-FLÚOR-3-METOXIFENIL)-1-[2-FLÚOR-6-(TRIFLUORMETIL)-1-[2-FLÚOR-6-(TRIFLUORMETIL)-BENZIL]-6-METIL-PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA



Etapa 3A: 3-[2(R){[3-cianopropil-amino]-2-feniletíl]-5-(flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 3a

[00110]O composto 1f (110 mg, 0,2 mmols) foi dissolvido em acetonitrila (5 mL) e diisopropiletil amina (52 mg, 0,4 mmols) foi adicionada, seguida pela adição de 4-bromobutironitrila (90 mg, 0,6 mmols). A mistura de reação foi refluxada durante 16 horas. Voláteis foram evaporados e o resíduo foi purificado por cromatografia

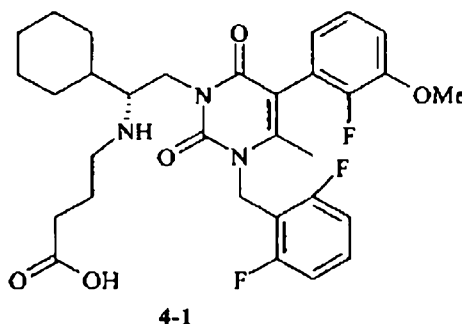
“flash” (sílica, MeOH a 5%/CH₂Cl₂) para dar o composto 3a (115 mg, 94%). MS (CI) *m/z* 613,3 (MH⁺).

Etapa 3B: 3-[2(R)-{2-[5-tetrazoil]-amino}-2-feniletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 3-1

[00111]Uma solução de 3a (38 g, 0,06 mmols) em tolueno (5 mL) foi adicionada tributilestanho azida (42 mg, 0,12 mmols), e a mistura de reação foi aquecida a 100°C durante 14 horas. A mistura foi resfriada, dividida entre EtOAc e NaOH 1N, e a camada orgânica foi lavada com HCl 1N e salmoura. A camada orgânica foi secada (sulfato de sódio), evaporada e o resíduo foi purificado por cromatografia “flash” (sílica, MeOH a 7%/CH₂Cl₂) para dar o composto 3-1 (10 mg, 25%). HPLC-MS (CI) *m/z* 656,2 (MH⁺), *t_R* = 2,128 min, (método 4).

EXEMPLO 4

3-[2(R)-{HIDROXICARBONILPROPIL-AMINO}-2-CICLOEXILETIL]-5-(2-FLÚOR-3-METOXIFENIL)-1-[2,6-DIFLUORBENZIL]-6-METIL-PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA



Etapa 4A: Preparação de 1-cicloexil-2-hidroxietilcarbamato de ter-butila 4a

[00112]Uma solução de N-(t-butiloxicarbonil)cicloexil-glicina (2,0 g, 7,77 mmols) em THF anidro (10 mL) foi resfriada para 0°C. Solução de borano (1M em THF, 15,5 mL, 15,5 mmols) foi adicionada lentamente e a mistura de reação foi aquecida para a temperatura ambiente e agitada por 2 horas. A reação foi finalizada com MeOH (5 mL), voláteis foram evaporados e o resíduo foi dividido entre água e EtOAc. A camada orgânica foi lavada com NaHCO₃ saturado/ água, salmoura,

secada (sulfato de sódio) e evaporada para dar 1-cicloexil-2-hidroxietilcarbamato de ter-butila 4a (1,26 g, 66,7%), MS (CI) m/z 144,2 (MH⁺-Boc).

Etapa 4B: Preparação de 5-bromo-3-[2-(R)-ter-butoxicarbonilamino-2-cicloexiletil]-1-[2,6-difluorbenzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 4b

[00113] Uma solução de 1-cicloexil-2-hidroxietilcarbamato de ter-butila 4a (638 mg, 2,62 mmols) em THF (10 mL) foi tratada com 5-bromo-1-(2,6-difluorbenzil)-6-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 1d.1 (869 mg, 2,62 mmols) e trifenilfosfina (1,03 g, 3,93 mmols) em temperatura ambiente, então azodicarboxilato de di-ter-butila (906 mg, 3,93 mmols) foi introduzida. A mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente durante 16 horas, e voláteis foram evaporados. O resíduo foi dividido entre NaHCO₃ saturado/H₂O e EtOAc. A camada orgânica foi secada (sulfato de sódio), evaporada e purificada por cromatografia "flash" (sílica, EtOAc a 25%/hexanos) para dar o composto 4b (1,39 g, 95,4%). MS (CI) m/z 456,1, 458,1 (MH⁺-Boc).

Etapa 4C: Preparação de 3-[2(R)-ter-butoxicarbonilamino-2-cicloexiletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2,6-difluorbenzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 4c

[00114] A 5-Bromo-3-[2(R)-terbutoxicarbonilamino-2-ciclo-exiletil]-1-[2,6-difluorbenzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H) -diona 4b (1,0 g, 1,79 mmols) em benzeno/EtOH/dimetil éter etileno glicólico (20/2/22 mL) foram adicionados ácido 2-flúor-3-metoxifenilborônico (382 mg, 2,24 mmols) e Ba(OH)₂ saturado/água (~0,5M, 15 mL). A mistura de reação foi desoxigenada com N₂ por 10 minutos, tetraquis(trifenilfos-fina)paládio (0) (208 mg, 0,18 mmols) foi adicionado e a mistura de reação foi aquecida a 80°C, durante a noite, sob N₂. A mistura de reação foi dividida entre salmoura e EtOAc. A camada orgânica foi secada (sulfato de sódio), evaporada, e purificada por cromatografia "flash" (sílica, EtOAc a 30%/hexanos) para dar o composto 4c (348 mg, 32,3%). MS (CI) m/z 502,2 (MH⁺-Boc).

Etapa 4D: Preparação de 3-(2(R)-amino-2-cicloexiletil)-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2,6-difluorbenzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 4d

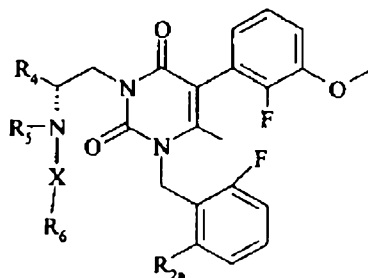
[00115]Ao composto 4c (300 mg, 0,5 mmols) em diclo-rometano (2 mL) foi adicionado TFA (2 mL) e a mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente, durante 1 hora. Voláteis foram evaporados e o resíduo foi dividido entre NaHCO₃ saturado/água e EtOAc. A camada orgânica foi secada, evaporada, purificada por HPLC de fase reversa (coluna C-18, ACN 15-75%/água) para dar o composto 4d. MS (CI) *m/z* 502,2 (MH⁺).

