

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

|                                                                    |                                                                                                                                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (22) Data de pedido: <b>2008.09.30</b>                             | (73) Titular(es):<br><b>ELI LILLY AND COMPANY</b><br><b>LILLY CORPORATE CENTER INDIANAPOLIS, IN</b><br><b>46285</b> <b>US</b>                                                       |
| (30) Prioridade(s): <b>2007.10.12 US 979464 P</b>                  |                                                                                                                                                                                     |
| (43) Data de publicação do pedido: <b>2010.06.30</b>               |                                                                                                                                                                                     |
| (45) Data e BPI da concessão: <b>2012.03.07</b><br><b>082/2012</b> | (72) Inventor(es):<br><b>SANDRA ANN FILLA</b> <b>US</b><br><b>VALENTINA O. BADESCU</b> <b>US</b><br><b>PETER THADDEUS GALLAGHER</b> <b>GB</b><br><b>MARIA ANN WHATTON</b> <b>GB</b> |
|                                                                    | (74) Mandatário:<br><b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b><br><b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b> <b>PT</b>                                                               |

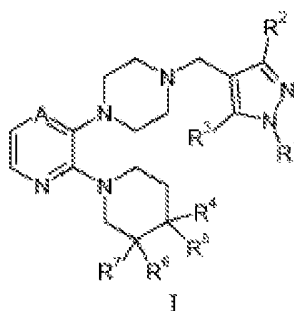
(54) Epígrafe: **ANTAGONISTAS DE RECEPTORES 5-HT7**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA COMPOSTOS ANTAGONISTAS DE RECEPTORES 5-HT7 SELECTIVOS DE FÓRMULA I E A SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DA ENXAQUECA: EM QUE A É C(H)= OU -N= E R1-7 SÃO COMO AQUI DEFINIDOS.

**RESUMO****"ANTAGONISTAS DE RECEPTORES 5-HT<sub>7</sub>"**

A presente invenção proporciona compostos antagonistas de receptores 5-HT<sub>7</sub> selectivos de Fórmula I e a sua utilização no tratamento da enxaqueca:



em que A é C(H)= ou -N= e R<sup>1-7</sup> são como aqui definidos.

## **DESCRIÇÃO**

### **"ANTAGONISTAS DE RECEPTORES 5-HT<sub>7</sub>"**

O neurotransmissor serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) tem uma farmacologia rica resultante de uma população heterogênea de pelo menos 14 receptores distintos. Cada receptor tem uma distribuição distinta, embora muitas vezes sobreposição ao longo do corpo e um único sítio de ligação de serotonina levando a afinidades diferentes para a serotonina e diferentes respostas fisiológicas para interação com a serotonina. Demonstrou-se que o receptor 5-HT<sub>7</sub> tem importantes papéis funcionais na termorregulação, ritmo circadiano, aprendizagem e memória, sinalização do hipocampo, e no sono. O receptor 5-HT<sub>7</sub> também foi associado a várias doenças neurológicas, incluindo enxaqueca e ansiedade, bem como a dor persistente, mais especificamente dor inflamatória e dor neuropática.

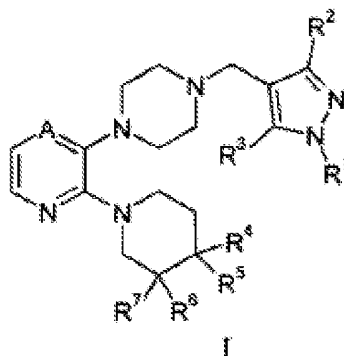
Antagonistas de receptores 5-HT<sub>7</sub> de alta afinidade proporcionariam agentes terapêuticos úteis para o tratamento das doenças associadas aos receptores 5-HT<sub>7</sub> acima mencionadas incluindo enxaqueca e dor persistente, particularmente dor inflamatória e neuropática. Antagonistas de receptores 5-HT<sub>7</sub> de alta afinidade que também são

selectivos para o receptor 5-HT<sub>7</sub> proporcionariam essa vantagem terapêutica sem os eventos adversos indesejáveis associados à modulação dos outros tipos de receptores, como por exemplo as outras subclasses de receptores serotoninérgicos, como 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub> ou receptores adrenérgicos alfa. Conseguir selectividade para o receptor 5-HT<sub>7</sub> em relação a outros subtipos de receptores 5-HT tem demonstrado ser difícil na concepção de antagonistas de 5-HT<sub>7</sub>. Os agonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> foram associados ao síndrome da serotonina. Os agonistas de receptores 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub> foram associados a efeitos adversos, como dor no peito.

Leopoldo, M. (2004) "Serotonin(7) receptors (5-HT(7)Rs) and their ligands", *Curr. Med. Chem.* 11, 629-661, descreve várias abordagens anteriores para obter ligandos de receptores 5-HT<sub>7</sub>. O WO 2004/067703 descreve antagonistas de 5-HT<sub>7</sub> incluindo certas 2-(piperazin-1-il)-3-fenilpirazinas e piridinas.

A presente invenção proporciona novos antagonistas potentes de receptores 5-HT<sub>7</sub>. Certos compostos da presente invenção são selectivos para o receptor 5-HT<sub>7</sub> em comparação com outros receptores de serotonina.

A presente invenção proporciona compostos antagonistas selectivos de receptores 5-HT<sub>7</sub> de Fórmula I:



em que:

A é  $-C(H)=$  ou  $-N=$ ,

$R^1$  é um substituinte seleccionado do grupo que consiste em i) hidrogénio, ii) metilo, iii) etilo, iv) hidroximetilo, v) hidroxietilo, vi) fenilo opcionalmente substituído com 1 a 3 grupos flúor, vii) benzilo opcionalmente substituído com 1 a 3 grupos flúor e viii) piridilo;

$R^2$  é hidrogénio, metilo, ou etilo;

$R^3$  é hidrogénio, metilo, ou cloro;

$R^4$  é seleccionado do grupo que consiste em i) hidrogénio, ii) flúor, iii) metilo, iv) hidroxilo, v) hidroximetilo, vi) hidroxietilo, vii) metoximetilo, viii) cianometilo e ix) metilsulfonilaminometilo;

$R^5$  é hidrogénio;

$R^6$  e  $R^7$  são iguais e são seleccionados conjuntamente do

grupo que consiste em hidrogénio, metilo e flúor, desde que quando  $R^6$  e  $R^7$  não são hidrogénio,  $R^4$  e  $R^5$  são ambos hidrogénio;

ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

A presente invenção também proporciona o composto cloridrato de 3'-(4,4-difluoro-piperidin-1-il)-4-(1,5-dimetil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']bipirazinilo.

A presente invenção também proporciona composições farmacêuticas compreendendo um composto de Fórmula I, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em associação com um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

Noutro aspecto da presente invenção, é proporcionado um ou mais compostos de fórmula I, ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis para utilização em terapêutica. Este aspecto inclui um ou mais compostos de Fórmula I, ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis para utilização como um produto farmacêutico. Da mesma forma, este aspecto da invenção proporciona um ou mais compostos de Fórmula I, ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis, para utilização no tratamento da enxaqueca em mamíferos, particularmente seres humanos, o tratamento profilático da enxaqueca em mamíferos, particularmente seres humanos e/ou o tratamento da dor persistente, parti-

cularmente dor neuropática ou inflamatória, em mamíferos, particularmente seres humanos.

Ainda outra forma de realização deste aspecto da invenção proporciona um composto de Fórmula I, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, para utilização no tratamento da ansiedade em mamíferos.

Nas formas de realização preferidas das indicadas acima, o mamífero a ser tratado é um ser humano.

Noutro aspecto da presente invenção, é proporcionada a utilização de um composto de Fórmula I, ou de um seu sal farmaceuticamente aceitável, no fabrico de um medicamento para o tratamento e/ou tratamento profilático da enxaqueca.

Noutro aspecto da presente invenção, é proporcionada a utilização de um composto de Fórmula I, ou de um seu sal farmaceuticamente aceitável, no fabrico de um medicamento para o tratamento de dor persistente, particularmente dor inflamatória e/ou neuropática.

Noutro aspecto da presente invenção, é proporcionada a utilização de um composto de Fórmula I, ou de um seu sal farmaceuticamente aceitável, no fabrico de um medicamento para o tratamento da ansiedade.

Adicionalmente, a presente invenção proporciona

uma formulação farmacêutica adaptada para o tratamento de enxaqueca e/ou para o tratamento profilático da enxaqueca, compreendendo um composto de Fórmula I, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em associação com um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

Da mesma forma, a presente invenção proporciona uma formulação farmacêutica adaptada para o tratamento da dor persistente, particularmente dor inflamatória e/ou neuropática, compreendendo um composto de Fórmula I, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em associação com um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

Além disso, a presente invenção proporciona uma formulação farmacêutica adaptada para o tratamento de ansiedade compreendendo um composto de Fórmula I, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em associação com um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

Os termos químicos gerais utilizados ao longo da especificação têm os seus significados usuais.

O termo "grupo protector de amina" tal como utilizado na presente especificação refere-se a um substituinte vulgarmente utilizado para bloquear ou proteger uma funcionalidade amino enquanto se faz reagir outros grupos funcionais no composto. A espécie de grupo protector de amina utilizada não é crítica desde que o grupo amina

derivatizado seja estável nas condições de reacções subsequentes noutras posições da molécula e possa ser removido no ponto apropriado sem perturbar o resto da molécula. A selecção e utilização (adição e remoção subsequente) de grupos protectores de amina é bem conhecida no âmbito dos conhecimentos correntes da técnica. Mais exemplos de grupos referidos pelos termos indicados acima estão descritos por T. W. Greene e P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3<sup>rd</sup> edition, John Wiley and Sons, New York, NY, 1999, capítulo 7, aqui referido adiante como "Greene".

O termo "farmacêutico" ou "farmaceuticamente aceitável" quando aqui utilizado como um adjectivo, significa substancialmente não tóxico e substancialmente não nocivo para quem recebe.

Por "composição farmacêutica" é ainda significado que o veículo, solvente, excipientes e/ou sal têm de ser compatíveis com o ingrediente activo da composição (e.g. um composto de Fórmula I). É entendido pelas pessoas com conhecimentos correntes nesta matéria que os termos "formulação farmacêutica" e "composição farmacêutica" são genericamente intermutáveis e são assim utilizados para os fins deste pedido.

O termo "quantidade eficaz" significa uma quantidade de um composto de Fórmula I que é capaz de antagonizar receptores 5-HT<sub>7</sub> e/ou eliciar um dado efeito farmacológico.

O termo "solvente adequado" refere-se a qualquer solvente ou mistura de solventes que solubiliza suficientemente os reagentes para proporcionar um meio no qual efectuar a reacção desejada e que não interfere com a reacção desejada.

Um composto destinado a utilização numa composição farmacêutica pode, sempre que seja possível e se justifique, ser convertido numa forma de sal, num esforço para otimizar as características tais como as propriedades de manipulação, estabilidade, farmacocinética e/ou biodisponibilidade, etc. Para qualquer composto, é imprevisível que contra-íões vão produzir formas de sal, como por exemplo uma forma de sal cristalina, tendo combinações óptimas de propriedades para a utilização pretendida. Os métodos para a conversão de um composto numa dada forma de sal são bem conhecidos na técnica (ver, e.g., P. Stahl *et al.*, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); Berge, S. M., Bighley, L. D., e Monkhouse, D. C., *J. Pharm. Sci.*, 66: 1, (1977)). Esses sais também são formas de realização desta invenção. É bem conhecido que os sais podem formar-se em várias proporções molares com o ácido para dar, por exemplo, sal de hemi-ácido, de mono-ácido, de di-ácido, etc. Quando, no procedimento de formação de sal, o ácido é adicionado numa proporção estequiométrica específica, salvo análise em contrário para confirmar, presume-se, mas não se sabe, que o sal se forma nessa proporção molar.

As abreviaturas aqui utilizadas são definidas como segue:

"DCM" significa diclorometano.

"MS(ES)" significa espectroscopia de massa utilizando ionização por electropulverização.

"Cromatografia SCX" significa cromatografia numa coluna ou cartucho SCX.

"Coluna SCX" ou "cartucho SCX", tal como aqui utilizado, refere-se a uma coluna de resina de permuta catiónica forte à base de sílica Bond Varian Elute® ou cartucho descartável ou equivalente (como por exemplo um cartucho SCX-2).

Embora todos os compostos da presente invenção sejam úteis como antagonistas de 5-HT<sub>7</sub>, certas classes são preferidas, como por exemplo, compostos tendo uma das seguintes selecções de substituintes enumeradas:

1) R<sup>1</sup> é seleccionado do grupo que consiste em metilo, etilo, fenilo opcionalmente substituído com 1 a 2 grupos flúor, ou benzilo;

2) R<sup>1</sup> é seleccionado do grupo que consiste em metilo, etilo e fenilo opcionalmente substituído com 1 a 2 grupos flúor;

- 3)  $R^1$  é metilo ou etilo;
- 4)  $R^1$  é fenilo;
- 5)  $R^1$  é fenilo,  $R^2$  é hidrogénio,  $R^3$  é cloro e  $R^4$  é hidroxilo, hidroximetilo ou metoximetilo;
- 6)  $R^4$  é hidroxilo, hidroximetilo, ou metoximetilo;
- 7)  $R^4$  é hidroxilo;
- 8)  $R^4$  é hidroximetilo;
- 9)  $R^4$  é metoximetilo;
- 10)  $R^1$  é seleccionado do grupo que consiste em metilo, etilo e fenilo opcionalmente substituído com 1 a 2 grupos flúor e  $R^4$  é hidroxilo, hidroximetilo ou metoximetilo.

Geralmente, os compostos de pirazinilo são preferidos em relação aos compostos de piridilo. Dos compostos de pirazinilo, os preferidos são os que têm selecções de substituintes de acordo com qualquer uma das alíneas 1 a 10 acima. Da mesma forma, dos compostos de piridilo, os compostos preferidos são os que têm selecções de substituintes de acordo com qualquer uma das alíneas 1 a 10 acima.

