

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 819 830**

(51) Int. Cl.:

C07D 413/12 (2006.01)

A61K 31/4245 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2017 PCT/EP2017/055885**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017 WO17157873**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2017 E 17710286 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3430010**

(54) Título: **Derivado de 5-etiol-4-metil-pirazol-3-carboxamida que tiene actividad como agonista de TAAR**

(30) Prioridad:

17.03.2016 EP 16160790

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.04.2021

(73) Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

(72) Inventor/es:

**GALLEY, GUIDO;
HOENER, MARIUS;
NORCROSS, ROGER y
PFLIEGER, PHILIPPE**

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

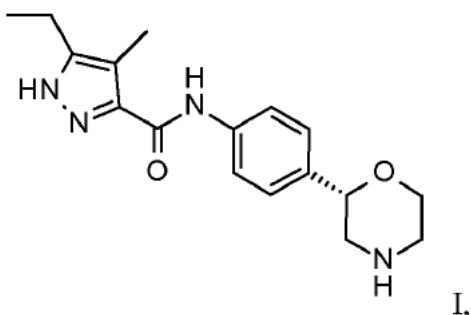
ES 2 819 830 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivado de 5-etilo-4-metil-pirazol-3-carboxamida que tiene actividad como agonista de TAAR

5 La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula



y a una sal de adición de ácido farmacéuticamente adecuada del mismo.

10 El compuesto divulgado en el presente documento y cubierto por la fórmula I anterior puede presentar tautomería. Se pretende que la invención englobe cualquier forma tautómera de este compuesto, o mezclas de dichas formas, y no se limita a una forma tautómera cualquiera representada en la fórmula anterior.

15 Ahora se ha descubierto que el compuesto de fórmula I (5-etilo-4-metil-N-[4-[(2S)morfolin-2-il]fenil]-1H-pirazol-3-carboxamida) tiene una buena afinidad para los receptores asociados a aminas traza (TAAR), en especial para TAAR1, y menos efectos secundarios en comparación con compuestos de la técnica anterior.

20 Se han divulgado ligandos similares de TAAR1 de ratón y TAAR1 de rata en los documentos WO2011/076678, WO2015/165835, WO 2016/016292 y WO2012/16826.

El compuesto de fórmula I y sus sales de adición farmacéuticamente utilizables poseen propiedades farmacológicas valiosas. Específicamente, se ha descubierto que el compuesto de la presente invención es un agonista parcial del receptor asociado a aminas traza humano 1 (hTAAR1).

25 El compuesto de la presente invención tiene ventajas significativas sobre los compuestos de la técnica anterior, ventajas que son

- actividad agonista potente en el receptor TAAR1 humano,
- selectividad frente al transportador de dopamina (DAT),
- selectividad frente al canal de iones hERG,
- un vector anfifílico bajo y, representa de este modo un riesgo bajo de provocar fosfolipidosis inducida por fármacos (DIPL) (véase *infra*).

30 Por lo tanto, el compuesto de fórmula I se puede usar como fármaco seguro para el tratamiento de depresión, trastornos de ansiedad, trastorno bipolar, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastornos relacionados con el estrés, trastornos psicóticos tales como esquizofrenia, enfermedades neurológicas tales como enfermedad de Parkinson, trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Alzheimer, epilepsia, migraña, hipertensión, adicción, drogadicción y trastornos metabólicos tales como trastornos de la conducta alimentaria, diabetes, complicaciones diabéticas, obesidad, dislipidemia, trastornos del consumo de energía y su asimilación, trastornos y disfunción de la homeostasis de la temperatura corporal, trastornos del sueño y del ritmo circadiano y trastornos cardiovasculares.

35 Las aminas biogénas clásicas (serotonina, noradrenalina, epinefrina, dopamina, histamina) desempeñan papeles importantes como neurotransmisores en el sistema nervioso central y periférico^[1]. Su síntesis y almacenamiento, así como su degradación y recaptación después de la liberación, se regulan estrictamente. Se sabe que un desequilibrio en los niveles de aminas biogénas es el responsable de la alteración en la función cerebral en muchas afecciones patológicas^[2-5]. Una segunda clase de compuestos de aminas endógenas, las llamadas aminas traza (AT), coinciden significativamente con las aminas biogénas clásicas con respecto a su estructura, metabolismo y localización subcelular. Las AT incluyen p-tiramina, β-feniletilamina, triptamina y octopamina, y están presentes en el sistema nervioso de mamífero en niveles en general menores que las aminas biogénas

clásicas^[6].

Se ha relacionado su regulación incorrecta con diversas enfermedades psiquiátricas como esquizofrenia y depresión^[7] y con otras afecciones como trastorno por déficit de atención con hiperactividad, jaqueca, enfermedad de Parkinson, drogadicción y trastornos de la conducta alimentaria^[8,9].

Durante mucho tiempo, se había hipotetizado solo sobre los receptores específicos de AT en base a los sitios de unión de AT de alta afinidad anatómicamente diferenciados en el SNC de seres humanos y otros mamíferos^[10,11]. En consecuencia, se creyó que los efectos farmacológicos de las AT estaban mediados a través del mecanismo bien conocido de las aminas biógenas clásicas, desencadenando su liberación, inhibiendo su recaptación o bien "reaccionando de forma cruzada" con sus sistemas de receptores^[9,12,13]. Esta punto de vista cambió significativamente con la identificación de varios miembros de una familia novedosa de GPCR, los receptores asociados a aminas traza (TAAR)^[7,14]. Hay 9 genes TAAR en el ser humano (incluyendo 3 seudogenes) y 16 genes en el ratón (incluyendo 1 seudogén). Los genes TAAR no contienen intrones (con una excepción, TAAR2 contiene 1 intrón) y se sitúan próximos entre sí en el mismo segmento cromosómico. La relación filogénica de los genes de receptores, de acuerdo con una comparación de similitud de farmacóforos del GPCR en profundidad, y los datos farmacológicos sugieren que estos receptores forman tres subfamilias distintas^[7,14]. TAAR1 está en la primera subclase de cuatro genes (TAAR1-4) altamente conservados entre seres humanos y roedores. Las AT activan el TAAR1 por medio de G_{αs}. Se demostró que la regulación incorrecta de las AT contribuye a la etiología de diversas enfermedades como depresión, trastornos de ansiedad, trastorno bipolar, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastornos relacionados con el estrés, trastornos psicóticos tales como esquizofrenia, enfermedades neurológicas tales como enfermedad de Parkinson, trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Alzheimer, epilepsia, migraña, hipertensión, adicción, drogadicción y trastornos metabólicos tales como trastornos de la conducta alimentaria, diabetes, complicaciones diabéticas, obesidad, dislipidemia, trastornos del consumo de energía y su asimilación, trastornos y disfunción de la homeostasis de la temperatura corporal, trastornos del sueño y del ritmo circadiano y trastornos cardiovasculares.

Por lo tanto, existe un amplio interés en incrementar el conocimiento sobre los receptores asociados a aminas traza.

Referencias de la literatura:

[1] Deutch, A.Y. y Roth, R.H.; "Neurotransmitters". En *Fundamental Neuroscience* (2^a ed.) (Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L. and Squire, L.R., Eds.), pp. 193-234, Academic Press (1999);

[2] Wong, M.L. y Licinio, J.; "Research and treatment approaches to depression". *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, 2, 343-351;

[3] Carlsson, A. *et al.*; "Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, 41, 237-260;

[4] Tuite, P. y Riss, J.; "Recent developments in the pharmacological treatment of Parkinson's disease". *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, 12, 1335-1352;

[5] Castellanos, F.X. y Tannock, R.; "Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes". *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, 3, 617-628;

[6] Usdin, Earl; Sandler, Merton; Editors; *Psychopharmacology Series, Vol. 1: Trace Amines and the Brain. [Proceedings of a Study Group at the 14th Annual Meeting of the American College of Neuropsychopharmacology, San Juan, Puerto Rico]* (1976);

[7] Lindemann, L. y Hoener, M.; "A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family". *Trends in Pharmacol. Sci.* **2005**, 26, 274-281;

[8] Branchek, T.A. y Blackburn, T.P.; "Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact". *Curr. Opin. Pharmacol.* **2003**, 3, 90-97;

[9] Premont, R.T. *et al.*; "Following the trace of elusive amines". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 9474-9475;

[10] Mousseau, D.D. y Butterworth, R.F.; "A high-affinity [³H] tryptamine binding site in human brain". *Prog. Brain Res.* **1995**, 106, 285-291;

[11] McCormack, J.K. *et al.*; "Autoradiographic localization of tryptamine binding sites in the rat and dog central nervous system". *J. Neurosci.* **1986**, 6, 94-101;

[12] Dyck, L.E.; "Release of some endogenous trace amines from rat striatal slices in the presence and absence of a monoamine oxidase inhibitor". *Life Sci.* **1989**, 44, 1149-1156;

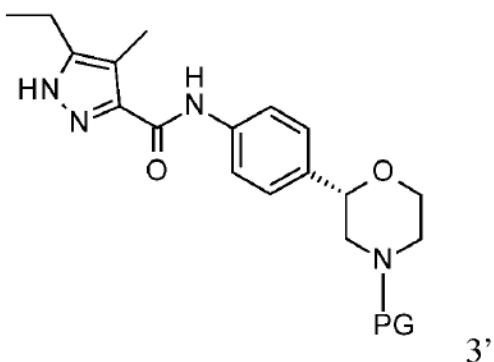
5 [13] Parker, E.M. y Cubeddu, L.X.; "Comparative effects of amphetamine, phenylethylamine and related drugs on dopamine efflux, dopamine uptake and mazindol binding". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1988**, 245, 199-210;

[14] Lindemann, L. et al.; "Trace amine associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors". *Genomics* **2005**, 85, 372-385.

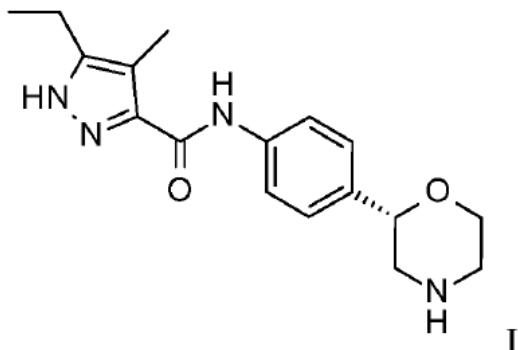
10 Los objetivos de la presente invención son el nuevo compuesto de fórmula I y sus sales farmacéuticamente aceptables, su uso para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la función biológica de los receptores asociados a aminas traza, su fabricación y medicamentos basados en el compuesto de acuerdo con la invención en el control o prevención de enfermedades tales como depresión, trastornos de ansiedad, trastorno bipolar, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, trastornos relacionados con el estrés, trastornos psicóticos tales como esquizofrenia, enfermedades neurológicas tales como enfermedad de Parkinson, trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Alzheimer, epilepsia, migraña, drogadicción, adicción y trastornos metabólicos tales como trastornos de la conducta alimentaria, diabetes, complicaciones diabéticas, obesidad, dislipidemia, trastornos del consumo de energía y su asimilación, trastornos y disfunción de la homeostasis de la temperatura corporal, trastornos del sueño y del ritmo circadiano y trastornos cardiovasculares.

