



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

TIAGO ZAMINELLI

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARREICA DE
ANÁLOGOS DE PIRIDOPYRIMIDINAS

CAMPINAS

2018

TIAGO ZAMINELLI

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARREICA DE
ANÁLOGOS DE PIRIDOPYRIMIDINAS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO TIAGO ZAMINELLI, ORIENTADO PELO PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/15525-1

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Z147s Zaminelli, Tiago, 1985-
Síntese e avaliação da atividade antidiarreica de análogos de
piridopirimidinas / Tiago Zaminelli. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Gilberto De Nucci.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Piridopirimidinas. 2. Diarreia. 3. Nucleotídeos cíclicos. I. De Nucci,
Gilberto, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Synthesis and evaluation of antidiarrheal activity of
pyridopyrimidine analogues

Palavras-chave em inglês:

Pyridopyrimidines

Diarrhea

Cyclic nucleotides

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto De Nucci [Orientador]

Edson Antunes

Sisi Marcondes Paschoal

Marcelo Nicolás Muscará

Soraia Kátia Pereira Costa

Data de defesa: 09-03-2018

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

TIAGO ZAMINELLI

ORIENTADOR: GILBERTO DE NUCCI

MEMBROS:

1. PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

2. PROF. DR. EDSON ANTUNES

3. PROFA. DRA. SISI MARCONDES PASCHOAL

4. PROF. DR. MARCELO NICOLÁS MUSCARÁ

5. PROF. DR. SORAIA KÁTIA PEREIRA COSTA

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA 09/03/2018.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese às pessoas mais importantes para mim, minha querida mãe Maria do Carmo Varjão e a meu pai Olavo Zaminelli Filho, ambos responsáveis por minha formação humana e profissional, com apoio incondicional e incentivo ao estudo e busca de meus objetivos.

Esta dedicatória se estende também ao meu amigo, professor e orientador, Dr. Gilberto De Nucci, ao qual devo a confiança em minha capacidade como Pesquisador.

Não posso deixar de mencionar minhas ex-orientadoras, profa. Dra. Maria Frazão Barbato Vital (UFPR, mestrado) e profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira (UEL), minha mentora desde a graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pelas oportunidades em seguir minha jornada e completar mais este objetivo. Sem sua influência e apoio, eu nada seria e nada teria.

Agradeço aos meus pais e familiares, que sempre me incentivaram e apoiaram meus sonhos, e dentro de suas condições, fizeram o máximo para possibilitar que estes fossem concretizados. Essa é mais uma conquista de vocês, meus amados.

Ao meu orientador, pela amizade e ensinamentos, e principalmente pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, onde pude crescer muito. Aos amigos e colegas da UNICAMP e USP.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa e apoio financeiro durante a execução deste estudo (2013/15525-1).

Gostaria de agradecer também às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, professores e servidores do Departamento de Farmacologia da UNICAMP e USP, colegas de outros laboratórios e programas e àqueles que porventura eu tenha esquecido de mencionar.

A vida me deu todas as condições necessárias para realizar meus objetivos, me deu saúde, habilidades, vontade e desafios... mas acima de tudo, permitiu que passassem pela minha história pessoas iluminadas, que me ensinaram muito, e também aprenderam... à todos vocês, muito obrigado!

RESUMO

O aumento dos níveis de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) nos enterócitos, desencadeia mecanismos intracelulares de secreção de íons e líquidos para o lúmen intestinal, caracterizando a diarreia secretória. Neste trabalho, doze novas moléculas derivadas de piridopirimidinas foram sintetizadas e avaliadas quanto seu efeito sob o acúmulo induzido de nucleotídeos cíclicos intracelular. Nossos resultados demonstram que todos os compostos não exercem efeito sob os níveis basais (ausência de estímulo exógeno) de nucleotídeos cíclicos e também em anéis aórticos pré-contraídos de coelhos. Tanto a atividade metabólica e viabilidade nas células, avaliadas pelos testes MTT e LDH, respectivamente, não foram afetadas pela incubação com os compostos (50 μ M). O melhor composto em atividade, composto **VI**, quase aboliu o acúmulo de GMPc (94% de inibição) induzido pela toxina STa em células T84 e reduziu significativamente (69%) o acúmulo de AMPc induzido por Forscolina em células Jurkat. O composto **VI** foi avaliado em um modelo *in vivo* de diarreia em coelhos, onde demonstrou eficácia em inibir o acúmulo de líquidos induzido pela STa e redução nos danos e alterações morfológicas teciduais promovidas pela exposição à esta enterotoxina. O teste de estabilidade *in vitro* revelou que o composto **VI** é resistente à oxidação promovida pelo oxigênio atmosférico.

Palavras-chave: Piridopirimidinas, diarreia, nucleotídeos cíclicos.

ABSTRACT

The increased levels of cyclic nucleotides (cGMP and cAMP) in enterocytes trigger intracellular mechanisms of ion and fluid secretion into the lumen causing secretory diarrhea. Twelve novel pyridopyrimidines derived from 5-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-1,3-dimethyl-5,11-dihydro-1H-indeno[2,1:5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6-trione (FPIPP) were synthesized and evaluated on intracellular cyclic nucleotide accumulation. All compounds had no effect on either cyclic nucleotide basal levels or on pre-contracted aortic rings. The metabolic activity and viability in T84 cells, assessed by MTT and LDH assays respectively were not affected by incubation with the compounds (50 μ M). Compound **VI** almost abolished cGMP accumulation (94% inhibition) induced by STa toxin in T84 cells and significantly decreased (69%) forskolin-induced cAMP accumulation in Jurkat cells. Compound **VI** was found to be active in an *in vivo* model for diarrhea in rabbits. *In vitro* stability test revealed that compound **VI** is resistant to oxidation promoted by atmospheric oxygen.

Keywords: *Pyridopyrimidines, Diarrhea, Cyclic Nucleotides.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Procedimento geral de síntese dos compostos (I-XII)	16
2. Rota de síntese do composto I	17
3. Rota de síntese do composto II	18
4. Rota de síntese do composto III	18
5. Rota de síntese do composto IV	19
6. Rota de síntese do composto V	20
7. Rota de síntese do composto VI	20
8. Rota de síntese do composto VII	21
9. Rota de síntese do composto VIII	22
10. Rota de síntese do composto IX	23
11. Rota de síntese do composto X	24
12. Rota de síntese do composto XI	24
13. Rota de síntese do composto XII	25
14. Diferenças estruturais dos compostos derivados de piridopirimidinas e inibidores da síntese de nucleotídeos cíclicos	31
15. Efeito dos compostos sob o acúmulo de nucleotídeos cíclicos	32
16. Curva concentração resposta sob o acúmulo de GMPc	33
17. Ensaio enzimático (PDE5)	39
18. Avaliação do efeito de bloqueadores de canais de cálcio da classe diidropiridinas sob o acúmulo de GMPc	39
19. Efeito dos compostos em anéis de aorta de coelho	40
20. Acúmulo de líquido intraluminal em íleo de coelhos tratados Com toxina STa e composto VI ou FPIPP	41
21. Análise histopatológica do tecido intestinal (íleo) de coelhos	45

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Estrutura química dos derivados de piridopirimidinas e seus efeitos sob o acúmulo induzido de GMPc e AMPc 34

Tabela II. Efeito dos compostos na atividade metabólica celular (MTT) e citotoxicidade (LDH) 37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
3. METODOLOGIA.....	15
3.1. SÍNTESE DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE PIRIDOPIRIMIDINAS	15
3.1.1 Síntese do composto I	16
3.1.2 Síntese do composto II	17
3.1.3 Síntese do composto III	18
3.1.4. Síntese do composto IV	19
3.1.5. Síntese do composto V	20
3.1.6. Síntese do composto VI	20
3.1.7. Síntese do composto VII	21
3.1.8. Síntese do composto VIII	22
3.1.9. Síntese do composto IX	22
3.1.10. Síntese do composto X	23
3.1.11. Síntese do composto XI	24
3.1.12. Síntese do composto XII	25
3.2. PROTOCOLO PADRÃO DE CULTURA CELULAR	25
3.3. ENSAIO DE ACÚMULO DE GMP_c INTRACELULAR	26
3.4. ENSAIO DE ACÚMULO DE AMP_c INTRACELULAR.....	26
3.5. ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA CELULAR POR MTT	26
3.6. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR LIBERAÇÃO DE LDH	27
3.7. ENSAIO SOBRE ATIVIDADE DE PDE5A1	27
3.8. EFEITO VASCULAR EM AORTA DE COELHOS	28
3.9. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA IN VIVO EM MODELO ANIMAL	28
3.9.1. Procedimento para clampeamento e tratamento do íleo	28
3.9.2. Procedimento para quantificação do volume de líquido intraluminal	29
3.9.3. Preparação do tecido para análise histopatológica	29
3.10. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DO COMPOSTO VI.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30

4.1. Síntese dos derivados de piridopirimidina.....	30
4.2. Avaliação dos derivados de piridopirimidina como inibidores do.....	31
acúmulo de GMPc e AMPc	31
4.3. Avaliação da atividade metabólica (MTT) e citotoxicidade (LDH).....	37
4.4. Avaliação do efeito vascular em aorta de coelhos	38
4.5. Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> em modelo animal	41
4.6. Avaliação da estabilidade da exposição ao ar para o composto VI.....	43
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS	47
8. APÊNDICES.....	51
8.1. Avaliação da resposta celular ao estímulo do agonista Linaclotide.....	51
8.2. Avaliação da resposta celular ao estímulo de doador de Óxido Nítrico e ativador da GC solúvel.....	51
8.3. Espectrogramas dos compostos I-XII	52
9. ANEXOS	58
9.1. Registro de patente dos compostos	58

1. INTRODUÇÃO

Considerada uma das principais causas de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento, a diarreia é um grave problema de saúde pública promovendo milhares de mortes anualmente (Guerrant *et al.*, 2002; Kosek *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2003; Collaborators, 2017). A etiologia da diarreia infecciosa é diversificada, sendo causada por bactérias, vírus e parasitas, entretanto, 60% das mortes associadas à diarreia são atribuídas a cepas de bactérias enterotoxigênicas, dentre elas a *Escherichia coli* (Qadri *et al.*, 2005).

Estas cepas são capazes de sintetizar inúmeras toxinas, como por exemplo, a enterotoxina “A” termoestável (STa) produzida pela *Escherichia coli* (ETEC), que se liga ao receptor de membrana das células do epitélio intestinal, Guanilato Ciclase tipo C (GC-C), induzindo a síntese de 3'-5' monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) a partir da guanosina trifosfato (GTP) (Field *et al.*, 1978; Hughes *et al.*, 1978; Vaandrager, 2002; Croxen e Finlay, 2010).

A GC-C é uma proteína transmembrana com um domínio receptor extracelular e um domínio catalítico intracelular (Schulz *et al.*, 1990) e através desta proteína, ligantes endógenos como guanilina e uroguanilina, regulam a secreção de sais e fluídos pelo intestino (Forte, 2004). A elevação nos níveis de GMPc induzida pela interação da STa com a GC-C, induz a ativação de um canal de cloreto, o regulador de condutância transmembranar de fibrose cística (CFTR), via fosforilação pela proteína quinase G tipo II (PKGII). A ativação do CFTR aumenta o efluxo de cloreto para o lúmen intestinal, acompanhado de acúmulo de água e íons sódio, desencadeando a diarreia secretória (Vaandrager, 2002).

Independente da etiologia, o sintoma comum da diarreia, ou seja, a perda de fluídos, pode ser corrigida com terapia de reidratação oral na maioria dos casos. Esta abordagem não farmacológica consiste na reposição de eletrólitos (sódio, potássio) e glucose, favorecendo a absorção de água (De Hostos *et al.*, 2011; Sigman e Luchette, 2012). É importante ressaltar que a terapia de reidratação oral continua sendo a abordagem não farmacológica recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Fundo de Crianças das Nações Unidas desde a década de 70 (Victora *et al.*, 2000).

Já o tratamento farmacológico dos quadros de diarreia secretória consiste principalmente na administração de antimicrobianos ou agentes redutores do peristaltismo. No primeiro caso, a administração de antimicrobianos em associação com a reidratação oral pode ser uma abordagem interessante em alguns casos específicos oriundos de agentes etiológicos bacterianos (como na diarreia induzida pelo *V. cholerae*). No caso da cólera, o volume fecal pode chegar a 250 mL/Kg/dia e o tratamento com antimicrobianos pode reduzir entre 50-66% do volume fecal, além de encurtar a duração do quadro diarreico em até 50% (Karchmer *et al.*, 1970; Sigman e Luchette, 2012). Porém, em geral o tratamento indiscriminado dos quadros diarreicos com antimicrobianos apresenta consequências desfavoráveis ao usuário, como aumento na seleção de microrganismos resistentes (De Hostos *et al.*, 2011).

Agentes redutores do peristaltismo, especialmente agentes opióides, não são aconselhados em casos de diarreia secretória infecciosa uma vez que favorecem o acúmulo intestinal do patógeno, o que pode levar ao agravamento do quadro e gerar complicações importantes (De Hostos *et al.*, 2011). Não há dúvidas de que o tratamento não farmacológico através de reidratação oral apresenta boa eficácia e baixo custo, entretanto, não se pode deixar de reconhecer que a diarreia secretória continua matando milhões de indivíduos a cada ano. Além disso, a adoção desta abordagem não farmacológica como padrão ouro no tratamento dos quadros diarreicos tem diminuído nos últimos anos em vários países em desenvolvimento (Ram *et al.*, 2008), possivelmente pelo fato de que a reidratação oral em geral não promove um alívio rápido nos sintomas clínicos associados à diarreia secretória (de fato, na fase aguda da doença ocorre um aumento nas evacuações líquidas a medida que o indivíduo se reidrata), o que pode induzir uma descontinuação prematura do tratamento por parte do paciente (De Hostos *et al.*, 2011).

Diferente dos principais agentes antidiarreicos disponíveis, que se baseiam na diminuição da motilidade intestinal e eliminação do agente infeccioso, nossa proposta visa o desenvolvimento de uma nova geração de compostos, a partir de relatos da literatura (Kots *et al.*, 2008; Tanifum *et al.*, 2009; Toropov *et al.*, 2013), que atuem promovendo a redução no volume de água perdida no processo secretório estimulado pelos agentes etiológicos causadores

do quadro. Isto não acarretaria, necessariamente, em uma redução da eliminação do agente infeccioso.

Diante desta realidade, este estudo teve como objetivo primário o desenvolvimento de uma nova classe de medicamentos que module a cascata bioquímica responsável pelo processo fisiológico da diarreia e desta forma pudesse ser utilizada não apenas em quadros diarreicos de etiologia infecciosa, mas também em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (Doença de Crohn e a retocolite ulcerativa), onde a diarreia é um dos principais sintomas de caráter crônico e autoimune (Randall et al., 2012), bem como em pacientes com HIV que encontram no tratamento com antirretroviral a diarreia crônica como um dos principais efeitos colaterais (Chordia e Macarthur, 2013), além de outros casos onde a diarreia esteja associada.

2. OBJETIVOS

- a) Delinear e sintetizar novas moléculas derivadas de piridopirimidinas inibidoras do acúmulo de nucleotídeos cíclicos;
- b) Avaliar o efeito destes compostos sob o acúmulo de GMPc e AMPc em modelo celular;
- c) Avaliar a eficácia antidiarreica *in vivo* dos compostos selecionados.

3. METODOLOGIA

3.1. SÍNTESE DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE PIRIDOPIRIMIDINAS

Os compostos **I-XII** foram sintetizados de acordo com a rota sintética descrita na Figura 1, com posições variáveis em **R1**, **R2** e **X** correspondendo às estruturas finais descritas na Figura 14. O procedimento de síntese foi baseado na síntese da dihidropiridina de Hantzsch (Hantzsch, 1881; Agarwal e Chauhan, 2004; Tanifum *et al.*, 2009).

Em resumo, a reação das aminas primárias (c), sintetizadas quando não disponíveis comercialmente com aldeídos (b), sintetizadas quando não disponíveis comercialmente e 1,3-indandiona (a) em ácido acético possibilitou a formação dos compostos **I-XII**.

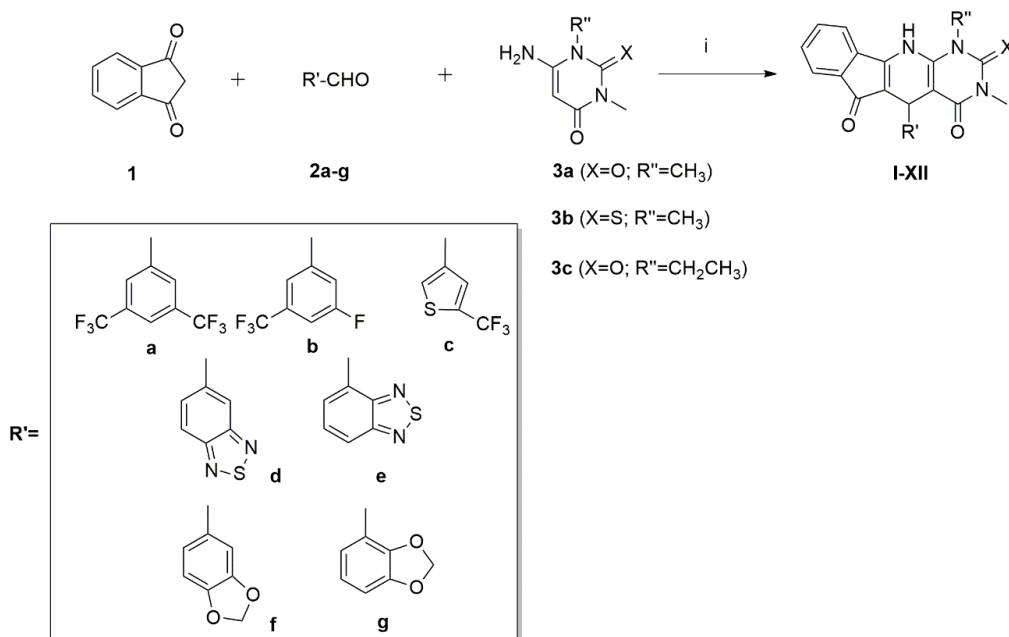


Figura 1a. Procedimento geral para a síntese dos compostos I-XII: (i) CH₃COOH, submetido a refluxo sob N₂ durante 8 horas.

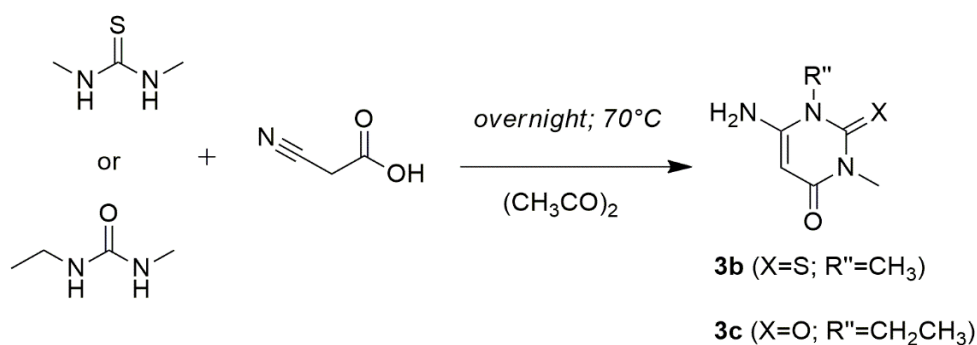


Figura 1b: Rota de síntese dos intermediários **3b** e **3c**.

3.1.1 Síntese do composto I

Síntese de 5-(trifluormetil)tiofeno-3-carbaldeído

O composto foi obtido de acordo com procedimentos previamente descritos na literatura (Binder *et al.*, 1985). Em resumo, 20 mL de uma solução DIBAL 20% em n-hexano foi adicionado em gotas durante 30 minutos em temperatura abaixo de -45° C sob atmosfera de N₂ em uma solução de 3.1 g (17.5 mmol) de 5-(trifluormetil)tiofeno-3-carbonitrila em 32.0 mL de éter anidro. A mistura foi então agitada por 45 minutos à -30° C e sucessivamente uma solução de H₂SO₄ 5% (3.0 mL) foi adicionada três vezes e a fase aquosa extraída com éter dietílico. A fase orgânica combinada foi seca sobre MgSO₄. O solvente

foi evaporado para obtenção do composto desejado como um óleo sem necessidade de purificação.

Síntese de 5-(4-trifluormetiltiofeno)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6]pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona

Em um frasco de fundo redondo contendo 15 mL de ácido acético foram adicionados 6-amino-1,3-dimetiluracil (0.5 g, 3.22 mmol), 1,3-indandiona (0.56 g, 3.87 mmol) e 5-(trifluormetil)tiofeno-3-carbaldeído (0.697 g, 3.87 mmol). A mistura foi aquecida em refluxo sob atmosfera de nitrogênio por 8 horas e na sequência refrigerada à 0° C. O precipitado resultante foi filtrado e lavado com água fria para obtenção do produto bruto. Purificação em coluna de sílica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9.5/0.5, v/v) deu origem ao composto I (Figura 2).

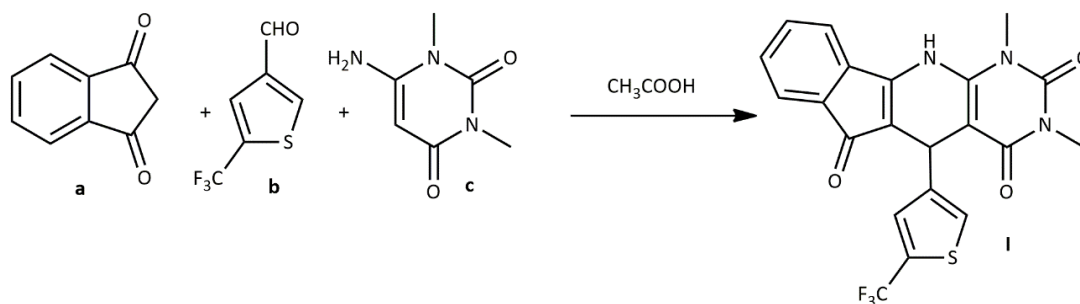


Figura 2. Síntese do composto 5-(4-trifluormetiltiofeno)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6]pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona.

3.1.2 Síntese do composto II

Síntese de 6-amino-1,3-dimetil-2-tioxo-2,3-dihidropirimidina-4(1H)-ona

O composto foi obtido seguindo procedimentos previamente descritos na literatura (Hu *et al.*, 2012). Em solução sob agitação constante de 1,3-dimetiluréia (1.83 g, 17.6 mmol) em ácido acético anidro (30 mL) foi adicionado ácido cianoacético (1.5 g, 17.6 mmol), sendo a mistura resultante agitada “overnight” à 70° C.

A mistura foi então concentrada e o resíduo oleoso resultante foi diluído em H_2O (40 mL) e tratado com NaOH 5N (15 mL). Na sequência o precipitado formado foi coletado por filtração, lavado em água fria e purificado por recristalização de MeOH/ H_2O para dar origem à 2.65 g de 6-amino-1,3-dimetil-2-tioxo-2,3-dihidropirimidina-4(1H)-ona.

Síntese de 5-(4-trifluormetiltiofeno)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6] pirido[2,3-d]pirimidina-2-tioxo-4,6-diona

O composto foi obtido de acordo com os mesmos procedimentos descritos para o composto I, pela reação de 1,3-indandiona (170 mg, 1.16 mmol), 5-(trifluormetil)tiofeno-3-carbaldeído (209 mg, 1.16 mmol) e 6-amino-1,3-dimetil-2-tioxo-2,3-dihidropirimidina-4(1H)-ona (166 mg, 0.97 mmol) (Figura 3).

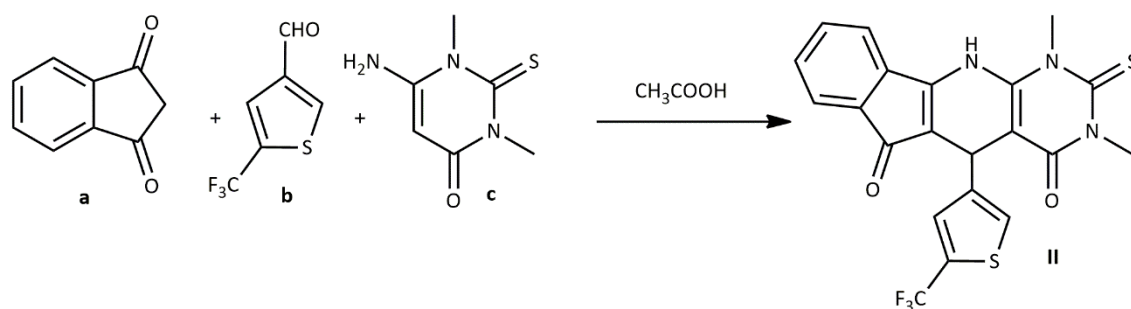


Figura 3. Síntese do composto 5-(4-trifluormetiltiofeno)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6] pirido[2,3-d]pirimidina-2-tioxo-4,6-diona.

3.1.3 Síntese do composto III

O composto foi obtido de acordo com os mesmos procedimentos descritos para o composto I, pela reação de 1,3-indandiona (1.11 g, 7.61 mmol), 3-fluor-5-trifluormetilbenzaldeído (1.46 g, mmol 7.61) e 6-amino-1,3-dimetil-2-tioxo-2,3-dihidropirimidina-4(1H)-ona (1.08 g, 6.34 mmol) (Figura 4).

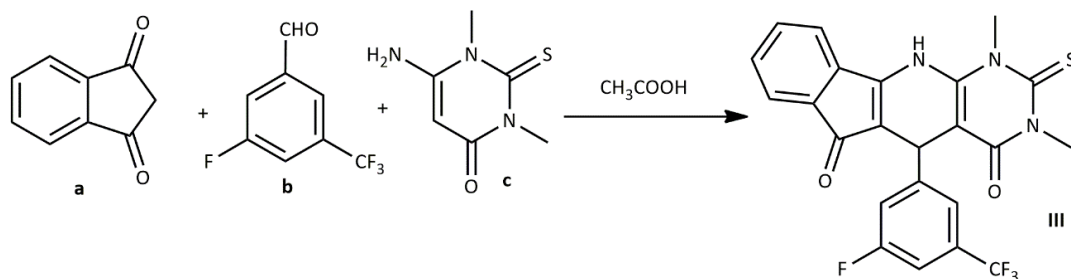


Figura 4. Síntese do composto 5-(3-fluor-5-trifluormetolfenil)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1h-indeno-[2',1':5,6]pirido[2,3-d]pirimidina-2-tioxo-4,6-diona.

3.1.4. Síntese do composto IV

Síntese de 6-amino-1-etil-3-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona

O composto foi obtido seguindo procedimentos previamente descritos na literatura e oportunamente modificados (Hu *et al.*, 2012). Em uma solução sob constante agitação de 1-etil-3-metiluréia (1.36 g, 13.3 mmol) em ácido acético anidro (30 mL) foi adicionado ácido cianoacético (1.13 g, 13.3 mmol), sendo a mistura resultante agitada “overnight” à 70°C. A mistura foi concentrada e o resíduo oleoso resultante diluído com H₂O (40 mL) e tratado com NaOH 5N (15 mL). O precipitado formado foi então coletado por filtração, lavado com água fria e purificado por recristalização de MeOH/H₂O para formar 1.91 g de 6-amino-1-etil-3-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona.

Síntese de 5-(3-fluor-5-trifluormetilfenil)-1-etil-3-metil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6] pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona

O composto foi obtido de acordo com os mesmos procedimentos descritos para o composto I, pela reação de 1,3-indandiona (970 mg, 6.64 mmol), 3-fluor-5-trifluormetilbenzaldeído (1.27 g, 6.64 mmol) e 6-amino-1-etil-3-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona (936 mg, 5.53 mmol) (Figura 5).

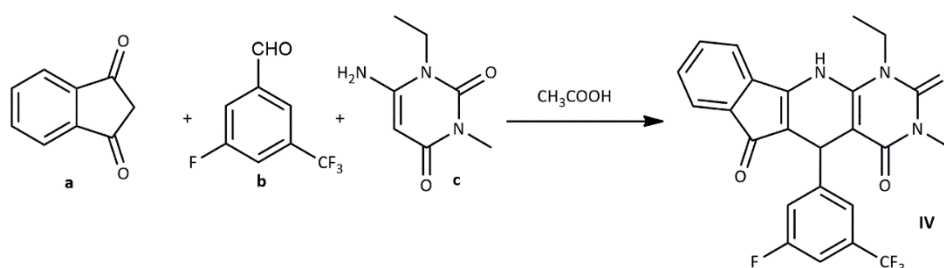


Figura 5. Síntese do composto 5-(3-fluor-5-trifluormetilfenil)-1-etil-3-metil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6] pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona.