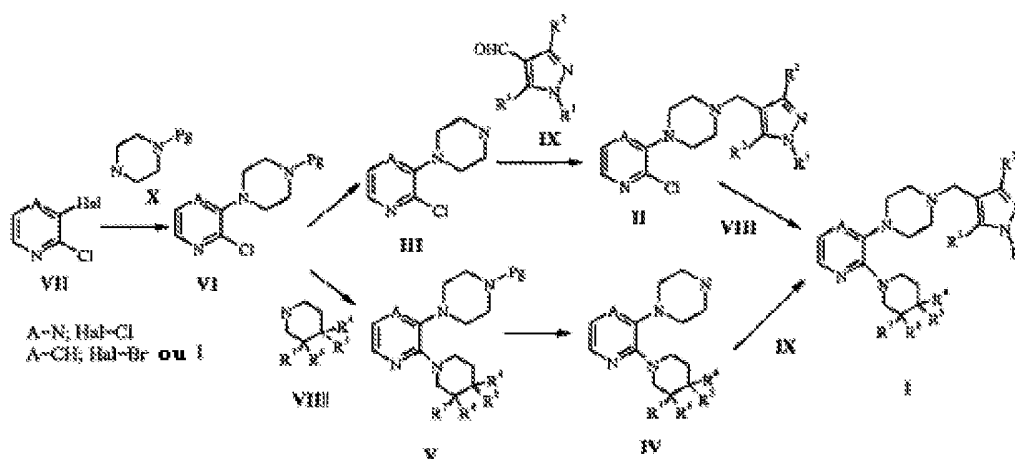
Compostos específicos preferidos da presente invenção são os aqui descritos nos Exemplos, incluindo as bases livres e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis. Um composto particularmente preferido é 3'-[4-(1-Etil-5-metil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']bipiridinil-4-ol ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, como por exemplo o composto do Exemplo 1.

Os compostos da presente invenção podem ser preparados de acordo com os seguintes esquemas sintéticos por métodos bem conhecidos e apreciados na técnica. As condições reacionais adequadas para os passos destes esquemas são bem conhecidas na técnica e as substituições apropriadas de solventes e co-reagentes estão dentro da perícia na técnica. Da mesma forma, será apreciado pelos especialistas na técnica que intermediários sintéticos podem ser isolados e/ou purificados por várias técnicas bem conhecidas consoante necessário ou desejado, e que frequentemente vai ser possível utilizar vários intermediários directamente em passos de síntese subsequentes com pouca ou nenhuma purificação. Além disso, o especialista na matéria apreciará que, em algumas circunstâncias, a ordem em que são introduzidas as unidades não é crítica. A ordem específica de passos necessários para produzir os compostos de Fórmula I está dependente do composto específico a ser sintetizado, do composto de partida e da labilidade relativa das unidades substituídas, como é bem apreciado pelo químico experiente. Todos os substituintes, salvo indicação

em contrário, são como previamente definido, e todos os reagentes são bem conhecidos e apreciados na técnica.

O Esquema I adiante mostra uma via de síntese geral para obter compostos da presente invenção.

Esquema I

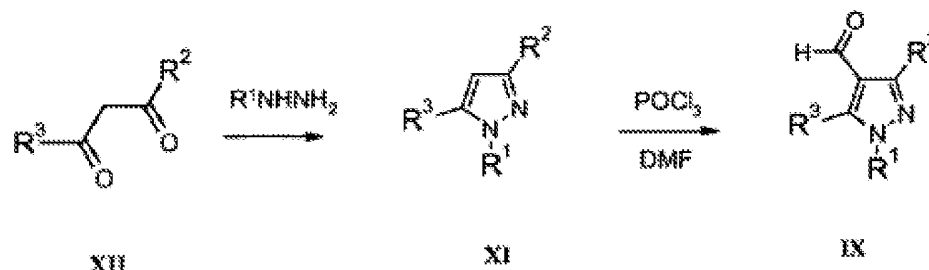


Neste esquema, para compostos de fórmula VII em que A é azoto, Hal vai tipicamente ser cloro. Faz-se reagir a di-halogeno piperazina com piperazina N-protetida e uma base adequada como carbonato de potássio num solvente apropriado como N,N-dimetilacetamida a uma temperatura elevada para dar compostos de fórmula VI em que A é azoto. Para compostos de fórmula VII em que A é -CH=, Hal é tipicamente bromo ou iodo. O di-halogenopiridilo é acoplado com piperazina N-protetida em condições de acoplamento catalíticas adequadas bem conhecidas na técnica (John P. Wolfe e L. Stephen Buchwald. *Organic Syntheses. Coll. Vol. 10*, página 423 (2004); *Vol. 78*, página 23 (2002)) para dar compostos de fórmula VI (A é CH).

Os compostos de fórmula VI podem ser desprotegidos em condições bem conhecidas para um especialista na técnica (por exemplo, ver: Greene e Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, 1999, Chapters 2 and 7, John Wiley and Sons Inc.) para dar aminas de fórmula III. Faz-se ainda reagir as aminas com pirazole aldeídos adequados, em condições de aminação redutiva bem conhecidos por um especialista na técnica (Richard C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Second Edition, 1999, páginas 835-846, Wiley and Sons Inc.,) para dar compostos de fórmula II. Os compostos de fórmula II podem depois reagir com piperidinas apropriadamente substituídas que estão disponíveis comercialmente ou que podem ser preparadas por métodos bem conhecidos na técnica para dar as bases livres I desejadas. Se desejado, as bases livres podem ser convertidas numa forma de sal por meios bem conhecidos na técnica, como por exemplo por reacção com um ácido farmacologicamente aceitável.

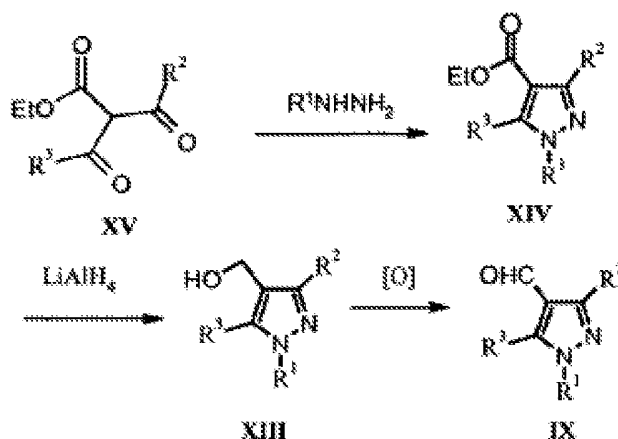
Alternativamente, pode fazer-se reagir os intermediários de fórmula VI com piperidinas VIII a temperatura elevada para dar intermediários de fórmula V. Os intermediários V são então desprotegidos em condições bem conhecidas pelo especialista na técnica para dar compostos de fórmula IV. Faz-se então reagir as aminas resultantes com pirazole aldeídos adequados em condições de aminação redutiva bem conhecidos por um especialista na matéria para dar compostos de fórmula I.

Esquema II



Os pirazoles substituídos estão disponíveis comercialmente ou podem ser sintetizados por procedimentos genericamente conhecidos, como por exemplo o procedimento apresentado no Esquema II, em que as variáveis  $R^1$ ,  $R^2$  e  $R^3$  são como definidas anteriormente. Quando  $R^2$  não é igual a  $R^3$ , os produtos regio-isoméricos da ciclização têm de ser separados por técnicas cromatográficas correntes. Se XII for um aldeído lábil, XII vai estar tipicamente na forma de um acetal. Faz-se reagir os compostos de fórmula XII com hidrazinas adequadas para dar compostos de fórmula XI. Faz-se então reagir os intermediários XI com  $POCl_3$ , num solvente adequado como dimetilformamida a uma temperatura elevada para dar os intermediários desejados de fórmula IX.

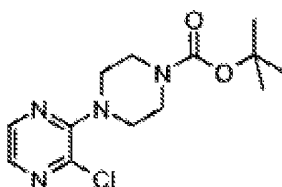
Esquema III



Pode utilizar-se variações da química quando os precursores de aldeído são incorporados nos precursores de ciclização como ilustrado no Esquema III. Um composto de fórmula XIV reage com uma hidrazina apropriada para dar um éster de pirazole de fórmula XIII, que é reduzido com um agente redutor adequado como  $\text{LiAlH}_4$  para dar um álcool de pirazole de fórmula XII. O álcool pode ser oxidado com métodos bem conhecidos por um especialista na matéria para dar o aldeído de pirazole de fórmula IX desejado.

As seguintes Preparações e Exemplos são ilustrativos de métodos úteis para a síntese dos compostos da presente invenção. Os nomes para muitos dos compostos ilustrados nas preparações e exemplos são atribuídos a partir de estruturas desenhadas com o software ChemDraw®, versão 7.0 ou Autonom 2000 para ISIS/Draw.

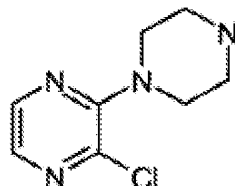
Preparação 1: Éster *t*-butílico do ácido 3'-cloro-2,3,5,6-tetra-hidro-[1,2']bipirazinil-4-carboxílico



Carregar um balão de fundo redondo de 2 L com 3 tubuladuras com 2,3-dicloropirazina (78,7 g, 0,532 mol), éster *t*-butílico do ácido piperazino-1-carboxílico (100 g,

0,537 mol), carbonato de potássio (88,2 g, 0,638 mol) seguido por N,N-dimetilacetamida (0,780 L) e aquecer a suspensão resultante a 110°C sob azoto com agitação vigorosa. Arrefecer até à temperatura ambiente, adicionar água (0,390 L) e éter *t*-butil metílico (0,390 L) e agitar a mistura durante 60 min. Parar a agitação e separar as camadas. Lavar a camada orgânica com água (2 x 200 mL), seca sobre MgSO<sub>4</sub>, filtrar e concentrar para dar 145 g de éster *t*-butílico do ácido 3'-cloro-2,3,5,6-tetra-hidro-[1,2']bipirazinil-4-carboxílico como um xarope amarelo (91% de rendimento). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8,10 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 3,59 (m, 4H), 3,40 (n, 4H), 1,48 (s, 9H).

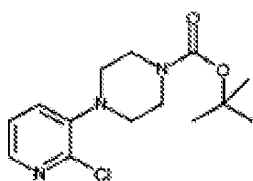
Preparação 2: 3'-Cloro-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinilo



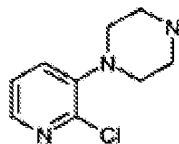
Adicionar HCl 4 M em 1,4-dioxano (10 mL) a éster *t*-butílico do ácido 3'-cloro-2,3,5,6-tetra-hidro-[1,2']bipirazinil-4-carboxílico (6,80 g, 22,76 mmol). Adicionar 1,4-dioxano (40 mL) e submeter a reacção a ultra-sons de em seguida agitar à temperatura ambiente sob azoto durante 3 h. Adicionar mais HCl em 1,4-dioxano (40 mL) e agitar durante 1 h. Adicionar clorofórmio (400 mL), lavar com hidróxido de sódio 2 N (200 mL), cloreto de sódio aquoso saturado (100 mL), secar (sulfato de magnésio) e concentrar

para dar 3'-cloro-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']-bipirazinilo como um óleo amarelo que cristalizou em repouso para dar um sólido (4,0 g, 88%). MS (m/z): 199,1 (M+1).

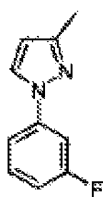
Preparação 3: Éster *t*-butílico do ácido 4-(2-cloro-piridin-3-il)-piperazino-1-carboxílico



Agitar 2-cloro-3-bromopiridina (5,00 g, 26,0 mmol) e éster *t*-butílico do ácido piperazino-1-carboxílico (3,73 g, 20,0 mmol) em tolueno seco (200 mL) à temperatura ambiente sob azoto. Adicionar *t*-butóxido de sódio (2,88 g, 30,0 mmol), tris(dibenzilidenoacetona)dipaládio(0) (0,366 g, 0,40 mmol) e 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (0,694 g, 1,20 mmol), desgaseificar a reacção e aquecer a 100°C (temperatura do banho de óleo) durante 3 h. Arrefecer até à temperatura ambiente, adicionar 100 mL de água, extrair com 2 x 200 mL de acetato de etilo. Concentrar a camada orgânica em vácuo, purificar (cromatografia em gel de sílica, eluindo com acetato de etilo:isohexano 30:70) e secar numa estufa de vácuo de um dia para o outro para dar éster *t*-butílico do ácido 4-(2-cloro-piridin-3-il)-piperazino-1-carboxílico como um pó bege (3,01 g, 51%). MS (m/z): 298 (M+1).

Preparação 4: 1-(2-Cloro-piridin-3-il)-piperazina

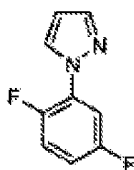
Agitar éster *t*-butílico do ácido 4-(2-cloro-piridin-3-il)-piperazino-1-carboxílico (2,00 g, 6,72 mmol) em DCM (50 mL) à temperatura ambiente, depois adicionar ácido trifluoroacético (5 mL). Agitar a reacção durante 2 h e remover os solventes em vácuo, depois formar a base livre utilizando cromatografia SCX-2<sup>®</sup> lavando com metanol e eluindo depois com amoníaco cerca de 3M em metanol. Concentrar em vácuo para dar 1-(2-cloro-piridin-3-il)-piperazina como um óleo castanho (1,47 g, 110% de rendimento). MS (*m/z*): 198 (*M*+1).