Etapa 4E: Preparação de 3-[2(R)-{hidroxicarbonilpropil-amino}-2-cicloexiletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2,6-difluorbenzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona -1

[00116]A uma solução do composto 4d (10 mg, 0,02 mmols) em metanol (2 mL) foi adicionado semialdeído succínico (15 mg, solução aquosa a 15%), seguido da adição de borano/piridina (8M, 3 µL). A mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente, por 1 hora. Voláteis foram evaporados e o resíduo foi purificado diretamente em placa de TLC preparativa eluindo com MeOH a 7%/CH₂Cl₂ para dar o composto 4-1 (5 mg). MS (CI) *m/z* 588,3 (MH⁺).

[00117]3-[2(R)-{hidroxicarbonilpropil-amino}-2-cicloexi-letil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil) benzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 4-2 foi sinte-tizada usando o mesmo procedimento e intermediário 1d.

[00118]Os seguintes compostos foram sintetizados de acordo com o procedimento acima.

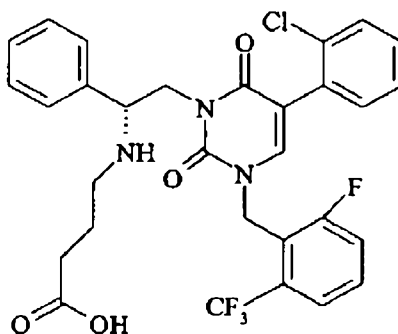


Nº	-N(R ₅)-X-R ₆	R _{2a}	R ₄	p.m.	Massa	t _R (Método #)
4-1		F	Cicloexila	587,63	588,4	5,350 (3)
4-2		CF ₃	Cicloexila	637,64	638,3	27,56 (5)

4-3		CF ₃	Ciclopentila	623,60	624,2	2,290 (4)
4-4		CF ₃	Isobutila	611,61	612,3	6,480 (6)
4-5		CF ₃	Cicloexila	651,67	652,1	2,340 (4)
4-6		CF ₃	Isobutila	625,63	626,0	2,593 (4)
4-7		CF ₃	Isobutila	639,66	640,0	2,61 (4)
4-8		CF ₃	Isobutila	597,58	598,0	2,571 (4)

EXEMPLO 5

3-[2(R)-{HIDROXICARBONILPROPIL-AMINO}-2-FENILETIL]-5-(2-CLOROFENIL)-1-[2-FLÚOR-6-(TRIFUORMETIL)BENZIL]-PIRIMIDINA-2,4-(1H,3H)-DIONA



Etapa 5A: Preparação de 5-bromo-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4-(1H,3H)-diona 5a

[00119]Uma suspensão de 5-bromouracila (31,0 g) em 300 mL de dicloroetano é tratada com N,O-bis(trimetilsilil) acetamida(80 mL). A mistura de reação é aquecida sob nitrogênio. A solução é resfriada para a temperatura ambiente, brometo de 2-flúor-6-(trifluormetil)benzila (50 g) é adicionado e a mistura de reação é aquecida durante a noite, sob o nitrogênio. A reação é resfriada, finalizada com MeOH e dividida entre diclorometano e água. A camada orgânica é lavada com salmoura, secada (sulfato de sódio) e evaporada para dar um sólido. O produto bruto é triturado com éter, filtrado e lavado com éter três vezes, fornecendo

40,7 g de 5-bromo-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil] pirimidina,2,4(1H,3H)-diona 5a. MS (CI) m/z 366,0, 368,0 (MH⁺).

Etapa 5B: Preparação de 3-[2(R)-amino-2-feniletíl]-5-bromo-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 5b

[00120]Uma solução de 5-bromo-1-[2-flúor-6-(trifluor-metil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 5a (19,2 g, 52,3 mmols) em THF (180 mL) foi tratada com N-(t-butiloxi-carbonil)-D- α -fenilglicinol (13,6 g, 57,5 mmols) e trifenil-fosfina (20,6 g, 78,5 mmols), a temperatura ambiente, então azodicarboxilato de di-ter-butila (18,0 g, 78,5 mmols) foi introduzido em várias porções durante 5 minutos. A mistura foi agitada a temperatura ambiente, por 16 horas, THF (90 mL) foi adicionado, e a mistura foi aquecida para 50°C. HCl concentrado (34,6 mL, 418 mmols) foi adicionado, e a mistura de reação foi agitada a 50°C, por 40 horas. Depois de diluição com acetato de etila (100 mL), o sólido foi filtrado, lavado com acetato de etila adicional (100 mL) e secado para dar o composto 5b (26,9 g, 98%), como um pó branco. MS(CI) m/z 485,00, 487,0 (MH⁺).

Etapa 5C: Preparação de 3-[2(R)-amino-2-feniletíl]-5-(2-clorofenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 5c

[00121]Ao composto 5b (10,45 g, 20 mmols) em dioxano/água (180/20 mL) foi adicionado ácido 2-clorofenilborônico (6,26 g, 40 mmols) e Na₂CO₃ (12,72 g, 120 mmols). A mistura foi desoxigenada com N₂ por 15 minutos, tetraquis(trifenilfosfina)paládio (0) (2,31 g, 2 mmols) foi adicionado e a mistura de reação foi aquecida a 90°C, por 16 horas. A reação foi dividida entre EtOAc e H₂O. A camada orgânica foi lavada com salmoura, secada sobre Na₂SO₄ concentrado, e purificada por cromatografia em coluna em sílica-gel com acetato de etila/hexanos/trietilamina 500/500/6 a 800/200/7 para render o composto 5c (7,26 g, 70%) como uma espuma branca. MS (CI) m/z 518,0, 520,1 (MH⁺).

