

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2006.04.05</b>	(73) Titular(es): <b>THERAVANCE, INC.</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2005.04.06 US 668780 P</b>	<b>901 GATEWAY BOULEVARD SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080</b>	<b>US</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2008.01.09</b>	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2010.09.01</b> <b>231/2010</b>	<b>PAUL R. FATHEREE</b>	<b>US</b>
	<b>DANIEL GENOV</b>	<b>US</b>
	<b>S. DEREK TURNER</b>	<b>US</b>
	<b>ADAM GOLDBLUM</b>	<b>US</b>
	(74) Mandatário:	
	<b>ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO</b>	<b>PT</b>
	<b>RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA</b>	

(54) Epígrafe: **FORMA CRISTALINA DE UM COMPOSTO QUINOLINONA-CARBOXAMIDA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA UM SAL CRISTALINO DE CLORIDRATO DE {(1S,3R,5R)-8-[(R)-2-HIDROXI-3-(METANOSSULFONIL-METILAMINO) PROPIL]-8-AZABICICLO[3.2.1]OCT-3-IL}AMIDA DO ÁCIDO 1-ISOPROPIL-2-OXO-1,2-DI-HIDROQUINOLINA-3-CARBOXÍLICO OU UM SEU SOLVATO. A INVENÇÃO PROPORCIONA TAMBÉM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO TAIS FORMAS CRISTALINAS SALINAS, MÉTODO DE UTILIZAR TAIS FORMAS CRISTALINAS SALINAS PARA TRATAR DOENÇAS ASSOCIADAS COM A ACTIVIDADE DO RECEPTOR DE 5-HT4 E PROCESSOS ÚTEIS PARA PREPARAR TAIS FORMAS CRISTALINAS SALINAS.

## DESCRIÇÃO

### "FORMA CRISTALINA DE UM COMPOSTO QUINOLINONA-CARBOXAMIDA"

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

##### Campo da Invenção

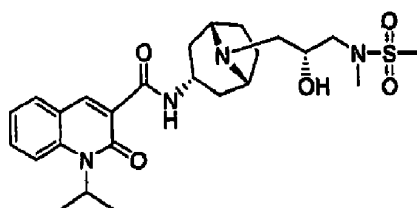
A invenção é dirigida a formas cristalinas salinas de um composto quinolinona-carboxamida que são úteis como agonistas do receptor 5-HT<sub>4</sub>. A invenção é também dirigida a composições farmacêuticas compreendendo tais compostos cristalinos. A invenção encontra utilidade em métodos de utilização de tais compostos para o tratamento de patologias médicas mediadas pela actividade do receptor 5-HT<sub>4</sub>. São descritos processos úteis para tais compostos.

##### Estado da Técnica

O Pedido Provisório U.S. Nº 60/560076 apresentado em 7 de Abril de 2004 e o Pedido de Patente U.S. Nº 11/100113, apresentado em 6 de Abril de 2005 do mesmo titular, divulgam novos compostos quinolinona-carboxamida que se espera serem úteis para o tratamento de distúrbios de motilidade reduzida do tracto gastrointestinal. Em particular, o composto {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico é especificamente divulgado

nestes pedidos, como demonstrado pela actividade do agonista 5-HT<sub>4</sub>. O documento EP-564650 divulga derivados de quinolina úteis como antagonistas do 5HT<sub>3</sub>.

A estrutura química da {(1*S*,3*R*,*SR*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico é representada pela fórmula I:



I

Para utilizar, de um modo eficaz, este composto como um agente terapêutico, seria desejável ter um sal no estado sólido que possa ser rapidamente preparado e que tenha estabilidade química e física aceitável. Por exemplo, seria altamente desejável ter uma forma de sal que seja estável termicamente, por exemplo, a temperaturas excedendo cerca de 200 °C e não seja higroscópica nem deliquiscente, facilitando assim, o processamento e armazenamento do material. Os sólidos cristalinos são geralmente preferidos relativamente às formas amorfas, para potenciar a pureza e estabilidade do produto preparado.

Anteriormente não foram reportadas formas cristalinas salinas do composto de fórmula I. Consequentemente, existe a necessidade de uma forma cristalina estável de sal do composto

de fórmula I que não seja nem hidroscópica nem deliquescente e apresente estabilidade térmica favorável.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção proporciona um sal cristalino de cloridrato de {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico ou um seu solvato. Num aspecto, a forma cristalina salina da invenção é um sal cristalino de cloridrato do composto de fórmula I. Noutro aspecto, a forma cristalina salina da invenção é um hidrato cristalino do sal de cloridrato do composto de fórmula I.

Surpreendentemente, o sal cristalino de cloridrato da invenção demonstrou ser termicamente estável a temperaturas superiores a cerca de 200 °C e exibe uma alteração de peso inferior a cerca de 0,2%, quando exposto a uma gama de humidade relativa entre cerca de 2% e cerca de 90%, à temperatura ambiente. Além disso, nem o sal cristalino de cloridrato da invenção nem o seu hidrato é deliquescente quando exposto a 90% de humidade relativa, à temperatura ambiente.

Entre outras utilizações, é esperado que as formas cristalinas salinas da invenção sejam úteis para preparar composições farmacêuticas para o tratamento de distúrbios de motilidade reduzida do tracto gastrointestinal. Consequentemente, noutro dos seus aspectos de composição, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável e um sal cristalino de cloridrato de {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido

1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico ou um seu solvato.

A invenção encontra utilidade num método de tratamento de uma doença ou patologia associada com a actividade do receptor 5-HT<sub>4</sub>, e. g. um distúrbio da motilidade reduzida do tracto gastrointestinal, o método compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um sal cristalino de cloridrato da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico ou um seu solvato.

Num aspecto do método, a invenção proporciona um processo para preparar um sal cristalino de cloridrato da invenção, compreendendo o processo colocar em contacto a {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico com sal de cloridrato para formar uma mistura reaccional e isolar o sal cristalino de cloridrato da mistura reaccional.

A invenção proporciona também um sal cristalino de cloridrato da invenção, como aqui descrito, para utilização em terapia ou como um medicamento, bem como a utilização de um sal cristalino de cloridrato da invenção, na preparação de um medicamento, especialmente para a preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio de motilidade reduzida do tracto gastrointestinal num mamífero.

## BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

São ilustrados vários aspectos da presente invenção por referência aos desenhos que a acompanham.

A Figura 1 mostra um padrão de difracção de raio-X de pó (PXRD) de um sal cristalino de cloridrato da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico da invenção.

A Figura 2 mostra um perfil de calorimetria de varrimento diferencial (DSC) (perfil inferior, eixo vertical do lado direito) e um perfil de análise gravimétrica térmica (TGA) (perfil superior, eixo vertical do lado esquerdo) para um sal cristalino de cloridrato da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonilmetil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico da invenção.

A Figura 3 mostra um perfil de absorção de humidade dinâmica (DMS) para um sal cristalino de cloridrato de {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico da invenção.

A Figura 4 mostra um padrão de difracção de raio-X de pó (PXRD) de um hidrato cristalino de um sal de cloridrato da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico da invenção.

A Figura 5 mostra um perfil de calorimetria de varrimento diferencial (DSC) (perfil superior, eixo vertical do lado esquerdo) e uma análise gravimétrica térmica (TGA) (perfil inferior, eixo vertical do lado direito) para um hidrato cristalino de um sal de cloridrato da {(1S,3R,5R)-8-[(R)-2-hidroxi-3-(metanossulfonilmetil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico da invenção.

A Figura 6 mostra um perfil de absorção de umidade dinâmica (DMS) para um hidrato cristalino de um sal de cloridrato da {(1S,3R,5R)-8-[(R)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico da invenção.

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A invenção proporciona um sal cristalino de cloridrato da {(1S,3R,5R)-8-[(R)-2-hidroxi-3-(metanossulfonilmetil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico e os seus solvatos.

### Definições

Ao descrever os compostos, composições e métodos da invenção, os seguintes termos têm os significados que se seguem, salvo indicado em contrário.

O termo “quantidade terapeuticamente eficaz”, significa uma quantidade suficiente para tratar com eficácia, quando administrada a um doente com necessidade de tratamento.

O termo “tratamento”, como aqui utilizado, significa o tratamento de uma doença, distúrbio ou patologia médica num doente, tal como um mamífero (particularmente, um humano) que inclui:

- (a) prevenir a doença, distúrbio ou patologia médica de ocorrer, *i. e.*, tratamento profilático de um doente;
- (b) melhorar a doença, distúrbio ou patologia médica, *i. e.*, eliminar ou provocar a regressão da doença, distúrbio ou patologia médica num doente;
- (c) suprimir a doença, distúrbio ou patologia médica, *i. e.*, abrandar ou impedir o desenvolvimento da doença, distúrbio ou patologia médica num doente; ou
- (d) aliviar os sintomas da doença, distúrbio ou patologia médica num doente.

O termo “solvato” significa um complexo ou agregado formado por uma ou mais moléculas de um soluto, *i. e.* um composto da invenção ou um seu sal farmaceuticamente aceitável e uma ou mais moléculas de um solvente. Tais solvatos são tipicamente sólidos cristalinos, com uma proporção molar substancialmente fixa de soluto e solvente. Os solventes representativos incluem, a título exemplificativo, água, metanol, etanol, isopropanol, ácido acético e semelhantes. Quando o solvente é água, o solvato formado é especificamente denominado hidrato.



O termo “sal cristalino de cloridrato”, como aqui utilizado, significa um sólido cristalino que não inclui uma fracção molar substancialmente fixa de moléculas do solvente na rede cristalina, *i. e.*, um que não é um solvato. Os solvatos, ou especificamente hidratos, da invenção são explicitamente identificados.

Deverá ser notado que, como aqui utilizado na descrição e reivindicações em anexo, as formas singulares “um”, “uma” e “o” podem incluir referências múltiplas, a menos que o conteúdo refira nitidamente o contrário.

O termo “grupo de protecção amino” significa um grupo de protecção adequado para prevenir reacções não desejadas num azoto amino. Os grupos de protecção amino representativos incluem, mas não estão limitados a, formilo; grupos acilo, por exemplo grupos alcanoílo, tal como acetilo; grupos alcoxycarbonilo, tal como *terc*-butoxycarbonil(Boc); grupos arilmetoxycarbonilo, tais como benziloxycarbonilo (Cbz) e 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc); grupos arilmetilo, tais como benzilo (Bn), tritilo (Tr) e 1,1-di-(4'-metoxifenil)metilo; grupos sililo, tais como trimetilsililo (TMS) e *terc*-butildimetilsililo (TBDMS); e semelhantes.

#### Agente Activo

O agente activo nas presentes formas salinas, *i. e.* o composto de fórmula I, é designado {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico utilizando o software AutoNom disponível

(MDL Information Systems, GmbH, Frankfurt, Alemanha). A designação (1S,3R,SR) descreve a orientação relativa das ligações associadas com o sistema de anel bicíclico. O composto é denominado alternativamente como *N*-[(3-endo)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il]-1-(1-metiletil)-2-oxo-1,2-di-hidro-3-quinolinocarboxamida.

#### Formas Salinas da Invenção

Num aspecto, a invenção proporciona o cloridrato de {(1S,3R,5R)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonilmetil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico cristalino.

Um sal cristalino de cloridrato da invenção contém, tipicamente, entre cerca de 0,8 e cerca de 1,2 equivalentes molares de ácido clorídrico por equivalente molares do composto de fórmula I, incluindo entre cerca de 0,9 e cerca de 1,1 equivalentes molares de ácido clorídrico por equivalente molares do composto de fórmula I.

A proporção molares do ácido clorídrico relativamente ao agente activo pode ser rapidamente determinada por métodos disponíveis pelos especialistas na técnica. Por exemplo, tais proporções molareses podem ser rapidamente determinadas por titulação com uma solução padrão de nitrato de prata. Alternativamente, métodos de análise elementar, RMN de <sup>1</sup>H e cromatografia iónica, podem ser utilizados para determinar a proporção molares.

Num aspecto, o sal cristalino de cloridrato da presente invenção é caracterizado por um padrão de difracção de raio-X de pó (PXRD) com dois ou mais picos nos valores  $2\theta$  seleccionados de  $4,41\pm0,2$ ,  $8,82\pm0,2$ ,  $9,08\pm0,2$ ,  $11,21\pm0,2$ ,  $14,40\pm0,2$ ,  $16,42\pm0,2$ ,  $17,35\pm0,2$ ,  $17,61\pm0,2$ ,  $18,14\pm0,2$ ,  $19,04\pm0,2$ ,  $19,95\pm0,2$ ,  $20,20\pm0,2$ ,  $21,23\pm0,2$ ,  $22,13\pm0,2$ ,  $22,48\pm0,2$ ,  $22,83\pm0,2$ ,  $24,16\pm0,2$ ,  $25,37\pm0,2$ ,  $25,56\pm0,2$ ,  $26,22\pm0,2$ ,  $27,33\pm0,2$ ,  $29,08\pm0,2$  e  $29,61\pm0,2$ . Em particular, neste aspecto, a forma cristalina é caracterizada por um padrão de difracção de raio-X de pó com dois ou mais picos de difracção nos valores  $2\theta$  seleccionados de  $14,40\pm0,2$ ,  $17,35\pm0,2$ ,  $17,61\pm0,2$ ,  $19,04\pm0,2$ ,  $21,23\pm0,2$  e  $22,13\pm0,2$ .

Como é bem conhecido no campo de difracção de raio-X de pó, as posições dos picos dos espectros de PXRD são relativamente menos sensíveis aos detalhes experimentais, tais como detalhes de preparação de amostra e geometria de instrumentos, do que são os tamanhos relativos dos picos. Assim, num aspecto, um sal cristalino de cloridrato do composto de fórmula I é caracterizado por um padrão de difracção de raio-X de pó, no qual as posições dos picos estão substancialmente de acordo com aquelas mostradas na Figura 1.

O sal cristalino de cloridrato da presente invenção é também caracterizado pela estabilidade térmica de temperatura elevada como evidenciado pelo seu perfil de calorimetria de varrimento diferencial (DSC) que exhibe um pico no fluxo de calor endotérmico, na gama de cerca de  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$  até cerca de  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ , como ilustrado na Figura 2. Além disso, o perfil de análise gravimétrica térmica (TGA) não mostra acontecimentos térmicos significativos abaixo dos  $225\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Ainda noutro aspecto, um sal cristalino de cloridrato é caracterizado pelo seu espectro de absorção de infravermelho que mostra bandas de absorção significativas a cerca de 758, 783, 795, 802, 949, 981, 1149, 1158, 1217, 1332, 1377, 1453, 1467, 1487, 1525, 1566, 1575, 1615, 1672 e 3197  $\text{cm}^{-1}$ .

