



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(11) BR 112018015389-3 B1

(22) Data do Depósito: 14/03/2017

(45) Data de Concessão: 19/12/2023

(54) Título: DERIVADO DE 5-ETIL-4-METIL-PIRAZOL-3-CARBOXAMIDA, SEU PROCESSO DE FABRICAÇÃO, PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA ORAL E USO

(51) Int.Cl.: C07D 413/12; A61K 31/4245; A61P 25/00.

(30) Prioridade Unionista: 17/03/2016 EP 16160790.8.

(73) Titular(es): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.

(72) Inventor(es): GUIDO GALLEY; MARIUS HOENER; ROGER NORCROSS; PHILIPPE PFLIEGER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2017055885 de 14/03/2017

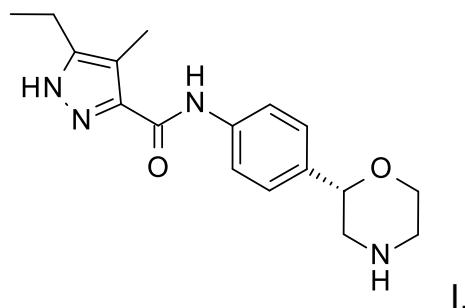
(87) Publicação PCT: WO 2017/157873 de 21/09/2017

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/07/2018

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a um composto de Fórmula (I) e a um sal de adição de ácido farmaceuticamente aceitável do mesmo com uma boa afinidade com os receptores associados à amina traço (TAARs), especialmente com TAAR1, para o tratamento de certas doenças do SNC.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"DERIVADO DE 5-ETIL-4-METIL-PIRAZOL-3-CARBOXAMIDA, SEU
 PROCESSO DE FABRICAÇÃO, PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA
 ORAL E USO".**

[0001] A presente invenção refere-se a um composto de Fórmula



e a um sal de adição farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0002] O composto divulgado aqui e compreendido pela Fórmula I pode exibir tautomerismo. É pretendido que a presente invenção compreenda qualquer forma tautomérica deste composto, ou misturas de tais formas, e não é limitado a nenhuma forma tautomérica mostrada na fórmula acima.

[0003] Foi agora constatado que o composto de Fórmula I (5-etyl-4-metil-N-[4-[(2S) morfolin-2-il]fenil]-1H-pirazol-3-carboxamida tem uma boa afinidade com receptores associados à amina traço (TAARs), especificamente com TAAR1, e menos efeitos colaterais comparado com compostos da técnica anterior.

[0004] Ligantes similares de TAAR1 de camundongo e TAAR1 de rato foram divulgados no WO2011/076678 e no WO2012/16826.

[0005] O composto de Fórmula I e seus sais de adição farmaceuticamente úteis possuem propriedades farmacológicas valiosas. Especificamente, foi constatado que o composto da presente invenção é um agonista parcial do receptor associado à amina traço humana 1 (hTAAR1).

[0006] O composto da presente invenção tem vantagens significantes em relação a compostos da técnica anterior, vantagens

que são

- atividade agonística potente no receptor de TAAR1 humano,
- seletividade contra o transportador de dopamina (DAT),
- seletividade contra o canal de íon hERG,
- um vetor pouco anfifílico e desta maneira oferecendo um baixo risco de causar fosfolipidose induzida por fármaco (DIPL) (*vide infra*).

[0007] O composto de Fórmula I pode então ser usado como um fármaco seguro para o tratamento de depressão, distúrbios de ansiedade, distúrbio bipolar, distúrbio de déficit de atenção e hiperatividade (ADHD), distúrbios relacionados ao estresse, distúrbios psicóticos tal como esquizofrenia, doenças neurológicas tal como doença de Parkinson, distúrbios neurodegenerativos tal como doença de Alzheimer, epilepsia, enxaqueca, hipertensão, vício, abuso de substância e distúrbios metabólicos tais como distúrbios alimentares, diabetes, complicações diabéticas, obesidade, dislipidemia, distúrbios de consumo de energia e assimilação, distúrbios e mau funcionamento de homeostase da temperatura corporal, distúrbios do sono e ritmo circadiano e distúrbios cardiovasculares.

[0008] As aminas biogênicas clássicas (serotonina, norepinefrina, epinefrina, dopamina, histamina) desempenham papéis importantes como neurotransmissores no sistema nervoso central e periférico^[1]. Sua síntese e armazenamento, bem como sua degradação e reabsorção após liberação, são estritamente reguladas. Um desequilíbrio nos níveis de aminas biogênicas é conhecido ser responsável pela função cerebral alterada sob muitas condições patológicas^[2-5]. Uma segunda classe de compostos amina endógenos, as chamadas aminas traço (TAS), se sobrepõe显著mente às aminas biogênicas clássicas com relação à estrutura, metabolismo e localização subcelular. As TAs

incluem p-tiramina, β -feniletilamina, triptamina e octopamina e elas estão presentes no sistema nervoso mamífero em níveis geralmente menores do que as aminas biogênicas clássicas^[6].

[0009] Desregulagem de TAs foi ligada a várias doenças psiquiátricas tais como esquizofrenia e depressão^[7] e a outras condições tais como distúrbios de déficit de atenção e hiperatividade, enxaqueca, doença de Parkinson, abuso de substância e distúrbios alimentares^[8,9].

[0010] Por um longo tempo, receptores específicos de TA foram apenas hipotetizados com base em sítios de ligação de TA de alta afinidade anatomicamente diferentes no SNC de humanos e outros mamíferos^[10,11]. Desta maneira, os efeitos farmacológicos de TAs foram acreditados ser mediados através do mecanismo bem conhecido de aminas biogênicas clássicas, ou disparando sua liberação, inibindo sua reabsorção ou "reagindo cruzado" com seus sistemas receptores^[9,12,13]. Esta visão mudou显著mente com a identificação de vários membros de uma nova família de GPCRs, os receptores associados à amina traço (TAARs)^[7,14]. Há 9 genes de TAAR em humano (incluindo 3 pseudogenes) e 16 genes em camundongo (incluindo 1 pseudogene). Os genes de TAAR não contêm íntrons (com uma exceção, TAAR2 contém 1 íntron) e estão localizados uns próximos aos outros no mesmo segmento cromossomal. A relação filogenética dos genes receptores, em concordância com uma comparação de similaridade de farmacóforo de DPCR abrangente, e dados farmacológicos sugerem que esses receptores formam três subfamílias distintas^[7,14]. TAAR1 está na primeira subclasse de quatro genes (TAAR1-4) altamente conservados entre humanos e roedores. TAS ativa TAAR1 através de $G_{\alpha}s$. Desregulagem de TAs foi mostrada contribuir para a etiologia de várias doenças tais como depressão, distúrbios de ansiedade, distúrbio bipolar, distúrbios de déficit de atenção e hiperatividade (ADHD),

distúrbios relacionados ao estresse, distúrbios psicóticos tal como esquizofrenia, doenças neurológicas tal como doença de Parkinson, distúrbios neurodegenerativos tal como doença de Alzheimer, epilepsia, enxaqueca, hipertensão, vício, abuso de substância e distúrbios metabólicos tais como distúrbios alimentares, diabetes, complicações diabéticas, obesidade, dislipidemia, distúrbios de consumo de energia e assimilação, distúrbios e mau funcionamento de homeostase de temperatura corporal, distúrbio do sono e ritmo circadiano e distúrbios cardiovasculares.

[0011] Desta maneira, há um grande interesse em aumentar o conhecimento sobre receptores associados à amina traço.