3.1.5. Síntese do composto V

O composto foi obtido de acordo com os mesmos procedimentos descritos para o composto I, pela reação de 1,3-indandione (503 mg, 3.44 mmol), 3,5-bistrifluormetilbenzaldeído (833 mg, 3.44 mmol) e 6-amino-1,3-dimetil-2-tioxo-2,3-dihidropirimidina-4(1H)-ona (490 mg, 2.87 mmol) (Figura 6).

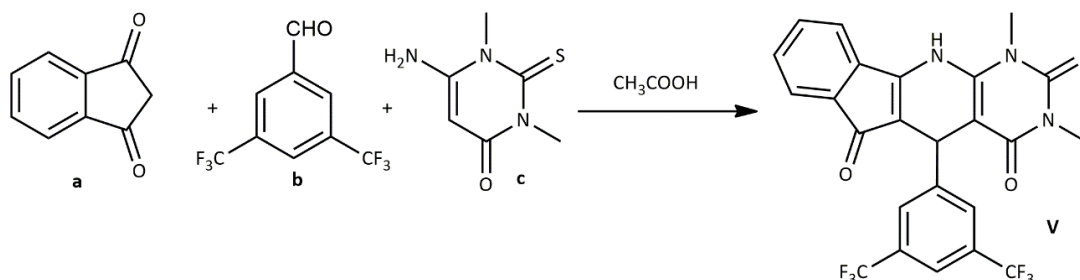


Figura 6. Síntese do composto 5-(3,5-bistrifluormetilfenil)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1 h-indeno-[2',1':5,6]pirido[2,3-d]pirimidina-2-tioxo-4,6-diona.

3.1.6. Síntese do composto VI

O composto foi obtido de acordo com os mesmos procedimentos descritos para o composto I, pela reação de 1,3-indandiona (708 mg, 4.85 mmol), 3,5-bistrifluormetilbenzaldeído (1.17g, 4.85 mmol) e 6-amino-1-etil-3-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona (683 mg, 4.04 mmol) (Figura 7).

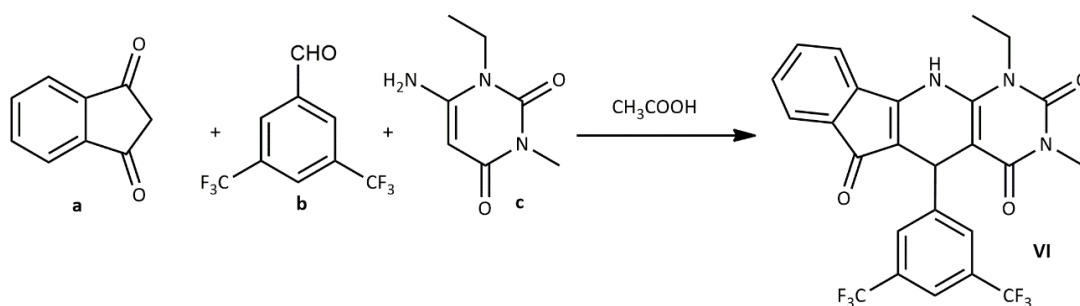


Figura 7. Síntese do composto 5-(3,5-bistrifluormetilfenil)-1-etil-3-metil-5,11-dihidro-1 h-indeno-[2',1':5,6]pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona.

3.1.7. Síntese do composto VII

Síntese de 2,3-(metilenodioxi)benzaldeído

O composto foi sintetizado de acordo com procedimentos previamente descritos (Morin Deveau e Macdonald, 2004). Em um balão equipado com condensador de refluxo foi adicionado 2,3-dihidroxibenzaldeído (1 g; 7.24 mmol), DMF (seco, 30 mL) e carbonato de cézio (1.5 eq). Após homogeneização, foi adicionado dibromometano (1.5 eq) através de seringa. A mistura foi aquecida à 110° C por 2 horas e posteriormente resfriada em temperatura ambiente. Após filtração o filtro foi lavado com acetato de etila.

O filtrado orgânico resultante foi concentrado, diluído com água e extraído três vezes com acetato de etila. As fases orgânicas combinadas foram lavadas com água, secas sobre MgSO₄ e concentradas para formação de um óleo bruto.

A purificação deste óleo bruto foi realizada por cromatografia e destilação de “kugelrohr”, dando origem ao aldeído desejado (cristal incolor e translúcido).

Síntese de 5-(benzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6] pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona

O composto foi obtido de acordo com os mesmos procedimentos descritos para o composto I, pela reação de 1,3-indandiona (1.61 g, 11.06 mmol), 2,3-(metilenodioxi)benzaldeído (1.66g, 11.06 mmol) e 6-amino-1,3-dimetiluracil (1.43 g, 9.22 mmol) (Figura 8).

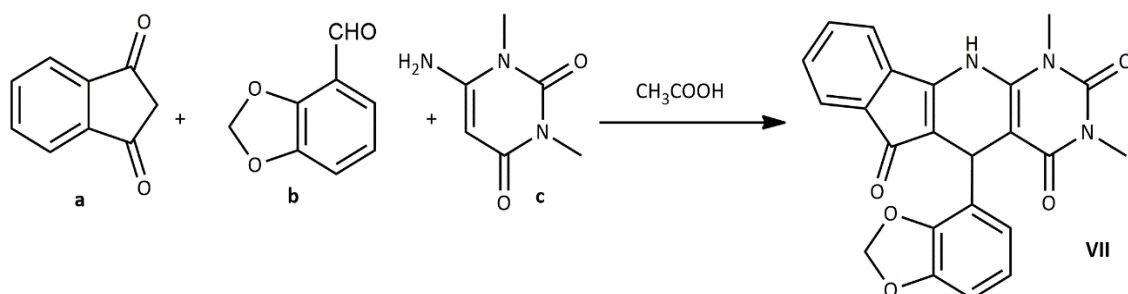


Figura 8. Síntese do composto 5-(benzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6] pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona.

3.1.8. Síntese do composto VIII

O composto foi obtido de acordo com os mesmos procedimentos descritos para o composto I, pela reação de 1,3-indandiona (535 mg, 3.66 mmol), 2,3-(metilenodioxi) benzaldeído (549 mg, 3.66 mmol) e 6-amino-1,3-dimetil-2-tioxo-2,3-dihidropirimidina-4(1H)-ona (521 mg, 3.05 mmol) (Figura 9).

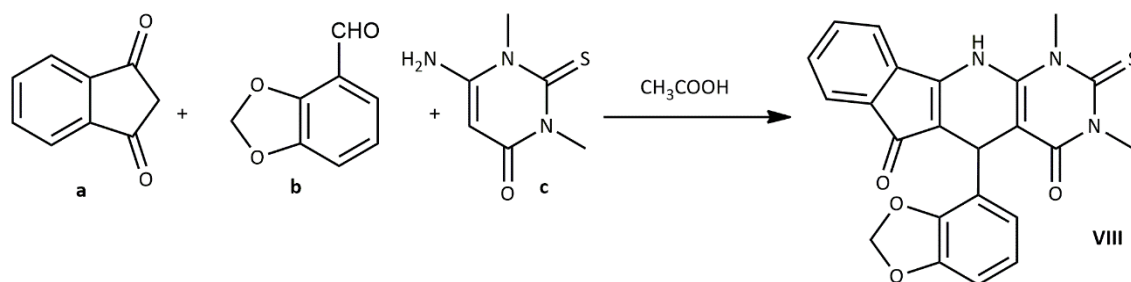


Figura 9. Síntese do composto 5-(benzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1h-indeno-[2',1':5,6]pirido[2,3-d]pirimidina-2-tioxo-4,6-diona.

3.1.9. Síntese do composto IX

Síntese de 3,4-(metilenodioxi)benzaldeído

O composto foi sintetizado de acordo com procedimentos previamente descritos (Poli e Giambastiani, 2002). Para uma solução de álcool piperonil (10 g, 65.72 mmol) em CH_2Cl_2 (250 mL), foi adicionado MnO_2 (49.3 g, 567.2 mmol). A suspensão resultante foi agitada em temperatura ambiente por 24 horas, então 3filtrada em bloco de celite e lavada com CH_2Cl_2 . O solvente foi removido à vácuo e o sólido resultante (cristal sólido amarelado) foi utilizado para purificação.

Síntese de 5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6] pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona

O composto foi obtido de acordo com os mesmos procedimentos descritos para o composto I, pela reação de 1,3-indandiona (203 mg, 1.39 mmol), 3,4-(metilenodioxi)benzaldeído (209 mg, 1.39 mmol) e 6-amino-1,3-dimetiluracil (180 mg, 1.16 mmol) (Figura 10).

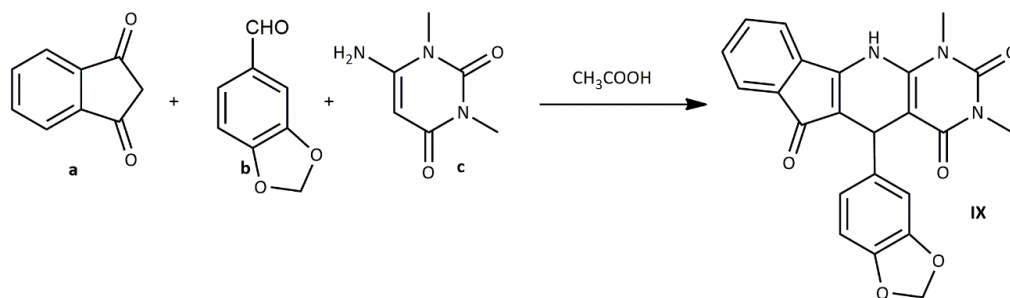


Figura 10. Síntese do composto 5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6] pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona.

3.1.10. Síntese do composto X

Síntese de 2,1,3-benzotiadiazol-4-carboxaldeído

O composto foi sintetizado de acordo com procedimentos previamente descritos (Vanelle *et al.*, 1997). Sal de lítio de 2-nitropropano (2.48 g, 279 mmol) foi adicionado para uma solução de 4-bromometil-2,1,3-benzotiadiazol (5.82 g, 25.4 mmol) em metanol (60 mL). Após agitação em temperatura ambiente por 24 horas, o metanol foi destilado em um evaporador rotatório sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em diclorometano e o solvente lavado com água, seco sobre sulfato de magnésio anidro e evaporado à vácuo. Após purificação por recristalização de ciclohexano foi obtido o 2,1,3-benzotiadiazol-4-carboxaldeído (amarelo sólido).

Síntese de 5-(2,1,3-benzotiadiazol-4-il)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6] pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona

O composto foi obtido de acordo com os procedimentos previamente descritos para o composto I, pela reação de 1,3-indandiona (420 mg, 2.87 mmol), 2,1,3-benzotiadiazol-4-carboxaldeído (471 mg, 2.87 mmol) e 6-amino-1,3-dimetiluracil (359 mg, 2.39 mmol) (Figura 11).

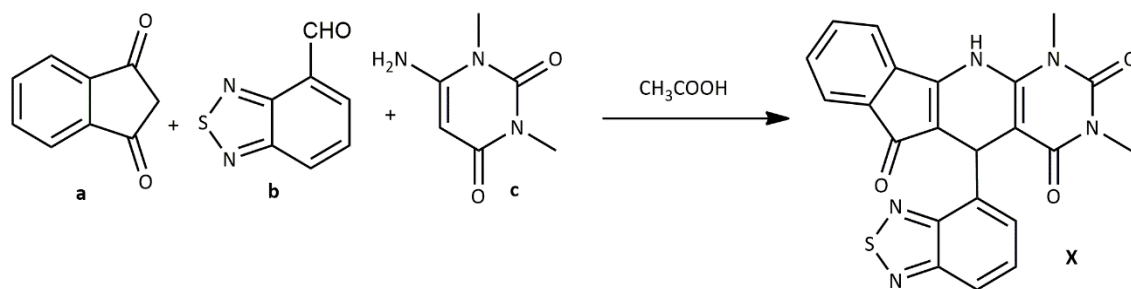


Figura 11. 5-(2,1,3-benzotriazol-4-il)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6] pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona.

3.1.11. Síntese do composto XI

Síntese de 2,1,3-benzotriazol-5-carboxaldeído

O composto foi sintetizado de acordo com procedimentos previamente descritos (Carroll *et al.*, 2004). 5-Hidroxi-metilbenzo-2,1,3-tiadiazol (2.6 g, 16 mmol) e MnO_2 (5.6 g, 64 mmol) em CHCl_3 (150 mL) foram agitados em temperatura ambiente “overnight”. A mistura foi filtrada e o filtrado evaporado.

O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel para formação de 1.9 g de 2,1,3-benzotriazol-5-carboxaldeído.

Síntese de 5-(2,1,3-benzotriazol-5-il)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6] pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona

O composto foi obtido de acordo com os mesmos procedimentos descritos para o composto I, pela reação de 1,3-indandiona (468 mg, 3.20 mmol), 2,1,3- benzotriazol-5-carboxaldeído (525 mg, 3.2 mmol) e 6-amino-1,3-dimetiluracil (415 mg, 2.67 mmol) (Figura 12).

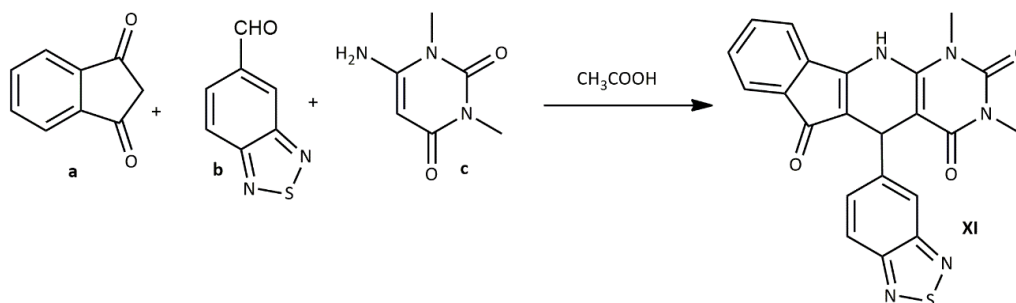


Figura 12. Síntese do composto 5-(2,1,3-benzotriazol-5-il)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1H-indeno-[2',1':5,6]pirido[2,3-d]pirimidina-2,4,6-triona.

3.1.12. Síntese do composto XII

O composto foi obtido através dos mesmos procedimentos descritos para o composto I, pela reação de 1,3-indandiona (456 mg, 3.12 mmol), 2,1,3-benzotiadiazol-5-carboxaldeído (512 mg, 3.12 mmol) e 6-amino-1,3-dimetil-2-tioxo-2,3-dihidropirimidina-4(1H)-ona (445 mg, 2.60 mmol) (Figura 13).

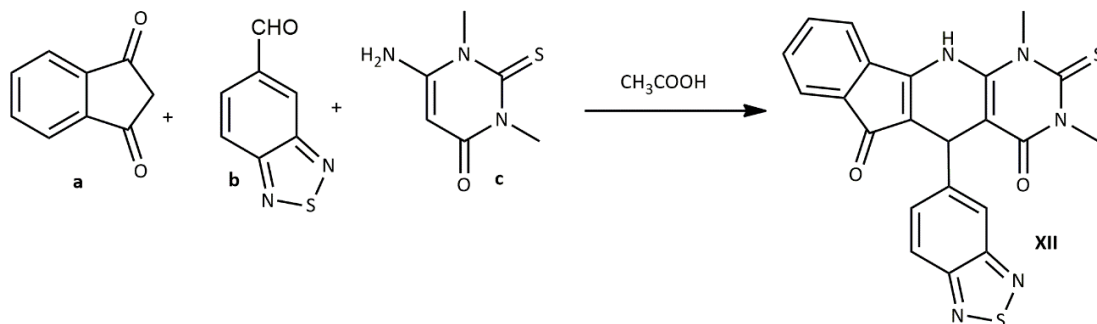


Figura 13. Síntese do composto 5-(2,1,3-benzotiadiazol-5-il)-1,3-dimetil-5,11-dihidro-1h-indeno-[2',1':5,6]pirido[2,3-d]pirimidina-2-tioxo-4,6-diona.

3.2. PROTOCOLO PADRÃO DE CULTURA CELULAR

Células da linhagem de carcinoma colorretal humano, ou T84, foram adquiridas diretamente da *American Type Culture Collection* (n. CCL248) e cultivadas em meio de cultura Dulbecco F-12 Ham (Sigma-Aldrich, D8900) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, # 12657029) e penicilina-estreptomicina (Gibco, n. 15140122) em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 37° C.

As células da linhagem Jurkat E6-01 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (n. 0125) e foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco, n. 61870-036) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, n.12657029) e penicilina-estreptomicina (Gibco, n. 15140122) numa atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 37° C.

3.3. ENSAIO DE ACÚMULO DE GMPc INTRACELULAR

As células T84 cresceram até confluência de 85-95% em placas de 12 poços (Santa Cruz Biotechnology, n. sc-204444) e foram lavadas três vezes com DPBS (pH 7.4). As células foram tratadas com veículo (DPBS com DMSO [Sigma-Aldrich, n. D2650], 0.1%, 0.5 mL por poço) ou compostos (50 μ M) em DPBS durante 10 minutos. Em seguida, o acúmulo de GMPc foi estimulado com enterotoxina de *E. Coli* (STa, 1 μ M [Bachem, n. 404429]) durante 10 minutos.

O meio líquido foi aspirado e o GMPc foi extraído com adição de 0.1 M de HCl (0.3 mL por poço) e mensurado por ELISA (protocolo de acetilação, Cayman Chemical, n. 581021).

3.4. ENSAIO DE ACÚMULO DE AMPc INTRACELULAR

As células da linhagem Jurkat E6-01 foram cultivadas numa concentração de 5 milhões de células/mL em frasco de cultura de 75 cm² (Santa Cruz Biotechnology, n. sc-200263). Na sequência, foram centrifugadas a 3000 x g durante 5 minutos e lavadas três vezes com DPBS (pH 7.4). Posteriormente, as células (0.1 mL) foram tratadas com veículo (DPBS com DMSO 0,1% [Sigma-Aldrich, n. D2650], 0.9 mL por frasco) ou compostos (50 μ M) em DPBS durante 10 minutos. Em seguida, o acúmulo de AMPc foi estimulado com Forscolina (100 μ M) (Sigma-Aldrich, n. F6886) durante 10 minutos. O AMPc intracelular foi extraído com HCl 0.2 M (0.1 mL por frasco) e agitação suave num agitador orbital durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Por fim, as células foram centrifugadas a 3000 x g durante 5 minutos e o sobrenadante congelado a -20° C, sendo o AMPc mensurado por ELISA (protocolo de acetilação, Cayman Chemical, n. 581001).

3.5. ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA CELULAR POR [3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)2,5-DIFENIL BROMETO DE TETRAZOLIUM (MTT)

Usando placas de 96 poços, as células T84 foram cultivadas por 48h de acordo com o descrito acima. O meio foi aspirado e substituído por meio de

cultura padrão livre de proteína (100 µl/poço). Os compostos (50 µM) e o veículo (DPBS com DMSO 0.1% [Sigma-Aldrich, n. D2650]) foram incubados durante 1 hora.

Após a incubação, o meio foi aspirado e substituído por solução de MTT (Sigma-Aldrich, n. M2128) (concentração final de 0.45 mg/mL). As placas foram incubadas durante 2 a 4 horas a 37° C e o meio aspirado e substituído por 100 µl de solução de solubilização (isopropanol acidificado), misturado por 15 minutos com posterior leitura de absorvência a 570 nm.

3.6. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

A citotoxicidade foi avaliada utilizando o Kit de Ensaio LHD CaymanChem (n. 601170). Em resumo, as células T84 foram cultivadas numa placa de 96 poços à densidade ótima previamente determinada em 200 µl de meio de cultura. Triton X-100 (10%; 20 µl) foi adicionado aos poços contendo células para obter a libertação máxima de LDH. O tampão de ensaio (20 µl) foi adicionado para obter libertação espontânea e o LDH (20 µl) foi adicionado aos respectivos poços como controle positivo.

Os compostos (50 µM) ou o seu veículo foram adicionados (20 µl) e a placa foi incubada numa incubadora de 5% de CO₂ a 37° C. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos e 100 µl de sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de ensaio de 96 poços, onde foi adicionado 100 µl de solução de reação a cada poço. As placas foram incubadas com agitação suave num agitador orbital durante 30 minutos à temperatura ambiente e a absorbância lida a 490 nm.

3.7. ENSAIO SOBRE ATIVIDADE DE PDE5A1

A investigação foi realizada utilizando kit de fluorescência polarizada, de acordo com as instruções do fabricante que constam na bula do kit BPSBioscience (#60351). Em resumo, após o preparo de cada reagente, foi feita a incubação do composto VI juntamente com a enzima e seu respectivo

substrato, em solução de reação. Após 2 horas de incubação, foi adicionado o agente de ligação e incubado por mais 30 min. Ao término, o ensaio foi quantificado através de leitor de fluorescência polarizada em excitação entre 475-495 nm e emissão entre 518-538 nm.

3.8. EFEITO VASCULAR EM AORTA DE COELHOS

Os coelhos machos (3 Kg) foram anestesiados com quetamina (50 mg/kg) e isoflurano (2%), com posterior exanguinação. A aorta torácica foi isolada e colocada em solução de Krebs (pH 7.4). A composição da solução de Krebs foi: NaCl (139.9 mM), KCl (2.7 mM), CaCl₂ (1.8 mM); MgSO₄ (0.6 mM); NaHCO₃ (25 mM), KH₂PO₄ (0.5 mM) e Glucose (11.5 mM). O tecido foi dissecado e cortado em anéis aórticos (3 mm) e cada anel foi tensionado para 20 mN durante 45 minutos para estabilização.

Após o período de estabilização, a ausência de endotélio foi avaliada na presença de acetilcolina (1 µM) em anéis pré-contraídos com fenilefrina (1 µM). Após lavagem, os anéis foram pré-contraídos com uma solução de hiperpolarização de KCl (60 mM) e os efeitos dos compostos sobre o tecido foram avaliados.

3.9. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA IN VIVO EM MODELO ANIMAL

3.9.1. Procedimento para clampeamento e tratamento do íleo

Os coelhos machos da variedade Nova Zelândia, com idade entre 8-12 meses e 3-4 Kg foram individualmente pesados e acomodados em 2 animais por gaiola, com jejum prévio de alimento 12 horas antes do procedimento e água *ad libitum*. Posteriormente, foram anestesiados com quetamina (60-80 mg/kg) e xilazina (5-10 mg/kg), administradas por via intramuscular e uma incisão abdominal para expor o intestino delgado foi realizada.

O íleo foi lavado com auxílio de agulha com 10 mL de solução fisiológica (pH 7.4) e com auxílio de fio cirúrgico, o íleo foi clampeado em forma de alças de 4 cm, intervalados por 1 cm entre si, com amarração dupla (sem interromper o fluxo sanguíneo).

Cada alça controle foi injetada intraluminal com uma solução de 0.5 mL de solução fisiológica com 20 µg/mL de toxina STa de *E. coli*. Após 10 minutos, estas alças foram injetadas com 0.5 mL de solução fisiológica.

Cada alça teste dos compostos foi injetada intraluminal com uma solução de 0.5 mL de solução fisiológica com 20 µg/mL de toxina STa de *E. coli*. Após 10 minutos, estas alças foram injetadas com 0.5 mL de cada composto (1 mg/Kg). Por fim, o íleo foi realocado na cavidade abdominal e esta suturada e fechada. Os coelhos foram mantidos sob anestesia geral até eutanásia 5 horas depois.

3.9.2. Procedimento para quantificação do volume de líquido intraluminal

Após 5h de incubação, os segmentos ileais ligados foram removidos. O comprimento de cada segmento ileal foi medido. O líquido intraluminal foi extraído de cada alça e quantificado, sendo corrigido por cálculo da relação entre volume x área foi (mililitros por centímetro por alça). O conteúdo líquido de cada alça foi analisado microscopicamente e qualitativamente (cor, opacidade, aspecto mucoide, seroso, hemorrágico, purulento).

3.9.3. Preparação do tecido para análise histopatológica

Com a remoção do conteúdo luminal das alças de cada íleo, o tecido foi coletado em cassetes de histologia e mergulhado em solução de formalina 10% por 24 horas. Na sequência, os cassetes foram enxaguados sob água da torneira durante 10 min, depois colocados em etanol a 70% até o processamento.

As amostras foram incorporadas em blocos de parafina e cortadas em secções de 3 a 5 µm para cada região. Cada seção foi montada sob lâminas e corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina. Os achados histopatológicos foram categorizados numa escala de pontos definidas de acordo com Bang & Lichtenberger (2016).

3.10. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DO COMPOSTO VI

Para avaliar a estabilidade química do composto VI, o procedimento foi executado da seguinte forma:

(a) Composto VI em estado sólido

Duas amostras do mesmo lote do composto VI foram preparadas: (I) Amostra A, 10 mg, armazenada a 4° C sob atmosfera de nitrogênio; (II) Amostra B, 10 mg, temperatura ambiente, frasco aberto. Após 4 semanas, as amostras A e B foram comparadas por inspeção visual, RP-HPLC (Cromatografia líquida de Fase Reversa) e ESI-MS (Espectrometria de Massa Ionização de Eletrospray).

(b) Composto VI em solução metanólica

Duas amostras do mesmo lote do composto VI foram preparadas: (I) Amostra C, 1 mg, diluída em 1 mL de MeOH, armazenada a 4° C sob atmosfera de nitrogênio; (II) Amostra D, 1 mg, diluída em 1 mL de MeOH, temperatura ambiente, frasco aberto. Após 4 semanas, as amostras A e B foram comparadas por inspeção visual, RP-HPLC (Cromatografia Líquida de Fase Reversa) e LC-HRMS (Cromatografia Líquida de Alta Resolução/Espectrometria de Massa).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese dos derivados de piridopirimidina

Os compostos I-XII foram preparados seguindo a rota de síntese representados na Figura 4. O procedimento sintético baseou-se na técnica de ciclização dihidropiridina de Hantzsch (Hantzsch, 1881; Agarwal e Chauhan, 2004; Tanifum *et al.*, 2009). Em particular, a reação de 1,3-indandiona (**1**) com os aldeídos (**2a-g**) e as aminas primárias oportunas (**3a-c**) em ácido acético proporcionou os compostos (I-XII) desejados.

Os aldeídos **2a-2c** estão comercialmente disponíveis, enquanto que os aldeídos **2d-2g** foram sintetizados segundo literatura (Vanelle *et al.*, 1997; Poli e Giambastiani, 2002; Carroll *et al.*, 2004; Morin Deveau e Macdonald, 2004). O intermediário **3a** também está comercialmente disponível, enquanto que os intermediários **3b** e **3c** foram preparados de acordo com o descrito na Figura 18, com modificações, conforme descrito anteriormente (Hu *et al.*, 2012). A estrutura molecular de cada composto é apresentada na Figura 14.