15 20 El presente compuesto de fórmula I y sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, por procedimientos descritos a continuación, procedimiento que comprende

25 a) separar por escisión el grupo protector de N (PG) de los compuestos de fórmula



30 en un compuesto de fórmula

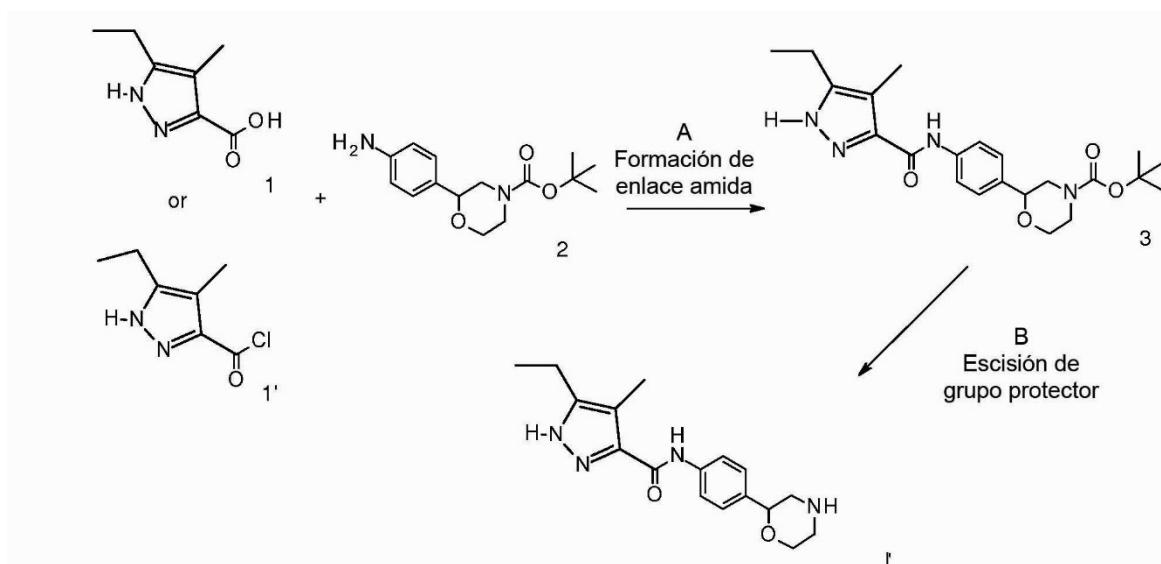


en el que PG es un grupo protector de N seleccionado de -C(O)O-terc-butilo (BOC), y,

35 si se desea, convertir el compuesto obtenido en sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

PROCEDIMIENTO GENERAL

Esquema 1



Los materiales de partida **1, 1'** y **2** están comercialmente disponibles o se pueden preparar por procedimientos bien conocidos en la técnica. 2-(4-aminofenil)morfolin-4-carboxilato de *terc*-butilo racémico (NR CAS: 1002726-96-6) está disponible comercialmente. (2*R*)-2-(4-aminofenil)morfolin-4-carboxilato de *terc*-butilo (NR CAS: 1260220-42-5) está disponible comercialmente. (2*S*)-2-(4-aminofenil)morfolin-4-carboxilato de *terc*-butilo (NR CAS: 1260220-43-6) está disponible comercialmente, o se puede preparar como se describe en la literatura, por ejemplo, como se describe en Trussardi, R. e Iding, H, solic. Int. PCT WO 2015/086495 A1.

10 Etapa A: Se puede lograr la formación de enlace de amida por una reacción de acoplamiento entre amina **2** y el compuesto de ácido carboxílico **1** en presencia de un reactivo de acoplamiento tal como DCC, EDC, TBTU o HATU en presencia de una base orgánica tal como trietilamina, *N,N*-diisopropiletilamina o *N*-metilmorfolina en disolventes halogenados tales como o 1,2-dicloroetano o disolventes etéreos tales como éter dietílico, dioxano, THF, DME o TBME.

15 Las condiciones preferentes son TBTU con *N*-metilmorfolina en THF a 50-60 °C durante 12-48 horas. De forma alternativa, se puede lograr la formación de enlace de amida por una reacción de acoplamiento entre amina **2** y compuesto de cloruro de acilo **1'** en disolventes halogenados tales como diclorometano o 1,2-dicloroetano o disolventes etéreos tales como éter dietílico, dioxano, THF, DME o TBME, en presencia de una base orgánica tal como trietilamina o *N,N*-diisopropiletilamina.

20 Las condiciones preferentes son trietilamina en THF a temperatura ambiente durante 18 horas.

25 Si se desea, se puede preparar el compuesto de cloruro de acilo **1'** *in situ* a partir del correspondiente ácido carboxílico **1** por tratamiento con cloruro de oxalilo en disolventes halogenados tales como diclorometano o 1,2-dicloroetano o disolventes etéreos tales como éter dietílico, dioxano, THF, DME o TBME en presencia de un catalizador tal como DMF.

30 Las condiciones preferentes son dicloroetano a temperatura ambiente durante 1 hora.

De forma alternativa, se puede preparar el compuesto de cloruro de acilo **1'** *in situ* a partir del correspondiente ácido carboxílico **1** por tratamiento con 1-cloro-*N,N*,2-trimetilpropenilamina [CAS 26189-59-3] en diclorometano, seguido de retirada del disolvente a vacío, de acuerdo con el procedimiento de Ghosez y colaboradores (*J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 1180; *Org. Synth.* **1980**, 59, 26-34).

35 Etapa B: Se puede efectuar la retirada del grupo protector de N BOC con ácidos minerales tales como HCl, H₂SO₄ o H₃PO₄ o ácidos orgánicos tales como CF₃COOH, CHCl₂COOH, HOAc o ácido p-toluenosulfónico en disolventes tales como CH₂Cl₂, CHCl₃, THF, MeOH, EtOH o H₂O a de 0 a 80 °C.

40 Las condiciones preferentes son CF₃COOH en acetonitrilo acuoso a 80 °C durante 3 horas o HCl 4 N en dioxano a temperatura ambiente durante 16 horas.

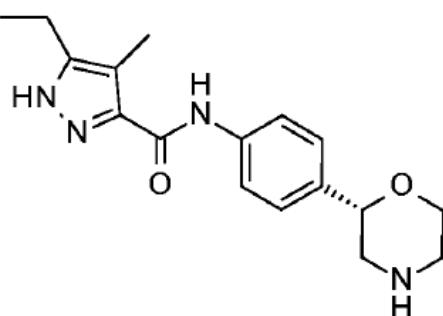
Donde se ha usado material de partida racémico **2**, se puede preparar la mezcla racémica resultante de los compuestos de morfolina **I'** en sus enantiómeros constituyentes usando HPLC quiral. De forma alternativa, se puede obtener el compuesto **I** en forma enantioméricamente pura partiendo del compuesto enantioméricamente puro **2**.

Aislamiento y purificación de los compuestos

Se puede lograr el aislamiento y purificación de los compuestos e intermedios descritos en el presente documento, si se desea, por cualquier procedimiento de separación o purificación adecuado tal como, por ejemplo, filtración, extracción, cristalización, cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, cromatografía en capa gruesa, cromatografía de líquidos de baja o alta presión preparativa o una combinación de estos procedimientos. Se pueden tener ilustraciones específicas de procedimientos de separación y aislamiento adecuados por referencia a las preparaciones y ejemplos en el presente documento a continuación. Sin embargo, por supuesto, también se podrían usar otros procedimientos de separación o aislamiento equivalentes. Se pueden separar mezclas racémicas de compuestos quirales de fórmula I usando HPLC quiral. También se pueden separar mezclas racémicas de intermedios sintéticos quirales usando HPLC quiral.

Sales del compuesto de fórmula I

El compuesto de fórmula I es básico y se pueden convertir en una sal de adición de ácido correspondiente. Se logra la conversión por tratamiento con al menos una cantidad estequiométrica de un ácido apropiado, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Típicamente, se disuelve la base libre en un disolvente orgánico inerte, tal como éter dietílico, acetato de etilo, cloroformo, etanol o metanol y similares, y se añade el ácido en un disolvente similar. Se mantiene la temperatura entre 0 °C y 50 °C. La sal resultante precipita de forma espontánea o se puede retirar de la solución con un disolvente menos polar.

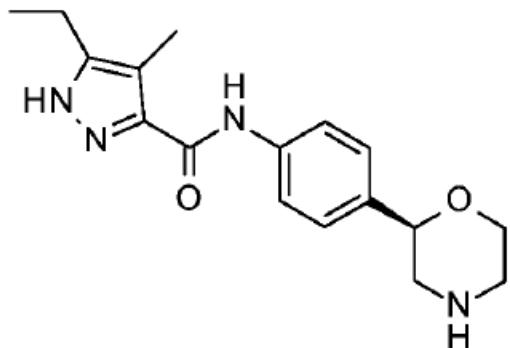
Ejemplo 1**5-etil-4-metil-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]-1H-pirazol-3-carboxamida**a) (2S)-2-[4-[(5-etil-4-metil-1H-pirazol-3-carbonil)amino]fenil]morpholin-4-carboxilato de terc-butilo

A una solución agitada de (2S)-2-(4-aminofenil)morpholin-4-carboxilato de *terc*-butilo (NR CAS: 1260220-43-6, 350 mg, 1,26 mmol, 1,00 eq.) y ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (NR CAS: 957129-38-3, 245 mg, 1,51 mmol, 1,20 eq.) en THF (8 ml) se le añadieron TBTU (807 mg, 2,51 mmol, 2,00 eq.) y *N*-metilmorfolina (509 mg, 553 µl, 5,03 mmol, 4,00 eq.). Se agitó la mezcla de reacción a 50 °C durante 15 h. TLC a t = 15 h mostró que se completó la reacción. Se concentró la mezcla de reacción a vacío. Se purificó el material bruto por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, eluyente: EtOAc del 0 % al 100 % en heptano) para dar (2S)-2-[4-[(5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbonil)amino]fenil]morpholin-4-carboxilato de *terc*-butilo como un sólido blanquecino (501 mg, 96 %). EM (ISP): 413,7 ([M-H]⁺).

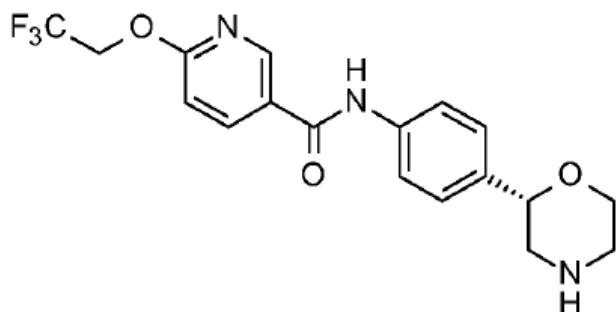
b) 5-etil-4-metil-N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]-1H-pirazol-3-carboxamida

A una solución agitada de ácido trifluoroacético (1,37 g, 918 µl, 12,0 mmol, 10 eq.) en agua (8 ml) se le añadió una suspensión de (2S)-2-[4-[(5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbonil)amino]fenil]morpholin-4-carboxilato de *terc*-butilo (497 mg, 1,2 mmol, 1,00 eq.) en acetonitrilo (4 ml). Se agitó la mezcla de reacción a 80 °C durante 3 h. EM a t = 3 h mostró que se completó la reacción. Se vertió la mezcla de reacción en NaOH 1 M ac. y se extrajo dos veces con EtOAc. Se secaron las capas orgánicas sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío. Se purificó el material bruto por cromatografía en columna ultrarrápida (cartucho de amina SiliaSep™, eluyente: EtOAc del 0 % al 100 % en heptano, a continuación MeOH del 0 % al 10 % en EtOAc) para dar 5-etil-4-metil-N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]-1*H*-pirazol-3-carboxamida (327 mg, 87 %) como un sólido blanquecino. EM (ISP): 315,7 ([M+H]⁺).