Um sal cristalino de cloridrato do composto de fórmula I tem demonstrado ter um perfil de absorção/desabsorção reversível com um nível excepcionalmente baixo de higroscopicidade (*i. e.*, inferior a cerca de 0,2% em ganho de peso na gama de humidade de 2% de humidade relativa a 90% de humidade relativa, à temperatura ambiente), como mostrado na Figura 3.

Além disso, o sal cristalino de cloridrato do composto de fórmula I demonstrou ser estável após exposição a temperatura elevada e humidade durante um período de tempo extenso. Por exemplo, após armazenamento durante 24 semanas a 40 °C e 75% de humidade relativa, a análise por HPLC não mostrou degradação química e não existiam alterações detectáveis nos resultados de DSC, TGA ou PXRD.

Noutro aspecto, a invenção proporciona um hidrato cristalino de um sal de cloridrato do composto de fórmula I.

Num aspecto, um hidrato cristalino de um sal de cloridrato da presente invenção é caracterizado por um padrão de difracção de raio-X de pó (PXRD), com dois ou mais picos de difracção, a valores de  $2\theta$  seleccionados de  $5,30\pm 0,2$ ,  $7,43\pm 0,2$ ,  $8,72\pm 0,2$ ,  $10,52\pm 0,2$ ,  $13,85\pm 0,2$ ,  $14,11\pm 0,2$ ,  $15,80\pm 0,2$ ,  $15,99\pm 0,2$ ,  $17,26\pm 0,2$ ,  $19,53\pm 0,2$ ,  $20,08\pm 0,2$ ,  $21,06\pm 0,2$ ,  $21,48\pm 0,2$ ,  $21,92\pm 0,2$ ,  $22,85\pm 0,2$ ,  $23,91\pm 0,2$ ,  $25,28\pm 0,2$ ,  $26,06\pm 0,2$ ,  $27,34\pm 0,2$ ,  $27,51\pm 0,2$  e  $29,67\pm 0,2$ . Em particular, neste aspecto,

a forma cristalina é caracterizada por um padrão de difracção de raio-X de pó, com dois ou mais picos de difracção, a valores  $2\theta$  seleccionados de  $10,52\pm0,2$ ,  $13,85\pm0,2$ ,  $15,80\pm0,2$ ,  $17,26\pm0,2$  e  $21,06\pm0,2$ .

Noutro aspecto, um hidrato cristalino de um sal de cloridrato do composto de fórmula I é caracterizado por um padrão de difracção de raio-X de pó, no qual as posições dos picos estão, substancialmente, de acordo com aquelas mostradas na Figura 4.

O hidrato cristalino de um sal de cloridrato da presente invenção é também caracterizado pelo seu perfil de calorimetria de varrimento diferencial (DSC) que exhibe um pico substancial no fluxo de calor endotérmico identificado com a fusão do cristal na gama de cerca de  $225\text{ }^{\circ}\text{C}$  até cerca de  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com endotérmicas amplas ou fracas a temperaturas baixas, como ilustrado na Figura 5. Além disso, o perfil da análise gravimétrica térmica (TGA) mostra que a temperatura de degradação é de cerca de  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Um hidrato cristalino de um sal de cloridrato do composto de fórmula I tem demonstrado ter um perfil de absorção/desabsorção à temperatura ambiente, acima da gama total de cerca de 2% a cerca de 90% de humidade relativa, como ilustrado na Figura 6. O hidrato cristalino exhibe menos do que 0,25% em ganho de peso entre cerca de 40% e cerca de 75% humidade relativa.

Estas propriedades das formas salinas desta invenção são depois ilustradas nos Exemplos abaixo.

### Processos Sintéticos

O agente activo,  $\{(1S,3R,5R)-8-[(R)-2\text{-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil}]-8\text{-azabicyclo}[3.2.1]\text{oct-3-il}\}$ amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico, pode ser preparado a partir de materiais de partida rapidamente disponíveis, utilizando os processos descritos nos Exemplos abaixo ou utilizando os processos descritos nos pedidos U.S. do mesmo titular enumerados na secção dos Antecedentes deste pedido.

Para preparar um sal cristalino de cloridrato da invenção, a  $\{(1S,3R,5R)-8-[(R)-2\text{-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil}]-8\text{-azabicyclo}[3.2.1]\text{oct-3-il}\}$ amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico é, tipicamente, colocada em contacto com cerca de 1 a cerca de 1,5 molares equivalentes, incluindo cerca de 1 a cerca de 1,2 molares equivalentes, de ácido clorídrico concentrado. Geralmente, esta reacção é efectuada num diluente inerte a uma temperatura que varia desde cerca de 20 °C a cerca de 80 °C. Os diluentes inertes adequados para esta reacção incluem, mas não estão limitados a, etanol, metanol, isopropanol, acetato de etilo, acetonitrilo, tolueno, tetra-hidrofurano e as suas combinações.

Após a reacção estar completa, é isolado um sal cristalino da invenção a partir da mistura reaccional, através de qualquer meio convencional, tais como precipitação, concentração, centrifugação e semelhantes.

O hidrato cristalino pode ser preparado por dissolução do sal de cloridrato da  $\{(1S,3R,5R)-8-[(R)-2\text{-hidroxi-3-}$

(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico em água a uma concentração acima dos 50 mg/mL, que proporciona uma suspensão a partir da qual o hidrato cristalino resultante pode ser isolado, através de meios convencionais.

### Composições Farmacêuticas

As formas salinas cristalino de cloridrato da invenção são tipicamente administradas a um doente na forma de uma composição farmacêutica. Tais composições farmacêuticas podem ser administradas a um doente através de qualquer via de administração aceitável incluindo, mas não limitada a, oral, rectal, vaginal, nasal, inalada, tópica (incluindo transdérmica) e modos parentéricos de administração.

Consequentemente, num dos aspectos da composição, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável ou excipiente e uma quantidade terapêuticamente eficaz de um sal cristalino de cloridrato de um composto de fórmula I. Opcionalmente, tais composições farmacêuticas podem conter outros agentes de formulação e/ou terapêuticos, se desejado.

As composições farmacêuticas da invenção contêm, tipicamente, uma quantidade terapêuticamente eficaz de um sal cristalino da presente invenção. Tipicamente, tais composições farmacêuticas irão conter desde cerca de 0,1 a cerca de 95% em peso do agente activo; incluindo desde cerca de 1 a cerca de 70% em peso, tal como desde cerca de 5 a cerca de 60% em peso do agente activo.

Qualquer veículo ou excipiente convencional pode ser utilizado nas composições farmacêuticas da invenção. A escolha de um veículo ou excipiente em particular, ou combinações dos veículos ou excipientes, irá depender do modo de administração a ser utilizado para tratar um doente em particular ou tipo de patologia médica ou estado de doença. Considerando este aspecto, a preparação de uma composição farmacêutica adequada para um modo de administração em particular, está bem dentro do âmbito dos especialistas na técnica farmacêutica. Adicionalmente, os ingredientes para tais composições estão disponíveis comercialmente, por exemplo, de Sigma, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178. Através de ilustrações posteriores, as técnicas de formulação convencionais são descritas em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edição, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); e H.C. Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ª Edição, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland-(1999).

Os exemplos representativos de materiais que servem como veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados aos seguintes: (1) açúcares, tais como lactose, glucose e sacarose; (2) amidos, tais como amido de milho e amido de batata; (3) celulose, tal como celulose microcristalina e os seus derivados, tais como carboximetilcelulose de sódio, etilcelulose e acetato de celulose; (4) tragacanto em pó; (5) malte; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tais como manteiga de cacau e ceras de supositório; (9) óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de girassol, óleo de sésamo, azeite, óleo de milho e óleo de soja; (10) glicóis, tais como, propilenoglicol; (11) polióis, tais como glicerina, sorbitol, manitol e polietilenoglicol;



(12) ésteres, tais como oleato de etilo e laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tais como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; (15) ácido algínico; (16) água livre de pirogêneos; (17) solução salina isotónica; (18) solução de Ringer; (19) álcool etílico; (20) soluções tampão de fosfatos; e (21) outras substâncias compatíveis não tóxicas, empregues nas composições farmacêuticas.

As composições farmacêuticas da invenção são tipicamente preparadas através de uma mistura íntima e profunda, ou combinação de um composto com um veículo farmacêuticamente aceitável e um ou mais ingredientes opcionais. Se necessário ou desejado, a mistura uniformemente misturada resultante, pode depois ser moldada ou carregada em comprimidos, cápsulas, pílulas e semelhantes, utilizando processos e equipamentos convencionais.

As composições farmacêuticas da invenção são, de um modo preferido, embaladas numa forma de dosagem unitária. O termo "forma de dosagem unitária" refere-se a uma unidade fisicamente discreta adequada para dosear um doente, *i. e.*, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de agente activo, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado sozinho ou em combinação com uma ou mais unidades adicionais. Por exemplo, tais formas de dosagem unitárias podem ser cápsulas, comprimidos, pílulas e semelhantes.

Numa forma de realização preferida, as composições farmacêuticas da invenção são adequadas para administração oral. As composições farmacêuticas adequadas para administração oral podem estar na forma de cápsulas, comprimidos, pílulas, pastilhas, hóstias, dragueias, pós, grânulos; ou como uma

solução ou uma suspensão num líquido aquoso ou não aquoso; ou como uma emulsão óleo-em-água ou água-em-óleo; ou como um elixir ou xarope; e semelhantes; cada uma contendo uma quantidade predeterminada de um composto da presente invenção, como um ingrediente activo.

Quando se pretende a administração oral numa forma de dosagem sólida (*i. e.*, como cápsulas, comprimidos, pílulas e semelhantes), as composições farmacêuticas da invenção irão, tipicamente, compreender um composto da presente invenção como o ingrediente activo e um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis, tais como citrato de sódio ou fosfato dicálcio. Opcionalmente ou alternativamente, tais formas de dosagem sólidas podem compreender também: (1) enchimentos ou extensores, tais como amidos, celulose microcristalina, lactose, sacarose, glucose, manitol e/ou ácido silícico; (2) ligandos, tais como carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarose e/ou acácia; (3) humidificantes, tal como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tais como agar-agar, carbonato de cálcio, amido de batata ou tapioca, ácido algínico, certos silicatos e/ou carbonato de sódio; (5) agentes de retardamento de solução, tal como parafina; (6) aceleradores de absorção, tal como composto de amónio quaternário; (7) agentes humidificantes, tais como álcool cetílico e/ou monoestearato de glicerilo; (8) absorventes, tais como caolino e/ou argila de bentonite; (9) lubrificantes, tais como talco, estearato de cálcio, estearato de magnésio, polietilenoglicóis sólidos, laurilsulfato de sódio e/ou as suas misturas; (10) agentes corantes; e (11) agentes tamponantes.

Agentes de libertação, agentes de humedificação, agentes de revestimento, adoçantes, agentes de aroma e perfumantes,

conservantes e antioxidantes, podem também estar presentes nas composições farmacêuticas da invenção. Exemplos de antioxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, sulfito de sódio e metabissulfito de sódio e semelhantes; (2) antioxidantes solúveis em água, tais como palmitato de ascorbilo, hidroxianisole butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propilgalato, alfa-tocoferol e semelhantes; e (3) agentes quelantes metálicos, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e semelhantes. Agentes de revestimento para comprimidos, cápsulas, pílulas e semelhantes, incluem aqueles utilizados para revestimentos entéricos, tais como acetofalato de celulose (CAP), ftalato de polivinilacetato (PVAP), ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, copolímeros do éster do ácido metacrílico-ácido metacrílico, trimetilato de acetato de celulose (CAT), carboximetiletilcelulose (CMEC), acetato de hidroxipropilmetilcelulose succinato (HPMCAS) e semelhantes.

Se desejado, as composições farmacêuticas da presente invenção podem também ser formuladas para proporcionar libertação lenta ou controlada do ingrediente activo, utilizando a título de exemplo, hidroxipropilmetilcelulose em proporções variadas; ou outras matrizes poliméricas, lipossomas e/ou microesferas.

Além disso, as composições farmacêuticas da presente invenção podem, opcionalmente, conter agentes opacificadores e podem ser formulados de modo a libertar apenas o ingrediente activo ou, de um modo preferido, numa determinada proporção do tracto gastrointestinal, opcionalmente, de um modo retardado.

Exemplos de composições de combinação que podem ser utilizadas incluem substâncias poliméricas e ceras. O ingrediente activo pode estar também na forma micro-encapsulada, se apropriado, com um ou mais dos excipientes descritos acima.

As formas de dosagem líquidas adequadas para administração oral incluem, como meio de ilustração, emulsões farmacêuticamente aceitáveis, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes e elixires. Tais formas de dosagem líquidas compreendem, tipicamente, o ingrediente activo e um diluente inerte, tal como, por exemplo, água ou outros solventes, agentes de solubilização e emulsionantes, tais como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, álcool benzílico, benzoato de benzilo, propilenoglicol, 1,3-butilenoglicol, óleos (esp., óleos de semente de algodão, amendoim, milho, germen, azeitona, rícínio e sésamo), glicerol, álcool tetra-hidrofurílico, polietilenoglicóis e ésteres de ácido gordo de sorbitano e as suas misturas. As suspensões além do ingrediente activo, podem conter agentes de suspensão tais como, por exemplo, álcoois isoestarílicos etoxilados, ésteres de polioxietilenossorbitol e sorbitano, celulose microcristalina, meta-hidróxido de alumínio, bentonite, agar-agar e tragacanto, e as suas misturas.

Alternativamente, as composições farmacêuticas da invenção são formuladas para administração por inalação. As composições farmacêuticas adequadas para administração por inalação irão, tipicamente, estar na forma de um aerossol ou um pó. Tais composições são, geralmente, administradas utilizando dispositivos de distribuição bem conhecidos, tais como um inalador de dose calibrada, um inalador de pó seco, um nebulizador ou um dispositivo de distribuição semelhante.

Quando administrado por inalação, utilizando um recipiente pressurizado, as composições farmacêuticas da invenção irão, tipicamente, compreender o ingrediente activo e um propulsor adequado, tais como o diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono ou outro gás adequado.

Adicionalmente, a composição farmacêutica pode estar na forma de uma cápsula ou cartucho (preparada, por exemplo, a partir de gelatina), compreendendo um composto da invenção e um pó adequado para utilização num inalador de pó. As bases de pó adequadas incluem, a título de exemplo, lactose ou amido.

