

(11) Número de Publicação: **PT 2694518 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C07D 495/04** (2015.01) **A61K 31/495** (2015.01)  
**A61P 9/00** (2015.01)

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

(22) Data de pedido: <b>2012.03.29</b>	(73) Titular(es): <b>XENTION LIMITED</b> <b>ICONIX PARK LONDON ROAD</b> <b>PAMPISFORDCAMBRIDGECAMBRIDGESHIRE</b> <b>CB22 3EG</b> <b>GB</b>
(30) Prioridade(s): <b>2011.04.01 GB 201105659</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2014.02.12</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2015.10.07</b> <b>025/2016</b>	(72) Inventor(es): <b>DEREK EDWARD JOHN</b> <b>JOHN FORD</b> <b>GB</b> <b>GB</b>
	(74) Mandatário: <b>NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO</b> <b>RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DE TIENO [2,3-D]PIRIMIDINA E O SEU USO PARA TRATAR ARRITMIA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO RELACIONA-SE COM COMPOSTOS TIENOPIRIMIDINA OS QUAIS SÃO INIBIDORES DOS CANAIS DE POTÁSSIO. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO OS COMPOSTOS E O SEU USO NO TRATAMENTO DE ARRITMIA SÃO TAMBÉM DESCRITOS.

## **RESUMO**

### **"DERIVADOS DE TIENO [2,3-D]PIRIMIDINA E O SEU USO PARA TRATAR ARRITMIA"**

A presente invenção relaciona-se com compostos tienopirimidina os quais são inibidores dos canais de potássio. Composições farmacêuticas compreendendo os compostos e o seu uso no tratamento de arritmia são também descritos.

## **DESCRIÇÃO**

### **"DERIVADOS DE TIENO [2,3-D]PIRIMIDINA E O SEU USO PARA TRATAR ARRITMIA"**

#### **ÂMBITO TÉCNICO**

A presente invenção relaciona-se com compostos tienopirimidina os quais são inibidores dos canais de potássio. Composições farmacêuticas compreendendo os compostos e o seu uso no tratamento de arritmia são também fornecidos.

#### **ANTECEDENTES DA TÉCNICA**

Canais iônicos são proteínas que se estendem na bicamada lipídica da membrana celular e fornecem uma via aquosa através da qual iões específicos tais como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  e  $\text{Cl}^-$  podem passar (Herbert, 1998). Os canais de potássio representam o maior e mais diverso subgrupo de canais iônicos e desempenham um papel central na regulação do potencial de membrana e controlo da excitabilidade celular (Armstrong & Hille, 1998). Os canais de potássio foram categorizados em famílias genéticas com base nas suas sequências de aminoácidos e nas suas propriedades biofísicas (para nomenclatura ver Gutman *et al.*, 2003).

Compostos que modulam os canais de potássio têm múltiplas aplicações terapêuticas em várias áreas de doenças, incluindo as áreas cardiovascular, neuronal, da audição, renal, metabólica e proliferação celular (Shieh *et al.*, 2000; Ford *et al.*, 2002). Mais especificamente, os canais de potássio tais como Kv4.3, Kir2.1, hERG, KCNQ1/minK, e Kv1.5 estão envolvidos na fase de repolarização do potencial de ação em miócitos cardíacos. Estes subtipos de canais de potássio foram associados a doenças e distúrbios

cardiovasculares incluindo síndrome de QT longo, hipertrofia, fibrilação ventricular, e fibrilação atrial, em que todas podem causar insuficiência cardíaca e serem fatais (Marban, 2002).

A subunidade humana do canal de potássio dependente de voltagem de retificação tardia, Kv1.5, é exclusivamente expressa em miócitos atriais e acredita-se que oferece oportunidades terapêuticas para a gestão da fibrilação atrial por várias razões diferentes (ver a revisão de Brendel e Peukert, 2002): (i) Há evidência de que Kv1.5 está subjacente à corrente fisiológica de retificação tardia cardíaca ultrarrápida ( $Kv_{(ur)}$ ) em humanos devido a propriedades biofísicas e farmacológicas semelhantes (Wang *et al.*, 1993; e Fedida *et al.*, 1993). Isto foi suportado com oligonucleótidos antissentido para Kv1.5 os quais foi demonstrado que reduzem a amplitude de  $Kv_{(ur)}$  em miócitos atriais humanos (Feng *et al.*, 1997). (ii) registros eletrofisiológicos demonstraram que  $Kv_{(ur)}$  é expressado seletivamente em miócitos atriais, e portanto evita a indução de arritmia ventricular potencialmente fatal através de interferência com a repolarização ventricular (Amos *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; e Nattel, 2002). (iii) A inibição de  $Kv_{(ur)}$  em miócitos atriais humanos de tipo fibrilação atrial prolongou a duração do potencial de ação comparado com miócitos atriais humanos normais saudáveis (Courtemanche *et al.*, 1999). (iv) O prolongamento da duração do potencial de ação por inibição seletiva de Kv1.5 pode apresentar intervenções farmacológicas mais seguras para proteger contra arritmias atriais reentrantes tal como fibrilação atrial e *flutter* atrial comparado com antiarrítmicos de classe III tradicionais, através do prolongamento do período refratário atrial enquanto deixa a refração ventricular inalterada (Nattel *et al.*, 1999,

Knobloch et al., 2002; e Wirth et al., 2003). Antiarrítmicos de classe III foram largamente descritos como um método preferido para tratar arritmias cardíacas (Colatsky et al., 1990).

Bloqueadores dos canais de potássio antiarrítmicos de classe III tradicionais e novos foram descritos como tendo um mecanismo de ação por modularem diretamente Kv1.5 ou Kv<sub>(ur)</sub>. Os conhecidos antiarrítmicos de classe III ambasilida (Feng et al., 1997), quinidina (Wang et al., 1995), clofílio (Malayev et al., 1995) e bertosamil (Godreau et al., 2002) foram todos descritos como bloqueadores dos canais de potássio de Kv<sub>(ur)</sub> em miócitos atriais humanos. O novo derivado de benzopirano, NIP-142, bloqueia os canais de Kv1.5, prolonga o período refratário atrial e pára a fibrilação e *flutter* atrial em modelos caninos *in vivo* (Matsuda et al., 2001), e S9947 inibiu Kv1.5 estavelmente expresso em oócitos de *Xenopus* e células de ovário de hamster Chinês (CHO) e Kv<sub>(ur)</sub> em miócitos cardíacos nativos de ratazana e humanos (Bachmann et al., 2001). Noutros sítios, outros moduladores novos dos canais de potássio cujo alvo é Kv1.5 ou Kv<sub>(ur)</sub> foram descritos para o tratamento de arritmias cardíacas, e estes incluem bifenilos (Peukert et al 2003), amidas do ácido tiofeno carboxílico (W00248131), derivados de bisarilo (W00244137, W00246162), derivados de carbonamida (W00100573, W00125189) amidas do ácido antranílico (W92002100825, W002088073, W002087568), dihidropirimidinas (W00140231), derivados de cicloalquilo (W003063797), derivados de indano (W00146155 W09804521), derivados de benzocicloheptano tetralina (W09937607), derivados de tiazolindona e metatiazanona (W09962891), derivados de benzamida (W00025774), derivados de isoquinolina (W00224655), derivados de piridazinonas (W09818475 W09818476), derivados de cromano (W09804542),

derivados de benzopirano (W00121610, W003000675, W00121609, W00125224, W002064581), derivados de benzoxazina (W00012492), e o novo composto A1998 purificado a partir de material Ocean (Xu & Xu, 2000). Inibidores dos canais de potássio dependentes da voltagem gerais foram relatados os quais podem também modular Kv1.5 (US05753676, US05821251, EP0743936B).

Tienopirimidinas foram descritas como sendo úteis como agentes anti-inflamatórios, antifúngicos, antiosteoporose e antimicrobianos, e como agentes cardiovasculares (atuando através da modulação do grupo fosfodiesterase das enzimas ou através da modulação do sistema de troca sódio/protão) entre outros.

Tieno[2,3-*d*]-pirimidinas substituídas na posição 4 com uma porção benzilamina ou fenetilamina opcionalmente substituídas e na posição 5 com um grupo metilo podem servir como agentes anti-inflamatórios ou antiosteoporose (Katada *et al.*, 1999). Esses compostos demonstraram que modulam a atividade de muitos tipos de células incluindo leucócitos, que são originários de células precursoras hematopoiéticas na medula óssea. A atividade aumentada nos leucócitos pode conduzir a várias doenças inflamatórias; portanto compostos citotóxicos para leucócitos podem funcionar como fármacos anti-inflamatórios. Pensa-se que esses compostos suprimem a atividade celular por se ligarem a integrinas à superfície dos leucócitos e previnem eventos de sinalização celular a jusante. Tieno[2,3-*d*]pirimidinas substituídas na posição 4 com grupos heteroariltiois, ariltiois, arilmetil tiois, heteroarilaminas, benzilamina, hidroxilo e cloro podem também ser agentes anti-inflamatórios úteis (Stewart *et al.*, 2001). Esta série de compostos demonstrou inibir a expressão induzida das

moléculas de adesão celular na superfície luminal do endotélio vascular prevenindo assim a adesão de leucócitos no sítio da inflamação.