Referências na Literatura:

- [1] Deutch, A.Y. e Roth, R.H.; "Neurotransmitters." In *Fundamental Neuroscience* (2^a Ed.) (Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L, e Squire, L.R., Eds.), pp. 193-234, Academic Press (1999);
- [2] Wong, M.L. e Licinio, J.; "Research and treatment approaches to depression." *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, 2, 343-351;
- [3] Carlsson, A. e outros; "Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, 41, 237-260;
- [4] Tuite, P. e Riss, J.; "Recent developments in the pharmacological treatment of Parkinson's disease." *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, 12, 1335-1352;
- [5] Castellanos, F.X. e Tannock, R.; "Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes." *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, 3, 617-628;
- [6] Usdin, Earl; Sandler, Merton; Editors; *Psychopharmacology Series, Vol. 1: Trace Amines and the Brain.* [Proceedings of a Study Group at the 14th Annual Meeting of the

American College of Neuropsychopharmacology, San Juan, Puerto Rico] (1976);

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

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

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

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

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

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

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

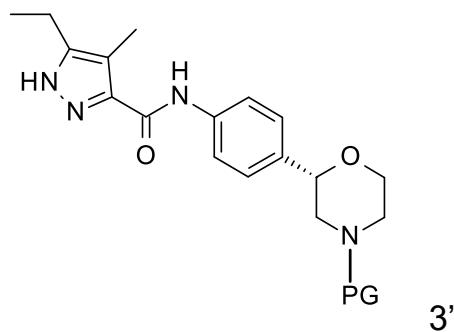
[14] Lindemann, L. e outros; "Trace amine associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors." *Genomics* **2005**, *85*, 372-385.

[0012] Os objetivos da presente invenção são o novo composto de Fórmula I e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, seu uso para o tratamento de doenças relacionadas à função biológica dos receptores associados à amina traço, sua fabricação e medicamentos baseados no

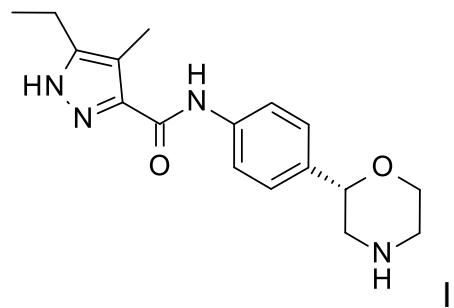
composto de acordo com a invenção no controle ou prevenção de doenças tais como depressão, distúrbios de ansiedade, distúrbio bipolar, distúrbio de déficit de atenção e hiperatividade, distúrbios relacionados ao estresse, distúrbios psicóticos tal como esquizofrenia, doenças neurológicas tal como doença de Parkinson, distúrbios neurodegenerativos tal como doença de Alzheimer, epilepsia, enxaqueca, abuso de substância, vício e distúrbios metabólicos tais como distúrbios alimentares, diabetes, complicações diabéticas, obesidade, dislipidemia, distúrbios de consumo de energia e assimilação, distúrbios e mau funcionamento de homeostase da temperatura corporal, distúrbios do sono e ritmo circadiano e distúrbios cardiovasculares.

[0013] O presente composto de Fórmula I e seus sais farmaceuticamente aceitáveis podem ser preparados através de métodos conhecidos na técnica, por exemplo, através de processos descritos abaixo, processo que compreende

a) clivagem do grupo de proteção N (PG) a partir de compostos de fórmula



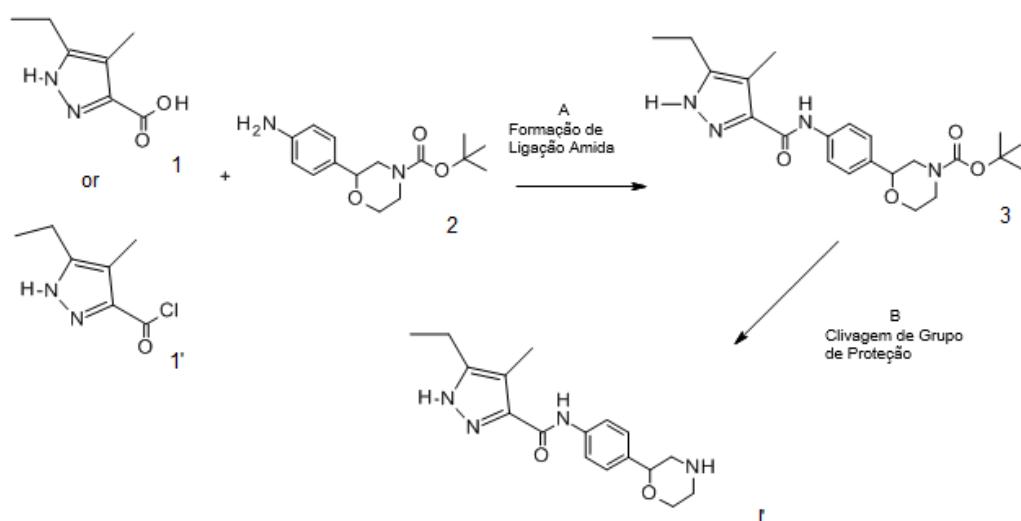
em um composto de fórmula



onde PG é um grupo de proteção N selecionado de $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ -terc-butila (BOC), e se desejado, conversão do composto obtido em sais de adição ácidos farmaceuticamente aceitáveis.

PROCEDIMENTO GERAL

Esquema 1



[0014] Os materiais de partida, 1, 1' e 2 estão comercialmente disponíveis ou podem ser preparados através de métodos bem conhecidos na técnica. 2-(4-Aminofenil)morfolino-4-carboxilato de terc-butila racêmico (CAS RN: 1002726-96-6) está comercialmente disponível. (2*R*)-2-(4-Aminofenil)morfolino-4-carboxilato de terc-butila (CAS RN: 1260220-42-5) está comercialmente disponível. (2*S*)-2-(4-Aminofenil)morfolino-4-carboxilato de terc-butila (CAS RN: 1260220-43-6) está comercialmente disponível ou pode ser preparado como descrito na literatura, por exemplo, como descrito em Trussardi, R. & Iding, H, Pedido Internacional PCT WO 2015/086495 A1.

[0015] Etapa A: formação de ligação amida pode ser realizada através de uma reação de acoplamento entre amina 2 e composto ácido carboxílico 1 na presença de um reagente de acoplamento tal como DCC, EDC, TBTU ou HATU na presença de uma base orgânica tal como trietilamina, *N,N*-di-isopropiletilamina ou *N*-metilmorfolina em solventes halogenados tal como diclorometano ou 1,2-dicloroetano ou solventes

etéreos tal como éter de dietila, dioxana, THF, DME ou TMME.

[0016] Condições preferidas são TBTU com *N*-metilmorfolina em THF a 50-60°C por 12-48 horas. Alternativamente, formação de ligação amida pode ser realizada através de uma reação de acoplamento entre composto amina 2 e cloreto de acila 1' em solventes halogenados tal como diclorometano ou 1,2-dicloroetano ou solventes etéreos tal como éter de dietila, dioxana, THF, DME ou TBME, na presença de uma base orgânica tal como trietilamina ou *N,N*-di-isopropiletilamina.

[0017] Condições preferidas são trietilamina em THF em temperatura ambiente por 18 horas.

[0018] Se desejado, o composto cloreto de acila 1' pode ser preparado *in situ* a partir do ácido carboxílico 1 correspondente através de tratamento com cloreto de oxalila em solventes halogenados tal como diclorometano ou 1,2-dicloroetano ou solventes etéreos tal como éter de dietila, dioxana, THF, DME ou TBME na presença de um catalisador tal como DMF.