Os compostos da invenção podem também ser administrados transdermicamente, utilizando sistemas de distribuição transdérmicos conhecidos e excipientes. Por exemplo, um composto da invenção pode ser misturado com potenciadores de permeação, tais como propilenoglicol, monolaurato de polietilenoglicol, azacicloalcan-2-onas e semelhantes, e incorporado num adesivo ou sistema de distribuição semelhante. Os excipientes adicionais, incluindo agentes de gelificação, emulsionantes e tampões, podem ser utilizados em tais composições transdérmicas, se desejado.

As formulações seguintes ilustram composições farmacêuticas representativas da presente invenção:

#### Exemplo de Formulação A

As cápsulas de gelatina dura para administração oral são preparadas como se segue:

Ingredientes	Quantidade
Sal da invenção	50 mg
Lactose (seca por vaporização)	200 mg
Estearato de magnésio	10 mg

Processo representativo: Os ingredientes são exaustivamente misturados e depois carregados numa cápsula de gelatina dura (260 mg de composição por cápsula).

#### Exemplo de formulação B

As cápsulas de gelatina dura para administração oral são preparadas como se segue:

Ingredientes	Quantidade
Sal da invenção	20 mg
Amido	89mg
Celulose microcristalina	89 mg
Estearato de magnésio	2 mg

Processo representativo: Os ingredientes são exaustivamente misturados e depois feitos passar através de um peneiro de malha U.S. N° 45 e carregados numa cápsula de gelatina dura (200 mg de composição por cápsula).

#### Exemplo de formulação C

As cápsulas para administração oral são preparadas como se segue:

Ingredientes	Quantidade
Sal da invenção	10 mg
Monooleato de polioxietilenosorbitano	50 mg
Pó de amido	250 mg

Processo representativo: Os ingredientes são exaustivamente misturados e depois carregados numa cápsula de gelatina (310 mg de composição por cápsula).

#### Exemplo de formulação D

Os comprimidos para administração oral são preparados como se segue:

Ingredientes	Quantidade
Sal da invenção	5 mg
Amido	50 mg
Celulose microcristalina	35 mg
Polivinilpirrolidona (10% em peso em água)	4 mg
Carboximetilamido de sódio	4,5 mg
Estearato de magnésio	0,5 mg
Talco	1 mg

Processo representativo: O ingrediente activo, amido e celulose são feitos passar através de um peneir de malha U.S.

nº 45 e exaustivamente misturados. A solução de polivinilpirrolidona é misturada com o pó resultante e esta mistura é depois feita passar através de um peneir de malha U.S. nº 14. Os grânulos assim produzidos são secos a 50-60 °C e feitos passar através de um peneiro de malha U.S. Nº 18. O carboximetilamido de sódio, estearato de magnésio e talco (previamente passados através de um peneiro de malha U.S. Nº 60) são depois adicionados aos grânulos. Após agitação, a mistura é prensada numa máquina de compressão para proporcionar um comprimido pesando 100 mg.

#### Exemplo de formulação E

Os comprimidos para administração oral são preparados como se segue:

Ingredientes	Quantidade
Sal da invenção	25 mg
Celulose microcristalina	400 mg
Dióxido de silício fumegante	10 mg
Ácido esteárico	5 mg

Processo representativo: Os ingredientes são exaustivamente misturados e depois compressos para formar comprimidos (440 mg da composição por comprimido).



#### Exemplo de formulação F

Os comprimidos de pontuação individual, para administração oral, são preparados como se segue:

Ingredientes	Quantidade
Sal da invenção	15 mg
Amido de milho	50 mg
Croscarmelose de sódio	25 mg
Lactose	120 mg
Estearato de magnésio	5 mg

Processo representativo: Os ingredientes são exaustivamente misturados e prensados de modo a formar um comprimido de pontuação individual (215 mg de composição por comprimido).

#### Exemplo de formulação G

Uma suspensão para administração oral é preparada como se segue:

Ingredientes	Quantidade
Sal da invenção	0,1 g
Ácido fumárico	0,5 g
Cloreto de sódio	2,0 g
Metilparabeno	0,15 g
Propilparabeno	0,05 g
Açúcar granulado	25,5 g
Sorbitol (solução a 70%)	12,85 g
Veegum k (Vanderbilt Co.)	1,0 g
Aromatizante	0,035 mL
Corantes	0,5 mg
Água destilada	q.s. para 100 mL

Processo representativo: Os ingredientes são misturados para formar uma suspensão contendo 10 mg do ingrediente activo por 10 mL de suspensão.

#### Exemplo de formulação H

Um pó seco para administração por inalação é preparado como se segue:

Ingredientes	Quantidade
Sal da invenção	1,0 mg
Lactose	25 mg

Processo representativo: O ingrediente activo é micronizado e depois combinado com a lactose. Esta mistura combinada é depois carregada num cartucho de inalação de gelatina. Os conteúdos do cartucho são administrados utilizando um inalador de pó.

#### Exemplo de formulação I

Um pó seco para administração por inalação num inalador de dose doseada é preparado como se segue:

Processo representativo: Uma suspensão contendo 5% em peso de um sal da invenção e 0,1% em peso de lecitina, é preparado por dispersão de 10 g do composto activo como partículas micronizadas com tamanho médio inferior a 10 µm numa solução formada a partir de 0,2 g de lecitina, dissolvidas em 200 mL de água desmineralizada. A suspensão é seca por vaporização e o

material resultante é micronizado em partículas com um diâmetro médio inferior a 1,5 µm. As partículas são carregadas em cartuchos com 1,1,1,2-tetrafluoroetano pressurizado.

#### Exemplo de formulação J

Uma formulação injectável é preparada como se segue:

Ingredientes	Quantidade
Sal da invenção	0,2 g
Solução tampão de acetato de sódio (0,4 M)	40 mL
HCl (0,5 N) ou NaOH (0,5 N)	q.s. para pH 4
Água (destilada, estéril)	q.s. para 20 mL

Processo representativo: Os ingredientes acima são combinados e o pH é ajustado para  $4 \pm 0,5$ , utilizando HCl 0,5 N ou NaOH 0,5 N.

#### Exemplo de formulação K

As cápsulas para administração oral são preparadas como se segue:

Ingredientes	Quantidade
Sal da invenção	4,05 mg
Celulose microcristalina (Avicel PH 103)	259,2 mg
Estearato de magnésio	0,75 mg

Processo representativo: Os ingredientes são exaustivamente misturados e depois carregados numa cápsula de gelatina (Tamanho N° 1, White, Opaque) (264 mg de composição por cápsula).

#### Exemplo de formulação L

As cápsulas para administração oral são preparadas como se segue:

Ingredientes	Quantidade
Sal da invenção	8,2 mg
Celulose microcristalina (Avicel PH 103)	139,05 mg
Estearato de magnésio	0,75 mg

Processo representativo: Os ingredientes são exaustivamente misturados e depois carregados numa cápsula de gelatina (Tamanho N° 1, White, Opaca) (148 mg de composição por cápsula).

#### Utilidade

O composto de fórmula I, {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico é um agonista do receptor 5-HT<sub>4</sub> e, deste modo, espera-se que as presentes formas cristalinas de sal do composto de fórmula I sejam úteis para tratar patologias médicas mediadas por receptores 5-HT<sub>4</sub> ou associadas à actividade do receptor 5-HT<sub>4</sub>, i. e., patologias médicas que são aliviadas por tratamento com um agonista do receptor 5-HT<sub>4</sub>. Tais patologias médicas incluem, mas não são limitadas a, síndrome do intestino

irritável (IBS), obstipação crónica, dispepsia funcional, esvaziamento gástrico retardado, doença de refluxo gastroesofageal (GERD), gastroparesia, gastropatia diabética e idiopática, ileo pós-cirurgia, obstrução pseudo-intestinal e trânsito retardado induzido por fármaco. Além disso, tem sido sugerido que alguns compostos agonistas do receptor 5-HT<sub>4</sub> podem ser utilizados no tratamento de distúrbios do sistema nervoso central, incluindo distúrbios cognitivos, distúrbios comportamentais, distúrbios de humor e distúrbios de controlo de função autónoma.

Em particular, as formas salinas da invenção aumentam a motilidade do tracto gastrointestinal (GI) e, assim, espera-se que sejam úteis para tratar distúrbios do tracto GI, provocado por motilidade reduzida em mamíferos, incluindo humanos. Tais distúrbios de motilidade do GI incluem, como meio de ilustração, obstipação crónica, síndrome do intestino irritável com obstipação predominante (C-IBS), gastroparesia diabética e idiopática e dispepsia funcional.

Deste modo, num aspecto, a invenção encontra utilidade num método de aumentar a motilidade do tracto gastrointestinal num mamífero, o método compreendendo administrar ao mamífero uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica, compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável e um sal cristalino da invenção.

Quando utilizado para tratar distúrbios de motilidade reduzida do tracto GI ou outras patologias mediadas pelos receptores 5-HT<sub>4</sub>, as formas salinas da invenção irão, tipicamente, ser administradas oralmente numa dose diária única ou em doses múltiplas por dia, embora possam ser utilizadas

outras formas de administração. A quantidade de agente activo administrada por dose ou a quantidade total administrada por dia irá, tipicamente, ser determinada por um médico, à luz das circunstâncias relevantes, incluindo a patologia a ser tratada, a via escolhida de administração, o composto actual administrado e a sua actividade relativa, a idade, peso e resposta do doente individual, a gravidade dos sintomas do doente e semelhantes.

Espera-se que as doses adequadas para tratar distúrbios de motilidade reduzida do tracto GI ou outros distúrbios mediados pelos receptores 5-HT<sub>4</sub> variem na gama desde cerca de 0,0007 a cerca de 20 mg/kg/dia de agente activo, incluindo desde cerca de 0,0007 a cerca de 1 mg/kg/dia. Para um humano com 70 kg de peso médio, isto irá significar uma quantidade desde cerca de 0,05 a cerca de 70 mg por dia do agente activo.

Assim, as formas salinas da invenção podem ser utilizadas para tratar a obstipação crónica. Quando utilizados para tratar a obstipação crónica, os sais da invenção irão, tipicamente, ser administrados oralmente numa dose diária única ou em doses múltiplas por dia. Espera-se que a dose para tratar a obstipação crónica varie desde cerca de 0,05 a cerca de 70 mg por dia.

As formas salinas da invenção podem ser utilizadas para tratar a síndrome do intestino irritável. Quando utilizadas para tratar a síndrome do intestino irritável com obstipação predominante, os sais da invenção irão, tipicamente, ser administrados oralmente numa dose diária única ou em doses múltiplas por dia. Espera-se que a dose para tratar a síndrome do intestino irritável com obstipação predominante varie de cerca desde 0,05 a cerca de 70 mg por dia.

As formas salinas da invenção podem ser utilizadas para tratar gastroparesia diabética e idiopática. Quando utilizadas para tratar a gastroparesia diabética idiopática, os sais da invenção irão, tipicamente, ser administrados oralmente, numa dose diária individual ou em doses múltiplas por dia. Espera-se que a dose para tratar a gastroparesia diabética varie desde cerca de 0,05 a cerca de 70 mg por dia.

As formas salinas da invenção podem ser utilizadas para tratar dispepsia funcional. Quando utilizados para tratar a dispepsia funcional, os compostos da invenção irão, tipicamente ser administrados oralmente numa dose diária única ou em doses múltiplas por dia. Espera-se que a dose para tratar a dispepsia funcional varie desde cerca de 0,05 a cerca de 70 mg por dia.

A invenção encontra utilidade num método de tratamento de um mamífero com uma doença ou patologia associada com a actividade do receptor 5-HT<sub>4</sub>, o método compreendendo administrar ao mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma forma de sal da invenção ou de uma composição farmacêutica, compreendendo uma forma de sal da invenção.

Como descrito acima, as formas salinas da invenção são agonistas do receptor 5-HT<sub>4</sub>. Deste modo, a invenção encontra também utilidade num método de agonizar um receptor de 5-HT<sub>4</sub> num mamífero, o método compreendendo administrar uma forma salina da invenção ao mamífero.

Estas propriedades, bem como a utilidade das formas salinas de cloridrato da invenção, podem ser demonstradas utilizando vários ensaios *in vitro* e *in vivo* bem conhecidos pelos

especialistas na técnica. Os ensaios representativos são descritos em maior detalhe nos seguintes exemplos.

### **EXEMPLOS**

Os seguintes exemplos sintéticos e biológicos são proporcionados para ilustrar a invenção e não são para serem entendidos de qualquer modo como limitando o âmbito da invenção. Nos exemplos baixo, as seguintes abreviaturas têm os seguintes significados, a menos salvo indicação em contrário. As abreviaturas não definidas abaixo, têm os significados normalmente aceites.

Boc =	<i>terc</i> -butoxicarbonilo
(Boc) <sub>2</sub> O =	di- <i>terc</i> -butildicarbonato
DCM =	diclorometano
DMF =	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO =	dimetilsulfóxido
EtOAc =	acetato de etilo
mCPBA =	ácido <i>m</i> -clorobenzóico
MeCN =	acetonitrilo
MTBE =	éter <i>terc</i> -butilmetílico



PyBop = hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidino-fosfónio

R<sub>f</sub> = factor de retenção

t.a. = temperatura ambiente

TFA = ácido trifluoroacético

THF = tetra-hidrofurano

Os reagentes (incluindo aminas secundárias) e solventes foram adquiridos de fornecedores comerciais (Aldrich, Fluka, Sigma, etc.) e utilizados sem purificação posterior. As reacções foram efectuadas sob atmosfera de azoto, a não ser que seja referido de outro modo. O progresso das misturas reaccionais foi monitorizado por cromatografia de camada fina (TLC), cromatografia líquida de elevado desempenho analítica (HPLC anal.) e espectrofotometria de massa, os detalhes dos quais são apresentados abaixo e em separado, nos exemplos específicos das reacções. As misturas reaccionais foram efectuadas como especificamente descrito em cada reacção; normalmente, são purificados por extracção e outros métodos de purificação, tal como cristalização dependente do solvente e da temperatura e precipitação. Além disso, misturas reaccionais foram purificadas, de modo rotineiro, por HPLC preparativa. A caracterização dos produtos reaccionais foi efectuada de modo rotineiro por espectroscopia de massa e RMN de <sup>1</sup>H. Para determinações de RMN, as amostras foram dissolvidas em solvente deuterado (CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub> ou DMSO-*d*<sub>6</sub>) e os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram efectuados num aparelho Varian Gemini 2000 (300 MHz), sob as condições de observação convencionais. A identificação dos

compostos por espectroscopia de massa foi efectuada por um método de ionização por electrospray (ESMS) com um aparelho da Applied Biosystems (Foster City, CA), modelo API 150 EX ou um aparelho da Agilent (Palo Alto, CA), modelo 1100 LC/MSD. O conteúdo em água é determinado por titulação de Karl Fischer, utilizando um colorímetro da Brinkmann (Westbury, NI) Metrohm Karl Fischer Model 813.