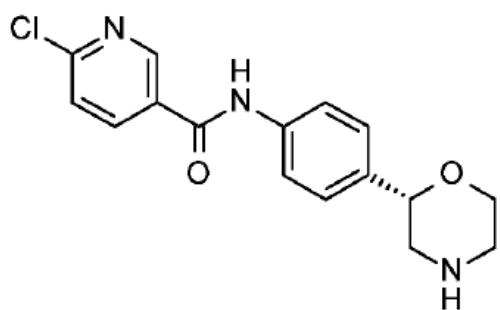
55 **Ejemplo 2 (ejemplo comparativo)**

5-etil-4-metil-N-[4-[(2R)-morfolin-2-il]fenil]-1H-pirazol-3-carboxamida

5 Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando (2R)-2-(4-aminofenil)morfolin-4-carboxilato (NR CAS: 1260220-42-5) en lugar de (2S)-2-(4-aminofenil)morfolin-4-carboxilato en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 315,6 ($[M+H]^+$).

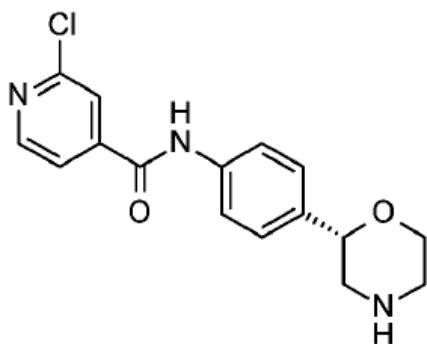
10 Ejemplo 3 (ejemplo comparativo)***N*-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]-6-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridin-3-carboxamida**

15 Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 6-(2,2,2-trifluoroetoxi)nicotínico (NR CAS: 159783-29-6) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 382,1 ($[M+H]^+$).

20 Ejemplo 4 (ejemplo comparativo)**6-cloro-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridin-3-carboxamida**

25 Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 6-cloro-nicotínico (NR CAS: 5326-23-8) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 320,1 ($[{^{37}Cl}M+H]^+$), 318,2 ($[{^{35}Cl}M+H]^+$).

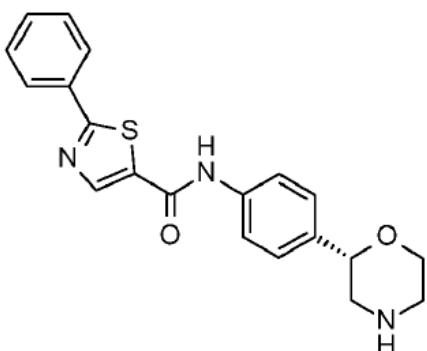
30 Ejemplo 5 (ejemplo comparativo)**2-cloro-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridin-4-carboxamida**



- 5 Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 2-cloro-isonicotínico (NR CAS: 6313-54-8) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 320,1 ($\{[{}^{37}\text{Cl}]\text{M}+\text{H}\}^+$), 318,1 ($\{[{}^{35}\text{Cl}]\text{M}+\text{H}\}^+$).

Ejemplo 6 (ejemplo comparativo)

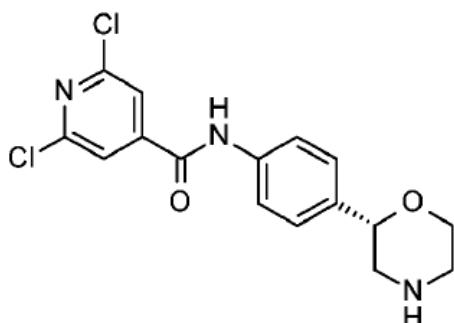
- 10 **N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]-2-fenil-1,3-tiazol-5-carboxamida**



- 15 Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 2-feniltiazol-5-carboxílico (NR CAS: 10058-38-5) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 366,1 ($\{[\text{M}+\text{H}]^+\}$).

Ejemplo 7 (ejemplo comparativo)

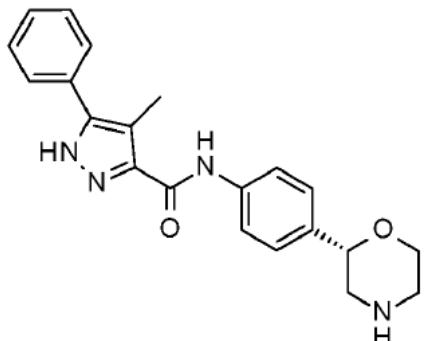
- 20 **2,6-dicloro-N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]piridin-4-carboxamida**



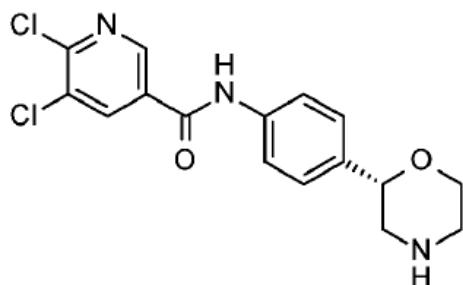
- 25 Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (NR CAS: 5398-44-7) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a).

Sólido blanco. EM (ISP): 356,1 ($\{[{}^{37}\text{Cl}]\text{M}+\text{H}\}^+$), 354,1 ($\{[{}^{37}\text{Cl}{}^{35}\text{Cl}]\text{M}+\text{H}\}^+$), 352,1 ($\{[{}^{35}\text{Cl}]\text{M}+\text{H}\}^+$).

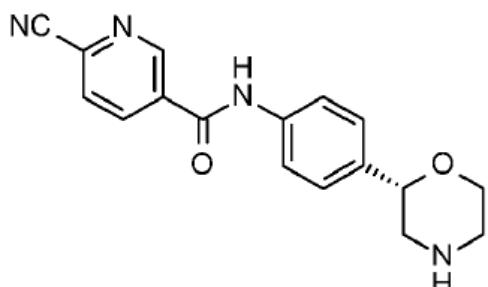
Ejemplo 8 (ejemplo comparativo)

4-metil-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]-5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida

- 5 Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 4-metil-5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (NR CAS: 879770-33-9) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 363,2 ($[M+H]^+$).

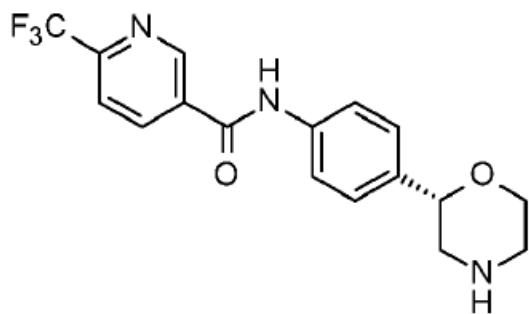
Ejemplo 9 (ejemplo comparativo)**5,6-dicloro-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridin-3-carboxamida**

- 15 Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 5,6-dicloro-nicotínico (NR CAS: 41667-95-2) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 356,1 ($\{[{}^{37}Cl]{}^{35}Cl\}M+H]^+$), 354,1 ($\{[{}^{37}Cl]M+H]^+$), 352,1 ($\{[{}^{35}Cl]M+H]^+$).

Ejemplo 10 (ejemplo comparativo)**6-ciano-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridin-3-carboxamida**

- 25 Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 6-ciano-nicotínico (NR CAS: 70165-31-0) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 309,1 ($[M+H]^+$).

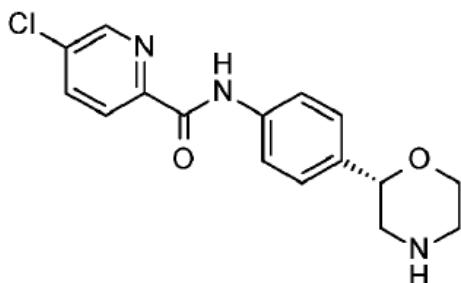
Ejemplo 11 (ejemplo comparativo)**N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]-6-(trifluorometil)piridin-3-carboxamida**



Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 6-(trifluorometil)nicotínico (NR CAS: 158063-66-2) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 5 352,2 ([M+H]⁺).

Ejemplo 12 (ejemplo comparativo)

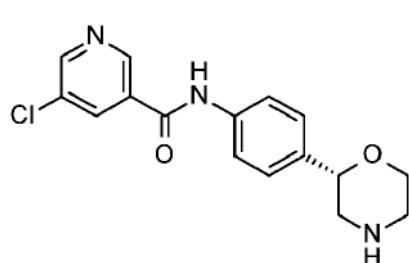
5-cloro-N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]piridin-2-carboxamida



Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 5-cloro-picolínico (NR CAS: 86873-60-1) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 15 320,1 ([³⁷Cl]M+H)⁺, 318,2 ([³⁵Cl]M+H)⁺.

Ejemplo 13 (ejemplo comparativo)

5-cloro-N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]piridin-3-carboxamida

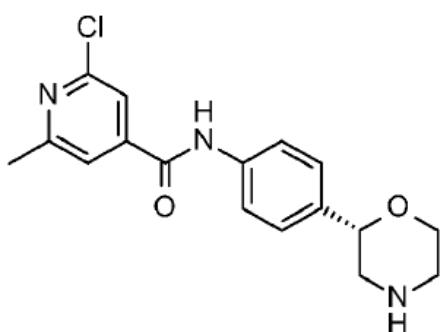


Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 5-cloro-nicotínico (NR CAS: 22620-27-5) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 25 320,1 ([³⁷Cl]M+H)⁺, 318,1 ([³⁵Cl]M+H)⁺.

Ejemplo 14 (ejemplo comparativo)

2-cloro-6-metil-N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]piridin-4-carboxamida

30



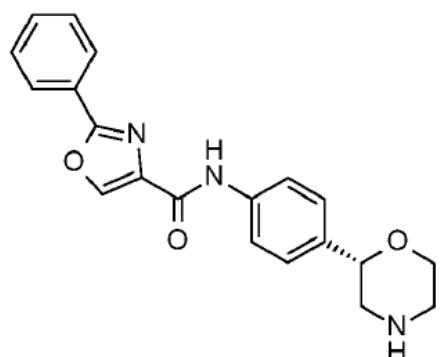
Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 2-cloro-6-metilpiridin-4-carboxílico (NR CAS: 25462-85-5) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 334,1 ($[{}^{37}\text{Cl}]\text{M}+\text{H}]^+$), 332,1 ($[{}^{35}\text{Cl}]\text{M}+\text{H}]^+$).

5

Ejemplo 15 (ejemplo comparativo)

N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]-2-fenil-1,3-oxazol-4-carboxamida

10



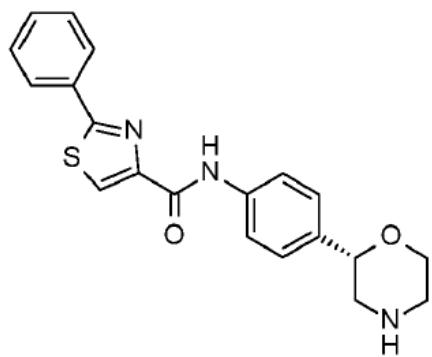
Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 2-fenioxazol-4-carboxílico (NR CAS: 23012-16-0) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 350,2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

15

Ejemplo 16 (ejemplo comparativo)

N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]-2-fenil-1,3-tiazol-4-carboxamida

20

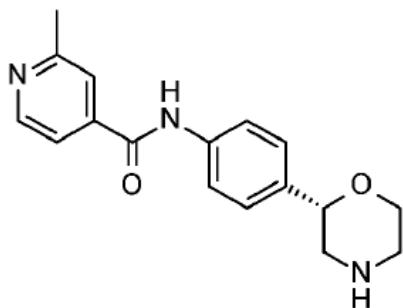


Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 2-feniltiazol-4-carboxílico (NR CAS: 7113-10-2) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 366,1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

25

Ejemplo 17 (ejemplo comparativo)

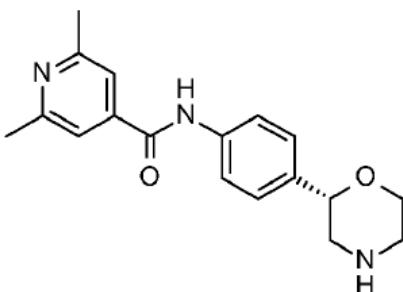
2-metil-N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]piridin-4-carboxamida



- 5 Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 2-metil-isonicotínico (NR CAS: 4021-11-8) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 298,2 ([M+H]⁺).