[0019] Condições preferidas são dicloroetano em temperatura ambiente por 1 hora.

[0020] Alternativamente, o composto cloreto de acila 1' pode ser preparado *in situ* a partir do ácido carboxílico correspondente 1 através de tratamento com 1-cloro-*N,N*,2-trimetilpropenilamina [CAS 26189-59-3] em diclorometano, seguido por remoção do solvente a vácuo, de acordo com o método de Ghosez e colaboradores (*J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1979, 1180; *Org. Synth.* 1980, 59, 26-34).

[0021] Etapa B: remoção do grupo de proteção N BOC pode ser realizada com ácidos minerais tal como HCl, H₂SO₄ ou H₃PO₄ ou ácidos orgânicos tais como CF₃COOH, CHCl₂COOH, HOAc ou ácido p-toluenossulfônico em solventes tal como CH₂Cl₂, CHCl₃, THF, MeOH, EtOH ou H₂O a 0 até 80 °C.

[0022] Condições preferidas são CF₃COOH em acetonitrila aquosa

a 80°C por 3 horas ou HCl 4N em dioxana em temperatura ambiente por 16 horas.

[0023] Onde material de partida racêmico 2 tiver sido usado, a mistura racêmica resultante de compostos morfolina I' pode ser separada em seus enantiômeros constituintes usando HPLC quiral. Alternativamente, o composto I pode ser obtido em forma enantiomericamente pura iniciando com composto 2 enantiomericamente puro.

Isolamento e purificação dos compostos

[0024] Isolamento e purificação dos compostos e intermediários descritos aqui podem ser realizados, se desejado, através de qualquer procedimento de separação ou purificação adequado tal como, por exemplo, filtragem, extração, cristalização, cromatografia de coluna, cromatografia de camada fina, cromatografia de camada espessa, cromatografia líquida de baixa ou alta pressão preparativa ou uma combinação desses procedimentos. Ilustrações específicas de procedimentos de separação e isolamento adequados podem ser obtidas com referência às preparações e exemplos abaixo. No entanto, outros procedimentos de separação ou isolamento equivalentes poderiam, por certo, ser também usados. Misturas racêmicas de compostos de fórmula I quirais podem ser separadas usando HPLC quiral. Misturas racêmicas de intermediários sintéticos quirais podem ser também separadas usando HPLC quiral.

Sais de composto de Fórmula I

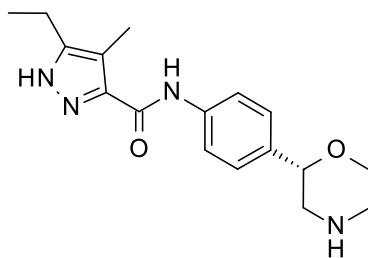
[0025] O composto de Fórmula I é básico e pode ser convertido em um sal de adição ácido correspondente.

[0026] A conversão é realizada através de tratamento com pelo menos uma quantidade estequiométrica de um ácido apropriado, tais como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e similar, e ácidos orgânicos tais como ácido acético,

ácido propiônico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malônico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido p-toluenossulfônico, ácido salicílico e similar. Tipicamente, a base livre é dissolvida em um solvente orgânico inerte tal como éter de dietila, acetato de etila, clorofórmio, etanol ou metanol e similar, e o ácido adicionado em um solvente similar. A temperatura é mantida entre 0°C e 50°C. O sal resultante precipita espontaneamente ou pode ser retirado da solução com um solvente menos polar.

Exemplo 1

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



a) (2S)-2-[4-[(5-Etil-4-metil-1H-pirazol-3-carbonil)amino]fenil]morfolino-4-carboxilato de terc-butila

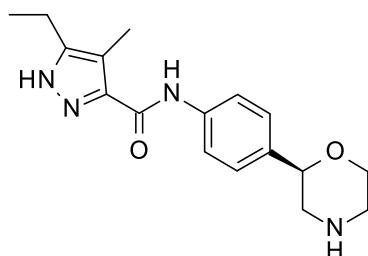
[0027] A uma solução agitada de (2S)-2-(4-aminofenil)morfolino-4-carboxilato de terc-butila (CAS RN: 1260220-43-6, 350 mg, 1,26 mmol, 1,00 equiv.) e ácido 5-etyl-4-metil-1H-pirazol-3-carboxílico (CAS RN: 957129-38-3, 245 mg, 1,51 mmol, 1,20 equiv.) em THF (8 ml) foram adicionados TBTU (807 mg, 2,51 mmol, 2,00 equiv.) e *N*-metilmorfolina (509 mg, 553 µl, 5,03 mmol, 4,00 equiv.). A mistura de reação foi agitada a 50°C por 15 h. TLC em $t = 15$ h mostrou que a reação estava completa. A mistura de reação foi concentrada a vácuo. O material bruto foi purificado através de cromatografia *flash* (sílica gel, eluente: EtOAc 0% a 100% em heptano) para fornecer (2S)-2-[4-[(5-etyl-4-metil-1H-pirazol-3-carbonil)amino]fenil]morfolino-4-carboxilato de terc-butila como um

sólido esbranquiçado (501 mg, 96%). EM (ISP): 413,7 ($[M-H]^-$).

b) 5-Etil-4-metil-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]-1H-pirazol-3-carboxamida
 [0028] A uma solução agitada de ácido trifluoracético (1,37 g, 918 μ l, 12,0 mmol, 10 equiv.) em água (8 ml) foi adicionada uma suspensão de (2S)-2-[4-[(5-etyl-4-metil-1H-pirazol-3-carbonil)amino]fenil]morfolino-4-carboxilato de terc-butila (497 mg, 1,2 mmol, 1,00 equiv.) em acetonitrila (4 ml). A mistura de reação foi agitada a 80°C por 3 h. EM em $t = 3$ h mostrou que a reação estava completa. A mistura de reação foi despejada em NaOH aq. 1N e extraída duas vezes com EtOAc. As camadas orgânicas foram secas em Na_2SO_4 e concentradas a vácuo. O material bruto foi purificado através de cromatografia de coluna *flash* (cartucho de amina SiliaSep®, eluente: EtOAc 0% a 100% em heptano, então MeOH 0% a 10% em EtOAc) para fornecer 5-etyl-4-metil-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]-1H-pirazol-3-carboxamida (327 mg, 87%) como um sólido esbranquiçado. EM (ISP): 315,7 ($[M+H]^+$).

Exemplo 2 (exemplo comparativo)

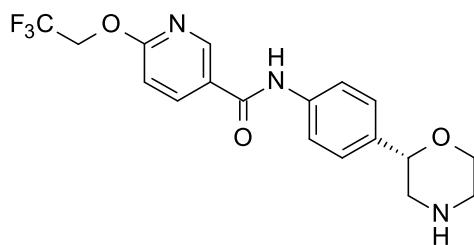
5-Etil-4-metil-N-[4-[(2R)-morfolin-2-il]fenil]-1H-pirazol-3-carboxamida



[0029] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando (2R)-2-(4-aminofenil)morfolino-4-carboxilato (CAS RN: 1260220-42-5) no lugar de (2S)-2-(4-aminofenil)morfolino-4-carboxilato na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 315,6 ($[M+H]^+$).

Exemplo 3 (exemplo comparativo)

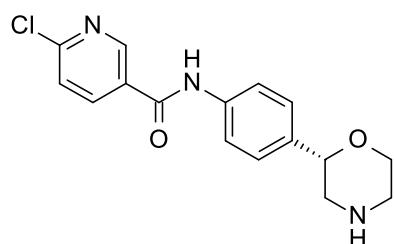
N-[4-[(2S)-Morfolin-2-il]fenil]-6-(2,2,2-trifluoretóxi)piridino-3-carboxamida



[0030] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 6-(2,2,2-trifluoretóxi)nicotínico (CAS RN: 159783-29-6) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 382,1 ($[M+H]^+$).