**Preparação 1: éster terc-butílico do ácido (1*S*,3*R*,5*R*)-3-amino-8-azabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxílico**

a. Preparação de 8-benzil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ona

Foi adicionado ácido clorídrico concentrado (30 mL) à solução heterogénea de 2,5-dimetoxitetra-hidrofurano (82,2 g, 0,622 mol) em água (170 mL), com agitação. Num frasco separado, arrefecido para 0 °C (banho de gelo), foi adicionado, lentamente, ácido clorídrico concentrado (92 mL) a uma solução de benzilamina (100 g, 0,933 mol) em água (350 mL). A solução de 2,5-dimetoxitetra-hidrofurano foi agitada durante aproximadamente 20 min, diluída com água (250 mL) e, depois, a solução de benzilamina foi adicionada, seguida por adição de uma solução de ácido 1,3-acetonedicarboxílico (100 g, 0,684 mol) em água (400 mL) e, depois, a adição de hidrogenofosfato de sódio (44 g, 0,31 mol) em água (200 mL). O pH foi ajustado de pH 1 para pH ~4,5, utilizando NaOH a 40%. A solução amarelo-pálido e turva resultante, foi agitada de um dia para o outro. A solução foi depois acidificada para pH 3 a partir de pH 7,5 utilizando ácido clorídrico a 50%, aquecida para 85 °C e agitada durante 2 horas. A solução foi arrefecida para a temperatura ambiente, basificada para pH 12, utilizando NaOH a 40% e extraída com

diclorometano (3 x 500 mL). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com solução salina, secas ( $\text{MgSO}_4$ ), filtradas e concentradas sob pressão reduzida, para produzir o intermediário do título em bruto como um óleo castanho viscoso.

A uma solução do intermediário em bruto em metanol (1000 mL), foi adicionado dicarbonato de di-terc-butilo (74,6 g, 0,342 mol) a 0 °C. A solução foi deixada a aquecer para a temperatura ambiente e agitada de um dia para o outro. O metanol foi removido sob pressão reduzida e o óleo resultante foi dissolvido em diclorometano (1000 mL). O intermediário foi extraído em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 M (1000 mL) e lavado com diclorometano (3 x 250 mL). A camada aquosa foi basificada para pH 12, utilizando NaOH aquoso foi extraída com diclorometano (3 x 500 mL). As camadas orgânicas combinadas foram secas ( $\text{MgSO}_4$ ), filtradas e concentradas sob pressão reduzida, para produzir o intermediário do título como um óleo castanho claro viscoso. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7,5-7,2 (m, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 3,7 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3,45 (ampla s, 2H,  $\text{CH-NBn}$ ), 2,7-2,6 (dd, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2,2-2,1 (dd, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2,1-2,0 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1,6 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ). ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd para  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}$  216,14; verificado, 216,0.

b. Preparação do éster terc-butílico do ácido 3-oxo-8-azabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxílico

A uma solução de 8-benzil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ona (75 g, 0,348 mol) em EtOAc (300 mL), foi adicionada uma solução de dicarbonato de di-terc-butilo (83,6 g, 0,383 mol, 1,1 eq) em EtOAc (300 mL). A solução resultante e lavagem (100 mL de EtOAc), foram adicionados a um recipiente de Parr de hidrogenação de 1 L, contendo 23 g de hidróxido de paládio (20% em peso de Pd, base seca em carbono, ~50% de humidade com água;

e. g., catalisador de Pearlman) sob uma corrente de azoto. O recipiente reaccional foi desgaseificado (alternando vácuo e N<sub>2</sub> cinco vezes) e pressurizado para 60 psi de H<sub>2</sub> gasoso. A solução reaccional foi agitada durante dois dias e recarregada com H<sub>2</sub> consoante necessário para manter a pressão de H<sub>2</sub>, a 60 psi, até a reacção estar completa como monitorizado por cromatografia de camada fina em sílica. A solução preta foi depois filtrada através de uma almofada de Celite® e concentrada sob pressão reduzida, para proporcionar o intermediário do título, quantitativamente como um óleo amarelo alaranjado viscoso. Foi utilizado no passo seguinte sem tratamento posterior. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) 4,5 (ampla, 2H, CH-NBoc), 2,7 (ampla, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 2,4-2,3 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,1 (ampla m, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 1,7-1,6 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1,5 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCON)).

c. Preparação do éster *terc*-butílico do ácido (1*S*,3*R*,5*R*)-3-amino-8-azabicyclo[3,2,1]octano-8-carboxílico

A uma solução do produto do passo anterior (75,4 g, 0,335 mol) em metanol (1 L), foi adicionado formato de amónio (422,5 g, 6,7 mol), água (115 mL) e 65 g de paládio em carbono activado (10% numa base seca, ~50% húmido com água; tipo Degussa E101NE/W) sob uma corrente de N<sub>2</sub>, com agitação em simultâneo, via agitação mecânica. Após 24 e 48 horas, foram adicionadas porções extra de formato de amónio (132 g, 2,1 mol) de cada vez. Após o progresso da reacção ter cessado, como monitorizado por HPLC anal., foi adicionada Celite® (>500 g) e a suspensão espessa resultante foi filtrada e, depois, o sólido recolhido foi enxaguado com metanol (~500 mL). Os filtrados foram combinados e concentrados sob pressão reduzida, até todo o metanol ter sido

removido. A solução bifásica turva resultante foi depois diluída com ácido fosfórico 1 M, para um volume final de ~1,5 a 2,0 L a pH 2 e lavada com diclorometano (3 x 700 mL). A camada aquosa foi basificada para pH 12, utilizando NaOH aq. a 40% e extraída com diclorometano (3 x 700 mL). As camadas orgânicas combinadas foram secas sob  $\text{MgSO}_4$ , filtrados e concentrados por evaporação rotativa, depois o alto vácuo, deixando 52 g (70%) do intermediário do título, normalmente *N*-Boc-endo-3-aminotropano, como um sólido branco a amarelo pálido. A proporção do isômero da amina *endo* a *exo* do produto foi >99, baseada numa análise de RMN de  $^1\text{H}$  (>96% pureza por HPLC analítica). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 4,2-4,0 (ampla d, 2H,  $\text{CHNBoc}$ ), 3,25 (t, 1H,  $\text{CHNH}_2$ ), 2,1-2,05 (m, 4H), 1,9 (m, 2H), 1,4 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{OCON}$ ), 1,2-1,1 (ampla, 2H). ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$  227,18; verificado, 227,2. HPLC analítico (método isocrático; 2:98 (A:B) a 90:10 (A:B) durante 5 min): tempo de retenção = 2,14 min.

#### **Preparação de ácido 2:1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico**

Primeiro foi adicionada acetona (228,2 mL, 3,11 mol) a uma suspensão agitada de 2-aminofenilmetanol (255,2 g, 2,07 mol) e ácido acético (3,56 mL, 62 mmol) em água (2 L) à temperatura ambiente. Após 4 h, a suspensão foi arrefecida para 0 °C e agitada durante mais 2,5 h e depois filtrada. O sólido foi recolhido e lavado com água e o sólido húmido arrefecido e seco por liofilização para proporcionar 2,2,-dimetil-1,4-di-hidro-2*H*-benzo[1,3]oxazina (332,2 g, 98%), como um sólido branco sujo. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz): 1,48 (s, 6H,  $\text{C}(\underline{\text{CH}_3})_2$ ), 4,00 (bs, 1H, NH), 4,86 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,66 (d, 1H,  $\text{ArH}$ ), 6,81 (t, 1H,  $\text{ArH}$ ), 6,96 (d, 1H,  $\text{ArH}$ ), 7,10 (t, 1H,  $\text{ArH}$ ).

Uma solução de 2,2,-dimetil-1,4-di-hidro-2H-benzo[1,3]oxazina (125 g, 0,77 mol) em THF (1 L), foi filtrada através de um funil de cintilação e depois adicionada, gota a gota, via um funil de adição, durante um período de 2,5 h, a uma solução agitada de  $\text{LiAlH}_4$  1,0 M em THF (800 mL) a 0 °C. A reacção foi atenuada por adição lenta, em porções, de  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (110 g), durante um período de 1,5 h a 0 °C. A mistura reaccional foi agitada, de um dia para o outro, filtrada e os sais de sólido foram lavados a fundo com THF. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, para proporcionar o 2-isopropilaminofenilmetanol (120 g, 95%) como um óleo amarelo. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz): 1,24 (d, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3,15 (bs, 1H,  $\text{OH}$ ), 3,61 (sept, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 4,57 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,59 (t, 1H,  $\text{ArH}$ ), 6,65 (d, 1H,  $\text{ArH}$ ), 6,99 (d, 1H,  $\text{ArH}$ ), 7,15 (t, 1H,  $\text{ArH}$ ).

Foi adicionado dióxido de manganésio (85% 182,6 g, 1,79 mol) a uma solução agitada de 2-isopropilaminofenilmetanol (118 g, 0,71 mol) em tolueno (800 mL) e a mistura reaccional foi aquecida para 117 °C durante 4 h. A mistura reaccional foi deixada a arrefecer à temperatura ambiente, de um dia para o outro, e depois filtrada através de uma almofada de Celite que foi eluída com tolueno. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para proporcionar o 2-isopropilaminobenzaldeído (105 g, 90%) como um óleo laranja. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz): 1,28 (d, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3,76 (sept, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 6,65 (t, 1H,  $\text{ArH}$ ), 6:69 (d, 1H,  $\text{ArH}$ ), 7,37 (d, 1H,  $\text{ArH}$ ), 7,44 (t, 1H,  $\text{ArH}$ ), 9,79 (s, 1H,  $\text{CHO}$ ).

A 2,2-dimetil-[1,3]dioxano-4,6-diona, normalmente ácido de Meldrum, (166,9 g, 1,16 mol) foi adicionada a uma solução agitada de 2-isopropilaminobenzaldeído (105 g, 0,64 mol), ácido acético (73,6 mL, 1,29 mol) e etilenodiamina (43,0 mL, 0,64 mol)

em metanol (1 L) a 0 °C. A mistura reaccional foi agitada durante 1 h a 0 °C e, depois, à temperatura ambiente, de um dia para o outro. A suspensão resultante foi filtrada e o sólido foi lavado com metanol e recolhido para proporcionar o intermediário do título, ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico (146 g, 98%) como um sólido branco sujo. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz): 1,72 (d, 6H,  $\text{CH}(\underline{\text{CH}_3})_2$ ), 5,50 (bs, 1H,  $\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$ ), 7,44 (t, 1H,  $\text{Ar}\underline{\text{H}}$ ), 7,75-7,77 (m, 2H,  $\text{Ar}\underline{\text{H}}$ ), 7,82 (d, 1H,  $\text{Ar}\underline{\text{H}}$ ), 8,89 (s, 1H,  $\underline{\text{CH}}$ ).

**Exemplo 1: Síntese da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico**

a. Preparação do éster *tert*-butílico do ácido (1*S*,3*R*,5*R*)-3-[1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carbonil)amino]-8-azabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxílico

Num frasco de 3 L, o ácido de 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico (112,4 g, 0,486 mol, 1,1 eq) foi suspenso em tolueno (1 L). A mistura foi aquecida para 85 °C e foi adicionado, gota a gota, cloreto de tionilo (86,74 g, 0,729 mol) durante 70 min. A mistura foi aquecida a 95 °C durante 1,5 h, com agitação e, depois, deixada a arrefecer para a temperatura ambiente.

Num frasco de 12 L separado, o éster de *tert*-butílico do ácido (1*S*,3*R*,5*R*)-3-amino-8-azabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxílico (100,0 g, 0,442 mol, 1 eq) foi suspenso em tolueno (1 L) e foi adicionado NaOH 3 M (4 eq). A mistura foi agitada à temperatura

ambiente durante 10 min e, depois, arrefecida para cerca de 5 °C. A solução de ácido clorídrico foi adicionada lentamente com agitação, durante 40 min, mantendo a temperatura interna abaixo dos 10 °C. A mistura foi agitada a 3-5 °C durante 30 min e as camadas foram deixadas a separar, de um dia para o outro. A camada de tolueno (~2.5 L) foi recolhida, concentrada para cerca de metade (~1,2 L), por evaporação rotativa e utilizada directamente no passo seguinte.

b. Preparação da {(1S,3R,SR)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico

À solução de tolueno do passo anterior (~1,2 L), foi adicionado ácido trifluoroacético (200 mL) durante 20 min a 20 °C, com agitação. A mistura foi agitada a 20 °C durante 2 h. Foi adicionada água (1,55 L) e a mistura foi agitada durante 30 min a 20 °C. Após 30 min, a mistura separou-se em três camadas. A camada do fundo (~350 mL), um óleo castanho viscoso, continha o intermediário em bruto.

A um frasco de 12 L carregado com MTBE (2,8 L) foi adicionado o óleo castanho em bruto durante 1 h a 1-2 °C, com agitação. A suspensão foi agitada, à mesma temperatura durante, 1 h e, depois, filtrada. O filtrado foi lavado com MTBE (2 x 300 mL) e seco sob vácuo, à temperatura ambiente, durante 4 dias, para proporcionar o sal de trifluoroacetato do intermediário do título (163,3 g), como um pó amarelo pálido.



c. Preparação da *N*-metil-*N*-[(*S*)-2-oxiran-2-ilmetil]metanossulfonamida

Um frasco de 12 L foi carregado com água (1 L), seguido por adição de NaOH (50% em água, 146,81 g, 1,835 mol). O recipiente contendo NaOH foi lavado com água (2 x 500 mL) e as lavagens foram adicionadas ao frasco. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 10 min e arrefecida para ~8 °C. Foi adicionada (*N*-metil)metanossulfonamida (200,2 g, 1,835 mol) em água (500 mL), durante 5 min. A mistura foi lavada durante 1 h a ~4 °C e foi adicionado (*S*)-2-clorometiloxirano (339,6 g, 3,67 mol). A mistura foi agitada durante 20 h a 3-4 °C. Foi adicionado diclorometano (2 L) e a mistura foi agitada durante 30 min a 5-10 °C. As duas camadas foram deixadas a separar durante 10 min e recolhidos. A camada orgânica (~2,5 L) foi adicionada de novo ao frasco de 12 L e lavada com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M (800 mL) e solução salina (800 mL). O diclorometano foi removido por evaporação rotativa. Ao produto em bruto, foi adicionado tolueno (400 mL) e este foi removido por evaporação rotativa. Após três ciclos adicionais do processo do tolueno, foi obtido o intermediário do título (228,2 g) que foi depois utilizado sem purificação posterior no passo seguinte.

d. Síntese da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico

Num frasco de 3 L, a trifluoroacetato {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida de ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico (105,0 g, 0,232 mol) foi suspensa em etanol absoluto (400 mL). A esta

suspensão, foi adicionado, à temperatura ambiente, NaOH (50% em água, 0,243 mol. 1,05 eq), dissolvido em etanol absoluto (100 mL). O recipiente contendo o NaOH foi lavado com etanol (2 x 50 mL) e as lavagens foram adicionadas à mistura reaccional. Após 30 min de agitação, foi adicionada uma solução de *N*-metil-*N*-[(*S*)-2-oxiran-2-ilmetil]metanossulfonamida (62,0 g, 1,5 eq) em etanol absoluto (100 mL). A mistura foi submetida a refluxo durante 2 h, arrefecida para a temperatura ambiente e foram adicionados cristais de nucleação do composto do título. Após cerca de 5 min de agitação, formou-se um sólido branco. A mistura foi arrefecida para 3-5 °C e agitada durante 2 h. O sólido branco foi filtrado e o bolo húmido foi lavado com etanol absoluto frio (3 x 50 mL). O sólido foi seco sob vácuo a 30 °C durante 60 h, para proporcionar o composto do título (93,8 g, conteúdo em água através do método de Karl Fischer de 2,03%). RMN de <sup>1</sup>H CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 10,52 (d, 1H), 8,83 (s, 1H), 7,75 (d, 2H), 7,64-7,60 (m, 2H), 7,28-7,26 m, 1H), 4,33-4,26 (m, 2H), 3,78-3,75 (m, 1H), 3,27-3,20 (m, 4H), 3,01 (s, 3H), 2,88 (s, 3H), 2,58-2,53 (m, 1H), 2,30-1,81(m, 11H), 1,68 (d, 6H).