Preparação 5: 1-(3-Fluoro-fenil)-3-metil-1*H*-pirazole

Adicionar ácido clorídrico (5 M, 12 mL, 60 mmol) a uma mistura de 4,4-dimetoxibuta-2-ona (6,61 g, 6,67 mL, 50 mmol) e cloridrato de 3-fluorofenil-hidrazina (8,13 g, 50 mmol) em etanol (50 mL). Aquecer e agitar a refluxo sob azoto durante 7,5 h, arrefecer até à temperatura ambiente, deixar em repouso durante 60 h. Evaporar o etanol em vácuo e cromatografar o resíduo em sílica eluindo com DCM.

Evaporar o diclorometano para dar 1-(3-fluoro-fenil)-3-metil-1*H*-pirazole como um líquido (4,38 g, 49%). MS (m/z): 171,1 (M+1).

Preparação 6: 1-(2,5-Difluoro-fenil)-1*H*-pirazole



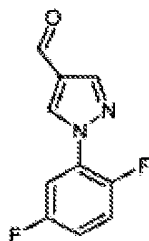
Adicionar 1,1,3,3-tetrametoxipropano (8,2 g, 50 mmol) a uma mistura de 2,5-difluorofenil-hidrazina (9,022 g, 62,6 mmol) e ácido clorídrico (5 M, 5 mL, 25 mmol) em etanol (50 mL) e aquecer e agitar a refluxo sob azoto durante 17 h. Arrefecer a mistura, evaporar o etanol em vácuo, suspender o resíduo em DCM (80 mL), filtrar a solução de DCM e passar através de uma coluna SCX-2. Recolher o eluente e passar através de uma segunda coluna SCX2 e evaporar o eluente para dar 1-(2,5-difluoro-fenil)-1*H*-pirazole como um líquido (8,79 g, 97%). MS (m/z): 181 (M+1).

Preparação 7: 1-(3-Fluoro-fenil)-3-metil-1*H*-pirazole-4-carbaldeído



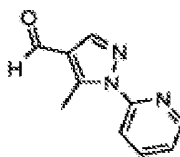
Adicionar oxicloreto de fósforo (20,8 mL, 34,3 g, 223,7 mmol) gota a gota com agitação a 95°C sob azoto, a 1-(3-fluoro-fenil)-3-metil-1*H*-pirazole (4,38 g, 24,86 mmol) em dimetilformamida (19,2 mL, 18,17 g, 248,6 mmol). Aquecer a 95°C durante 15 h, arrefecer até à temperatura ambiente, verter sobre gelo e neutralizar com hidrogenocarbonato de sódio. Extrair a solução aquosa com acetato de etilo (2 x 150 mL), secar (sulfato de magnésio), filtrar e passar através de uma coluna SCX-2. Evaporar o solvente para dar 1-(3-fluoro-fenil)-3-metil-1*H*-pirazole-4-carbaldeído como um sólido (4,22 g, 83%). MS (m/z): 205,1 (M+1).

Preparação 8: 1-(2,5-Difluoro-fenil)-1*H*-pirazole-4-carbaldeído



O intermediário em epígrafe é preparado utilizando métodos semelhantes aos da Preparação 7 usando 1-(2,5-difluoro-fenil)-1*H*-pirazole. MS (ES) [M+H] 209,1.

Preparação 9: 5-Metil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazole-4-carbaldeído



Éster etílico do ácido 2-dimetilaminometileno-3-oxo-butírico

Adicionar acetoacetato de etilo (15 mL, 0,118 mol) de dimetoximetil-dimetil-amina (19 mL, 0,142 mol) e aquecer a mistura a refluxo durante 1 h. Evaporar a mistura para dar éster etílico do ácido 2-dimetilaminometileno-3-oxo-butírico (21,7 g, 99%).

Éster etílico do ácido 5-metil-1-piridin-2-il-1H-pirazole-4-carboxílico

Dissolver éster etílico do ácido 2-dimetilaminometileno-3-oxo-butírico (0,662 g, 3,57 mmol) e piridin-2-il-hidrazina (0,410 g, 3,75 mmol) em etanol (15 mL) e refluxo durante 2 h. Evaporar a mistura, em seguida diluir com bicarbonato de sódio saturado e extrair três vezes com acetato de etilo. Secar a solução (sulfato de sódio), filtrar e concentrar. Purificar utilizando cromatografia em gel de sílica, eluindo com acetato de etilo:hexano 50:50 para dar éster etílico do ácido 5-metil-1-piridin-2-il-1H-pirazole-4-carboxílico como um sólido branco (0,700 g, 85%). MS (m/z): 232 (M+1).

(5-Metil-1-piridin-2-il-1H-pirazol-4-il)-metanol

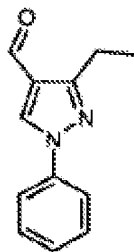
Adicionar hidreto de alumínio e lítio (0,225 g, 5,92 mmol) a tetra-hidrofurano (15 mL) a 0°C, em seguida, adicionar lentamente éster etílico do ácido 5-metil-1-

piridin-2-il-1*H*-pirazole-4-carboxílico (0,685 g, 2,96 mmol) em tetra-hidrofurano (5 mL) gota a gota. Aquecer a mistura até à temperatura ambiente e agitar durante duas horas, depois arrefecer a solução a 0°C. Adicionar sulfato de sódio aquoso saturado (0,5 mL), aquecer até à temperatura ambiente e depois agitar durante 2 h. Separar os materiais sólidos por filtração, em seguida secar a solução (sulfato de sódio), filtrar e concentrar para dar (5-metil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazol-4-il)-metanol como um sólido branco (0,501 g, 89%).

5-Metil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazole-4-carbaldeído

Dissolver sulfóxido de dimetilo (0,751 mL, 10,6 mmol) em DCM (20 mL) e arrefecer a -78°C. Adicionar cloreto de oxalilo (0,577 mL, 6,62 mmol) gota a gota em DCM (8 mL) e agitar durante 15 min. Adicionar (5-metil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazol-4-il)-metanol (0,501 g, 2,65 mmol) em DCM (20 mL) gota a gota e agitar durante 1 h a -78°C. Adicionar trietilamina (1,85 mL, 13,2 mmol) e aquecer a mistura até à temperatura ambiente durante 1 h. Diluir a mistura com bicarbonato de sódio saturado e extrair três vezes com DCM. Secar (sulfato de sódio) a solução, filtrar e concentrar para dar 5-metil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazole-4-carbaldeído como um sólido branco (0,496 g, 100%). MS (m/z): 188 (M+1).

Preparação 10: 3-Etil-1-fenil-1*H*-pirazole-4-carbaldeído



N-[1-Metil-prop-(E)-ilideno]-N'-fenil-hidrazina

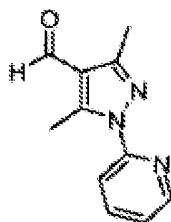
Adicionar ácido acético (1,00 mL, 17,45 mmol) e fenil hidrazina (1,98 mL, 20,00 mmol) a uma solução de 2-butanona (2,15 mL, 24,00 mmol) em etanol (90 mL) à temperatura ambiente. Agitar a reação durante 1 h, depois remover os solventes em vácuo para dar N-[1-metil-prop-(E)-ilideno]-N'-fenil-hidrazina como um óleo cor de laranja em bruto (3,21 g, 99%). MS (m/z): 163 (M+1).

3-Etil-1-fenil-1H-pirazole-4-carbaldeído

A uma solução gelada de N,N-dimetilformamida (4,59 mL, 59,36 mmol) e cloreto de fosforilo (5,52 mL, 59,36 mmol) adicionar uma solução de N-[1-metil-prop-(E)-ilideno]-N'-fenil-hidrazina (3,21 g, 19,79 mmol) em N,N-dimetilformamida (2 mL) gota a gota. Aquecer até à temperatura ambiente e em seguida aquecer a 75°C durante 5 h. Arrefecer até à temperatura ambiente e verter numa solução gelada de carbonato de potássio saturado. Extrair com DCM (3 x 20 mL), passar através de uma IST Phase Separator Frit® e concentrar. Purificar (cromatografia em gel de sílica, eluindo com 0:100 a 20:80 de acetato de

etilo:isohexano), para dar 3-etil-1-fenil-1*H*-pirazole-4-carbaldeído como um sólido castanho (600 mg, 15%). MS (*m/z*): 201 (*M*+1).

Preparação 11: 3,5-Dimetil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazole-4-carbaldeído



Éster etílico do ácido 3,5-dimetil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazole-4-carboxílico

Dissolver éster etílico do ácido 2-acetil-3-oxobutírico (20,74 g, 0,120 mol) e 2-piridil-hidrazina (14,5 mL, 0,133 mol) em ácido acético (160 mL) e agitar a mistura durante 18 h. Concentrar, diluir com DCM, lavar com bicarbonato de sódio saturado, secar (sulfato de sódio), filtrar e concentrar para dar éster etílico do ácido 3,5-dimetil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazole-4-carboxílico como um óleo (28,6 g, 97%). MS (*m/z*): 246 (*M*+1).

(3,5-Dimetil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazol-4-il)-metanol

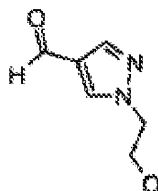
Suspender hidreto de alumínio e lítio (0,359 g, 9,46 mmol) em tetra-hidrofurano (25 mL) a -10°C e adicionar éster etílico do ácido 3,5-dimetil-1-piridin-2-il-1*H*-

pirazole-4-carboxílico (1,160 g, 4,73 mmol) gota a gota em tetra-hidrofurano (5 mL). Deixar a mistura aquecer até 25°C e agitar durante 4 horas. Arrefecer a mistura até 0°C, em seguida desactivar cuidadosamente com uma solução saturada de sulfato de sódio (1 mL). Deixar a mistura a agitar à temperatura ambiente durante 2 h, depois separar o precipitado por filtração, secar a solução e concentrar para dar (3,5-dimetil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazol-4-il)-metanol como um sólido amarelo (0,821 g, 86%).

3,5-Dimetil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazole-4-carbaldeído

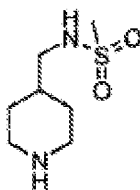
Dissolver sulfóxido de dimetilo (0,324 mL, 4,56 mmol) em DCM (10 mL) e arrefecer a solução a -78°C. Adicionar cloreto de oxalilo (0,239 mL, 2,74 mmol) gota a gota à mistura e agitar a -78°C durante 20 min. Adicionar (3,5-dimetil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazol-4-il)-metanol (0,369 g, 1,82 mmol) em DCM (10 mL) e agitar a mistura a -78°C durante 1 h. Adicionar trietilamina (1,27 mL, 9,12 mmol) à mistura e aquecer até à temperatura ambiente, depois agitar durante 18 h. Adicionar bicarbonato de sódio aquoso saturado e extrair a fase aquosa 3 vezes com DCM, secar a solução orgânica, depois filtrar e concentrar. Purificar por cromatografia em gel de sílica, eluindo com hexanos:acetato de etilo 20:80 para dar 3,5-dimetil-1-piridin-2-il-1*H*-pirazole-4-carbaldeído como um sólido amarelo (0,358 g, 97%). MS (m/z): 202 (M+1).

Preparação 12: 1-(2-Hidroxi-etil)-1*H*-pirazole-4-carbaldeído



Combinar 1*H*-pirazole-4-carbaldeído (0,110 g, 1,14 mmol), 2-bromoetanol (0,172 g, 1,37 mmol) e carbonato de potássio (0,236 g, 1,71 mmol) em acetonitrilo (2 mL). Aquecer em microondas a 150°C durante 20 min. Arrefecer até à temperatura ambiente e filtrar, lavar com acetonitrilo. Concentrar o filtrado para dar 1-(2-hidroxi-etil)-1*H*-pirazole-4-carbaldeído (0,155 g, 97%). GC-MS (*m/z*): 140 (*M*<sup>+</sup>).

Preparação 13: N-piperidin-4-ilmetilmetano-sulfonamida



A uma solução de 4-(aminometil)tetra-hidropiridino-1(2*H*)-carboxilato de *t*-butilo (1,50 g, 7,0 mmol, 1 eq) em DCM (anidro) (20 mL) adiciona-se cloreto de metanosulfonilo (569 µL, 7,35 mmol, 1,05 eq). A esta adicionar trietilamina (2,05 mL, 14,7 mmol, 2,1 eq) gota a gota ao longo de 15 min. Agitar à temperatura ambiente durante 3 h e depois adicionar água (20 mL) com agitação. A fase orgânica é isolada, depois lavada com ácido clorídrico

aquoso 2 M (20 mL) e solução aquosa saturada de hidrogeno carbonato de sódio (20 mL). Secar a camada orgânica (sulfato de magnésio) e concentrar para dar éster *t*-butílico do ácido 4-(metanossulfonyl-aminometil)-piperidino-1-carboxílico (2,1 g, 102%). MS (ES):  $m/z = 315,1$   $[M+Na]^+$ . A uma solução deste composto (2,1 g, 7,2 mmol, 1 eq) em 1,4-dioxano (25 mL) adicionar cloreto de hidrogénio 4 M em dioxano (17,95 mL, 72 mmol, 10 eq). Agitar à temperatura ambiente durante 29 h, basificar com hidróxido de sódio aquoso 2 M e depois adicionar DCM (20 mL). Separar as camadas e extrair a fase aquosa duas vezes com DCM (20 mL), secar as fases orgânicas combinadas sobre sulfato de magnésio, filtrar e concentrar. Extrair a camada aquosa mais quatro vezes com clorofórmio:isopropanol 3:1 (25 mL). Concentrar a camada aquosa até menos de 10 mL de volume e extrair novamente quatro vezes com clorofórmio:isopropanol 3:1 (25 mL). Combinar com todos os extractos orgânicos anteriores para dar N-piperidin-4-ilmetil-metanossulfonamida (703 mg, 50%). MS ( $m/z$ ): 193 ( $M+1$ ).

