

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 98.592

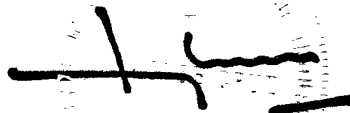
REQUERENTE: MONSANTO COMPANY, norte-americana, industrial, com sede em St. Louis, Missouri 63177-7020, Estados Unidos da América do Norte

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS ARIL ALQUILSULFONIL PIRAZOLES SUBSTITUÍDOS"

INVENTORES:

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

98.593



G.D. SEARLE & CO.

"MÉTODO PARA ESTIMULAR A PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDOS NUM MAMÍFERO,
UTILIZANDO TIOÉTERES FENÓLICOS"

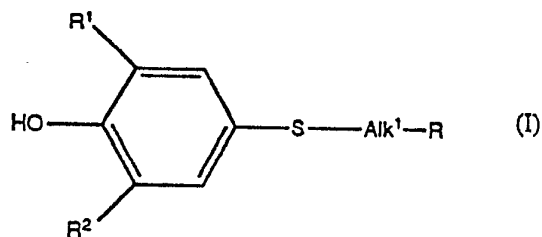
=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

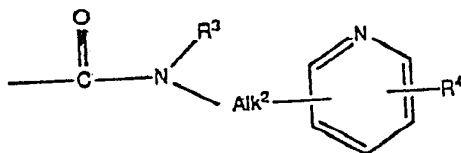
O presente invento é dirigido a um método para estimular a produção de superóxidos em mamíferos utilizando tioéteres fenólicos que estimulam a produção de superóxidos.

Mais concretamente, o método consiste na administração a um mamífero necessitado desse tratamento de uma quantidade de um composto da Fórmula I:



ou de um seu sal ou esteroisômero ou isômero geométrico farmacêuticamente aceitáveis; em que R¹ e R² são iguais ou diferentes e

representam independentemente terc-alquilo ou fenilo; Alk^1 representa cadeia alquileno linear ou ramificada com 1 a 10 átomos de carbono; e R representa, por exemplo:



em que R^3 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono, Alk^2 é uma cadeia alquileno linear ou ramificada com 1 a 4 átomos de carbono, e R^4 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono.

FUNDAMENTOS DO INVENTO

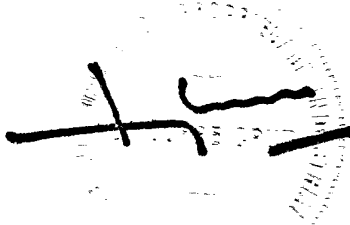
1. Campo do Invento

O presente invento é dirigido a um método para estimular a produção de superóxido usando tioéteres fenólicos que estimulam a produção de superóxido.

2. Informação Fundamental e Técnica Afim

Recentemente, os radicais de oxigénio foram responsabilizados pela patogénese de muitas doenças. Esta implicação reflete-se em muitas conferencias dedicadas a este tópico, livros sobre o assunto dos radicais livres e doença, e na publicação de dois novos jornais especializados: Free Radical Research Communications, e Free Radical Biology and Medicine.

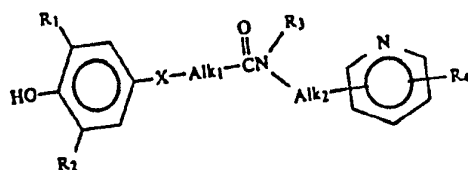
Sabe-se muito sobre as propriedades físicoquímicas de vários radicais de oxigénio, mas o conhecimento sobre a sua importancia global em relação ao início e amplificação da doença humana é limitado. Algumas situações clínicas em que se pensa que os radicais de oxigénio se encontram envolvidos são discutidas em Cross, C. E., et al., "Oxygen Radicals and Human Disease," ANN. INT. MED., 107:526-545 (1987) (ver Quadro 1, p. 527) e Ward, P. A., et al., "Oxygen Radicals, Inflammation, and Tissue Injury," FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE, 5:403-408 (1988). Entre as condições clínicas em que se pensa estarem envolvidos radicais de oxigénio incluem-se, por exemplo, lesão inflamatória-imunitária, doenças autoimunitárias, estados de isquémia por refluxo, perturbações do envelhecimento, cancro, efeitos do fumo do cigarro, enfisema, síndrome de doença respiratória aguda (ARDS), aterosclerose, artrite reumatoide, demencia senil, cataractogénese, retinopatia da prematuridade, e dermatite de contacto.



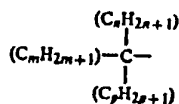
Os radicais de oxigénio são capazes de desencadear efeitos prejudiciais reversíveis ou irreversíveis sobre compostos de todas as classes bioquímicas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e amino ácidos, lípidos e lipoproteínas, hidratos de carbono e macromoléculas do tecido conjuntivo. Estas espécies podem ter um impacto sobre actividades celulares tais como a função da membrana, metabolismo, e expressão genética. Os radicais de oxigénio são formados nos tecidos por muitos processos (ver Cross, et al., p. 528, Quadro 2). Pensa-se que estes processos podem ser tanto endógenos, tais como mitocondriais, microsomais e cadeias de transporte de electrão cloroplasto; enzimas oxidativos tais como xantina oxidase, indoleamina dioxigenase, triptofan dioxigenase, galactose oxidase, ciclooxygenase, lipoxigenase, e monoamina oxidase; células fagocitárias tais como neutrófilos, monocitos e macrofagos, eosinófilos, e células endoteliais; e reacções de antioxição; e exógenos, tais como substancias de redox-ciclicização, oxidações de drogas, fumo de cigarro, radiação de ionização, luz solar, choque por calor e substancias que oxidam a glutathione. Podem ser envolvidos na acção de toxinas tais como paraquat (herbicida), fumo do cigarro, e drogas antitumorais quinona.

A produção de espécies de oxigénio reactivo constitui um fenómeno de importancia crítica no que se refere à defesa bem sucedida do hospedeiro contra organismos invasores. Tanto os neutrofilos como os macrófagos contam com uma série de oxidantes para atacar constituintes bacterianos (ver V. L. Shepherd, "The role of the respiratory burst of phagocytes in host defense," SEMIN. RESPIR. INFECT. (United states) Jun. 1986, 1(2) p. 99-106.