Os cristais de nucleação foram obtidos a partir de uma preparação prévia do composto do título através do método deste exemplo, a uma escala mais pequena, no qual a cristalização ocorreu espontaneamente.

**Exemplo 2: Síntese do sal cristalino de cloridrato da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(1,2-metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo [3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico**

Num frasco de 1 L, a {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico (34,7 g, 0,069 mol), foi suspensa em etanol absoluto (210 mL). Foi adicionado HCl concentrado (1,1 eq) à temperatura ambiente com agitação. A mistura foi agitada a refluxo durante 30 min e arrefecida para a temperatura ambiente e agitada durante 2 h. O sólido foi filtrado e o bolo húmido foi lavado com etanol absoluto frio (3 x 50 mL). O sólido foi seco sob vácuo a 30 °C durante 48 h, para proporcionar o composto do título (34,5 g, rendimento de 93,7%, conteúdo em água através do método de Karl Fischer de 0,13%).

**Exemplo 3: Síntese do hidrato cristalino do cloridrato da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico**

O cloridrato da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico (139 mg, 0,28 mmol) foi dissolvido em água esterilizada para injeção (2 mL). Durante algumas horas, a solução tornou-se numa suspensão turva. A suspensão foi agitada e deixada a repousar, de um dia para o outro, à temperatura ambiente, resultando num precipitado branco. O sólido foi

recolhido por filtração e seco durante 2 min a condições ambientes (aproximadamente, 40-50% de humidade relativa), para proporcionar o composto do título (130 mg, rendimento de 91%).

#### **Exemplos 4-9: Propriedades das Formas Salinas da invenção**

As amostras do sal cristalino de cloridrato da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico (composto de fórmula I), preparado como no Exemplo 2 e o hidrato cristalino do sal de cloridrato do composto de fórmula I, preparado como no Exemplo 3, foram analisados por difracção de raio-X de pó (PXRD), calorimetria de varrimento diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA) espectroscopia de infravermelho (IR) e análise elementar.

#### **Exemplo 4: Difracção de raio-X de pó**

Os padrões de difracção de raio-X de pó foram obtidos com um Difractómetro de raio-X Thermo ARL Modelo XTRA (Thermo ARL SA, Suíça), utilizando radiação Cu K $\alpha$  a 1,542 Å (45 kV, 40 mA) com detector de estado sólido de Si(Li). A análise foi tipicamente efectuada a uma velocidade de varrimento de 2°/min com um tamanho de passo de 0,03° por ponto durante uma gama de 2° a 35° em ângulo dois-teta. As amostras, quer com recebidas ou trituradas num pó fino, foram cuidadosamente embaladas em pacotes de volume pequeno convencionais, de modo a caberem no recipiente de amostra de carregamento superior do instrumento para análise. A calibração do instrumento dentro do ângulo dois-

teta  $\pm 0,02^\circ$  foi verificada semanalmente por comparação com um padrão de metal silício. Os padrões de PXRD representativos para amostras do sal cristalino de cloridrato e do hidrato do cloridrato do sal da invenção são apresentados nas Figuras 1 e 4, respectivamente.

### **Exemplo 5: Análise Térmica**

A calorimetria de varrimento diferencial (DSC) foi efectuada utilizando um módulo TA Instruments Modelo Q-100. Os dados foram recolhidos e analisados utilizando TA Instruments Thermal Advantage para o software Q Series™. Uma amostra de cerca de 1-10 mg foi pesada com precisão num recipiente de alumínio com tampa. A amostra foi avaliada utilizando uma rampa de aquecimento linear de 10 °C/min desde 5 °C a, tipicamente, 265 °C. A célula de DSC foi purgada com azoto seco durante a utilização. O perfil de DSC representativo para amostras do sal cristalino de cloridrato e do hidrato cristalino de um sal de cloridrato do composto I, são apresentados nas Figuras 2 e 5, respectivamente.

A análise termogravimétrica (TGA) foi efectuada utilizando um módulo de TA Instruments Modelo Q-500. Os dados foram recolhidos e analisados utilizando TA Instruments Thermal Advantage para software Q Series™. Uma amostra pesando cerca de 1-5 mg foi colocada num recipiente de alumínio numa cama de platina e foi efectuado o varrimento desde a temperatura ambiente até 300 °C com uma taxa de aquecimento linear de 10 °C/min. As câmaras de equilíbrio e fornalha foram purgadas com azoto durante a utilização. As marcas de TGA representativas para amostras de um sal cristalino de cloridrato e um hidrato

cristalino de um sal de cloridrato do composto I, são também apresentados nas Figuras 2 e 5, respectivamente.

O perfil de DSC na Figura 2 demonstra que um sal de cloridrato da presente invenção tem uma estabilidade excelente com um máximo no fluxo de calor endotérmico na gama de cerca de 230 °C a cerca de 260 °C e sem acontecimentos significativos abaixo dos 225 °C. A comparação dos perfis de DSC e TGA indicam que um sal de cloridrato da presente invenção sofre simultaneamente fusão e decomposição, a temperaturas abaixo dos 230 °C.

O perfil de DSC na Figura 5 para a presente forma de hidrato exhibe um pico substancial no fluxo de calor endotérmico, identificado com a fusão do cristal na gama de cerca de 225 °C a cerca de 250 °C e endotérmicas amplas ou fracas a temperaturas baixas. A comparação do perfil de DSC e TGA indicam que a decomposição da forma de hidrato cristalino não é significativa à temperatura da transição de fusão.

#### **Exemplo 6: Avaliação de absorção de Humidade Dinâmica**

A avaliação da absorção de humidade dinâmica (DMS) foi efectuada a 25 °C, utilizando uma microbalança atmosférica VTI, SGA-100 system (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Foi utilizada uma amostra com tamanho de aproximadamente 5-10 mg e a humidade estabelecida para a temperatura ambiente no início da análise. Uma análise de DMS típica consiste de três varrimentos: ambiente a 2% de humidade relativa (HR), 2% de HR a 90% de HR, 90% de HR a 5% de HR a uma taxa de varrimento de 5% de HR/passos. A massa foi avaliada a cada dois minutos e a HR foi alterada para o

valor seguinte ( $\pm 5\%$  de HR), quando a massa da amostra foi definida para 0,02% durante 5 pontos consecutivos. As marcas de DMS representativas de um sal cristalino de cloridrato e de um hidrato cristalino de um sal de cloridrato do composto I, são apresentadas nas Figuras 3 e 6, respectivamente.

O sal de cloridrato exibe um perfil de absorção/desabsorção reversível, com uma alteração de peso inferior a 0,2%, ao longo de toda a gama de 2% a 90% de HR. A forma de hidrato exibe um perfil de absorção/desabsorção reversível com cerca de 2,3% de perda de peso, quando a amostra foi seca, da temperatura ambiente para 2% de HR, que foi recuperado quando o composto seco foi exposto de 2% de HR a 40% de HR. A forma de hidrato tinha menos do que cerca de 0,25% de ganho de peso na gama de 40% de RH a 75% de RH.

#### **Exemplo 7: Análise por Infravermelho**

O espectro de absorção por infravermelho (IR) foi determinado ao longo de uma gama de frequência de 4000 a  $675\text{ cm}^{-1}$ , utilizando um espectrómetro Avatar 360 FT-IR equipado com um suporte de amostra de reflexão total atenuada por Nicolet (ATR). Um espectro de absorção de IV representativo para uma amostra de um sal cristalino de cloridrato da invenção apresenta bandas de absorção significativas a  $758\pm 1$ ,  $783\pm 1$ ,  $795\pm 1$ ,  $802\pm 1$ ,  $949\pm 1$ ,  $981\pm 1$ ,  $1149\pm 1$ ,  $1158\pm 1$ ,  $1217\pm 1$ ,  $1332\pm 1$ ,  $1377\pm 1$ ,  $1453\pm 1$ ,  $1467\pm 1$ ,  $1487\pm 1$ ,  $1525\pm 1$ ,  $1566\pm 1$ ,  $1573\pm 1$ ,  $1615\pm 1$ ,  $1672\pm 1$  e  $3197\pm 1\text{ cm}^{-1}$ .

### **Exemplo 8: Avaliação da Estabilidade no Estado Sólido**

As amostras do sal de cloridrato da invenção foram armazenadas em múltiplos frasquinhos de vidro abertos a 40 °C e 75% de HR. A intervalos específicos, os conteúdos de um frasquinho representativo foram removidos e analisados por DSC, TGA, PXRD e por HPLC para a pureza química. Após 24 semanas de armazenamento, não se verificaram alterações nos termogramas de DSC ou TGA nem no padrão de PXRD. A pureza química da amostra armazenada foi de 99,6%.

### **Exemplo 9: Determinação da Proporção Molares do Contra-Ião**

A proporção molares do contra-ião do ácido clorídrico (HA) relativamente à {(1S,3R,SR)-8-[(R)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico (composto de fórmula I), foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Proporção do Contra-ião} = (W_{HA}/MW_{HA}) / (W_I/MW_I)$$

onde  $W_{HA}$  é a percentagem em peso de HCl na amostra,  $MW_{HA}$  é o peso molecular de HCl,  $MW_I$  é o peso molecular do composto de fórmula I (504,6 amu) e  $W_I$  é a percentagem em peso do composto de formula I na amostra, calculado de acordo com a fórmula:

$$W_I = 100 - W_{HX} - W_{H_2O} - W_{RS}$$

onde  $W_{H_2O}$  é a percentagem em peso do conteúdo de água,  $W_{RS}$  é a percentagem em peso do solvente residual, assumindo que o composto I não tem impurezas.



A proporção molares do ácido clorídrico relativamente ao composto I, para uma amostra do sal cristalino de cloridrato da invenção, foi calculada como 0,94:1, utilizando a percentagem em peso de HCl ( $W_{HA}$ ) de 6,3% e os valores  $W_{H_2O}$  = 0,26% e  $W_{RS}$  = 0,47%. O conteúdo em HCl foi determinado por titulação com uma solução padrão de nitrato de prata, o conteúdo em água  $W_{H_2O}$  foi determinado por titulação colorimétrica de Karl Fisher e o conteúdo em solvente residual  $W_{RS}$  foi determinado por cromatografia gasosa.

**Exemplo Comparativo 1: Síntese do sal do ácido cítrico da { (1*S*, 3*R*, 5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico**

A { (1*S*, 3*R*, 3*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico (0,1 g, 0,2 mmol) foi suspensa em etanol (1 mL). A esta suspensão foi adicionada uma solução de ácido cítrico 1 M em etanol (0,072 mL, 0,072 mmol, 0,33 eq). A mistura foi brevemente sonicada até ser obtida uma solução límpida e, depois, foi deixada a repousar, de um dia para o outro. A tampa foi depois removida e a mistura foi deixada a evaporar sob condições ambiente, até serem observados sólidos. A mistura foi depois tapada de novo e deixada a repousar durante 72 h. O sólido resultante foi filtrado e lavado com etanol frio para proporcionar o composto do título como um sólido (74,3 mg).

**Exemplo Comparativo 2: Síntese de sais ácidos de {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico**

Seguindo o processo do Exemplo comparativo 1, os seguintes sais ácidos de {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida de ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico foram preparados na forma sólida, utilizando os equivalentes indicados do ácido (peso do produto nos segundos parêntesis): adípico (0,5 eq) (48,5 mg); fosfórico (0,5 eq) (86,6 mg); sulfúrico (0,5 eq) (27,0 mg); tartárico (0,5 eq) (66,3 mg); málico (0,5 eq) (25,3 mg); e bromídrico (1 eq) (62,9 mg).

**Exemplo Comparativo 3: Síntese do sal do ácido metanossulfônico da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico**

A uma solução da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico (0,1 g, 0,2 mmol) em acetonitrilo/água a 50% (1 mL) foi adicionada uma solução de ácido metanossulfônico 1 M em etanol (0,2 mL, 0,2 mmol, 1 eq). A mistura foi depois congelada e liofilizada até à secura, de um dia para o outro. O sólido resultante foi dissolvido em isopropanol (1 mL) com aquecimento ligeiro e deixado a arrefecer. O sólido resultante foi recolhido

por filtração e lavado com isopropanol frio para proporcionar o composto do título como um sólido (90 mg).

**Exemplo Comparativo 4: Síntese de sais ácidos da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico**

Seguindo o processo do Exemplo Comparativo 3, os seguintes sais ácidos da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-aza-biciclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico foram preparados na forma sólida, utilizando os equivalentes de ácido indicados (peso do produto nos segundos parêntesis): fumárico (1 eq) (107,2 mg); benzóico (1 eq) (105,2 mg); e (*R*)-mandélico (1 eq) (96,1 mg).