Tieno[2,3-*d*]pirimidinas com uma hidrazina substituída na posição 4 e um grupo fenilo na posição 5 (Hozien *et al.*, 1996), tetrahidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]pirimidinas (Ismail *et al.*, 1995), tieno[2,3-*d*]pirimidinas as quais têm um grupo hidrogénio, cloro, hidrazina, heterociclilo, amino, metilo, etilo ou fenilo na posição 2, um substituinte alquilamino, alquilarilamino, amino, dialquilamino ou hidrazina na posição 4, um grupo hidrogénio ou metilo na posição 5, um grupo hidrogénio, metil acetamida ou fenilo na posição 6 ou um tetrametileno na posição 5,6 (GB7549025), e a série líder de 5-fenil- e 5,6-tetrametilenotieno[2,3-*d*]pirimidinas com metilo ou fenilo na posição 2 e alquilamino ou arilamino na posição 4 (Konno *et al.*, 1989) todos demonstraram ter atividade antimicrobiana. Tetrahidrobenzotieno[2,3-*d*]pirimidina com a porção 2-oxo-3-pirrolidinilmetileno-hidrazina na 4 posição demonstrou ter alguma atividade herbicida contra *Abutilon theophrasti* (Ram *et al.*, 1981). Foi também descrito que 4-clorotetrahidrobenzotieno[2,3-*d*]pirimidina é herbicida, tetrahidrobenzotieno-[2,3-*d*]pirimidinas com um substituinte tiol, hidrazina, 2-fluoroanilino, 3-fluoroanilino ou 4-dietilanilino na posição 4 são bactericidas contra *Streptococcus fecales* e tetrahidrobenzotieno[2,3-*d*]pirimidinas com um substituinte 2,4-diclorobenzilamino ou 2-fluoroanilina na posição 4 são fungicidas contra *Pythium* (Ram, 1979). Tieno[2,3-*d*]pirimidinas com um grupo hidrogénio, hidroxilo, tiol, halogénio ou ciano na posição 2, grupos alquilamino, arilalquilamino ou hidroxialquilamino na posição 4, um hidrogénio, alquilo ou halogénio na

posição 5 e/ou 6 ou alquilenos na posição 5,6 foram descritas como agentes de controlo de carraças (AU 521790).

Noutros sítios, tetrahydrobenzo[b]tieno[2,3-d]pirimidinas apresentaram atividade antitumoral (Shehata *et al.*, 1996) e metade da atividade analgésica da aspirina (Moneer *et al.*; 1994), uma série de tieno[2,3-d]pirimidinas com 4-alquilamino ou arilamino, 5-H ou 5-metilo, 6-metilo ou 5,6-tetrametilenos demonstraram ter potencial como anticitoquinas (Jordis *et al.*, 1986), uma série de 5,6-dimetil-tieno[2,3-d]pirimidinas e 5,6-tetrametilenotieno[2,3-d]pirimidinas, ambas substituídas na posição 2 com arilaminas ou aminas heterocíclicas e na posição 4 com arilaminas apresentaram propriedades inibidoras da agregação de plaquetas sanguíneas (DD 226893), pirano- e tiopirano[3,4-b]tieno[5,4-d]pirimidinas com a posição 4 substituída com amino, butilamina, anilina, ciclohexilamina, benzilamina, fenetilamina e 2-hidroxietilamina foram descritas como exibindo atividade anticonvulsiva (Noravanyan *et al.*, 1977), e 4-[(Benzo-2,1,3-tiadiazolil-4)amino]-5,6,7,8-tetrahydrobenzotieno-(2,3-d)-pirimidina foi descrita como possuindo atividade anti-helmíntica em equinococose alveolar larval (RU 2116309).

Tieno[2,3-d]pirimidinas com um grupo amina substituído na posição 4, substituição de hidrogénio, alquilo ou halo nas posições 5 e 6 e uma cadeia alquilo na posição 2 são reivindicadas como sendo inibidores da fosfodiesterase V e úteis no tratamento de doenças cardiovasculares e para distúrbios na potência (DE 10104802)

Noutros sítios, 5-alquil tieno[2,3-d]pirimidinas com um substituinte piperazinilo na posição 4 verificou-se serem inibidoras da troca de sódio/protão e úteis no tratamento



de vários distúrbios cardiovasculares, incluindo angina de peito e arritmia (WO 01/27107).

4-[(fenil)amino]-tieno[2,3-d]pirimidinas carregando um substituinte 5-tiofenilo e um substituinte 2-metilo verificou-se terem atividade moluscicida (Hosni *et al*, Acta Poloniae Pharmaceutica, 1999, 56(1), 49-56).

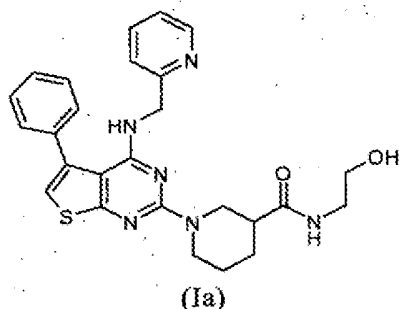
Recentemente as tienopirimidinas foram também descritas como potentes inibidores de VEGFR (Munchhof, 2004).

Muitas publicações divulgam compostos que são indicados como atuadores nos canais de potássio. Portanto, a US6531495 divulga 2-aminometilbifenil-2-carboxamidas, a W02002/100825 divulga amidas do ácido antranílico como antiarrítmicos e a W02002/036556 divulga acilaminoalquilbenzenosulfonamidas como agentes cardiovasculares.

Compostos tienopirimidina que são úteis como inibidores dos canais de potássio, particularmente por inibirem os canais de potássio Kv1.5 ou Kv<sub>(ur)</sub>, são descritos na WO 2004/111057.

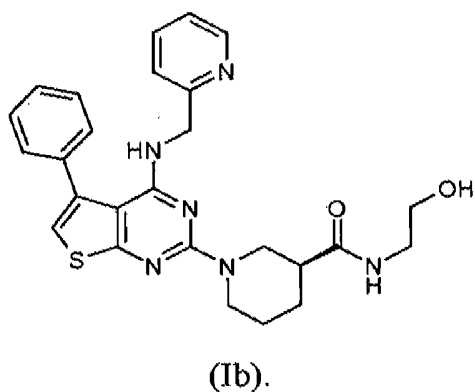
## **DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO**

Um primeiro aspecto da invenção fornece um composto de fórmula (Ia)

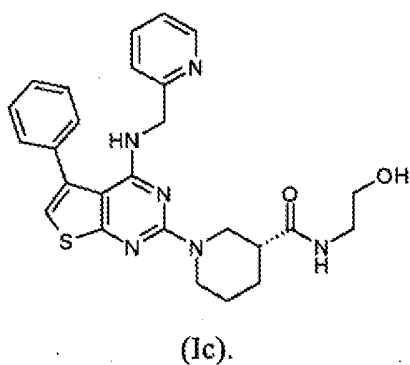


ou um seu sal ou éster farmacologicamente aceitável.

Numa forma de realização, o composto é de fórmula (Ib).



Noutra forma de realização, o composto é de fórmula (Ic).



Noutra forma de realização, o composto de fórmula (Ia) compreende uma mistura dos compostos das fórmulas (Ib) e (Ic). Numa forma de realização adicional, o composto de fórmula (Ia) compreende uma mistura racémica dos compostos das fórmulas (Ib) e (Ic). Numa forma de realização alternativa adicional, o composto de fórmula (Ia) compreende um excesso enantiomérico do composto de fórmula (Ib) ou um excesso enantiomérico do composto de fórmula (Ic).

Um segundo aspecto da invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um dos compostos acima e, opcionalmente, um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

Os compostos e composições da invenção são inibidores dos canais de potássio que são particularmente úteis para inibir os canais de potássio Kv1.5 ou Kv<sub>(ur)</sub> para o tratamento de arritmia cardíaca nos átrios tais como fibrilação atrial. Esta invenção não está limitada a tratar arritmias cardíacas, os compostos são também úteis para tratar doenças que requerem a inibição dos canais de potássio (por exemplo, Shieh *et al.*, 2000; Ford *et al.*, 2002).

Um terceiro aspecto da invenção fornece portanto um composto ou composição da invenção para uso na inibição dos canais de potássio. Além disso, este aspecto da invenção fornece ainda o uso de um composto da invenção para o fabrico de um medicamento para uso na inibição de canais de potássio. Conforme aqui usado, "uso na inibição dos canais de potássio" inclui usos para tratar ou prevenir um distúrbio que responde à inibição da função dos canais de potássio. Este distúrbio pode ser arritmia.

Os compostos da invenção têm propriedade mais vantajosas do que os da técnica anterior, em particular em termos de potência e/ou seletividade.

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

### *Mistura racémica*

Uma "mistura racémica" contém quantidades aproximadamente iguais dos compostos de fórmula (Ib) e fórmula (Ic). Por

outra palavras, um composto ou composição compreendendo uma "mistura racémica" dos compostos de fórmula (Ib) e de fórmula (Ic) contém uma mistura de aproximadamente 1:1, ou 50:50 dos compostos.

#### *Excesso enantiomérico*

Um composto ou composição compreendendo um "excesso enantiomérico" do composto de fórmula (Ib) ou do composto de fórmula (Ic) compreende mais desse enantiómero do que do outro (também conhecido como uma mistura escalémica).

O excesso enantiomérico é o excesso de um composto em relação a outro, expresso como percentagem da totalidade. Por exemplo, uma mistura 98:2 do composto de fórmula (Ib) em relação ao composto de fórmula (Ic) tem um excesso enantiomérico de 96 % do composto de fórmula (Ib). Assim, os compostos e composições da invenção podem compreender um excesso enantiomérico do composto de fórmula (Ib) de pelo menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou até 100 % (isto é, enantiomericamente puro, até ao limite de deteção de pureza). Alternativamente, os compostos e composições da invenção podem compreender um excesso enantiomérico do composto de fórmula (Ic) de pelo menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou até 100 %.

#### *Nomenclatura R e S*

Conforme aqui usado, o termo isómero "R" ou "S" refere-se aos dois enantiómeros possíveis de acordo com o Sistema Cahn-Ingold-Prelog adotado por International Union of Pure and Applied-Chemistry (IUPAC). Assim, o composto de fórmula

(Ib) é o "isómero S" e o composto de fórmula (Ic) é o "isómero R".

*Um seu sal ou éster farmacêuticamente aceitável*

O termo "éster farmacêuticamente aceitável" inclui compostos da invenção nos quais o átomo de hidrogénio do grupo álcool pode ser substituído para formar um éster (por exemplo, o átomo de hidrogénio pode ser substituído por C(O)C<sub>1-6</sub>alquilo).

O termo "sal farmacêuticamente aceitável" inclui um sal preparado a partir de ácidos ou bases não tóxicos farmacêuticamente aceitáveis incluindo ácidos ou bases inorgânicos ou orgânicos.