Ejemplo 18 (ejemplo comparativo)

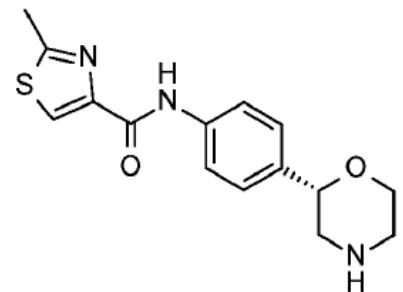
- 10 **2,6-dimetil-N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]piridin-4-carboxamida**



- 15 Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 2,6-dimetil-isonicotínico (NR CAS: 54221-93-1) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 312,2 ([M+H]⁺).

Ejemplo 19 (ejemplo comparativo)

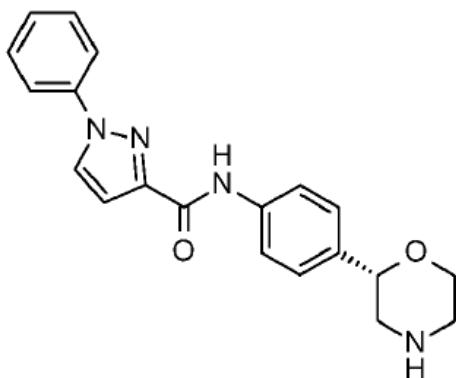
- 20 **N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]-2-metil-1,3-tiazol-4-carboxamida**



- 25 Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 2-metiltiazol-4-carboxílico (NR CAS: 35272-15-2) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 304,1 ([M+H]⁺).

Ejemplo 20 (ejemplo comparativo)

- 30 **N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]fenil]-1-fenilpirazol-3-carboxamida**



Se obtuvo el compuesto del título de forma análoga al ejemplo 1 usando ácido 1-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (NR CAS: 4747-46-0) en lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico en la etapa (a). Sólido blanco. EM (ISP): 5 349,2 ([M+H]⁺).

Como se menciona anteriormente, el compuesto de la presente invención tiene ventajas significativas sobre los compuestos de la técnica anterior, ventajas que son actividad agonista potente en el receptor TAAR1 humano, selectividad frente al transportador de dopamina (DAT), selectividad frente al canal de iones hERG y un vector anfíflico bajo y, representa de este modo un riesgo bajo de provocar fosfolipidosis inducida por fármacos (DIPL) (véase *infra*). 10

Se pueden proporcionar los siguientes datos comparativos y comentarios para mostrar las ventajas de superioridad del compuesto de fórmula I en comparación con compuestos conocidos de la técnica anterior.

15 **1. Efectos farmacológicos y potencial terapéutico de agonistas parciales del receptor 1 asociado a aminas traza humano (hTAAR1)**

Existen pruebas de diferencias entre especies significativas en las interacciones ligando-receptor entre TAAR1 de 20 roedor y de humano^[1]. Por lo tanto, cuando se seleccionan compuestos para su uso como tratamientos humanos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con TAAR1, es importante priorizar los compuestos candidatos en base a la potencia de su actividad funcional en la forma humana del receptor TAAR1 (hTAAR1). hTAAR1 es un receptor transmembranario acoplado a proteína G (GPCR), con lo que los ligandos pueden funcionar como antagonistas, agonistas, agonistas parciales o agonistas inversos del receptor. El compuesto de fórmula I y ejemplos comparativos se han sometido a prueba *in vitro* para determinar su actividad funcional en hTAAR1, con lo que se descubrió que el compuesto de fórmula I era un agonista parcial de hTAAR1. Los valores de CE₅₀ de 25 hTAAR1 determinados experimentalmente para el compuesto de fórmula I y una selección de ejemplos comparativos se muestran en la tabla 1 (véase *infra*). De este modo se ha descubierto que el compuesto del ejemplo 1, en particular, es un agonista parcial potente de hTAAR1 *in vitro*.

30 Los experimentos electrofisiológicos *ex vivo* en el área ventrotegmentaria y núcleos de rafe dorsal mostraron que los agonistas parciales de TAAR1 potenciaron las tasas de activación neuronal de 5-HT y DA en ratones naturales^[2,3], mientras que agonistas completos como *p*-tiramina disminuyeron las tasas de activación^[3,4]. Sin embargo, se ha demostrado que los agonistas tanto completos como parciales son protectores frente a los efectos 35 gratificantes y de refuerzo de la cocaína psicoestimulante^[5]. Mientras que los agonistas completos como la anfetamina inducen retroalimentación negativa para mitigar su propio efecto sobre los sistemas DA y 5-HT^[6,7], los agonistas parciales pueden incrementar su efecto sobre la transmisión de señales neuronales incrementando las tasas de activación por medio de TAAR1. Debido a estos hallazgos, y los informes de que los agonistas parciales 40 de TAAR1 tienen una farmacología *in vivo* más rica roedores que los agonistas completos^[3,8], está surgiendo un sólido conjunto de datos preclínicos que sugiere que los agonistas parciales de TAAR1 muestran un potencial altamente prometedor para su uso como tratamientos humanos para el tratamiento de enfermedades del SNC incluyendo, pero sin limitarse a, esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, enfermedad de Parkinson, así como 45 para el tratamiento de alcoholismo y toxicomanía.

50 Por ejemplo, se propone que los agonistas parciales de TAAR1 son superiores a los fármacos antipsicóticos atípicos existentes mostrando eficacia antipsicótica con el beneficio de una mejora en la cognición y estado de ánimo así como con una reducción en el perfil de efectos secundarios (por ejemplo, sin inducción del síndrome metabólico que se observa con antipsicóticos actuales)^[3,8]. Otra literatura sugiere que posibles indicaciones incluyen trastorno bipolar,^[8] toxicomanía^[5,9] y diabetes^[10].

Referencias de la literatura:

[1] Simmler, L. D.; Buchy, D.; Chaboz, S.; Hoener, M.C.; Liechti, M. E.; "In vitro characterization of psychoactive

substances at rat, mouse and human trace amine-associated receptor 1". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2016**, Fast Forward article DOI: 10.1124/jpet.115.229765;

- 5 [2] Bradaia, A. et al.; "The selective antagonist EPPTB reveals TAAR1-mediated regulatory mechanisms in dopaminergic neurons of the mesolimbic system". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 20081-20086;
- [3] Revel, F. G. et al.; "Trace amine-associated receptor 1 partial agonism reveals novel paradigm for neuropsychiatric therapeutics". *Biol. Psychiatry* **2012**, 72, 934-942;
- 10 [4] Revel, F. G. et al.; "TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 8485-8490;
- [5] Pei, Y.; Mortas, P.; Hoener, M. C.; Canales, J. J.; "Selective activation of the trace amine-associated receptor 1 decreases cocaine's reinforcing efficacy and prevents cocaine-induced changes in brain reward thresholds". *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiatry* **2015**, 63, 70-75;
- 15 [6] Lindemann, L. et al.; "Trace amine-associated receptor 1 modulates dopaminergic activity". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, 324, 948-956;
- 20 [7] Di Cara, B. et al.; "Genetic deletion of trace amine 1 receptors reveals their role in auto-inhibiting the actions of ecstasy (MDMA)". *J. Neuroscience* **2011**, 31, 16928-16940;
- [8] Revel, F. G. et al.; "A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight". *Mol. Psychiatry* **2013**, 18, 543-556;
- 25 [9] Pei, Y.; Lee, J.; Feo, D.; Gainetdinov, R. R.; Hoener, M. C.; Canales, J. J.; "Activation of the trace amine-associated receptor 1 prevents relapse to cocaine seeking". *Neuropsychopharmacology* **2014**, 39, 2299-2308;
- 30 [10] Raab, S. et al.; "Incretin-like effects of small molecule trace amine-associated receptor 1 agonists". *Mol. Metabolism* **2016**, 5, 47-56.

2. Transportador de dopamina (DAT) y predisposición asociada para drogadicción y/o posibilidad de adicción

- 35 La farmacología del transportador de dopamina (DAT) se ha implicado, entre otros, en los efectos psicoestimuladores y en la predisposición a abuso y el mecanismo de adicción de determinadas drogas psicoestimulantes tales como cocaína y MDPV.^[1-3] Por lo tanto, para un nuevo tratamiento destinado al uso humano, es deseable evitar la inhibición de, o la interacción con, el transportador de dopamina DAT para minimizar el riesgo de predisposición a abuso o posibilidad de adicción.
- 40 Por ejemplo, las pruebas sugieren que los efectos de refuerzo de la cocaína dependen de su capacidad para bloquear rápidamente el transportador de dopamina (DAT). En estudios con animales, los inhibidores de la recaptación de dopamina además de la cocaína también se autoadministran, con una potencia relativa que se correlaciona en general positivamente con su potencia para inhibir el DAT, pero no con los transportadores de serotonina o noradrenalina (SERT, NET)^[4-8]. Los animales entrenados para autoadministrar cocaína también se autoadministrarán agonistas de dopamina directos^[9-11]. Además, la destrucción de terminales nerviosas con dopamina puede dar lugar a la extinción del comportamiento de autoadministración de cocaína^[12,13], y estos efectos se han observado incluso cuando se conserva la respuesta sostenida por otros reforzadores^[14,15]. En humanos, el "subidón" inducido por cocaína se correlaciona con la ocupación de DAT en el cerebro^[16].
- 45
- 50 Para someter a prueba además la hipótesis de que el DAT es esencial para los efectos de refuerzo de la cocaína, se generó un DAT funcional pero "insensible a cocaína" y se expresó en ratones^[17,18]. Este DAT mutante demostró una afinidad 89 veces menor por cocaína en relación con DAT natural, y la cocaína no logró incrementar la dopamina extracelular en el núcleo accumbens, o inducir incrementos en la actividad locomotora, estereotipias o preferencias de lugar condicionadas, en ratones con inserción génica (DATki) que expresan este DAT mutante^[18-20]. Además, la cocaína no sirvió como reforzador positivo en estos ratones DATki, mientras que la comida, d-fenilamina y un agonista de dopamina directo mantuvieron de manera fiable el comportamiento operante en estos ratones, a niveles comparables con ratones naturales^[21]. La reintroducción del DAT natural sensible a cocaína en áreas cerebrales, incluyendo, entre otras, el área ventrotegmentaria (VTA) dio lugar al restablecimiento del comportamiento de recompensa de cocaína en los ratones DATki^[22]. En conclusión, la capacidad de la cocaína para bloquear DAT es suficiente para suprimir sus efectos de refuerzo en ratones proporcionando fuertes pruebas de que el bloqueo de DAT es fundamental para los efectos de refuerzo de cocaína.
- 55
- 60
- 65 Por lo tanto, tomados conjuntamente, estos hallazgos sugieren que para un nuevo tratamiento destinado para uso humano, es altamente deseable evitar la inhibición de, o la interacción con, el transportador de dopamina DAT para minimizar el riesgo de predisposición a abuso o posibilidad de adicción.