**Exemplo Comparativo 5: Propriedades dos Compostos dos Exemplos Comparativos 1-4.**

Os sais ácidos cristalinos do composto de fórmula I dos Exemplos comparativos 1-4 foram analisados por PXRD, DSC e TGA. Em todos os casos, foi observada uma perda de peso por TGA a temperaturas inferiores a cerca de 100 °C, o que pode ser, muito provavelmente, devido à perda de solvente. A temperatura(s) à(s) qual(is) o fluxo de calor endotérmico foi observado por DSC, exclusivo das características da temperatura baixa atribuídas à perda de solvente, em simultâneo com a confirmação da cristalinidade por PXRD, são apresentadas na Tabela I onde a

estequiometria é indicada pelo número de equivalentes do ácido, utilizados para preparar o sal ácido.

Tabela I: Sais de Comparação

Ácido	Equivalentes de ácido	Endotérmica por DSC	PXRD
cítrico	0,33	~125 °C, ~160-180 °C	cristalino
adípico	0,5	~150 °C	cristalino
fosfórico	0,5	~215-220 °C	cristalino
sulfúrico	0,5	~150 °C, ~190-205 °C, ~240°C	cristalino
tartárico	0,5	~140 °C, ~185 °C	cristalino
málico	0,5	~110 °C, ~185 °C <sup>#</sup>	cristalino
bromídrico	1	~155 °C, ~210 °C	cristalino
metanossulfônico	1	~175 °C, ~235 °C*	cristalino
fumárico	1	~125 °C	cristalino
benzóico	1	<150 °C <sup>#</sup>	cristalino
(R)-mandélico	1	~120 °C	cristalino
* foram observadas exotérmicas polimórficas múltiplas			
<sup>#</sup> início da fusão e decomposição			

## **Ensaio 1: Ensaio de Ligação do Radioligando nos Receptores 5-HT<sub>4(c)</sub> Humanos**

### **a. Preparação da Membrana de 5-HT<sub>4(c)</sub>**

As células de HEK-293 (rim de embrião humano) transfectadas de modo estável com ADNC do receptor 5-HT<sub>4(c)</sub> humano (B<sub>máx</sub>=~6,0 pmol/mg de proteína, como determinado utilizando o ensaio de ligação com radioligando de membrana [<sup>3</sup>H]-GR113808) foram crescidas em frascos T-225 em Meio Eagles Modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 4500 mg/L de D-glucose e cloridrato de piridoxina (GIBCO-Invitrogen Corp., Carlsbad CA: Cat N° 11965) suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS) (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat N° 10437), L-glutamina 2 mM e penicilina-(100 µg) estreptomicina/mL (100 unidades) (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat N° 15140) em 5% de CO<sub>2</sub>, incubadora humidificada a 37 °C. As células foram crescidas sob pressão de selecção contínua, por adição de 800 µg/mL de geneticina (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat N° 10131) ao meio.

As células foram cultivadas para aproximadamente 60-80% de confluência (< 35 passagens de subcultura). Vinte a vinte e duas horas antes da recolha, as células foram lavadas duas vezes e alimentadas com DMEM livre de soro. Todos os passos da preparação de membranas foram efectuados em gelo. A monocadama de células foi levantada gentilmente por agitação mecânica e trituração com uma pipeta de 25 mL. As células foram recolhidas por centrifugação a 1000 rpm (5 min).

Para a preparação de membranas, os sedimentos celulares foram ressuspensos em ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfónico (HEPES) 50 mM gelado, pH 7,4 (tampão

de preparação de membranas) (40 mL/total de células proporcionaram de 30 a 40 frascos T225) e homogeneizados utilizando um disruptor politron (ajustado para 19, 2 x 10 s) em gelo. Os homogenados resultantes foram centrifugados a 1200 g, durante 5 min a 4 °C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi centrifugado a 40000 g (20 min). O sedimento foi lavado uma vez por ressuspensão com tampão de preparação de membrana e foi centrifugado a 40000 g (20 min). O sedimento final foi ressuspensão em HEPES 50 mM, pH 7,4 (tampão de ensaio) (equivalente a 1 frasco T225/1 mL). A concentração proteica da suspensão de membranas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As membranas foram armazenadas em aliquotas a -80 °C.

#### b. Ensaio de Ligação de Radioligando

Os ensaios de ligação de radioligando foram efectuados em placas de ensaio de polipropileno de 96 poços profundos de 1,1 mL (Axygen), num volume de ensaio total de 400 µL, contendo 2 µg de proteína de membrana em HEPES 50 mM, pH 7,4, contendo 0,025% de albumina de soro bovino (BSA). Os estudos de ligação de saturação para determinação dos valores de  $K_d$  do radioligando, foram efectuados utilizando [ $^3$ H]-GR113808 (Amersham Inc., Bucks, UK: Cat N° TRK944; actividade específica ~82 Ci/mmol) a 8-12 concentrações diferentes, variando de 0,001 nM-5,0 nM. Os ensaios de remoção, para determinação dos valores de  $pK_i$  dos compostos, foram efectuados com [ $^3$ H]-GR113808 a 0,15 nM e onze concentrações diferentes do composto variando de 10 pM - 100 µM.

Os compostos de teste foram recebidos como soluções stock de 10 mM em DMSO e diluídos para 400 µM em HEPES 50 mM, pH 7,4 a

25 °C, contendo BSA a 0,1% e foram, depois, efectuadas diluições em série (1:5) no mesmo tampão. A ligação não específica foi determinada na presença de 1 µM de GR113808 não marcado. Os ensaios foram incubados durante 60 min à temperatura ambiente e, depois, as reacções de ligação foram terminadas por filtração rápida sobre as placas de filtro de fibra de vidro GF/B de 96 poços (Packard BioScience Co., Meriden, CT) pré-ensopado em polietilenoimina a 0,3%. As placas de filtro foram lavadas três vezes com tampão de filtração (HEPES 50 mM gelado, pH 7,4) para remover a radioactividade do não ligado. As placas foram secas, foram adicionados 35 µL de fluido de cintilação líquido Microscint-20 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) a cada poço e as placas foram contadas num contador de líquido de cintilação Packard Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT).

Os dados de ligação foram analisados por análise de regressão linear com o Software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), utilizando o modelo de 3 parâmetros para uma competição por um local. O BOTTOM (mínimo da curva) foi fixo para o valor de ligação não específica, como determinado na presença de GR113808 1 µM. Os valores de  $K_i$  para os compostos de teste foram calculados, em Prism, a partir dos valores mais ajustados de  $IC_{50}$  e o valor de  $K_d$  do radioligando, utilizando a equação de Cheng-Prusoff (Cheng e Prusoff, Biochemical Pharmacology, 1973, 22, 3099-108):  $K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$ , onde  $[L]$  = concentração de [ $^3H$ ]-GR113808. Os resultados são expressos como o logaritmo decádico negativo dos valores de  $K_i$ ,  $pK_i$ .

Os compostos de teste com um valor de  $pK_i$  superior neste ensaio, têm uma afinidade mais elevada para o receptor 5-HT<sub>4</sub>.

Neste ensaio, o composto de fórmula I tinha um valor de  $pK_i$  superior a cerca de 7,5.

## **Ensaio 2: Ensaio de Ligação do Radioligando nos Receptores 5-HT<sub>3A</sub> Humanos: Determinação da Selectividade do Subtipo do Receptor**

### **a. Preparação de Membranas de 5-HT<sub>3A</sub>**

As células HEK-293 (rim de embrião humano) transfectadas de um modo estável com o ADNc do receptor 5-HT<sub>3A</sub> foram obtidas de Dr. Michael Bruess (Universidade de Bonn, GDR) ( $B_{\text{máx}} \sim 9,0$  pmol/mg de proteína, como determinado utilizando o ensaio de ligação do radioligando da membrana de [<sup>3</sup>H]-GR65630). As células foram cultivadas em frascos T-225 ou fábricas de células em Meio Eagles Modificado por Dulbecco a 50% (DMEM) (GIBCO-Invitrogen Corp., Carlsbad, CA: Cat N° 11965) e F12 de Ham a 50% (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat N° 11765) suplementado com soro bovino fetal inactivado por calor (FBS) a 10% (Hyclone, Logan, UT: Cat N° SH30070.03) e penicilina-(50 µg) estreptomicina/mL (50 unidade) (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat N° 15140) em 5% de CO<sub>2</sub>, incubadora com humidificação a 37 °C.

As células foram cultivadas para uma confluência de aproximadamente 70-80% (< 35 passagens de subcultura). Todos os passos da preparação de membranas foram efectuados em gelo. Para recolher as células, o meio foi aspirado e as células foram lavadas com Ca<sup>2+</sup>, solução salina tamponada com fosfato Dulbecco livre de Mg<sup>2+</sup> (dPBS). A monocamada celular foi elevada por agitação mecânica ligeira. As células foram recolhidas por centrifugação a 1000 rpm (5 min). Os passos subsequentes da



preparação de membranas seguiram o protocolo descrito acima para os receptores 5-HT<sub>4(c)</sub> expressos na membrana.

#### b. Ensaio de Ligação com Radioligando

Os ensaios de ligação com radioligando foram efectuados em placas de ensaio de polipropileno de 96 poços, num volume de ensaio total de 200 µL, contendo 1,5-2 µg de proteína de membrana em HEPES 50 mM pH 7,4, contendo tampão de ensaio de BSA a 0,025%. Os estudos de ligação de saturação para determinação de valores de  $K_d$  do radioligando foram efectuados utilizando [<sup>3</sup>H]-GR65630 (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA: Cat N° NET1011, actividade específica ~85 Ci/mmol) a doze concentrações diferentes variando de 0,005 nM a 20 nM. Os ensaios de remoção para determinação dos valores de  $pK_i$  dos compostos, foram efectuados com [<sup>3</sup>H]-GR65630 a 0,50 nM e onze concentrações diferentes de composto, variando desde 10 pM a 100 µM. Os compostos foram recebidos como soluções stock a 10 mM em DMSO (ver secção 3,1), diluídos para 400 µM em HEPES 50 mM, pH 7,4 a 25 °C, contendo BSA 0,1% e foram depois efectuadas diluições em série (1:5) no mesmo tampão. A ligação não-específica foi determinada na presença de MDL72222 10 µM não marcado. Os ensaios foram incubados durante 60 min à temperatura ambiente, depois as reacções de ligação foram terminadas por filtração rápida sobre placas de filtro de fibra de vidro GF/B de 96 poços (Packard BioScience Co., Meriden, CT), pré-ensopadas em polietilenoimina a 0,3%. As placas de filtro foram lavadas três vezes com tampão de filtração (HEPES 50 mM gelado, pH 7,4) para remover a radioactividade dos não ligados. As placas foram secas, foram adicionados 35 µL de fluido de cintilação líquido Microscint-20 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) a cada poço

e as placas foram contadas num contador de líquido de cintilação Packard Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT).

Os dados de ligação foram analisados utilizando o processo de regressão não linear descrito acima, para determinar os valores de  $K_i$ . O BOTTOM (mínimo da curva) foi fixo para o valor de ligação não específico, como determinado na presença de MDL72222 10  $\mu$ M. A quantidade [L] na equação de Cheng-Prusoff foi definida como a concentração de [ $^3$ H]-GR63630.

A selectividade para o subtipo do receptor 5-HT<sub>4</sub> relativamente ao subtipo do receptor 5-HT<sub>3</sub> foi calculada como a proporção  $K_i(5\text{-HT}_{3A})/K_i(5\text{-HT}_{4(c)})$ . O composto de fórmula I tem uma selectividade de subtipo do receptor 5-HT<sub>4</sub>/5-HT<sub>3</sub> superior a cerca de 1000 neste ensaio.

### **Ensaio 3: Ensaio de *FlashPlate* de acumulação de AMPc de célula inteira com células HEK-293 expressando os Receptores 5-HT<sub>4(c)</sub> Humanos**

Neste ensaio, a potência funcional de um composto de teste foi determinada por determinação da quantidade de AMP cíclico produzido quando as células HEK-293, expressando receptores 5-HT<sub>4</sub>, foram colocadas em contacto com diferentes concentrações do composto de teste.

#### **a. Cultura Celular**

As células HEK-293 (rim de embrião humano) transfectadas de um modo estável com ADNc do receptor 5-HT<sub>4(c)</sub> humano clonado foram

preparadas expressando o receptor a duas densidades diferentes: (1) a uma densidade de cerca de 0,5-0,6 pmol/mg de proteína, como determinado utilizando um ensaio de ligação de radioligando de membrana [<sup>3</sup>H]-GR113808 e (2) a uma densidade de cerca de 6,0 pmol/mg de proteína. As células foram crescidas em frascos T-225 em Meio Eagles Modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 4500 mg/L D-glucose (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat N° 11965) suplementado com soro bovino fetalico a 10% (FBS) (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat N° 10437) e penicilina-(100 µg) estreptomicina/mL (100 unidades) (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat N° 15140) em 5% de CO<sub>2</sub>, incubadora humidificada a 37 °C. As células foram crescidas sob pressão de selecção contínua pela adição de geneticina (800 µg/mL: GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat N° 10131) ao meio.

#### b. Preparação de Células

As células foram cultivadas para aproximadamente 60-80% de confluência. Vinte a vinte e duas horas antes do ensaio, as células foram lavadas duas vezes e alimentadas com DMEM livre de soro contendo 4500 mg/L de D-glucose (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat #11965). Para recolher as células, o meio foi aspirado e foram adicionados 10 mL de Versene (GIBCO-Invitrogen Corp.: Cat N° 15040) a cada frasco T-225. As células foram incubadas durante 5 min à t.a. e depois removidas do frasco por agitação mecânica. A suspensão de células foi transferida para um tubo de centrífuga contendo um volume igual de dPBS pré-aquecido (37 °C) e foi centrifugada durante 5 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspenso em tampão de estimulação pré-aquecido (37 °C) (10 mL equivalentes por 2-3 frascos T-225). Este tempo foi anotado e marcado como o tempo zero. As células

foram contadas com um contador Coulter (contagem acima dos 8  $\mu\text{m}$ , cada frasco proporcionou  $1\text{--}2 \times 10^7$  células/frasco). As células foram ressuspensas a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL em tampão de estimulação pré-aquecido (37 °C) (como proporcionado no kit de *flashPlate*) e foram pré-incubadas a 37 °C durante 10 min.

Os ensaios de AMPc foram efectuados num formato de radioimunoensaio, utilizando o Sistema de Activação da AdenililCiclase de *Flashplate* com  $^{125}\text{I}$ -cAMP (SMP004B, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), de acordo com as instruções do fabricante.