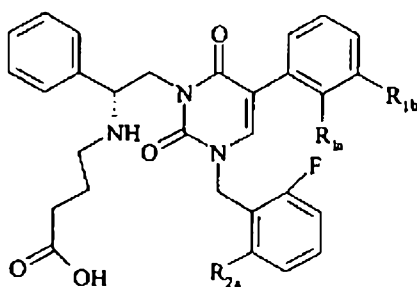
Etapa 5D: Preparação de 3-[2(R)-{etoxicarbonilpropil-amino}-2-feniletil]-5-(2-clorofenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 5d

[00122] Uma mistura do composto 5c (4,1 g, 7,93 mmols), 4-bromobutirato de etila (3,6 mL, 23,79 mmols) e K_2CO_3 (2,2 g, 15,86 mmols) em MeCN (80 mL) foi refluxada por 16 horas. MeCN foi removido, e o resíduo foi dividido entre EtOAc e H_2O . A camada orgânica foi lavada com salmoura, secada sobre Na_2SO_4 , concentrada e purificada por cromatografia em coluna em sílica-gel com acetato de etila/hexanos/trietilamina 400/600/7 para render o composto 5d (2,5 g, 50%), como um xarope amarelado. MS (CI) m/z 632,2, 234,2 (MH^+).

Etapa 5E: Preparação de 3-[2(R)-{hidroxicarbonilpropil-amino}-2-feniletil]-5-(2-clorofenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 5-1

[00123] Ao composto 5d (2,4 g, 3,8 mmols) foi adicionado THF (30 mL) e H_2O (30 mL), seguido por NaOH (1,588 g, 39,7 mmols). A mistura foi agitada a $50^\circ C$ por 16 horas. THF foi removido a vácuo, a solução aquosa foi lavada com éter, e resfriada a $0^\circ C$. Neutralização com ácido cítrico aquoso a 10% (26,0 mL, 40,6 mmols) rendeu um precipitado que foi lavado com água e secado para dar o composto 5-1 (1,88 g, 82%). HPLC-MS (CI) m/z 604,1, 606,1 (MH^+), t_R = 2,511 (método 4), t_R = 26,98 (método 5).

[00124] Os seguintes compostos foram sintetizados de acordo com o procedimento acima.

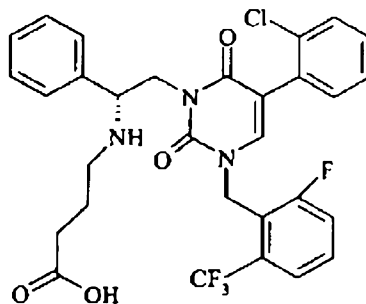


Nº	R _{1a}	R _{1b}	R _{2a}	p.m.	Massa	t_R (Método #)
5-1	Cl	H	CF ₃	604,00	604,1,	2,511 (4)

					606,1	26,98 (5)
5-2	F	OCH ₃	CF ₃	617,57	618,2	2,482 (4) 25,45 (5)
5-3	Ciano	H	CF ₃	594,56	594,9	5,548 (6)
5-4	F	CH ₃	CF ₃	601,57	602,2	6,144 (6)
5-5	Cl	CH ₃	CF ₃	618,02	617,9	5,104 (6)
5-6	F	H	CF ₃	587,54	588,2	5,172 (6)
5-7	F	OCH ₃	F	567,56	568,2	2,108 (4)
5-8	Cl	H	F	553,99	554,1	2,137 (4)
5-9	Cl	H	SO ₂ CH ₃	614,09	614,2	5,020 (6)
5-10	F	OCH ₃	SO ₂ CH ₃	627,66	628,2	1,178 (1)

EXEMPLO 6

3-[2(R)-{HIDROXICARBONILPROPIL-AMINO}-2-FENILETIL]-5-(2-
CLOROFENIL)-1-[2-FLÚOR-6-(TRIFLUORMETIL)BENZIL]-PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-
diona

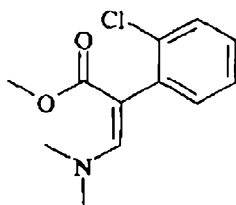


Etapa 6A: Preparação do composto (2-clorofenil)acetato de metila 6a

[00125]A ácido 2-clorofenilacético (1,04 g, 6 mmols) em MeOH (25 mL) foi adicionado ácido sulfúrico (6 gotas) e a solução foi refluxada durante 16 horas. Depois de concentração, o resíduo foi absorvido em acetato de etila e lavado com

NaHCO₃ aquoso, saturado, H₂O e salmoura. A camada orgânica foi secada sobre Na₂SO₄ e concentrada para dar (2-clorofenil)acetato de metila 6a. (1,08 g, 97,5%) como um óleo amarelado. GCMS (EI) *m/z* 184, 186 (M⁺).

Etapa 6B:: Preparação de 2-(2-clorofenil)-3-(dimetilamino)acrilato de metila 6b



[00126] Uma solução de (2-clorofenil)acetato de metila 6a (1,08 g, 5,85 mmols) em DMFDMA (10 mL, 70,8 mmols) foi refluxada por 16 horas. Depois de evaporação, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna em sílica-gel com acetato de etila/hexanos 1/3 a 1/5 para render (2-clorofenil)acetato de metila não reagido 6a (0,67 g, 62%) primeiro, e então 2-(2-clorofenil)-3-(dimetilamino)acrilato de metila 6b (0,38 g, 27%; 71% com base em material de partida recuperado) como um xarope incolor. MS (CI) *m/z* 240,2, 242,2 (MH⁺).

Etapa 6C: Preparação de 5-(2-clorofenil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 6c

[00127] A uma mistura de 2-(2-clorofenil)-3-(dimetilamino)acrilato de metila 6b (0,26 g, 1,08 mmols), uréia (0,2 g, 3,26 mmols) e NaI (0,49 g, 3,26 mmols) em acetonitrila (5 mL) foi adicionado TMSCl (0,41 mL, 3,26 mmols). A mistura resultante foi refluxada por 16 horas, resfriada para a temperatura ambiente, e NaOH 1,0M (8 mL) foi adicionado. A solução resultante foi agitada durante 20 horas, e acetonitrila foi removida a vácuo. A solução aquosa foi lavada com éter, resfriada em banho de gelo, e neutralizada com HCl 1N (8 mL). O precipitado foi filtrado, lavado com H₂O adicional e secado para dar 5-(2-clorofenil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 6c (0,16 g, 66%) como um sólido branco. MS (CI) *m/z* 222,9, 224,9 (MH⁺).

Etapa 6D: Preparação de 5-(2-clorofenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)-benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 6d

[00128]A uma suspensão de 5-(2-clorofenil)pirimidina-2,4(2-clorofenil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 6c (0,16 mL, 0,72 mmols) em acetonitrila (5 mL) foi adicionada bis(trimetilsilil)acetamida (0,36 mL, 1,44 mmols), e a solução resultante foi refluxada por uma hora e meia. Depois de resfriamento para a temperatura ambiente, brometo de 2-flúor-3-trifluormetilbenzila (0,22 g, 0,86 mL) foi adicionado, e o refluxo foi reiniciado por 16 horas. A reação foi finalizada por adição de MeOH (5 mL) e agitação por 2 horas. Depois de concentração, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna em sílica-gel com acetato de etila/hexanos 1/1 para render 5-(2-clorofenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 6d (0,25 g, 87%) como um sólido branco. MS (CI) m/z 398,9, 400,9 (MH⁺).