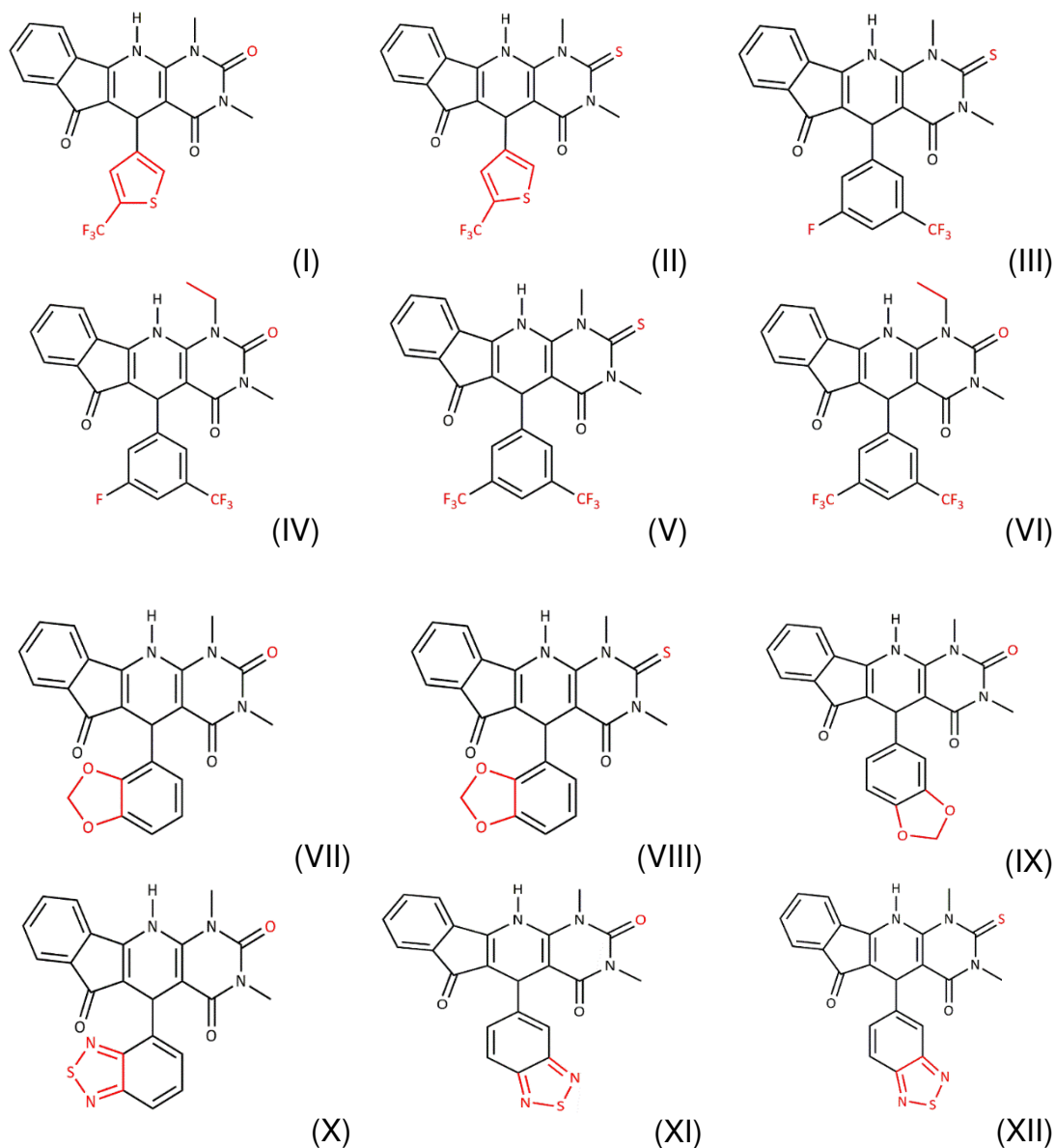


Figura 14. Estrutura molecular dos compostos derivados de piridopirimidinas, inibidores da síntese de nucleotídeos cíclicos derivados de piridopirimidinas.

4.2. Avaliação dos derivados de piridopirimidina como inibidores do acúmulo de GMPc e AMPc

A atividade do composto foi determinada medindo a concentração intracelular de AMPc ou GMPc antes e depois da estimulação com STa ou Forscolina, respectivamente (Figura 15). Os níveis basais de AMPc em células Jurkat foram 16 ± 1 e 140 ± 8 pmol/10 min/mg após estimulação por Forscolina. Ademais, nenhum dos compostos modificaram os níveis basais de AMPc nestas

células, enquanto que todos os compostos inibiram significativamente, em maior ou menor nível, o acúmulo induzido por Forscolina.

Na ausência da toxina STa, os níveis de GMPc em células T84 foram 7 ± 1 pmol/10 min/mg e na presença 471 ± 11 pmol/10 min/mg. Nenhum composto alterou os níveis basais de GMPc, enquanto que à exceção do composto VII, todos os demais inibiram o acúmulo induzido de GMP. Uma curva concentração resposta foi realizada para os compostos mais ativos (I, II, IV, VI e XI) como pode ser observado na Figura 16.

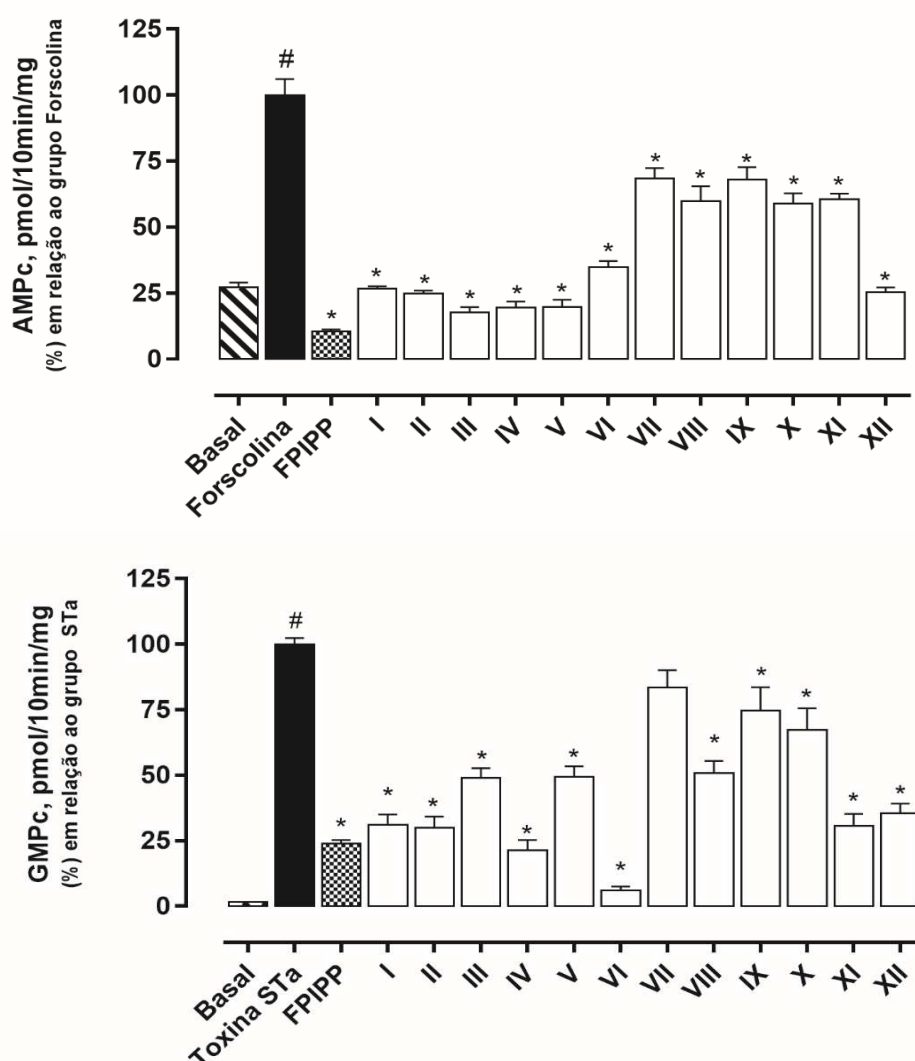


Figura 15. Efeito dos compostos sob o acúmulo de AMPc e GMPc intracelular. Células foram pré-tratadas com os compostos (50 μ M) ou veículo (DPBS com 0.1% de DMSO) por 10 minutos e estimuladas com Forscolina (100 μ M) ou STa (1 μ M). n= 3-5. ANOVA complementada pelo teste de Tukey. * p<0.05 comparado ao grupo Forscolina ou STa; # p<0.05 comparado ao grupo Basal.

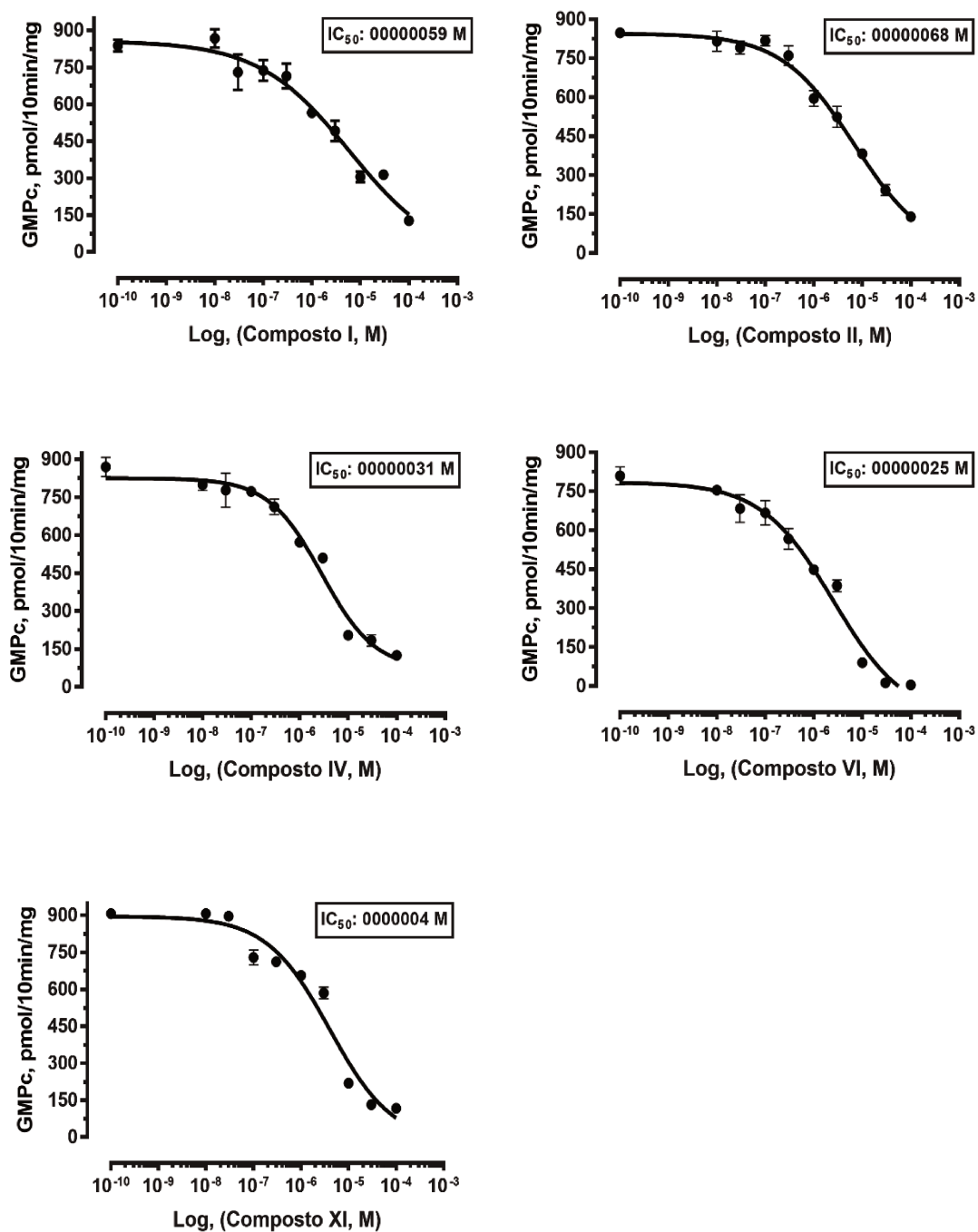
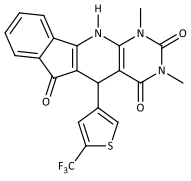
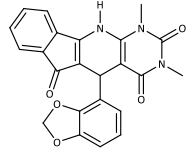
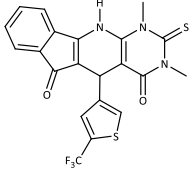
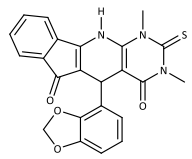
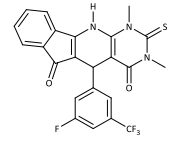
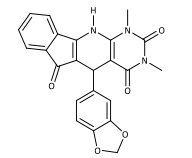
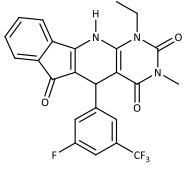
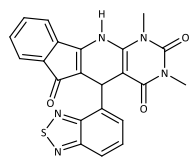
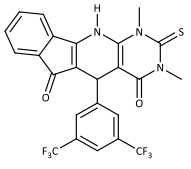
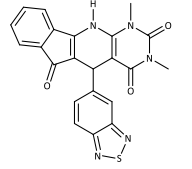
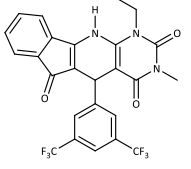
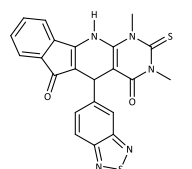


Figura 16. Curva concentração resposta sob o acúmulo de GMPC intracelular em células T84. Células foram pré-tratadas com os compostos ou veículo (DPBS com 0.1% de DMSO) por 10 minutos e então estimuladas com a toxina STa ($1 \mu\text{M}$) por 10 minutos. Resultados são médias + EPM de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

Tabela I. Estrutura química dos derivados de piridopirimidinas (I-XII) e seus efeitos sobre o acúmulo de GMPc induzido por STa em células T84 e de AMPc induzido por Forscolina em células Jurkat.

Estrutura	GMPc (%)	AMPc (%)	Estrutura	GMPc (%)	AMPc (%)
I 	(69±3)	(84±3)	VII 	(17±7)	(37±4)
II 	(70 ± 5)	(82±3)	VIII 	(49±4)	(45±6)
III 	(51±3)	(88±3)	IX 	(25±9)	(35±6)
IV 	(78±4)	(86±3)	X 	(33±8)	(45±4)
V 	(51±4)	(86±3)	XI 	(71±4)	(4±2)
VI 	(94±2)	(69±2)	XII 	(65±4)	(80±2)

As células T84 e/ou Jurkat foram pré-tratadas durante 10 minutos com compostos a 50 µM ou veículo (DPBS com 0.1% de DMSO) e depois tratados com a toxina STa (1 µM) ou Forscolina (100 µM) por 10 minutos. Os dados são médias + EPM de 3-5 experimentos independentes testados em duplicata.

Os resultados sobre o acúmulo induzido de nucleotídeos cíclicos permitiram algumas considerações preliminares de relação estrutura-atividade.

Um substituinte eletronegativo na posição meta do anel fenil (carbono 5) é essencial para a atividade inibitória dos compostos. Quando esta característica não estava presente, observou-se uma diminuição severa na atividade (compostos VII-X), tanto para GMPc quanto para inibição de AMPc. Além disso, a presença de grupos aromáticos bicíclicos na posição 5 (compostos VII-XII) promoveu perda de atividade quando comparada ao composto precursor (BPIPP). A substituição do grupo metil com um grupo etil com maior impedido estérico na posição N1 aumentou a atividade (compostos IV e VI).

Finalmente, a substituição isostérica de um oxigênio por um átomo de enxofre na posição 2 provou não estar diretamente ligada à atividade inibitória. De fato, quando esta modificação química foi incluída, gerou compostos com uma atividade sobreposta (compostos I e II), ou com melhor efeito inibitório para o composto que contém o átomo de enxofre (VIII > VII) ou compostos com efeito diminuído (ou seja, XII < XI). As considerações acima relatadas concordaram com as já publicadas na literatura sobre derivados analógicos (Tanifum *et al.*, 2009).

Com base nos resultados obtidos, um mecanismo farmacológico de ação dos compostos sintetizados foi postulado preliminarmente. É sabido que quando a STa ou mediadores endógenos (guanilina e uroguanilina) interagem com o receptor GC-C induzindo uma alteração conformacional na porção extracelular do complexo GC-C, dois domínios catalíticos intracelulares dimerizam e formam duas fissuras catalíticas ativas.

Este mecanismo de ativação no intestino resulta em estimulação da secreção de Cl^- e HCO_3^- (pela abertura dos canais apicais de Cl^- , CFTR) e inibição da absorção de Na^{+2} (bloqueando o permutador Na^+/H^+) (Vaandrager, 2002). É possível que a diminuição da síntese de GMPc observada possa estar relacionada a qualquer dos seguintes eventos: (i) dessensibilização/modificação alostérica do receptor GC-C ou (ii) modulação da atividade de PDE5, (iii) outros mecanismos.

A exposição prolongada das células T84 à STa induz mecanismos intracelulares que promovem a dessensibilização do receptor GC-C, resultando em um bloqueio significativo na síntese GMPc (Bakre e Visweswariah, 1997).

Vários compostos foram descritos como inibidores da atividade GC-C, mesmo quando expostos por períodos mais curtos, semelhantes e inferiores aos empregados em nossos protocolos (Dreyfus *et al.*, 1984; Gazzano *et al.*, 1991; Katwa *et al.*, 1992; Vaandrager *et al.*, 1993; Parkinson e Waldman, 1996). Assim, seria possível que os compostos aqui descritos pudessem estimular esses mecanismos responsáveis pela dessensibilização do receptor, especialmente por ter havido um alto estímulo pela toxina STa.

Além disso, sabe-se que quando o STa ativa a GC-C, o substrato (GMP) liga-se primeiro ao sítio regulador do receptor e, enquanto esta ligação é necessária para a subsequente ligação do substrato ao local catalítico, não afeta a afinidade do site catalítico (Katwa *et al.*, 1992). Por isso, a ligação destes compostos ao sítio regulador da GC-C, de forma semelhante ao que pode ser observado para outros compostos (Dreyfus *et al.*, 1984; Parkinson e Waldman, 1996; Parkinson *et al.*, 1997) poderia inibir a sua atividade.

Ademais, a enzima fosfodiesterase 5 (PDE5) que é altamente expressa em células T84 (Bakre *et al.*, 2000) é caracterizada por uma especificidade relativa para hidrólise de GMPc em baixos níveis de substrato e pela presença de locais de alta afinidade para GMPc (Bender e Beavo, 2006). Esses locais de ligação são agora conhecidos como domínios GAF regulatórios N-terminais da enzima. A ligação de GMPc ao domínio GAF-A PDE5 estimula a atividade enzimática 9 a 11 vezes e o bloqueio dessa ligação inibe a atividade de PDE5 (Bender e Beavo, 2006).

Além disso, quando os níveis de GMPc são elevados (como após o estímulo por STa) e o GAF-A já está ocupado pelo GMPc, a PKA também pode fosforilar este site (Bender e Beavo, 2006), estabilizando o aumento da atividade catalítica ao aumentar a afinidade da ligação GMPc ao domínio GAF (Corbin *et al.*, 2000).

No entanto, quando incubamos nossos compostos em células T84, previamente tratadas com 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), um inibidor de PDE não específico, e avaliamos o efeito em enzima (PDE5) isolada, os compostos ainda foram capazes de bloquear, em menor extensão, o acúmulo de GMPc (Figura 24), de forma semelhante aos resultados descritos para BIPP (Kots *et al.*, 2008).

4.3. Avaliação da atividade metabólica (MTT) e citotoxicidade (LDH)

Todos os compostos avaliados neste estudo mostraram algum efeito sobre síntese estimulada de GMPc e AMPc. Portanto, para investigar a possibilidade de nossos resultados serem derivados apenas da atividade intrínseca de cada composto, e não por um efeito tóxico nas células, como alterações metabólicas ou perda de viabilidade, o MTT e o ensaio LDH (lactato desidrogenase) foram utilizados, respectivamente.

O ensaio MTT requer células que possam ativamente metabolizar o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) num precipitado de formazan insolúvel (Ehrich e Sharova, 2001). Para investigar mudanças na atividade metabólica, os compostos foram incubados durante 1 hora em meio de cultura padrão livre de proteína. Os resultados não demonstram alterações no metabolismo celular (atividade mitocondrial), sugerindo a ausência de interferência na atividade metabólica das células T84 e excluindo a possibilidade de interferência metabólica nas células durante o ensaio de estimulação com STa (Tabela 2).

Tabela II. Efeito dos compostos na atividade metabólica celular (MTT) e citotoxicidade (LDH).

MTT		LDH	
Tratamento	%	Tratamento	%
Veículo (DPBS)	100 ± 5	Veículo (DPBS)	1.7 ± 1
Triton-X100 (1%)	10 ± 1*	LDH (controle)	36 ± 0.5*
STa (1 µM)	93 ± 2	STa (1 µM)	1 ± 0.5
Composto I	86 ± 2	Composto I	1.7 ± 0.1
Composto II	85 ± 4	Composto II	1.6 ± 0.5
Composto III	107 ± 2	Composto III	1 ± 0.4
Composto IV	99 ± 2	Composto IV	2.6 ± 0.5
Composto V	104 ± 3	Composto V	1.5 ± 0.6
Composto VI	112 ± 2	Composto VI	2.8 ± 0.4
Composto VII	79 ± 2	Composto VII	1.4 ± 0.2
Composto VIII	80 ± 2	Composto VIII	2 ± 0.2
Composto IX	76 ± 1	Composto IX	1.4 ± 0.5
Composto X	78 ± 4	Composto X	1 ± 0.5
Composto XI	78 ± 6	Composto XI	4.2 ± 1.3
Composto XII	76 ± 2	Composto XII	2.7 ± 0.6

Resultados são médias + EPM de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. ANOVA complementada pelo teste de Tukey. * p<0.05 comparado ao grupo Veículo.

Um dos principais processos envolvidos na morte celular e que são facilmente mensurados, consiste na liberação de enzimas intracelulares que ocorre geralmente após danos à membrana celular, portanto, quanto maior a taxa de liberação de enzima, maior a extensão da morte/dano celular ocorrida nesse período (Racher *et al.*, 1990). Com relação a citotoxicidade induzida pelos compostos, nossos resultados mostraram que nenhum dos compostos foi capaz de induzir toxicidade celular no protocolo utilizado, de forma semelhante aos resultados já demonstrados com a molécula precursora (Kots *et al.*, 2008).

4.4. Avaliação do efeito vascular em aorta de coelhos

Estudos funcionais em aorta isolada de coelho foram realizados para avaliar o relaxamento do músculo liso induzido pelos compostos I-XII. Embora todos os compostos sintetizados neste estudo tenham sido capazes de bloquear o acúmulo de GMPc e AMPc quando estimulados por toxinas ou agentes farmacológicos, nenhum deles induziu alterações nos níveis basais desses nucleotídeos cíclicos. Esta ausência de efeito sobre os níveis basais é extremamente importante, considerando que pequenas mudanças nos níveis de AMPc ou GMPc podem promover efeitos fisiológicos significativos devido à importância desta via de sinalização intracelular, especialmente no sistema cardiovascular (Polson e Strada, 1996; Maurice *et al.*, 2003).

Além disso, devemos considerar aqui a semelhança estrutural parcial de nossos compostos com bloqueadores de cálcio tipo diidropiridina, como a amlodipina, amplamente utilizada na clínica como ferramenta para controlar a pressão arterial. Estes compostos derivados de diidropiridina agem inibindo o influxo de cálcio através de canais "lentos" nas células do músculo liso periférico vascular e coronário, produzindo vasodilatação acentuada em leitos vasculares periféricos e coronários (Murdoch e Heel, 1991). Assim, consideramos importante avaliar o efeito dos compostos aqui apresentados no tecido vascular.

Quando incubada sem células T84, amlodipina, nifedipina e nimodipina não induziram alterações no acúmulo de GMPc induzido por STa (319 ± 11 , 328 ± 29 e 273 ± 11 pmol/10 min/mg, respectivamente, em comparação com STa 348 ± 20 pmol/10 min/mg) (Figura 18).

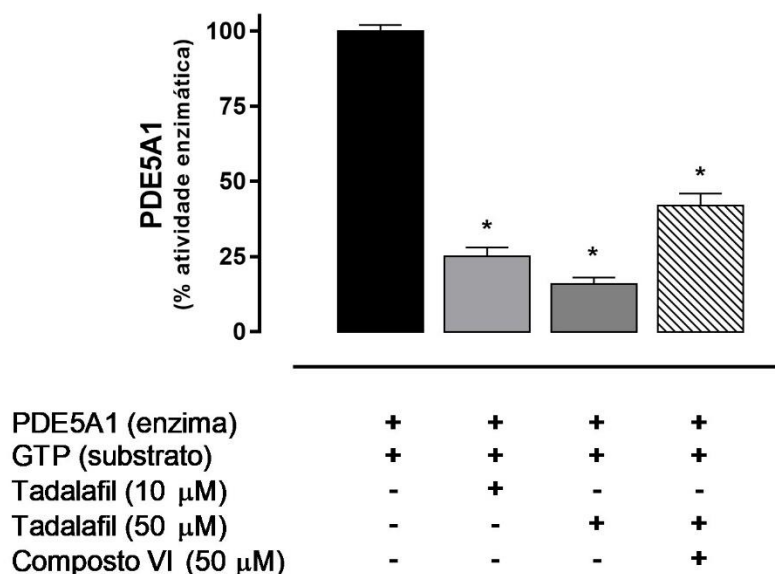


Figura 17. Ensaio enzimático para PDE5A1. Os resultados são apresentados como média + EPM. n= 3. One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey; * p<0.05 em comparação com o grupo atividade total.

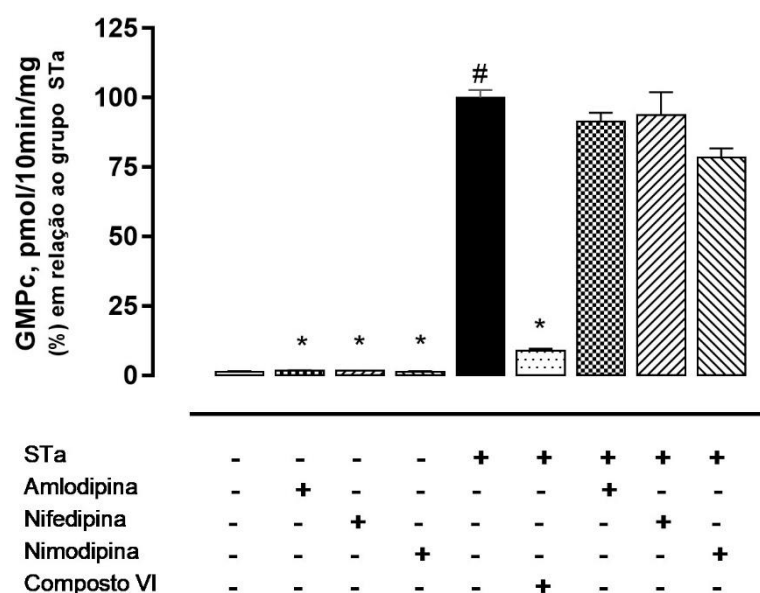


Figura 18. Avaliação da resposta celular (células T84) a inibidores de canais de cálcio da classe dihidropiridina. Os resultados são apresentados como média + EPM. n= 3. One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey; * p<0.05 em comparação com o grupo STa. # p<0.05 em comparação com o grupo basal.

Para este propósito, os compostos foram avaliados em um modelo de tensão aórtica, demonstrando que nenhum destes foi capaz de induzir alterações nos tônus vasculares da aorta de coelhos, em contraste com o relaxamento vascular máximo induzido pela amlodipina (Figura 19).

Curiosamente, apenas FPIPP (50 μ M) promoveu um efeito do tipo dual, aumentando o tônus vascular em 20% antes induzir um relaxamento vascular máximo semelhante à amlodipina (10 μ M). Essas observações são criticamente importantes, uma vez que, embora haja semelhança estrutural entre nossos compostos e bloqueadores de cálcio do tipo diidropiridina, seu efeito no músculo liso vascular não tem relevância fisiológica.

Além disso, a inibição do acúmulo de nucleotídeos cíclicos por estes compostos parece não desempenhar nenhum papel no tônus vascular, o que favorece a ausência de possíveis efeitos cardiovasculares adversos se administrados de forma sistêmica.