Foram descritos previamente vários compostos de tio-éter. Por exemplo, a Patente dos E.U.A. No. 4.663.333 apresenta compostos da fórmula



em que: R_1 e R_2 são os membros iguais ou diferentes do grupo consistindo em halo, fenilo, fenilo substituído e um grupo

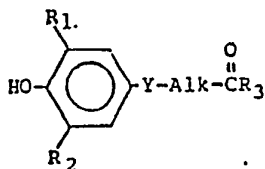


em que n , m e p são independentemente um número inteiro de 1 a 8 contanto que $n+m+p$ seja igual a ou inferior a 10; X é tio, sulfinilo ou sulfonilo; Alk_1 é alquilenos inferior de cadeia linear ou ramificada com 1 a 6 átomos de carbono, R_3 é alquilo inferior, Alk_2 é alquilenos de cadeia linear ou ramificada com 1 a 4 átomos de carbono; R_4 é seleccionado de entre o grupo consistindo em hidrogénio, halo, hidroxil, alquilo inferior e alcoxi inferior; e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis. Os compostos inibem a 5-lipoxigenase e são úteis no tratamento da

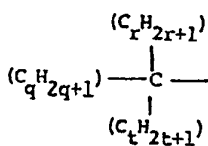
inflamação, alergia e reacções de hipersensibilidade e de outras perturbações do sistema imunitário.

Wagner, et al., Patente dos E.U.A. No. 4.029.812, e Patentes dos E.U.A. afins Nos. 4.076.841 e 4.078.084 provenientes de requerimentos divisionários do requerimento -812, todos atribuídos a The Dow Chemical Company, apresentam ácidos 2-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)tiocarboxílicos, ésteres e amidas simples que são hipolipidémicos e que são úteis na redução dos níveis de lípidos do plasma, especialmente dos níveis de colesterol e de triglicéridos.

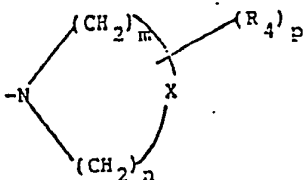
O Requerimento da Patente Europeia EP 0 190 685 apresenta amidas heterocíclicas representadas pela fórmula



em que R_1 e R_2 são membros iguais ou diferentes do grupo consistindo em halo, fenilo, fenilo substituído e um grupo



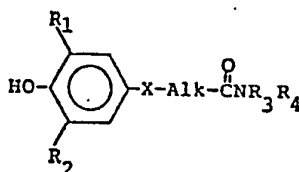
em que q, r e t são independentemente um número inteiro de 1 a 8 contanto que q + r + t seja igual a ou inferior a 10: Y é tio, sulfinilo ou sulfonilo; Alk é alquilenos inferior de cadeia linear ou ramificada, e R₃ é uma amina heterocíclica representada pela fórmula:



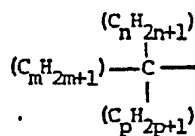
em que R₄ é seleccionado de entre o grupo consistindo em hidrogénio, alquilo inferior, fenilo, fenilo substituído, benzilo, benzilo substituído, carboxilo ou alquilo inferior carboxílico; X é seleccionado de entre o grupo consistindo em N-R₄, O e CH₂; m é 2 ou 3; n é 2 ou 3 quando X é O ou N-R₄ e n é 1 a 3 quando X é CH₂; p é 0 a 2; e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis. Os

compostos inibem a 5-lipoxigenase e são úteis como agentes anti-inflamatórios e anti-alérgicos.

O requerimento da Patente Europeia EP 0 190 682 apresenta aniletos representados pela fórmula



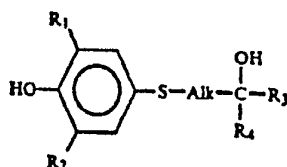
em que: R_1 e R_2 são membros iguais ou diferentes do grupo consistindo em halo, fenilo, fenilo substituído e um grupo



em que n , m e p são independentemente um número inteiro de 1 a 8 contanto que $n + m + p$ seja igual a ou inferior a 10; X é tio, sulfinilo ou sulfonilo; Alk é alquileno inferior de cadeia linear ou ramificada; R_3 é hidrogénio ou alquilo inferior; e R_4 é fenilo

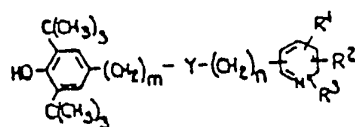
ou fenilo substituído. Os compostos inibem a 5-lipoxigenase e são úteis no tratamento da alergia, reacções de hipersensibilidade e inflamação.

A Patente dos E.U.A. No. 4.857.588 apresenta métodos para inibir a lipoxigenase e inclui formulações farmacêuticas compreendendo um veículo farmacêutico e uma quantidade inibidora da lipoxigenase eficaz de um composto da fórmula



em que: R_1 e R_2 são membros iguais ou diferentes do grupo consistindo em 1,1-dimetiletilo, halo, fenilo e fenilo substituído; Alk é alquilenos inferior de cadeia linear ou ramificada; R_4 é hidrogénio ou alquilo inferior; R_3 é hidrogénio ou alquilo inferior ou um grupo cicloalquilo com de 3 a 8 átomos de carbono. Os compostos apresentados inibem a 5-lipoxigenase e são úteis no tratamento da alergia, reacções de hipersensibilidade e inflamação.

A Patente do Reino Unido No. 1.557.622 apresenta compostos 3,5-di-terciários-butil-4-hidroxifenil piridina da fórmula:

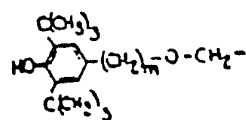


ou um seu sal de adição de ácido farmacêuticamente aceitável, em que:

Y é -O-, -S- ou -N(R⁴)- [em que R⁴ é um átomo de hidrogénio, um grupo alquilo tendo 1 a 4 átomos de carbono (por exemplo metilo, etilo, propilo ou butilo), um grupo aralquilo (por exemplo benzilo, metoxibenzilo ou fenetilo)];

sendo cada um de entre R¹ e R² um átomo de hidrogénio, um grupo hidroxilo ou um grupo alquilo tendo 1 a 4 átomos de carbono (por exemplo metilo, etilo, propilo ou butilo);

R³ é um átomo de hidrogénio, um grupo hidroximetilo ou um grupo da fórmula:

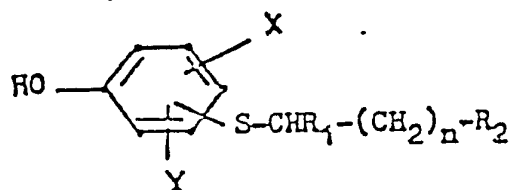


m é 0 ou 1; e

n é 0, 1, 2 ou 3.

Compostos preferidos da fórmula são aqueles em que Y é -O- ou -N(R⁴)- (em que R⁴ é tal como foi definido anteriormente). É referido que estes compostos apresentam actividades antiaterosclerótica, antihiperlipidémica, vasodilatadora cerebral e anti-trombótica, e que são úteis como drogas para o tratamento de doenças vasculares isquémicas em mamíferos tais como aterosclerose, enfarto do miocárdio, angina pectoris, enfarto cerebral, hemorragia cerebral, enfarto renal, claudicação intermitente, acidente vascular cerebral transitório ou trombose.