Etapa 6E: Preparação de 3-[2(R)-{ter-butoxicarbonil-amino}-2-feniletíl]-5-(2-clorofenil)-1-[2-fluor-6-(trifluormetil)benzil]-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 6e

[00129]Uma mistura de 5-(2-clorofenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 6d (125 mg, 0,32 mmols), K₂CO₃ (130 mg, 0,86 mmols) e mesilato de N-(t-butiloxicarbonil)-D- α -fenilglicinol (0,2 g, 0,64 mmols) em DMF (3 mL) foi aquecida a 75°C, por 16 horas. A reação foi diluída com acetato de etila, lavada com H₂O e salmoura, secada sobre Na₂SO₄ e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna em sílica-gel com acetato de etila/hexanos 2/3 para render o composto 6e (144 mg, 74%). MS (CI) m/z 518,0, 520,0 (MH⁺-Boc).

Etapa 6F: Preparação de 3-[2(R)-amino-2-feniletíl]-5-(2-clorofenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 6f

[00130]A uma solução do composto 6e (0,144 g, 0,23 mmols) em DCM (1 mL) foi adicionado TFA (0,5 mL, 6,5 mmols) e a mistura foi agitada a temperatura ambiente por 1,5 h. Após concentração, o resíduo foi absorvido em DCM e NaHCO₃ aquoso, saturado foi adicionado. A camada aquosa foi extraída com DCM. Os

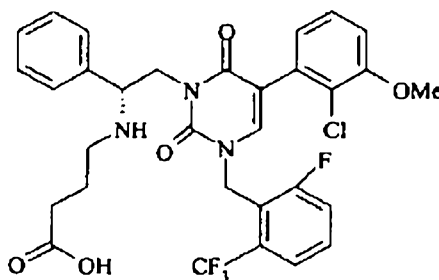
extratos orgânicos combinados foram secados sobre Na₂SO₄ e concentrados para dar o composto 6f (0,12 g). MS (CI) *m/z* 518,0, 520,1 (MH⁺).

Etapa 6G: Preparação de 3-[2(R)-{hidroxicarbonilpropil-amino}-2-feniletíl]-5-(2-clorofenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 6-1

[00131]Uma solução do composto 6f (0,1 g, 0,19 mmols) e semialdeído succínico (solução a 15% em peso em água, 0,13 mL, 0,21 mmols) em MeCN foi agitada a temperatura ambiente por 5 minutos. Complexo de borano piridina (8M; 72 µL) foi adicionado e agitado por 16 horas. Depois de concentração, o resíduo foi purificado em placa de TLC preparativa e então por LC preparativa-MS para dar o composto 6-1. HPLC-MS (CI) *m/z* 604,1, 606,1 (MH⁺), *t_R* = 3,511 (método 4).

EXEMPLO 7

3-[2(R)-{HIDROXICARBONILPROPIL-AMINO}-2-FENILETIL]-5-(2-CLORO-3-METOXIFENIL)-1-[2-FLÚOR-6-(TRIFLUORMETIL)BENZIL]PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA



Etapa 7A: Preparação de 2-cloro-3-metoxibenzaldeído 7a

[00132]A uma suspensão de 3-hidroxibenzaldeído (20,12 g, 160 mmols) em HOAc (40 mL) foi adicionado cuidadosamente tBuOCl (20 mL, 176 mmols) com agitação. A reação tornou-se uma solução límpida e fortemente exotérmica. Foi deixada resfriar e agitada por 16 horas, resultando em um precipitado branco. O sólido foi filtrado, lavado com H₂O e secado para dar 2-cloro-3-hidroxibenzaldeído (13,77 g, 55%), GCMS (EI) *m/z* 156,158 (M⁺).

[00133]A uma solução de 2-cloro-3-hidroxibenzaldeído (4,55 g, 29 mmols) em DMF (30 mL) foi adicionado K₂CO₃ (4,8 G, 34,9 mmols) seguido por MeI (2,7 mL,

43,6 mmols) e a mistura foi agitada a temperatura ambiente por 16 horas. Seguindo-se concentração a vácuo, o resíduo foi absorvido em acetato de etila, lavado com H₂O, salmoura, secado sobre Na₂SO₄ e concentrado. Purificação por cromatografia em coluna em sílica-gel com acetato de etila/hexanos 1/5 rendeu 2-cloro-3-metoxibenzaldeído 7a (4,68 g, 94%) como um óleo incolor, que se solidificou ao ficar em descanso. GCMS (EI) *m/z* 170, 172 (M⁺).

Etapa 7B: Preparação de 2-cloro-1-metóxi-3-[2-(metilsulfanil)-2-(metilsulfinil)vinil]benzeno 7b

[00134]A uma solução de 2-cloro-3-metoxibenzaldeído 7a (4,65 g, 27,3 mmols) e sulfóxido de (metiltio)metila (4,3 mL, 43,9 mmols) em THF (25 mL) foi adicionada uma solução metanólica a 40% de Triton B (6,2 mL, 13,6 mmols) e a solução resultante foi refluxada por 16 horas. Depois da remoção do THF, o resíduo foi absorvido em acetato de etila, lavado com HCl 1N, H₂O e salmoura, então secado sobre Na₂SO₄ e concentrado. Purificação por cromatografia em coluna em sílica-gel com diclorometano rendeu 2-cloro-1-metóxi-3-[2-(metilsulfanil)-2-(metilsulfinil)vinil]benzeno 7b (3,61 g, 48%) como um óleo amarelo. GCMS (EI) *m/z* 225 (M⁺-Cl-16), 210 (M⁺-Cl-OMe).

Etapa 7C: Preparação de (2-cloro-3-metoxifenil)acetato de etila 7c

[00135]A uma solução de 2-cloro-1-metóxi-3-[2-(metilsulfanil)-2-(metilsulfinil)vinil]benzeno 7b (3,58 g, 12,9 mmols) em etanol (20 mL) foi adicionada uma solução etanólica 5M de HCl (5,2 mL) e a solução resultante foi refluxada por 3 horas. Depois de evaporação, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna em sílica-gel com diclorometano para render (2-cloro-3-metoxifenil)acetato de etila 7c (2,78 g, 94%) como um óleo amarelo. GCMS (EI) *m/z* 228, 230 (M⁺).