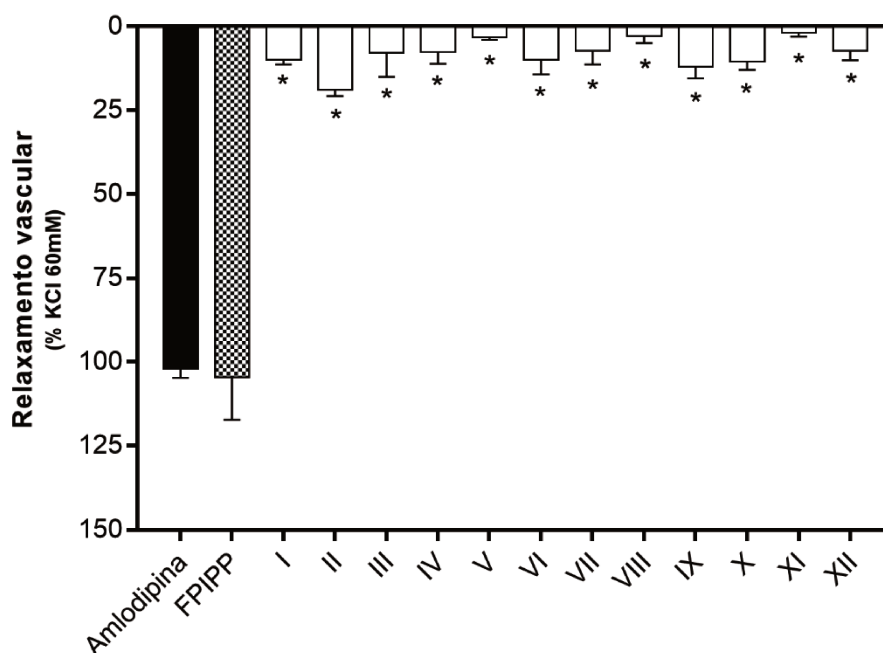


Figura 19. Efeito dos compostos I-XII em anéis de aorta de coelho pré-contráídos. Os anéis aórticos de coelho foram pré-contráídos com KCl (60 mM) e tratados com 50 μ M dos compostos, FPIPP ou Amlodipina (10 μ M) durante 40 minutos. Os resultados são apresentados como média + EPM. $n = 3-5$. One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey; * $p < 0.05$ em comparação com o grupo Amlodipina.

4.5. Avaliação da eficácia *in vivo* em modelo animal

A fim de investigar a eficácia do composto VI na redução da diarreia induzida por toxina bacteriana (dependente da ativação das vias GMPc e/ou AMPc) *in vivo*, bem como a possibilidade de modulação do processo inflamatório e lesões celulares induzidas por esta toxina, utilizamos a técnica anteriormente descrita por Alcantara et al. (2005).

Os dados apresentados na Figura 20 mostram que tanto o composto VI quanto o FPIPP são eficazes na redução do acúmulo de fluídos no lúmen intestinal quando estimulado pela toxina STa. Estatisticamente, assim como previamente observado *in vitro*, ambos os compostos não diferem entre si em termos de efetividade.

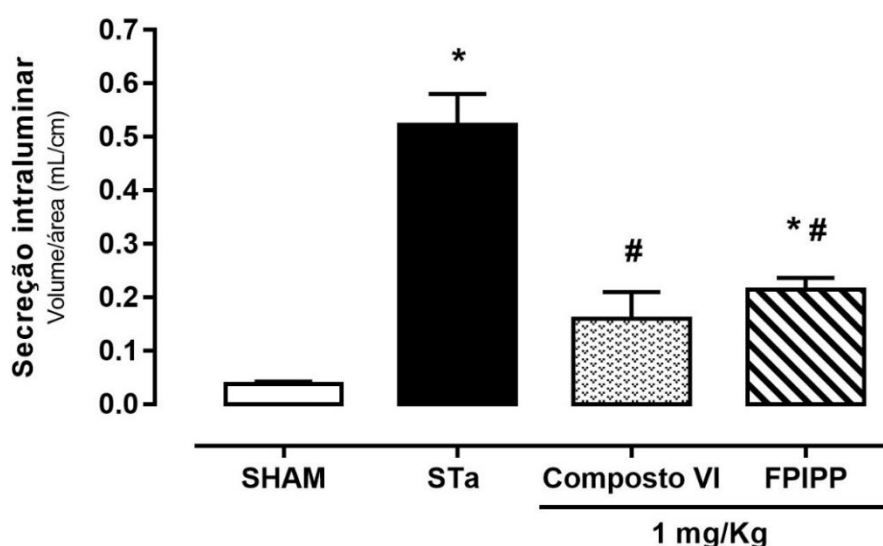


Figura 20. Acúmulo de líquido após injeção intraluminal do composto VI e/ou FPIPP (1 mg/alça) em alças de íleo de coelhos tratados com toxina STa (20 µg/mL). * $p < 0.05$ (SHAM vs. STa; SHAM vs. FPIPP); # $p < 0,05$ (STa vs. composto VI; STa vs. FPIPP). One-way ANOVA, complementado pelo teste de Tukey.

No entanto, os achados histopatológicos (Figura 21) apontam para uma diferença biológica relevante entre os dois compostos. De acordo com esses resultados, o tratamento com o composto VI reduz drasticamente as alterações microscópicas no tecido intestinal, preservando sua arquitetura.

Já o tecido de animais tratados com STa e FPIPP, no entanto, demonstraram um padrão microscópico muito semelhante ao tecido tratado apenas com a toxina STa, com uma perda intensa de arquitetura de tecido com características de necrose moderada e/ou agregados inflamatórios acentuados.

De forma mais detalhada, o estudo histopatológico do tecido intestinal dos coelhos tratados permitiu a observação das modificações teciduais elencadas na sequência, classificadas de acordo com o escore antiinflamatório descrito por Bang e Lichtenberger (2016).

(a) Animais não tratados (SHAM)

A avaliação histopatológica revelou arquitetura de tecidual preservada, destacando-se leve edema da mucosa e deposição de material secretor superficial. Na submucosa e na camada muscular foram observados focos discretos de congestionamento vascular e edema das fibras de colágeno. Em resumo foram observados padrões de intestino preservado sem alterações patológicas significativas, com pontuação inflamatória de grau 0 (tecido preservado ausente da celularidade inflamatória e necrose).

(b) Animais tratados com a toxina STa e pós-tratados com veículo

A avaliação histopatológica revelou uma discreta deposição de material serocelular, com hiperplasia epitelial moderada das vilosidades, dilatação difusa da mucosa. No meio da camada epitelial foi observado um infiltrado inflamatório linfoplasmacítico multifocal misturados aos traços supurativos e exsudativos no meio da transição da mucosa. Na região submucosa, edema moderado do tecido, com espaçamento das fibras de colágeno e dilatação linfática. Em resumo foram observados padrões de enterite linfoplasmocitária difusa severa, associada a traços exsudativos, com escore inflamatório de grau 4 (perda de arquitetura do tecido com características de necrose moderada e/ou agregados inflamatórios acentuados).

(c) Animais tratados com a toxina STa e pós-tratados com o composto VI

A avaliação histopatológica revelou arquitetura do tecido preservada, destacando-se a hiperplasia leve da mucosa, associada à deposição de material mucoide e foco cemático frequente.

No meio da mucosa, padrão inflamatório discreto, representado por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos raros. A submucosa e a lâmina própria estavam preservadas, com edema leve e dilatação linfática. Em resumo foram observados padrões de hiperplasia da mucosa intestinal associada a agregados linfoplasmocitários, com escore inflamatório de grau 2 (desorganização moderada do tecido com esboços de necrose e/ou agregado de infiltrado inflamatório discreto).

(d) Animais tratados com a toxina STa e pós-tratados com FPIPP

A avaliação histopatológica revelou uma discreta deposição de material serocelular, com hiperplasia epitelial moderada das vilosidades e dilatação difusa da mucosa.

No meio da camada epitelial, infiltrado inflamatório linfoplasmacítico multifocal. Na região submucosa, edema de tecido moderado, com espaçamento das fibras de colágeno e dilatação linfática. Em resumo foram observados padrões de enterite linfoplasmocitária difusa severa, associada a traços exsudativos, com escore inflamatório de grau 4 (perda de arquitetura do tecido com características de necrose moderada e/ou agregados inflamatórios acentuados).

4.6. Avaliação da estabilidade da exposição ao ar para o composto VI

Para avaliar a estabilidade química do composto VI, identificado como o composto mais ativo na inibição do acúmulo induzido de GMPc, realizamos ensaios para avaliar sua resistência contra a oxidação do ar, tanto em estado sólido como em solução de álcool metílico, conforme detalhado na respectiva seção metodológica.

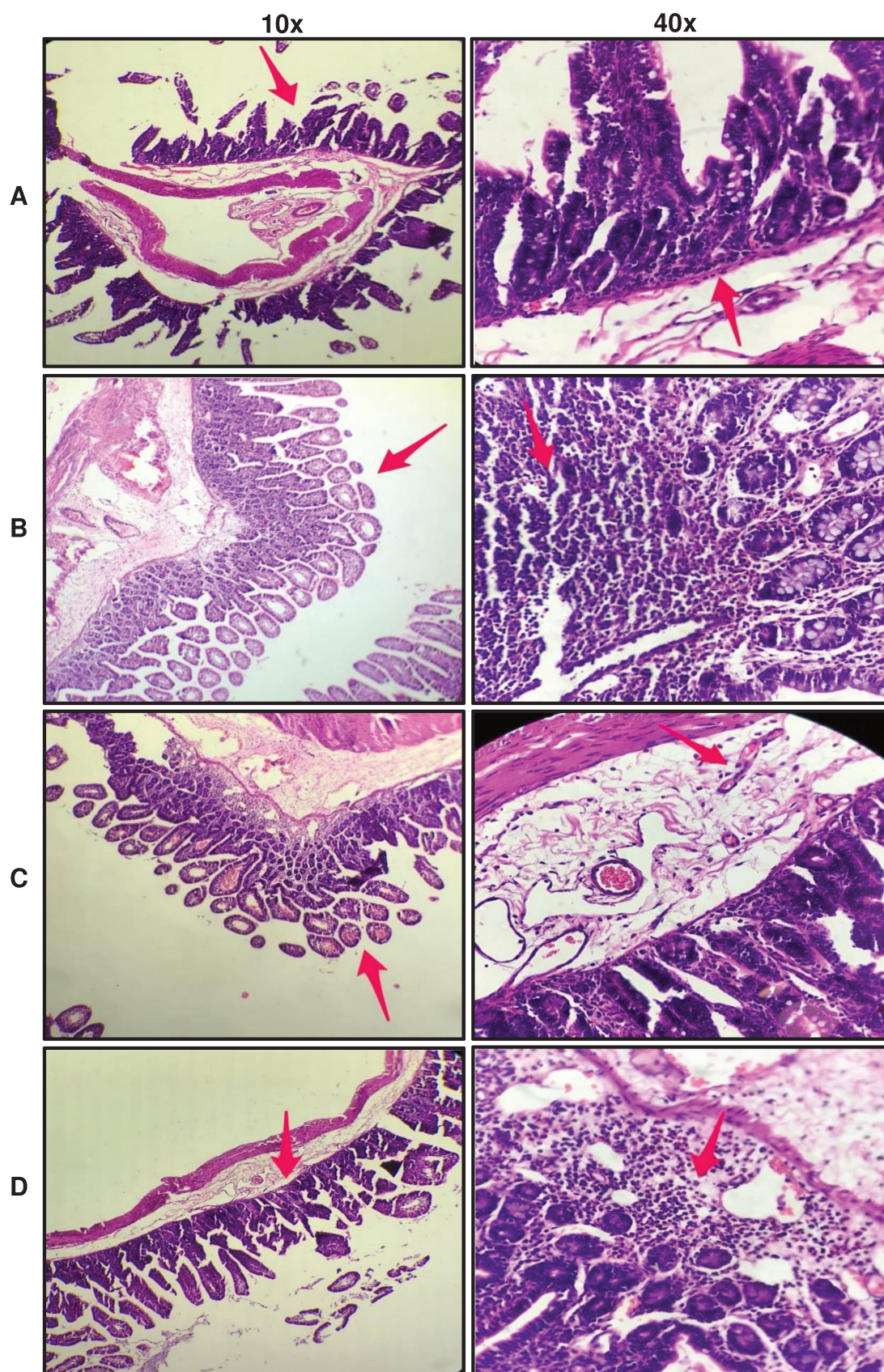


Figura 21. Análise histopatológica do tecido intestinal (íleo) de coelhos tratados com veículo (A), toxina STa (B), composto VI (C) ou FPIPP (D) durante 5 horas.

No caso onde o composto VI foi avaliado em seu estado sólido, após um período de 4 semanas, as amostras A e B foram comparadas por técnicas cromatográficas e de acordo com os resultados, não houve oxidação do composto.

No entanto, no ensaio utilizando o composto VI em álcool metílico por 4 semanas, os resultados analíticos evidenciaram que o armazenamento prolongado desta solução à temperatura ambiente sob exposição ao ar permitiu a formação de uma pequena quantidade de dois subprodutos, denominados "a" e "b". O composto "a" revelou um peso molecular de 538.1189 gramas, correspondente a uma molécula com uma fórmula geral de $C_{25}H_{18}O_4N_3F_6$. O composto "b", foi caracterizado por um peso molecular de 520.1081 gramas e identificado como um derivado de piridina, obtido por oxidação do composto VI.

6. CONCLUSÕES

Os resultados da pesquisa relatados neste trabalho permitiram a identificação de novos derivados de piridopirimidinas postulados como uma nova e promissora classe de agentes antidiarreicos. As moléculas sintetizadas foram obtidas por uma metodologia sintética que se mostrou como uma boa estratégia para obter todos os compostos com alto rendimento e pureza. Os derivados mais notáveis foram representados pelos compostos VI e IV, com uma seletividade parcial para GMPc e AMPc, respectivamente.

Ensaio *in vitro* demonstraram que nenhum dos compostos sintetizados afetou o tônus vascular de anéis aórticos pré-contraídos quando comparado à amlodipina. Além disso, a atividade metabólica e a viabilidade celular não foram afetadas pelos compostos I-XII.

O composto VI foi então selecionado para uma visão específica *in vivo*, focada na avaliação de sua atividade antidiarreica em modelo animal. Os experimentos realizados em ligaduras de íleo de coelho evidenciaram um efeito potente do composto VI e do FPIPP.

Isso nos levou a realizar uma análise microscópica histopatológica de tecidos intestinais voltados para a avaliação da arquitetura de tecido. As imagens permitiram revelar que apenas o composto VI preserva o intestino, sem

mudanças patológicas significativas e com um padrão inflamatório diminuído em relação ao FPIPP.

Ademais, tendo em vista que as diidropiridinas são relatadas na literatura por serem convertidas por oxigênio do ar em seus correspondentes análogos de piridina, o composto VI foi investigado por sua estabilidade química e revelou-se adequado para um armazenamento prolongado em estado sólido. Este composto, portanto, foi apontado como "composto ouro" desta classe de piridopirimidinas, um andaime interessante para a geração de moléculas para possível uso como drogas antidiarreicas eficientes.

Por fim, é importante ressaltar que o mecanismo farmacodinâmico destes compostos necessita de estudos complementares para sua elucidação, o que pode impactar imensamente no avanço dos estudos com estas moléculas. Também seria interessante a realização de estudos farmacocinéticos para avaliar se há e em qual extensão uma biodisponibilidade absoluta destes compostos após administração por via oral, pois, a probabilidade de efeitos adversos sistêmicos poderia ser facilmente reduzida através de técnicas farmacotécnicas como uma formulação de liberação cólon específica e/ou controlada.

7. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; CHAUHAN, P. M. S. First Report on the Abnormal Dearylation/Alkylation Reaction in One-Pot Hantzsch Synthesis with 6-Amino-1,3-Dimethyl Uracil. **Synthetic Communications**, v. 34, n. 24, p. 4447-4461, 2004.

BAKRE, M. M.; SOPORY, S.; VISWESWARIAH, S. S. Expression and regulation of the cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human colonic epithelial cells: role in the induction of cellular refractoriness to the heat-stable enterotoxin peptide. **J Cell Biochem**, v. 77, n. 1, p. 159-67, 2000.

BAKRE, M. M.; VISWESWARIAH, S. S. Dual regulation of heat-stable enterotoxin-mediated cGMP accumulation in T84 cells by receptor desensitization and increased phosphodiesterase activity. **FEBS Lett**, v. 408, n. 3, p. 345-9, 1997.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 3, p. 488-520, 2006.

BINDER, D. et al. [Thiophene as a structural element in physiologically active substances. 15. Thiophene analogs of an anxiolytic acting 1,2,4-triazolo[4,3-b]pyridazine]. **Arch Pharm (Weinheim)**, v. 318, n. 3, p. 243-9, 1985.

CARROLL, W. A. et al. Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of tricyclic dihydropyridine-based KATP openers that potently inhibit bladder contractions in vitro. **J Med Chem**, v. 47, n. 12, p. 3180-92, 2004.

CHORDIA, P.; MACARTHUR, R. D. Crofelemer, a novel agent for treatment of non-infectious diarrhea in HIV-infected persons. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 7, n. 7, p. 591-600, 2013.

COLLABORATORS, G. B. D. D. D. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 9, p. 909-948, 2017.

CORBIN, J. D. et al. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 9, p. 2760-7, 2000.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.

DE HOSTOS, E. L.; CHOY, R. K.; NGUYEN, T. Developing novel antisecretory drugs to treat infectious diarrhea. **Future Med Chem**, v. 3, n. 10, p. 1317-25, 2011.

DREYFUS, L. A.; JASO-FRIEDMANN, L.; ROBERTSON, D. C. Characterization of the mechanism of action of Escherichia coli heat-stable enterotoxin. **Infect Immun**, v. 44, n. 2, p. 493-501, 1984.

EHRICH, M.; SHAROVA, L. In vitro methods for detecting cytotoxicity. **Curr Protoc Toxicol**, v. Chapter 2, p. Unit 2 6, 2001.

FIELD, M. et al. Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 6, p. 2800-4, 1978.

FORTE, L. R., JR. Uroguanylin and guanylin peptides: pharmacology and experimental therapeutics. **Pharmacol Ther**, v. 104, n. 2, p. 137-62, 2004.

GAZZANO, H.; WU, H. I.; WALDMAN, S. A. Activation of particulate guanylate cyclase by Escherichia coli heat-stable enterotoxin is regulated by adenine nucleotides. **Infect Immun**, v. 59, n. 4, p. 1552-7, 1991.

GUERRANT, R. L. et al. Magnitude and impact of diarrheal diseases. **Arch Med Res**, v. 33, n. 4, p. 351-5, 2002.

HANTZSCH, A. Condensationsprodukte aus Aldehydammoniak und ketonartigen Verbindungen. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 14, n. 2, p. 1637-1638, 1881.

HU, S. et al. Design, synthesis and inhibitory activities of 8-(substituted styrol-formamido)phenyl-xanthine derivatives on monoamine oxidase B. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 60, n. 3, p. 385-90, 2012.

HUGHES, J. M. et al. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. **Nature**, v. 271, n. 5647, p. 755-6, 1978.

KARCHMER, A. W. et al. Furazolidone in paediatric cholera. **Bull World Health Organ**, v. 43, n. 3, p. 373-8, 1970.

KATWA, L. C. et al. Nucleotide regulation of heat-stable enterotoxin receptor binding and of guanylate cyclase activation. **Biochem J**, v. 283 (Pt 3), p. 727-35, 1992.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ**, v. 81, n. 3, p. 197-204, 2003.

KOTS, A. Y. et al. Pyridopyrimidine derivatives as inhibitors of cyclic nucleotide synthesis: Application for treatment of diarrhea. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 24, p. 8440-5, 2008.

MAURICE, D. H. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. **Mol Pharmacol**, v. 64, n. 3, p. 533-46, 2003.

MORIN DEVEAU, A.; MACDONALD, T. L. Practical synthesis of biaryl colchicinoids containing 3',4'-catechol ether-based A-rings via Suzuki cross-coupling with ligandless palladium in water. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 4, p. 803-807, 2004.

MORRIS, S. S.; BLACK, R. E.; TOMASKOVIC, L. Predicting the distribution of under-five deaths by cause in countries without adequate vital registration systems. **Int J Epidemiol**, v. 32, n. 6, p. 1041-51, 2003.

MURDOCH, D.; HEEL, R. C. Amlodipine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in cardiovascular disease. **Drugs**, v. 41, n. 3, p. 478-505, 1991.

PARKINSON, S. J. et al. Interruption of Escherichia coli heat-stable enterotoxin-induced guanylyl cyclase signaling and associated chloride current in human intestinal cells by 2-chloroadenosine. **J Biol Chem**, v. 272, n. 2, p. 754-8, 1997.

PARKINSON, S. J.; WALDMAN, S. A. An intracellular adenine nucleotide binding site inhibits guanylyl cyclase C by a guanine nucleotide-dependent mechanism. **Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 3213-21, 1996.

POLI, G.; GIAMBASTIANI, G. An epiisopropodophyllin aza analogue via palladium-catalyzed pseudo-domino cyclization. **J Org Chem**, v. 67, n. 26, p. 9456-9, 2002.

POLSON, J. B.; STRADA, S. J. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 36, p. 403-27, 1996.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 3, p. 465-83, 2005.

RACHER, A. J.; LOOBY, D.; GRIFFITHS, J. B. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. **Cytotechnology**, v. 3, n. 3, p. 301-7, 1990.

RAM, P. K. et al. Declines in case management of diarrhoea among children less than five years old. **Bull World Health Organ**, v. 86, n. 3, p. E-F, 2008.

RANDALL, C. et al. Current and emerging strategies in the management of Crohn's disease. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 26, n. 5, p. 601-10, 2012.

SCHULZ, S. et al. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. **Cell**, v. 63, n. 5, p. 941-8, 1990.

SIGMAN, M.; LUCHETTE, F. A. Cholera: something old, something new. **Surg Infect (Larchmt)**, v. 13, n. 4, p. 216-22, 2012.

TANIFUM, E. A. et al. Novel pyridopyrimidine derivatives as inhibitors of stable toxin a (STa) induced cGMP synthesis. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, n. 11, p. 3067-71, 2009.

TOROPOV, A. A. et al. QSAR models for inhibitors of physiological impact of Escherichia coli that leads to diarrhea. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 432, n. 2, p. 214-25, 2013.

VAANDRAGER, A. B. Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. **Mol Cell Biochem**, v. 230, n. 1-2, p. 73-83, 2002.

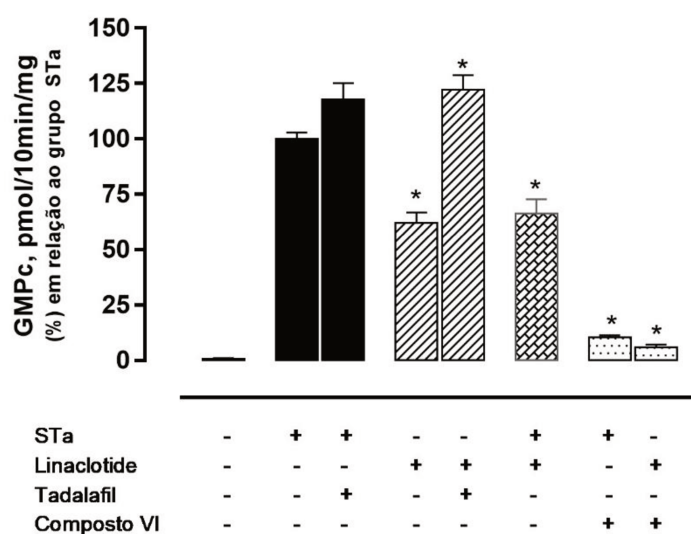
VAANDRAGER, A. B.; VAN DER WIEL, E.; DE JONGE, H. R. Heat-stable enterotoxin activation of immunopurified guanylyl cyclase C. Modulation by adenine nucleotides. **J Biol Chem**, v. 268, n. 26, p. 19598-603, 1993.

VANELLE, P. et al. **An original way for synthesis of new nitro-benzothiadiazole derivatives.** 1997. 955-962.

VICTORA, C. G. et al. Reducing deaths from diarrhoea through oral rehydration therapy. **Bull World Health Organ**, v. 78, n. 10, p. 1246-55, 2000.

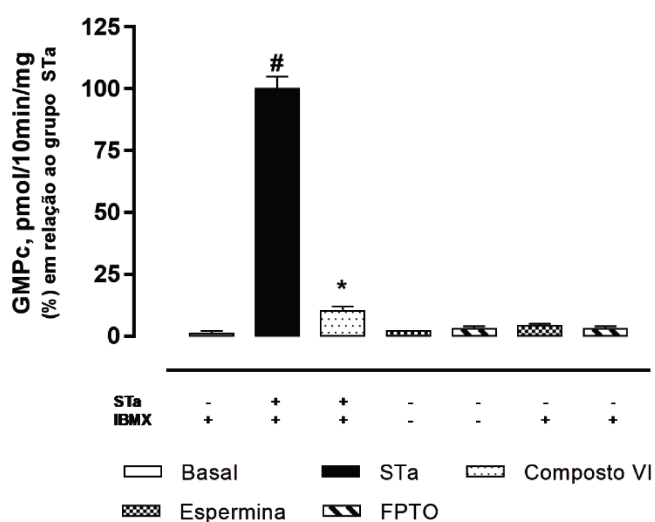
8. APÊNDICES

8.1. Avaliação da resposta celular ao estímulo do agonista Linacлотide



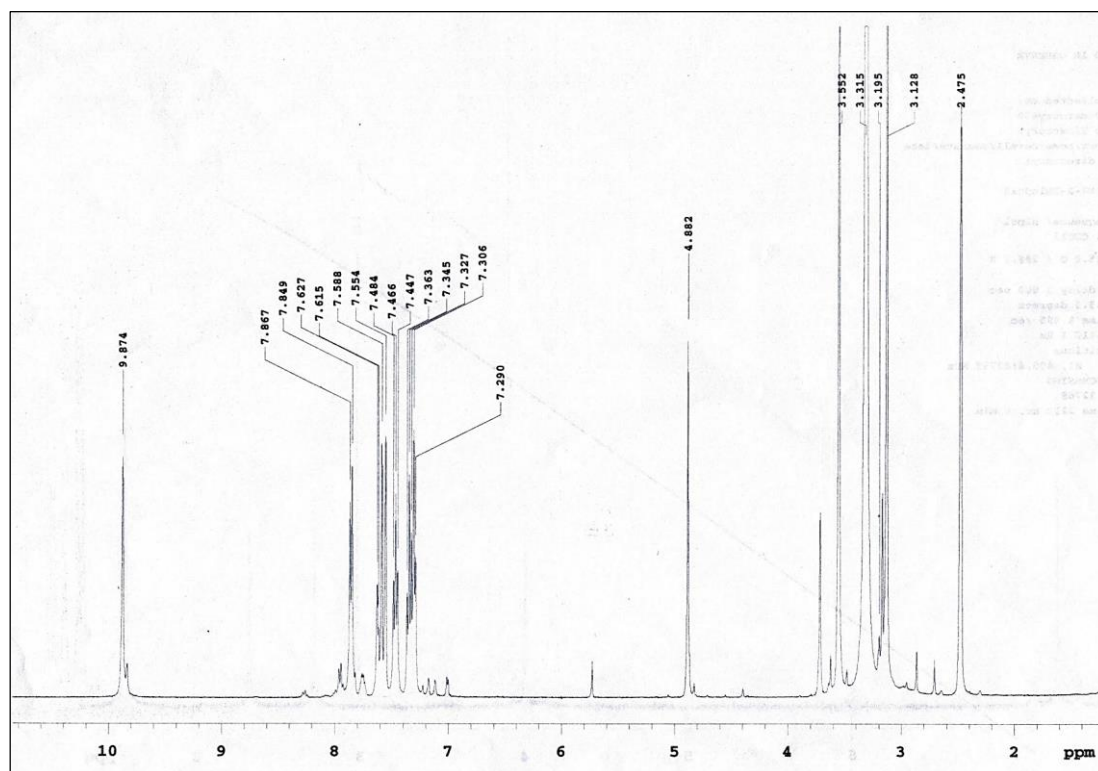
Apêndice 1. Avaliação da resposta celular (células T84) ao estímulo do agonista Linacлотide. Os resultados são apresentados como média + EPM. n= 3. One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey; * p<0.05 em comparação com o grupo STa.