A Patente Alemã No. 1.936.463 apresenta fenois tendo a fórmula

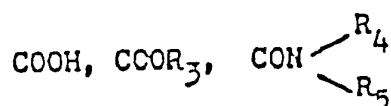


em que

X e Y, que podem ser iguais ou diferentes, representam átomos de hidrogénio ou de halogénio ou radicais alquilo inferior,

R₁ representa um átomo de hidrogénio ou um radical alquilo inferior,

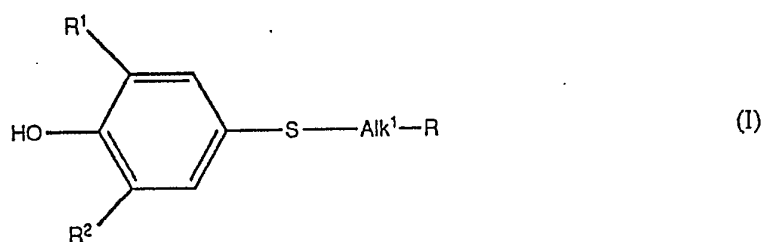
R₂ representa um dos grupos,



CN, e, no caso em que n é igual a 0 e R₁ é um hidrogénio, ele pode apenas ser C₆H₅ e no caso em que n é igual a 1, ele pode também ser OH, pelo que R₃ representa um radical alquilo com 1 a 5 átomos de carbono e R₄ e R₅, que podem ser iguais ou diferentes, representam átomos de hidrogénio, radicais alquilo inferior ou médio ou, juntamente com o átomo de azoto, representam um anel que pode conter um outro heteroátomo, n representa 0 ou 1 assim como os correspondentes fenolatos. É referido que os fenóis apresentam actividade biocida mas é referido que eles são acima de tudo apropriados como intermediários para a preparação de substancias biocidas, por exemplo, ésteres fosfato e carbamatos.

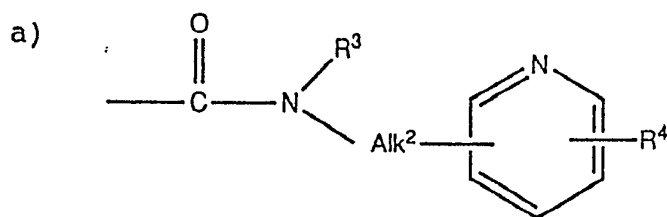
SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento relaciona-se com um método para estimular a produção de superóxido que compreende a administração a um mamífero necessitado desse tratamento de uma quantidade de um composto da Fórmula I



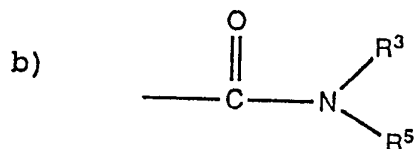
ou de um seu sal ou estereoisômero ou isômero geométrico farmacêuticamente aceitável; em que R^1 e R^2 são iguais ou diferentes e representam independentemente terc-alquilo ou fenilo; Alk^1 representa alquilenos de cadeia linear ou ramificada com 1 a 10 átomos de carbono; e

R representa:

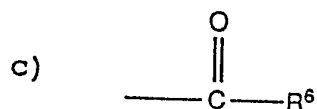


em que R^3 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono, Alk^2 é alquilenos de cadeia linear ou ramificada com 1 a 4 átomos

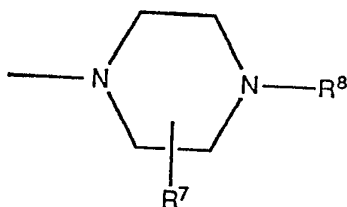
de carbono, e R^4 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono;



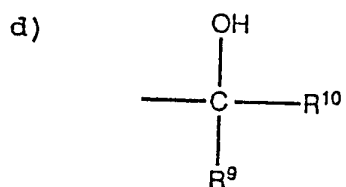
em que R^3 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono e R^5 é fenilo ou fenilo substituído;



em que R^6 é uma amina heterocíclica representada pela fórmula



em que R^7 é hidrogénio ou alquilo inferior e R^8 é hidrogénio, alquilo inferior, fenilo, fenilo substituído, benzilo, benzilo substituído; ou



em que R^9 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono e R^{10} é alquilo com 1 a 10 átomos de carbono;

que é eficaz para estimular a produção de superóxido.

Os compostos da Fórmula I são estimuladores da produção de superóxido em neutrófilos e podem ser úteis no tratamento terapêutico ou profilático de quadros patológicos em que a produção de superóxido constitui um factor importante.

Embora se tenha especulado que a 5-lipoxigenase possa estar envolvida na produção de superóxido, a capacidade destes compostos, que inibem a 5-lipoxigenase, para estimular a produção de superóxido em neutrófilos indica que a produção de superóxido não é governada pela 5-lipoxigenase. Assim a actividade dos compostos da Fórmula I na estimulação da produção de superóxido não se relaciona com a capacidade para inibir a 5-lipoxigenase.

O presente invento proporciona um método pelo qual a activação dos neutrofilos e a produção de aniões superóxido são realizadas utilizando os compostos da fórmula I. Consequentemente os compostos da fórmula I são úteis para avaliar e testar as propriedades anti-inflamatórias de outros agentes farmacologicamente activos.

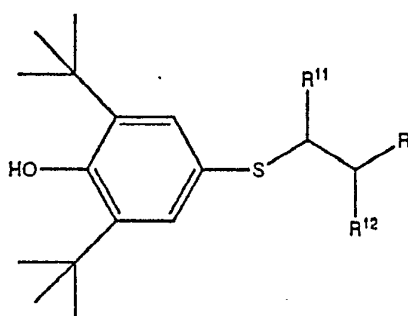
A capacidade para produzir superóxido que pode ele próprio ser microbicida ou que é então convertido em oxidantes tóxicos tais como $H_2O_2.OH$, e oxigénio singlet é importante para os mecanismos destruidores fagocíticos que permitem que os neutrófilos e os macrófagos matem as bactérias e os parasitas por meio de fagocitose.