Las K_i de DAT *in vitro* medidas para una serie de compuestos TAAR1 se muestran en la tabla 1 (véase *infra*). Sorprendentemente se ha descubierto que el ejemplo 1 es un ligando significativamente más débil en DAT que otros compuestos, siendo simultáneamente un agonista parcial potente de hTAAR1 y, por lo tanto, la proporción de selectividad hTAAR1/DAT para el ejemplo 1 es significativamente mayor que para otros compuestos.

Referencias de la literatura:

- [1] Meil, W. M. y Boja, J. W.; "The dopamine transporter and addiction". capítulo 1, pp. 1-21 en *Neurochemistry of Abused Drugs* (Karch, S. B., Ed.), CRC Press (2008);
- [2] Simmler, L. D. *et al.*; "Pharmacological characterization of designer cathinones *in vitro*". *Brit. J. Pharmacol.* **2013**, *168*, 458-470;
- [3] Baumann, M. H.; Partilla, J. S.; Lehner, K. R.; "Psychoactive 'bath salts': not so soothing". *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *698*, 1-5;
- [4] Ritz., M. C.; Lamb, R. J.; Goldberg, S. R.; Kuhar, M. J.; "Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine". *Science* **1987**, *237*, 1219-1223;
- [5] Bergmann., J.; Madras, B. K.; Johnson, S. E.; Spealman, R. D.; "Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. III. Self-administration by squirrel monkeys". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, *251*, 150-155;
- [6] Howell., L. L. & Byrd, L. D.; "Serotonergic modulation of the behavioural effects of cocaine in the squirrel monkey". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *275*, 1551-1559;
- [7] Roberts, D. C. S. *et al.*; "Self-administration of cocaine analogs by rats". *Psychopharmacology* **1999**, *144*, 389-397;
- [8] Wee, S. *et al.*; "Relationship between serotonergic activity and reinforcing effects of a series of amphetamine analogs". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313*, 848-854;
- [9] Woolverton, W. L.; Goldberg, L. I.; Ginos, J. Z.; "Intravenous self-administration of dopamine receptor agonists by Rhesus monkeys". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**, *230*, 678-683;
- [10] Wise, R. A.; Murray, A.; Bozarth, M. A.; "Bromocriptine self-administration and bromocriptine-reinstatement of cocaine-trained and heroin-trained lever pressing in rats". *Psychopharmacology* **1990**, *100*, 355-360;
- [11] Caine, S. B. y Koob, G. F.; "Modulation of cocaine self-administration in the rat through D-3 dopamine receptors". *Science* **1993**, *260*, 1814-1816;
- [12] Roberts, D. C. S.; Corcoran, M. E.; Fibiger, H. C.; "On the role of ascending catecholaminergic systems in intravenous self-administration of cocaine". *Pharmacol. Biochem. Behaviour* **1977**, *6*, 615-620;
- [13] Roberts, D. C. S.; Koob, G. F.; Klonoff, P.; Fibiger, H. C.; "Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens". *Pharmacol. Biochem. Behaviour* **1980**, *12*, 781-787;
- [14] Pettit, H. O.; Ettenberg, A.; Bloom, F. E.; Koob, G. F.; "Destruction of dopamine in the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats". *Psychopharmacology* **1984**, *84*, 167-173;
- [15] Caine, S. B. y Koob, G. F.; "Effects of mesolimbic dopamine depletion on responding maintained by cocaine and food". *J. Exp. Anal. Behavior* **1994**, *61*, 213-221;
- [16] Volkow, N. D. *et al.*; "Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy". *Nature* **1997**, *386*, 827-830;
- [17] Chen, R.; Han, D. D.; Gu, H. H.; "A triple mutation in the second transmembrane domain of mouse dopamine transporter markedly decreases sensitivity to cocaine and methylphenidate". *J. Neurochem.* **2005**, *94*, 352-359;
- [18] Chen, R. *et al.*; "Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9333-9338;
- [19] Tilley, M. R. y Gu, H. H.; "Dopamine transporter inhibition is required for cocaine-induced stereotypy". *Neuroreport* **2008**, *19*, 1137-1140;

[20] Tilley, M. R.; O'Neill, B.; Han, D.D.; Gu, H. H.; "Cocaine does not produce reward in absence of dopamine transporter inhibition". *Neuroreport* **2009**, 20, 9-12;

5 [21] Thomsen, M.; Han, D.D.; Gu, H. H.; Caine, S. B.; "Lack of cocaine self-administration in mice expressing a cocaine-insensitive dopamine transporter". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, 331, 204-211;

[22] Wu, H. et al.; "Restoration of cocaine stimulation and reward by reintroducing wild type dopamine transporter in adult knock-in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter". *Neuropharmacology* **2014**, 86, 31-37.

10 3. Bloqueo de hERG y predisposición asociada para la prolongación del intervalo QT cardíaco

La minimización de la verosimilitud para provocar efectos secundarios cardíacos inducidos por fármacos es altamente deseable para un agente terapéutico destinado a un uso seguro en humanos, en especial para un fármaco destinado a usarse para regímenes de tratamiento crónicos. En los últimos años, las autoridades reguladoras han retrasado la aprobación o impuesto restricciones en el uso de, e incluso negado la aprobación o retirado del mercado, agentes terapéuticos que prolongan el intervalo QT cardíaco. El intervalo QT es el tiempo desde el inicio del complejo QRS al final de la onda T del electrocardiograma (ECG) y es una medida de la duración de la despolarización y repolarización ventricular. Los fármacos que prolongan el intervalo QT se han asociado con una taquicardia ventricular polimórfica conocida como *Torsades de Pointes* (TdP). Esta arritmia puede provocar resultados cardiovasculares graves y puede progresar a fibrilación ventricular irreversible y muerte. La directriz reguladora ICH S7B^[1] recomienda una estrategia no clínica global para evaluar el riesgo cardiovascular de nuevas entidades moleculares (NME) que incluye el ensayo de IK_r *in vitro* [corriente de potasio conducida por el homólogo humano del gen "éter a gogó" (hERG)]. La inhibición de hERG se identificó como el mecanismo principal para la prolongación de QT.^[2] Por lo tanto, la estrategia de reducción de riesgo del intervalo QT no clínico mínima recomendada es someter a prueba compuestos representativos de una serie química dada en el ensayo de hERG *in vitro*.^[3] El objetivo es seleccionar compuestos que no provoquen más de un 20 % de inhibición de hERG a concentraciones al menos 30 veces inferiores a la concentración eficaz *in vitro* (*o in vivo* si está disponible) para la actividad terapéutica. En el caso de agonistas de TAAR1, la CE_{50} de hTAAR1 se puede considerar como el factor predictivo de concentración *in vitro* pertinente de la actividad terapéutica (véase *supra*). Por lo tanto, es deseable seleccionar agonistas de TAAR1 donde la proporción Cl_{20} hERG/ CE_{50} hTAAR1 sea al menos de 30 veces.

Las Cl_{20} y Cl_{50} de hERG *in vitro* para una serie de compuestos TAAR1 se muestran en la tabla 1 (véase *infra*).

35 Se sabe que los compuestos básicos en particular son en especial propensos a provocar una inhibición potente del canal hERG.^[4] Todos los compuestos TAAR1 tienen el mismo grupo principal de morfolino, por lo tanto, se espera que todos los compuestos sean similarmente básicos. El resto básico se requiere para la actividad agonista en hTAAR1. Sorprendentemente, se ha descubierto que el ejemplo 1 es un inhibidor del canal hERG significativamente más débil que los compuestos comparativos y, por lo tanto, la proporción Cl_{20} hERG/ CE_{50} hTAAR1 para el ejemplo 1 es significativamente mayor que el mínimo de 30 veces recomendado.

Referencias de la literatura:

45 [1] Directriz ICH. "The nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals (S7B)" presentada como CPMP/ICH/423/02, adoptada por CHMP en mayo de 2005;

50 <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/safety-single/article/the-non-clinical-evaluation-of-the-potential-for-delayed-ventricular-repolarization-qt-interval-pro.html>

55 [2] Redfern, W. S.; Carlsson, L.; Davis, A. S.; Lynch, W. G.; MacKenzie, I.; Palethorpe, S.; Siegl, P.K.; Strang, I.; Sullivan, A. T.; Wallis, R.; Camm, A.J.; Hammond, T. G.; "Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development". *Cardiovasc. Res.* **2003**, 58, 32-45;

60 [3] Helliwell, R. M.: "Potassium Channels". *Methods in Molecular Biology* (Totowa, NJ, United States) **2008**, 491, 279-295;

[4] Zolotoy, A. B.; Plouvier, B. P.; Beatch, G. B.; Hayes, E. S.; Wall, R. A.; Walker, M. J. A.; "Physicochemical determinants for drug-induced blockade of hERG potassium channels: Effect of charge and charge shielding". *Curr. Med. Chem. - Cardiovascular & Hematological Agents* **2003**, 1, 225-241.

4. Anfifilicidad y predisposición asociada para fosfolipidosis inducida por fármacos (DIPL)

65 La fosfolipidosis (PLD) es un trastorno de almacenamiento lisosómico caracterizado por la acumulación excesiva de fosfolípidos en tejidos^{[1][2][3]} Se informa de que muchos fármacos anfifílicos catiónicos, incluyendo

5 antidepresivos, antianginosos, antipalúdicos e hipocolesterolimiantes provocan fosfolipidosis inducida por fármacos (DIPL) en animales y humanos. Los mecanismos de DIPL implican la captura o captación selectiva de fármacos DIPL dentro de los lisosomas y vesículas ácidas de células afectadas. La captura de fármaco está seguida de una acumulación gradual de complejos fármaco-fosfolípido dentro de las membranas lisosómicas internas. El incremento en los materiales no digeridos da como resultado la acumulación anómala de cuerpos multilamelares (cuerpos mieloides) en los tejidos. Aunque la fosfolipidosis se considera principalmente como un trastorno de almacenamiento, con algunos compuestos se sabe que el trastorno de almacenamiento está asociado con inflamación y necrosis dando lugar a un deterioro funcional de los tejidos afectados. Por lo tanto, es altamente deseable que un fármaco terapéutico no represente un riesgo de provocar DIPL. Esto es en especial cierto en el caso de medicamentos destinados para uso crónico, por ejemplo, fármacos destinados para el tratamiento de trastornos psiquiátricos crónicos tales como esquizofrenia, trastorno bipolar o depresión, o fármacos destinados para el tratamiento de trastornos metabólicos crónicos tales como diabetes.

10 15 DIPL es un efecto adverso conocido por estar en particular asociado con fármacos anfifílicos catiónicos (CAD).^[4] Para evitar la DIPL se tiene que reducir el pK_a básico (pK_a básico < 6,3) o bien la anfifilicidad ($\Delta\Delta G_{an}$ > - 6 kJ mol⁻¹) de un compuesto (es decir, es necesario incrementar $\Delta\Delta G_{an}$).^[5] Un compuesto se clasifica como DIPL negativa si el valor de pK_a básico está por debajo de 6,3 o bien la anfifilicidad está por encima de $\Delta\Delta G_{an}$ = -6 kJ mol⁻¹. La anfifilicidad para un compuesto dado se puede calcular *in silico* directamente a partir de la fórmula estructural molecular,^[6] y por lo tanto el riesgo predicho para DIPL para ese compuesto también se puede calcular *in silico*,^[5] con lo que el algoritmo de predicción usa una clasificación de riesgo DIPL definida de acuerdo con los siguientes criterios, que se basan en parámetros extraídos de un conjunto de entrenamiento computacional que comprende resultados de fosfolipidosis determinados experimentalmente para un gran conjunto de compuestos:

20 25 VECTOR ANFIFÍLICO > -5,0 kJ/mol Y BPKA1 <= 5,60 da como resultado predicción DIPL NEGATIVO;
-7,0 kJ/mol < VECTOR ANFIFÍLICO < -5,0 kJ/mol y/o 7,0 > BPKA1 > 5,60 da como resultado predicción DIPL límite;

30 35 VECTOR ANFIFÍLICO < -7,0 kJ/mol y BPKA1 >= 7,00 da como resultado predicción DIPL POSITIVO.
Las anfifilicidades calculadas ($\Delta\Delta G_{an}$ en kJ mol⁻¹), así como las predicciones de riesgo DIPL *in silico* (negativo/límite/positivo) para una serie de compuestos TAAR1 se muestran en la tabla 1 (véase *infra*).