8.2. Avaliação da resposta celular ao estímulo de doador de Óxido Nítrico e ativador da GC solúvel

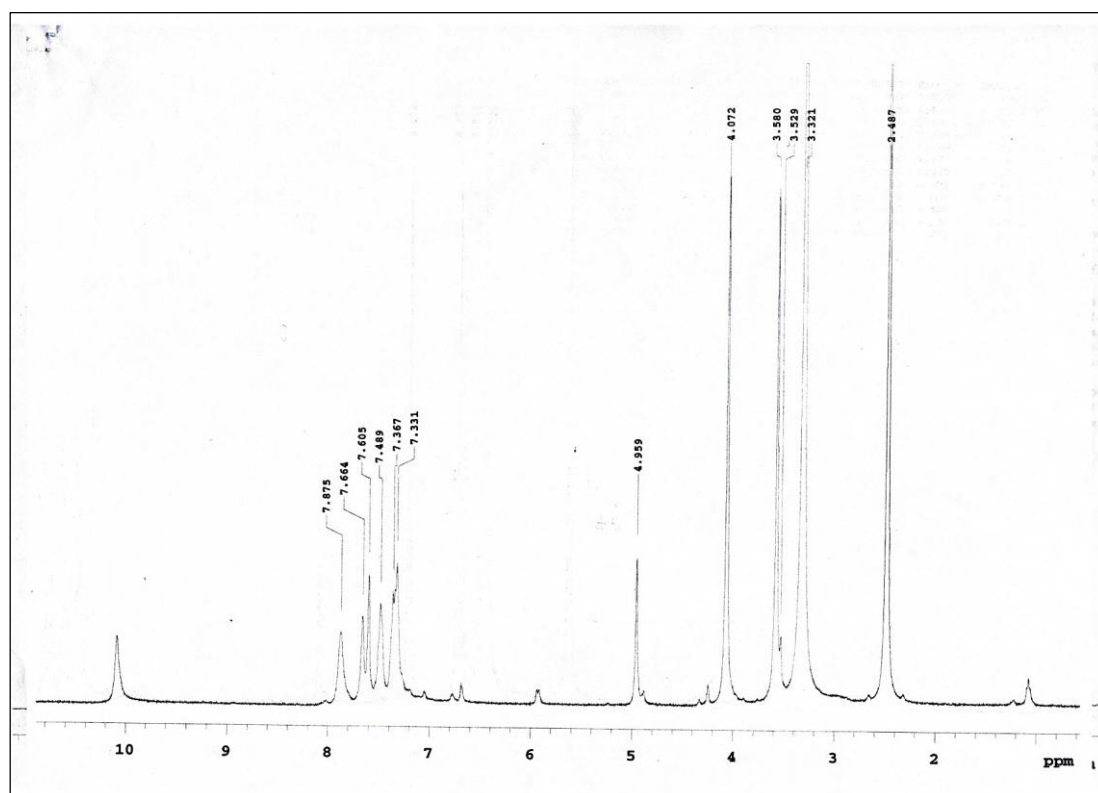


Apêndice 2. Efeito de doador de Óxido Nítrico (espermina) e ativador da GC solúvel (FPTO) no acúmulo de GMPC em células T84. Os resultados são apresentados como média + EPM. n= 3. One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey; * p<0.05 em comparação com o grupo STa.

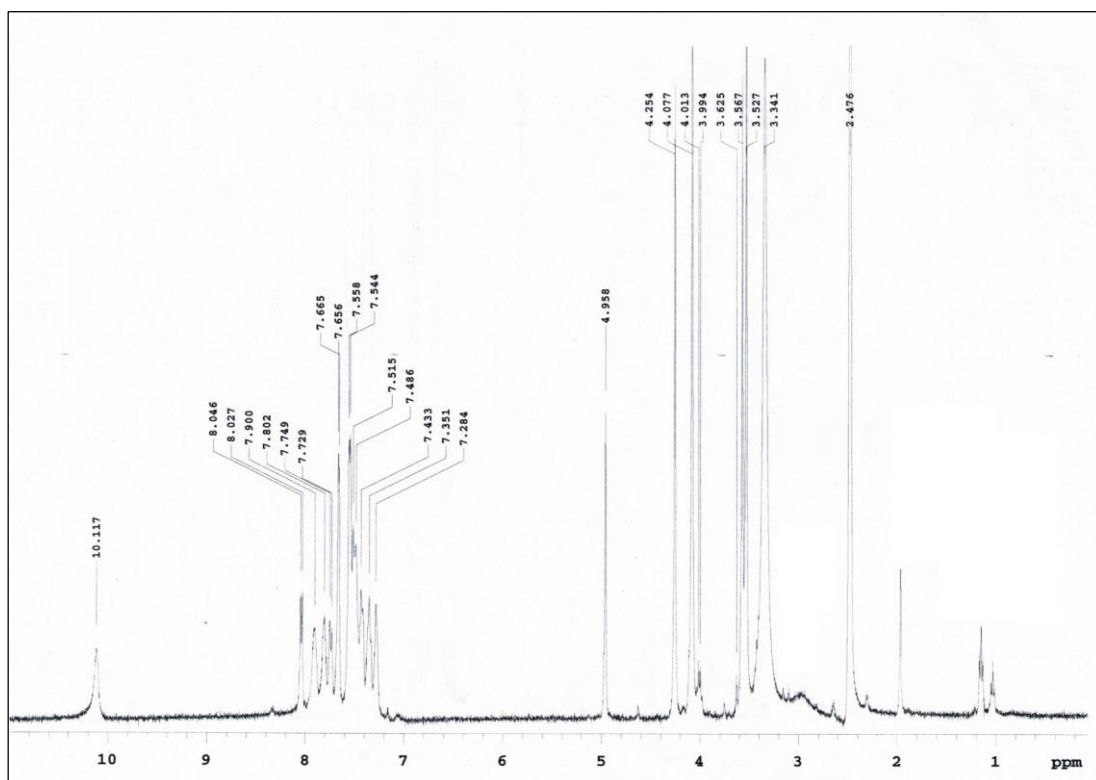
8.3. Espectrogramas dos compostos I-XII



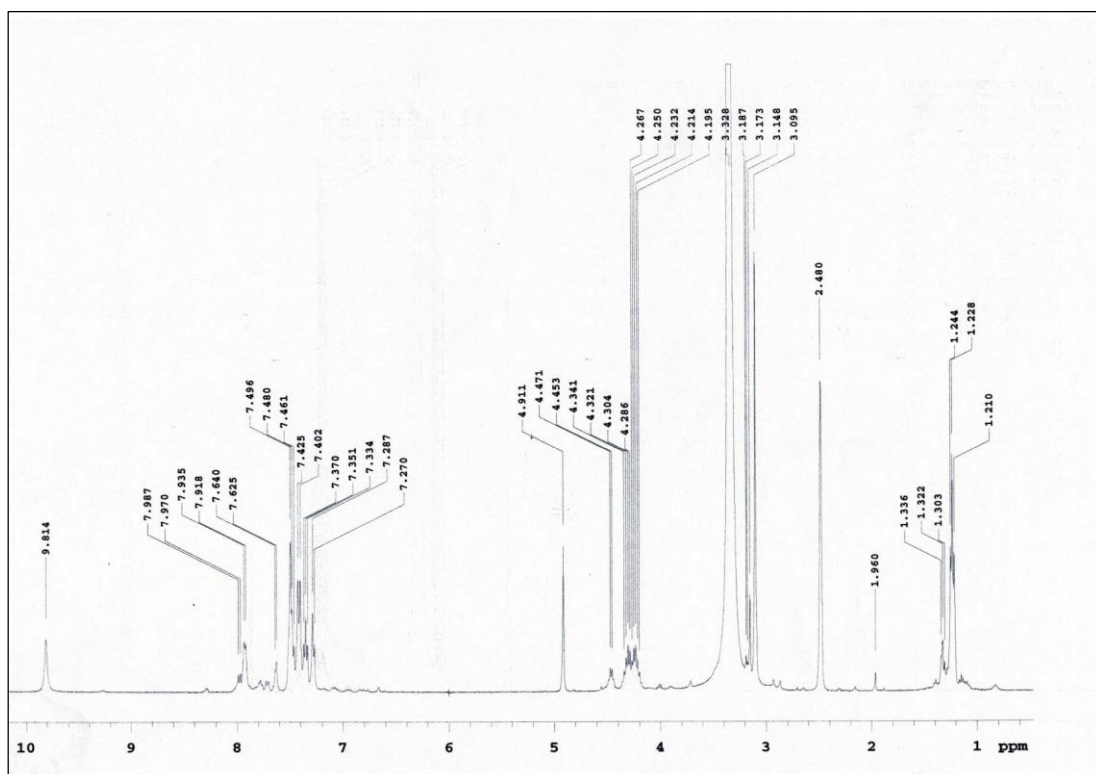
Apêndice 3. Representação do espectrograma (RMN) do composto I.



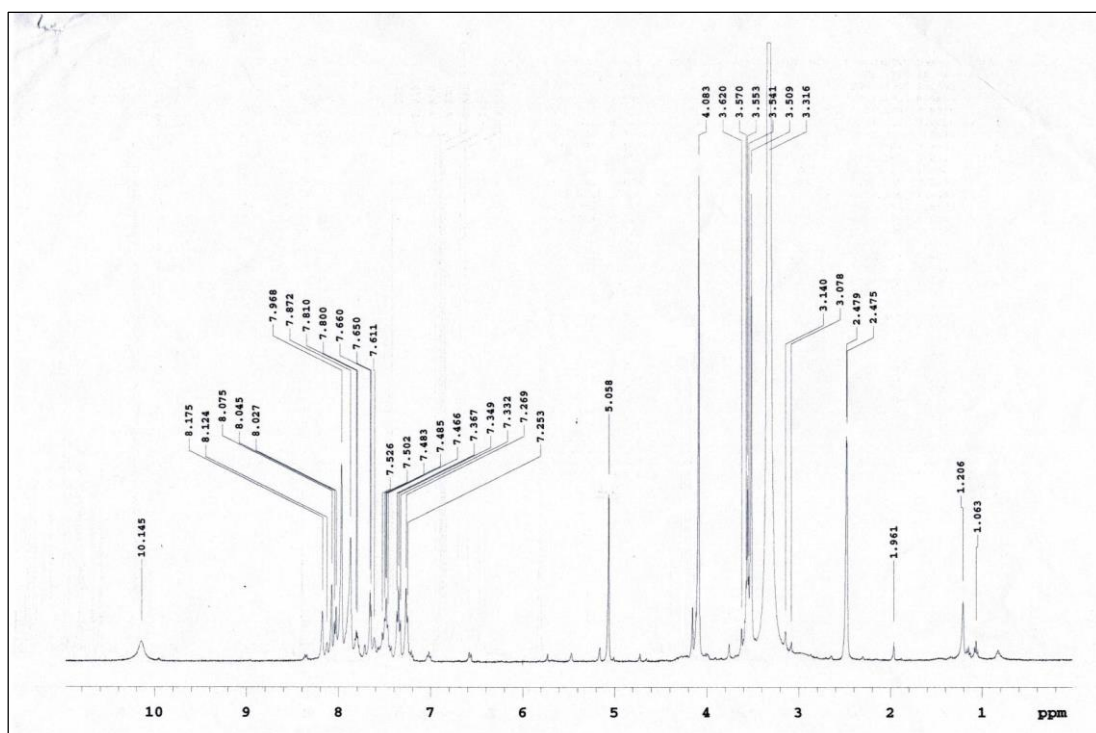
Apêndice 4. Representação do espectrograma (RMN) do composto II.



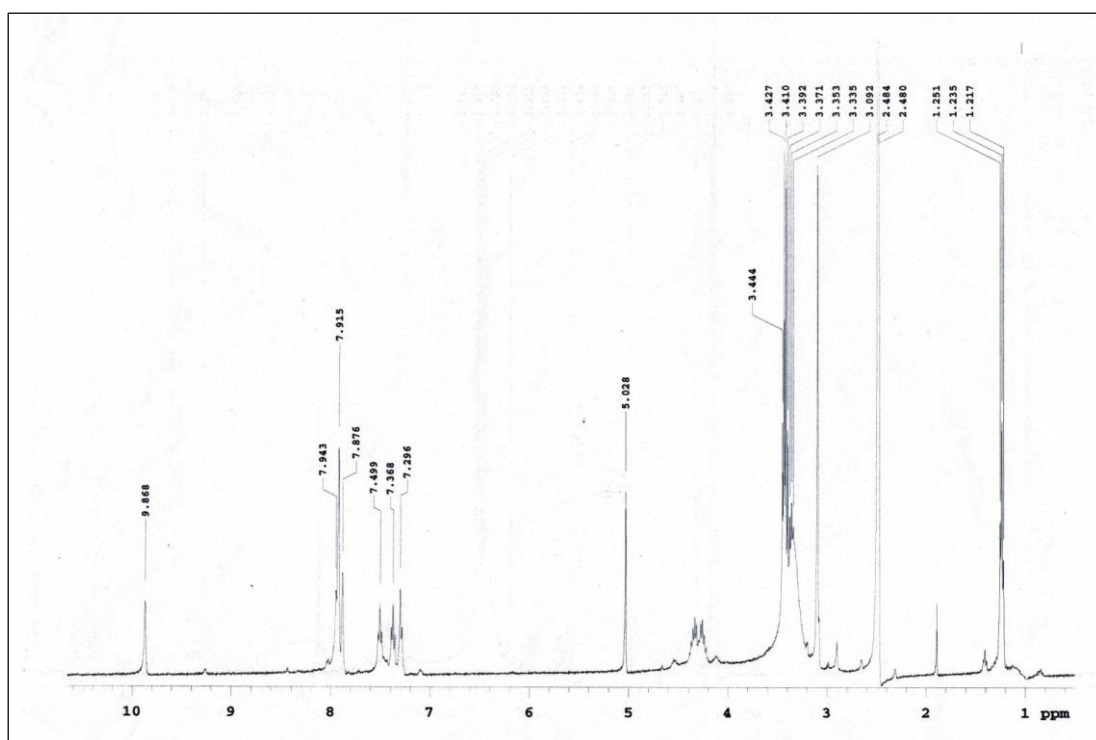
Apêndice 5. Representação do espectrograma (RMN) do composto III.



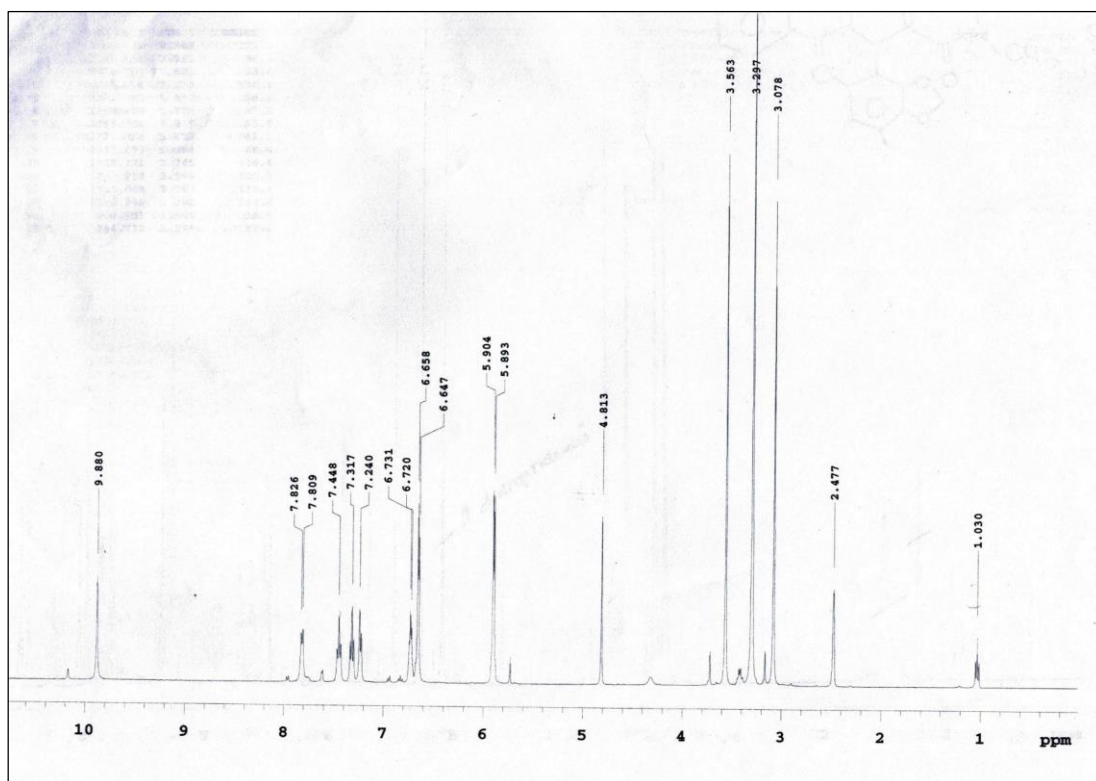
Apêndice 6. Representação do espectrograma (RMN) do composto IV.



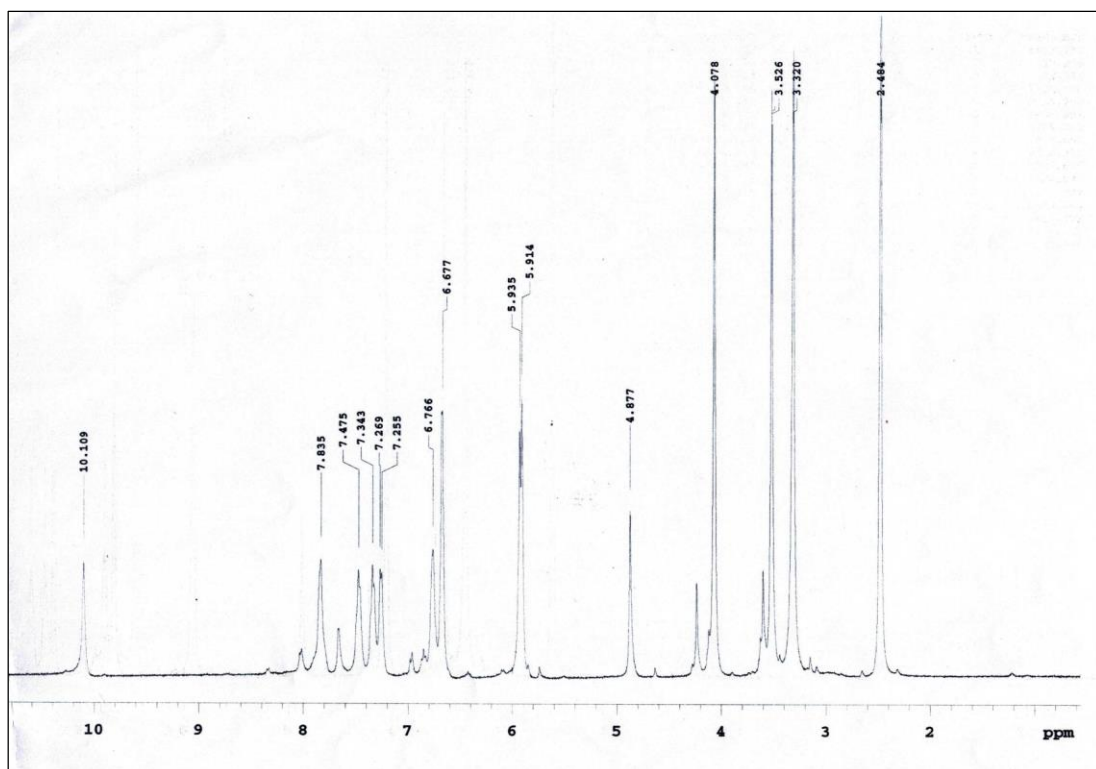
Apêndice 7. Representação do espectrograma (RMN) do composto V.



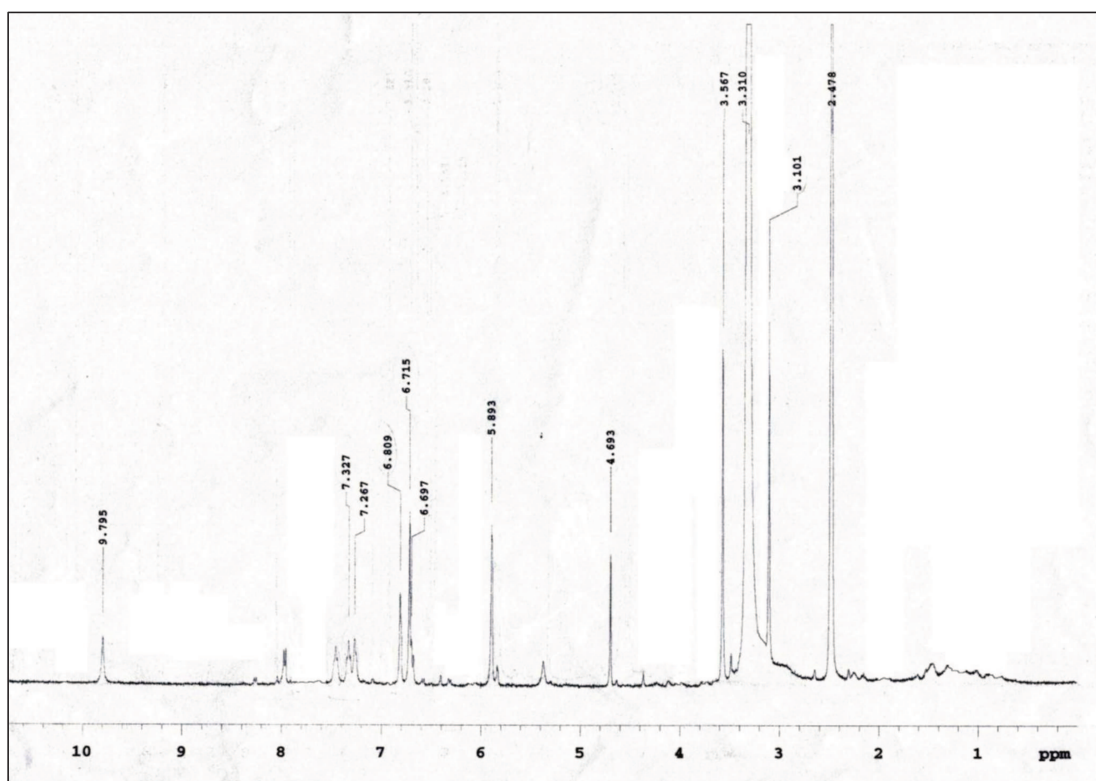
Apêndice 8. Representação do espectrograma (RMN) do composto VI.



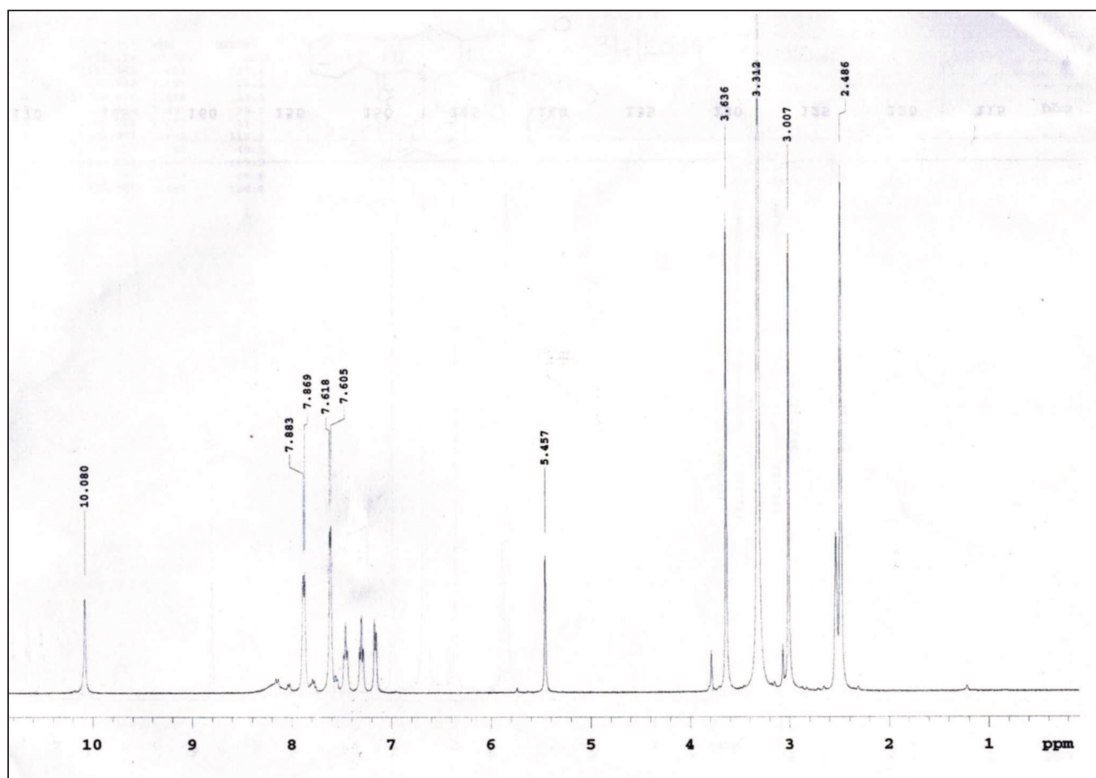
Apêndice 9. Representação do espectrograma (RMN) do composto VII.



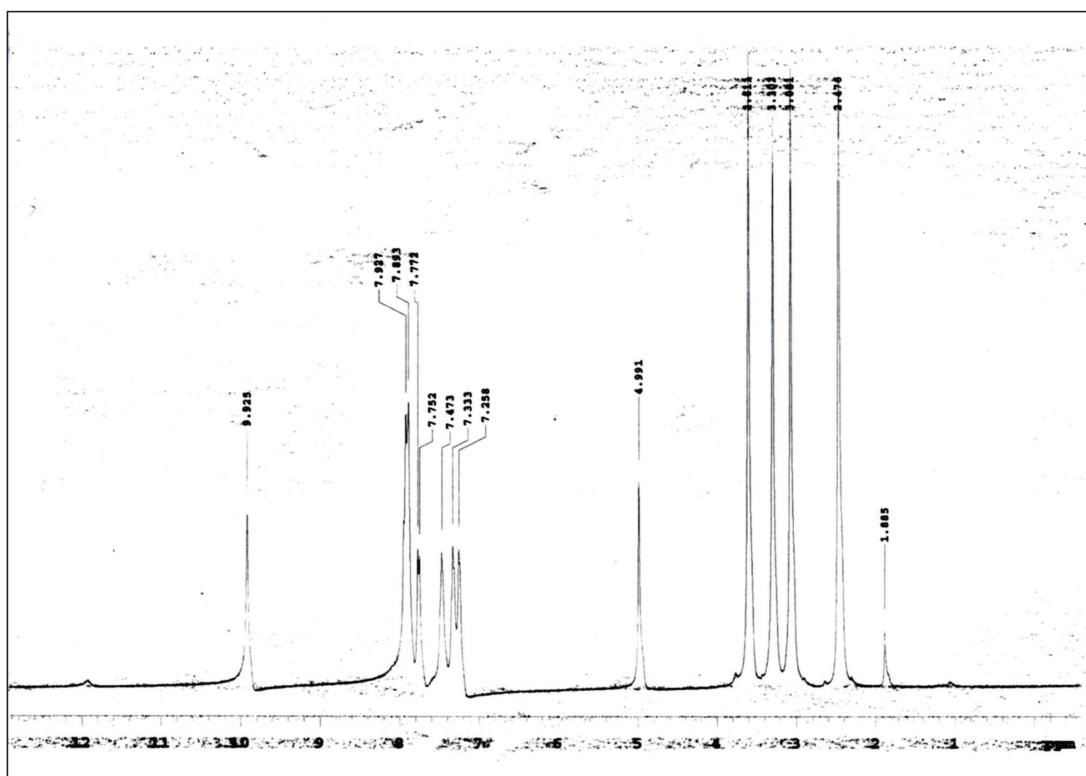
Apêndice 10. Representação do espectrograma (RMN) do composto VIII.