As células foram cultivadas e preparadas como descrito acima. As concentrações celulares finais no ensaio foram de  $25 \times 10^3$  células/poço e o volume de ensaio final foi 100  $\mu\text{L}$ . Os compostos de teste foram recebidos como soluções de stock 10 mM em DMSO, diluídas para 400  $\mu\text{M}$  em HEPES 50 mM pH 7,4 a 25 °C, contendo BSA 0,1% e foram depois efectuadas diluições em série (1:5) no mesmo tampão. Os ensaios de acumulação de AMP cíclico foram efectuados com 11 concentrações diferentes de composto, variando de 10 pM a 100  $\mu\text{M}$  (as concentrações de ensaio finais). Foi incluída uma curva de resposta à concentração de 5-HT (10 pM a 100  $\mu\text{M}$ ) em todas as placas. As células foram incubadas com agitação a 37 °C durante 15 min e a reacção foi terminada por adição de 100  $\mu\text{L}$  de tampão de detecção gelado (como proporcionado no kit de *flashplate*) a cada poço. As placas foram seladas e incubadas a 4 °C, de um dia para o outro. Foi quantificada a radioactividade da ligação por espectroscopia de proximidade de cintilação utilizando o Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT).

A quantidade de AMPc produzida por mL de reacção, foi extrapolada a partir de uma curva padrão de AMPc, de acordo com as instruções proporcionadas no manual de utilização do fabricante. Os dados foram analisados por análise de regressão linear com o software GraphPad Prism, utilizando o modelo de resposta à dose sigmoideal de 3 parâmetros (o declive limitado à unidade). Os dados de potência são referidos como valores de  $pEC_{50}$ , o logaritmo decádico negativo do valor de  $EC_{50}$ , onde  $EC_{50}$  é a concentração eficaz para uma resposta máxima de 50%.

Os compostos de teste exibindo um valor de  $pEC_{50}$  superior neste ensaio, têm uma potência superior para agonizar o receptor 5-HT<sub>4</sub>. O composto de fórmula I que foi testado neste ensaio na linha celular (1) com uma densidade de cerca de 0,5-0,6 pmol/mg de proteína, tem um valor de  $pEC_{50}$  superior a cerca de 7,5.

#### **Ensaio 4: Ensaio de Voltage-Clamp In vitro de Inibição da Corrente de Ião de Potássio em Células Inteiras Expressando o Canal de Potásio Cardíaco hERG**

As células CHO-K1 transfectadas de um modo estável com ADNc de hERG, foram obtidas de Grail Robertson da University of Wisconsin. As células foram mantidas em armazenamento criogénico até serem necessárias. As células foram expandidas e passadas em Meio Eagles Modificado por Dulbecco/F12 suplementado com soro bovino fetal a 10% e 200 µg/mL de geneticina. As células foram semeadas em lamelas de vidro revestidas por poli-D-lisina (100 µg/mL) em discos de 35 mm<sup>2</sup> (contendo 2 mL de meio) a uma densidade que permite isolar as células a serem seleccionadas para estudos de *voltage-clamp* da célula inteira. Os discos foram mantidos num ambiente de humidade e 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

A solução extracelular foi preparada a, pelo menos, cada 7 dias e armazenada a 4 °C, quando não está a ser utilizada. A solução extracelular continha (mM): NaCl (137), KCl (4), CaCl<sub>2</sub> (1.8), MgCl<sub>2</sub> (1), Glucose (10), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanossulfónico (HEPES) (10), pH 7,4 com NaOH. A solução extracelular, na ausência ou presença do composto de teste, estava contida em reservatórios, a partir dos quais foi vertida para as câmaras de gravação a aproximadamente 0,5 mL/min. A solução intracelular foi preparada, dividida em aliquotas e armazenada, a -20 °C, até ao dia de ser utilizada. A solução intracelular continha (mM): KCl (130), MgCl<sub>2</sub> (1), sal de etilenoglicol-bis(éter beta-aminoetílico) do ácido *N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA) (5), MgATP (5), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfónico (HEPES) (10), pH 7,2 com KOH. Todas as experiências foram efectuadas à temperatura ambiente (20-22 °C).

As lamelas nas quais as células foram semeadas foram transferidas para uma câmara de gravação e perfundidas continuamente. Formaram-se marcas Giga-ohm entre a célula e o eléctrodo de Patch. Após ter sido alcançado um *patch* estável, iniciou-se a gravação no modo *voltage-clamp*, com o potencial inicial mantido a -80 mV. Após ter sido alcançada uma corrente de célula inteira estável, as células foram expostas ao composto de teste. O protocolo convencional de voltagem foi: passo de manter o potencial de -80 mV até +20 mV durante 4,8 s, repolarizar para -50 mV durante 5 s e, depois, regressar ao potencial original mantido (-80 mV). Este protocolo de voltagem foi corrido uma vez a cada 15 s. (0,067 Hz). As amplitudes de corrente de pico durante a fase de repolarização foram determinadas utilizando o software pClamp. Os compostos de teste a uma concentração de 3 µM foram perfundidos ao longo da célula

durante 5 minutos, seguido por um período de lavagem de 5 minutos na ausência de composto. Finalmente, foi adicionado um controlo positivo (cisapride, 20 nM) ao perfundido para testar a função da célula. O passo de -80 mV a +20 mV activa o canal de hERG, resultando numa corrente exterior. O passo que volta aos -50 mV, resulta numa corrente de cauda exterior, à medida que o canal recupera da inactivação e desactiva.

As amplitudes de corrente de pico durante a fase de repolarização foram determinadas utilizando o software pCLAMP. Os dados de controlo e artigo de teste foram exportados para Origin® (OriginLab Corp., Northampton MA) onde as amplitudes de corrente individuais foram normalizadas para a amplitude de corrente inicial na ausência de composto. Foram calculadas as médias de corrente normalizada e desvios padrão para cada condição e representados graficamente versus o período de tempo da experiência.

Foram efectuadas comparações entre as inibições de corrente de K<sup>+</sup> observadas após os cinco minutos de exposição a cada um dos artigos de teste ou controlo de veículo (normalmente DMSO a 0,3%). As comparações estatísticas entre grupos experimentais foram efectuadas utilizando um teste de t independente de duas populações (Microcal Origin v. 6.0). As diferenças foram consideradas significativas a  $p < 0,05$ .

Quanto mais pequena a percentagem de inibição da corrente de ião de potássio neste ensaio, mais pequeno o potencial dos compostos de teste para alterar o padrão da repolarização cardíaca quando utilizado como agente terapêutico. O composto de fórmula I foi testado neste ensaio a uma concentração de 3  $\mu$ M e

exibiu uma inibição da corrente do íão de potássio inferior a cerca de 15%.

#### **Ensaio 5: Modelo *In vitro* de Biodisponibilidade Oral: Ensaio de Permeação de Caco-2**

O ensaio de permeação de Caco-2 foi efectuado para modelar a capacidade dos compostos de teste para passarem através do intestino e atingirem a corrente sanguínea após administração oral. Foi determinada a taxa à qual os compostos de teste em solução atravessam a monocamada celular construída para imitar uma junção apertada das monocamadas do intestino delgado humano.

As células Caco-2 (cólon, adenocarcinoma; humano) foram obtidas de ATCC (American Type Culture Collection; Rockville, MD). Para o estudo de permeação, as células foram inoculadas a uma densidade de 63000 células/cm<sup>2</sup> em filtros de polycarbonato *transwells* pré-humedecidos (Costar; Cambridge, MA). Foi formada uma monocamada celular após 21 dias em cultura. Após a cultura celular na placa *transwell*, a membrana contendo a monocamada de células foi descolada da placa *transwell* e inserida na câmara de difusão (Costar; Cambridge, MA). A câmara de difusão foi inserida nos blocos de aquecimento que foram equipados com circulação de água externa, regulada termoestaticamente para 37 °C para a temperatura de controlo. A entrada de ar distribuiu 95% de O<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub> a cada metade de uma câmara de difusão e criou um padrão de fluxo laminar, ao longo da monocamada celular que foi eficaz na redução da camada limite não agitada.

O estudo de permeação foi efectuado com as concentrações do composto de teste a 100 µM e com <sup>14</sup>C-manitol para monitorizar a



integridade da monocamada. Todas as experiências foram conduzidas a 37 °C durante 60 min. As amostras foram recolhidas a 0, 30 e 60 min a partir de ambos os lados, dador e receptor, da câmara. As amostras foram analisadas por HPLC ou contagem com líquido de cintilação para o composto de teste e concentrações de manitol. Foi calculado o coeficiente de permeação ( $K_p$ ) em cm/s.

Neste ensaio, um valor de  $K_p$  superior a cerca de  $10 \times 10^{-6}$  cm/s é considerado indicativo de biodisponibilidade favorável. O composto de fórmula I foi testado neste ensaio e exibiu um valor de  $K_p$  superior a cerca de  $20 \times 10^{-6}$  cm/s.

#### **Ensaio 6: Estudo de Farmacocinética em Rato**

As formulações de solução aquosa dos compostos de teste foram preparadas em ácido láctico a 0,1%, a um pH de entre cerca de 5 e cerca de 6. Os ratos Sprague-Dawley machos (estirpe CD, Laboratórios Charles River, Wilmington, MA) foram doseados com os compostos de teste via administração intravenosa (IV), a uma dose de 2,5 mg/kg ou por sonda oral (PO), a uma dose de 5 mg/kg. O volume de dosagem foi de 1 mL/kg para IV e 2 mL/kg para administração PO. As amostras de sangue foram recolhidas em série de animais pré-doseados e a 2 (apenas IV), 5, 15 e 30 min, e a 1, 2, 4, 8 e 24 horas após dosagem. As concentrações dos compostos de teste no plasma sanguíneo foram determinadas por análise por espectrofotometria de massa-cromatografia líquida (LC-MS/MS) (MDS SCIEX, API 4000, Applied Biosystems, Foster City, CA) com um limite inferior de quantificação de 1 ng/mL.

Foram avaliados os parâmetro convencionais por análise não-compartimentada (Modelo 201 para IV e Modelo 200 para PO) utilizando WinNonlin (Versão 4.0.1, Pharsight, Mountain View, CA). O máximo na curva de concentração do composto de teste no plasma sanguíneo vs. tempo é denominado  $C_{\text{máx}}$ . A área sob a curva de concentração vs. tempo a partir do tempo de dosagem da última concentração mensurável ( $AUC(0-t)$ ) foi calculada através da regra do trapézio linear. A biodisponibilidade oral ( $F(\%)$ ), i. e. a proporção normalizada de dose de  $AUC(0-t)$  para administração PO relativamente a  $AUC(0-t)$  para administração, foi calculada como:

$$F(\%) = \frac{AUC_{PO}}{AUC_{IV}} \times \frac{Dose_{IV}}{Dose_{PO}} \times 100\%$$

Espera-se que os compostos de teste que exibem valores superiores para os parâmetros  $C_{\text{máx}}$ ,  $AUC(0-t)$  e  $F(\%)$  neste ensaio tenham uma biodisponibilidade superior quando administrados oralmente. O composto de fórmula I tem um valor de  $C_{\text{máx}}$  de 0,16 µg/mL, um valor de  $AUC(0-t)$  de 0,46 µg·h/mL e biodisponibilidade oral ( $F(\%)$ ) no modelo de rato de cerca de 19%.

Lisboa, 23 de Novembro de 2010

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Forma cristalina salina que é o sal de cloridrato da  $\{(1S,3R,5R)-8-[(R)-2\text{-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil}]-8\text{-azabicyclo}[3.2.1]\text{oct-3-il}\}$ amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico ou um seu solvato.
2. Forma cristalina salina da Reivindicação 1, em que a forma cristalina salina é um sal cristalino de cloridrato.
3. Forma cristalina salina da Reivindicação 2, em que a forma cristalina salina é caracterizada pelo padrão de difracção de raio-X de pó com dois ou mais picos de difracção a valores  $2\theta$  seleccionados de  $4,41\pm 0,2$ ,  $8,82\pm 0,2$ ,  $9,08\pm 0,2$ ,  $11,21\pm 0,2$ ,  $14,40\pm 0,2$ ,  $16,42\pm 0,2$ ,  $17,35\pm 0,2$ ,  $17,61\pm 0,2$ ,  $18,14\pm 0,2$ ,  $19,04\pm 0,2$ ,  $19,95\pm 0,2$ ,  $20,20\pm 0,2$ ,  $21,23\pm 0,2$ ,  $22,13\pm 0,2$ ,  $22,48\pm 0,2$ ,  $22,83\pm 0,2$ ,  $24,16\pm 0,2$ ,  $25,37\pm 0,2$ ,  $25,56\pm 0,2$ ,  $26,22\pm 0,2$ ,  $27,33\pm 0,2$ ,  $29,08\pm 0,2$  e  $29,61\pm 0,2$ .
4. Forma cristalina salina da Reivindicação 3, em que o padrão de difracção de raio-X de pó compreende dois ou mais picos de difracção a valores de  $2\theta$  seleccionados de  $14,40\pm 0,2$ ,  $17,35\pm 0,2$ ,  $17,61\pm 0,2$ ,  $19,04\pm 0,2$ ,  $21,23\pm 0,2$  e  $22,13\pm 0,2$ .
5. Forma cristalina salina da Reivindicação 2, em que a forma cristalina salina é caracterizada por um padrão de difracção de raio-X de pó, no qual as posições dos picos estão substancialmente de acordo com as posições dos picos do padrão apresentado na Figura 1.

6. Forma cristalina salina da Reivindicação 2, em que a forma cristalina salina é caracterizada por um perfil de calorimetria de varrimento diferencial que mostra um máximo de fluxo de calor endotérmico a uma temperatura superior a cerca de 230 °C.
7. Forma cristalina salina da Reivindicação 2, em que a forma cristalina salina é caracterizada por um perfil de calorimetria de varrimento diferencial substancialmente de acordo com o apresentado na Figura 2.
8. Forma cristalina salina da Reivindicação 1, em que a forma cristalina salina é um hidrato.
9. Forma cristalina salina da Reivindicação 8, em que a forma cristalina salina é caracterizada por um padrão de difracção de raio-X de pó, com dois ou mais picos de difracção a valores de  $2\theta$ , seleccionados de  $5,30\pm0,2$ ,  $7,43\pm0,2$ ,  $8,72\pm0,2$ ,  $10,52\pm0,2$ ,  $13,85\pm0,2$ ,  $14,11\pm0,2$ ,  $15,80\pm0,2$ ,  $15,99\pm0,2$ ,  $17,26\pm0,2$ ,  $19,53\pm0,2$ ,  $20,08\pm0,2$ ,  $21,06\pm0,2$ ,  $21,48\pm0,2$ ,  $21,92\pm0,2$ ,  $22,85\pm0,2$ ,  $23,91\pm0,2$ ,  $25,28\pm0,2$ ,  $26,06\pm0,2$ ,  $27,34\pm0,2$ ,  $27,51\pm0,2$  e  $29,67\pm0,2$ .
10. Forma cristalina salina da Reivindicação 9, em que o padrão de difracção de raio-X de pó compreende dois ou mais picos de difracção, a valores de  $2\theta$ , seleccionados de  $10,52\pm0,2$ ,  $13,85\pm0,2$ ,  $15,80\pm0,2$ ,  $17,26\pm0,2$  e  $21,06\pm0,2$ .
11. Forma cristalina salina da Reivindicação 8, em que a forma cristalina salina é caracterizada por um padrão de difracção de raio-X de pó, no qual as posições dos picos

estão substancialmente de acordo com as posições dos picos dos padrões apresentados na Figura 4.