Exemplo 4 (exemplo comparativo)

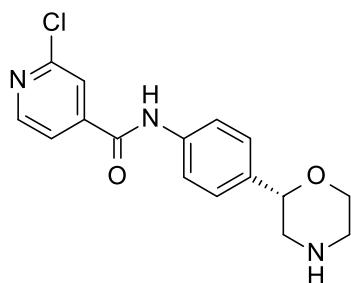
6-Cloro-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridino-3-carboxamida



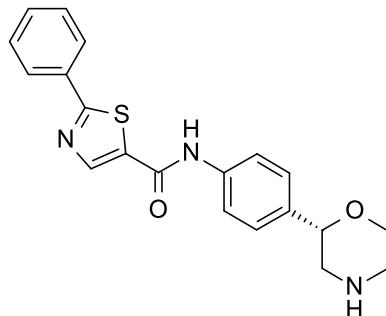
[0031] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 6-cloro-nicotínico (CAS RN: 5326-23-8) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 320,1 ($[\{^{37}Cl\}M+H]^+$), 318,2 ($[\{^{35}Cl\}M+H]^+$).

Exemplo 5 (exemplo comparativo)

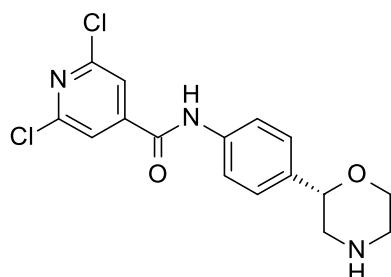
2-Cloro-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridino-4-carboxamida



[0032] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 2-cloro-isonicotínico (CAS RN: 6313-54-8) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 320,1 ($[\{^{37}Cl\}M+H]^+$), 318,1 ($[\{^{35}Cl\}M+H]^+$).

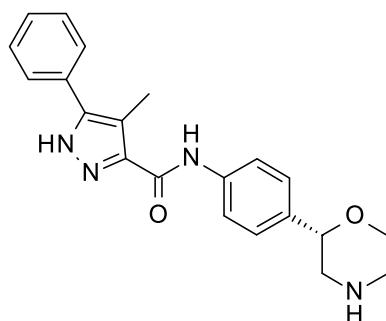
Exemplo 6 (exemplo comparativo)N-[4-[(2S)-Morfolin-2-il]fenil]-2-fenil-1,3-tiazol-5-carboxamida

[0033] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 2-feniltiazol-5-carboxílico (CAS RN: 10058-38-5) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 366,1 ($[M+H]^+$).

Exemplo 7 (exemplo comparativo)2,6-Dicloro-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridino-4-carboxamida

[0034] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (CAS RN: 5398-44-7) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 356,1 ($[\{^{37}\text{Cl}\}M+H]^+$), 354,1 ($[\{^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}\}M+H]^+$), 352,1 ($[\{^{35}\text{Cl}\}M+H]^+$).

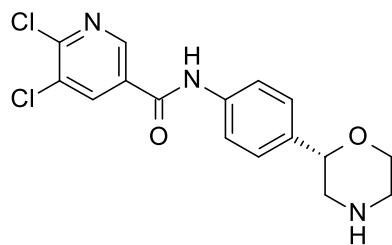
Exemplo 8 (exemplo comparativo)4-Metil-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]-5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxamida



[0035] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 4-metil-5-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (CAS RN: 879770-33-9) no lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 363,2 ($[M+H]^+$).

Exemplo 9 (exemplo comparativo)

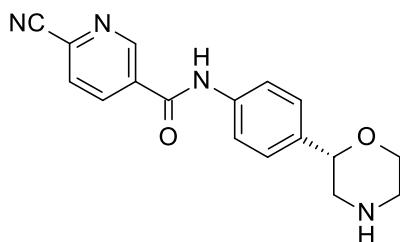
5,6-Dicloro-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridino-3-carboxamida



[0036] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 5,6-dicloro-nicotínico (CAS RN: 41667-95-2) no lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 356,1 ($[\{^{37}Cl}^{35}Cl\}M+H]^+$), 354,1 ($[\{^{37}Cl\}M+H]^+$), 352,1 ($[\{^{35}Cl\}M+H]^+$).

Exemplo 10 (exemplo comparativo)

6-Ciano-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridino-3-carboxamida

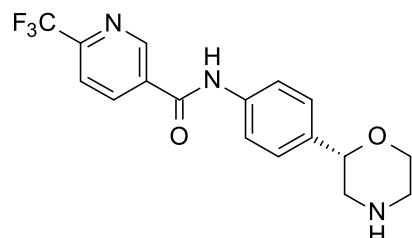


[0037] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 6-ciano-nicotínico (CAS RN: 70165-31-0) no lugar de 5-

etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 309,1 ([M+H]⁺).

Exemplo 11 (exemplo comparativo)

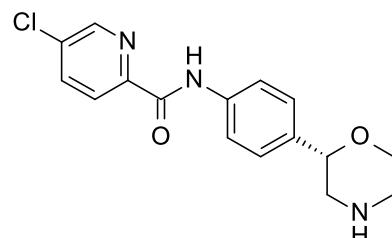
N-[4-[(2S)-Morfolin-2-il]fenil]-6-(trifluorometil)piridino-3-carboxamida



[0038] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 6-(trifluorometil)nicotínico (CAS RN: 158063-66-2) no lugar de 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 352,2 ([M+H]⁺).

Exemplo 12 (exemplo comparativo)

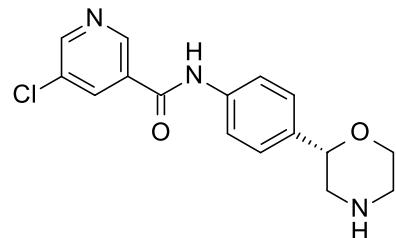
5-Cloro-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridino-2-carboxamida



[0039] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 5-cloro-picolínico (CAS RN: 86873-60-1) no lugar de ácido 5-etil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 320,1 ([{³⁷Cl}]M+H)⁺, 318,2 ([{³⁵Cl}]M+H)⁺.

Exemplo 13 (exemplo comparativo)

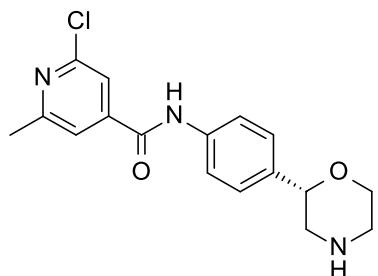
5-Cloro-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridino-3-carboxamida



[0040] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 5-cloro-nicotínico (CAS RN: 22620-27-5) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 320,1 ($[\{^{37}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$), 318,1 ($[\{^{35}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$).

Exemplo 14 (exemplo comparativo)

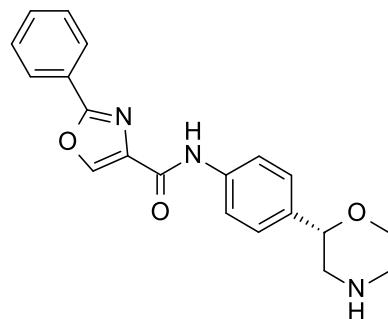
2-Cloro-6-metil-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridino-4-carboxamida



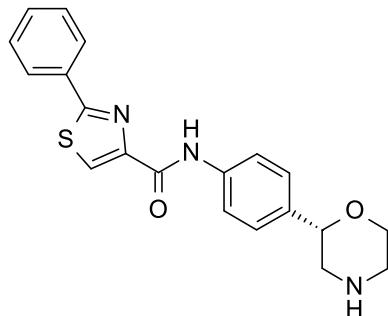
[0041] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 2-cloro-6-metilpiridino-4-carboxílico (CAS RN: 25462-85-5) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 334,1 ($[\{^{37}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$), 332,1 ($[\{^{35}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$).