Etapa 7D: Preparação de 2-(2-cloro-3-metoxifenil)-3-(dimetilamino)acrilato de etila 7d

[00136] Uma solução de (2-cloro-3-metoxifenil)acetato de etila 7c (2,78 g, 12 mmols) em DMFDMA (16 mL, 120 mmols) foi refluxada por 16 horas. Após evaporação, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna em sílica-gel com acetato de etila/hexanos 1/2 a 1/1 para render (2-cloro-3-metoxifenil)acetato de etila não reagido 7c (1,8 g, 65%) primeiro, e então 2-(2-cloro-3-metoxifenil)-3-(dimetilamino)acrilato de etila 7d (1,1 g, 32%; 90% com base no material de partida recuperado) como um xarope amarelo. MS (CI) m/z 284,0, 286,0 (MH^+).

Etapa 7E: Preparação de 5-(2-cloro-3-metoxifenil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7e

[00137] A uma mistura de 2-(2-cloro-3-metoxifenil)-3-(dimetilamino)acrilato de etila 7d (1,7 g, 6 mmols), uréia (1,08 g, 18 mmols) e NaI (2,7 g, 18 mmols) em acetonitrila (20 mL) foi adicionado TMSCl (2,3 mL, 18 mmols). A mistura resultante foi refluxada por 16 horas, resfriada para a temperatura ambiente, e NaOH 1,0M (30 mL) foi adicionado. A solução resultante foi agitada por 20 horas, e acetonitrila foi removida a vácuo. A solução aquosa foi lavada com éter, resfriada em banho de gelo, e neutralizada com HCl 1N (30 mL). O precipitado foi filtrado, lavado com H₂O adicional e secado para dar 5-(2-cloro-3-metoxifenil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7e (1,24 g, 82%) como um sólido amarelo pálido. MS (CI) m/z 253,1, 255,1 (MH^+).

Etapa 7F: Preparação de 5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7f

[00138] A uma suspensão de 5-(2-cloro-3-metoxifenil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7e (2,2 g, 8,7 mmols) em acetonitrila (25 mL) foi adicionada bis(trimetilsilil)acetamida (4,3 mL, 17,4 mmols), e a solução resultante foi refluxada por uma hora e meia. A mistura foi resfriada para a temperatura ambiente, brometo de 2-flúor-3-trifluor-metilbenzila (2,7 g, 10,5 mmols) foi adicionado, e refluxo foi reiniciado por 16 horas. A reação foi finalizada por adição de MeOH (25 mL) e agitação por 2 horas. Depois de concentração, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna em

sílica-gel com acetato de etila/hexanos 1/1 para render 5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7f (3,3 g, 88%) como um sólido branco. MS (CI) m/z 429,0, 432,0 (MH⁺).

Etapa 7G: Preparação de 3-(2(R)-(ter-butoxicarbonilamino)-2-feniletíl)-5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7g

[00139]Uma mistura de 5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7f (75 mg, 0,175 mmols), K₂CO₃ (72 mg, 0,525 mmols) e mesilato de N-(t-butoxicarbonil)-D-α-fenilglicinol (0,11 g, 0,35 mmols) em DMF (2 mL) foi aquecida a 75°C, por 16 horas. A reação foi diluída com acetato de etila, lavada com H₂O e salmoura, secada sobre Na₂SO₄ e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna em sílica-gel com acetato de etila/hexanos 2/3 para render o composto 7g (82 mg, 72%) como um sólido branco. MS (CI) m/z 548,0 550,0 (MH⁺-Boc).

Etapa 7H: Preparação de 3-[2(R)-amino-2-feniletíl]-5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7h

[00140]O composto 7g (2,7 g, 4,2 mmols) foi dissolvido em diclorometano [(10 mL), TFA (14 mL, 175 mmols) foi adicionado, e a mistura foi agitada a temperatura ambiente por 4,5 horas. Depois de concentração, o resíduo foi absorvido em DCM, e NaHCO₃ aquoso, saturado foi adicionado. A camada aquosa foi extraída com DCM. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre Na₂SO₄ e concentrados para dar o composto 7h (2,2 g, 96%). MS (CI) m/z 548,00, 550,0 (MH⁺).

[00141]3-[2(R)-amino-2-feniletíl]-5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1-[2,6-difluorbenzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7h.1 foi preparada por substituição do material de partida apropriado usando os procedimentos acima.

Etapa 7I: Preparação de 3-[2(R)-[etoxicarbonilpropil-amino]-2-feniletíl]-5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7i

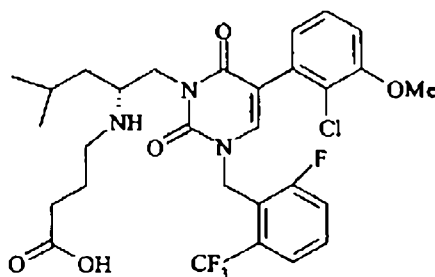
[00142]A uma solução do composto 7h (2,0 g, 3,65 mmols) em DMF (8 mL) foi adicionado Na_2CO_3 (0,47 g, 4,38 mmols) seguido por 4-bromobutirato de etila (0,83 mL, 5,48 mmols). A mistura foi aquecida a 95°C por uma hora e meia, resfriada para a temperatura ambiente, e dividida entre acetato de etila e H_2O . A camada orgânica foi lavada com salmoura, secada sobre Na_2SO_4 e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna em sílica gel com acetato de etila/hexanos/trietilamina 500/500/5 para render o composto 7i (1,29 g) como um sólido branco. MS (CI) m/z 662,2, 664,2 (MH^+).

Etapa 7J: Preparação de 3-[2(R)-{hidroxicarbonilpropil-amino}-2-feniletil]-5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7-1

[00143]Ao composto 7i (0,7 g, 1,06 mmol) foram adicionados THF (6 mL) e H_2O (6 mL) seguido por NaOH (0,17 g, 4,24 mL). A mistura foi agitada a 50°C por 16 horas. THF foi removido a vácuo, a solução aquosa foi lavada com éter, e resfriada a 0°C. Neutralização com ácido cítrico aquoso a 5% (6,0 mL, 4,7 mmols) deu um precipitado, que foi coletado e posteriormente purificado por cromatografia em coluna em sílica-gel com MeOH/DCM/trietilamina 8/100/2 para render o composto 7-1 (0,56 g, 84%) como um sólido branco. HPLC-MS (CI) m/z 634,2, 636,2 (MH^+), t_R = 24,925, (método 5).