Assim, compostos da fórmula I que estimulam a produção de supróxido podem ser úteis na terapêutica auxiliar das infecções microbianas. Os compostos podem também ser úteis no tratamento de condições tais como o Síndrome de Chediak-Higashi em que os macrófagos e os polimorfos do doente apresentam uma fraca actividade o que leva os doentes a sofrerem de infecções

recorrentes envolvendo organismos com uma patogenicidade normalmente baixa. Os compostos da fórmula I podem também ser úteis na terapêutica auxiliar de doentes cujos sistemas imunitários foram enfraquecidos ou comprometidos pela doença ou por quimioterapia ou terapêutica por radiações e que se apresentam mais sujeitos a infecções microbianas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O presente invento relaciona-se também com um método para estimular a produção de superóxido que compreende a administração a um mamífero necessitado desse tratamento de uma quantidade de um composto da fórmula



(II)

ou de um seu sal ou estereoisômero ou isômero geométrico farmacêuticamente aceitável, em que R^{11} e R^{12} são idênticos ou diferentes e são hidrogênio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono, e R é definido tal como foi aqui anteriormente referido, que é eficaz para estimular a produção de superóxido.

A expressão "terc-alquilo" tal como é aqui usada em referência a R_1 e R_2 refere-se a porções alquilo de cadeia ramificada com de cerca de 4 a 10 átomos de carbono tendo um átomo de carbono terciário ligado ao anel fenilo substituído por R_1 e R_2 . Exemplos desses grupos são terc-butilo, isto é, 1,1-dimetilo, 1-1-dimetilpropilo, 1-metil-1-(etil)pentilo, 1,1-dietilpropilo, 1-etil-1-(propil)butilo, etc.

A expressão "alquilenos" refere-se a grupos alquilenos de cadeia linear ou ramificada tendo entre cerca de 1 e 10 átomos de carbono incluindo, por exemplo, metileno, etileno, propileno, 1,2-dimetiletileno, pentileno, 1-metilbutileno, isopentileno, neopentileno, etc.

A expressão "alquilo inferior", tal como é aqui usada, refere-se a grupos alquilo de cadeia linear ou ramificada tendo de 1 a 6 átomos de carbono, inclusive, isto é, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, n-pentilo, 2-metilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, n-hexilo, etc.

As expressões "fenilo substituído" e "benzilo substituído" referem-se a fenilo ou benzilo tendo um ou mais substituintes selecionados de entre o grupo consistindo em halo, hidróxi, alquilo inferior e alcoxi inferior.

Compostos particularmente preferidos da Fórmula I são aqueles em que R_1 e R_2 são ambos terc-alquilo.

A expressão "sais farmacêuticamente aceitáveis" pretende incluir os sais que podem ser formados com os compostos do presente invento sem alterar de modo relevante a sua estrutura química ou as suas propriedades farmacológicas. Esses sais incluem catiões inorgânicos ou orgânicos ou sais de adição de

ácido, tais como sódio, potássio, cálcio, amônio, alquilamônio, trietanolamina, lisina, sal clorídrico, bromídrico, etc. bem conhecidos pelos especialistas nesta técnica. Os sais anteriores são preparados de um modo convencional por neutralização dos compostos da Fórmula I com a base ou ácido desejado.

Os compostos do presente invento podem ser administrados sob a forma de dosagem oral tal como comprimidos, cápsulas, pílulas, pós, grânulos, elixires, ou xaropes assim como aerossóis para inalação. De um modo semelhante, a administração pode ser realizada por via intravascular, subcutânea, ou intramuscular usando formas de dosagem conhecidas pelos especialistas na técnica farmacêutica. Em geral, a forma de administração preferida é a oral. É utilizada no tratamento uma quantidade eficaz mas não tóxica. O regime de dosagem que utiliza os presentes compostos é seleccionado de acordo com uma série de factores incluindo o tipo, idade, peso, sexo, e situação médica do paciente; a gravidade da condição a ser melhorada; e a via de administração. Um médico de competência técnica geral pode determinar e receitar rapidamente a quantidade eficaz da droga requerida para evitar, tratar ou interromper a progressão de uma determinada condição. A quantidade eficaz para administração é habitualmente a quantidade que é requerida para assegurar que os neutrófilos de mamíferos envolvidos na produção de superóxido irão ser expostos a uma concentração de droga suficiente para estimular a produção de superóxido. O regime de dosagem pode ser determinado eficazmente para cada doente ou animal por infusão intravenosa inicial com um nível de dosagem baixo, por exemplo, 0,01 $\mu\text{g/kg/min}$ e em seguida aumentando a dose até se obter o efeito desejado. Consequentemente, podem ser determinadas doses orais que vão proporcionar níveis sanguíneos equivalentes de droga. As doses dos compostos do presente invento irão variar geralmente entre cerca de 0,1 mg/kg/dia e cerca de 100 mg/kg/dia e de preferência entre cerca

de 0,5 mg/kg/dia e cerca de 50 mg/kg/dia. Os compostos podem também ser administrados por via transdérmica ou tópica. A dose diária pode ser administrada numa única dose ou em doses divididas iguais três ou quatro vezes por dia.

Nas composições e métodos farmacêuticos do presente invento, pelo menos um dos compostos activos do invento ou um seu sal farmacêuticamente aceitável irá ser típicamente administrado em mistura com diluentes, excipientes, ou veículos farmacêuticos apropriados (aqui referidos colectivamente como materiais "veículo") seleccionados apropriadamente de acordo com a forma de administração pretendida, ou seja, comprimidos, cápsulas, elixires, xaropes para a via oral, etc., e compatíveis com as técnicas farmacêuticas convencionais. Por exemplo, para administração oral sob a forma de comprimidos ou cápsulas, o componente droga activa pode ser combinado com qualquer veículo inerte oral, não tóxico, farmacêuticamente aceitável, tal como lactose, amido, sucrose, celulose, estearato de magnésio, fosfato dicálcico, sulfato de cálcio, manitol, etc.; para administração oral sob a forma líquida, o componente droga activa pode ser combinado com qualquer veículo inerte oral, não tóxico, farmacêuticamente aceitável, tal como etanol, etc. Além disso, quando desejado ou necessário, podem também ser incorporados na mistura agentes de ligação, lubrificantes, agentes de desintegração e agentes de coloração apropriados. Agentes de ligação apropriados incluem amido, gelatina, açucares naturais, edulcorantes do milho, gomas naturais e sintéticas tais como acácia, alginato de sódio, carboximetilcelulose, polietilene glicol, e ceras. Os lubrificantes para utilização nestas formas de dosagem incluem ácido bórico, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio, etc. Os agentes de desintegração incluem, sem limitação, amido, metilcelulose, agar, bentonite, goma guar, etc.

A preparação dos compostos utilizados na prática do invento foi descrita em patentes publicadas e requerimentos de patentes, por exemplo a Patente dos E.U.A. No. 4.663.333 aqui incorporada como referência descreve a preparação de compostos da fórmula I em que R é uma aminoalquilpiridina. A Patentes dos E.U.A. No. 4.857.588 aqui incorporada como referência descreve a preparação de alcanóis 4-hidroxifeniltio. Outros compostos utilizados no método do presente invento são apresentados nos requerimentos das Patentes Europeias EP 0.190.685 e EP 0.190.682.

AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS

Os compostos do invento são avaliados no que se refere à inibição da 5-lipoxigenase de acordo com o processo de ensaio que se segue.

Inibição da 5-lipoxigenase, in vitro:
actividades anti-inflamatória, anti-alérgica.

A fracção flutuante de 100.000 x g de Homogenato de Células da Leucemia Basofílica do rato (RBL-1) serve de fonte de enzima 5-lipoxigenase. O enzima é incubado com ácido [1-¹⁴C]-araquidónico e Ca++ na presença e ausência do composto do teste. O produto da 5-lipoxigenase, ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico (5-HETE), é separado por cromatografia de placa delgada e medido por radioactividade. Um composto inibindo a síntese de 5-HETE em 30% ou mais é considerado activo nessa concentração. As doses de avaliação inicial são 1×10^{-4} M. Quando o composto inibe mais de 50% da síntese de 5-HETE a 10^{-4} M, esse composto é testado com vários níveis de dosagem a fim de determinar o valor CI₅₀ (concentração inibidora que inibe 50%).

Os compostos do invento são avaliados no que se refere à actividade moduladora do superóxido de acordo com o processo de ensaio que se segue:

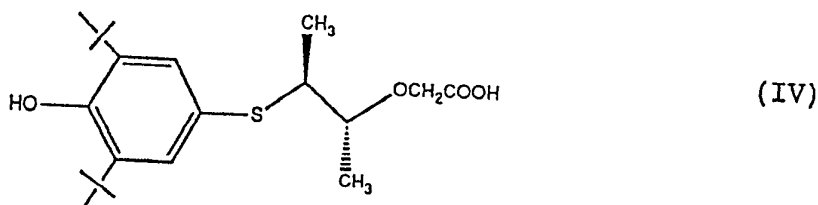
Produção de superóxido a partir de neutrófilos humanos:

A produção de superóxido por neutrófilos estimulados por formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) foi quantificada pela redução do citocrómio C (Badwey, J. A., Curnutte, J. T. and Karnovsky, M. L., ácidos gordos cis-poli-insaturados induzem níveis elevados de produção de superóxido pelos neutrófilos humanos. J. Biol. Chem. 256: 12640-12643, 1981). A 5 milhões de neutrófilos em 2,85 ml de tampão fosfato de Krebs-Ringer, pH 7,2, 50 ul de inibidor (em 10% DMSO/tampão), e 50 ul de ferricitocrómio C (5 mM, stock) foram adicionados e incubados durante 3 minutos a 37°C. As medições da absorção a 550 nm foram registadas no início da préincubação. Foram adicionados cinquenta ul de FMLP (6 uM, stock) a fim de iniciar a reacção. Foi atingido um planalto no espaço de 3 minutos e esta leitura - leitura inicial (antes da adição de FMLP) foi usada para calcular nanomoles de superóxido produzidos tendo como base o coeficiente de extinção molar de $2,1 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mole}^{-1}$.

Isolamento de neutrófilos humanos: Os neutrófilos humanos foram isolados a partir de sangue colhido recentemente de dadores saudáveis. Dois ml de dextrano a 5% (P.M. 200.000-300.000) em solução salina foram adicionados a porções alíquotas de 10 ml de sangue, misturados e colocados verticalmente durante 45 minutos a 37°C. Aproximadamente 8-10 ml da suspensão do plasma-glóbulos brancos a partir da sedimentação de dextrano foram levados à formação de camada sobre uma placa-Ficol de 3 ml num tubo de 15 ml e centrifugados a 400 g durante 30 minutos. O produto flutuante, contendo plasma e plaquetas, foi eliminado por

aspiração, e a pílula, contendo predominantemente neutrófilos, foi suspensa de novo em 1 ml de solução salina. A suspensão foi transferida para um tubo limpo, e reunida com outras porções aliquotas de sangue tratado de um modo semelhante. A suspensão reunida foi centrifugada a 350 g durante 5 minutos e o produto flutuante foi eliminado. A pílula foi suspensa de novo em 5 ml de NaCl a 0,05% com uma pipeta de Pasteur de plástico durante 25 segundos a fim de provocar a lise dos glóbulos vermelhos contaminantes, adicionando-se então 5 ml de NaCl a 1,75% a fim de recuperar a isotonicidade. O processo de lise dos glóbulos vermelhos foi repetido, as células foram suspensas em tampão apropriado (dependendo do ensaio) e contadas.

Para comparação foi usado o composto da Fórmula IV, um inibidor da 5-lipoxigenase conhecido descrito na Patente dos E.U.A. No. 4.755.524.



Ácido (±) [2S* - [[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenil]tio] -
-1R*-metilpropoxi]acético

Os resultados no que se refere a certos compostos do presente invento são indicados no Quadro I a seguir.

QUADRO I

Número Exemplo Composto	Inibição 5-Lipoxigenase CI ₅₀ (gM)	Estimulação de Superóxido Induzido por FMLP
5	0,32	5μM, 50% > controlo; 10μM, 227% > controlo
7	0,23 0,33	Estimula a 3-20 μM
8	0,16	5μM, 150% > controlo; 10μM, 206% > controlo
9	0,26	Estimula a 5-50μM
10	0,79	Estimula a 5-50μM
Exemplo IV	4,9	Inibiu produção superóxido: CI ₅₀ = 11μM

Ao contrário dos compostos do presente invento, o composto da Fórmula IV inibiu tanto a produção de superóxido como a 5-lipoxigenase. Estes dados indicam que a produção de

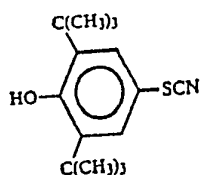
superóxido não depende da 5-lipoxigenase e que a capacidade de um composto para inibir a 5-lipoxigenase não está relacionada com a sua capacidade para estimular a produção de superóxido.

A produção de superóxido induzida por complemento C5a é também estimulada por compostos do presente invento.

Os exemplos que se seguem não limitativos ilustram ainda os detalhes para a preparação dos compostos usados na prática do presente invento. Os especialistas nesta técnica compreenderão e apreciarão rapidamente que podem ser utilizadas variações conhecidas das condições e processos nos métodos preparativos que se seguem. Todas as temperaturas são em graus Celsius a não ser que indicado de um modo diferente. Os pontos de fusão foram determinados num aparelho de ponto de fusão Thomas-Hoover e não são corrigidos.