40 45 Todos los compuestos TAAR1 llevan el mismo grupo principal de morfolino, por lo tanto el pK_a básico de todos los compuestos es muy similar y claramente por encima de 6,3. El resto básico se requiere para la actividad agonista en hTAAR1. Por lo tanto, la única forma de evitar DIPL es reducir la lipofilia de la cadena principal de las moléculas. Sorprendentemente se ha descubierto que para el ejemplo 1 la lipofilia se reduce significativamente más de lo esperado en base a los resultados para compuestos similares, y por lo tanto la anfifilicidad del ejemplo 1 se reduce claramente y, como consecuencia, no se predice que este compuesto provoque DIPL.

Referencias de la literatura:

- [1] Anderson, N.; Borlak, J.; "Drug-induced phospholipidosis". *FEBS Lett.* **2006**, 580, 5533-540;
- [2] Reasor, M. J.; Hastings, K. L.; Ulrich, R. G.; "Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions". *Expert Opin. Drug Safety* **2006**, 5, 567-83;
- [3] Nonoyama, T.; Fukuda, R.; "Drug induced phospholipidosis pathological aspects and its prediction". *J. Toxicol. Pathol.* **2008**, 21, 9-24;
- [4] Lullmann, H.; Lullmann-Rauch, R.; Wassermann, O.; "Lipidosis induced by amphiphilic cationic drugs." *Biochem. Pharmacol.* **1978**, 27, 1103-8;
- [5] Fischer, H.; Atzpodien, E. A.; Csato, M; Doessegger, L.; Lenz, B.; Schmitt, G.; Singer, T.; "In silico assay for assessing phospholipidosis potential of small drug like molecules: training, validation and refinement using several datasets." *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 126-139;
- [6] Fischer, H.; Kansy, M.; Bur, D.; "CAFCA: a novel tool for the calculation of amphiphilic properties of charged drug molecules". *Chimia* **2000**, 54, 640-645.

60 Se investigaron los compuestos de acuerdo con las pruebas dadas a continuación en el presente documento.

Materiales y procedimientos

65 TAAR1 humano

Para la construcción de plásmidos de expresión, se amplificaron las secuencias codificantes de TAAR 1 humano a partir de ADN genómico esencialmente como se describe por Lindemann *et al.* [14]. Se usó el sistema de PCR Expand High Fidelity (Roche Diagnostics) con Mg²⁺ 1,5 mM y se clonaron los productos de PCR purificados en el vector de clonación pCR2.1-TOPO (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se subclonaron los 5 productos de PCR en el vector pIRESneo2 (BD Clontech, Palo Alto, California) y se verificó la secuencia de los vectores de expresión antes de su introducción en líneas celulares.

Se cultivaron células HEK293 (n.º ATCC CRL-1573) esencialmente como se describe por Lindemann *et al.* (2005). Para la generación de líneas celulares transfectadas de forma estable, se transfecionaron células HEK293 con los 10 plásmidos de expresión pIRESneo2 que contenían las secuencias codificantes de TAAR (descritas anteriormente) con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y 24 horas después de la transfección se complementó el medio de cultivo con 1 mg/ml de G418 (Sigma, Buchs, Suiza). Después de un periodo de cultivo de aproximadamente 10 días, se aislaron los clones, se expandieron y se sometieron a prueba 15 para determinar su sensibilidad hacia aminas traza (todos los compuestos adquiridos de Sigma) con el sistema de inmunoensayo enzimático (EIA) Biotrak de AMPc (Amersham) siguiendo el procedimiento de EIA sin acetilación proporcionado por el fabricante. Se usaron las líneas celulares monoclonales que presentaron una CE₅₀ estable durante un periodo de cultivo de 15 pasos para todos los estudios posteriores.

Se realizaron mediciones de AMPc como se describe previamente (Revel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 20 108, 8485-8490). En resumen, se plaquearon células que expresaron TAAR1 humano en placas de 96 pocillos (BIOCOAT 6640; Becton Dickinson, Allschwil, Suiza) y se incubaron durante 20 h a 37 °C. Antes de la estimulación de las células con un amplio intervalo de concentración de agonistas durante 30 min a 37 °C, se lavaron las células con PBS y se preincubaron con PBS que contenía 3-isobutil-1-metilxantina 1 mM durante 10 min a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se estableció la estimulación con DMSO al 0,2 % como nivel de basal, y se estableció el efecto de β-PEA 25 30 µM como la respuesta máxima. Posteriormente, se lisaron las células y se realizaron ensayos de AMPc de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit AMPc; Upstate/Millipore, Schaffhausen, Suiza). Finalmente, se leyeron las placas con un luminómetro (1420 Multilabel Counter; PerkinElmer, Schwerzenbach, Suiza), y se calculó la cantidad de AMPc. Se obtuvieron los resultados de al menos tres experimentos independientes. Se realizaron los experimentos por duplicado o triplicado. Se presentan los valores de CE₅₀ como media ± desviación estándar 30 (en µM). El valor E_{máx} para los datos de actividad funcional en TAAR1 describe el grado de actividad funcional en comparación con un 100 % para el ligando endógeno y el agonista completo β-PEA.

DAT humano

35 Unión al transportador de dopamina (DAT) *in vitro*. Se cultivaron células 293 de riñón embrionario humano (HEK) (Invitrogen, Zug, Suiza) transfecionadas de forma estable con DAT humano. Se recogieron las células y se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se congelaron los sedimentos a -80 °C. A continuación se resuspendieron los sedimentos en 400 ml de HEPES-NaOH 20 mM, pH 7,4, que contenía EDTA 10 mM a 4 °C. Despues de la homogeneización con un Polytron (Kinematica, Lucerna, Suiza) a 10000 rotaciones 40 por minuto (rpm) durante 15 s, se centrifugaron los homogeneizados a 48000 xg durante 30 min a 4 °C. Se congelaron aliquotas de las reservas de membrana a -80 °C. Se realizaron todos los ensayos al menos tres veces. Se diluyeron los compuestos de prueba en 20 ml de tampón de unión (NaCl 252 mM, KCl 5,4 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, KH₂PO₄ 3,52 mM, pH 7,4) y se hicieron curvas de dilución de 10 puntos y se transfirieron a placas de ensayo de poliestireno blanco de 96 pocillos (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza). [³H]-WIN35,428 (~86 Ci/mmol; Perkin-45 Elmer) fue el radioligando para el ensayo de DAT y tuvo una K_d de 12 nM. Se añadieron cincuenta microlitros de [³H]-WIN35,428 (concentración ~ 40 nM) a cada pocillo de las placas de ensayo de hDAT, seleccionando una concentración final de [³H]-WIN35428 de 10 nM. Veinte microlitros de tampón de unión solo en la placa de ensayo definieron la unión total, mientras que la unión en presencia de indatralina 10 µM definió la unión no específica. Se descongelaron reservas de membrana con DAT congelada y se resuspendieron a una concentración de 50 aproximadamente 0,04 mg de proteína/ml de tampón de unión (diluido 1:1 en H₂O) usando un homogeneizador de tejidos Polytron. A continuación se mezclaron ligeramente los homogeneizados de membrana (40 µg/ml) durante 5-30 min con perlas de ensayo de proximidad de centelleo recubiertas con aglutinina con germen de trigo de poliviniltolueno (PCT) (WGASPA; Amersham Biosciences) a 7,7 mg de perlas/ml de homogeneizado. Se añadieron ciento treinta microlitros de la mezcla membrana/perla a cada pocillo de la placa de ensayo que contenía 55 radioligando y compuestos de prueba (volumen final en cada pocillo, 200 µl) para comenzar el ensayo, que se incubó durante aproximadamente 2 h a temperatura ambiente con agitación. A continuación se contaron las placas de ensayo en el modo de conteo PVT SPA de un Packard Topcount. Se contaron cincuenta microlitros de las reservas [³H]-WIN35428 en 5 ml de cóctel de centelleo ReadySafe (Beckman Industries) en un contador de centelleo líquido Packard 1900CA para determinar los recuentos totales añadidos a los ensayos respectivos. Se 60 usó regresión no lineal para ajustar los datos a las curvas sigmoides y determinar los valores de CI₅₀ para la unión y la captación. Se calcularon los valores de K_i para la unión y la captación usando la siguiente ecuación de Cheng-Prusoff: K_i = CI₅₀/(1+ [S]/K_m).

ERG humano (hERG)

65 Se usó la técnica de pinzamiento zonal de células completas para investigar los efectos de los elementos de

prueba en los canales de potasio de hERG (homólogo humano del gen "éter a gogó") en células CHO transfectadas de forma estable cerca de la temperatura fisiológica ($36 \pm 1^\circ\text{C}$). Se evaluaron los efectos de los compuestos sobre los parámetros de corriente de K^+ de hERG a 4 concentraciones (0,3-3-30-300 μM) en al menos 3 células CHO que expresan de forma estable el canal hERG. Para las mediciones electrofisiológicas, se sembraron células en placas de cultivo estériles de 35 mm que contenían 2 ml de medio de cultivo sin higromicina B. Se cultivaron las células a una densidad que permitió que se midieran células individuales (sin conexiones visibles a células vecinas). Se incubaron las células a 37°C en una atmósfera humidificada con CO_2 al 5 % (humedad rel. de aproximadamente un 95 %). Se mantuvieron continuamente las células y se pasaron en matraces de cultivo estériles que contenían la mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12 con L-glutamina) complementada con suero bovino fetal al 10 % y solución de penicilina/estreptomicina al 10 %. Cada día se trataron al menos tres células con un bloqueador de IK_r selectivo (E-4031, sustancia de referencia) para garantizar la exactitud del procedimiento. Se colocaron las placas de cultivo de 35 mm sobre las que se sembraron células a una densidad que permitió que se registraran células individuales en el portaplatas del microscopio y se perfundieron continuamente (a aproximadamente 1 ml/min) con la solución de baño (cloruro de sodio 150 mM, cloruro de potasio 4 mM, cloruro de calcio 1,2 mM, cloruro de magnesio 1 mM, HEPES 10 mM, pH (NaOH) 7,4) a temperatura casi fisiológica ($36 \pm 1^\circ\text{C}$). Después de la formación de un sello de Gigaohm entre los electrodos de parche y las células CHO transfectadas de manera estable con hERG individuales (intervalo de resistencia de pipeta: 2,0 $\text{M}\Omega$ - 7,0 $\text{M}\Omega$; intervalo de resistencia de sello: > 1 $\text{G}\Omega$) se rompió la membrana celular a través de la punta de la pipeta para garantizar el acceso eléctrico al interior celular (configuración de parche de célula completa). En caso de que la calidad del sello fuera mala, se repitió el procedimiento de formación de sello con una célula diferente y una nueva pipeta. Tan pronto como se estableció un sello estable, se midieron las corrientes de cola exterior de hERG tras la despolarización de la membrana celular a -40 mV durante 50 ms seguido de 500 ms a +20 mV (activación de canales) desde un potencial de retención de -80 mV y tras la repolarización posterior a -40 mV durante 500 ms. Se ejecutó este protocolo de voltaje al menos 10 veces a intervalos de 10 s. Si se consideró que la densidad de corriente era demasiado baja para la medición, se registró otra célula. Una vez que se han realizado los registros de control, se perfundieron continuamente las células con una solución de baño que contenía los elementos de prueba. Durante el lavado del elemento de prueba, se ejecutó el protocolo de voltaje indicado anteriormente de nuevo continuamente a intervalos de 10 s hasta que se logró el nivel de bloqueo en estado estacionario. Se aplicaron secuencialmente las cuatro concentraciones del elemento de prueba del compuesto a 3 células de manera acumulativa. A medida que se inhibieron las corrientes de cola de hERG por el elemento de prueba, se generó la curva concentración-respuesta y se calculó el valor de Cl_{50} . En base al valor de Cl_{50} se estimó la Cl_{20} . Se analizó cada concentración del elemento de prueba en tres experimentos ($n=3$).