Exemplo 15 (exemplo comparativo)

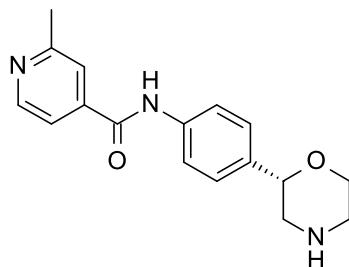
N-[4-[(2S)-Morfolin-2-il]fenil]-2-fenil-1,3-oxazol-4-carboxamida



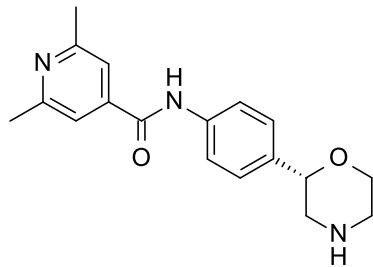
[0042] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 2-feniloxazol-4-carboxílico (CAS RN: 23012-16-0) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 350,2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Exemplo 16 (exemplo comparativo)N-[4-[(2S)-Morfolin-2-il]fenil]-2-fenil-1,3-tiazol-4-carboxamida

[0043] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 2-feniltiazol-4-carboxílico (CAS RN: 7113-10-2) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 366,1 ($[M+H]^+$).

Exemplo 17 (exemplo comparativo)2-Metil-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridino-4-carboxamida

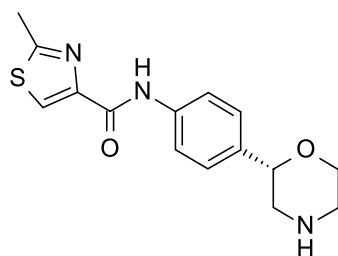
[0044] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 2-metil-isonicotínico (CAS RN: 4021-11-8) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 298,2 ($[M+H]^+$).

Exemplo 18 (exemplo comparativo)2,6-Dimetil-N-[4-[(2S)-morfolin-2-il]fenil]piridino-4-carboxamida

[0045] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 2,6-dimetil-isonicotínico (CAS RN: 54221-93-1) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 312,2 ([M+H]⁺).

Exemplo 19 (exemplo comparativo)

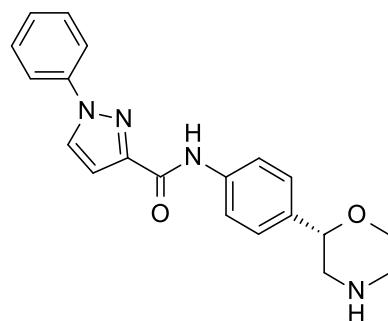
N-[4-[(2S)-Morfolin-2-il]fenil]-2-metil-1,3-tiazol-4-carboxamida



[0046] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 2-metiltiazol-4-carboxílico (CAS RN: 35272-15-2) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 304,1 ([M+H]⁺).

Exemplo 20 (exemplo comparativo)

N-[4-[(2S)-Morfolin-2-il]fenil]-1-fenilpirazol-3-carboxamida



[0047] O composto título foi obtido em analogia ao exemplo 1 usando ácido 1-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (CAS RN: 4747-46-0) no lugar de ácido 5-etyl-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico na etapa (a). Sólido branco. EM (ISP): 349,2 ([M+H]⁺).

[0048] Como mencionado acima, o composto da presente invenção tem vantagens significantes em relação a compostos da técnica anterior, vantagens que são atividade agonística potente no receptor de

TAAR1 humano, seletividade contra o transportador de dopamina (DAT), seletividade contra o canal de íon hERG e um vetor pouco anfifílico e desta maneira oferecendo um risco baixo de causar fosfolipidose induzida por fármaco (DIPL) (*vide infra*).

[0049] Os dados comparativos e comentários que seguem podem ser providos para mostrar as vantagens superiores do composto de Fórmula I em comparação com compostos conhecidos da técnica anterior.

1. Efeitos farmacológicos e potencial terapêutico de agonistas parciais do receptor associado à amina traço humana 1 (hTAAR1)

[0050] Há evidência de diferenças significantes entre espécies em interações ligante-receptor entre TAAR1 de roedor e humano^[1]. Desta maneira, quando selecionando compostos para uso como agentes terapêuticos humanos para o tratamento de doenças relacionadas a TAAR1, é importante priorizar compostos candidatos com base na potência de sua atividade funcional na forma humana do receptor de TAAR1 (hTAAR1). hTAAR1 é um receptor de transmembrana acoplado à proteína G (GPCR), desta maneira ligantes podem funcionar como antagonistas, agonistas, agonistas parciais ou agonistas inversos do receptor. O composto de Fórmula I e exemplos comparativos foram testados *in vitro* quanto à atividade funcional em hTAAR1, de maneira que o composto de Fórmula I foi verificado ser um agonista parcial de hTAAR1. Os valores de EC₅₀ de hTAAR1 experimentalmente determinados para o composto de Fórmula I e uma seleção de exemplos comparativos são mostrados na Tabela 1 (*vide infra*). O composto do exemplo 1 foi então verificado, em particular, ser um agonista parcial potente de hTAAR1 *in vitro*.

[0051] Experimentos de eletrofisiologia *ex vivo* na área tegmental ventral e núcleos dorsais da rafe mostraram que agonistas parciais de TAAR1 aumentaram taxas de disparo de neurônio de DA e 5-HT em

camundongos do tipo selvagem^[2,3], enquanto agonistas integrais tal como *p*-tiramina diminuíram as taxas de disparo^[3,4]. No entanto, ambos os agonistas integrais e parciais foram mostrados ser protetores contra os efeitos de recompensa e reforço do psicoestimulante cocaína^[5]. Enquanto agonistas integrais tal como anfetamina induzem *feedback* negativo para embotar seu próprio efeito sobre sistemas de DA e 5-HT^[6,7], agonistas parciais aumentariam seu efeito sobre transmissão de sinal neuronal através do aumento das taxas de disparo através de TAAR1. Devido a essas constatações, e os relatos que agonistas parciais de TAAR1 têm uma farmacologia *in vivo* mais rica em roedores do que agonistas integrais^[3,8], um forte corpo de evidência pré-clínica está emergindo, que sugere que agonistas parciais de TAAR1 mostram potencial altamente promissor para uso como agentes terapêuticos humanos para o tratamento de doenças do SNC incluindo, mas não limitado a, esquizofrenia, distúrbio bipolar, depressão, doença de Parkinson, bem como para o tratamento de vício de álcool e droga.

[0052] Por exemplo, agonistas parciais de TAAR1 são propostos ser superiores a fármacos antipsicóticos atípicos existentes ao exibirem eficácia antipsicótica com o benefício de cognição e humor melhores bem como com um perfil de efeito colateral reduzido (por exemplo, nenhuma indução da síndrome metabólica que é vista com antipsicóticos atuais)^[3,8]. Outra literatura sugere que possíveis indicações incluem distúrbio bipolar^[8], vício de droga^[5,9] e diabetes^[10].