EXEMPLO 8

3-[2(R)-{HIDROXICARBONILPROPIL-AMINO}-2-(ISOBUTIL)ETIL]-5-(2-CLORO-3-METOXIFENIL)-1-[2-FLÚOR-6-(TRIFLUORMETIL)BENZIL]PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA



Etapa 8A: Preparação de 3-[2(R)-{ter-butoxicarbonil-amino}-2(isobutil)etil]-5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8a

[00144]A uma solução de N(t-butiloxicarbonil)-D- α -leucinol (1,21 g, 5,57 mmols) em piridina (6 mL) foi adicionado cloreto de tosila (1,6 g, 8,35 mmols). A mistura de reação foi agitada para a temperatura ambiente por 3 horas, diluída com EtOAc, e lavada seqüencialmente com HCl 1N, H₂O, NaHCO₃ aquoso, saturado e salmoura. A camada orgânica foi secada sobre Na₂SO₄, concentrada e purificada por cromatografia em coluna em sílica-gel com acetato de etila/hexanos 1/3 para render éster [3-metil-1-[[[(4-metilfenil)sulfonyl]oxi]metil]butil]-1,1-dimetil carbâmico (1,66 g, 80%), MS (CI) *m/z* 272,2 (MH⁺-Boc).

[00145]Uma mistura de 5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7f (56 mg, 0,13 mmol), K₂CO₃ (754 mg, 0,39 mmols) e éster [3-metil-1-[[[(4-metilfenil)sulfonyl]oxi]metil]butil]-1,1-dimetiletil carbâmico (97 mg, 0,26 mmols) em DMF (2 mL) foi aquecida a 95°C, por 16 horas. A reação foi diluída com acetato de etila, lavada com H₂O e salmoura, secada sobre Na₂SO₄, e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna em sílica-gel com acetato de etila/hexanos 1/1 para render éster [3-metil-1-[[[(4-metilfenil)sulfonyl]oxi]metil]butil]-1,1-dimetiletil carbâmico recuperado (30 mg, 54%) e o composto 8a (30 mg, 37%), MS (CI) *m/z* 528,0, 530,0 (MH⁺-Boc).

Etapa 8B: Preparação de 3-[2(R)-amino-2-(isobutil)etil]-5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8b

[00146]A uma solução do composto 8a (30 mg, 0,048 mmols) em DCM (1 mL) foi adicionado TFA (0,1 mL, 1,3 mmol) e agitada a temperatura ambiente por uma hora e meia. Depois de concentração, o resíduo foi absorvido em DCM e NaHCO₃ aquoso, saturado foi adicionado. A camada orgânica foi extraída com DCM. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre Na₂SO₄ e concentrados para dar o composto 8b. MS (CI) *m/z* 528,0, 530,0 (MH⁺).

Etapa 8C: Preparação de 3-[2(R)-{etoxicarbonilpropil-amino}-2-(isobutil)etil]-5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8c

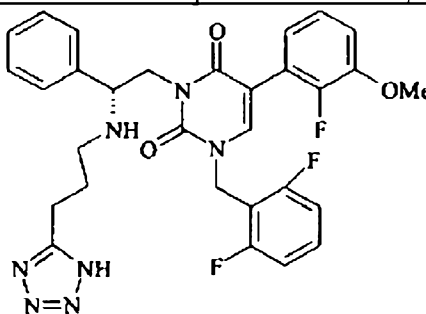
[00147]A uma solução do composto 8b (25 mg, 0,048 mmols) em DMF (1 mL) foi adicionado K₂CO₃ (21 mg, 0,15 mmols) seguido por 4-bromobutirato de etila (0,015 mL, 0,1 mmol). A mistura foi aquecida a 95°C por 16 horas, resfriada para a temperatura ambiente, a dividida entre acetato de etila e H₂O. A camada orgânica foi lavada com salmoura, secada sobre Na₂SO₄ e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna em sílica-gel com acetato de etila/hexanos/trietilamina 500/500/5 para render o composto 8c. MS (CI) *m/z* 642,2, 644,2 (MH⁺).

Etapa 8D: Preparação de 3-[2(R)-{hidroxicarbonilpropil-amino}-2-(isobutil)etil]-5-(2-cloro-3-metoxifenil)-1-[2-flúor -6-(trifluormetil)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8-1

[00148]Ao composto 8c (10 mg, 0,016 mmols) foram adicionados THF (0,3 mL) e H₂O (0,3 mL) seguido por NaOH (6,4 mg, 0,16 mmols). A mistura foi agitada a 50°C, por 16 horas, e purificada por LCMS preparativa para dar o composto 8-1. MS (CI) *m/z* 614,1, 616,1 (MH⁺), *t_R* = 6,550 min (método 6)

EXEMPLO 9

3-[2(R)-{2[1-(5-TETRAZOLIL)PROPIL]AMINO}-2-FENILETIL]-5-(2-FLÚOR-3-METOXIFENIL)-1-[2,6-DIFLUORBENZIL]PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA



Etapa 9A: Preparação de 3[2(R)-{2-[3-cianopropil-amino]-2-feniletil]-5(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2,6-difluorbenzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 9a

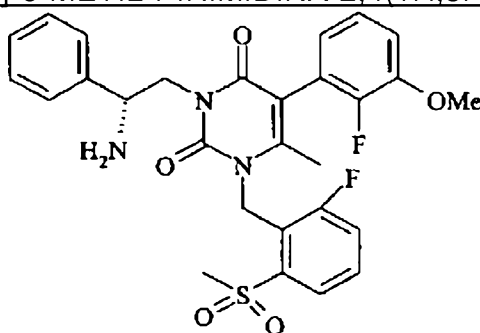
[00149] Uma solução de 7h.1 (2,59 g, 5 mmols) em CH₃CN (25 mL) foi adicionada diisopropil etil amina (2,61 mL, 15 mmols), seguindo-se a adição de 4-bromobutironitrila (2,22 g, 15 mmols). A mistura de reação foi refluxada por 16 horas. Voláteis foram evaporados e o resíduo foi purificado por cromatografia “flash” (sílica, MeOH a 4%/CH₂Cl₂) para dar o composto 9a (2,62 g, 95,5%). MS (CI) *m/z* 549,1 (MH⁺).