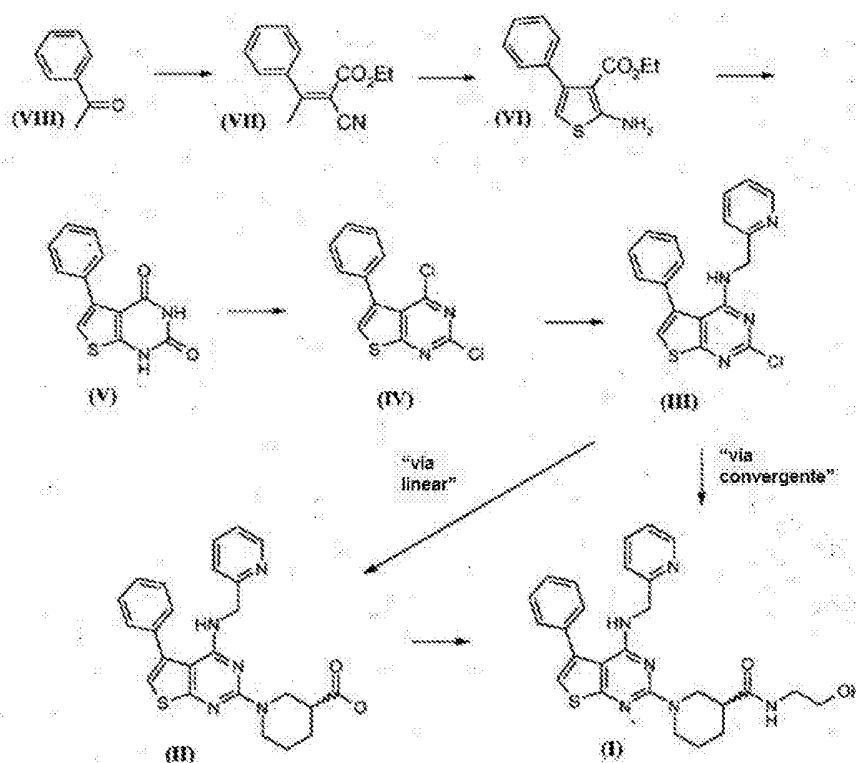
Sais de adição de ácido farmacêuticamente aceitáveis dos compostos da invenção incluem, mas não se limitam, aos ácidos inorgânicos tais como ácidos hidrohâlicos (por exemplo, ácido clorídrico, brômico e iódico), ácido sulfúrico, ácido nítrico, e ácidos fosfóricos. Além disso, sais de adição de ácido farmacêuticamente aceitáveis dos compostos da invenção incluem, mas não se limitam, aos ácidos orgânicos tais como as classes de ácidos orgânicos alifático, aromático, carboxílico e sulfónico, exemplos dos quais incluem: ácidos monocarboxílicos alifáticos tais como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico ou ácido butírico; ácidos hidroxil alifáticos tais como ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartárico ou ácido málico; ácidos dicarboxílicos tais como ácido maleico ou ácido succínico; ácidos carboxílicos aromáticos tais como ácido benzoico, ácido p-clorobenzoico, ácido fenilacético, ácido difenilacético ou ácido trifenilacético; ácidos hidroxil aromáticos tais como ácido o-hidroxibenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido 1-hidroxinaftaleno-2-carboxílico ou ácido 3-hidroxinaftaleno-2-carboxílico; e ácidos sulfónicos

tais como ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico ou ácido benzenosulfónico. Outros sais de adição de ácido farmacêuticamente aceitáveis dos compostos da invenção incluem, mas não se limitam a, ácido glicólico, ácido glucorónico, ácido furoico; ácido glutâmico, ácido antranílico, ácido salicílico, ácido mandélico, ácido embónico (pamoico), ácido pantoténico, ácido esteárico, ácido sulfanílico, ácido algénico, e ácido galacturónico.

Sais básicos farmacêuticamente aceitáveis dos compostos da invenção incluem, mas não se limitam a, sais de metais tais como sais de metais alcalinos ou alcalino terrosos (por exemplo, sais de sódio, potássio, magnésio ou cálcio) e sais de zinco ou de alumínio. Além disso, sais básicos farmacêuticamente aceitáveis dos compostos da invenção incluem, mas não se limitam a, sais formados com amónia ou aminas orgânicas farmacêuticamente aceitáveis ou bases heterocíclicas tais como etanolaminas (por exemplo, dietanolamina), benzilaminas, N-metil-glucamina, aminoácidos (por exemplo, lisina) ou piridina.

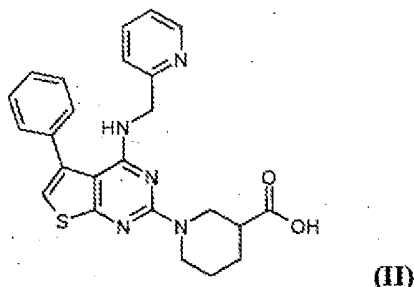
### *Síntese*

Os compostos de fórmula (I) podem ser preparados como racemato, como uma mistura escalémica, ou como um enantiómero quiralmente puro usando vias descritas no esquema 1 a seguir:

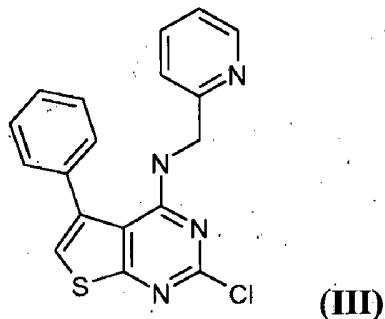


Isto inclui a preparação dos compostos de fórmula (I) usando a "via linear" análoga à via sintética descrita na W02004/111057 dos compostos de fórmula (II) e aminoetanol. Tipicamente, esta reação é realizada usando um reagente de acoplamento tal como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) ou 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato (HATU) utilizando métodos padrão familiares dos especialistas na técnica tal como reação em solvente tal como tetrahidrofurano, acetonitrilo ou dimetilformamida numa gama de temperaturas desde temperatura ambiente até à de refluxo. Alternativamente, os compostos de fórmula (I) podem ser preparados a partir de compostos de fórmula (III) por deslocamento do substituinte 2-cloro com um composto de fórmula (IX) na presença de uma base tal como N,N-diisopropiletilamina e um solvente tal como N-metil

pirrolidinona com aquecimento convencional ou radiação de micro-ondas.

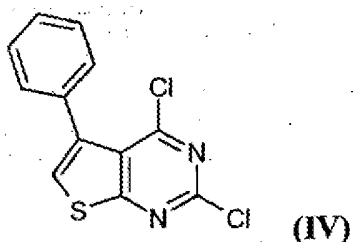


Os compostos de fórmula (II) podem ser preparados a partir de um composto de fórmula (III) por deslocamento do substituinte 2-cloro com ácido nipecótico disponível comercialmente, na presença de uma base tal como N,N-diisopropiletilamina e um solvente tal como N-metil pirrolidinona com aquecimento convencional ou radiação de micro-ondas.

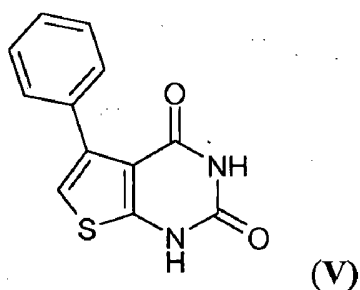


Os compostos de fórmula (III) são facilmente sintetizados a partir dos compostos de fórmula (IV) por uma reação de substituição nucleofílica com 2-aminometilpiridina, opcionalmente na presença de um solvente e uma base, e opcionalmente a temperatura elevada ou com radiação de micro-ondas. Preferencialmente, o solvente (se presente) é um álcool, preferencialmente etanol e a base é uma base de azoto impedida tal como trietilamina. A reação é realizada a temperaturas ambientes.

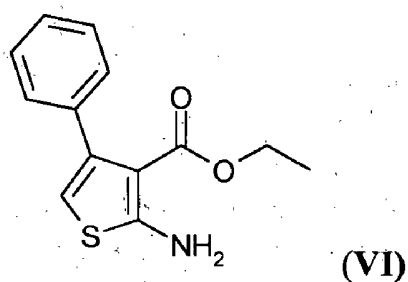




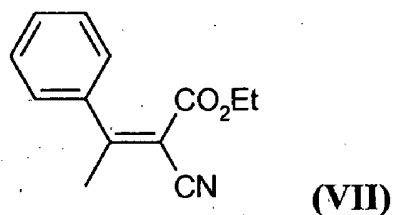
Um composto de fórmula (IV) pode ser sintetizado por reação de um composto de fórmula (V) com um reagente de cloração tal como dicloreto fenilfosfônico ou oxicloreto fosforoso.



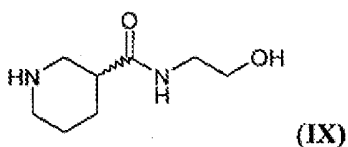
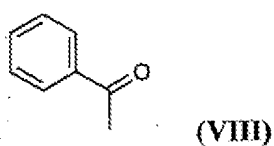
Os compostos de fórmula (V) podem ser sintetizados por reação de um composto de fórmula (VI) com um cianato de metal alcalino, preferencialmente cianato de potássio.



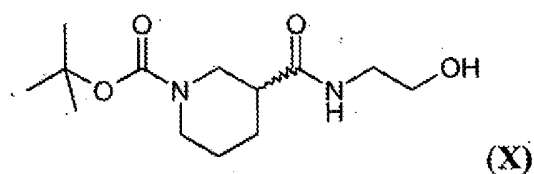
Um composto de fórmula (VI) pode ser preparado por "reação de Gewald" na qual um composto de fórmula (VII) é reagido sob condições básicas e num solvente adequado tal como etanol, com enxofre em pó. Preferencialmente, a base é diisopropiletilamina (base de Hünig) e o solvente pode ser um álcool, preferencialmente etanol, e a reação é realizada entre 25 e 65°C.



Os compostos de fórmula (VII) podem ser preparados por reação de condensação de Knoevenagel aquecendo o composto de fórmula (VIII) com etilcianoacetato ( $\text{NCCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ ) na presença de um ácido e acetato de amônio num solvente adequado tal como tolueno, opcionalmente com remoção de água azeotrópica. Preferencialmente, o ácido é ácido acético. Isto origina o éster ciano alquilideno como um par de isômeros geométricos (E e Z).

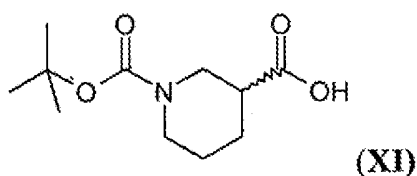


O composto de fórmula (IX) pode ser preparado a partir do composto de fórmula (X) por hidrólise do grupo protetor *t*-butil carbamato (BOC) com um ácido forte num solvente tal como diclorometano. Tipicamente, o ácido é ácido trifluoroacético.