Referências na literatura:

[1] Simmller, L. D.; Buchy, D.; Chaboz, S.; Hoener, M.C.; Liechti, M. E.; "In vitro characterization of psychoactive substances at rat, mouse and human trace amine-associated receptor 1". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2016**, Fast Forward article DOI: 10.1124/jpet.115.229765;

[2] Bradaia, A. e outros; "The selective antagonist EPPTB reveals TAAR1-mediated regulatory mechanisms in dopaminergic

neurons of the mesolimbic system". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 20081-20086;

[3] Revel, F. G. e outros; "Trace amine-associated receptor 1 partial agonism reveals novel paradigm for neuropsychiatric therapeutics". *Biol. Psychiatry* **2012**, *72*, 934-942;

[4] Revel, F. G. e outros; "TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 8485-8490;

[5] Pei, Y.; Mortas, P.; Hoener, M. C.; Canales, J. J.; "Selective activation of the trace amine-associated receptor 1 decreases cocaine's reinforcing efficacy and prevents cocaine-induced changes in brain reward thresholds". *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiatry* **2015**, *63*, 70-75;

[6] Lindemann, L. e outros; "Trace amine-associated receptor 1 modulates dopaminergic activity". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *324*, 948-956;

[7] Di Cara, B. e outros; "Genetic deletion of trace amine 1 receptors reveals their role in auto-inhibiting the actions of ecstasy (MDMA)". *J. Neuroscience* **2011**, *31*, 16928-16940;

[8] Revel, F. G. e outros; "A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight". *Mol. Psychiatry* **2013**, *18*, 543-556;

[9] Pei, Y.; Lee, J.; Leo, D.; Gainetdinov, R. R.; Hoener, M. C.; Canales, J. J.; "Activation of the trace amine-associated receptor 1 prevents relapse to cocaine seeking". *Neuropsychopharmacology* **2014**, *39*, 2299–2308;

[10] Raab, S. e outros; "Incretin-like effects of small molecule trace amine-associated receptor 1 agonists". *Mol. Metabolism*

2016, 5, 47-56.

2. Transportador de dopamina (DAT) e tendência associada a abuso de fármaco e/ou potencial de vício

[0053] A farmacologia do transportador de dopamina (DAT) foi implicada *inter alia* nos efeitos psicoestimulantes e na tendência a abuso e mecanismo de vício de certas drogas psicoestimulante tais como cocaína e MDPV^[1-3]. Desta maneira, para um novo agente terapêutico pretendido para uso humano, é desejável evitar inibição do, ou interação com o, transportador de dopamina DAT a fim de minimizar o risco de tendência a abuso ou potencial para vício.

[0054] Por exemplo, evidência sugere que efeitos de reforço da cocaína dependem de sua habilidade em bloquear rapidamente o transportador de dopamina (DAT). Em estudos animais, inibidores de reabsorção de dopamina que não cocaína são também autoadministrados, com uma potência relativa que geralmente se relaciona positivamente com sua potência em inibir o DAT, mas não os transportadores de serotonina ou norepinefrina (SERT, NET)^[4,8]. Animais treinados para autoadministrar cocaína também autoadministrarão agonistas de dopamina diretos^[9-11]. Ainda, destruição de terminais nervosos de dopamina pode levar à extinção de comportamento de autoadministração de cocaína^[12,13], e esses efeitos foram observados mesmo quando resposta mantida por outros reforçadores foi preservada^[14,15]. Em humanos, "intoxicação" induzida por cocaína se relaciona com ocupação de DAT no cérebro^[16].

[0055] Para testar mais a hipótese que DAT é essencial para efeitos de reforço de cocaína, um DAT funcional, mas "insensível à cocaína", foi gerado e expresso em camundongos^[17,18]. Este DAT mutante demonstrou uma afinidade 89 vezes menor com cocaína em relação a DAT do tipo selvagem, e a cocaína falhou em aumentar a dopamina extracelular no núcleo acumbente, ou induzir aumentos em atividade

locomotora, estereotipias, ou preferências de lugar condicionadas, em camundongos inativados (DATki) expressando este DAT mutante^[18-20]. Ainda, a cocaína falhou em servir como um reforçador positivo nesses camundongos DATki, enquanto alimento, d-anfetamina e um agonista de dopamina direto mantiveram de forma confiável comportamento operante nesses camundongos, em níveis comparáveis com camundongos do tipo selvagem^[21]. Reintrodução do DAT do tipo selvagem sensível à cocaína em áreas do cérebro *inter alia* a área tegmental ventral (VTA) levou à restauração de comportamento de recompensa de cocaína nos camundongos DATki^[22]. Concluindo, a habilidade da cocaína em bloquear DAT é suficiente para abolir seus efeitos de reforço em camundongos provendo forte evidência que bloqueio de DAT é crítico para efeitos de reforço de cocaína.

[0056] Desta maneira, juntas, essas constatações sugerem que para um novo agente terapêutico pretendido para uso humano, é altamente desejável evitar inibição do, ou interação com o, transportador de dopamina DAT a fim de minimizar o risco de tendência a abuso ou potencial para vício.

[0057] Os DAT K_i *in vitro* medidos para uma série de compostos TAAR1 são mostrados na Tabela 1 (*vide infra*). Foi surpreendentemente constatado que o Exemplo 1 é um ligante significantemente mais fraco em DAT do que outros compostos, enquanto sendo simultaneamente um agonista parcial potente de hTAAR1 e, desta maneira, a razão de seletividade de hTAAR1/DAT para o Exemplo 1 é显著mente maior do que para outros compostos.

Referências na literatura:

[1] Meil, W. M. e Boja, J. W.; "The dopamine transporter and addiction." Chapter 1, pp. 1-21 em *Neurochemistry of Abused Drugs* (Karch, S. B., Ed.), CRC Press (2008);

[2] Simmler, L. D. e outros; "Pharmacological

characterization of designer cathinones *in vitro*". *Brit. J. Pharmacol.* **2013**, *168*, 458-470;

[3] Baumann, M. H.; Partilla, J. S.; Lehner, K. R.; "Psychoactive 'bath salts': not so soothing". *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *698*, 1-5;

[4] Ritz., M. C.; Lamb, R. J.; Goldberg, S. R.; Kuhar, M. J.; "Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine". *Science* **1987**, *237*, 1219-1223;

[5] Bergmann., J.; Madras, B. K.; Johnson, S. E.; Spealman, R. D.; "Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. III. Self-administration by squirrel monkeys". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, *251*, 150-155;

[6] Howell., L. L. & Byrd, L. D.; "Serotonergic modulation of the behavioural effects of cocaine in the squirrel monkey". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *275*, 1551-1559;

[7] Roberts, D. C. S. e outros; "Self-administration of cocaine analogs by rats". *Psychopharmacology* **1999**, *144*, 389-397;

[8] Wee, S. e outros; "Relationship between serotonergic activity and reinforcing effects of a series of amphetamine analogs". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313*, 848-854;

[9] Woolverton, W. L.; Goldberg, L. I.; Ginos, J. Z.; "Intravenous self-administration of dopamine receptor agonists by Rhesus monkeys". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**, *230*, 678-683;

[10] Wise, R. A.; Murray, A.; Bozarth, M. A.; "Bromocriptine self-administration and bromocriptine-reinstatement of cocaine-trained and heroin-trained lever pressing in rats". *Psychopharmacology* **1990**, *100*, 355-360;

[11] Caine, S. B. & Koob, G. F.; "Modulation of cocaine self-administration in the rat through D-3 dopamine receptors". *Science* **1993**, *260*, 1814-1816;