Preparação 14: Piperidin-4-il-acetonitrilo



Éster *t*-butílico do ácido 4-cianometileno-piperidino-1-carboxílico

Adicionar cianometilfosfonato de dietilo (5,33 g,

4,88 mL, 30,11 mmol) a carbonato de potássio (3,47 g, 25,09 mmol) em THF seco (10 mL) e agitar à temperatura ambiente durante 15 min, depois aquecer a refluxo durante 15 min. A esta mistura adicionar éster *t*-butílico do ácido 4-oxopiperidino-1-carboxílico (5,00, 25,09 mmol) e aquecer a refluxo sob azoto durante 24 h, deixar arrefecer até à temperatura ambiente e deixar em repouso de um dia para o outro. Verter a mistura reaccional em solução aquosa de carbonato de potássio (10%, 80 mL) e extrair a mistura resultante com acetato de etilo (2 x 50 mL). Combinar as fases orgânicas, secar (MgSO<sub>4</sub>) e evaporar em vácuo para dar éster *t*-butílico do ácido 4-cianometilenopiperidino-1-carboxílico como um líquido que solidifica em repouso (5,39 g, 96,6%). NMR ( $\delta$ -CDCl<sub>3</sub>) 1,5 (s, 9H), 2,4 (m, 2H), 2,6 (m, 2H), 3,5 (m, 4H), 5,2 (s, 1H).

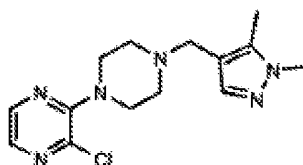
Éster *t*-butílico do ácido 4-cianometilpiperidino-1-carboxílico

Adicionar éster *t*-butílico do ácido 4-cianometilenopiperidino-1-carboxílico (5,39 g, 24,25 mmol) em etanol (160 mL) a uma suspensão de paládio a 5% sobre carvão (0,69 g) em etanol (20 mL) e hidrogenar à temperatura ambiente com agitação a 60 psi durante 6 h. Filtrar a mistura através de celite e evaporar o solvente em vácuo para dar éster *t*-butílico do ácido 4-cianometilpiperidino-1-carboxílico como um óleo que solidifica em repouso para dar um sólido (5,43 g, 99,8%). MS (m/z): 247 (M+Na).

Piperidin-4-ilacetoneitrilo

Adicionar ácido trifluoroacético (23 mL, 34,7 g, 304 mmol) a éster *t*-butílico do ácido 4-cianometilpiperidino-1-carboxílico (5,43 g, 24,21 mmol) em DCM (25 mL) e agitar à temperatura ambiente durante 18 h. Remover o solvente em vácuo e dissolver em metanol (50 mL) e verter numa coluna SCX-2. Eluir com amoníaco 2 M em metanol e evaporar o eluente para dar piperidin-4-ilacetoneitrilo como um óleo que solidifica em repouso (2,78 g, 92%). MS (*m/z*): 125,1 (*M*+1).

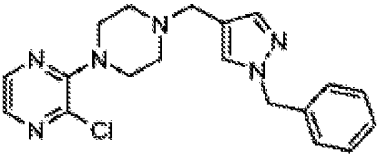
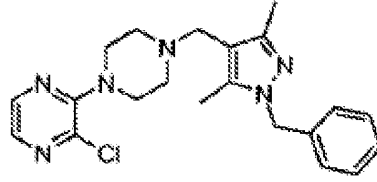
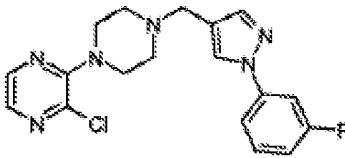
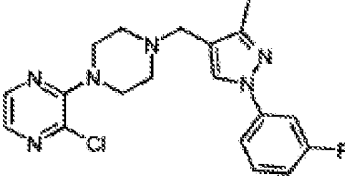
Preparação 15: 3'-Cloro-4-(1,5-dimetil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']-bipirazinilo



Carregar um balão de fundo redondo de 2 L com 3 tubuladuras com 3'-cloro-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']bipirazinilo (39 g, 0,196 mol), 1,2-dicloroetano (780 mL), seguidos por 1,5-dimetil-1*H*-pirazole-4-carbaldeído (25,5 g, 0,206 mol) e agitar durante 15 min sob azoto com agitação vigorosa. Adicionar triacetoxiboro-hidreto de sódio (45,77 g, 215 mmol) em três porções, separadas por 10 min. Adicionar metanol (100 mL) lentamente e agitar durante 20 min e concentrar até uma espuma branca. Dissolver a espuma em cloreto de metileno e adicionar a uma camada de 1 kg de

sílica. Eluir o produto com 5-10% de álcool isopropílico/DCM e concentrar as fracções contendo o produto para dar 3'-cloro-4-(1,5-dimetil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']bipirazinilo como um óleo amarelo (37 g, 60%). MS (m/z): 307 (M+1).

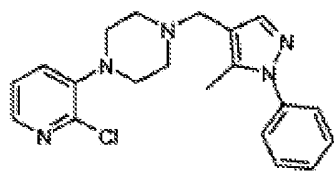
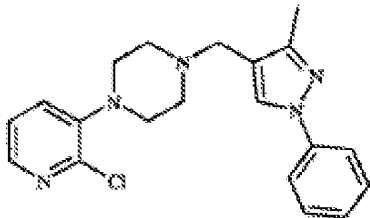
Os compostos seguintes são preparados essencialmente pelos métodos da Preparação 15 utilizando a 2-cloro-3-(piperazin-1-il)pirazina ou 1-(2-cloro-piridin-3-il)piperazina apropriada e 1*H*-pirazole-4-carbaldeído substituído.

| Prep. | Composto                                                                                                                | Estrutura                                                                            | MS (ES)<br>[M+H] |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 16    | 4-(1-Benzil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3'-cloro-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinilo                  |  | 369,1            |
| 17    | 4-(1-Benzil-3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3'-cloro-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinilo      |  | 397,1            |
| 18    | 3'-Cloro-4-[1-(3-fluorofenil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinilo         |  | 373,1            |
| 19    | 3'-Cloro-4-[1-(3-fluorofenil)-3-metil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinilo |  | 387,1            |

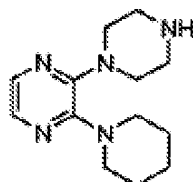
(continuação)

| Prep. | Composto                                                                                                              | Estrutura | MS (ES)<br>[M+H] |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------|
| 20    | 3'-Cloro-4-[1-(2-fluoro-fenil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinilo      |           | 372,9            |
| 21    | 3'-Cloro-4-[1-(2,5-difluoro-fenil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazi-nilo |           | 391,1            |
| 22    | 2-[4-(3'-Cloro-2,3,5,6-tetra-hidro-[1,2']bipira-zinil-4-ilmetil)-pirazol-1-il]-etanol                                 |           | 323,1            |
| 23    | 3'-Cloro-4-(3-metil-1-fe-nil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilme-til)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinilo       |           | 369              |
| 24    | 1-(2-Cloro-piridin-3-il)-4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pira-zol-4-ilmetil)-piperazina                                    |           | 306              |
| 25    | 1-(2-Cloro-piridin-3-il)-4-(1-etil-5-metil-1 <i>H</i> -pi-razol-4-ilmetil)-piper-a-zina                               |           | 320,1            |

(continuação)

| Prep. | Composto                                                                                            | Estrutura                                                                          | MS (ES)<br>[M+H] |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 26    | 1-(2-Cloro-piridin-3-il)-<br>4-(5-metil-1-fenil-1 <i>H</i> -pi-<br>razol-4-ilmetil)-piper-<br>azina |  | 368              |
| 27    | 1-(2-Cloro-piridin-3-il)-<br>4-(3-metil-1-fenil-1 <i>H</i> -pi-<br>razol-4-ilmetil)-pipe-<br>razina |  | 368              |

Preparação 28: 3'-Piperidin-1-il-3,4,5,6-tetra-  
hidro-2*H*-[1,2']bipirazinilo



Éster *t*-butílico do ácido 3'-piperidin-1-il-  
2,3,5,6-tetra-hidro-[1,2']-bipirazinil-4-carboxílico

Colocar éster *t*-butílico do ácido 3'-cloro-  
2,3,5,6-tetra-hidro-[1,2']bipirazinil-4-carboxílico (0,4 g,  
1,34 mmol, 1 eq) e piperidina (662 µL, 6,69 mmol, 5 eq) num  
frasco de microondas, selar e aquecer num microondas CEM™ a  
180°C com um máximo de 300 Watts de potência durante 1 h  
(Cuidado - aumento de pressão). Adicionar solução aquosa de  
hidróxido de sódio 2 M (5 mL) e DCM (5 mL) e depois passar

através de uma frita hidrófoba para separar. Extrair a camada aquosa duas vezes com DCM (5 mL), combinar os extractos orgânicos e concentrar para dar éster *t*-butílico do ácido 3'-piperidin-1-il-2,3,5,6-tetra-hidro-[1,2']bipirazinil-4-carboxílico (0,46 g, 99%). MS (m/z): 348,3 (M+1).

3'-Piperidin-1-il-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']-bipirazinilo

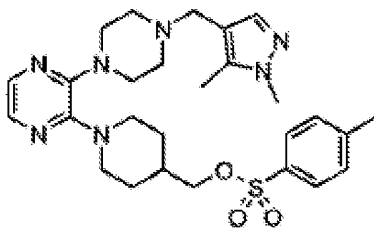
Adicionar ácido trifluoroacético (1,00 mL, 13,24 mmol, 10 eq) a uma solução de éster *t*-butílico do ácido 3'-piperidin-1-il-2,3,5,6-tetra-hidro-[1,2']bipirazinil-4-carboxílico (0,46 g, 1,32 mmol, 1 eq) em DCM (10 mL), depois agitar a mistura à temperatura ambiente durante 4 h. Concentrar a mistura reaccional, depois dissolver em metanol e carregar num cartucho de permuta iónica SCX-2 de 10 g (pré-lavado com metanol). Lavar com um volume de coluna de metanol, depois eluir com um volume de coluna de amoníaco 3,5 M em metanol. Concentrar para dar 3'-piperidin-1-il-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']bipirazinilo (0,317 g, 97%). MS (m/z): 248,2 (M+1).

Os compostos seguintes são preparados essencialmente pelo método da Preparação 28 utilizando 4-(2-cloropiridin-3-il)piperizino-1-carboxilato de *terc*-butilo ou 4-(3-cloropirazin-2-il)-piperizino-1-carboxilato de *terc*-butilo e piperidina substituída.

| Prep. | Composto                                                                     | Estrutura | MS (ES)<br>[M+H] |
|-------|------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------|
| 29    | 1-(3,4,5,6-Tetra-hidro-2H-[1,2']-bipirazinil-3'-il)-piperidin-4-ol           |           | 264,3            |
| 30    | 3'-(4-Metil-piperidin-1-il)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinilo        |           | 262,2            |
| 31    | [1-(3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']-bipirazinil-3'-il)-piperidin-4-il]-metanol |           | 278              |
| 32*   | 3'-(4-Fluoro-piperidin-1-il)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinilo       |           | 266              |
| 33*   | (3'-Piperazin-1-il-3,4,5,6-tetra-hidro-[1,2']bipiridinil-4-il)-metanol       |           | 277,1            |

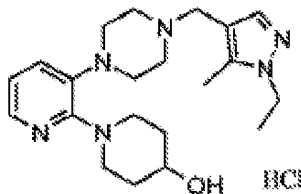
\* Estes intermediários não requerem o passo de desprotecção da Preparação 27 uma vez que o grupo N-protector Boc é removido nas condições de microondas.

Preparação 34: Éster 1-[4-(1,5-dimetil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']-bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-ilmetílico do ácido tolueno-4-sulfónico



Adicionar cloreto de p-toluenossulfonilo (272 mg, 1,43 mmol, 1,1 eq) a uma solução de {1-[4-(1,5-dimetil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']-bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol (0,5 g, 1,30 mmol, 1 eq, base livre e trietilamina (1,43 mL, 10,24 mmol, 1,1 eq) em DCM (3 mL) a 0°C. Agitar a mistura sob azoto durante 20,5 h. Adicionar mais uma porção de cloreto de p-toluenossulfonilo (0,13 g, 0,682 mmol, 0,5 eq) à mistura reaccional e continuar a agitar durante mais 4,5 h. Desactivar a reacção com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (20 mL) e depois passar através de uma frita hidrófoba para separar. Lavar a camada aquosa duas vezes com DCM (20 mL), combinar os extractos orgânicos e concentrar. Purificar por cromatografia "flash" numa coluna de 40 g de gel de sílica, eluindo com 0-10% de metanol em DCM para dar éster 1-[4-(1,5-dimetil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-ilmetílico do ácido tolueno-4-sulfónico (0,36 g, 51%). MS (m/z): 540,2 (M+1).