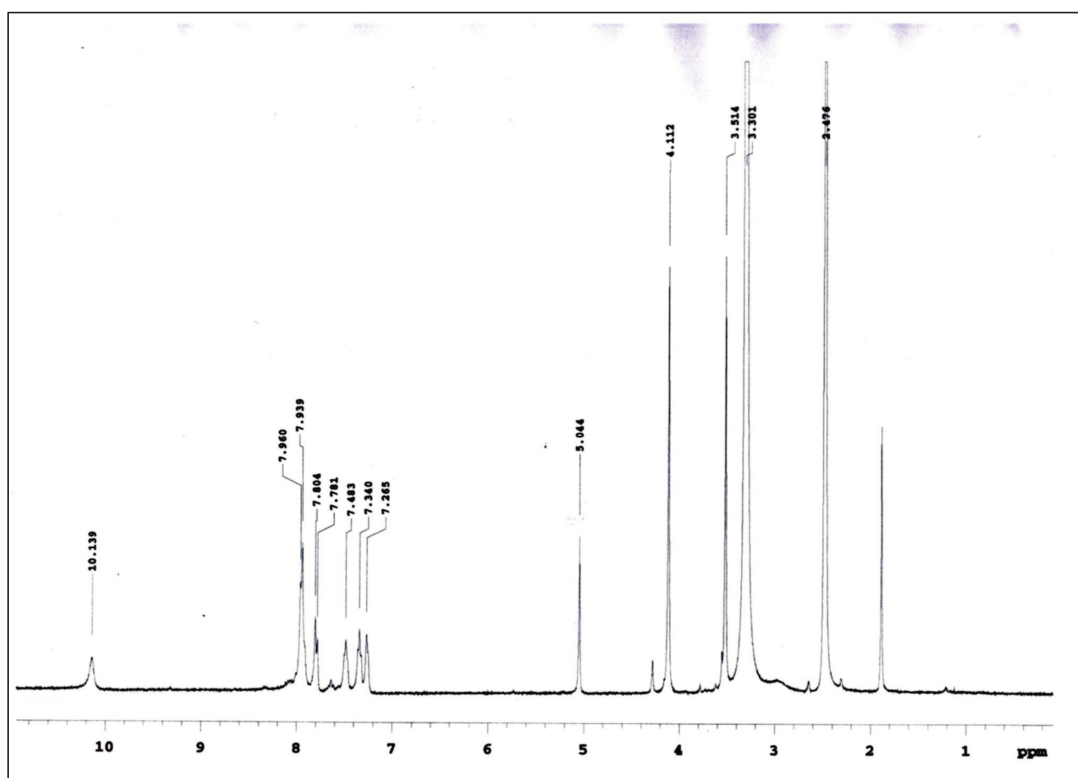
Apêndice 11. Representação do espectrograma (RMN) do composto IX.



Apêndice 12. Representação do espectrograma (RMN) do composto X.



Apêndice 13. Representação do espectrograma (RMN) do composto XI.



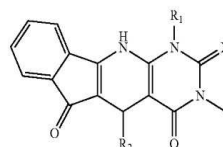
Apêndice 14. Representação do espectrograma (RMN) do composto XII.

9. ANEXOS

9.1. Registro de patente dos compostos



US 20160075702A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2016/0075702 A1**
De Nucci (43) **Pub. Date: Mar. 17, 2016**(54) **NEW PYRIDOPYRIMIDINES DERIVATIVES
COMPOUNDS**(71) Applicant: **BIOLAB SANUS FARMACEUTICA
LTDA**, Taboao da Serra (BR)(72) Inventor: **Gilberto De Nucci**, Sao Paulo (BR)(21) Appl. No.: **14/851,072**(22) Filed: **Sep. 11, 2015****Related U.S. Application Data**(60) Provisional application No. 62/049,506, filed on Sep.
12, 2014.**Publication Classification**(51) **Int. Cl.**
C07D 471/04 (2006.01)(52) **U.S. Cl.**
CPC **C07D 471/04** (2013.01)(57) **ABSTRACT**The present invention describes new pyridopyrimidine
derivatives compounds with structure represented by General
Formula (I):

General Formula (I)

or pharmaceutically acceptable salts thereof, or their mix-
tures (in any ratio), a pharmaceutical composition containing
them, a method for using the new pyridopyrimidine deriva-
tives compounds as inhibitor of the cyclic nucleotide synthe-
sis or as inhibitor of the cAMP and cGMP synthesis, and their
uses in the prophylactic and/or curative treatment of diarrhea,
colitis and irritable bowel syndrome.

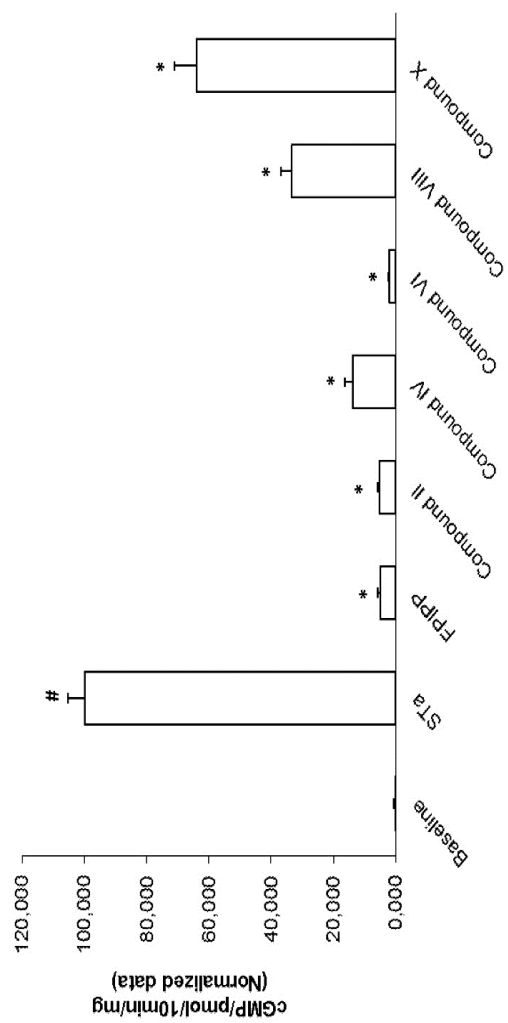


Figure 1

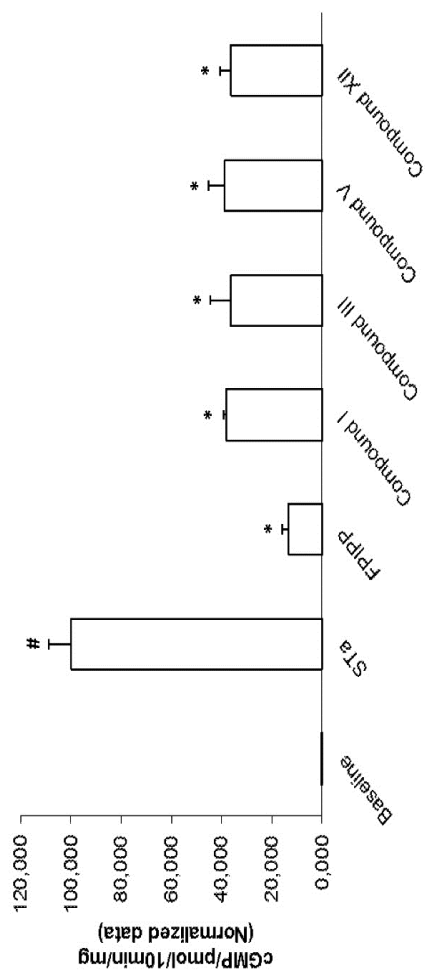


Figure 2

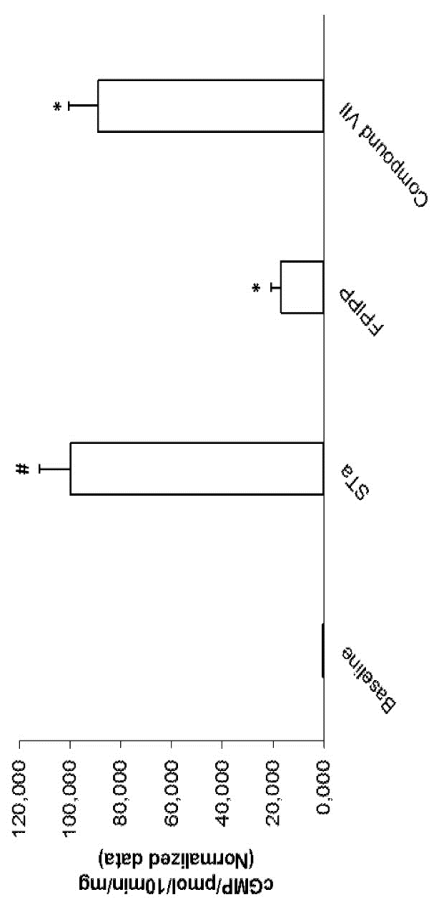


Figure 3

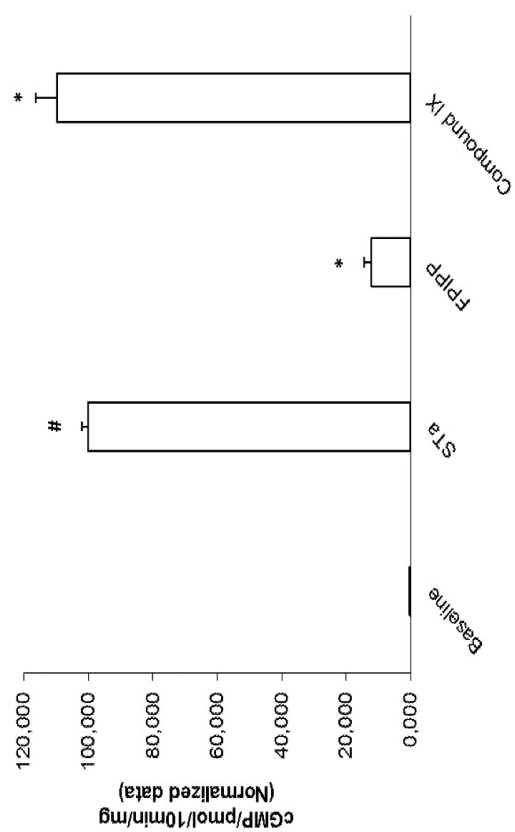


Figure 4

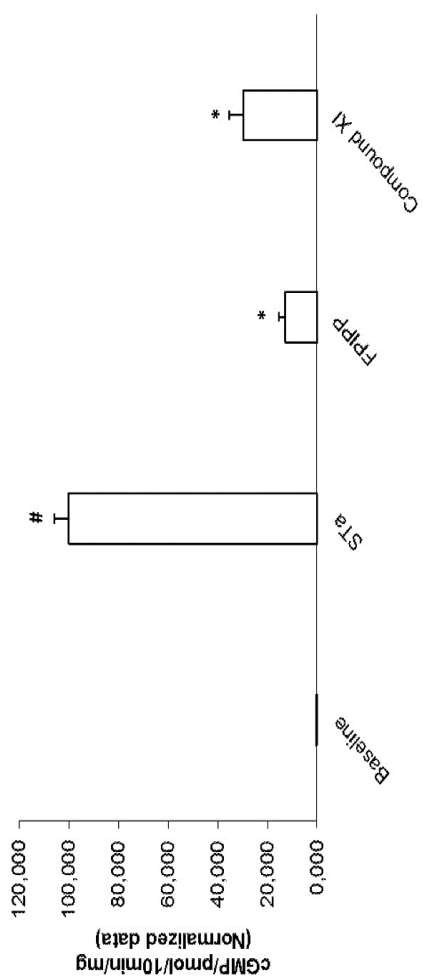


Figure 5

US 2016/0075702 A1

Mar. 17, 2016

1

NEW PYRIDOPYRIMIDINES DERIVATIVES COMPOUNDS

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention describes new pyridopyrimidine derivatives compounds, or pharmaceutically acceptable salts thereof, or their mixtures (in any ratio), a pharmaceutical composition containing them, a method for using the new pyridopyrimidine derivatives compounds as inhibitor of the cyclic nucleotide synthesis, a method for using the new pyridopyrimidine derivatives compounds as inhibitor of the cAMP and cGMP synthesis, and their uses in the prophylactic and/or curative treatment of diarrhea, colitis and irritable bowel syndrome.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] According to the United Nations Children's Fund (UNICEF) and the World Health Organization (WHO), diarrhea disease is the second leading cause of death and a main cause of malnutrition in children under five years old. A significant proportion of diarrhea disease can be prevented through safe drinking-water and adequate sanitation and hygiene.

[0003] Diarrhea is characterized by an increase in the frequency of bowel movements compared to normal bowel movement or a decrease in the formation of a stool. Although changes in frequency of bowel movements and looseness of stools can vary independently of each other, changes often occur in both.

[0004] In most cases, diarrhea signs and symptoms usually last a couple of days. But sometimes diarrhea can last for weeks. In these situations, diarrhea can be a sign of a serious disorder, such as inflammatory bowel disease, or a less serious condition, such as irritable bowel syndrome.

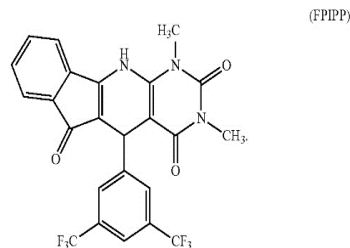
[0005] Diarrhea can be an infectious bacterial or viral disorder caused by parasites. The diarrhea may also be a non-infectious diarrhea caused by food poisoning, food additives, food allergies, malabsorption syndromes (like gluten or lactose intolerance), antibiotic therapies, diseases of the intestines (Crohn's disease, ulcerative colitis), etc. Typical treatment is to give fluids to prevent dehydration and continued feeding while administering drugs for the underlying cause.

[0006] In cases of infectious disorder caused by bacteria, the pathogenic mechanisms of *Escherichia coli* (a gram-negative bacteria), that induced diarrhea, probably involves secretion of a heat stable toxin (STa).

[0007] Thus, the present inventor's efforts to develop new pyridopyrimidine derivative compounds inhibitors of cyclic nucleotide synthesis caused by stable toxin of *Escherichia coli* (STa). The STa induces diarrhea when it binds to intestinal epithelial cell membrane receptor, guanylyl cyclase type C (GC-C). This activates the enzyme to convert guanosine triphosphate (GTP) to cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP), causing intracellular levels of cGMP to spike. This in turn induces activation of a cGMP-dependent protein kinase and chloride-ion channel, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Activation of CFTR triggers the flux of chloride ions into the intestinal lumen and the accumulation of water and sodium ions, thus causing diarrhea.

[0008] International Publication No. WO 2008/008704 describes inhibitors of cyclic nucleotide synthesis and their use for therapy of various diseases.

[0009] Another class of inhibitor of the cAMP and cGMP synthesis and inhibitor of cyclic nucleotide synthesis is described in the publication by TANIFUM [E. A. TANIFUM et al., "Novel pyridopyrimidine derivatives as inhibitors of stable toxin a (STa) induced cGMP synthesis". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19:3067-3071]. According to this publication, one of the best compounds identified was Compound 24 (FPIPP), with the following structural form:

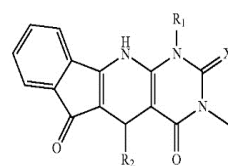


[0010] Also according to TANIFUM [E. A. TANIFUM et al., "Novel pyridopyrimidine derivatives as inhibitors of stable toxin a (STa) induced cGMP synthesis". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19:3067-3071], the development of drugs that are effective against the physiological mechanisms that cause the imbalance of fluids in the intestine would be a significant addition in therapeutic arsenal.

[0011] Based on the above, the inventor of the present invention developed new compounds, new derivatives of pyridopyrimidine, that can be used in treatment, prevention or amelioration of symptoms of diarrhea.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0012] The main objective of the present invention is to provide new pyridopyrimidine derivative compounds with a structure represented by General Formula (I):



General Formula (I)

or pharmaceutically acceptable salts thereof, or their mixtures (in any ratio), a pharmaceutical composition containing them, a method for using the new pyridopyrimidine derivatives compounds as inhibitor of the cyclic nucleotide synthesis, a method for using the new pyridopyrimidine derivatives compounds as inhibitor of the cAMP and cGMP synthesis, and their uses in the prophylactic and/or curative treatment of diarrhea, colitis and irritable bowel syndrome.

US 2016/0075702 A1

Mar. 17, 2016

2

[0013] In some aspects, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising as active ingredient an effective amount of the new pyridopyrimidine derivative compounds, or pharmaceutically acceptable salts thereof, or their mixtures (in any ratio), and pharmaceutically acceptable excipients.

[0014] Another objective of the present invention is the use of the new pyridopyrimidine derivative compounds, their pharmaceutically acceptable salts or mixtures thereof (in any ratio), for inhibiting the cyclic nucleotide synthesis. Furthermore, it is the objective of the present invention the use of one of the new pyridopyrimidine derivative compounds, their pharmaceutically acceptable salts or mixtures thereof (in any ratio), for inhibiting the cAMP and cGMP synthesis.

[0015] It is also the objective of the present invention the use of one of the new pyridopyrimidine derivative compounds, their pharmaceutically acceptable salts or mixtures thereof (in any ratio), in the prophylactic and/or curative treatment of diarrhea, colitis and irritable bowel syndrome.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0016] FIG. 1: Effect of Compounds II, IV, VI, VIII and X on cGMP accumulation induced by STa (1 μ M) in T₈₄ cells.

[0017] FIG. 2: Effect of Compounds I, III, V and XII on cGMP accumulation induced by STa (1 μ M) in T₈₄ cells.

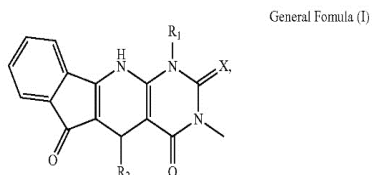
[0018] FIG. 3: Effect of Compound VII on cGMP accumulation induced by STa (1 μ M) in T₈₄ cells.

[0019] FIG. 4: Effect of Compound IX on cGMP accumulation induced by STa (1 μ M) in T₈₄ cells.

[0020] FIG. 5: Effect of Compound XI on cGMP accumulation induced by STa (1 μ M) in T₈₄ cells.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0021] The present invention describes new pyridopyrimidine derivative compounds with a structure represented by General Formula (I):



or pharmaceutically acceptable salts thereof, or their mixtures (in any ratio), wherein:

[0022] R₁ is selected from the group consisting of C₁₋₆ alkyl, amino C₁₋₆ alkyl, dimethylamino C₁₋₆ alkyl, halo C₁₋₆ alkyl, guanidino C₁₋₆ alkyl, and mercapto C₁₋₆ alkyl;

[0023] R₂ is selected from the group consisting of 4-(trifluoromethyl)thiophene, 3-fluoro-5-trifluoromethylphenyl, 3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl, 1,3-benzodioxol-4-yl, 1,3-benzodioxol-5-yl, 2,1,3-benzothiadiazol-4-yl, 2,1,3-benzothiadiazol-5-yl, and substituted aryl wherein the substituent is selected from the group consisting of C₁₋₆ alkoxy, halogen, C₁₋₆ heteroalkyl or C₂₋₆ heteroalkenyl; and

[0024] X is selected from the group consisting of, S and Se.

[0025] As used above, and throughout this disclosure, the following terms, unless otherwise indicated, shall be understood to have the following meanings:

[0026] The term “alkyl” represents straight, branched or cyclic alkyl chains, for example, the C₁₋₆ alkyl group can be methyl, ethyl, propyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, iso-butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, etc.

[0027] The term “alkenyl” includes alkenyl groups of straight, branched or cyclic chains, such as, allyl, benzyl, vinyl, styryl, indolyl, etc. The term “acylamino” represents any acyl derivative of an amino group, such as acetamido, benzamido, etc.

[0028] The term “aryl” refers to any functional group or substituent derived from an aromatic ring, for example, phenyl, naphthyl, thienyl, indolyl, etc.

[0029] The term “halogen or halo” represents atoms of fluorine, chlorine, bromine or iodine.

[0030] The term “patient” is a human or non-human mammal. In one embodiment, a patient is a human. In another embodiment, a patient is a non-human mammal, including, but not limited to, a monkey, dog, cat, baboon, rhesus, mouse, rat, horse, rabbit, cow, etc.

[0031] The term “effective amount” as used herein, refers to an amount of a new pyridopyrimidine derivatives compounds, or a pharmaceutical composition thereof that is effective in producing the desired therapeutic, ameliorative, inhibitory or preventive effect when administered to a patient suffering from a condition.

[0032] In a preferred embodiment, the compounds of this invention have a structure represented in General Formula (I), or pharmaceutically acceptable salts thereof, or their mixtures (in any ratio), wherein:

[0033] R₁ is a C₁₋₆ alkyl selected from the group consisting of methyl, ethyl, propyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, iso-butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, and hexyl;

[0034] R₂ is selected from the group consisting of: 4-(trifluoromethyl)thiophene, 3-fluoro-5-trifluoromethylphenyl, 3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl, 1,3-benzodioxol-4-yl, 1,3-benzodioxol-5-yl, 2,1,3-benzothiadiazol-4-yl, and 2,1,3-benzothiadiazol-5-yl; and

[0035] X represents O or S.

[0036] In a more preferred embodiment, the compounds of this invention have a structure represented in General Formula (I), or pharmaceutically acceptable salts thereof, or their mixtures (in any ratio), wherein:

[0037] R₁ is methyl or ethyl;

[0038] R₂ is selected from the group consisting of: 4-(trifluoromethyl)thiophene, 3-fluoro-5-trifluoromethylphenyl, 3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl, 1,3-benzodioxol-4-yl, 1,3-benzodioxol-5-yl, 2,1,3-benzothiadiazol-4-yl, and 2,1,3-benzothiadiazol-5-yl; and

[0039] X is O or S.

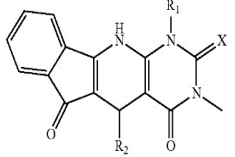
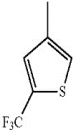
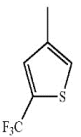
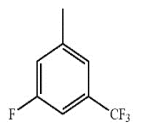
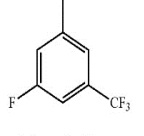
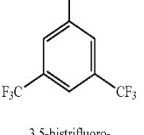
[0040] In particular, preferred compounds are the compounds of General formula (I) described in the examples as individual compounds, as well as pharmaceutically acceptable salts thereof. Preferred substituents are those of the specific examples described in TABLE 1.

US 2016/0075702 A1

3

Mar. 17, 2016

TABLE 1

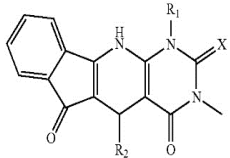
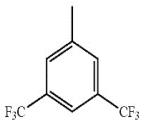
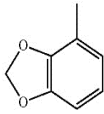
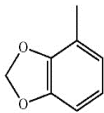
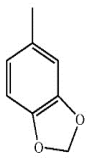
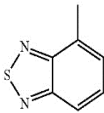
General Formula (I)						
						
Structure Data						
Comp.	R ₁	R ₂	X	Formula	m.p.	Mol Wt
I	Methyl	 4-(trifluoromethyl) thiophene	O	C ₂₁ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₃ S	265° C.	445.07
II	Methyl	 4-(trifluoromethyl) thiophene	S	C ₂₁ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ S ₂	178° C.	461.05
III	Methyl	 3-fluoro-5-trifluoro- methylphenyl	S	C ₂₃ H ₁₃ F ₄ N ₃ O ₂ S	313° C.	473.08
IV	Ethyl	 3-fluoro-5-trifluoro- methylphenyl	O	C ₂₄ H ₁₇ F ₄ N ₃ O ₃	177° C.	471.12
V	Methyl	 3,5-bis(trifluoro- methyl)phenyl	S	C ₂₄ H ₁₅ F ₆ N ₃ O ₂ S	314° C.	523.08

US 2016/0075702 A1

4

Mar. 17, 2016

TABLE 1-continued

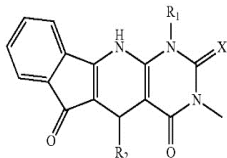
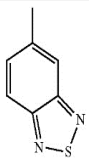
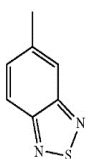
General Formula (I)						
						
Structure Data						
Comp.	R ₁	R ₂	X	Formula	m.p.	Mol Wt
VI	Ethyl	 3,5-bis(trifluoro- methyl)phenyl	O	C ₂₅ H ₁₇ F ₆ N ₃ O ₃	166° C.	521.12
VII	Methyl	 1,3-benzodioxol-4-yl	O	C ₂₃ H ₁₇ N ₃ O ₃	300° C.	415.12
VIII	Methyl	 1,3-benzodioxol-4-yl	S	C ₂₃ H ₁₇ N ₃ O ₂ S	310° C.	431.09
IX	Methyl	 1,3-benzodioxol-5-yl	O	C ₂₃ H ₁₇ N ₃ O ₃	338° C.	415.12
X	Methyl	 2,1,3-benzothia- diazol-4-yl	O	C ₂₂ H ₁₅ N ₃ O ₃ S	331° C.	429.09

US 2016/0075702 A1

5

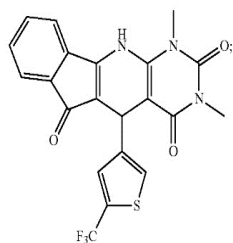
Mar. 17, 2016

TABLE 1-continued

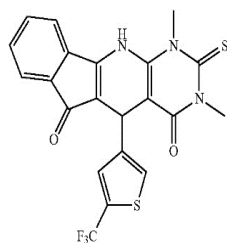
General Formula (I)						
						
Structure Data						
Comp.	R ₁	R ₂	X	Formula	m.p.	Mol Wt
XI	Methyl		O	C ₂₂ H ₁₅ N ₃ O ₃ S	358° C.	429.09
XII	Methyl	2,1,3-benzothia- diazol-5-yl  2,1,3-benzothia- diazol-5-yl	S	C ₂₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S ₂	362° C.	445.07

[0041] Preferred compounds of General formula (I) are those selected from the group consisting of:

[0042] Compound (5-(4-trifluoromethylthiophen)-1,3-dimethyl-5,11-dihydro-1H-indeno-[2',1':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6-trione, which Chemical Structure is:



[0043] Compound 5-(4-trifluoromethylthiophen)-1,3-dimethyl-5,11-dihydro-1H-indeno-[2',1':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2-thioxo-4,6-dione, which Chemical Structure is:

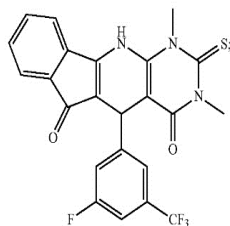


US 2016/0075702 A1

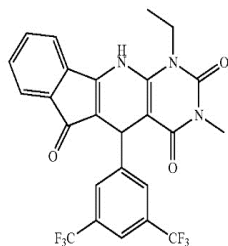
Mar. 17, 2016

6

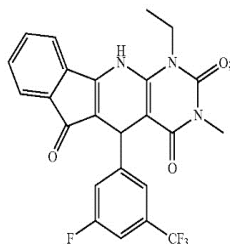
[0044] Compound III: 5-(3-fluoro-5-trifluoromethylphenyl)-1,3-dimethyl-5,11-dihydro-1H-indeno-[2',1':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2-thioxo-4,6-dione, which Chemical Structure is:



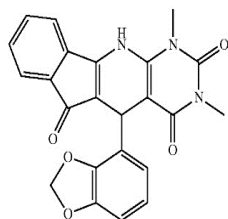
[0047] Compound VI: 5-(3,5-bistrifluoromethylphenyl)-1-ethyl-3-methyl-5,11-dihydro-1H-indeno-[2',1':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6-trione, which Chemical Structure is:



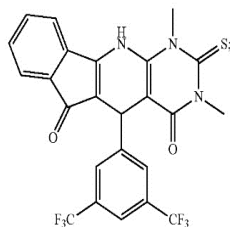
[0045] Compound IV: 5-(3-fluoro-5-trifluoromethylphenyl)-1-ethyl-3-methyl-5,11-dihydro-1H-indeno-[2',1':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6-trione



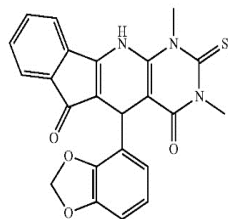
[0048] Compound VII: 5-(1,3-benzodioxol-4-yl)-1,3-dimethyl-5,11-dihydro-1H-indeno-[2',1':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6-trione, which Chemical Structure is:



[0046] Compound V: 5-(3,5-bistrifluoromethylphenyl)-1,3-dimethyl-5,11-dihydro-1H-indeno-[2',1':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2-thioxo-4,6-dione, which Chemical Structure is:



[0049] Compound VIII: 5-(1,3-benzodioxol-4-yl)-1,3-dimethyl-5,11-dihydro-1H-indeno-[2',1':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2-thioxo-4,6-dione, which Chemical Structure is:

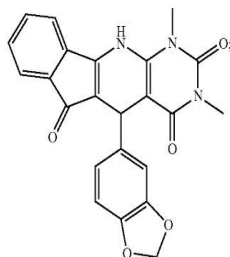


US 2016/0075702 A1

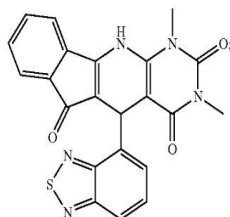
Mar. 17, 2016

7

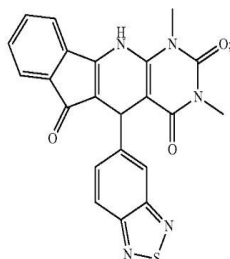
[0050] Compound IX: 5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1,3-dimethyl-5,11-dihydro-1H-indeno-[2',1':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6-trione, which Chemical Structure is:



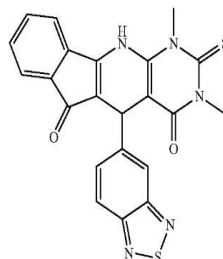
[0051] Compound X: 5-(2,1,3-benzothiadiazol-4-yl)-1,3-dimethyl-5,11-dihydro-1H-indeno-[2',1':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6-trione, which Chemical Structure is:



[0052] Compound XI: 5-(2,1,3-benzothiadiazol-5-yl)-1,3-dimethyl-5,11-dihydro-1H-indeno-[2',1':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4,6-trione, which Chemical Structure is:



[0053] Compound XII: 5-(2,1,3-benzothiadiazol-5-yl)-1,3-dimethyl-5,11-dihydro-1H-indeno-[2',1':5,6]pyrido[2,3-d]pyrimidine-2-thioxo-4,6-dione, which Chemical Structure is:



and pharmaceutically acceptable salts thereof.