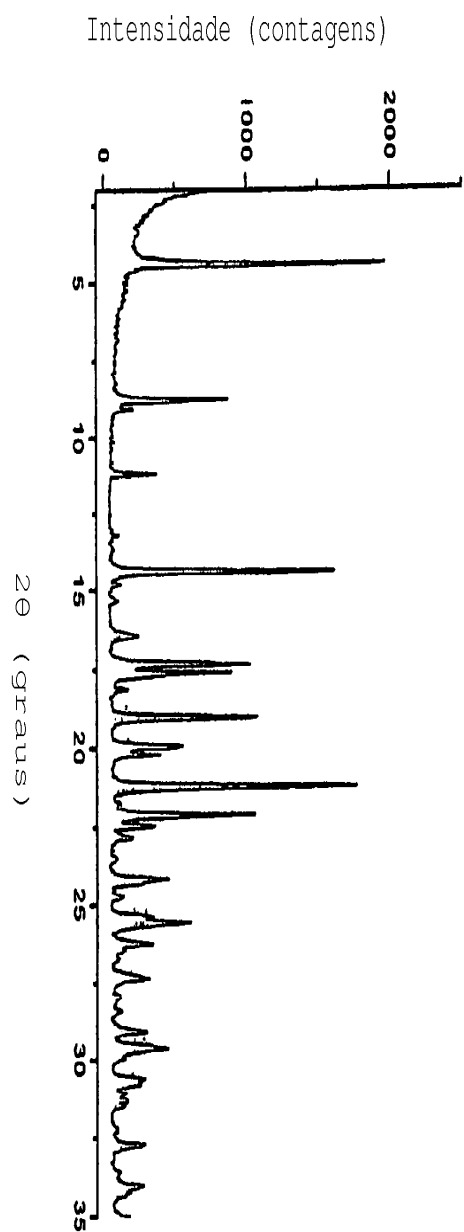
12. Forma cristalina salina da Reivindicação 8, em que a forma cristalina salina é caracterizada por um perfil de calorimetria de varrimento diferencial substancialmente de acordo com o apresentado na Figura 5.
13. Composição farmacêutica compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável e uma forma cristalina salina de qualquer uma das Reivindicações 1 a 12.
14. Forma cristalina salina, como reivindicada em qualquer uma das Reivindicações 1 a 12, para utilização em terapia.
15. Forma cristalina salina, como reivindicada na reivindicação 14, para utilização no tratamento de um distúrbio de motilidade reduzida do tracto gastrointestinal, num mamífero.
16. Forma cristalina salina da reivindicação 15, em que o distúrbio de motilidade reduzida é seleccionado de obstipação crónica, síndrome do intestino irritável com obstipação predominante, gastroparesia diabética e idiopática e dispepsia funcional.
17. Utilização de uma forma cristalina salina de qualquer uma das Reivindicações 1 a 12, para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma patologia médica num mamífero, em que a patologia médica é um distúrbio de motilidade reduzida do tracto gastrointestinal.

18. Utilização da Reivindicação 17, em que a patologia médica é seleccionada de obstipação crónica, síndrome do intestino irritável com obstipação predominante, gastroparesia diabética e idiopática e dispepsia funcional.
19. Processo para preparar um sal cristalino de cloridrato da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico, o processo compreendendo:
- (a) colocar em contacto a {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico com o ácido clorídrico para formar uma mistura reaccional; e
- (b) isolar o sal cristalino de cloridrato da mistura reaccional.
20. Processo para preparar um hidrato cristalino do sal de cloridrato da {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico, o processo compreendendo:
- (a) dissolver cloridrato de {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico em água a uma

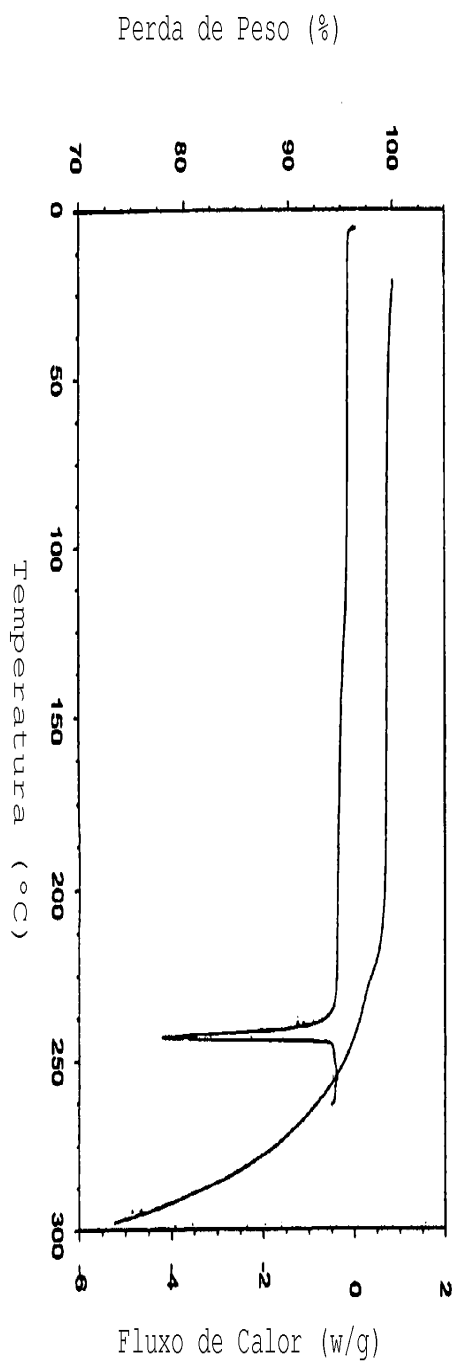
concentração superior a cerca de 50 miligramas por mililitro para formar uma suspensão; e

(b) isolar o hidrato cristalino da suspensão.

Lisboa, 23 de Novembro de 2010

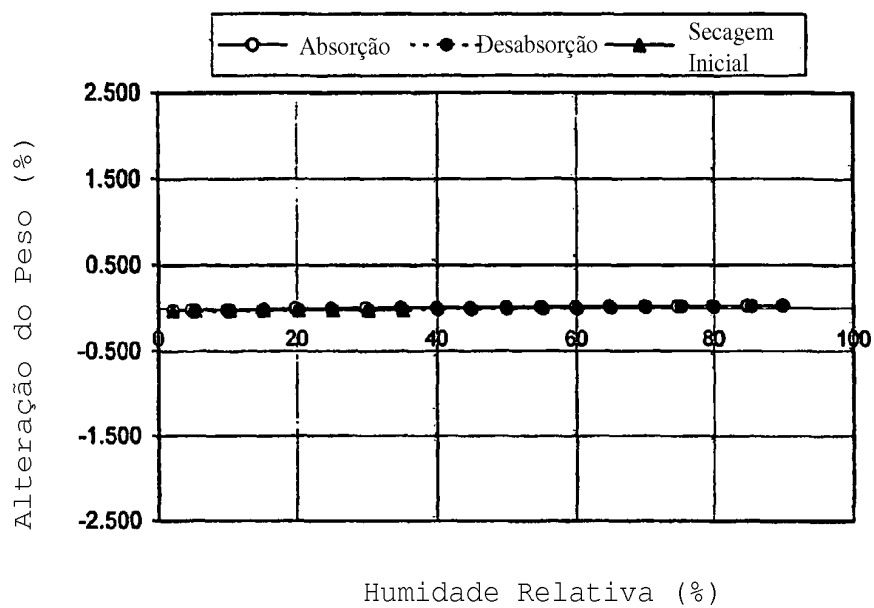
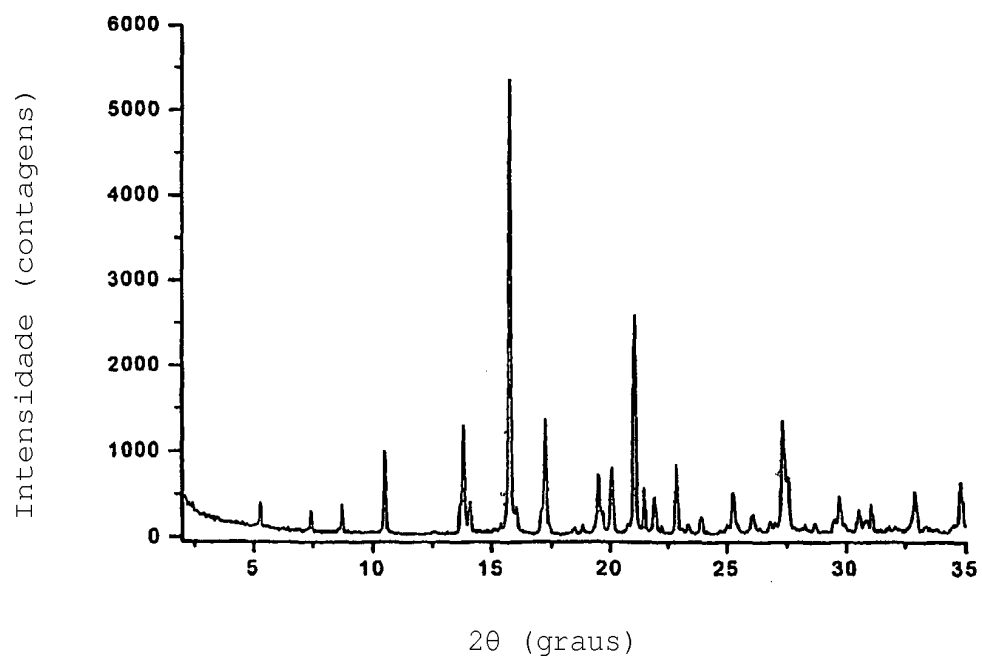


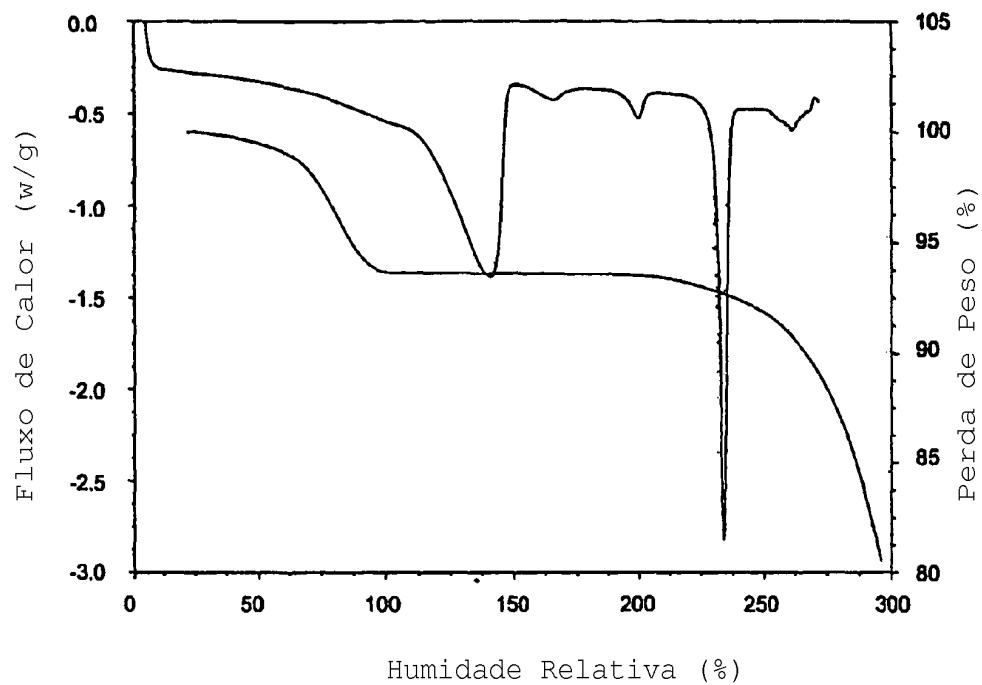
**Figura 1**



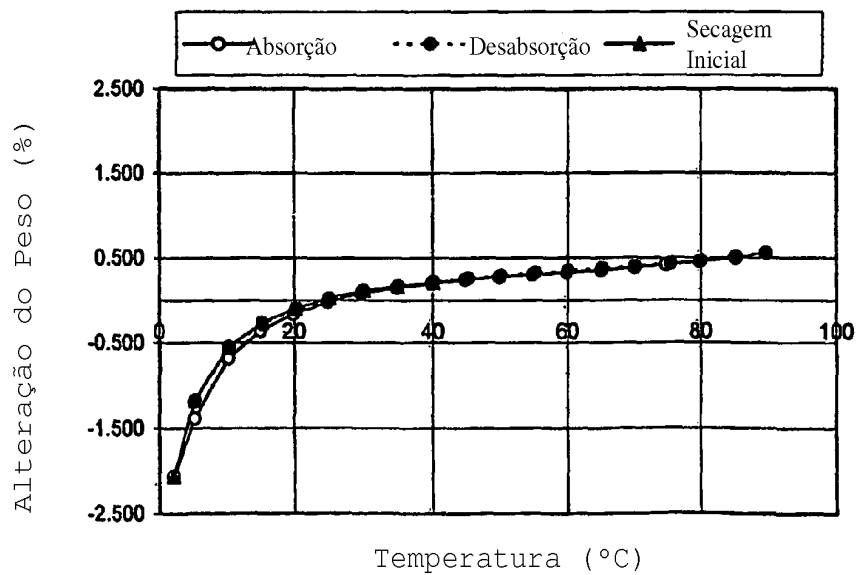
**Figura 2**



**Figura 3****Figura 4**



**Figura 3**



**Figura 6**

## **RESUMO**

### **"FORMA CRISTALINA DE UM COMPOSTO QUINOLINONA-CARBOXAMIDA"**

A invenção proporciona um sal cristalino de cloridrato de {(1*S*,3*R*,5*R*)-8-[(*R*)-2-hidroxi-3-(metanossulfonil-metil-amino)propil]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il}amida do ácido 1-isopropil-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina-3-carboxílico ou um seu solvato. A invenção proporciona também composições farmacêuticas compreendendo tais formas cristalinas salinas, método de utilizar tais formas cristalinas salinas para tratar doenças associadas com a actividade do receptor de 5-HT<sub>4</sub> e processos úteis para preparar tais formas cristalinas salinas.