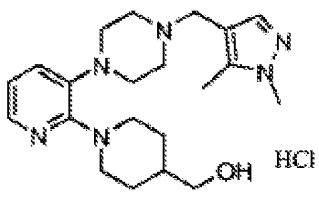
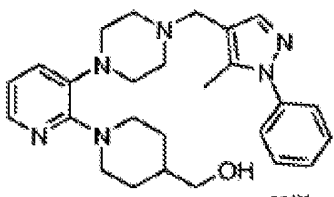
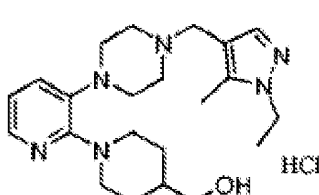
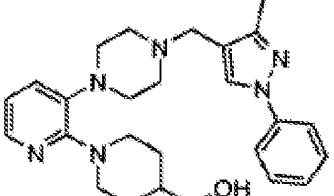
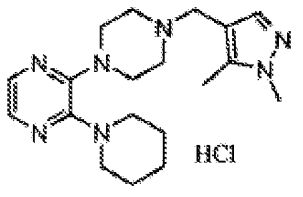
Exemplo 1: Cloridrato de 3'-[4-(1-etil-5-metil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']bipiridinil-4-ol



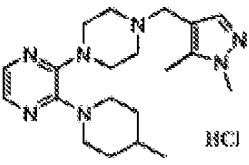
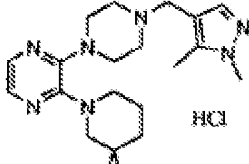
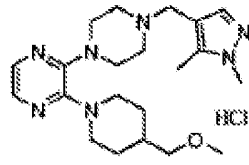
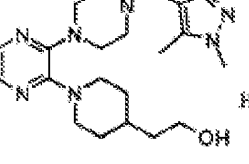
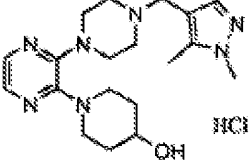
Colocar (2-cloro-piridin-3-il)-4-(1-etil-5-metil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-piperazina (0,155 mg, 0,484 mmol, 1 eq) e 4-hidroxipiperidina (245,09 mg, 2,42 mmol, 5 eq) num frasco para microondas, selar e aquecer num forno de microondas CEM™ a 180°C com uma potência máxima de 300 Watts durante 1 h. Recolocar a mistura arrefecida para reagir durante mais 1 h nas mesmas condições. Adicionar água (5 mL) e DCM (5 mL) à mistura reaccional arrefecida e depois passar através de uma frita hidrófoba para separar. Extrair a camada aquosa duas vezes com DCM (5 mL), combinar os extractos orgânicos e concentrar. Purificar por cromatografia "flash" numa coluna de 40 g de gel de sílica, eluindo com 4-8% de metanol em DCM. Dissolver este material (101 mg, 0,26 mmol) na quantidade mínima de acetonitrilo aquoso a 50%. Adicionar cloreto de hidrogénio aquoso 2 M (130 µL, 0,26 mmol) e liofilizar para dar cloridrato de 3'-[4-(1-etil-5-metil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']bipiridinil-4-ol (111 mg, 54%). MS (*m/z*): 385,2 (*M*+1).

Os compostos seguintes são preparados essencialmente pelo método do Exemplo 1, utilizando a 4-(substituído-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-1-(2-cloro-piridin-3-il)-piperazina ou 4 -(substituído-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-1-

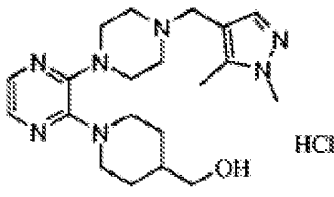
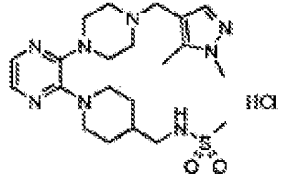
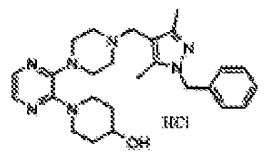
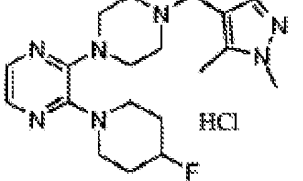
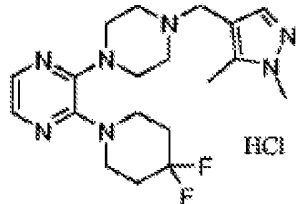
piperazina (2-cloro-pirazin-3-il) apropriada e piperidina substituída.

| Exemplo | Composto                                                                                                                                              | Estrutura                                                                            | MS (ES)<br>[M+H] |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 2       | Cloridrato de {3'-[4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']-bipiridinil-4-il}-metanol     |    | 385,2            |
| 3       | Cloridrato de {3'-[4-(5-metil-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']-bipiridinil-4-il}-metanol |   | 447,2            |
| 4       | Cloridrato de {3'-[4-(1-etil-5-metil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']-bipiridinil-4-il}-metanol  |  | 399,2            |
| 5       | Cloridrato de {3'-[4-(3-metil-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']-bipiridinil-4-il}-metanol |  | 447,2            |
| 6       | Cloridrato de 4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3'-piperidin-1-il-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']-bipirazinilo                     |  | 356,2            |

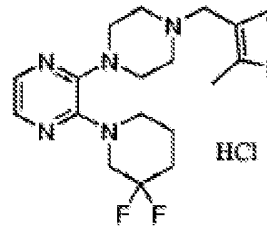
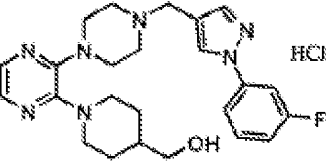
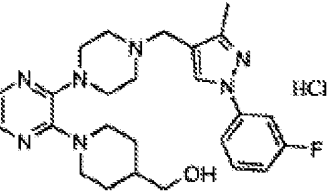
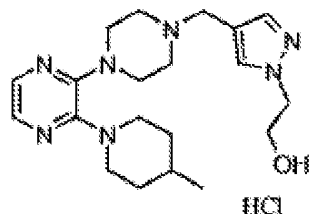
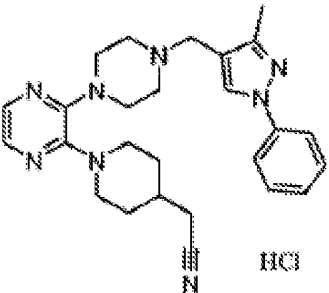
(continuação)

| Exemplo | Composto                                                                                                                                           | Estrutura                                                                            | MS (ES)<br>[M+H] |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 7       | Cloridrato de 4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3'-(4-metil-piperidin-1-il)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']-bipirazinilo        |    | 370,2            |
| 8       | Cloridrato de 3-(3,3'-dimetil-piperidin-1-il)-4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinilo     |   | 384,3            |
| 9       | Cloridrato de 4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3'-(4-metoxi-metil-piperidin-1-il)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']-bipirazinilo |  | 400,2            |
| 10      | Cloridrato de 2-{1-[4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-etanol  |  | 400,2            |
| 11      | Cloridrato de 1-[4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-ol             |  | 372,2            |

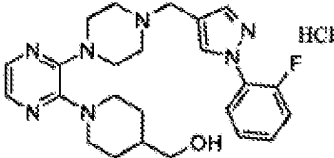
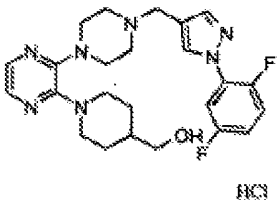
(continuação)

| Exemplo        | Composto                                                                                                                                                           | Estrutura                                                                            | MS (ES)<br>[M+H] |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 12             | Cloridrato de {1-[4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol                   |    | 386,2            |
| 13<br>***      | Cloridrato de N-{1-[4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-ilmetil}-metano-sulfonamida |   | 463,2            |
| 14             | Cloridrato de 1-[4-(1-benzil-3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-ol                    |  | 462,2            |
| 15<br>*<br>*** | Cloridrato de 4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3'-(4-fluoro-piperidin-1-il)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinilo                        |  | 374,2            |
| 16<br>**       | Cloridrato de 3'-(4,4-difluoro-piperidin-1-il)-4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinilo                    |  | 392,1            |

(continuação)

| Exemplo        | Composto                                                                                                                                                         | Estrutura                                                                            | MS (ES)<br>[M+H] |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 17<br>**       | Cloridrato de 3'-(3,3-difluoro-piperidin-1-il)-4-(1,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinilo                  |    | 392,1            |
| 18             | Cloridrato de (1-{4-[1-(3-fluoro-fenil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinil-3'-il}-piperidin-4-il)-metanol          |   | 452,5            |
| 19             | Cloridrato de (1-{4-[1-(3-fluoro-fenil)-3-metil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']-bipirazinil-3'-il}-piperidin-4-il)-metanol |  | 466,2            |
| 20<br>*<br>*** | Cloridrato de 2-{4-[3'-(4-metil-piperidin-1-il)-2,3,5,6-tetra-hidro[1,2']bipirazinil-4-ilmetil]-pirazol-1-il}-etanol                                             |  | 386,2            |
| 21<br>*<br>*** | Cloridrato de (1-{4-[3-(3-metil-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-acetonitrilo     |  | 457,2            |

(continuação)

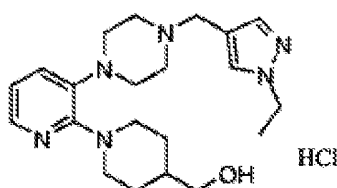
| Exemplo | Composto                                                                                                                                                    | Estrutura                                                                           | MS (ES)<br>[M+H] |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 22      | Cloridrato de (1-{4-[1-(2-fluoro-fenil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinil-3'-il}-piperidin-4-il)-metanol     |   | 452,2            |
| 23      | Cloridrato de (1-{4-[1-(2,5-difluoro-fenil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipirazinil-3'-il}-piperidin-4-il)-metanol |  | 470,17           |

\*A reacção é realizada com aquecimento convencional num tubo selado, em vez de em condição de micro-ondas como no Exemplo 1.

\*\* Utiliza-se piperidina substituída apropriada como o seu sal de HCl e adiciona-se diisopropiletilamina para evitar decomposição.

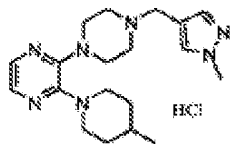
\*\*\* Utiliza-se solvente apropriado como 1,4-dioxano ou piridina.

Exemplo 24: Cloridrato de {3'-[4-(1-etil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']bipiridinil-4-il}-metanol

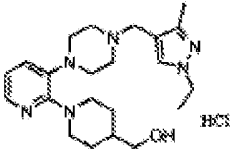
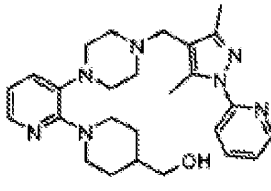
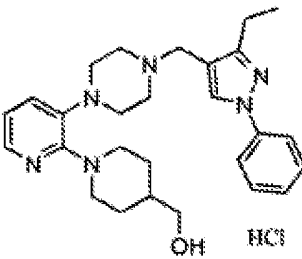
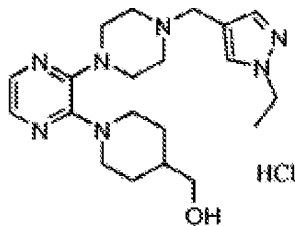
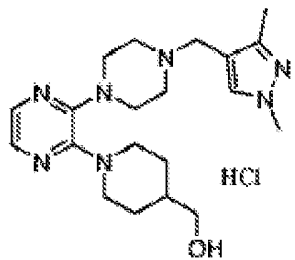


A uma solução de (3'-piperazin-1-il-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipiridinil-4-il)-metanol (0,145 g, 0,524 mmol, 1 eq) e 1-etil-1H-pirazole-4-carbaldeído (97,69 mg, 0,787 mmol, 1,5 eq) em 1,2-dicloroetano (10 mL) adicionar triacetoxiboro-hidreto de sódio (166,79 mg, 0,787 mmol, 1,5 eq) numa porção como um sólido. Agitar a mistura à temperatura ambiente sob azoto durante 20 h. Adicionar solução aquosa de hidróxido de sódio 2 M (20 mL) e DCM (20 ml). Separar utilizando um separador de fases e extrair a camada aquosa com DCM (10 mL). Concentrar os extractos orgânicos combinados e purificar por HPLC de fase inversa a pH elevado. Dissolver este material (120 mg, 0,31 mmol) na quantidade mínima de acetonitrilo aquoso a 50%. Adicionar cloreto de hidrogénio aquoso 2 M (155 µL, 0,31 mmol) e liofilizar para dar o composto em epígrafe (127 mg, 58%). MS (m/z): 385,2 (M+1).

Os compostos seguintes são preparados essencialmente pelo método do Exemplo 24 utilizando a 2-(2-(substituído-piperidin-1-il)piridin-3-il)piperazina ou 2-(substituído-piperidin-1-il)-3-pirazina (piperazin-1-il) adequada, e 1H-pirazole-4-carbaldeído substituído.

| Exemplo | Composto                                                                                                              | Estrutura                                                                            | MS (ES)<br>[M+H] |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 25      | Cloridrato de 3'-(4-metil-piperidin-1-il)-4-(1-metil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']-bipirazinilo |  | 356,2            |

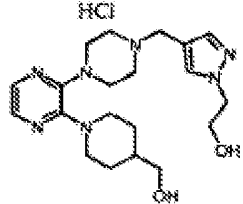
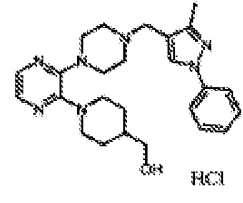
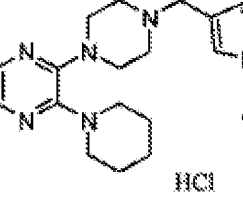
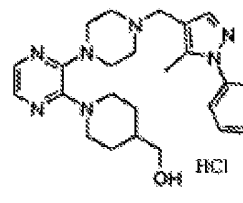
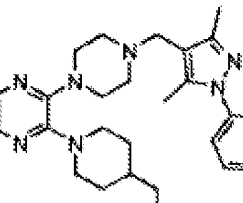
(continuação)

| Exemplo | Composto                                                                                                                                                         | Estrutura                                                                            | MS (ES)<br>[M+H] |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 26      | Cloridrato de {3'-[4-(1-etil-3-metil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipiridinil-4-il}-metanol              |    | 399,3            |
| 27      | Cloridrato de {3'-[4-(3,5-dimetil-1-piridin-2-il-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']-bipiridinil-4-il}-metanol |   | 462,3            |
| 28      | Cloridrato de {3'-[4-(3-etil-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']bipiridinil-4-il}-metanol              |  | 461,2            |
| 29      | Cloridrato de {1-[4-(1-etil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']-bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol                     |  | 386,3            |
| 30      | Cloridrato de 1-[4-(1,3-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2 <i>H</i> -[1,2']-bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol                 |  | 386,3            |