[0054] The new pyridopyrimidine derivative compounds can form pharmaceutically acceptable salts which are also within the scope of the present invention.

[0055] Examples of pharmaceutically acceptable salts of the General Formula (I) compound of the present invention are salts with mineral acids such as hydrochloric acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid, hydrofluoric acid, hydrobromic acid, and the like, salts with organic acids such as formic acid, acetic acid, tartaric acid, lactic acid, citric acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, benzenesulfonic acid, toluenesulfonic acid, naphthalenesulfonic acid, camphorsulfonic acid, and the like, and salts with alkali metal or alkali earth metals such as sodium, potassium, calcium, and the like.

[0056] The new pyridopyrimidine derivatives compounds, according to the invention, can be prepared by the following General Synthetic Route.

General Synthetic Route

Materials and Methods

[0057] 5-(trifluoromethyl)thiophene-3-carbaldehyde was purchased from Aurora Building Blocks, 1-ethyl-3-methylurea was purchased from AKos Building Blocks and all the other commercial products have been purchased from Sigma Aldrich. All the reactions have been followed by TLC (Thin Layer Chromatography), carried out on Merck silica gel 60 F254 plates with fluorescent indicator and the plates have been visualized with UV light (254 nm). Preparative chromatographic purifications have been performed using silica gel column (Kieselgel 60). Solutions have been concentrated with a Büchi rotary evaporator at low pressure. Melting points, determined using a Büchi Melting Point B-540 instrument, are uncorrected and represent values obtained on recrystallized or chromatographically purified material. Molecular weights of intermediates and final compounds have been assessed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS) performed on an API 2000 Applied Biosystems mass spectrometer. The ¹H-NMR spectra have been recorded on a Varian Mercury Plus 400 MHz instrument. All spectra have been recorded in DMSO-d₆. The following abbreviations are used to describe peak patterns when appropriate: s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet).

US 2016/0075702 A1

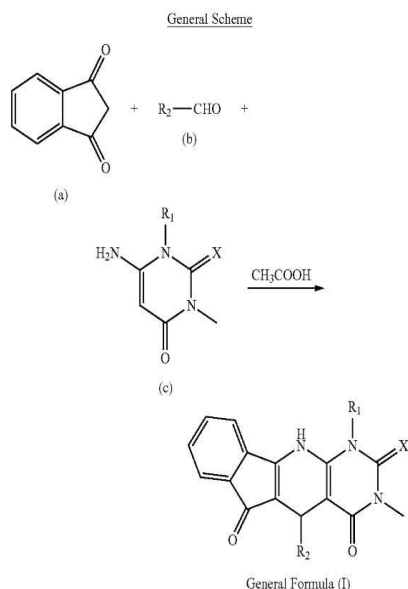
Mar. 17, 2016

8

General Procedure

[0058] The synthetic general procedure is based on the HANTZSCH and AGARWAL, dihydropyridine three component cyclization [A. HANTZSCH, "Condensation-sprodukte aus Aldehydammoniak und ketonartigen Verbindungen". *Chem. Ber.*, 1881, 14:1637-1638] and [A. AGARWAL et al., "First Report on the abnormal dearylation/alkylation reaction in one-pot hantzsch synthesis with 6-Amino-1,3-Dimethyl Uracil". *Synthetic Communications*, 2004, 34:4447-4461]. In particular, reaction of the primary amines (c), synthesized when not commercially available (Synthetic procedures described in the Examples) with aldehydes (b), synthesized when not commercially available, and 1,3-indandione (a) in acetic acid afforded the desired compounds of General Formula (I).

[0059] The new pyridopyrimidine derivative compounds of General Formula (I) have been synthesized following the general synthetic route described in General Scheme below.



[0060] The following Examples describe the present invention in more details. It should be noted that the invention is not limited by the following Examples.

EXAMPLE 1

Preparation of Compound I

Synthesis of
5-(trifluoromethyl)thiophene-3-carbaldehyde

[0061] The compound 5-(trifluoromethyl)thiophene-3-carbaldehyde was obtained following a previously published procedure by BINDER [D. BINDER et al., "Thiophen als Strukturelement physiologisch aktiver Substanzen". *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 1985, 318:243-249]. 20 mL of a 20%

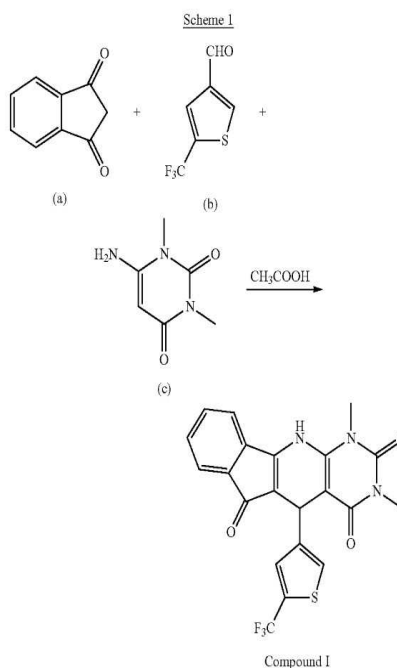
solution of DIBAL in n-hexane were added dropwise during 30 min at a temperature below -45° C. under N₂ atmosphere to a solution of 3.1 g (17.5 mmol) of 5-(trifluoromethyl)thiophene-3-carbonitrile in 32.0 mL of anhydrous ether. The mixture was then stirred for 45 min at -30° C. and successively a 5% H₂SO₄ solution (3.0 mL) was added three times and the aqueous phase was extracted with diethyl ether. The combined organic phases were dried over MgSO₄. Solvent was evaporated to obtain desired compound as oil without further purification, and presented ESI-MS (M_w 179.99): 180.8 (M+H⁺). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 9.95 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.95 (s, 1H).

Synthesis of Compound I:

[0062] To acetic acid (15 mL) in a round bottom flask, (a) (trifluoromethyl)thiophene-3-carbaldehyde (0.697 g, 3.93 mmol), and (c) 6-amino-1,3-dimethyluracil (0.5 g, 3.22 mmol) were added. The mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 8 h. It was then cooled to 0° C. The resulting precipitate was filtered and rinsed with cold water to obtain the crude product. Purification on silica gel column (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9,5/0,5, v/v) afforded the desired Compound I. m.p.: 265° C.

[0063] ESI-MS (M_w 445.07): 445.9 (M+H⁺).

[0064] ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 9.87 (s, 1H, NH), 7.87 (d, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.59 (d, 1H), 7.48 (t, 1H), 7.36 (m, 2H), 4.88 (s, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.13 (s, 3H).



US 2016/0075702 A1

Mar. 17, 2016

9

EXAMPLE 2

Preparation of Compound II

[0065] Synthesis of 6-amino-1,3-dimethyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrimidin-4(1H)-one.

[0066] The compound 6-amino-1,3-dimethyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrimidin-4(1H)-one was obtained following a previously published procedure by HU [S. HU et al., "Design, Synthesis and inhibitory activities of 8-(Substituted styryl-formamido)phenyl-xanthine derivatives on monoamine oxidase B". *Chem. Pharm. Bull.*, 2012, 60(3):385-390], opportunely modified.

[0067] To a stirred solution of 1,3-dimethylthiourea (1.83 g, 17.57 mmol) in acetic anhydride (30 mL) was added cyanoacetic acid (1.5 g, 1.76 mmol), and the resulting mixture was stirred overnight at 70° C. The reaction mixture was concentrated and the resulting oily residue was diluted with H₂O (40 mL) and treated with 5N NaOH (15 mL). The precipitate thus formed was collected by filtration, washed with cold water and purified by recrystallization from MeOH/H₂O to give 6-amino-1,3-dimethyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrimidin-4(1H)-one.

[0068] m.p. 289° C.

[0069] ESI-MS (M_w 171.05): 172.1 ($M+H^+$).

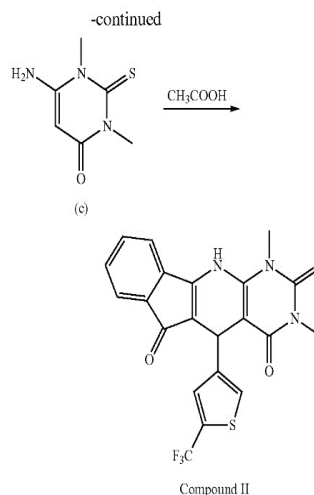
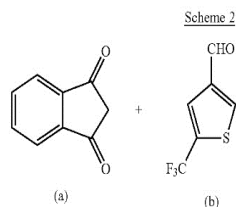
[0070] ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 7.01 (s, 2H, NH₂), 5.01 (s, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.50 (s, 3H).

Synthesis of Compound II:

[0071] The Compound II was obtained with the same procedure described for Compound I in Example 1, by reaction of (a) 1,3-indandione (170 mg, 1.16 mmol), (b) 5-(trifluoromethyl)thiophene-3-carbaldehyde (209 mg, 1.18 mmol) and (c) 6-amino-1,3-dimethyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrimidin-4(1H)-one (166 mg, 0.97 mmol). The mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 8 h. It was then cooled to 0° C. The resulting precipitate was filtered and rinsed with cold water to obtain the crude product. Purification on silica gel column (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9.5/0.5, v/v) afforded the desired Compound II. m.p.: 178° C.

[0072] ESI-MS (M_w 461.05): 461.9 ($M+H^+$); 483.9 ($M+Na^+$).

[0073] ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 10.09 (s, 1H, NH), 7.87 (bs, 1H), 7.66 (bs, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.49 (bs, 1H), 7.37 (m, 2H), 4.96 (s, 1H), 4.07 (s, 3H), 3.58 (s, 3H).



EXAMPLE 3

Preparation of Compound III

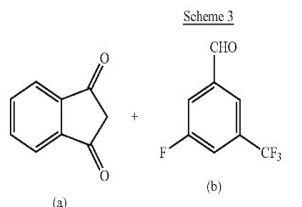
Synthesis of Compound III

[0074] The Compound III was obtained with the same procedure described for Compound I in Example 1, by reaction of (a) 1,3-indandione (1.11 g, 7.57 mmol), (b) 3-fluoro-5-trifluoromethylbenzaldehyde (1.46 g, mmol 7.60) and (c) 6-amino-1,3-dimethyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrimidin-4(1H)-one (1.08 g, 6.30 mmol). The mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 8 h. It was then cooled to 0° C. The resulting precipitate was filtered and rinsed with cold water to obtain the crude product. Purification on silica gel column (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9.5/0.5, v/v) afforded the desired Compound III.

[0075] m.p.: 313° C.

[0076] ESI-MS (M_w 473.08): 474.1 ($M+H^+$); 496.0 ($M+Na^+$).

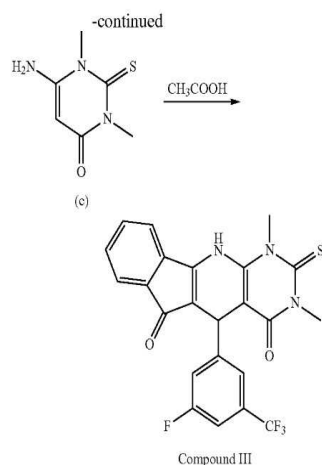
[0077] ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 10.12 (s, 1H, NH), 8.05 (d, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.51 (d, 1H), 7.43 (t, 1H), 7.35 (t, 1H), 7.28 (s, 1H), 4.96 (s, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.53 (s, 3H).



US 2016/0075702 A1

Mar. 17, 2016

10



EXAMPLE 4

Preparation of Compound IV

[0078] Synthesis of 6-amino-1-ethyl-3-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione. The compound 6-amino-1-ethyl-3-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione was obtained following a previously published procedure by HU [S. HU et al., "Design, Synthesis and inhibitory activities of 8-(Substituted styrol-formamido)phenyl-xanthine derivatives on monoamine oxidase B". *Chem. Pharm. Bull.*, 2012, 60(3):385-390], opportunistically modified.

[0079] To a stirred solution of 1-ethyl-3-methylurea (1.36 g, 13.3 mmol) in acetic anhydride (30 mL) was added cyanoacetic acid (1.13 g, 1.33 mmol) and the resulting mixture was stirred overnight at 70° C. The reaction mixture was concentrated and the resulting oily residue was diluted with H₂O (40 mL) and treated with 5N NaOH (15 mL). The precipitate thus formed was collected by filtration, washed with cold water and purified by recrystallization from MeOH/H₂O to give 1.91 g of 6-amino-1-ethyl-3-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione.

[0080] m.p. 232° C.

[0081] ESI-MS (M_w 169.09): 170.1 (M+H⁺).

[0082] ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 6.76 (s, 2H, NH₂), 4.64 (s, 1H), 3.80 (q, 2H), 3.29 (s, 3H), 1.08 (t, 3H).

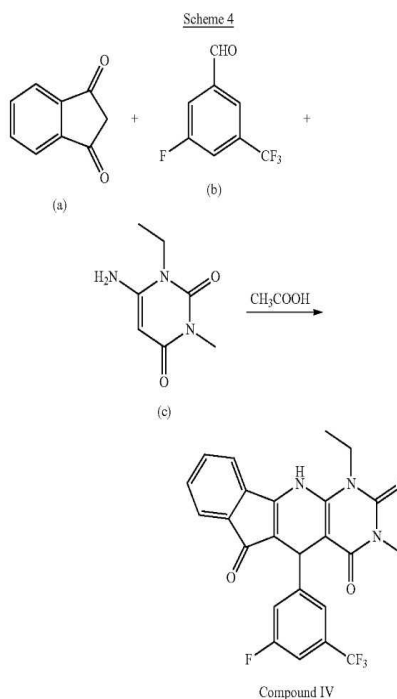
Synthesis of Compound IV

[0083] The Compound IV was obtained with the same procedure described for Compound I in Example 1, by reaction of (a) 1,3-indandione (970 mg, 6.64 mmol), (b) 3-fluoro-5-trifluoromethylbenzaldehyde (1.27 g, 6.61 mmol) and (c) 6-amino-1-ethyl-3-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (936 mg, 5.53 mmol). The mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 8 h. It was then cooled to 0° C. The resulting precipitate was filtered and rinsed with cold water to obtain the crude product. Purification on silica gel column (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9,5/0,5, v/v) afforded the desired Compound IV.

[0084] m.p. 177° C.

[0085] ESI-MS (M_w 471.12): 471.9 (M+H⁺); 498.8 (M+Na⁺).

[0086] ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 9.81 (s, 1H, NH), 7.94 (d, 1H), 7.49 (m, 3H), 7.40 (d, 1H), 7.33 (t, 1H), 7.27 (t, 1H), 4.91 (s, 1H), 4.26 (m, 2H), 3.10 (s, 3H), 1.24 (t, 3H).



EXAMPLE 5

Preparation of Compound V

Synthesis of Compound V

[0087] The Compound V was obtained with the same procedure described for Compound I in Example 1, by reaction of (a) 1,3-indandione (503 mg, 3.44 mmol), (b) 3,5-bis(trifluoromethyl)benzaldehyde (833 mg, 3.44 mmol) and (c) 6-amino-1,3-dimethyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrimidin-4(1H)-one (490 mg, 2.86 mmol). The mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 8 h. It was then cooled to 0° C. The resulting precipitate was filtered and rinsed with cold water to obtain the crude product. Purification on silica gel column (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9,5/0,5, v/v) afforded the desired Compound V.

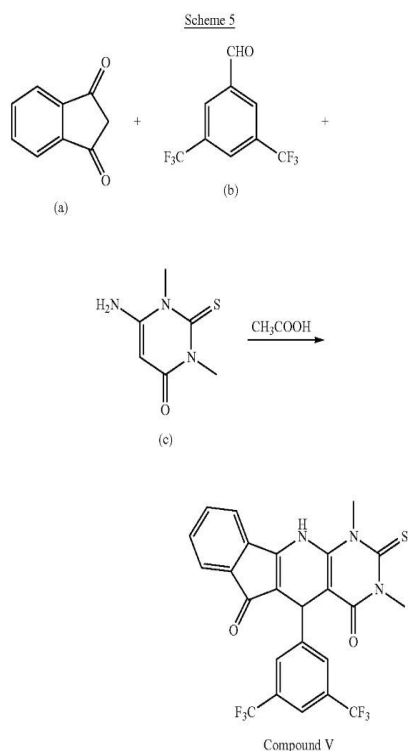
[0088] m.p. 314° C.

[0089] ESI-MS (M_w 523.08): 524.0 (M+H⁺); 546.1 (M+Na⁺). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 10.14 (s, 1H, NH), 8.08 (d, 1H), 7.97 (s, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.53 (t, 1H), 7.37 (t, 1H), 7.27 (d, 1H), 5.06 (s, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.51 (s, 3H).

US 2016/0075702 A1

Mar. 17, 2016

11



EXAMPLE 6

Preparation of Compound VI

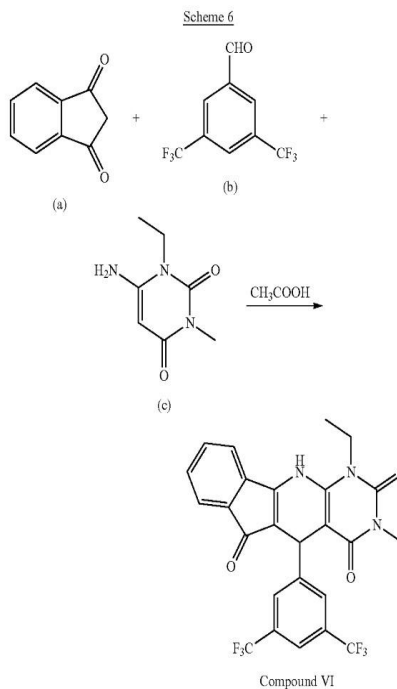
Synthesis of Compound VI

[0090] The Compound VI was obtained with the same procedure described for Compound I in Example 1, by reaction of (a) 1,3-indandione (708 mg, 4.84 mmol), (b) 3,5-bis(trifluoromethyl)benzaldehyde (1.17g, 4.83 mmol) and (c) 6-amino-1-ethyl-3-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (683 mg, 4.04 mmol). The mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 8 h. It was then cooled to 0° C. The resulting precipitate was filtered and rinsed with cold water to obtain the crude product. Purification on silica gel column (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9,5/0,5, v/v) afforded the desired Compound VI.

[0091] m.p. 166° C.

[0092] ESI-MS (M_w 521.12): 522.1 (M+H⁺).

[0093] ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 9.87 (s, 1H, NH), 7.94 (bs, 3H), 7.88 (s, 1H), 7.50 (t, 1H), 7.37 (t, 1H), 7.30 (d, 1H), 5.03 (s, 1H), 4.32 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 1.24 (t, 3H).



EXAMPLE 7

Preparation of Compound VII

Synthesis of 2,3-methylenedioxybenzaldehyde

[0094] The compound 2,3-methylenedioxybenzaldehyde was obtained following a previously published procedure by DEVEAU [A. M. DEVEAU, T. L. MACDONALD, "Practical synthesis of biaryl colchicinoids containing 3',4'-catechol ether-based A-rings via Suzuki cross-coupling with ligandless palladium in water", *Tetrahedron Letters*, 2004, 45:803-807].

[0095] To a flame-dried bottom flask equipped with a reflux condenser, 2,3-dihydroxybenzaldehyde (1 g; 7.24 mmol), DMF (dry, 30 mL) and cesium carbonate (1.5 eq) were sequentially added. After thorough mixing, dibromomethane (1.5 eq) was added via syringe. The mixture was heated at 110° C. for 2 hours, then cooled to room temperature. After filtering through a pad of celite, the filter cake was rinsed with EtOAc. The resultant organic filtrate was concentrated, diluted with water, and extracted three times with EtOAc. The combined organic phases were washed with water, dried over MgSO₄ and concentrated, in order to obtain a good yield of crude oil. Purification of the crude yellow oil by flash chromatography and kugelrohr distillation afforded the desired aldehyde which formed colorless translucent crystals upon cooling.

[0096] m.p. 35° C.

[0097] ESI-MS (M_w 150.03): 151.1 (M+H⁺).

[0098] ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 10.35 (s, 1H), 7.51 (dd, 1H), 7.24 (dd, 1H), 7.16 (dd, 1H), 6.36 (s, 2H).

US 2016/0075702 A1

Mar. 17, 2016

12

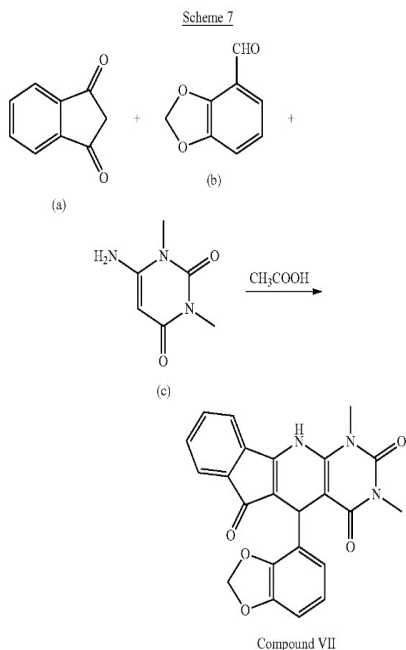
Synthesis of Compound VII

[0099] The Compound VII was obtained with the same procedure described for Compound I in Example 1, by reaction of (a) 1,3-indandione (1.61 g, 11.02 mmol), (b) 2,3-(methylenedioxy)benzaldehyde (1.66g, 11.06 mmol) and (c) 6-amino-1,3-dimethyluracil (1.43 g, 9.22 mmol). The mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 8 h. It was then cooled to 0° C. The resulting precipitate was filtered and rinsed with cold water to obtain the crude product. Purification on silica gel column (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9,5/0,5, v/v) afforded the desired Compound VII.

[0100] m.p. 300° C.

[0101] ESI-MS (M_w 415.12): 416.0 (M+H⁺); 438.0 (M+Na⁺).

[0102] ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 9.88 (s, 1H, NH), 7.83 (d, 1H), 7.45 (t, 1H), 7.32 (t, 1H), 7.24 (d, 1H), 6.73 (t, 1H), 6.66 (d, 2H), 5.90 (d, 2H), 4.81 (s, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.08 (s, 3H).



EXAMPLE 8

Preparation of Compound VIII

Synthesis of Compound VIII

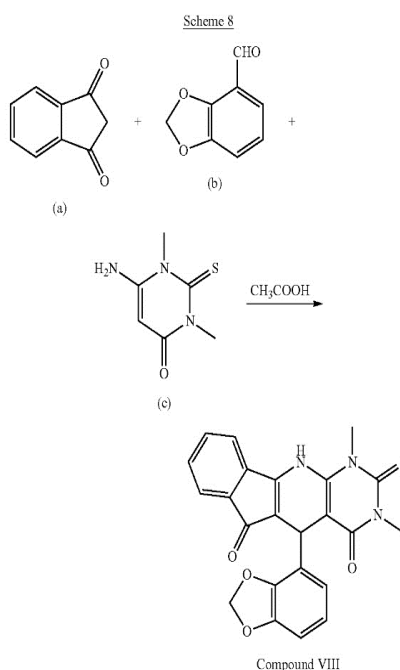
[0103] The Compound VIII was obtained with the same procedure described for Compound I, by reaction of (a) 1,3-indandione (535 mg, 3.66 mmol), (b) 2,3-(methylenedioxy)benzaldehyde (549 mg, 3.66 mmol) and (c) 6-amino-1,3-dimethyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrimidin-4(1H)-one (521 mg, 3.05 mmol). The mixture was heated at reflux under

nitrogen atmosphere for 8 h. It was then cooled to 0° C. The resulting precipitate was filtered and rinsed with cold water to obtain the crude product. Purification on silica gel column (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9,5/0,5, v/v) afforded the desired Compound VIII.

[0104] m. p. 310° C.

[0105] ESI-MS (M_w 431.09): 432.0 (M+H⁺); 453.9 (M+Na⁺).

[0106] ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 10.11 (s, 1H, NH), 7.83 (d, 1H), 7.47 (t, 1H), 7.34 (t, 1H), 7.27 (d, 1H), 6.77 (bs, 1H), 6.68 (bs, 2H), 5.93 (d, 2H), 4.88 (s, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.53 (s, 3H).



EXAMPLE 9

Preparation of Compound IX

Synthesis of 3,4-(methylenedioxy)benzaldehyde

[0107] The compound 3,4-(methylenedioxy)benzaldehyde was obtained following a previously published procedure by POLI [G. POLI, G. GLANBASTIANI, "An Episopropodophyllin aza analogue via Palladium-catalyzed pseudo-domino cyclization". *J. Org. Chem.*, 2002, 67:9456-9459].

[0108] To a solution of piperonyl alcohol (10 g, 65.73 mmol) in CH₂Cl₂ (250 mL), MnO₂ (49.3 g, 567.32 mmol) was added in one portion. The resulting dark suspension was

stirred at room temperature for 24 h, and then filtered off throw a celite pad washing with CH_2Cl_2 . The solvent was removed in vacuum and the resulting crude crystalline yellow pale solid was used without further purification.

[0109] m.p. 338°C .

[0110] ESI-MS (M_w 150.03): 151.1 ($M+H^+$).

[0111] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 9.80 (s, 1H), 7.40 (m, 2H), 6.92 (d, 1H), 6.07 (s, 2H).

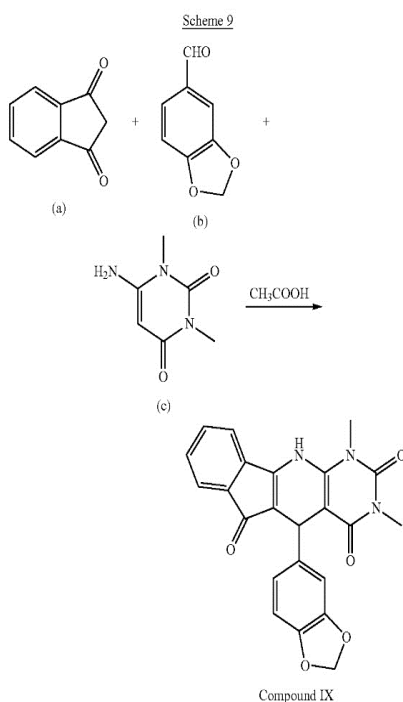
Synthesis of Compound IX:

[0112] The Compound IX was obtained with the same procedure described for compound I in Example 1, by reaction of (a) 1,3-indandione (203 mg, 1.39 mmol), (b) 3,4-(methylene-dioxy)benzaldehyde (209 mg, 1.39 mmol) and (c) 6-amino-1,3-dimethyluracil (180 mg, 1.16 mmol). The mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 8 h. It was then cooled to 0°C . The resulting precipitate was filtered and rinsed with cold water to obtain the crude product. Purification on silica gel column ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9,5/0,5, v/v) afforded the desired Compound IX.

[0113] m.p. 338°C .

[0114] ESI-MS (M_w 415.12): 416.0 ($M+H^+$); 437.9 ($M+Na^+$); 453.9 ($M+K^+$).

[0115] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 9.79 (s, 1H, NH), 7.98 (d, 1H), 7.46 (t, 1H), 7.33 (t, 1H), 7.27 (d, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.72 (bs, 2H), 5.89 (s, 2H), 4.69 (s, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.10 (s, 3H).