O composto de fórmula (X) pode ser preparado a partir do composto de fórmula (XI) e aminoetanol. Tipicamente, esta reação é realizada usando um reagente de acoplamento tal

como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) ou 2-(7-aza-1H-benzotriazole-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato (HATU) utilizando métodos padrão familiares dos especialistas na técnica tal como reação num solvente tal como tetrahidrofurano, acetonitrilo ou dimetilformamida numa gama de temperaturas desde a temperatura ambiente até à de refluxo.



#### *Composições farmacêuticas*

Conforme aqui discutido, os compostos da invenção são úteis no tratamento de várias condições. Assim, o segundo aspeto da invenção fornece uma composição ou formulação farmacêutica compreendendo pelo menos um composto da invenção e opcionalmente um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

Excipientes típicos farmacêuticamente aceitáveis incluem:

- diluentes, por exemplo, lactose, dextrose, sacarose, manitol, sorbitol, celulose e/ou glicina;
- lubrificantes, por exemplo, sílica, talco, ácido esteárico, o seu sal de magnésio ou cálcio e/ou polietilenoglicol;
- ligantes, por exemplo, silicato de magnésio e alumínio, pasta de amido, gelatina, tragacanto, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio e/ou polivinilpirrolidona;
- desintegrantes, por exemplo, amidos, agar, ácido algínico ou o seu sal de sódio, ou misturas efervescentes; e/ou
- absorventes, corantes, e/ou adoçantes.

As composições da invenção podem ser apresentadas em formas de doses unitárias contendo uma quantidade pré-determinada de cada componente ativo por dose. Essa unidade pode ser adaptada para fornecer 5-100mg/dia do composto, preferencialmente 5-15mg/dia, 10-30mg/dia, 25-50mg/dia 40-80mg/dia ou 60-100mg/dia. Para compostos da invenção, doses na gama de 100-1000mg/dia são fornecidas, preferencialmente 100-400mg/dia, 300-600mg/dia ou 500-1000mg/dia. Essas doses podem ser fornecidas numa dose única ou como várias doses discretas. A dose final vai depender da condição a ser tratada, da via de administração e idade, peso e condição do paciente e vai ser à descrição do médico.

As composições da invenção podem ser adaptadas para administração por qualquer via apropriada, por exemplo por via oral (incluindo bucal ou sublingual), retal, nasal, tópica (incluindo bucal, sublingual ou transdérmica), vaginal ou parentérica (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa ou intradérmica). Essas formulações podem ser preparadas por qualquer método conhecido na técnica de farmácia, por exemplo associando o componente ativo com o(s) transportador(es) ou excipiente(s).

As formulações farmacêuticas adaptadas para administração oral podem se apresentadas como unidades discretas tais como cápsulas ou comprimidos; pós ou grânulos; soluções ou suspensões em líquidos aquosos ou não aquosos; espumas ou cremes batidos comestíveis; ou emulsões líquidas óleo-em-água ou emulsões líquidas água-em-óleo.

As formulações farmacêuticas adaptadas para administração transdérmica podem ser apresentadas como emplastos discretos com a intenção de permanecerem em contacto íntimo com a epiderme do recetor durante um período de

tempo prolongado. Por exemplo, o componente ativo pode ser aplicado a partir do emplastro por iontoforese como geralmente descrito em *Pharmaceutical Research*, 3(6), 318 (1986).

As formulações farmacêuticas adaptadas para administração tópica podem ser formuladas como pomadas, cremes, suspensões, loções, pós, soluções, pastas, géis, *sprays*, aerossóis ou óleos.

Para aplicações no olho ou outros tecidos externos, por exemplo boca ou pele, as formulações são preferencialmente aplicadas como uma pomada tópica ou creme. Quando formulados numa pomada, o componente ativo pode ser empregue numa base de pomada parafínica ou miscível em água. Alternativamente, o componente ativo pode ser formulado num creme com uma base de creme óleo-em-água ou uma base água-em-óleo.

As formulações farmacêuticas adaptadas para administração tópica no olho incluem gota para os olhos em que o componente ativo é dissolvido ou suspenso num transportador adequado, especialmente um solvente aquoso.

As formulações farmacêuticas adaptadas para administração tópica na boca incluem losangos, pastilhas e elixires.

As formulações farmacêuticas adaptadas para administração retal pode ser apresentadas como supositórios ou enemas.

As formulações farmacêuticas adaptadas para administração nasal em que o transportador é um sólido incluem um pó grosseiro com um tamanho de partícula por exemplo na gama de 20 até 500 microns que é administrado de modo a que se faça a inalação, isto é, por inalação rápida através da

passagem nasal a partir de um recipiente com o pó mantido perto do nariz. Formulações adequadas em que o transportador é um líquido, para administração como um *spray* nasal ou como gotas nasais, incluem soluções aquosas ou em óleo do componente ativo.

As formulações farmacêuticas adaptadas para administração por inalação incluem pós de partículas finas ou névoas que podem ser geradas por meio de vários tipos de aerossóis de dose calibrada pressurizados, nebulizadores ou insufladores.

As formulações farmacêuticas adaptadas para administração vaginal podem ser apresentadas como pessários, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou formulações em *spray*.

As formulações farmacêuticas adaptadas para administração parentérica incluem soluções de injeção estéreis aquosas e não-aquosas que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostáticos e solutos que tornam a formulação isotónica com o sangue do recetor pretendido; e suspensões estéreis aquosas e não-aquosas que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. As formulações podem ser apresentadas em recipientes de doses unitárias ou multidoses, por exemplo ampolas seladas e frascos, e podem ser armazenadas em condições de secagem por congelação (liofilizadas) exigindo apenas a adição do transportador líquido estéril, por exemplo água para injeções, imediatamente antes do uso. As soluções e suspensões para injeção extemporânea podem ser preparadas a partir de pós estéreis, grânulos e comprimidos.

Formulações de dosagem unitária preferidas são as que contêm uma dose diária ou subdose, como aqui mencionado

acima, ou uma sua fração apropriada, de um componente ativo.

Deve ser entendido que para além dos componentes particularmente mencionados acima, as formulações podem também incluir outros agentes convencionais na técnica tendo em consideração o tipo de formulação em questão, por exemplo as adequadas para administração oral podem incluir agentes aromatizantes.

### **MODOS PARA REALIZAR A INVENÇÃO**

Os seguintes protocolos descrevem a preparação de:-

1. racemato feito usando a "via convergente" (Exemplos 1 até 6)
2. enantiómeros feitos usando a "via convergente" (Exemplos 1 até 5 e 7 até 12)
3. enantiómeros feitos usando a "via linear" (Exemplos 1 até 5 e 13 até 16)

#### *Síntese e determinação dos enantiómeros*

O composto enantiomericamente puro desejado foi obtido pela seleção cuidadosa dos reagentes e o uso de condições experimentais apropriadas e sequência em particular no que respeita aos passos de formação do centro quiral e reação subsequente. Foi determinado durante o curso da síntese que a "via linear" era menos propensa a racemização uma vez que a ligação de formação da amida final pode ser realizada a temperatura mais baixa ao contrário da "via convergente" que forneceu melhores rendimentos mas com racemização detetável.

Para a "via linear", enantiómeros puros do ácido nipecótico foram obtidos por resolução clássica do ácido nipecótico racémico barato disponível comercialmente usando ácido 1-(S)-cânfora sulfônico como o agente de resolução, determinando a análise ee após formar um derivado BOC de uma amostra.

A pureza enantiomérica foi determinada por HPLC Quiral.

#### *Métodos analíticos*

Espetros de ressonância magnética protónica ( $^1\text{H}$  NMR) foram registados num espectrómetro Varian 400MHz Mercury Plus. Todos os espetros foram determinado em dmso- $d_6$  a menos que indicado de outro modo e as alterações químicas foram registadas em unidades (sigma) a jusante do tetrametilsilano padrão interno (TMS) e as constantes de acoplamento interprotões são registadas Hertz (Hz), os padrões de divisão são designados como se segue: s, singlete; d, duplete; t, tripleto; q, quadruplete; m, múltiplo; br, pico amplo; dd, duplete de duplete; dt, duplete de tripleto; bs, singlete amplo; dq, duplete de quarteto.

Os espetros de IR foram determinados num instrumento Perkin Elmer Spectrum One.

Os espetros de massa foram determinados num instrumento Agilent 6310 Ion trap.

A análise de HPLC (método (a)) foi realizada num sistema Waters 2695 usando coluna ZORBAX SB C-18 (4,6 x 50mm);

Fase móvel: A: 0,05% TFA (AQ,) B: 0,05% TFA (MeCN); T%B: 0/20; 5/90; 8/90, 8,1/20; taxa de fluxo 1,0mL/min;



Coluna quiral: Chiralpak IC (4,6X250mm)5u, fase móvel: A: Hexano, B: EtOH (70:30); taxa de fluxo 0,8mL/min durante 40 minutos.

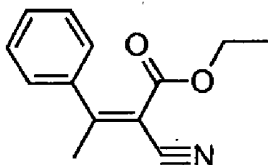
Os pontos de fusão foram determinados num instrumento EX-Melt (Modelo: MPA120).

Alternativamente, a análise de HPLC (método (b)) foi realizada com: sistema de tratamento de fluido Waters 616, detetor de arranjo fotodiodo Waters 996.

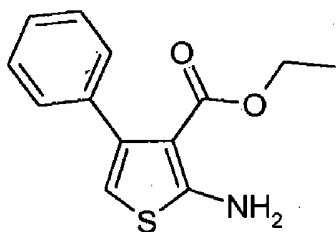
Coluna quiral: Daicel Chiralpak AD-H (Chiral technologies) que regista a pureza quiral a 244nm; fase móvel 80% Hexanos:20%EtOH; taxa de fluxo 0,8mL/min; temp 40 °C.

Os espetros de massa foram determinados num instrumento de série Agilent 1100 (Modelo: G1946C).

Usando a informação aqui descrita os seguintes compostos podem ser sintetizados os quais são dados apenas como exemplo. O perfil farmacológico dos compostos da presente invenção pode ser facilmente avaliado pelos especialistas na técnica usando experimentação de rotina, tal como procedimentos e técnicas aqui ilustradas e descritas em pormenor em Ford *et al.*, 2002.