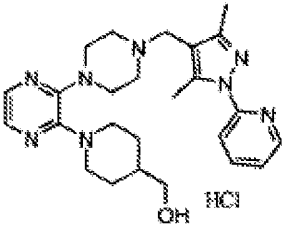
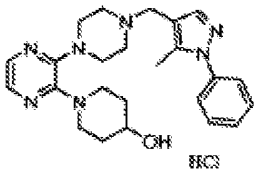
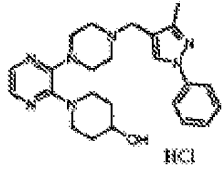
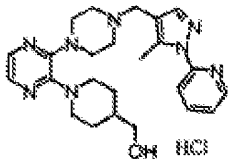
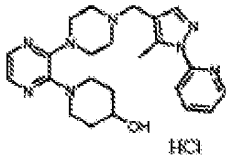
(continuação)

| Exemplo | Composto                                                                                                                                    | Estrutura | MS (ES)<br>[M+H] |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------|
| 31      | Cloridrato de {1-[4-(1-benzil-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol     |           | 476,3            |
| 32      | Cloridrato de (1-{4-[1-(4-fluoro-fenil)-5-metil-1H-pirazol-4-ilmetil]-3,4,5,6-tetra-hidro-[1,2']-bipirazinil-3'-il}-piperidin-4-il)-metanol |           | 466,3            |
| 33      | Cloridrato de {1-[4-(1-etil-5-metil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol           |           | 400,3            |
| 34      | Cloridrato de {1-[4-(1,3,5-trimetil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol           |           | 400,3            |
| 35      | Cloridrato de {1-[4-(1-metil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']-bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol                 |           | 372,3            |

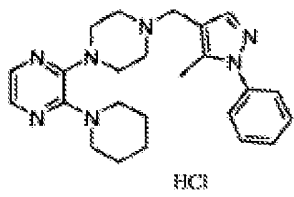
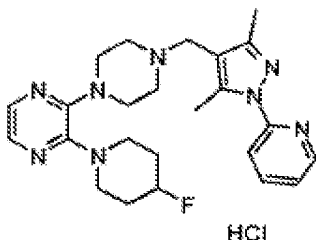
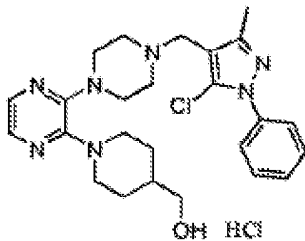
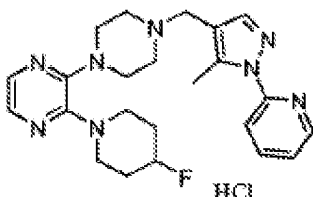
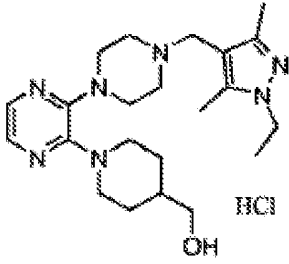
(continuação)

| Exemplo | Composto                                                                                                                               | Estrutura                                                                            | MS (ES)<br>[M+H] |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 36      | Cloridrato de 2-{4-[3'-(4-hidroxi-metil-piperidin-1-il)-2,3,5,6-tetra-hidro-[1,2']bipirazinil-4-ilmetil]-pirazol-1-il}-etanol          |    | 402,2            |
| 37      | Cloridrato de {1-[4-(3-metil-1-fenil-1H-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']-bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol            |   | 448,4            |
| 38      | Cloridrato de 2-[4-(3'-piperidin-1-il-2,3,5,6-tetra-hidro-[1,2']-bipirazinil-4-ilmetil)-pirazol-1-il]-etanol                           |  | 372,2            |
| 39      | Cloridrato de {1-[4-(5-metil-1-fenil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol     |  | 448,2            |
| 40      | Cloridrato de {1-[4-(3,5-dimetil-1-fenil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol |  | 462,2            |

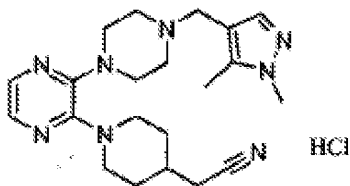
(continuação)

| Exemplo | Composto                                                                                                                                       | Estrutura                                                                            | MS (ES)<br>[M+H] |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 41      | Cloridrato de {1-[4-(3,5-dimetil-1-piridin-2-il-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']-bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol |    | 463,2            |
| 42      | Cloridrato de 1-[4-(5-metil-1-fenil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-ol                       |   | 434,2            |
| 43      | Cloridrato de 1-[4-(3-metil-1-fenil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-ol                       |  | 434,2            |
| 44      | Cloridrato de {1-[4-(5-metil-1-piridin-2-il-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol      |  | 449,2            |
| 45      | Cloridrato de {1-[4-(5-metil-1-piridin-2-il-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-ol               |  | 435,2            |

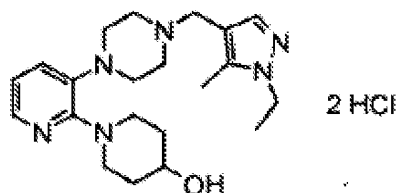
(continuação)

| Exemplo | Composto                                                                                                                                   | Estrutura                                                                                      | MS (ES)<br>[M+H] |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 46      | Cloridrato de 4-(5-metil-1-fenil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3'-piperidin-1-il-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']-bipirazinilo                        | <br>HCl      | 418,2            |
| 47      | Cloridrato de 4-(3,5-dimetil-1-piridin-2-il-1H-pirazol-4-ilmetil)-3'-(4-fluoro-piperidin-1-il)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']-bipirazinilo  | <br>HCl     | 451,2            |
| 48      | Cloridrato de {1-[4-(5-cloro-3-metil-1-fenil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol | <br>OH HCl | 482,2            |
| 49      | Cloridrato de 3'-(4-fluoro-piperidin-1-il)-4-(5-metil-1-piridin-2-il-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']-bipirazinilo      | <br>F HCl  | 437,2            |
| 50      | Cloridrato de {1-[4-(1-etil-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-metanol      | <br>OH HCl | 414,2            |

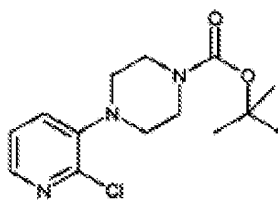
Exemplo 51: Cloridrato de {1-[4-(1,5-dimetil-1H-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']-bipirazinil-3'-il]-piperidin-4-il}-acetonitrilo



Exemplo 52: Dicloridrato de 3'-[4-(1-etil-5-metil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetrahidro-2*H*-[1,2']bipiridinil-4-ol



Éster *terc*-butílico do ácido 4-(2-cloro-piridin-3-il)-piperazino-1-carboxílico



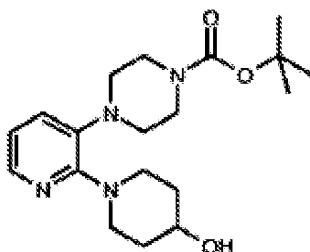
Agitar 3-bromo-2-cloropiridina (460 g, 2,39 moles) em tolueno (2,3 litros). Adicionar N-*t*-butoxicarbonyl-piperazina (445,2 g, 2,39 moles) e purgar com azoto durante 15 min. Adicionar tris(dibenzilidenoacetona)dipaládio(0) (43,78 g, 47,8 mmol) e 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (82,99 g, 143 mmol) e purgar com azoto durante 15 min. Transferir a mistura para um autoclave de um galão e manter sob azoto. Adicionar de *t*-butóxido de sódio (252,69 g, 2,63 mol) (observando uma ligeira exotérmica). Pressurizar o autoclave com azoto a 40 psi (275,6 KPa) e libertar a pressão, três vezes e depois pressurizar com azoto a 20-40 psi (137,8-275,6 kPa) e aquecer rapidamente a mistura a 110°C. A temperatura

aumenta por reacção exotérmica para cerca de 113°C. Agitar a reacção durante 2,75 horas a 110°C e 20-40 psi (137,8-275,6 Kpa) sob azoto. Arrefecer a mistura e teste quanto à conclusão da reacção (análise por HPLC). Filtrar a mistura sobre papel de fibra de vidro e lavar com tolueno.

Transferir a mistura filtrada para uma ampola de separação e extrair com água (2 litros). Extrair a fase aquosa duas vezes com acetato de etilo (3 L, depois 2 L). Lavar as fases orgânicas combinadas duas vezes com solução de NaCl a 15% (4 L, depois 2 L). Agitar as fases orgânicas durante 30 min com sulfato de sódio e de carvão descorante (100 g). Filtrar a mistura e evaporar o filtrado num evaporador rotativo para se obter um óleo escuro (831 g).

Dissolver o produto em bruto referido acima em acetato de etilo (3 L) e aplicar num funil de vidro sinterizado empacotado com gel de sílica (6 kg, empacotado utilizando heptano). Lavar a coluna com 95% de heptano:5% de acetato de etilo (8 L), depois eluir com 70% de heptano:30% de acetato de etilo, recolhendo a fracção contendo o produto em bruto. Purificar adicionalmente as fracções combinadas contendo o produto por cromatografia em gel de sílica com 5% de éter *t*-butil metílico em DCM para dar éster *t*-butílico do ácido 4-(2-cloro-piridin-3-il)-piperazino-1-carboxílico (331 g, 46,5%) como um sólido amarelo. <sup>1</sup>H NMR 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,078 (dd, *J* = 3,2 Hz, 1H), 7,30 (dd, *J* = 6,5 Hz, 1H), 7,201 (m, 1H), 3,616 (m, 4H), 3,018 (m, 4H), 1,485 (s, 9H).

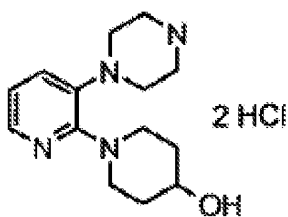
4-(2-(4-Hidroxipiperidin-1-il)piridin-3-il)-  
piperazino-1-carboxilato de *terc*-butilo



Equipar um balão de 2 L com um agitador, termopar e linha de azoto para a adição subsuperficial e purgar com atmosfera de azoto durante 30 min. Adicionar éster *t*-butílico do ácido 4-(2-cloro-piridin-3-il)-piperazino-1-carboxílico (100 g, 0,336 moles), 4-hidroxipiperidina (37,36 g, 0,369 mol), *t*-butóxido de sódio (80,68 g, 0,839 mol) e acetato de (2'-di-*t*-butilfosfino-1,1'-bifenil-2-il)-paládio(II) (2,33 g, 5,04 mmol). A mistura de sólidos é colocada sob atmosfera de azoto durante 15 min. Num balão separado, azoto é borbulhado através de tolueno (933 mL) durante 30 min. Adicionar o tolueno à mistura de sólidos e agita-se durante 28 h, borbulhando azoto lentamente através da mistura reaccional e controlando a temperatura entre 16 e 20°C com um banho de água. Adicionar água (1 L) gota a gota, mantendo a temperatura abaixo de 25°C. Separar as fases e extrair a camada aquosa com tolueno (500 mL). Combinar as fases orgânicas e lavar duas vezes com NaCl aquoso a 15%. Evaporar a fase orgânica num evaporador rotativo para obter um óleo. Adicionar tolueno (250 mL) e evaporar duas vezes para dar 127,7 g de óleo. Dissolver o

óleo em acetato de etilo (255 mL em 2 volumes) e aquecer a 65-70°C. Adicionar heptano (1277 mL em 10 volumes) a 65-70°C. Deixar a solução arrefecer até à temperatura ambiente e deixar em repouso durante 16 a 18 h. Arrefecer-se a mistura amarela a 0-5°C durante 1 h e depois filtrar. Lavar os sólidos com uma solução de acetato de etilo a 20% em heptano a 0-5°C. Secar o sólido a 45 a 50°C numa estufa de vácuo para dar 4-(2-(4-hidroxipiperidin-1-il)piridin-3-il)-piperazino-1-carboxilato de *t*-butilo (66,6 g, 54,7%). <sup>1</sup>H NMR 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,958 (dd, J = 3,3 Hz, 1H), 7,10 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 6,834 (m, 1H), 4,01 (d, J = 3,2, 2H), 3,865 (m, 1H), 3,578 (m, 4H), 3,041 (m, 4H), 2,945 (m, 2H), 1,643 (m, 2H), 1,487 (s, 9H).

Dicloridrato de 1-(3-(piperazin-1-il)piridin-2-il)piperidin-4-ol

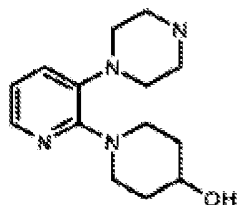


A um balão de 2 L arrefecido num banho de gelo adicionar HCl gasoso em metanol (900 mL) para preparar uma solução 7,31 M, mantendo a temperatura abaixo de 20°C.

Adicionar 4-(2-(4-hidroxipiperidin-1-il)piridin-3-il)-piperazino-1-carboxilato de *t*-butilo (306,5 g, 0,846 mol) a um balão de 12 litros, seguido por metanol (613 mL) e tolueno (3,06 L). Agitar a mistura para dar uma solução e

depois adicionar a solução de HCl metanólico (579 mL). Aquecer a solução a 35°C durante 2 h seguidas por 4 h à temperatura ambiente. Separar o produto cristalino resultante por filtração, lavar os cristais com tolueno e depois secar numa estufa de vácuo a 40-45°C para dar dicloridrato de 1-(3-(piperazin-1-il)piridin-2-il)-piperidin-4-ol como um sólido cristalino (283,5 g, 99,47%). <sup>1</sup>H NMR 300 MHz (DMSO) δ 9,624 (bs, 2H) 7,890 (dd, J = 6,4 Hz, 1H), 7,633 (d, J = 7,75 Hz, 1H), 7,137 (m, 1H), 3,916 (bm, 2H), 3,727 (bm, 1H), 3,236 (bs, 9H), 1,877 (bm, 2H), 1,515 (bm, 2H).