EXEMPLO 1

Tiocianato de 3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenilo



A um frasco de 5 litros de fundo redondo, com três gargalos, equipado com um agitador mecânico, entrada de gás, termómetro e saída de gás, foram adicionados 2,6-di-trec-butilfenol (474 g, 2,30 mole), tiocianato de amónio (76,12 g, 4,83 mole) e metanol (1.200 ml). A mistura da reacção foi agitada e arrefecida até 0°C num banho de gelo/sal. Mantendo a temperatura a de 0 a 10°C, fez-se borbulhar lentamente gás cloro através da mistura durante cerca de 1 hora após o que a mistura se apresentava com uma cor amarela heterogénea. Fez-se então borbulhar amónia através da reacção durante cerca de 1 e 1/2 horas, mantendo a mistura da reacção a uma temperatura entre 0 e 10°C. A reacção foi agitada durante uma hora adicional a 0°C, vertida para 2 litros de água destilada fria e refrigerada durante a noite. A fase aquosa foi decantada e o sólido foi misturado com metanol, precipitado pela adição de água, filtrado e seco durante 2 dias sobre pentóxido de fósforo. O sólido amarelo gomoso resultante foi recristalizado a partir de pentano e seco in vacuo para

proporcionar o produto sob a forma de um pó branco, p.f. 61,5-
-63°C.

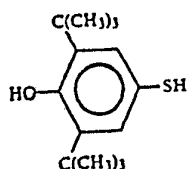
Análise calculada para $C_{15}H_{21}NSO$:

Teóricos: C, 68,40; H, 8,03; N, 5,32; S, 12,17

Encontrados: C, 68,85; H, 8,05; N, 5,29; S, 12,12

EXEMPLO 2

2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-mercaptofenol

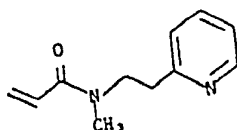


Tiocianato de 3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenilo (55 g, 0,209 mole) foi dissolvido em acetona (200 ml) sob atmosfera de argão. Adicionou-se água (7,6 g, 0,42 mole) e a reacção foi arrefecida até 0°C. Trietilfosfina (24,7 g, 0,209 mole) foi adicionada gota a gota durante um período de 1 hora e a reacção foi então deixada aquecer até à temperatura ambiente com agitação. A solução foi concentrada, os solventes foram removidos, e o óleo resultante foi purificado por cromatografia sobre sílica. As fracções contendo o tiol foram combinadas, os solventes foram removidos para proporcionar um pó branco que foi recristalizado a

partir de metanol/água e seco para proporcionar 43,3 g do produto desejado. RMN confirmou a identidade do produto.

EXEMPLO 3

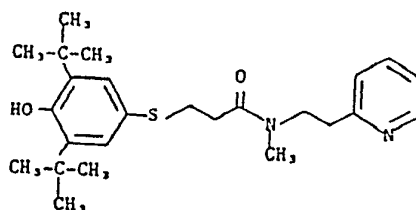
N-metil-N-[2-(2-piridinil)etil]-2-propenamida



Cloreto de acríloilo (4,52 g, 0,05 mole) foi adicionado gota a gota a uma solução em agitação de trietilamina (30 ml) e 2-(β-metilaminoetil)piridina (6,81 g, 0,05 mole) em éter etílico (500 ml). Após agitação durante a noite à temperatura ambiente, o sólido branco foi removido por filtração e lavado com éter etílico. As fases orgânicas foram combinadas, secas sobre sulfato de sódio, filtradas e em seguida concentradas até à secura para dar origem a um óleo cor de laranja. A estrutura foi confirmada por RMN.

EXEMPLO 4

3-[[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxi-fenil]tio]-N-metil-N-[2-(2-piridinil)etil]propanamida



N-metil-N-[2-(2-piridinil)etil]-2-propenamida (0,95 g, 0,005 mole) foi dissolvida em metanol (200 ml) contendo 2,6-bis-(1,1-dimetiletil)-4-mercaptofenol (1,19 g, 0,005 mole). Após adição de trietilamina (0.5 ml), a solução foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi removido por uma corrente de azoto para dar origem a um resíduo que foi purificado por cromatografia sobre sílica para dar origem ao composto do título, p.f. ca. 82-84°C.

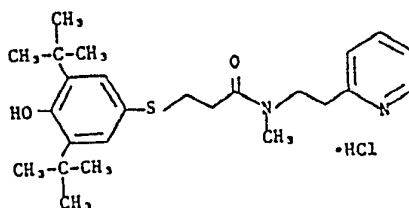
Anal. calc. para $C_{25}H_{36}N_2O_2S$ (428,62):

Calculados: C, 70,05; H, 8,47; N, 6,54; S, 7,47.

Encontrados: C, 70,45; H, 8,50; N, 6,60; S, 7,55.

EXEMPLO 5

Monoclorohidreio de 3-[[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenil]-tio]-N-metil-N-[2-(2-piridinil)etil]propanamida



O composto do título do Exemplo 4, (2,0 g) foi dissolvido em éter etílico (400 ml). Com agitação rápida, uma solução saturada de cloreto de hidrogênio em álcool isopropílico foi adicionada gota a gota até não ocorrer mais precipitação. O material oleoso foi agitado durante 20 horas. O éter etílico foi decantado e o resíduo foi cristalizado a partir de acetato de etilo/éter etílico para dar origem ao composto do título (700 mg), p.f. ca. 153-156°C.

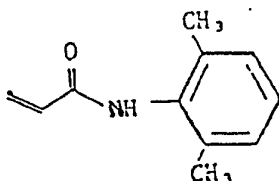
Análise calc. para $C_{25}H_{37}N_2SOCl$ (465,09):

Calculados: C, 64,56; H, 8,02; N, 6,02; Cl, 7,62; S, 6,89.

Encontrados: C, 64,30; H, 7,88; N, 6,00; Cl, 7,79; S, 6,91.

EXEMPLO 6

N-(2,6-dimetilfenil)-2-propenamida



Uma mistura de 2,6-dimetilanilina (8,68 g, 0,0718 mole) e trietilamina (15,3 ml) em éter etílico (250 ml) foi arrefecida até +5°C. Uma solução de cloreto de acríloilo (6,47 g, 0,0716 mole) em éter etílico (25 ml) foi adicionada gota a gota com agitação durante um período de 20 minutos. Deixou-se a solução aquecer até à temperatura ambiente e agitou-se durante 72 horas. Adicionou-se ácido clorídrico a 10 por cento (150 ml) e as camadas foram separadas. A camada de ácido foi extraída com acetato de etilo (150 ml), combinada, lavada com água (150 ml), seca sobre sulfato de sódio, filtrada e os solventes foram evaporados. O sólido foi misturado com acetato de etilo quente e foi recristalizado a partir de hexano para proporcionar o composto do título, p.f. ca. 143,5-145,0°C.