Exemplo 1**Éster etílico do ácido (Z)-2-ciano-3-fenil-but-2-enoico (VII)**

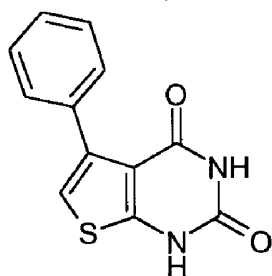
Uma mistura agitada de acetofenona (VIII) (180g, 1,5mol), etil cianoacetato (170g, 1,3mol), acetato de amônio (23,1g), ácido acético (72g) e tolueno (300mL) foi aquecida sob refluxo durante 18 horas enquanto a água foi removida da reação por destilação azeotrópica. A mistura foi deixada arrefecer até à temperatura ambiente, tolueno (100mL) foi adicionado, depois a mistura foi lavada com água (3 x 100mL). As lavagens aquosas combinadas foram agitadas com tolueno (50mL), depois as soluções de tolueno combinadas foram secas em sulfato de magnésio, filtradas e o solvente foi removido em vácuo. O óleo residual foi destilado sob pressão reduzida para originar éster etílico do ácido 2-ciano-3-fenil-but-2-enoico como um óleo (309g) que foi usado sem purificação adicional.

Exemplo 2**Éster etílico do ácido 2-amino-4-fenil-tiofeno-3-carboxílico (VI)**

Éster etílico do ácido 2-ciano-3-fenil-but-2-enoico (513,25g, 2,3mol) foi adicionado à temperatura ambiente até uma suspensão agitada vigorosamente de enxofre em pó (76g, 2,3mol) em etanol (500mL). Dietilamina (200mL) foi adicionada em porções ao longo de 20 minutos, tempo durante o qual a temperatura da reação subiu para 62°C. A mistura foi deixada arrefecer até 36°C, depois foi aquecida até 50°C e agitação a essa temperatura foi continuada durante 1 hora. Depois deste tempo, a agitação foi descontinuada, a solução quente foi removida por decantação de enxofre não reagido, depois foi deixada arrefecer até à temperatura ambiente. O sólido resultante foi recolhido por filtração, lavado com um pouco de etanol frio e seco em vácuo para originar éster etílico do ácido 2-amino-4-feniltiofeno-3-carboxílico como um sólido cor-de-laranja (195g) o qual foi usado sem purificação adicional.

### Exemplo 3

#### **5-Fenil-1H-tieno[2,3-d]pirimidina-2,4-diona (V)**

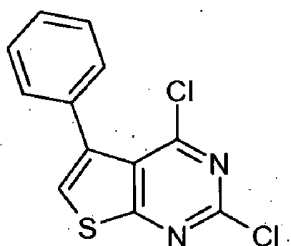


Éster etílico do ácido 2-amino-4-fenil-tiofeno-3-carboxílico (2,0g, 8,1mmol), e Cianato de Potássio (Aldrich, 2,0g, 24,3mmol) foram adicionados a ácido acético glacial (VWR, 20mL) e agitados à temperatura ambiente durante 18h. A reação foi diluída com água (50mL) e o precipitado resultante filtrado, lavado com água e seco até um bolo húmido. O sólido foi suspenso em água (100mL) e tornado alcalino até pH 12-14 por adição de

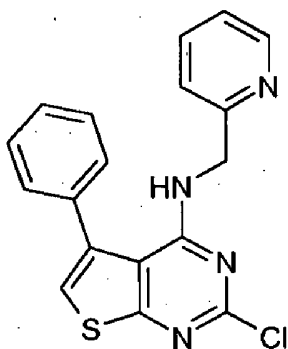
hidróxido de sódio concentrado. A suspensão resultante foi aquecida a 100°C durante 2h com agitação, depois arrefecida até à temperatura ambiente e acidificada por adição de ácido acético glacial. O sólido resultante foi recolhido por filtração, lavado com água e seco em vácuo a 40°C para originar 5-Fenil-1H-tieno[2,3-d]pirimidina-2,4-diona como um sólido branco. Rendimento= (1,1g, 56%).

#### Exemplo 4

#### **2,4-Dicloro-5-fenil-tieno[2,3-d]pirimidina (IV)**

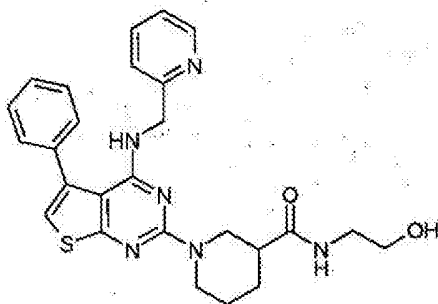


Uma mistura agitada de 5-Fenil-1H-tieno[2,3-d]pirimidina-2,4-diona (1,07g, 4,39mmol) e dicloreto fenil fosfónico (Aldrich, 10mL, excesso) foi aquecida a 150°C durante 7h depois deixada assentar à temperatura ambiente durante 18 horas. A solução escura resultante foi deitada em água gelada e extraída com DCM (3 x 150mL). Os extratos combinados foram lavados com solução saturada de carbonato de hidrogénio e sódio (150mL) e secos (MgSO<sub>4</sub>). O solvente foi removido em vácuo e o resíduo oleoso triturado com éter de petróleo a 40-60°C para originar 2,4-Dicloro-5-fenil-tieno[2,3-d]pirimidina como um sólido amarelo pálido. Rendimento = (0,82g, 66%).

Exemplo 5**(2-Cloro-5-fenil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)-piridin-2-ilmetil-amina (III)**

Uma mistura de 2,4-Dicloro-5-fenil-tieno[2,3-d]pirimidina (1,77g, 6,3mmol), 2-aminometilpiridina (Aldrich, 782 $\mu$ L, 7,6mmol), e trietilamina (VWR, 1,06mL; 7,63 mmol) foi refluxada em etanol (30mL) durante 3 horas. Ao arrefecer, a reação foi deitada em água (300mL) e agitada durante 1 hora. O precipitado resultante foi filtrado, lavado com água (2 x 30mL) e seco sob vácuo a 40°C para originar (2-Cloro-5-fenil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)-piridin-2-ilmetil-amina como um sólido amarelo pálido. Rendimento = (1,55g, 70%).

*Racemato - via convergente*

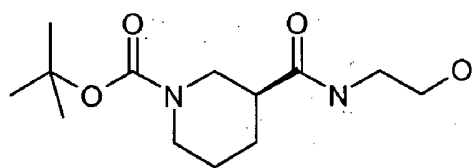
Exemplo 6**(Racémico) (2-Hidroxi-etil)-amida do ácido 1-{5-Fenil-4-[(piridin-2-ilmetil)-amino]-tieno[2,3-d]pirimidin-2-il}-piperidina-3 carboxílico (Ia)**

(2-Cloro-5-fenil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)-piridin-2-ilmetil-amina (44mg, 0,124mmol), (2-hidroxietil)amida do ácido piperidina-3-carboxílico (Fluorochem, 32mg, 0,188mmol, 1,5eq) e N,N-diisopropiletilamina (Aldrich, 0,188mmol) foram dissolvidos em N-Metil Pirrolidinona (1,5mL) num tubo de micro-ondas Biotage e aquecidos até 200°C e mantidos a esta temperatura durante 30 min. Após arrefecimento, os solventes foram removidos em vácuo. O resíduo foi triturado com DCM (2x10mL) e os extratos combinados, concentrados e purificados por TLC prep (eluente MeOH/DCM 10%) para originar o produto como um óleo amarelo, o qual solidificou lentamente após repouso até um sólido tipo cera. O sólido tipo cera pode ser convertido num pó de fluxo livre por agitação em éter dietílico durante 1-2h (0,5g em 10mL). Rendimento=18,3mg (30%)

*Enantiómeros - via convergente*

#### Exemplo 7

**Éster tert-butílico do ácido (S)-3-(2-hidroxi-etilcarbamoil)-piperidina-1-carboxílico**



Éster 1-tert-butílico do ácido (S)-Piperidina-1,3-dicarboxílico (500mg, 2,2mmol), HATU (833 mg, 2,2mmol) e Di-isopropiletilamina (761 µL, 4,4mmol) foram agitados em DCM seco (10mL) num banho de gelo durante 5 min, depois à temperatura ambiente durante 5 min. Etanolamina (198 µL, 3,28mmol) foi adicionada e a reação agitada à temperatura ambiente durante 3 horas. A reação foi diluída com DCM (40mL), lavada com água (50mL), a camada DCM separada e seca (MgSO<sub>4</sub>) e concentrada. O resíduo foi colocado em

coluna em sílica (20g isolute). Eluição: MeOH/DCM 0-5%CV, MeOH/DCM 5%-5% 10CV, MeOH/DCM 5-10% 5CV. TLC visualizado com  $\text{KMnO}_4$ . Isto originou o produto como um óleo transparente (327mg).

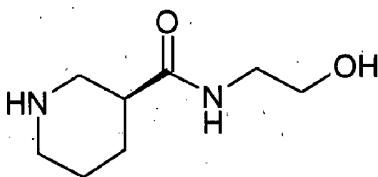
Foi preparado de modo semelhante:

#### Exemplo 8

**Éster tert-butílico do ácido (R)-3-(2-hidroxi-etilcarbamoyl)-piperidina-1-carboxílico**

#### Exemplo 9

**2(hidroxi-etil)-amida do ácido (S)-Piperidina-3-carboxílico**



O produto da reação acima foi agitado em 1:1 de TFA/DCM durante 2 horas depois concentrado em vácuo até um óleo. Este foi dissolvido em MeOH (5mL) e carregado num cartucho SCX de 5g. O cartucho foi lavado com MeOH (10mL), depois o produto foi eluído com 2M de  $\text{NH}_3$ /MeOH (10mL). A fração foi concentrada para originar um sólido branco. Rendimento = 260mg.