Cálculo del vector anfíflico ($\Delta\Delta G_{\text{an}}$) y predicción de DIPL *in silico*

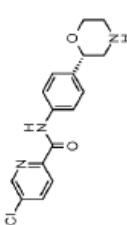
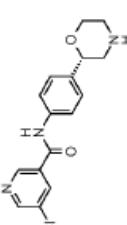
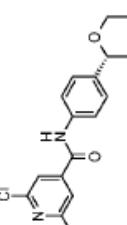
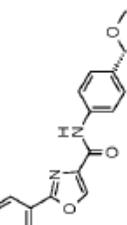
Se determinaron computacionalmente el vector anfíflico ($\Delta\Delta G_{\text{an}}$) y la predicción de DIPL *in silico* a partir de la fórmula estructural molecular para el compuesto de fórmula I y los compuestos comparativos de acuerdo con los algoritmos publicados (Fischer, H.; Kansy, M.; Bur, D.; "CAFCA: a novel tool for the calculation of amphiphilic properties of charged drug molecules". *Chimia* **2000**, 54, 640-645; Fischer, H.; Atzpodien, E. A.; Csato, M; Doessegger, L.; Lenz, B.; Schmitt, G.; Singer, T.; "*In silico* assay for assessing phospholipidosis potential of small drug like molecules: training, validation and refinement using several datasets". *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 126-139).

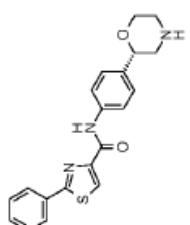
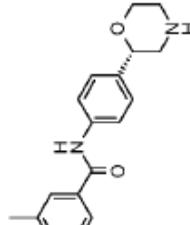
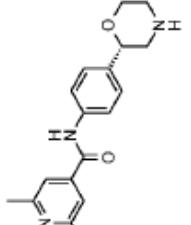
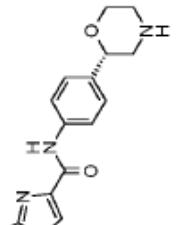
El compuesto de fórmula I tiene actividad agonista parcial sobre hTAAR1 (CE₅₀ en μM), afinidad de unión e hDAT (K_i en μM), y actividad bloqueante de canal en hERG (Cl_{20} y Cl_{50} en μM) como se muestra en la tabla 1. La tabla 1 también muestra el vector anfíflico calculado ($\Delta\Delta G_{\text{an}}$ en kJ mol^{-1}) y la estimación de fosfolipidosis *in silico* (predicción negativa/positiva/límite para DIPL *in vitro* y DIPL *in vivo*) para el compuesto de fórmula I y compuestos comparativos, como se calcula usando el procedimiento descrito anteriormente.

Tabla 1

N. ^o ejemplo	Estructura	CE ₅₀ hTAAR1 (μ M)	Eficacia hTAAR1* (%)	Cl ₅₀ hERG (μ M)	Cl ₂₀ hERG (μ M)	Proporción Cl ₂₀ hERG / CE ₅₀ hTAAR1	$\Delta\Delta G_{an}$ fosfolipidosis (kJ mol ⁻¹)	Fosfolipidosis <i>in silico</i> (<i>in</i> <i>vitro</i>)	Fosfolipidosis <i>in silico</i> (<i>in</i> <i>vivo</i>)	K _i DAT (μ M)	Proporción K _i DAT / CE ₅₀ hTAAR1
1		0,0585	42	216,60	36,20	619	-3,47	NEGATIVA	NEGATIVA	27,53	471
2		0,2632	38	-	-	-	-	-	-	-	-
3		0,0377	45	9,84	1,97	52	-6,3	POSITIVA	LÍMITE	17,43	462

4		0,0619	49	49,67	12,42	201	-5,31	NEGATIVA
5		0,0656	40	81,71	22,16	338	-5,9	NEGATIVA
6		0,08	30	1,31	0,38	5	-8,46	POSITIVA
7		0,0849	57	11,39	3,67	43	-7,41	POSITIVA

12		0,2119	40	14,26	3,21	15	-6,59	POSITIVA	LÍMITE	1,78	8
13		0,4045	37	66,04	9,14	23	-6,23	POSITIVA	LÍMITE	1,31	3
14		0,4467	53	73,18	21,63	48	-6,96	POSITIVA	LÍMITE	7,32	16
15		0,6632	35	9,65	2,40	4	-7,4	POSITIVA	POSITIVA	>26,1	>39

16		0,6666 35	8,98 3,35	5 5	-8,48 193	POSITIVA NEGATIVA	16,22 10,32	24 15
17		0,6727 45	518,2 129,55	45 193	-4,53 177	NEGATIVA NEGATIVA	10,32 10,32	15 15
18		0,8271 63	711,5 146,78	63 177	-5,82 8,32	NEGATIVA NEGATIVA	LÍMITE >26,1	>32 >32
19		1,025 32	60,47 8,32	32 8	-4,59 -4,59	NEGATIVA NEGATIVA	21,9 21,9	21 21

* se informa del % de actividad agonista para hTAAR1 en una escala calibrada de modo que el efecto del ligando endógeno de β -feniletilamina = agonismo de un 100 %

Sorprendentemente se ha descubierto que el compuesto de fórmula I (ejemplo 1) presenta una combinación superior global de propiedades en términos de actividad agonista potente en hTAAR1, selectividad alta frente a hDAT, selectividad alta frente a hERG, vector anfílico bajo y en consecuencia riesgo de fosfolipidosis bajo en comparación con otros compuestos de TAAR1 de la técnica anterior. La inspección de la tabla 1 revela que el ejemplo 1 tiene una actividad agonista parcial potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 0,059 \mu M$), es altamente selectivo frente a hDAT ($K_i = 27,5 \mu M$; proporción de selectividad = 471 veces frente a CE_{50} de hTAAR1), es altamente selectivo frente a hERG ($Cl_{20} = 36,2 \mu M$; proporción de selectividad = 619 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y tiene un vector anfílico bajo ($\Delta\Delta G_{an} = -3,47 \text{ kJ mol}^{-1}$) muy por debajo del valor umbral de preocupación para fosfolipidosis (predicción de riesgo de DIPL *in silico* = negativa).

La inspección de la tabla 1 revela que los análogos cercanos del ejemplo 1 tienen propiedades inferiores en comparación con el ejemplo 1 en una o más consideraciones.

Por ejemplo, el ejemplo comparativo 2, que es el enantiómero *R* del ejemplo 1, es menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 0,2632 \mu M$), lo que enseña que la configuración *S* de estereoquímica absoluta, como en el ejemplo 1, es preferente para obtener mayor potencia en hTAAR1.

El ejemplo comparativo 3 es significativamente más potente en hERG ($Cl_{20} = 1,97 \mu M$; proporción de selectividad = 52 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfíflico significativamente mayor ($\Delta\Delta G_{an} = -6,3 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL positiva.

El ejemplo comparativo 4 es significativamente más potente en DAT ($K_i = 2,5 \mu M$; proporción de selectividad = 40 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfíflico mayor ($\Delta\Delta G_{an} = -5,3 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL límite.

El ejemplo comparativo 5 es significativamente más potente en DAT ($K_i = 1,5 \mu M$; proporción de selectividad = 23 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfíflico mayor ($\Delta\Delta G_{an} = -5,9 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL límite.

El ejemplo comparativo 6 es significativamente más potente en hERG ($Cl_{20} = 0,38 \mu M$; proporción de selectividad = 5 veces frente a CE_{50} de hTAAR1), es más potente en DAT ($K_i = 5,9 \mu M$; proporción de selectividad = 74 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfíflico significativamente mayor ($\Delta\Delta G_{an} = -8,46 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL positiva.

El ejemplo comparativo 7 es significativamente más potente en hERG ($Cl_{20} = 3,57 \mu M$; proporción de selectividad = 43 veces frente a CE_{50} de hTAAR1), es significativamente más potente en DAT ($K_i = 0,79 \mu M$; proporción de selectividad = 9 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfíflico significativamente mayor ($\Delta\Delta G_{an} = -7,41 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL positiva.

El ejemplo comparativo 8 es significativamente más potente en hERG ($Cl_{20} = 3,01 \mu M$; proporción de selectividad = 28 veces frente a CE_{50} de hTAAR1).

El ejemplo comparativo 9 es menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 0,144 \mu M$), es significativamente más potente en hERG ($Cl_{20} = 1,14 \mu M$; proporción de selectividad = 8 veces frente a CE_{50} de hTAAR1), es significativamente más potente en DAT ($K_i = 0,48 \mu M$; proporción de selectividad = 3 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfíflico significativamente mayor ($\Delta\Delta G_{an} = -8,83 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL positiva.

El ejemplo comparativo 10 es menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 0,184 \mu M$) y es más potente en hERG ($Cl_{20} = 5,78 \mu M$; proporción de selectividad = 31 veces frente a CE_{50} de hTAAR1).

El ejemplo comparativo 11 es menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 0,203 \mu M$), es significativamente más potente en hERG ($Cl_{20} = 2,59 \mu M$; proporción de selectividad = 13 veces frente a CE_{50} de hTAAR1), es significativamente más potente en DAT ($K_i = 2,33 \mu M$; proporción de selectividad = 12 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfíflico significativamente mayor ($\Delta\Delta G_{an} = -6,18 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL positiva.

El ejemplo comparativo 12 es menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 0,212 \mu M$), es significativamente más potente en hERG ($Cl_{20} = 3,21 \mu M$; proporción de selectividad = 15 veces frente a CE_{50} de hTAAR1), es significativamente más potente en DAT ($K_i = 1,78 \mu M$; proporción de selectividad = 8 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfíflico significativamente mayor ($\Delta\Delta G_{an} = -6,59 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL positiva.

El ejemplo comparativo 13 es significativamente menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 0,405 \mu M$), es más potente en hERG ($Cl_{20} = 9,14 \mu M$; proporción de selectividad = 23 veces frente a CE_{50} de hTAAR1), es significativamente más potente en DAT ($K_i = 1,31 \mu M$; proporción de selectividad = 3 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfíflico significativamente mayor ($\Delta\Delta G_{an} = -6,23 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL positiva.

El ejemplo comparativo 14 es significativamente menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 0,447 \mu M$), es significativamente más potente en DAT ($K_i = 7,32 \mu M$; proporción de selectividad = 16 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfíflico significativamente mayor ($\Delta\Delta G_{an} = -6,96 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL positiva.

El ejemplo comparativo 15 es significativamente menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 0,663 \mu M$), es significativamente más potente en hERG ($Cl_{20} = 2,40 \mu M$; proporción de selectividad = 4 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfíflico significativamente mayor ($\Delta\Delta G_{an} = -7,4 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL positiva.