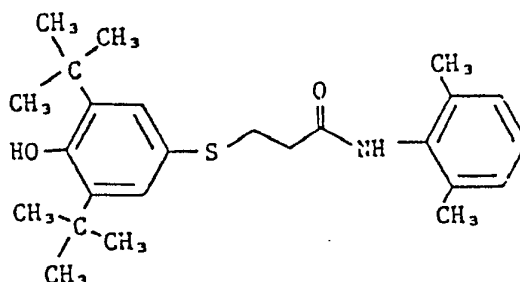
Análise calc. para $C_{11}H_{13}NO$ (175,23):

Calculados: C, 75,40; H, 7,48; N, 7,99.

Encontrados: C, 75,25; H, 7,51; N, 7,79.

EXEMPLO 7

3-[[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenil]tio]-N-(2,6-dimetilfenil)propanamida



2,6-bis-(1,1-Dimetiletil)-4-mercaptofenol (1,19 g, 0,005 mole), N-(2,6-dimetilfenil)-2-propenamida (0,87 g, 0,005 mole) e trietilamina (0,5 ml) em metanol (100 ml) foram agitados à temperatura ambiente sob argão durante 12 horas. O solvente e trietilamina foram removidos num evaporador rotativo e o produto foi purificado por cromatografia sobre sílica. Os solventes foram removidos e o produto foi recristalizado a partir de acetato de etilo/hexano, filtrado e seco in vacuo para proporcionar o composto do título, p.f. ca. 142,5-144°C.

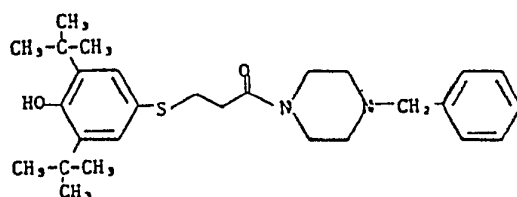
Análise calc. para $C_{25}H_{35}NSO_2$ (413,62):

Calculados: C, 72,60; H, 8,53; S, 7,75; N, 3,39.

Encontrados: C, 72,28; H, 8,75; S, 7,80; N, 3,37.

EXEMPLO 8

1-[3-[[3,5-Bis(1,1-dimetiletil)4-hidroxifenil]tio]-1-oxopropil]-
-4-(fenilmetil)piperazina



2,6-Bis-(1,1-dimetiletil)-4-mercaptofenol (1,52 g, 0,0064 mole), 1-(1-oxo-2-propenil)-4-fenilmetil)piperazina (1,47 g, 0,0064 mole) e trietilamina (0,5 ml) foram dissolvidos em 150 ml de metanol e agitados à temperatura ambiente durante 12 horas. O solvente foi removido num evaporador rotativo, e a reacção foi cromatografada sobre gel de sílica. O produto foi recristalizado a partir de acetato de etilo e hexano. O sólido branco resultante foi filtrado e seco durante a noite numa pistola de vácuo à temperatura ambiente, p.f. cerca de 92,5-95°C, (468,70).

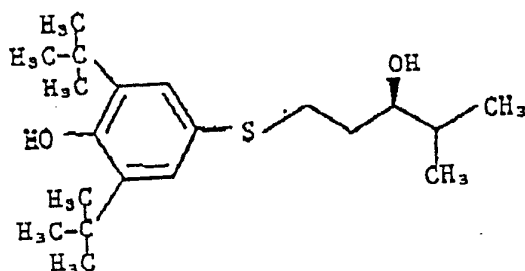
Análise calc. para $C_{28}H_{40}N_2SO_2$:

Calculados: C, 71,75; H, 8,60; N, 5,98; S, 6,84.

Encontrados: C, 71,67; H, 8,69; N, 6,04; S, 6,87.

EXEMPLO 9

2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-[(3-hidroxi-4-metilpentil)tio]fenol



3-[[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenil]tio]propa-
nol (2,0 g, preparado tal como foi descrito na Patente dos E.U.A.
No. 4.857.558) foi dissolvido em 20 ml de tetrahidrofurano seco
sob argão e adicionado a 8,5 ml de cloreto de isopropilmagnésio 2
M em tetrahidrofurano que tinha sido previamente adicionado sob
gás argão a um frasco que tinha sido seco in vacuo durante a
noite. A temperatura da reacção foi mantida a 10-15°C com um
banho de gelo. Quando a adição ficou completa, a mistura da
reacção foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e agitada
durante 3 horas. Adicionou-se ácido clorídrico 2 N (2 ml) seguin-
do-se 50 ml de água e a mistura foi extraída com acetato de etilo
três vezes. Os extractos orgânicos foram combinados, lavados com
água duas vezes e secos sobre sulfato de sódio. O solvente foi
removido in vacuo após filtração e o produto crú foi cromatogara-
fado sobre sílica para dar origem ao composto do título.

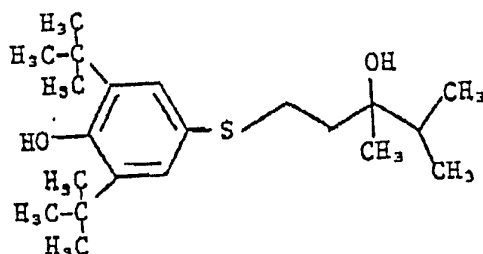
Análise calc. para $C_{20}H_{34}O_2S$ (338,54):

Calculados: C, 70,96; H, 10,12; S, 9,47.

Encontrados: C, 71,29; H, 10,25; S, 9,43.

EXEMPLO 10

2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-[(3-hidroxi-3,4-dimetilpentil)tio]fenol



5 ml de brometo de isopropilmagnésio 2,0 M em tetrahidrofurano foram arrefecidos num banho de gelo e uma solução de 4-[[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenil]tio]-2-butanona (preparada tal como na Patente dos E.U.A. No. 4.857.558) (750 mg) em tetrahidrofurano (25 ml) foi adicionada gota a gota sob argão e a mistura da reacção foi tratada pelo método do Exemplo 9 para dar origem ao composto do título.

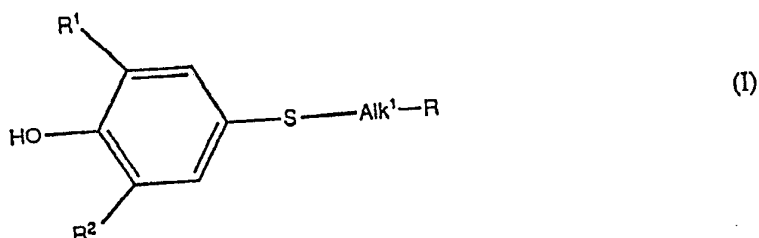
Análise calc. para $C_{21}H_{36}O_2S$ (352,52):

Calculados: C, 71,54; H, 10,29; S, 9,09.