EXAMPLE 10

Preparation of Compound X

Synthesis of 2,1,3-benzothiadiazol-4-carboxaldehyde

[0116] The compound 2,1,3-benzothiadiazol-4-carboxaldehyde was obtained following a previously published procedure by VANELLE [P. VANELLE, C. T. LIEGEOIS, J. MEUCHE, J. MALDONADO, M. P. CROZET, "An original way for synthesis of new nitrobenzothiadiazole derivatives", *Heterocycles*, 1997, 45(5):955-962].

[0117] The lithium salt of 2-nitropropane (2.48 g, 27.84 mmol) was added to a solution of 4-bromomethyl-2,1,3-benzothiadiazole (5.82 g, 25.40 mmol) in methanol (60 mL). After stirring at room temperature (approximately 25°C) for 24 h, methanol was distilled off on a rotatory evaporator under reduced pressure. The residue was dissolved in dichloromethane and the solvent was washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated under vacuum. After purification by recrystallization from cyclohexane, 2,1,3-benzothiadiazol-4-carboxaldehyde was obtained as a yellow solid.

[0118] m.p. 99°C .

[0119] ESI-MS (M_w 164.18): 165.2 ($M+H^+$).

[0120] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 10.60 (s, 1H), 8.43 (d, 1H), 8.27 (d, 1H), 7.91 (t, 1H).

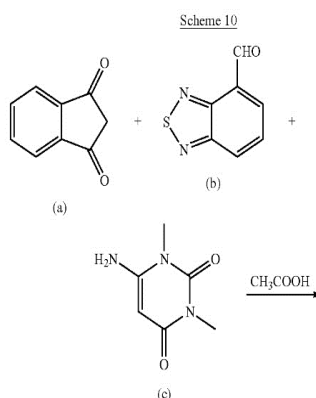
Synthesis of Compound X

[0121] The Compound X was obtained with the same procedure described for Compound I in Example 1, by reaction of (a) 1,3 indandione (420 mg, 2.87 mmol), (b) 2,1,3-benzothiadiazol-4-carboxaldehyde (471 mg, 2.87 mmol) and (c) 6-amino-1,3-dimethyluracil (359 mg, 2.31 mmol). The mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 8 h. It was then cooled to 0°C . The resulting precipitate was filtered and rinsed with cold water to obtain the crude product. Purification on silica gel column ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9,5/0,5, v/v) afforded the desired Compound X.

[0122] m.p. 331°C .

[0123] ESI-MS (M_w 429.09): 430.1 ($M+H^+$); 452.0 ($M+Na^+$); 467.9 ($M+K^+$).

[0124] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 10.08 (s, 1H, NH), 7.88 (d, 1H), 7.62 (d, 3H), 7.50 (t, 1H), 7.32 (t, 1H), 7.23 (d, 1H), 5.46 (s, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.01 (s, 3H).

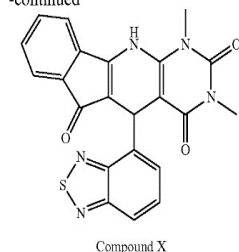


US 2016/0075702 A1

14

Mar. 17, 2016

-continued



EXAMPLE 11

Preparation of Compound XI

Synthesis of 2,1,3-benzothiadiazol-5-carboxaldehyde

[0125] The compound 2,1,3-benzothiadiazol-5-carboxaldehyde was obtained following a previously published procedure by CARROLL [W. A. CARROLL, et al., "Synthesis and Structure—Activity relationships of a novel series of 2,3,5,6,7,9-Hexahydrothieno[3,2-b]quinolin-8(4H)-one 1,1-dioxide K_{ATP} channel openers: Discovery of (-)-(9S)-9-(3-bromo-4-fluorophenyl)-2,3,5,6,7,9-hexahydrothieno[3,2-b]quinolin-8(4H)-one 1,1-Dioxide (A-278637), a Potent K_{ATP} Opener that selectively inhibits spontaneous bladder contractions". *J. Med. Chem.*, 2004, 47:3163-3179].

[0126] The 5-Hydroxy-methylbenzo-2,1,3-thiadiazole (2.6 g, 16 mmol) and MnO_2 (5.6 g, 64.41 mmol) in $CHCl_3$ (150 mL) were stirred at room temperature (approximately 25° C.) overnight. The reaction mixture was filtered and the filtrate evaporated. Crude residue was submitted to the chromatograph on silica gel (EtOAc/Hexane, 7/3, v/v) to provide 1.9 g of 2,1,3-benzothiadiazol-5-carboxaldehyde.

[0127] m.p. 93° C.

[0128] ESI-MS (M_w 164.18): 165.2 ($M+H^+$).

[0129] 1H -NMR (DMSO- d_6): 10.21 (s, 1H), 8.78 (d, 1H), 8.19 (d, 1H), 8.04 (s, 1H).

Synthesis of Compound XI

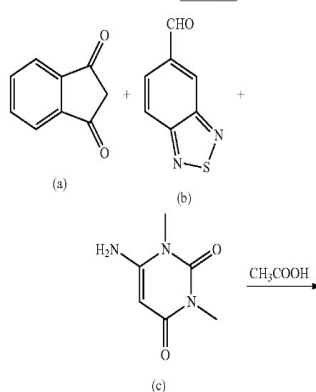
[0130] The Compound XI was obtained with the same procedure described for compound I in Example 1, by reaction of (a) 1,3-indandione (468 mg, 3.20 mmol), (b) 2,1,3-benzothiadiazol-5-carboxaldehyde (525 mg, 3.20 mmol) and (c) 6-amino-1,3-dimethyluracil (415 mg, 2.67 mmol). The mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 8 h. It was then cooled to 0° C. The resulting precipitate was filtered and rinsed with cold water to obtain the crude product. Purification on silica gel column (CH_2Cl_2/CH_3OH , 9,5/0,5, v/v) afforded the desired Compound XI.

[0131] m.p. 358° C.

[0132] ESI-MS (M_w 429.09): 430.1 ($M+H^+$); 452.1 ($M+Na^+$).

[0133] 1H -NMR (DMSO- d_6): 8.92 (s, 1H, NH), 7.93 (m, 3H), 7.77 (d, 1H), 7.47 (t, 1H), 7.33 (t, 1H), 7.26 (d, 1H), 4.99 (s, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.08 (s, 3H).

Scheme 11



EXAMPLE 12

Preparation of Compound XII

Synthesis of Compound XII:

[0134] The compound was obtained with the same procedure described for Compound I in Example 1, by reaction of (a) 1,3-indandione (456 mg, 3.12 mmol), (b) 2,1,3-benzothiadiazol-5-carboxaldehyde (512 mg, 3.12 mmol) and (c) 6-amino-1,3-dimethyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrimidin-4(1H)-one (445 mg, 2.60 mmol). The mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 8 h. It was then cooled to 0° C. The resulting precipitate was filtered and rinsed with cold water to obtain the crude product. Purification on silica gel column (CH_2Cl_2/CH_3OH , 9,5/0,5, v/v) afforded the desired Compound XII.

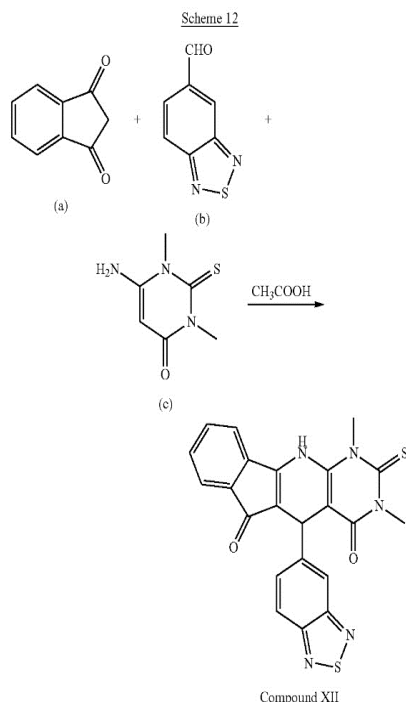
[0135] m.p. 362° C.

[0136] ESI-MS (M_w 445.07): 446.0 ($M+H^+$); 468.0 ($M+Na^+$). 1H -NMR (DMSO- d_6): 10.14 (s, 1H, NH), 7.96 (m, 3H), 7.80 (d, 1H), 7.48 (t, 1H), 7.34 (t, 1H), 7.27 (d, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.11 (s, 3H), 3.51 (s, 3H).

US 2016/0075702 A1

Mar. 17, 2016

15



[0137] In some aspects, the present invention also provides a pharmaceutical composition, e.g. an appropriate dosage form, wherein said composition comprises as active ingredient an effective amount of one or more compounds with structure represented by General Formula (I), or pharmaceutically acceptable salts thereof, or their mixtures (in any ratio); and pharmaceutically acceptable excipients.

[0138] The pharmaceutical composition, according to present invention, is administered by any adequate route, for example, by oral, sublingual, rectal, vaginal, nasal, intraperitoneal or parenteral routes, but not limited of these examples. The preferred route is oral.

[0139] The pharmaceutical compositions for oral administration can be presented in diverse pharmaceutical forms, such as, but not limited to: (i) tablet, optionally coated, chewable, effervescent, multilayered or dispersible; (ii) pills; (iii) powder, optionally dispersible or effervescent; (iv) capsule, optionally hard gelatinous capsule, softgel or amylaceous gelatinous capsule; (v) lozenge; (vi) granule, optionally in the form of microparticles, microcapsules, or vectorized preparations, like, liposomes; (vii) suppositories; (viii) solution; (ix) syrup; (x) suspension; (xi) injectable; and others.

[0140] The pharmaceutical composition, according to present invention, is for use as inhibitor of the cyclic nucleotide synthesis. In another embodiment, the pharmaceutical composition is for use as inhibitor of the cAMP and cGMP synthesis.

[0141] The pharmaceutical composition, according to present invention, is used in the prophylactic and/or curative treatment of diarrhea, colitis and irritable bowel syndrome.

[0142] The pharmaceutical composition, according to present invention, may be prepared by methods well known in the state of the art. Appropriately, Remington's Pharmaceutical Sciences or similar information sources may be used to prepare a suitable formulation according to the invention.

Test Compounds

EXAMPLE 13

Protocol for the Stimulation of Guanylate Cyclase-C Induced by the Toxin STa in T84 Cells

a) Cells Growing

[0143] Cells from the T84 line (ATCC CCL-248) are sub-culture according to supplier's instructions. Briefly, after washing the culture flask (75 cm²) using 3 mL of 0.25% Trypsin solution (w/v) and 0.53 mM EDTA solution to remove the traces of serum, the same volume of trypsin is added to each bottle, and cells are observed under a microscope until detachment of the cellular layer (usually 8-10 minutes).

[0144] Preparation of assay plates (12-well plates) follows after adding 8 mL of culture medium (DMEM-F12 supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin-streptomycin (50IU/mL:50pg/mL) and centrifugation of the cell homogenate at 2000 rpm for 5 minutes (at 25° C.).

[0145] With the aid of a 1 mL pipet connected to a vacuum pump, the supernatant is aspirated and the cells resuspended with culture medium (with necessary volume to maintain the ratio of 1:4, i.e. 1 culture flask originates 4 12-well plates). After homogenization of the cells, with an aid of a pipette, it is added 2 mL of the cell suspension to each well of the plate. The growth occurs in an incubator under controlled conditions (37° C., 5% CO₂ atmosphere) until confluence of each well (typically 8-10 days).

[0146] b) Method

[0147] Initially, the culture medium is aspirated using a 1 mL pipette connected to a vacuum pump and the cells are washed at least 3 times with 0.5 mL of a Dulbecco Phosphate Buffered Saline (DPBS; 37° C.) using a 1 mL pipette attached to one the vacuum pump. In the sequence, 0.5 mL of DPBS is added in the presence and/or absence of 1-metil-3-isobutyl xanthine (1 mM), dimethylsulfoxide (0.1% v/v) and the test compound and incubated for 10 minutes in an oven (37° C., 5% CO₂ atmosphere).

[0148] After the incubation period, the cells are stimulated with STa toxin (1 μM, 5 μL) and incubated in an incubator (37° C., 5% CO₂ atmosphere) for 10 minutes. After the stimulation period, the volume of the supernatant is aspirated using a 1 mL pipette connected to a vacuum pump and the cGMP is extracted by the addition of a hydrochloric acid solution 0.1 M (0.3 mL, using a pipette), pH 4, under constant stirring (speed 4) in a shaker type "rotator" (Lab-line Instruments, model number 4625), for 20 minutes. After the extraction period, the volume of each well is centrifuged (15000 rpm, 5 minutes, 25° C.) and an aliquot of the supernatant (0.3 mL) is quickly stored in a freezer at -20° C. for the subsequent quantification of the content of cGMP by the immunoassay method developed and described by HORTON et al. (1992) [Horton, J. K.; Martin, R. C.; Kalinka, S.; Cushing, A.; Kitcher, J. P.; O'Sullivan, M. J.; Baxendale, P. M., "Enzyme immunoassays for the estimation of adenosine 3',5' cyclic monophosphate and guanosine 3',5' cyclic monophosphate in biological fluids". *J Immunol Methods* 1992, 155:31-40].

US 2016/0075702 A1

16

Mar. 17, 2016

[0149] The protein precipitate or “pellets” are digested directly by the addition of 0.5 mL of a 0.1 M sodium hydroxide solution, under constant agitation in a shaker type “rotator” (speed 7), for 30 minutes. Posteriorly, this protein fraction is used in the tests to determine proteins, employing a method developed by BRADFORD (1976). M. M. BRADFORD, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-254].

c) Compounds Tested

[0150] The compounds tested are I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, and XII; described in TABLE 1.

d) Results

[0151]

TABLE 2

Effect of Compounds II, IV, VI, VIII and X on cGMP accumulation induced by STa (1 μ M) in T84 cells (see FIG. 1)		
Compound(s)	cGMP, pmol/10 min/mg	% of inhibition (Compound $\times$ STa)
Baseline	6.18 $\pm$ 0.49	—
STa (1 μ M)	1044.0 $\pm$ 55.42 [#]	—
FPIPP (50 μ M)	53.53 $\pm$ 6.22*	~94
II (50 μ M)	57.50 $\pm$ 3.16*	~94
IV (50 μ M)	146.80 $\pm$ 22.94*	~86
VI (50 μ M)	22.83 $\pm$ 3.30*	~97
VIII (50 μ M)	350.70 $\pm$ 35.80*	~66
X (50 μ M)	668.40 $\pm$ 75.46*	~36

Results are expressed as mean $\pm$ SEM.

[#]p < 0.05, compared with Baseline group;

*p < 0.05, compared with STa group; (ANOVA followed by Tukey's test).

TABLE 3

Effect of Compounds I, III, V and XII on cGMP accumulation induced by STa (1 μ M) in T84 cells (see FIG. 2)		
Compound(s)	cGMP, pmol/10 min/mg	% of inhibition (Compound $\times$ STa)
Baseline	0.02 $\pm$ 0.01	—
STa (1 μ M)	554.20 $\pm$ 49.43 [#]	—
FPIPP (50 μ M)	74.83 $\pm$ 13.26*	~86
I (50 μ M)	210.70 $\pm$ 6.11*	~62
III (50 μ M)	201.50 $\pm$ 44.93*	~64
V (50 μ M)	215.50 $\pm$ 34.57*	~62
XII (50 μ M)	201.50 $\pm$ 23.51*	~64

Results are expressed as mean $\pm$ SEM.

[#]p < 0.05, compared with Baseline group;

*p < 0.05, compared with STa group; (ANOVA followed by Tukey's test).

TABLE 4

Effect of compound VII on cGMP accumulation induced by STa (1 μ M) in T84 cells (see FIG. 3)		
Compound(s)	cGMP, pmol/10 min/mg	% of inhibition (Compound $\times$ STa)
Baseline	0.25 $\pm$ 0.06	—
STa (1 μ M)	334.60 $\pm$ 40.74 [#]	—

TABLE 4-continued

Effect of compound VII on cGMP accumulation induced by STa (1 μ M) in T84 cells (see FIG. 3)		
Compound(s)	cGMP, pmol/10 min/mg	% of inhibition (Compound $\times$ STa)
FPIPP (50 μ M)	56.25 $\pm$ 13.61*	~83
VII (50 μ M)	297.30 $\pm$ 39.06*	~12

Results are expressed as mean $\pm$ SEM.

[#]p < 0.05, compared with Baseline group;

*p < 0.05, compared with STa group; (ANOVA followed by Tukey's test).

TABLE 5

Effect of compound IX on cGMP accumulation induced by STa (1 μ M) in T84 cells (see FIG. 4)		
Compound(s)	cGMP, pmol/10 min/mg	% of inhibition (Compound $\times$ STa)
Baseline	5.62 $\pm$ 0.59	—
STa (1 μ M)	642.80 $\pm$ 11.60 [#]	—
FPIPP (50 μ M)	81.00 $\pm$ 14.38*	~87
IX (50 μ M)	703.50 $\pm$ 43.11*	—

Results are expressed as mean $\pm$ SEM.

[#]p < 0.05, compared with Baseline group;

*p < 0.05, compared with STa group; (ANOVA followed by Tukey's test).

TABLE 6

Effect of compound XI on cGMP accumulation induced by STa (1 μ M) in T84 cells (see FIG. 5)		
Compound(s)	cGMP, pmol/10 min/mg	% of inhibition (Compound $\times$ STa)
Baseline	0.02 $\pm$ 0.01	—
STa (1 μ M)	575.50 $\pm$ 33.01 [#]	—
FPIPP (50 μ M)	74.83 $\pm$ 13.26*	~86
XI (50 μ M)	171.30 $\pm$ 31.68*	~70

Results are expressed as mean $\pm$ SEM.

[#]p < 0.05, compared with Baseline group;

*p < 0.05, compared with STa group; (ANOVA followed by Tukey's test).

EXAMPLE 14

Protocol for Determination of Absolute Bioavailability

a) Animals

[0152] The study used male Beagle dogs, aged between 2 to 4 years old, weighing between 8 to 12 kg, and kept in food control and disposal of water ad libitum during the study.

b) Animal Preparation

[0153] The dogs were shaving in the radial portion of the front paws, performing aseptic on site with the aid of moistened gauze with 70% alcohol.

[0154] Entered the 21G catheter (one in each paw in the intravenous administration protocol and a single paw in the oral administration protocol) in order to access the cephalic vein.

[0155] The blood samples were collected from animals depending on the established sampling times by taking 1.5

US 2016/0075702 A1

Mar. 17, 2016

17

mL of blood using a 3 mL syringe. The samples were transferred to heparinized tube collection.

c) Route of Administration

[0156] The administration of the study compounds was made orally and intravenously.

[0157] The intravenous administration of the compounds was carried out in bolus, and has through one of the cephalic veins of dogs. Concentrations were administered 1 mg/kg; 3 mg/kg and 10 mg/kg in one, on different days.

[0158] The oral administration of the drug was provided as a powder in capsules at the dose of 3 mg/kg, which were all completely ingested by dogs.

d) Sampling Times

[0159] For the intravenous administration, the blood samples (1.5 ml) were collected in the following predetermined time intervals: 0, 0.033, 0.083, 0.17, 0.25, 0.33, 0.5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 12 and 24 hours.

[0160] For the oral administration, the blood samples (1.5 ml) were collected in the following predetermined time intervals: 0, 0.33, 0.67, 1, 1.5, 2, 3, 4, and 6, 8, 12 and 24 hours.

e) Compounds Tested

[0161] The compounds tested are II, IV, VI, and XI; described in TABLE 1.

f) Analytical Method

[0162] The heparinized tubes collections were placed in a centrifuge and were processed for 10 minutes at 2500 rpm per minute. The plasma was separated and put into other tubes. The plasma was analyzed by Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

g) Results

[0163]

TABLE 7

Results obtained of the compounds II, IV, VI, and XI were:	
Compound(s)	Absolute bioavailability
II	0.16%
IV	0.17%
VI	0.82%
XI	0.35%

[0164] All four compounds tested for inhibition of cyclic nucleotide showed negligible absolute bioavailability. These results indicate great therapeutic potential thereof for the treatment of disorders of the intestinal tract, since no absolute bioavailability greatly reduces the possibility of these compounds present some kind of systemic toxicity.

[0165] The compounds of the present invention, new pyridopyrimidine derivatives compounds, are useful in human and veterinary medicine for treating a condition in a patient. In accordance with the present invention, said compounds can be administered to a patient in need of prevention and/or treatment of a condition.

[0166] The present invention also describes a method for using the new pyridopyrimidine derivatives compounds as inhibitor of the cyclic nucleotide synthesis. In another

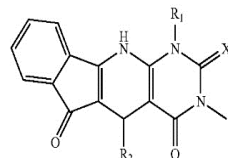
embodiment, describes a method for using the new pyridopyrimidine derivatives compounds as inhibitor of the cAMP and cGMP synthesis.

[0167] Another objective of the present invention is the use of the new pyridopyrimidine derivatives compounds, their pharmaceutically acceptable salts or mixtures thereof (in any ratio), for inhibiting the cyclic nucleotide synthesis. Furthermore, it is the objective of the present invention the use of one of the new pyridopyrimidine derivatives compounds, their pharmaceutically acceptable salts or mixtures thereof (in any ratio), for inhibiting the cAMP and cGMP synthesis.

[0168] It is also the objective of the present invention the use of one of the new pyridopyrimidine derivatives compounds, their pharmaceutically acceptable salts or mixtures thereof (in any ratio), in the prophylactic and/or curative treatment of diarrhea, colitis and irritable bowel syndrome.

1. A compound represented by General Formula (I):

General Formula (I)



or pharmaceutically acceptable salts thereof, or their mixtures in any ratio, wherein:

R₁ is selected from the group consisting of C₁₋₆ alkyl, amino C₁₋₆ alkyl, dimethylamino C₁₋₆ alkyl, halo C₁₋₆ alkyl, guanidino C₁₋₆ alkyl, and mercapto C₁₋₆ alkyl;

R₂ is selected from the group consisting of 4-(trifluoromethyl)thiophene, 3-fluoro-5-trifluoromethylphenyl, 3,5-bistrifluoromethylphenyl, 1,3-benzodioxol-4-yl, 1,3-benzodioxol-5-yl, 2,1,3-benzothiadiazol-4-yl, 2,1,3-benzothiadiazol-5-yl, and substituted aryl wherein the substituent is selected from the group consisting of C₁₋₆ alkoxy, halogen, C₁₋₆ heteroaralkyl or C₂₋₆ heteroaralkenyl; and

X is selected from the group consisting of O, S and Se.

2. Compound according to claim 1 wherein:

R₁ is a C₁₋₆ alkyl selected from the group consisting of methyl, ethyl, propyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, and hexyl;

R₂ is selected from the group consisting of 4-(trifluoromethyl)thiophene, 3-fluoro-5-trifluoromethylphenyl, 3,5-bistrifluoromethylphenyl, 1,3-benzodioxol-4-yl, 1,3-benzodioxol-5-yl, 2,1,3-benzothiadiazol-4-yl, and 2,1,3-benzothiadiazol-5-yl; and

X represents O or S.

3. C compound according to claim 2 wherein:

R₁ is methyl or ethyl;

R₂ is selected from the group consisting of: 4-(trifluoromethyl)thiophene, 3-fluoro-5-trifluoromethylphenyl, 3,5-bistrifluoromethylphenyl, benzo[d][1,3]dioxol-4-yl, benzo[d][1,3]dioxol-5-yl, 2,1,3-benzothiadiazol-4-yl, and 2,1,3-benzothiadiazol-5-yl; and

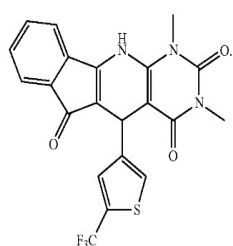
X is O or S.

US 2016/0075702 A1

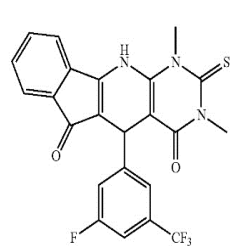
Mar. 17, 2016

18

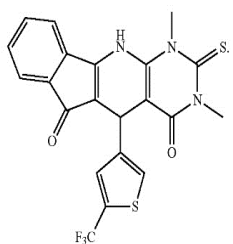
4. Compound according to claim 1 wherein it is:



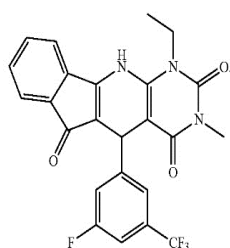
8. Compound according to claim 1 wherein it is:



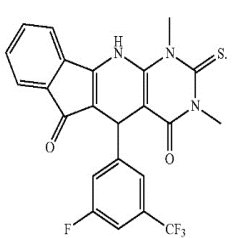
5. Compound according to claim 1 wherein it is:



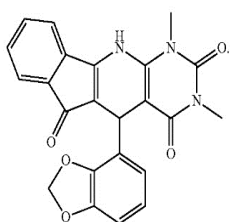
9. Compound according to claim 1 wherein it is:



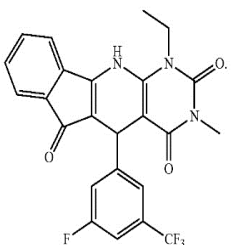
6. Compound according to claim 1 wherein it is:



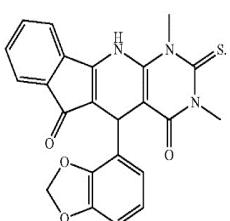
10. Compound according to claim 1 wherein it is:



7. Compound according to claim 1 wherein it is:



11. Compound according to claim 1 wherein it is:

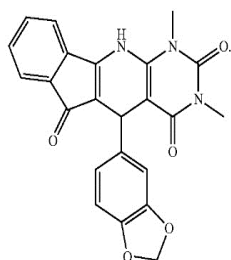


US 2016/0075702 A1

Mar. 17, 2016

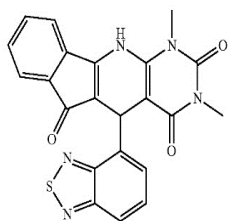
19

12. Compound according to claim 1, wherein it is:



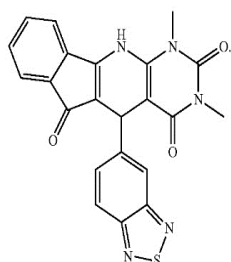
(Compound IX)

13. Compound according to claim 1, wherein it is:



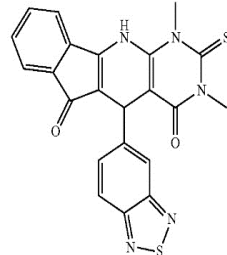
(Compound X)

14. Compound according to claim 1, wherein it is:



(Compound XI)

15. Compound according to claim 1, wherein it is:



(Compound XII)

16. A pharmaceutical composition comprising as active ingredient an effective amount of one or more compounds according to claim 1, or pharmaceutically acceptable salts thereof; and pharmaceutically acceptable excipients.

17. Pharmaceutical composition according to claim 16, wherein said composition is for inhibition of the cyclic nucleotide synthesis.

18. Pharmaceutical composition according to claim 16, wherein said composition is for inhibition of the cAMP and cGMP synthesis.

19. Pharmaceutical composition according to claim 16, wherein said composition is for the prophylactic and/or curative treatment of diarrhea, colitis and irritable bowel syndrome.

20. A method of inhibiting the cyclic nucleotide synthesis in a patient, comprising administering the pharmaceutical composition according to claim 16.

21. A method of inhibiting the cAMP and cGMP synthesis in a patient, comprising administering the pharmaceutical composition according to claim 16.

22. A method for prophylactic and/or curative treatment of diarrhea, colitis and irritable bowel syndrome in a patient, comprising administering the pharmaceutical composition according to claim 16.

23. Method according to claim 20, wherein the pharmaceutical composition is in an appropriate dosage form.

24. Use of the compound according to claim 1, or pharmaceutically acceptable salts thereof, or their mixtures in any ratio in the manufacture of medicament for inhibit the cyclic nucleotide synthesis.

25. Use of the compound according to claim 1, or pharmaceutically acceptable salts thereof, or their mixtures in any ratio in the manufacture of medicament for inhibit the cAMP and cGMP synthesis.

26. Use of the compound according to claim 1, or pharmaceutically acceptable salts thereof, or their mixtures in any ratio in the manufacture of medicament for prophylactic and/or curative treatment of diarrhea, colitis and irritable bowel syndrome.

* * * * *