- El ejemplo comparativo 16 es significativamente menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 0,666 \mu M$), es significativamente más potente en hERG ($Cl_{20} = 3,35 \mu M$; proporción de selectividad = 5 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfifílico significativamente mayor ($\Delta\Delta G_{an} = - 8,48 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL positiva.
- 5 El ejemplo comparativo 17 es significativamente menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 0,673 \mu M$) y es más potente en DAT ($K_i = 10,32 \mu M$; proporción de selectividad = 15 veces frente a CE_{50} de hTAAR1).
- 10 El ejemplo comparativo 18 es significativamente menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 0,827 \mu M$) y también tiene un vector anfifílico mayor ($\Delta\Delta G_{an} = - 5,82 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL límite.
- 15 El ejemplo comparativo 19 es significativamente menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 1,025 \mu M$) y es más potente en hERG ($Cl_{20} = 8,32 \mu M$; proporción de selectividad = 8 veces frente a CE_{50} de hTAAR1).
- 20 Finalmente, el ejemplo comparativo 20 es significativamente menos potente en hTAAR1 ($CE_{50} = 2,48 \mu M$), es significativamente más potente en hERG ($Cl_{20} = 2,49 \mu M$; proporción de selectividad = 1 veces frente a CE_{50} de hTAAR1) y también tiene un vector anfifílico mayor ($\Delta\Delta G_{an} = - 5,37 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por tanto una predicción de DIPL límite.
- 25 Por lo tanto, tomando todos los datos en la tabla 1 en consideración, el compuesto de fórmula I (ejemplo 1) es el compuesto más preferente global para el uso destinado como agente terapéutico seguro y eficaz para el tratamiento en humanos de trastornos relacionados con TAAR1, en especial para el tratamiento de trastornos del SNC crónicos, tales como depresión, trastornos de ansiedad, trastorno bipolar, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastornos relacionados con el estrés, trastornos psicóticos tales como esquizofrenia, enfermedades neurológicas tales como enfermedad de Parkinson, trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Alzheimer, epilepsia, migraña, hipertensión, drogadicción, adicción y trastornos metabólicos tales como trastornos de la conducta alimentaria, diabetes, complicaciones diabéticas, obesidad, dislipidemia, trastornos del consumo de energía y su asimilación, trastornos y disfunción de la homeostasis de la temperatura corporal, trastornos del sueño y del ritmo circadiano y trastornos cardiovasculares. Los trastornos más preferentes son esquizofrenia, trastorno bipolar o depresión.
- 30 Se pueden usar el compuesto de fórmula I y las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula I como medicamentos, por ejemplo, en forma de preparaciones farmacéuticas. Se pueden administrar las preparaciones farmacéuticas por vía oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones, emulsiones o suspensiones. Sin embargo, la administración también se puede efectuar por vía rectal, por ejemplo, en forma de supositorios, o por vía parenteral, por ejemplo, en forma de soluciones inyectables.
- 35 Se puede procesar el compuesto de fórmula I con vehículos farmacéuticamente inertes, inorgánicos u orgánicos para la producción de preparaciones farmacéuticas. Se pueden usar lactosa, almidón de maíz o derivados del mismo, talco, ácidos esteáricos o sus sales y similares, por ejemplo, como dichos vehículos para comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas y cápsulas de gelatina dura. Los vehículos adecuados para las cápsulas de gelatina blanda son, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos y líquidos y similares. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la sustancia activa, normalmente no se requieren vehículos en el caso de cápsulas de gelatina blanda. Los vehículos adecuados para la producción de soluciones y jarabes son, por ejemplo, agua, polioles, glicerol, aceite vegetal y similares. Los vehículos adecuados para supositorios son, por ejemplo, aceites naturales o hidrogenados, ceras, grasas, polioles semilíquidos o líquidos y similares.
- 40 Además, las preparaciones farmacéuticas pueden contener conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, agentes de enmascaramiento o antioxidantes. También pueden contener todavía otras sustancias terapéuticamente valiosas.
- 45 Los medicamentos que contienen un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo terapéuticamente inerte también son un objetivo de la presente invención, como lo es un procedimiento para su producción, que comprende introducir el compuesto de fórmula I y/o sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y, si se desea, una o más de otras sustancias terapéuticamente valiosas en una forma de administración galénica junto con uno o más vehículos terapéuticamente inertes.
- 50 Las indicaciones más preferentes de acuerdo con la presente invención son las que incluyen trastornos del sistema nervioso central, por ejemplo, el tratamiento o prevención de la depresión, psicosis, esquizofrenia y trastornos bipolares.
- 55 La dosificación puede variar dentro de límites amplios y, por supuesto, se tendrá que ajustar a los requisitos individuales en cada caso particular. En el caso de administración oral, la dosificación para adultos puede variar de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1000 mg por día de un compuesto de fórmula general I o de la

cantidad correspondiente de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Se puede administrar la dosificación diaria como dosis individual o en dosis divididas y, además, también se puede exceder el límite superior cuando esté indicado.

5 Formulación de comprimido (granulación por vía húmeda)

<u>Elemento</u>	<u>Ingredientes</u>	<u>mg/comprimido</u>			
1.	Compuesto de fórmula I	5	25	100	500
2.	Lactosa anhidra DTG	125	105	30	150
3.	Sta-Rx 1500	6	6	6	30
4.	Celulosa microcristalina	30	30	30	150
5.	Esterato de magnesio	1	1	1	1
	Total	<u>167</u>	<u>167</u>	<u>167</u>	<u>831</u>

Procedimiento de fabricación

- 10 1. Mezclar los elementos 1, 2, 3 y 4 y granular con agua purificada.
2. Secar los gránulos a 50 °C.
3. Pasar los gránulos a través de un equipo de molienda adecuado.
- 15 4. Añadir el elemento 5 y mezclar durante tres minutos; comprimir en una prensa adecuada.

Formulación de cápsula

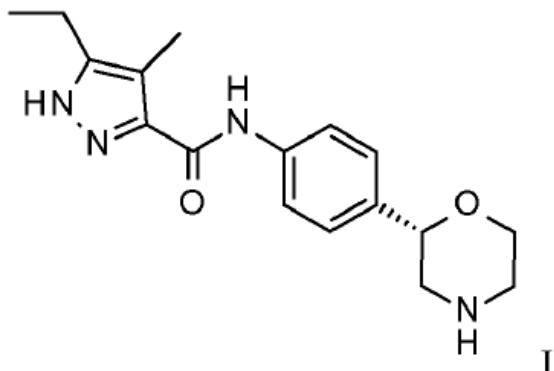
<u>Elemento</u>	<u>Ingredientes</u>	<u>mg/cápsula</u>			
1.	Compuesto de fórmula I	5	25	100	500
2.	Lactosa hidratada	159	123	148	---
3.	Almidón de maíz	25	35	40	70
4.	Talco	10	15	10	25
5.	Esterato de magnesio	1	2	2	5
	Total	<u>200</u>	<u>200</u>	<u>300</u>	<u>600</u>

Procedimiento de fabricación

- 20 1. Mezclar los elementos 1, 2 y 3 en una mezcladora adecuada durante 30 minutos.
- 25 2. Añadir los elementos 4 y 5 y mezclar durante 3 minutos.
3. Rellenar en una cápsula adecuada.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:

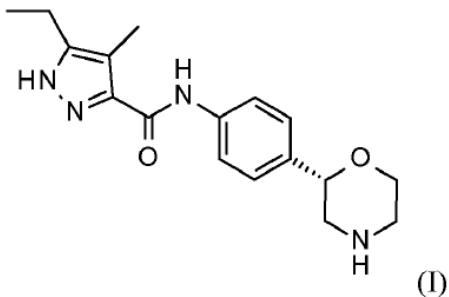


I

5

que es 5-etil-4-metil-N-[4-[(2S) morfolin-2-il]fenil]-1H-pirazol-3-carboxamida, o una sal de adición de ácido farmacéuticamente adecuada del mismo.

- 10 2. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1,



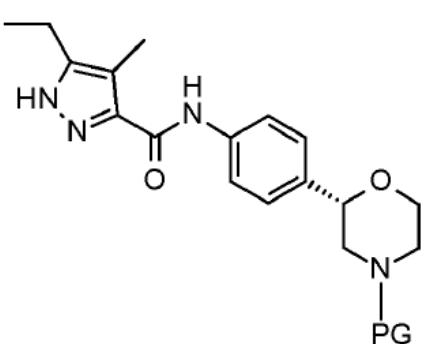
(I)

que es 5-etil-4-metil-N-[4-[(2S) morfolin-2-il]fenil]-1H-pirazol-3-carboxamida.

15

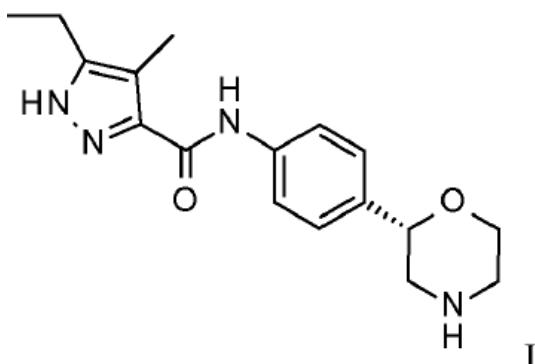
3. Un procedimiento para la fabricación del compuesto de fórmula I de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, procedimiento que comprende

- 20 a) separar por escisión el grupo protector de N (PG) de los compuestos de fórmula 3



3

en un compuesto de fórmula I



en la que PG es $-\text{C}(\text{O})\text{O-terc-butilo}$ (BOC), y, si se desea, convertir el compuesto de fórmula I obtenido en sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 5 4. El compuesto de fórmula I de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 para su uso como sustancia terapéuticamente activa.
- 10 5. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de depresión, trastornos de ansiedad, trastorno bipolar, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastornos relacionados con el estrés, esquizofrenia, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, migraña, hipertensión, drogadicción, adicción, trastornos de la conducta alimentaria, diabetes, complicaciones diabéticas, obesidad, dislipidemia, trastornos del consumo de energía y su asimilación, trastornos y disfunción de la homeostasis de la temperatura corporal, trastornos del sueño y del ritmo circadiano, y trastornos cardiovasculares.
- 15 6. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de depresión, trastornos de ansiedad, trastorno bipolar, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastornos relacionados con el estrés, esquizofrenia, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, migraña, hipertensión, drogadicción, adicción, trastornos de la conducta alimentaria, diabetes, complicaciones diabéticas, obesidad, dislipidemia, trastornos del consumo de energía y su asimilación, trastornos y disfunción de la homeostasis de la temperatura corporal, trastornos del sueño y del ritmo circadiano, y trastornos cardiovasculares.
- 20 7. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de depresión.
- 25 8. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de depresión.
- 30 9. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de trastorno bipolar.
- 35 10. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de trastorno bipolar.
- 40 11. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de esquizofrenia.
- 45 12. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de esquizofrenia.
- 50 13. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de drogadicción.
- 55 14. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de drogadicción.
- 60 15. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de adicción.
- 65 16. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de adicción.
- 70 17. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de trastorno de la conducta alimentaria.
- 75 18. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de trastorno de la conducta alimentaria.
- 80 19. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de diabetes.
- 85 20. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de diabetes.

21. Una preparación farmacéutica oral que comprende el compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la preparación farmacéutica oral está en una forma seleccionada del grupo que consiste en comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones, emulsiones y suspensiones.
- 5
22. Una preparación farmacéutica oral que comprende el compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la preparación farmacéutica oral está en una forma seleccionada del grupo que consiste en comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones, emulsiones y suspensiones.
- 10