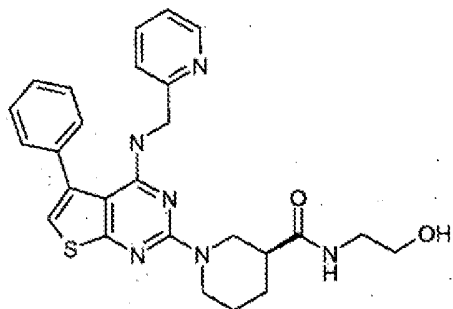
Foi preparado de modo semelhante:

#### Exemplo 10

**(2-hidroxi-etil)-amida do ácido (R)-piperidina-3-carboxílico**

Exemplo 11

**(2-hidroxi-etil)-amida do ácido (S)-1-{5-fenil-4-[(piridin-2-ilmetil)-amino]-tieno[2,3-d]pirimidin-2-il}-piperidina-3-carboxílico (Ib)**



(2-hidroxi-etil)-amida do ácido (S)-Piperidina-3-carboxílico foi reagida com (2-Cloro-5-fenil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)-piridin-2-ilmetil-amina como no Exemplo 6 acima para originar (2-hidroxi-etil)-amida do ácido (S)-1-{5-Fenil-4-[(piridin-2-ilmetil)-amino]-tieno[2,3-d]pirimidin-2-il}-piperidina-3-carboxílico como uma espuma amarela (188g).

Foi preparado de modo semelhante:

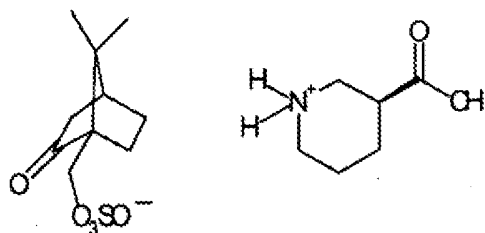
Exemplo 12

**(2-hidroxi-etil)-amida do ácido (R)-1-{5-Fenil-4-[(piridin-2-ilmetil)-amino]-tieno[2,3-d]pirimidin-2-il}-piperidina-3-carboxílico (Ic)**

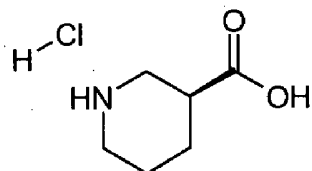


*Enantiómeros - via linear*Exemplo 13**Sal do ácido (S)-Canforsulfonato (S)-Nipecótico**

**Resolução quiral do ácido (S) Nipecótico a partir de mistura racêmica comercial**



A uma solução de ácido (S)-canforsulfônico (18kg, 77mol) em acetona (127kg) a 55-58°C, uma solução de ácido (R,S)-nipecótico (10kg), 77mol) em água (20kg) foi rapidamente carregada. A mistura foi mantida a 55-58°C até todos os sólidos estarem dissolvidos. A solução foi lentamente arrefecida até 20-25°C para precipitar o sal, depois agitada durante a noite, e isolada. Para aumentar ainda mais a pureza diastereomérica, o sal resultante foi recristalizado a partir de acetona (16kg) e água (4kg) a 55-58°C. Mais uma vez, a solução quente foi arrefecida até 20-25°C, agitada durante a noite, e isolada para originar o sal do ácido-(S)-canforsulfonato (S)-nipecótico (14kg).

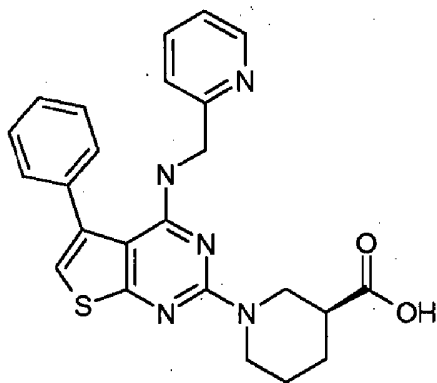
Exemplo 14**Hidrocloreto do ácido (S)-Piperidina-3-carboxílico**

Éster 1-tert-butílico do ácido (S)-Piperidina-1,3-dicarboxílico (20kg, 87,2mol) foi tornado em suspensão

espessa em ácido acético (189kg) e arrefecido até 15 °C. Um excesso de gás de cloreto de hidrogénio (9,6kg) foi carregado e agitado durante ~4 horas para completar a desproteção. A suspensão espessa foi isolada e o bolo de filtração foi lavado com ácido acético (2 x 31,5kg). O bolo de filtração foi depois seco em vácuo para obter o produto (14,4kg).

#### Exemplo 15

**Ácido (S)-1-{5-Fenil-4-[(piridin-2-ilmetil)-amino]-tieno[2,3-d]pirimidin-2-il}-piperidina-3-carboxílico**

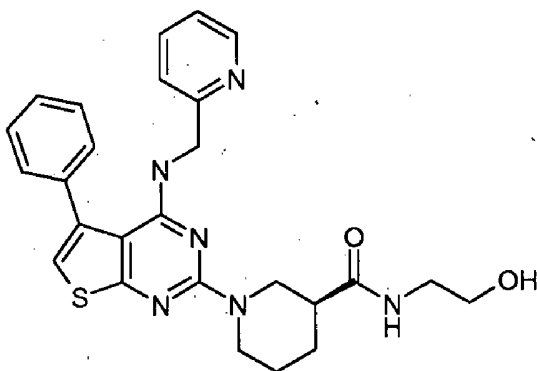


(2-Cloro-5-fenil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)-piridin-2-ilmetil-amina (5,9kg, 16,7mol) e hidrocloreto do ácido (S)-nipecótico (4,15kg, 25,1mol) foram dissolvidos em butirolnitrilo (13,9kg). Um excesso de diisopropiletilamina (8,6kg, 66,9mol) foi adicionado e a mistura aquecida até 110 °C durante 24 a 48 horas para completar a reação. Com o acoplamento completo (<2% de ácido nipecótico remanescente), a reação foi arrefecida até à temperatura ambiente e foi carregada água (29kg). O pH da mistura foi ajustado até ~10 com 25% de hidróxido de sódio aquoso (4,5L) e as camadas separadas. A camada aquosa do produto foi extraída duas vezes com acetato de etilo (15,9L) depois cloreto de metileno (23,5kg) foi adicionado à camada aquosa e o pH ajustado até ~2,5 com ácido clorídrico concentrado

(6,3kg). As camadas foram separadas e a camada aquosa re-extraída com cloreto de metileno (2 x 15,7kg). As camadas de cloreto de metileno foram combinadas e lavadas com água (18kg) depois secas em sulfato de sódio (5,9kg) e a solução de produto foi mantida para processamento no passo seguinte (Exemplo 16).

#### Exemplo 16

**2-hidroxi-etil)-amida do ácido (S)-1-{5-Fenil-4-[(piridin-2-ilmetil)-amino]-tieno [2,3-d] pirimidin-2-il}- piperidina-3-carboxílico (Ib)**



A solução de ácido (S)-1-{5-Fenil-4-[(piridin-2-ilmetil)-amino]-tieno[2,3-d]pirimidin-2-il}-piperidina-3-carboxílico (7,4kg, 16,63mol) (do Exemplo 15) foi arrefecida até 0 °C e diisopropilamina (4,51kg, 35mol) e etanolamina (2,03kg, 33,3mol) foram adicionadas. Mantendo a temperatura da reação abaixo de 10 °C, bezotriazolil tetrametilurônio-BF<sub>4</sub> (TBTU) (5,9kg, 18,3mol) foi carregado em porções depois agitado a ~5°C até o acoplamento estar completo. A solução de reação foi depois filtrada para remover os sais de TBTU e lavada com água (22,2 L), seguido de duas lavagens com solução aquosa de tampão ácido cítrico/ hidróxido de sódio (pH ~5) (2,88kg, 15mol), e finalmente com uma solução salgada (4L). Subsequentemente, a mistura foi carregada com

butironitrilo (17,4L) e parcialmente descarregada para precipitar o produto diastereomérico. A suspensão espessa foi filtrada para remover diastereoisómero e os filtrados adicionalmente descarregados até ~1/2 volume. Na mistura foram carregados heptanos (30,4L) para precipitar o produto e a suspensão espessa arrefecida até à temperatura ambiente. A suspensão espessa foi filtrada, lavada com heptanos (10,1L), e seca em vácuo para obter o produto (4,1kg).

(2-hidroxi-etil)-amida do ácido (R)-1-{5-Fenil-4-[(piridin-2-ilmetil)-amino]-tieno[2,3-d]pirimidin-2-il}-piperidina-3-carboxílico (Ic) pode ser preparada de acordo com uma via análoga aos Exemplos 13 até 16.

#### Exemplo 17

Os dados analíticos para os compostos representados pelos exemplos acima são mostrados na tabela seguinte.

Ex	Espetro de NMR <sup>1</sup> H (400MHz; dmso-d6)	HPLC (RT) mins	Espet Massa (M <sup>+</sup> )	HPLC Quiral (método (a))	MP (°C)	FT-IR (cm <sup>-1</sup> )	λ <sub>max</sub>
2	0,91 (3H, t), 3,96 (2H, q), 6,15 (1H, s) 7,3 (5H, m)	4,8	248 (99,5%)				
3	6,67 (1H, s), 7,3 (3H, m), 7,47 (2H, m)	(uplc)	245 (98,9%)				
4	7,51 (5H, m), 7,99 (1H, s)	(uplc)	282 (92%)				
5	4,64 (2H, s), 7,07 (1H, m), 7,23 (1H, m),	(uplc 1,75)	353 (97,6%)				

	7,4 (1H, d), 7,55 (6H, m) 7,75 (1H, dt), 8,21 (1H, m)					
6	1,3 (1H, m), 1,6 (2H, m), 1,8 (1H, m), 2,3 (1H, m), 2,8 (2H, m), 3,1 (2H, m), 3,4 (2H, m), 4,6 (5H, m), 6,3 (1H, m), 6,95 (1H, s), 7,2-7,3 (2H, m), 7,5 (5H, m), 7,7 (1H, m), 7,9 (1H, m), 8,3 (1H, m)	2,67 (uplc 0,91)	489 (99,8%)		190- 194	3338, 3298, 3098, 3009, 2931, 2847, 1642, 1556, 1517, 1504, 1484, 1438, 1386, 1321, 1300, 1255, 1220, 1203, 1139, 1062
11 (S)	1,3 (1H, m), 1,6 (2H, m), 1,8 (1H, m), 2,3 (1H, m), 2,8 (2H, m), 3,2 (2H, m), 3,4 (2H, m), 4,6 (5H, m), 6,3 (1H, t), 6,95 (1H, s), 7,2 (1H, dd), 7,3 (1H, d), 7,5 (5H, m),	-	489,3	98,3% RT=18, 4 min	61- 65	3426, 3357, 1649

	7,7 (1H, dd), 7,9 (1H, m), 8,3 (1H, m)					
12 (R)	1,3 (1H, m), 1,6 (2H, m), 1,8 (1H, m), 2,3 (1H, m), 2,8 (2H, m), 3,2 (2H, m), 3,4 (2H, m), 4,6 (5H, m), 6,3 (1H, t), 6,95 (1H, s), 7,2 (1H, dd), 7,3 (1H, d), 7,5 (5H, m), 7,7 (1H, dd), 7,9 (1H, m), 8,3 (1H, m)	-	489,3	97,6% RT= 14,87 MIN	71- 76	3425, 3352, 1649

### Exemplo 18

#### **Método Eletrofisiológico de Kv1.5**

A capacidade dos compostos da invenção para inibir os canais de potássio Kv1.5 foi medida numa experiência eletrofisiológica, usando células recombinantes expressando o canal de interesse numa experiência de "patch clamp" de célula inteira.