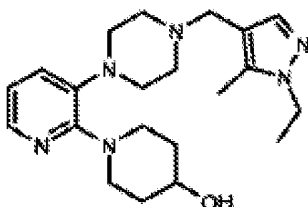
1-(3-(Piperazin-1-il)piridin-2-il)piperidin-4-ol



Dissolver dicloridrato de 1-(3-(piperazin-1-il)piridin-2-il)piperidin-4-ol (281,0, 0,838 mol) em solução aquosa saturada de cloreto de sódio (2,45 litros). Adicionar NaOH 2 M (~ 1 L) para levar o pH a 11,3. Extrair a mistura três vezes com DCM (3 x 2,04 L). Secar os extratos orgânicos combinados sobre sulfato de sódio, filtrar e evaporar o solvente num evaporador rotativo com uma purga de azoto para se obter uma espuma. Quando a espuma estiver estável, secar adicionalmente o material durante 2 a 3 horas a 50°C em vácuo para dar 1-(3-(piperazin-1-il)piridin-2-il)piperidin-4-ol (207,5 g, 94,1%). <sup>1</sup>H NMR 300

MHz (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,923 (dd,  $J$  = 3,1 Hz, 1H), 7,10 (d,  $J$  = 6,3 Hz, 1H), 6,815 (m, 1H), 4,040 (m, 2H), 3,840 (m, 1H), 3,048 (bs, 8H), 2,898 (m, 2H), 2,028 (m, 2H), 1,862 (s, 2H ??), 1,634 (m, 2H).

3'-[4-(1-Etil-5-metil-1H-pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,2']bipiridinil-4-ol



Dissolver 1-(3-(piperazin-1-il)piridin-2-il)-piperidin-4-ol (207 g, 0,789 mol) e 1-etil-5-metil-1H-pirazole-4-carbaldeído (130,8 g, 0,947 mol) em dicloroetano (4,55 L). Arrefecer a -5°C e começar a adicionar triacetoxiboro-hidreto de sódio (334,5 g, 1,578 mol) em porções, mantendo a temperatura abaixo de cerca de 5°C. Retirar o banho de gelo e permitir que a reacção aqueça até 10°C ao longo de cerca de 1 h. Aquecer a reacção a 18-20°C e agitar durante 3 h.

Arrefecer a mistura reaccional a 15°C e adicionar NaOH 2 N (2 L). Separar as fases e extrair as camadas aquosas duas vezes com DCM (2 x 1,3 L). Filtrar as camadas orgânicas combinadas através de papel de fibra de vidro. Extrair as fases orgânicas com HCl 1 N (1 x 2,5 L uma vez, 2 x 1 L). Às camadas aquosas combinadas que contêm o

produto, adicionar NaOH a 50% (400 mL) para levar o pH a 11,6. Extrair a camada aquosa leitosa resultante com DCM (1 x 3 L, 2 x 1,5 L). Secar os extractos orgânicos combinados sobre sulfato de sódio. Adicionar carvão descorante (G-60, 44 g) e agitar a mistura à temperatura ambiente durante 20 min. Filtrar através de papel de fibra de vidro, lavar com DCM (1 L) e evaporar os solventes para dar 3'-[4-(1-etil-5-metil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']bipiridinil-4-ol como um óleo (330 g, 109%). <sup>1</sup>H NMR 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) (E29-H70357-031) δ 7,87 (dd, *J* = 3,3 Hz, 1H), 7,37 (s, 1H) 7,05 (dd, *J* = 6,26 Hz, 1H), 6,77 (m, 1H), 4,065 (q, *J* = 7,35 Hz, 2H), 3,99 (bm, 2H), 3,802 (bm, 1H), 3,365 (s, 2H), 2,658 (bm, 2H), 2,551 (bm, 3H), 2,236 (s, 3H), 1,985 (bm, 2H), 1,615 (bm, 2H), 1,381 (t, *J* = 7,26 Hz, 3H).

Dicloridrato de 3'-[4-(1-etil-5-metil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']-bipiridinil-4-ol

Dissolve-se 3'-[4-(1-etil-5-metil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']-bipiridinil-4-ol (415 g, 1,079 mol) em etanol (5,5 litros) e éter *t*-butil metílico (6,23 litros). Agitar a solução em atmosfera de azoto e aquecer a 50-55°C. Adicionar solução de HCl 2,96 M em etanol (0,729 L) a 50-55°C ao longo de 50 min. Deixar a mistura arrefecer até cerca de 40,1°C ao longo de 90 min. Arrefecer a mistura a 20°C ao longo de 20 min e depois agitar a 20°C durante 30 min. Filtrar a

mistura e lavar com éter *t*-butil metílico (3 x 500 mL). Secar o sólido numa estufa de vácuo a 50-55°C sob vácuo com uma ligeira corrente de azoto durante 24 h para dar dicloridrato de 3'-[4-(1-etil-5-metil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']-bipiridinil-4-ol (416 g, 84,3%). <sup>1</sup>H NMR 500 MHz (CD<sub>3</sub>OD) δ 7,89 (dd, *J* = 6,0 Hz, 2H), 7,828 (s, 1H), 7,275 (dd, *J* = 6,0 Hz, 1H), 4,86 (CD<sub>3</sub>OH), 4,385 (s, 2H), 4,220 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 4,04 (bm, 2H), 3,976 (bm, 1H), 3,70 (bm, 4H), 3,511 (bm, 2H), 3,410 (bt, 2H), 3,145 (t, *J* = 8,1, 2H), 2,467 (s, 3H), 2,082 (bm, 2H), 1,716 (bm, 2H), 1,416 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H). A análise de cloreto é obtida por ICP/MS (15,6%).

Os antagonistas de receptores 5-HT<sub>7</sub> da presente invenção são relativamente selectivos para o receptor 5-HT<sub>7</sub>. Os compostos da presente invenção são particularmente relativamente selectivos para o receptor 5-HT<sub>7</sub> em comparação com outros subtipos de receptores 5-HT e, especificamente, os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub>. Esta selectividade é demonstrada nos seguintes ensaios de ligação a receptores e ensaios de actividade antagonista de receptores.

#### Preparação das membranas:

Membranas para ensaios de afinidade e actividade antagonista são preparadas essencialmente como se segue. Células AV-12, que exprimem de forma estável o receptor 5-HT<sub>7</sub>, são cultivadas como uma monocamada em 5 frascos T-150

em DMEM/F12 (3:1) 5% de FBS, HEPES 20 mM, 400 mg/mL de geneticina, 50 mg/mL de tobramicina. Depois de crescer até 90% de confluência o meio é removido e substituído por meio Hybritech contendo 2% de soro de cavalo, 100 mg/mL de sulfato de dextrano, 1 mg/mL de Nucellin®, 1 mg/mL de transferrina humana (parcialmente saturada com ferro), 50 mg/mL de tobramicina, HEPES 20 mM, 100 mg/mL de geneticina, Pluronic F68 a 0,04%. (O meio Hybritech é um meio DMEM/F12 modificado com baixo teor de cálcio para suportar o crescimento de células em suspensão que tem a fórmula seguinte: biotina 7,3 µg/L, cloreto de cálcio anidro 11 mg/L, cloreto de colina 8,98 mg/L, sulfato cúprico 5H<sub>2</sub>O 3,75 µg /L, D-glucose (dextrose) 6,00 g/L, ácido DL-lipóico tióctico 0,21 mg/L, etanolamina HCl 10 mg/L, nitrato férrico 9\*H<sub>2</sub>O 50 µg/L, sulfato ferroso 7\*H<sub>2</sub>O 0,42 mg/L, ácido fólico 4 mg/L, glicina 30 mg/L, I inositol 12,6 mg/L, L-alanina 8,9 mg/L, L-arginina HCl 211 mg/L, L-asparagina H<sub>2</sub>O 15 mg/L, L ácido aspártico 13,3 mg/L, L-cistina 2\*HCl 62,6 mg/L, ácido L-glutâmico 7,35 mg/L, L-glutamina 1,46 g/L, L-histidina HCl H<sub>2</sub>O 42 mg/L, L-isoleucina 105 mg/L, L-leucina 105 mg/L, L-lisina HCl 146 mg/L, L-metionina 30 mg/L, L-fenilalanina 66 mg/L, L-prolina 17,25 mg/L, L-serina 42 mg/L, L-treonina 95 mg/L, L-triptofano 16 mg/L, sal dissódico de L-tirosina 104 mg/L, L-valina 94 mg/L, cloreto de magnésio anidro 28,64 mg/L, sulfato de magnésio anidro 48,84 mg/L, niacinamida 4 mg/L, KCl 311,8 mg/L, purescina 2\*HCl 0,08 mg/L, piridoxal HCl 4 mg/L, piridoxina HCl 30 µg/L, riboflavina 0,4 mg/L, NaCl 5,50 g/L, hipoxantina de sódio 4,77 mg/L, pantotenato de sódio 4

mg/L, fosfato de sódio dibásico anidro 71,2 mg/L, fosfato de sódio monobásico 62,5 mg/L, piruvato de sódio 220 mg/L, selenito de sódio 5,00 µg/L, tiamina HCl 4 mg/L, timidina 0,73 mg/L, vitamina B12 0,68 mg/L, sulfato de zinco 7·H<sub>2</sub>O 0,43 mg/L). As células são cultivadas de um dia para o outro para condicionar o meio. Na manhã seguinte, o meio condicionado (~150 mL no total) é removido e posto de lado num recipiente estéril. As células são tripsinizadas e colhidas no meio condicionado. Adiciona-se meio de suspensão fresco para levar o volume total a 500 mL e uma densidade celular de  $5 \times 10^5$  células/mL. O volume da cultura em suspensão é aumentado repetidamente durante as 3 semanas seguintes para o volume e densidade desejados até à colheita (densidade celular alvo de aproximadamente 3,5-4,0  $\times 10^6$  células por mL). As células são colhidas por centrifugação a 1500 g, 4°C durante 30 min. O sobrenadante é decantado e os sedimentos de células são ressuspensos em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) gelado. A suspensão celular é dividida em alíquotas em tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugada a 1500 g, 4°C durante 15 min. O sobrenadante é removido, os sedimentos são pesados e depois congelados em gelo seco.

Para preparar as membranas, os sedimentos referidos acima são ressuspensos em tampão Tris gelado (Tris HCl 20 mM, pH 7,4 a 23°C, EDTA 5 mM) e homogeneizados com um moinho de tecidos Wheaton. O lisado é subsequentemente centrifugado a 200 x g durante 5 min a 4°C para sedimentar fragmentos grandes que são descartados. O

sobrenadante é recolhido e centrifugado a 40000 x g durante 60 min a 4°C. O sedimento resultante é ressuspenso num tampão final contendo Tris HCl 50 mM e EDTA 0,5 mM, pH 7,4. As preparações de membrana são congeladas instantaneamente em gelo seco e armazenadas a -80°C. As concentrações de proteína são determinadas pelo método de Bradford. *Anal Biochem.*, 72:248-254, 1976.

Para os ensaios de cAMP funcionais, as células que exprimem 5-HT<sub>7</sub> de cima são cultivadas em balões de 150 cm<sup>2</sup> e processadas essencialmente como se segue. O meio é aspirado dos balões e as células são lavadas com 1 mL de PBS. As células são libertadas da superfície do balão utilizando uma solução de dissociação de células isenta de enzimas (Specialty Media ([www.chemicon.com](http://www.chemicon.com)) CAT# S-004-B) e ressuspensas em meio completo. Uma amostra das células é contada e o restante é centrifugado como acima durante 3 min. O sedimento de células resultante é ressuspenso em PBS numa concentração de  $1 \times 10^6$  células por mL e utilizado directamente no ensaio de cAMP como descrito.

Afinidade para o receptor 5-HT<sub>7</sub>: Ensaio de ligação de radioligandos:

O ensaio de ligação do radioligando [<sup>3</sup>H]5-HT é realizado utilizando modificações das condições de ensaio descritas por Kahl et al. (*J. Biomol. Screen*, 2:33-40 (1997), essencialmente como se segue. Os ensaios de ligação

de radioligandos são realizados em placas de microtitulação com 96 poços, num volume total de 125  $\mu$ L contendo seguinte tampão de reacção: Tris 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EDTA 0,2 mM, pargilina 10 mM, ascorbato a 0,1%, pH 7,4 à temperatura ambiente. A ligação de competição é realizada utilizando onze concentrações do composto de teste variando de 0,1 a 10000 nM, na presença de [ $^3\text{H}$ ]5-HT 1 nM. 5-HT não marcado (10  $\mu$ M) é utilizado para definir a ligação não específica. A reacção de ligação é iniciada por adição de 0,15  $\mu$ g de homogeneizado de membranas (2,31 ng/ $\mu$ L, 65  $\mu$ L por poço) e 0,5 mg de fluoromicrosferas de ensaio de proximidade de cintilação. As reacções são incubadas à temperatura ambiente durante 3 h e depois contadas num contador de cintilações Trilux Microbeta™ para detectar o radioligando ligado ao receptor. Os dados de ligação são analisados por análise de ajustamento a 4 parâmetros assistida por computador (ID Business Solutions Ltd, Guildford, Surrey, UK). Os valores da  $\text{IC}_{50}$  são convertidos em valores de  $K_i$  utilizando a equação de Cheng-Prusoff. *Biochem. Pharmacol.*, 22:3099-3108 (1973).

Os compostos exemplificados são testados essencialmente como descrito e verificou-se terem valores de  $K_i \leq 50$  nM. O composto do Exemplo 1 é testado essencialmente como descrito e verifica-se ter um valor de  $K_i$  de cerca de 16,2 nM.