[12] Roberts, D. C. S.; Corcoran, M. E.; Fibiger, H. C.; "On the role of ascending catecholaminergic systems in intravenous self-administration of cocaine". *Pharmacol. Biochem. Behaviour* **1977**, *6*, 615-620;

[13] Roberts, D. C. S.; Koob, G. F.; Klonoff, P.; Fibiger, H. C.; "Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens". *Pharmacol. Biochem. Behaviour* **1980**, *12*, 781-787;

[14] Pettit, H. O.; Ettenberg, A.; Bloom, F. E.; Koob, G. F.; "Destruction of dopamine in the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats". *Psychopharmacology* **1984**, *84*, 167-173;

[15] Caine, S. B. & Koob, G. F.; "Effects of mesolimbic dopamine depletion on responding maintained by cocaine and food". *J. Exp. Anal. Behavior* **1994**, *61*, 213-221;

[16] Volkow, N. D. e outros; "Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy". *Nature* **1997**, *386*, 827-830;

[17] Chen, R.; Han, D. D.; Gu, H. H.; "A triple mutation in the second transmembrane domain of mouse dopamine transporter markedly decreases sensitivity to cocaine and methylphenidate". *J. Neurochem.* **2005**, *94*, 352-359;

[18] Chen, R. e outros; "Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9333-9338;

[19] Tilley, M. R. & Gu, H. H.; "Dopamine transporter inhibition is required for cocaine-induced stereotypy". *Neuroreport* **2008**, *19*, 1137-1140;

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

Neuroreport **2009**, *20*, 9-12;

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

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

3. Bloqueio de hERG e tendência associada a prolongamento de intervalo QT cardíaco

[0058] Minimização da probabilidade em causar efeitos colaterais cardíacos induzidos por fármaco é altamente desejável para um agente terapêutico pretendido para uso seguro em humanos, especialmente para um fármaco pretendido ser usado para regimes de tratamento crônicos. Nos últimos anos, autoridades reguladoras retardaram a aprovação ou impuseram restrições ao uso de, e até mesmo negaram aprovação ou retiraram do mercado, agentes terapêuticos prolongando o intervalo QT cardíaco. O intervalo QT é o tempo desde o início do complexo QRS até o final da onda T do eletrocardiograma (ECG) e é uma medida da duração de despolarização e repolarização ventricular. Fármacos prolongando o intervalo QT foram associados com uma taquicardia ventricular polimórfica referida como *Torsades de Pointes* (TdP). Esta arritmia pode causar sérios resultados cardiovasculares e pode progredir para fibrilação ventricular irreversível e morte. A orientação reguladora ICH S7B^[1] recomenda uma estratégia não clínica geral para avaliação de risco cardiovascular de novas entidades moleculares (NMEs) que inclui o ensaio IK_r *in vitro* [corrente de potássio conduzida pelo gene relacionado a *ether-a-go-go* humano (hERG)]. Inibição de hERG foi identificada como o mecanismo principal de prolongamento de QT^[2]. Desta maneira, a estratégia de redução de

risco de intervalo QT não clínica mínima recomendada é testar compostos representativos de uma dada série química no ensaio de hERG *in vitro*^[3]. O objetivo é selecionar compostos causando não mais do que 20% de inibição de hERG nas concentrações pelo menos 30 vezes abaixo da concentração *in vitro* eficaz (ou *in vivo* se disponível) para atividade terapêutica. No caso de agonistas de TAAR1, a EC₅₀ de hTAAR1 pode ser considerada como a concentração *in vitro* relevante preditiva de atividade terapêutica (*vide supra*). Desta maneira é desejável selecionar agonistas de TAAR1 onde a razão de IC₂₀ hERG/EC₅₀ hTAAR1 seja pelo menos 30 vezes.

[0059] As IC₂₀ e IC₅₀ de hERG *in vitro* medidas para uma série de compostos TAAR1 são mostradas na Tabela 1 (*vide infra*).

[0060] Compostos básicos em particular são conhecidos ser especificamente propensos a causar inibição potente do canal de hERG^[4]. Todos os compostos TAAR1 carregam o mesmo grupo de cabeça morfolino, desta maneira todos os compostos são esperados ser similarmente básicos. A porção básica é requerida para atividade agonista em hTAAR1. Foi surpreendentemente constatado que o Exemplo 1 é um inibidor de canal de hERG significantemente mais fraco do que os compostos comparativos e, desta maneira, a razão IC₂₀ hERG/EC₅₀ hTAAR1 para o Exemplo 1 é显著mente maior do que o mínimo de 30 vezes recomendado.

Referência na literatura:

[1] ICH Guideline. "The nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals (S7B)" issued as CPMP/ICH/423/02, adopted by CHMP in May 2005; <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/safety-single/article/the-non-clinical-evaluation-of-the-potential-for-delayed-ventricular-repolarization-qt-interval-pro.html>

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

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

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

4 Anfifilicidade e tendência associada à fosfolipidose induzida por fármaco (DIPL)

[0061] Fosfolipidose (PLD) é um distúrbio de armazenamento lisossomal caracterizado pelo acúmulo excessivo de fosfolipídeos em tecidos^{[1][2][3]}. Muitos fármacos anfifílicos catiônicos, incluindo antidepressivos, antianginosos, antimáláricos e agentes de diminuição do colesterol, são relatados causar fosfolipidose induzida por fármaco (DIPL) em animais e humanos. Os mecanismos de DIPL envolvem aprisionamento ou absorção seletiva de fármacos de DIPL dentro dos lisossomos e vesículas ácidas de células afetadas. Aprisionamento de fármaco é seguido por um acúmulo gradual de complexos de fármaco-fosfolipídeo dentro das membranas lisossomais internas. O aumento em materiais não digeridos resulta no acúmulo anormal de corpos multilamelares (corpos mieloides) em tecidos. Embora fosfolipidose seja considerada principalmente um distúrbio de armazenamento, com alguns compostos o distúrbio de armazenamento é conhecido estar

associado com inflamação e necrose levando a prejuízo funcional dos tecidos afetados. É então altamente desejável que um fármaco terapêutico não ofereça um risco de causar DIPL. Isto é especialmente verdadeiro no caso de remédios pretendidos para uso crônico, por exemplo, fármacos pretendidos para o tratamento de distúrbios psiquiátricos crônicos tal como esquizofrenia, distúrbio bipolar ou depressão, ou fármacos pretendidos para o tratamento de distúrbios metabólicos crônicos tal como diabetes.

[0062] DIPL é um efeito adverso conhecido estar particularmente associado com fármacos anfifílicos catiônicos (CAD)^[4]. Para evitar DIPL ou a pK_a básica (pK_a básica < 6,3) ou anfifilicidade ($\Delta\Delta G_{am} > -6$ kJ mol⁻¹) de um composto tem que ser reduzida (isto é, $\Delta\Delta G_{am}$ precisa ser aumentada)^[5]. Um composto é classificado como negativo para DIPL se ou o valor de pK_a básica estiver abaixo de 6,3 ou a anfifilicidade estiver acima de $\Delta\Delta G_{am} = -6$ kJ mol⁻¹. A anfifilicidade para um dado composto pode ser calculada *in silico* diretamente a partir da fórmula estrutural molecular^[6] e desta maneira o risco previsto para DIPL para este composto também pode ser calculado *in silico*^[5], desta maneira o algoritmo de predição usa uma classificação de risco de DIPL definida de acordo com os critérios que seguem, que são baseados nos parâmetros extraídos de um conjunto de treinamento computacional compreendendo resultados de fosfolipose experimentalmente determinados para um conjunto grande de compostos:

VETOR ANFIFÍLICO > -5,0 kJ/mol e $BPKA1 \leq 5,60$ resulta em predição de DIPL negativa;

$-7,0 \text{ kJ/mol} < \text{VETOR ANFIFÍLICO} < -5,0 \text{ kJ/mol}$ e/ou $7,0 > BPKA1 > 5,60$ resulta em predição de DIPL LIMÍTROFE;

VETOR ANFIFÍLICO < -7,0 kJ/mol e $BPKA1 \geq 7,00$ resulta em predição de DIPL POSITIVA.