A solução de banho externa continha (em mM): 150 de NaCl, 10 de KCl, 3 de MgCl<sub>2</sub>, 1 de CaCl<sub>2</sub>, 10 de HEPES, pH 7,4. Pipetas de "patch" foram enchidas com uma solução de eletrodo da composição (em mM): 160 de KCl, 0,5 de MgCl<sub>2</sub>, 10 de HEPES; 1 de EGTA, pH 7,2 com KOH.

Os compostos foram dissolvidos em DMSO (100 %) e feitos de fresco num banho externo à concentração desejada (concentração de DMSO final = 0,1 %). Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente.

Para os estudos de "*patch-clamp*" de célula inteira as células (CHO estavelmente transfetadas com hK.v1.5) foram semeadas em lamelas de vidro antes dos registos serem feitos. As células foram semeadas em placas de Petri estéreis de 30 mm a uma densidade que permite células isoladas serem selecionadas para as experiências de "*patch clamp*". As placas foram armazenadas numa incubadora humidificada, com gás (5 % CO<sub>2</sub>) a 37 °C até serem usadas.

Os registos de "*patch-clamp*" de célula inteira das correntes de membrana foram feitos após formação de selo gigaohm entre o elétrodo de "*patch*" e a célula usando amplificadores HEKA EPC-9/10 controlados pelo *Software Pulse* (Ver8.5x/8.6x, HEKA, Alemanha). As lamelas semeadas com células foram colocadas numa câmara de registo montada na plataforma de um microscópio invertido. Durante a experiência a célula de interesse foi continuamente sobrefundida com solução de banho aplicada por via de uma cânula colocada muito próximo da célula para permitir o controlo do ambiente da solução extracelular. Apenas as células com uma corrente de >500pA foram usadas para as experiências. Durante as experiências a resistência de série total não excedeu 10 M $\Omega$  e foi compensada por um mínimo de 70 %. Subtração de vazamento foi realizada *online* usando um protocolo P/n em *Pulse*.

Os protocolos de degrau de voltagem eletrofisiológicos e a análise dos dados foram realizados como se segue. Os dados foram amostrados a 5kHz, e filtrados com um comprimento de onda de -3 dB de 2,5kHz. As células foram mantidas a uma voltagem de -80mV. As correntes foram evocadas por um degrau de voltagem de despolarização até 0mV (900ms) antes de repolarização primeiro a -40mV (100ms) antes de voltar a -80mV. A forma de onda de comando foi repetidamente aplicada a cada 5s ao longo da experiência. As correntes médias durante 75-95% do passo de despolarização para 0mV foram analisadas usando o *software* Pulsefit (v8.x, HEKA, Alemanha). O protocolo de voltagem foi aplicado para se conseguir uma corrente de linha de base estável no banho antes da substância de teste ser sobrefundida por via da cânula; a troca de fluido demorou aproximadamente 15 s. A substância de teste foi deixada equilibrar e durante esse tempo o protocolo de voltagem foi repetidamente aplicado e registado. A percentagem de inibição da corrente na presença da substância de teste foi calculada em relação ao valor do pré-fármaco de controlo.



	Composto	IC <sub>50</sub> Kv1.5 (nM)
Racemato	(2-Hidroxi-etil)-amida do ácido 1-{5-Fenil-4-[(piridin-2-ilmetil)-amino]-tieno[2,3-d]pirimidin-2-il}-piperidina-3-carboxílico	9
Enantiómero (S) (Ib)	(2-Hidroxi-etil)-amida do ácido (S)-1-{5-Fenil-4-[(piridin-2-ilmetil)-amino]-tieno[2,3-d]pirimidin-2-il}-piperidina-3-carboxílico	27
Enantiómero (R) (Ic)	(2-Hidroxi-etil)-amida do ácido (R)-1-{5-Fenil-4-[(piridin-2-ilmetil)-amino]-tieno[2,3-d]pirimidin-2-il}-piperidina-3-carboxílico	5

#### Exemplo 19

##### **Rastreo de Seletividade**

Um composto da invenção e um composto comparativo foram rastreados nos seguintes ensaios:

1. Nav1.5; rastreado em Sophion QPatch usando células CHO expressando correntes de hNav1.5, estavelmente transfetadas com cADN de hNav1.5 heterólogo.

2. Kv4.3; rastreado por "patch clamp" manual de célula inteira usando células CHO expressando correntes hKv4.3, estavelmente transfetadas com cADN de Kv4.3 heterólogo.

3. hERG; rastreado por "patch clamp" manual de célula inteira usando células HEK293 expressando correntes de

hERG, estavelmente transfetadas com cADN de hERG heterólogo.

4. Kir3.1/3.4; rastreado por “*patch clamp*” manual de célula inteira usando células HEK293 expressando correntes de rKir3.1/3.4, estavelmente transfetadas com cADN de rKir3.1 e rKir3.4 heterólogo.

5. KCNQ1; rastreado por “*patch clamp*” manual de célula inteira usando células CHO expressando correntes de hKCNQ1/hmink, estavelmente transfetadas com cADN de hKCNQ1/hmink heterólogo.

6. Kir2.1; rastreado por “*patch clamp*” manual de célula inteira usando células HEK293 expressando correntes de hKir2.1, estavelmente transfetadas com cADN de hKir2.1 heterólogo.

7. Cav1.2; rastreado usando células GH3 ou células HEK293 expressando correntes de hCav1.2, estavelmente transfetadas com cADN de hCav1.2 heterólogo.

As proporções de seletividade para Kv1.5 como comparado com os canais iónicos acima são mostradas a seguir:

Canal de Iões	Composto da invenção	Composto comparativo
Nav1.5	>350x	~120x
Kv4.3	~500x	17x
hERG	~275x	54x
Kir3.1/3.4	~265x	~42x
KCNQ1	~1200x	~300x
Kir2.1	>400x	>1245x
Cav1.2	>1200x	>1245x

### Exemplo 20

#### **Inibição da corrente $I_{Kur}$ em miócitos atriais humanos dissociados**

##### **Isolamento de miócitos atriais humanos**

Espécimes de apêndices atriais humanos (direito ou esquerdo) foram obtidos de pacientes submetidos a vários procedimentos cirúrgicos cardíacos. O tecido foi obtido a partir de pacientes que deram consentimento do hospital Papworth Hospital NHS Trust, Cambs. Reino Unido após aprovação pela Comissão "Local Research Ethical Approval Committee". O isolamento mecano-enzimático de miócitos foi realizado usando um protocolo modificado como descrito por Wang *et al.* (1993) e Dobrev *et al.* (2005). Os miócitos isolados foram suspensos numa solução 'Krafte-brühe' (KB) modificada até serem usados.

##### **Sistema de registo**

Os miócitos foram colocados numa câmara de registo de pequeno volume com uma base de lamela de vidro, montada na plataforma de um microscópio invertido. Durante a experiência, a célula de interesse foi constantemente sobrefundida com solução de banho aplicada por via de uma cânula colocada muito próximo da célula para permitir o controlo do ambiente da solução extracelular.

Os registos de "patch-clamp" de célula inteira das correntes de membrana foram feitos usando um amplificador HEKA EPC-9/10 após formação do selo Gigaohm entre o eléctrodo de "patch" e o miócito. Pipetas de "patch" de vidro foram retiradas de vidro de borosilicato. Apenas miócitos em forma de bastonete e estriados foram seleccionados para uso. Capacitância e resistência em série

foram compensadas usando *software* Pulse. Os comandos de fixação de voltagem foram gerados usando *software* Pulse e os dados foram registados no disco rígido de um PC. Subtração de vazamento não foi realizada e as células com vazamento significativo foram rejeitadas. As experiências foram realizadas à temperatura ambiente. Para minimizar a contaminação proveniente de outras correntes iônicas, as soluções experimentais continham 10 mM de cloreto de tetraetilamônio ( $I_K$ ), 100 nM de atropina ( $I_{K,Ach}$ ), 200  $\mu$ M de  $CdCl_2$ , ( $I_{Ca,L}$ ; e  $I_{Cl,Ca}$ ), 0,5 mM de  $BaCl_2$  ( $I_{K1}$  e  $I_{KAch}$ ). Bloqueadores foram usados numa concentração que não se esperava que afetasse  $I_{Kur}$ . A corrente de sódio ( $I_{Na}$ ) foi suprimida usando um banho à base de cloreto de colina. O degrau de voltagem de despolarização foi aplicado a cada 10s para permitir uma corrente de potássio para fora composta por um componente transitório e sustentado. A corrente sustentada sensível a 300  $\mu$ M 4-AP foi definida como a corrente retificadora tardia ultrarrápida,  $I_{Kur}$ .

Corrente iônica	Composto da invenção	Composto comparativo
$hI_{Kur}$	11 nM	154 nM

### Abreviaturas

HGNC	Comissão de Nomenclatura Genética HUGO
Kv(ur)	Retificador Tardio Ultrarrápido Cardíaco
CHO	Células de Ovário de Hamster Chinês
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de Inositol
CRAC	Corrente de $Ca^{2+}$ ativado – libertação de $Ca^{2+}$
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
FCS	Soro de Vitelo Fetal
EBSS	Solução Salina Equilibrada de Earl

WCPC                      "*Patch-Clamp*" de Célula Inteira  
 HEK293                    Célula 293 de Rim Embrionário Humano

## REFERÊNCIAS

Herbert, "General principles of the structure of ion channels", *Am. J. Med*, 104, 87-98, 1998.