A afinidade para outros subtipos de receptores de

serotonina, bem como para os receptores adrenérgicos alfa 1 & 2 podem ser prontamente determinada por uma modificação do ensaio de ligação ao receptor descrito acima utilizando membranas derivadas de células que exprimem de forma estável o subtipo de receptor desejado, incluindo os subtipos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub>, bem como os receptores dos subtipos 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub> e 5-HT<sub>6</sub>. A razão de selectividade de  $K_{i-x}/K_{i-5HT7}$ , em que  $K_{i-x}$  é a  $K_i$  para o receptor a ser comparado, é indicativa da afinidade relativa de um composto para o receptor 5-HT<sub>7</sub>. Os compostos exemplificados são testados e têm razões de selectividade em relação a outros receptores serotoninérgicos de  $\geq 4$  e contra receptores andronérgicos de  $\geq 4$ . O composto do Exemplo 1 é testado essencialmente como descrito e verifica-se ter o perfil de selectividade seguinte:

| Receptor           | Ex. 1<br>$K_i$ (nM) |
|--------------------|---------------------|
| 5-HT <sub>1A</sub> | 213                 |
| 5-HT <sub>1B</sub> | >3580               |
| 5-HT <sub>1D</sub> | 1840                |
| 5-HT <sub>2A</sub> | >7470               |
| 5-HT <sub>2B</sub> | >6810               |
| 5-HT <sub>2C</sub> | >8360               |
| 5-HT <sub>4</sub>  | (não testado)       |
| 5-HT <sub>5</sub>  | 4550                |
| 5-HT <sub>6</sub>  | >5830               |
| 5-HT <sub>7</sub>  | 16,2                |
| Alfa 1 adrenérgico | 1380                |
| Alfa 2 adrenérgico | >2670               |

Ensaio antagonista funcional: Medição da formação de cAMP:

O receptor 5-HT<sub>7</sub> está funcionalmente acoplado a uma proteína G medida pela capacidade da serotonina e de fármacos serotoninérgicos para estimular a produção de cAMP em células CHO transfectadas com o receptor 5-HT<sub>7</sub>. (Ruat, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 90:8547-8551, 1993.) Por conseguinte, a actividade do receptor funcional pode ser medida por determinação da actividade de adenilato ciclase utilizando kit de ensaio de fluorescência resolvida no tempo, homogéneo, à base de células, disponível comercialmente, como por exemplo o kit produzido por Cisbio-US, Inc. (Bedford, MA). Essencialmente, e utilizando o protocolo e os reagentes fornecidos pelo fabricante, aproximadamente 20000 células AV-12 que exprimem receptores 5-HT<sub>7</sub> humanos (como descrito acima) são utilizados com concentrações de dose de compostos de teste no intervalo descrito para o ensaio de ligação. Curvas de resposta à dose EC-90 para 5-HT são medidas em paralelo para demonstrar o antagonismo competitivo. É também traçada uma curva padrão de cAMP em cada experiência. Depois de as placas de ensaio serem lidas num instrumento Envision™ (Perkin-Elmer, Wellesley MA), os dados são normalizados para a curva padrão e convertidos em percentagem de inibição para análise de dados como descrito acima para os resultados do ensaio de ligação ao receptor. O K<sub>b</sub> (nM) é calculado como uma medida da potência antagonista do composto. Os compostos preferidos são os que têm uma

percentagem de inibição > 75%. Ainda outros compostos preferidos são os que têm  $K_b$  <50 nM. O composto do Exemplo 1 é testado essencialmente como descrito e verifica-se ser um antagonista completo com um valor de  $K_b$  de cerca de 2,97 nM (inibição = cerca de 108%).

Modelo Animal de extravasamento de proteína de plasma dural (PPE).

O modelo de extravasamento de proteína de plasma dural é um modelo estabelecido para a enxaqueca. A capacidade de um composto de teste de reduzir o extravasamento de proteínas do plasma na dura-máter nas condições de ensaio é considerado indicativo da capacidade do composto para reduzir ou impedir a inflamação da dura-máter que se pensa ser sintomática da enxaqueca, (ver Johnson, K. W. *et al.*, *Neuroreport*, 8 (1997) 2237-2240).

Para ensaiar compostos quanto à sua capacidade para reduzir ou evitar o extravasamento de proteína do plasma dural, ratos Harlan Sprague-Dawley machos (250-350 g) são anestesiados com pentobarbital sódico (65 mg/kg, i.p.) e colocados numa estrutura estereotáxica (David Kopf Instruments) com a barra incisora regulada para -2,5 mm. Após uma incisão na linha média sagital do escalpe, são perfurados 2 pares de furos bilaterais através do crânio (3,2 mm posteriormente, 1,8 e 3,8 mm lateralmente, sendo todas as coordenadas referenciadas ao bregma). Pares de eléctrodos de estimulação em aço inoxidável, isolados

excepto nas extremidades (Rhodes Medical Systems, Inc.), são baixados através dos orifícios em ambos os hemisférios até uma profundidade de 9,2 mm.

O composto de teste é administrado por via intravenosa (i.v.) na veia femoral a um volume de dosagem de 1 mL/kg. Cerca de 8 min após a injeção, administra-se aos animais isotiocianato de fluoresceína-albumina de soro bovino (FITC-BSA) (20 mg/kg, i.v.). O FITC-BSA funciona como um marcador para extravasamento de proteína. Dez minutos após a injeção do composto de teste, o gânglio trigeminal esquerdo é estimulado electricamente durante 5 min a uma intensidade da corrente de 1,0 mA (5 Hz, pulso de 5 ms a cada 200 mseg) com um instrumento estimulador Grass modelo S48 com unidade de isolamento fotoeléctrico PSIU6 (Grass-Telefactor).

Alternativamente, a ratos que jejuaram de um dia para o outro administra-se oralmente o composto de teste através de sonda gástrica num volume de 2 mL/kg. Cerca de 50 min após a administração, os animais são anestesiados e colocados na estrutura estereotáxica como descrito acima. Administra-se aos animais FITC-BSA (20 mg/kg, i.v.) aos 58 min pós-administração p.o. Sessenta minutos após a administração do composto, os animais são estimulados electricamente como descrito acima.

Cinco minutos após a cessação da estimulação, os animais são sacrificados por exsanguinação com 40 mL de

soro fisiológico. O topo do crânio é retirado e amostras de membrana durais são removidas de ambos os hemisférios, lavadas com água e dispostas planas em lâminas de microscópio. Uma vez secos, os tecidos são cobertos com lamelas com uma solução de glicerol a 70%/água.

A quantidade de FITC-BSA para cada amostra é quantificada com um microscópio de fluorescência (Zeiss) equipado com um monocromador de rede, um espectrofotómetro, e um patamar activado por computador. As medições de fluorescência são tomados em 25 pontos de uma rede de 5x5 em passos de 500  $\mu\text{m}$  em cada amostra dural com um comprimento de onda de excitação de aproximadamente 490 nm e intensidade de emissão medida a cerca de 535 nm. São determinadas a média e o desvio padrão das 25 medições.

O extravasamento induzido pela estimulação eléctrica do gânglio trigeminal é um efeito ipsilateral (i.e. ocorre apenas no lado da dura-mater em que o gânglio trigeminal foi estimulado). Isto permite a utilização da outra metade (não estimulada) da dura-máter outro como um controlo. Calcula-se a razão da quantidade de extravasamento na dura do lado estimulado sobre a quantidade de extravasamento no lado não estimulado. Animais de controlo a quem apenas foi administrado soro fisiológico dão numa razão de aproximadamente 2,0. Em contraste, um composto que efectivamente impediu o extravasamento na dura-mater do lado estimulado daria uma razão de aproximadamente 1,0.

Os compostos preferidos são os que efectivamente impedem o extravasamento. O composto do Exemplo 1 é testado essencialmente como descrito e verifica-se ter uma ID<sub>100</sub> de 0,1 mg/kg, dando uma razão de cerca de 1,15.

Embora seja possível administrar compostos desta invenção directamente sem qualquer formulação, os compostos são normalmente administrados na forma de composições farmacêuticas compreendendo pelo menos um composto de Fórmula I, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, como ingrediente activo e pelo menos um veículo, diluente e / ou excipiente farmaceuticamente aceitável. Estas composições podem ser administradas por uma variedade de vias incluindo oral, sublingual, bucal, intranasal, transdérmica, subcutânea, intravenosa, intramuscular e pulmonar. Essas composições farmacêuticas e processos para a sua preparação são bem conhecidos na técnica. Ver, *e.g.*, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (University of the Sciences in Philadelphia, ed., 21<sup>st</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins Co., 2005).

As composições são preferencialmente formuladas numa forma de dosagem unitária, contendo cada dosagem de cerca de 0,1 a cerca de 200 mg, mais habitualmente cerca de 1,0 mg a cerca de 30 mg, do ingrediente activo. O termo "forma de dosagem unitária" refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para indivíduos seres humanos e outros mamíferos, contendo cada unidade uma quantidade predeterminada de material activo

calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com pelo menos um veículo, diluente e/ou excipiente adequado farmacologicamente aceitável.

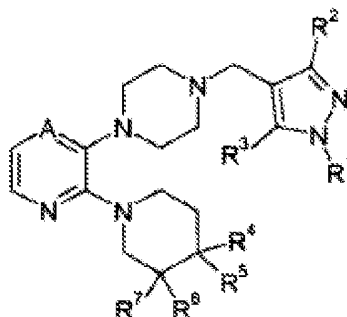
Os compostos são geralmente eficazes numa ampla gama de dosagem. Por exemplo, as dosagens por dia vão normalmente estar dentro da gama de cerca de 0,01 a cerca de 30 mg/kg, como por exemplo na gama de cerca de 0,1 a cerca de 15 mg/kg/dia, numa dose única ou dividida. No entanto, entender-se-á que a quantidade do composto realmente administrada vai ser determinada por um médico, à luz das circunstâncias relevantes, incluindo a patologia a ser tratada, a via de administração escolhida, o composto ou compostos reais administrados, a idade, o peso e a resposta do doente individual, e a gravidade dos sintomas do doente e, portanto, as gamas de dosagem acima referidas não pretendem limitar o âmbito da invenção por qualquer forma. Em alguns casos níveis de dosagem abaixo do limite inferior referido acima podem ser adequados, enquanto que noutros casos podem ser utilizadas doses ainda maiores.

O tipo de formulação utilizada para a administração dos compostos da presente invenção pode ser ditada pelo composto específico utilizado, o tipo de perfil farmacocinético desejado da via de administração seleccionada e o estado do doente.

Lisboa, 17 de Abril de 2012

## REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula:



em que:

A é -C(H)= ou -N=,

R<sup>1</sup> é um substituinte seleccionado do grupo que consiste em i) hidrogénio, ii) metilo, iii) etilo, iv) hidroximetilo, v) hidroxietilo, vi) fenilo opcionalmente substituído com 1 a 3 grupos flúor, vii) benzilo opcionalmente substituído com 1 a 3 grupos flúor e viii) piridilo;

R<sup>2</sup> é hidrogénio, metilo ou etilo;

R<sup>3</sup> é hidrogénio, metilo ou cloro;

R<sup>4</sup> é seleccionado do grupo que consiste em i) hidrogénio, ii) flúor, iii) metilo, iv) hidroxilo, v) hidroximetilo, vi) hidroxietilo, vii) metoximetilo, viii) cianometilo e ix) metilsulfonilaminometilo;

R<sup>5</sup> é hidrogénio;

R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> são iguais e são seleccionados conjuntamente do grupo que consiste em hidrogénio, metilo e flúor, desde que quando R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> não são hidrogénio, R<sup>4</sup> e R<sup>5</sup> são ambos hidrogénio;

ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que R<sup>1</sup> é metilo, etilo ou fenilo opcionalmente substituído com 1 a 2 grupos flúor.

3. Composto de acordo com a reivindicação 2, em que R<sup>4</sup> é hidroxilo, hidroximetilo ou metoximetilo.

4. Composto de acordo com a reivindicação 1 que é 3'-[4-(1-etil-5-metil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-piperazin-1-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']bipiridin-4-ol ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

5. Composto que é cloridrato de 3'-(4,4-difluoro-piperidin-1-il)-4-(1,5-dimetil-1*H*-pirazol-4-ilmetil)-3,4,5,6-tetra-hidro-2*H*-[1,2']bipirazinilo.

6. Composição farmacêutica compreendendo um composto de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5 como um ingrediente activo em associação com um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

7. Composto de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5 para utilização em terapêutica.

8. Composto de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5 para utilização no tratamento da enxaqueca em seres humanos.

9. Composto de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5 para utilização no tratamento profilático da enxaqueca em seres humanos.

10. Utilização de um composto de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5 no fabrico de um medicamento para utilização no tratamento da enxaqueca.

11. Utilização de um composto de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5 para utilização no fabrico de um medicamento para o tratamento profilático da enxaqueca.

Lisboa, 17 de Abril de 2012

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.*

**Documentos de patentes citadas na Descrição**

- WO 2004067703 A

**Literatura que não é de patentes citada na Descrição**

- LEOPOLDO, M. Serotonin(7) receptors (5-HT(7)Rs) and their ligands. *Curr. Med. Chem.*, 2004, vol. 11, 629-661
- T. W. GREENE ; P. G. M. WUTS. Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley and Sons, 1999
- P. STAHL et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use. VCHA/Wiley-VCH, 2002
- BERGE, S.M ; BIGHLEY, L.D. ; MONKHOUSE, D.C. *J. Pharm. Sci.*, 1977, vol. 66, 1
- JOHN P. WOLFE ; STEPHEN L. BUCHWALD. *Organic Syntheses, Coll.*, 2004, vol. 10, 423
- ORGANIC SYNTHESSES, COLL., 2002, vol. 78, 23
- GREENE ; WUTS. Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley and Sons Inc, 1999
- RICHARD C. LAROCK. Comprehensive Organic Transformations. Wiley and Sons Inc, 1999, 835-846
- BRADFORD. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, 248-254
- KAHL et al. *J. Biomol. Screen*, 1997, vol. 2, 33-40
- *Biochem. Pharmacol.*, 1973, vol. 22, 3099-3108
- RUAT et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 1993, vol. 90, 8547-8551
- JOHNSON, K.W. et al. *Neuroreport*, 1997, vol. 8, 2237-2240
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Lippincott Williams & Wilkins Co, 2005