Etapa 9B: Preparação de 3-[2(R)-{2-[5-tetrazoilpropil]-amino}-2-feniletíl]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2,6-difluorbenzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 9-1

[00150] A uma solução de 9a (274mg, 0,5 mmols) em DMF (5 mL) foram adicionados azida sódica (97 mg, 1,5 mmol) e cloreto de amônio (120 mg, 2,25 mmols). A mistura de reação foi aquecida a 110°C por 12 horas. A mistura foi resfriada, dividida entre EtOAc e NaHCO₃ saturado/água, lavada com salmoura, secada (sulfato de sódio) e evaporada. O resíduo foi purificado por cromatografia “flash” (sílica, MeOH a 6%/CH₂Cl₂) para dar o composto 9-1 (52 mg, 17,6%). HPLC-MS (CI) *m/z* 592,3, (MH⁺), *t_R* = 2,150, (método 4).

EXEMPLO 10

3-[2(R)-AMINO-2-FENILETIL]-5-(2-FLÚOR-3-METOXIFENIL)-1-[2-FLÚOR-6-METILSULFONILBENZIL]-6-METIL-PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA



Etapa 10A: Preparação de 3-[2(R)-ter-butoxicarbonilamino-2-feniletíl]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2,6-difluorbenzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 10a

[00151] A uma solução do composto 1f.1 (28 g, 56 mmols) em diclorometano (200 mL) foi adicionada uma solução de dicar-bonato de di-ter-butila (12 g, 56

mmols) em diclorometano (100 mL), gota-a-gota através de funil de adição. A mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente por 2 horas. A mistura de reação foi concentrada a vácuo para render o desejado produto 10a como um sólido amarelo claro (33 g, 56 mmols, 100%). HPLC-MS (CI) m/z = 496,1 ($M+H^+-Boc$), t_R = 3,052 (método 4).

Etapa 10B: Preparação de 3-[2(R)-ter-butoxicarbonilamino-2-feniletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-metiltiobenzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 10b

[00152]A uma solução do composto 10a (33 g, 56 mmols) em DMSO seco (100 mL) foi adicionado tiometóxido de sódio (4,0 g, 56 mmols) sob nitrogênio. A mistura de reação foi aquecida para 100°C, sob nitrogênio, por 1 hora. Outro 0,28 eq de tiometóxido de sódio (1,1 g, 16 mmols) foi adicionado, e a mistura de reação foi aquecida para 100°C, sob nitrogênio por 1 hora. A mistura de reação foi resfriada e dividida entre éter etílico e água. A camada orgânica foi lavada com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e salmoura, secada com sulfato de sódio, filtrada e concentrada. O produto bruto foi purificado por cromatografia “flash” em sílica-gel eluída com acetato de etila a 50% em hexano para render o composto 10b como um sólido amarelo pálido (27 g, 44 mmols, 78%). HPCL-MS (CI) m/z = 524,1 ($M+H^+-Boc$), t_R = 3,134 (método 4). RMN 1H ($CDCl_3$) δ 1,38 (s, 9H), 2,07 (s, 3H), 2,51 (s, 3H), 3,90 (s, 3H), 4,07-4,13 (m, 1H), 4,29-4,39 (m, 1H), 5,30-5,53 (m, 2H), 5,79-5,85 (m, 1H), 6,80-6,91 (m, 2H), 6,70 (dd, 1H), 7,06-7,15 (m, 2H), 7,22-7,41 (m, 6H).

Etapa 10C: Preparação de 3-[2(R)-ter-butoxicarbonilamino-2-feniletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-metilsulfonilbenzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 10c

[00153]A uma solução do composto 10b (27 g, 44 mmols) em diclorometano anidro (400 mL) foi adicionado ácido 3-cloroperoxibenzóico (mCPBA, 30 g, 180 mmols). A mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente, durante a noite. A mistura de reação foi dividida entre diclorometano e água. A camada orgânica foi

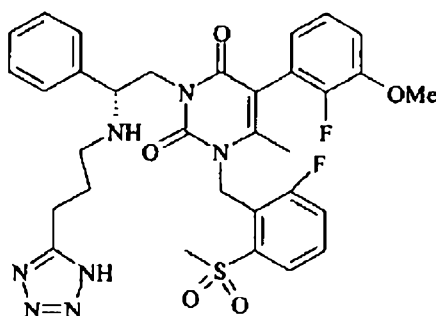
lavada com solução aquosa, saturada de bicarbonato de sódio e salmoura, secada com sulfato de sódio, filtrada e concentrada. O produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica-gel eluindo com acetato de etila a 50% em hexano para render o desejado composto 10c de produto, como um sólido amarelo pálido (15 g, 24 mmols, 53%). HPLC-MS m/z = 556,0 ($M+H^+$ -Boc), t_R = 2,941 (método 4). RMN 1H ($CDCl_3$) δ 1,38 (s, 9H), 2,27 (brs, 3H), 3,48 (s, 3H), 3,91 (s, 3H), 4,01-4,15 (m, 1H), 4,24-4,40 (m, 1H), 4,95-5,05 (m, 1H), 5,58-5,68 (m, 2H), 6,85-6,91 (dd, 1H), 7,02 (dd, 1H), 7,14 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,19-7,55 (m, 7H), 7,97 (d, J = 7,6 Hz, 1H).

Etapa 10D: Preparação de 3-[2(R)-amino-2-feniletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-metilsulfonilbenzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 10-1

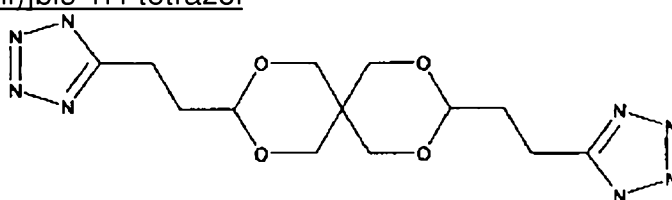
[00154]A uma solução do composto 10c (10 g, 15 mmols) em diclorometano anidro (60 mL) foi adicionado ácido trifluoracético (TFA, 16 mL). A mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente, por 4 horas. A mistura de reação foi concentrada, e dividida entre acetato de etila e solução aquosa diluída de NaOH. A camada orgânica foi lavada com solução aquosa, saturada de bicarbonato de sódio e salmoura, secada com sulfato de sódio, filtrada e concentrada para render um sólido castanho amarelado (8,0 g, 14 mmols, 95%). HPLC-MS (CI) m/z = 556,2 ($M+H^+$), t_R = 2,354 (método 4). RMN 1H ($CDCl_3$) δ 2,25 (s, 3H), 3,42 (s, 1,5H), 3,43 (s, 1,5H), 3,91 (s, 1,5H), 3,92 (s, 1,5H), 3,98-4,22 (m, 2H), 4,33-4,38 (m, 1H), 5,60 (brs, 2H), 6,80-6,89 (m, 1H), 6,97-7,03 (m, 1H), 7,11-7,17 (m, 1H), 7,22-7,37 (m, 6H), 7,46-7,54 (m, 1H), 7,95 (dd, 1H).