Armstrong & Hille, "Voltage-gated ion channels and electrical excitability", *Neuron*, 20, 371-380, 1998.

Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS

International Union of Pharmacology. XLI Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev*. 2003 Dec;55(4):583-6.

Shieh et al. "Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities", *Pharmacol Rev*, 52(4), 557-594, 2000.

Ford et al. "Potassium Channels: Gene Family, Therapeutic Relevance, High-Throughput Screening Technologies and Drug Discovery", *Prog Drug Res*, 58, 133-168, 2002.

Marban "Cardiac channelopathies", *Nature*, 415, 213-218, 2002.

Brendel and Peukert 'Blockers of the Kv1.5 Channel for the Treatment of Atrial Arrhythmias', Expert Opinion in Therapeutic Patents, 12 (11), 1589-1598 (2002).

Wang *et al.*, "Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to Kv1.5 cloned channel currents", Circ Res, 73, 1061-1076, 1993.

Fedida *et al.*, "Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K<sup>+</sup> channel current", Circ Res, 73, 210-216, 1993.

Feng *et al.*, "Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cultured adult human atrial myocytes", Circ Res, 80, 572-579, 1997.

Amos *et al.*, "Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes", J Physiol, 491, 31-50, 1996.

Li *et al.*, "Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes", Circ Res, 78, 689-696, 1996.

Nattel, 'Therapeutic implications of atrial fibrillation mechanisms: can mechanistic insights be used to improve AF management?' Cardiovascular Research, Volume 54, Issue 2, 347-360, 2002.

Courtemanche *et al.*, "Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodeling: insights

from a mathematical model", *Cardiovasc Res*, 42(2), 477-489, 1999.

Nattel *et al.*, "Cardiac ultrarapid delayed rectifiers: a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity", *Cell Physiol Biochem*, 9(4-5), 217-226, 1999.

Knobloch K, Brendel J, Peukert S, Rosenstein B, Busch AE, Wirth KJ.

Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the novel I(Kur) channel blockers, S9947 and S20951, on left vs. right pig atrium in vivo in comparison with the I(Kr) blockers dofetilide, azirnilide, d,l-sotalol and ibutilide. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2002 Nov;366(5):482-7.

Wirth KJ, Paehler T, Rosenstein B, Knobloch K, Maier T, Frenzel J, Brendel J, Busch AE, Bleich M. Atrial effects of the novel K(+)-channel-blocker AVE0118 in anesthetized pigs. *Cardiovasc Res*. Nov 1;60(2):298-306, 2003.

Colatsky *et al.*, "Channel specificity in antiarrhythmic drug action. Mechanism of potassium channel block and its role in suppressing and aggravating cardiac arrhythmias", *Circulation*, 82(6), 2235-2242, 1990.

Feng *et al.*, "Effects of class III antiarrhythmic drugs on transient outward and ultra-rapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes", *J Pharmacol Exp Ther*, 281(1), 384-392, 1997.

Wang *et al.*, "Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed

rectifier currents in human atrial myocytes", J Pharmacol, 272(1), 184-196, 1995.

Malayev et al., "Mechanism of clofilium block of the human Kv1.5 delayed rectifier potassium channel", Mol Pharmacol, 147(1), 198-205, 1995.

Godreau et al., "Mechanisms of action of antiarrhythmic agent bertosamil on hKv.5 channels and outward potassium current in human atrial myocytes", J Pharmacol Exp Ther 300(2), 612-620, 2002.

Matsuda et al., "Inhibition by a novel anti-arrhythmic agent, NIP-142, of cloned human cardiac K<sup>+</sup> channel Kv1.5 current", Life Sci, 68, 2017-2024, 2001.

Bachmann et al., "Characterization of a novel Kv1.5 channel blocker in Xenopus oocytes, CHO cells, human and rat cardiomyocytes", Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 364(5), 472-478, 2001.

Peukert S, Brendel J, Pirard B, Bruggemann A, Below P, Kleemann HW, Hemmerle H, Schmidt W. Identification, synthesis, and activity of novel blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. J Med Chem. Feb 13;46(4):486-98, 2003.

Xu & Xu, "The expression of arrhythmic related genes on Xenopus oocytes for evaluation of class III antiarrhythmic drugs from ocean active material", Yi Chuan Xue Bao, 27(3), 195-201, 2000.



Katada *et al*, 'Cytotoxic effects of NSL-1406, a new thienopyrimidine derivative, on leukocytes and osteoclasts.' *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9, 797-802, 1999.

Stewart *et al*, 'Discovery of inhibitors of cell adhesion molecule expression in human endothelial cells. 1. Selective inhibition of ICAM-1 and E-selectin expression', *J. Med. Chem.*, 44, 988-1002, 2001.

Hozien *et al*, 'Synthesis and application of some new thienopyrimidine derivatives as antimicrobial agents', *Synthetic Communications*, 26(20), 3733-3755, 1996.

Ismail *et al.*, 'Synthesis and antimicrobial activity of some tetramethylenethienopyrimidina derivatives', *Farmaco*, 50(9), 611-616, 1995.

Konno *et al.*, 'Synthesis of thienopyrimidine derivatives and their antifungal activities', *Yakugaku Zasshi*, 109(7), 464-473, 1989.

Ram *et al.*, 'Thienopyrimidines as potencial chemotherapeutic agents II', *J. Het. Chem.*, 18(7), 1277-1280, 1981.

Ram *et al.*, 'Thienopyrimidines as potential chemotherapeutic agents', *Archiv der Pharmazie*, 312(1), 19-25, 1979.

Shehata *et al.*, 'Synthesis, antitumour and anti-HIV-1 testing of certain thienopyrimidine, thienoimidazopyrimidina and thienothiazine derivatives' *Med. Chem. Res.*, 6(3), 148-163, 1996.

Moneer *et al.*, 'Reaction of 30amino and 4-hydrazino-5,6-tetramethylenethienopyrimidine derivatives with azlactones', Egyptian Journal of Pharm. Sci., 34 (4-6), 599-609, 1994.

Jordis *et al.*, '7;9-Dideaza-9-thiaadenines (4-aminothieno[2,3-d]pyrimidines) as potential anticytokinins' Vestnik Slovenskega Kemijskega Drustva, 33(3), 217-38, 1986.

Noravryan *et al.*, 'Synthesis and anticonvulsive activity of 4-alkyl (or aryl)amino-6,6-dimethyl-5,6-dihydro-8H-pyrano (or thiopyrano)[3,4-b]thieno[5,4-d]pyrimidines' Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal, 11(9), 38-42, 1977.

Hosni *et al.*, 'Thienopyrimidines II: synthesis of newer thieno[2,3-d]pyrimidines and their quaternized derivatives with molluscicidal activity' Acta Poloniae Pharmaceutica, 56(1)49-56, 1999.

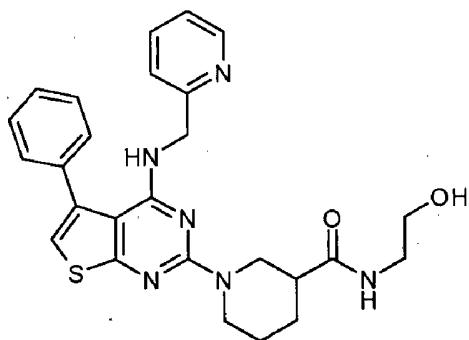
Munchof *et al.*, 'Design and SAR of thienopyrimidine and thienopyridine inhibitors of VEGFR-2 kinase activity'. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 14(1), 21-24, 2004.

Dobrev *et al.*, 'The G protein-gated potassium current  $I_{K,ACh}$  is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation.' Circulation, 112(24):3697-706, 2005.

Lisboa, 4 de janeiro de 2016

**REIVINDICAÇÕES**

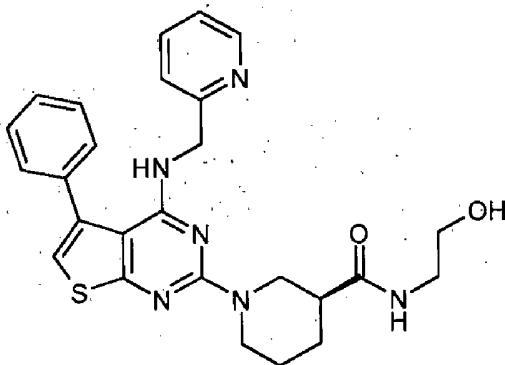
1. Composto de fórmula (Ia)



(Ia)

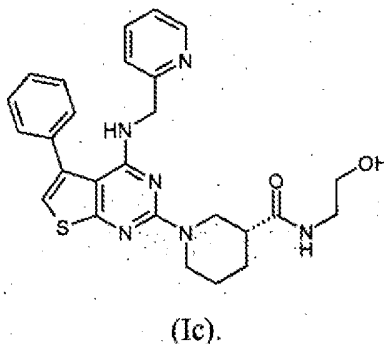
ou um seu sal ou éster farmacêuticamente aceitável.

2. O composto da reivindicação 1, em que o composto é de fórmula (Ib)



(Ib).

3. O composto da reivindicação 1, em que o composto é de fórmula (1c)



4. O composto da reivindicação 1, em que o composto de fórmula (Ia) compreende uma mistura dos compostos de fórmulas (Ib) e (Ic).
5. O composto da reivindicação 4, em que o composto de fórmula (Ia) compreende uma mistura racêmica dos compostos de fórmulas (Ib) e (Ic).
6. O composto da reivindicação 4, em que o composto de fórmula (Ia) compreende um excesso enantiomérico do composto de fórmula (Ib).
7. O composto da reivindicação 4, em que o composto de fórmula (Ia) compreende um excesso enantiomérico do composto de fórmula (Ic).
8. Composição farmacêutica compreendendo pelo menos um composto como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e, opcionalmente, um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis.
9. Composto ou composição como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 para uso em tratamento.
10. Composto ou composição como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 para uso na inibição de canais de potássio.

11. O composto ou composição como reivindicado na reivindicação 10, em que o composto ou composição é para uso no tratamento ou prevenção de arritmia.
12. O uso de um composto como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 para o fabrico de um medicamento para uso na inibição dos canais de potássio.
13. O uso da reivindicação 12 em que o medicamento é para uso no tratamento ou prevenção de arritmia.

Lisboa, 4 de Janeiro de 2016