Encontrados; C, 71,44; H, 10,11; S, 9,36.

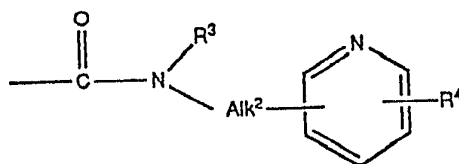
REIVINDICAÇÕES:

1ª. - Método para estimular a produção de superóxidos, caracterizado por compreender a administração a um mamífero necessitado desse tratamento de uma quantidade de um composto da Fórmula I



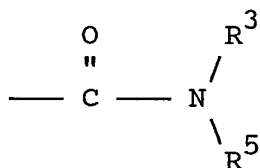
ou de um seu sal ou estereoisômero ou isômero geométrico farmacologicamente aceitáveis; em que R^1 e R^2 são iguais ou diferentes e representam independentemente terc-alquilo ou fenilo; Alk^1 representa cadeia alquileno linear ou ramificada com 1 a 10 átomos de carbono; e R representa:

a)



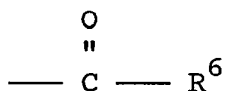
em que R^3 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono, Alk^2 é uma cadeia alquileno linear ou ramificada com 1 a 4 átomos de carbono, e R^4 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono;

b)

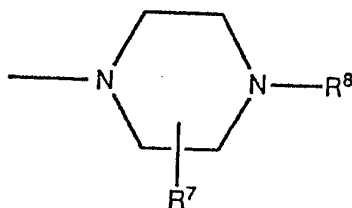


em que R^3 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono e R^5 é fenilo ou fenilo substituído;

c)

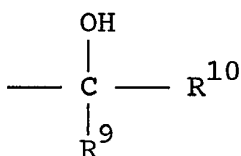


em que R^6 é uma amina heterocíclica representada pela fórmula



em que R^7 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono e R^8 é hidrogénio, alquilo inferior, fenilo, fenilo substituído, benzilo ou benzilo substituído; ou

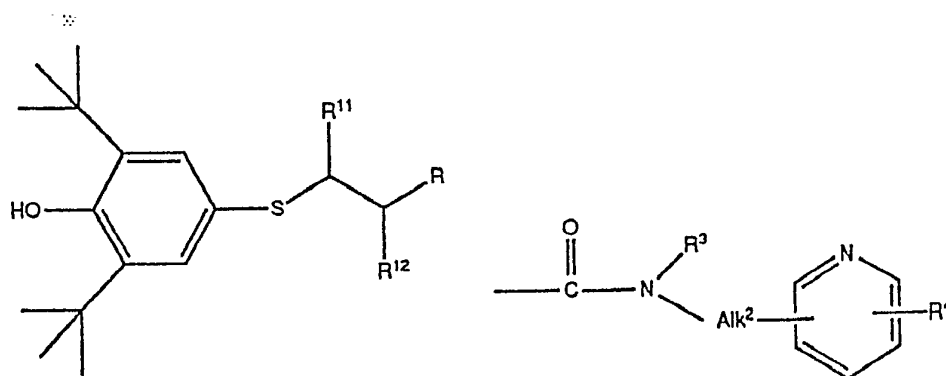
d)



em que R^9 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono e R^{10} é alquilo com 1 a 10 átomos de carbono;
o qual é eficaz para estimular a produção de superóxidos;

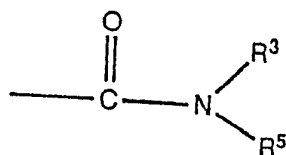
sendo a gama de dosagem, por infusão intravenosa, superior a 0,01 $\mu\text{g/kg/min}$, e, por via oral, de cerca 0,1 mg/kg/dia a cerca de 100 mg/kg/dia.

2ª. - Método de acordo com a reivindicação 1 para estimular a produção de superóxidos, caracterizado por compreender a administração a um mamífero necessitado desse tratamento de uma quantidade de um composto da fórmula



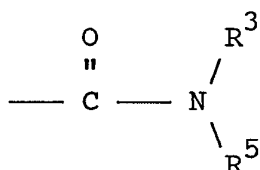
ou de um seu sal ou estereoisómero ou isómero geométrico farmacologicamente aceitáveis, em que R¹¹ e R¹² são idênticos ou diferentes e são hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono, e R representa:

a)



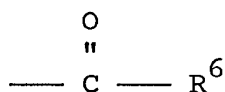
em que R³ é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono, Alk² é cadeia de alquilenos linear ou ramificada com 1 a 4 átomos de carbono, e R⁴ é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono;

b)

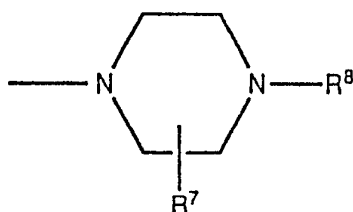


em que R^3 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono e R^5 é fenilo ou fenilo substituído;

c)

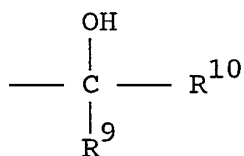


em que R^6 é uma amina heterocíclica representada pela fórmula



em que R^7 é hidrogénio ou alquilo inferior e R^8 é hidrogénio, alquilo inferior, fenilo, fenilo substituído, benzilo ou benzilo substituído; ou

d)



em que R^9 é hidrogénio ou alquilo com 1 a 4 átomos de carbono e R^{10} é alquilo com 1 a 10 átomos de carbono;

que é eficaz para estimular a produção de superóxidos.

3ª. - Método de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por o referido composto ser mono-hidrocloreto de 3-[[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenil]tio]-N-metil-N-[2-(2-piridinil)etil]propanamida.

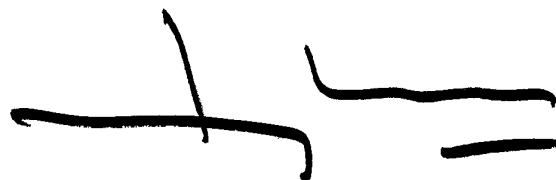
4ª. - Método de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por o referido composto ser 3-[[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenil]tio]-N-(2,6-dimetilfenil)propanamida.

5ª. - Método de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por o referido composto ser 1-[3-[[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenil]tio]-1-oxopropil]-4-(fenilmetil)piperazina.

6ª. - Método de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por o referido composto ser 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-[(3-hidroxi-4-metilpentil)tio]fenol.

7ª. - Método de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por o referido composto ser 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-[(3-hidroxi-3,4-dimetilpentil)tio]fenol.

Lisboa, 7 de Agosto de 1991



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.ª
1200 LISBOA