EXEMPLO 11

3-[2(R)-{2-[1-(5-TETRAZOIL)PROPI]AMINO}-2-FENILETIL]-5-(2-FLÚOR-3-METOXIFENIL)-1-[2-FLÚOR-6-METILSULFONILBENZIL]-6-METILPIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA



Etapa 11A: Preparação de 5,5'-[2,4,8,10-tetraoxaespíro[5.5]undecano-3,9-diilbis(etano-2,1-diil)]bis-1H-tetrazol

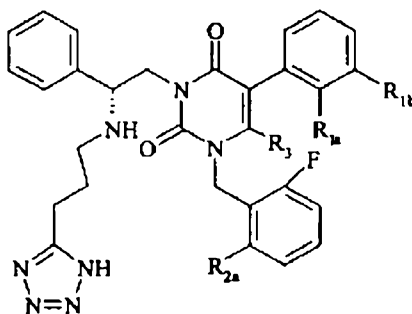


[00155]3,9-bis(2-Cianoetil)-2,4,8,10-tetraoxaespíro[5.5] undecano (5,38 g, 20 mmols), azidotrimetilsilano (10,6 mL, 80 mmols), e óxido de di-butilestanho (2,48 g, 4 mmols) foram suspensos em 40 mL de tolueno e 40 mL de dioxano e aquecidos sob refluxo durante 18 horas. A reação foi resfriada para a temperatura ambiente e diluída com 100 mL de hexano. O precipitado sólido foi coletado, lavado com hexano (2 x 30 mL) e secado a ar. O sólido foi suspenso em 100 mL de solução de carbonato de sódio a 5%, acetato de etila suficiente foi adicionado para dissolver a maior parte do sólido, e a mistura foi agitada por 1 hora. As camadas foram separadas, a camada aquosa foi lavada com acetato de etila (2 x 100 mL), e as camadas orgânicas foram novamente extraídas com carbonato de sódio a 5% (1 x 50 mL). As camadas aquosas foram combinadas, acidificadas para pH 7 com ácido clorídrico concentrado, filtradas em Celite e acidificadas para pH 3. O sólido foi coletado, lavado com água (2 x 50 mL) e acetona (2 x 50 mL) e secado a vácuo para dar 5,5'-[2,4,8,10-tetraoxaespíro[5.5]undecano-3,9-diilbis (etano-2,1-diil)]bis-1H-tetrazol 11a (4,71 g, 67%). RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4,56 (t, 2H, J = 5 Hz), 4,28 (dd, 2H, J = 9,2 Hz), 3,58 (d, 2H, J = 11 Hz), 3,57 (dd, 2H, J = 11,2 Hz), 3,36 (d, 2H, J = 11 Hz), 2,94 (t, 4H, J = 7,5 Hz), 1,97 (dt, 4H, J = 8,4 Hz).

Etapa 11B: Preparação de 3-[2(R)-{2-[1-(5-tetrazoil)propil]-amino}-2-feniletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-metilsulfonilbenzil]-6-metilpirimidina-2,4-(1H,3H)-diona 11-1

[00156] Uma amostra de 25 mg de 5,5'-[2,4,8,10-tetraoxaespíro[5.5]undecano-3,9-diilbis)etano-2,1-diil]bis-1H-tetrazol 11 a (70 µL) e ácido p-toluenossulfônico (20 mg, 100 µmols) foram suspensos em 1 mL de água e aquecidos a 80°C, por 18 horas. A solução foi resfriada e adicionada ao composto 10-1 (29 mg, 50 µmols) dissolvido em 1 mL de etanol e 17 µL de trietilamina (100 µmols). Complexo de borano-piridina (24 µL, 240 µL) foi então adicionado e a mistura foi agitada 0,25 h, até que o borbulhamento cessasse. Os voláteis foram removidos e o resíduo absorvido em 2 mL de acetato de etila e lavado com água (1 x 0,5 mL). A camada de acetato de etila foi evaporada e purificada por LC preparativa/MS para dar 11-1 (5 mg, 12% de rendimento).

[00157] Os compostos seguintes foram sintetizados de acordo com o procedimento acima.

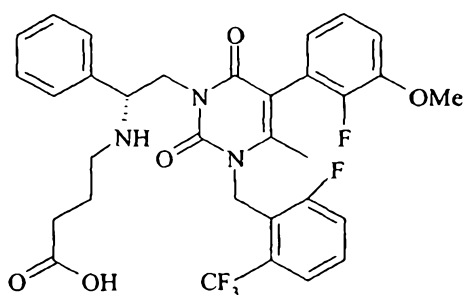


Nº	R _{1a}	R _{1b}	R _{2a}	R ₃	p.m.	Massa	t _R (Método #)
11-1	F	OMe	SO ₂ Me	CH ₃	665,7	666,2	20,92 (5)
11-2	Cl	H	CF ₃	H	628,0	628,2	27,34 (5)
11-3	F	OMe	F	CH ₃	605,6	606,2	24,19 (5)
11-4	F	OMe	CF ₃	CH ₃	655,6	656,2	2,540 (4)

[00158]Será apreciado que embora as modalidades específicas da invenção tenham sido descritas aqui para fins de ilustração, várias modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito e escopo da invenção. Por conseguinte, a invenção não está limitada a não ser pelas reivindicações apensas.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto **CARACTERIZADO** pelo fato de que é 3-[2(R)-{hidroxicarbonilpropil-amino}-2-feniletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluorometil)benzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona tendo a estrutura:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é um sal de sódio de 3-[2(R)-{hidroxicarbonilpropil-amino}-2-feniletil]-5-(2-flúor-3-metoxifenil)-1-[2-flúor-6-(trifluorometil)benzil]-6-metil-pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona.

3. Uso do composto como definido na reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de uma condição relacionada ao hormônio sexual de um indivíduo que necessite da mesma.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição relacionada ao hormônio sexual é endometriose, doença de ovário policístico, fibróides uterinos ou puberdade precoce.

5. Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um composto conforme definido na reivindicação 1 ou 2 e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.