[0063] As anfifilicidades calculadas ($\Delta\Delta G_{am}$ em kJ mol⁻¹) bem como

as predições de risco de DIPL *in silico* (negativa/limítrofe/positiva) para uma série de compostos TAAR1 são mostradas na Tabela 1 (*vide infra*).

[0064] Todos os compostos TAAR1 carregam o mesmo grupo de cabeça morfolino, desta maneira a pK_a básica de todos os compostos é muito similar e claramente acima de 6,3. A porção básica é requerida para atividade agonista em hTAAR1. Desta maneira, a única maneira de evitar DIPL é reduzir a lipofilicidade da estrutura principal da molécula. Foi surpreendentemente constatado que para o Exemplo 1 a lipofilicidade é reduzida显著mente mais do que esperado com base nos resultados para compostos similares e, desta maneira, a anfifilicidade do Exemplo 1 é claramente reduzida e, como uma consequência, este composto não é predito causar DIPL.

Referências na literatura:

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

the calculation of amphiphilic properties of charged drug molecules". *Chimia* **2000**, *54*, 640-645.

[0065] Os compostos foram investigados de acordo com os testes dados abaixo.

Materiais e Métodos

TAAR1 Humano

[0066] Para a construção de plasmídeos de expressão as sequências de codificação de TAAR1 humano foram amplificadas a partir de DNA genômico essencialmente como descrito por Lindemann e outros^[14]. O Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics) foi usado com 1,5 nM de Mg²⁺ e produtos de PCR purificados foram克隆ados em vetor de clonagem pCR2.1-TOPO (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Produtos de PCR foram subclonados no vetor pIRESneo2 (BD Clontech, Palo Alto, Califórnia) e vetores de expressão foram verificados na sequência antes da introdução nas linhagens de célula.

[0067] Células HEK293 (ATCC # CRL-1573) foram culturadas essencialmente como descrito por Lindermann e outros (2005). Para a geração de linhagens de célula estavelmente transfectadas, células HEK293 foram transfectadas com os plasmídeos de expressão pIRESneo2 contendo as sequências de codificação de TAAR (descritas acima) com Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e 24 h após a transfecção o meio de cultura foi suplementado com 1 mg/ml de G418 (Sigma, Buchs, Suíça). Após um período de cultura de cerca de 10 d clones foram isolados, expandidos e testados quanto à responsividade a aminas traço (todos os compostos comprados da Sigma) com o cAMP Biotrak Enzyme immunoassay (EIA) System (Amersham) seguindo o procedimento EIA de não acetilação provido pelo fabricante. Linhagens de célula monoclonais que exibiram uma EC₅₀ estável para um período de cultura de 15 passagens foram

usadas para todos os estudos subsequentes.

[0068] Medições de cAMP foram realizadas como anteriormente descrito (Revel e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 8485-8490). Em suma, células que expressaram TAAR1 humano foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (BIOCOAT 6640; Becton Dickinson, Allschwill, Suíça) e incubadas por 20 h a 37°C. Antes da estimulação das células com uma faixa de concentração ampla de agonistas por 30 min a 37°C, as células foram lavadas com PBS e preincubadas com PBS que continha 3-isobutil-1-metilxantina 1 mM por 10 min a 37°C e CO₂ 5%. Estimulação com DMSO 0,2% foi ajustada como o nível basal e o efeito de β-PEA 30 μM foi ajustado como a resposta máxima. Subsequentemente, as células foram lisadas e ensaios de cAMP foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (cAMP kit; Upstate/Millipore, Schaffhausen, Suíça). Finalmente, as placas foram lidas com um luminômetro (1420 Multilabel counter; PerkinElmer, Schwerzenbach, Suíça) e a quantidade de cAMP foi calculada. Os resultados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes. Os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata. Valores de EC₅₀ são apresentados como média ± desvio padrão (em μM). O valor de E_{max} para os dados de atividade funcional em TAAR1 descreve o grau de atividade funcional comparado com 100% para o ligante endógeno e agonista integral β-PEA.

DAT Humano

[0069] Ligação a transportador de dopamina (DAT) *in vitro*. Células de rim embrionário humanas 293 (HEK) (Invitrogen, Zug, Suíça) estavelmente transfectadas com DAT humano foram culturadas. As células foram coletadas e lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os peletes foram congelados a -80°C. Os peletes foram então ressuspensos em 400 ml de HEPES-NaOH 20 mM, pH 7,4, que continha EDTA 10 mM a 4°C. Após homogeneização

com Polytron (Kinematica, Lucerne, Suíça) a 10000 rotações por minuto (rpm) por 15 s, os homogenatos foram centrifugados a 48000 x g por 30 min a 4°C. Alíquotas dos estoques de membrana foram congeladas a -80°C. Todos os ensaios foram realizados pelo menos três vezes. Os compostos de teste foram diluídos em 20 ml de tampão de ligação (NaCl 252 mM, KCl 5,4 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, KH₂PO₄ 3,52 mM, pH 7,4) e curvas de diluição de 10 pontos foram feitas e transferidas para placas de ensaio de poliestireno brancas de 96 cavidades (Sigma Aldrich, Buchs, Suíça). [³H]-WIN35,428 (~86 Ci/mmol; Perkin-Elmer) foi o radioligante para o ensaio de DAT e tinha uma K_d de 12 nM. Cinquenta microlitros de [³H]-WIN35,428 (~concentração de ~40 nM) foram adicionados a cada cavidade das placas de ensaio de hDAT, atingindo uma concentração de [³H]-WIN35,428 final de 10 nM. Vinte microlitros de tampão de ligação sozinho na placa de ensaio definiram a ligação total, enquanto ligação na presença de 10 µM de indatralina definiu ligação não específica. Estoques de membrana de DAT congelados foram descongelados e ressuspensos para uma concentração de aproximadamente 0,04 mg de proteína/ml de tampão de ligação (1:1 diluído em H₂O) usando um homogeneizador de tecido Polytron. Os homogenatos de membrana (40 µg/ml) foram então misturados levemente por 5-30 min com contas de ensaio de proximidade de cintilação revestidas com aglutinina de germe de trigo (WGASPA) tolueno de polivinila (PCT); Amersham Biosciences) a 7,7 mg contas/ml homogenato. Cento e trinta microlitros da mistura de membrana/conta foram adicionados a cada cavidade da placa de ensaio que continha radioligante e compostos de teste (volume final em cada cavidade, 200 µl) para iniciar o ensaio, que foi incubada por aproximadamente 2 h e temperatura ambiente com agitação. As placas de ensaio foram então contadas no modo de contagem PVT SPA de um Packard Topcount. Cinquenta microlitros dos estoques de [³H]-WIN35428 foram contados

em 5 ml de coquetel de cintilação ReadySafe (Bekcman Industries) em um contador de cintilação líquida Packard 1900CA para determinar as contagens totais adicionadas aos respectivos ensaios. Regressão não linear foi usada para ajustar os dados a curvas sigmoides e determinar valores de IC_{50} para ligação e absorção. Valores de K_i para ligação e absorção foram calculados usando a equação Cheng-Prusoff: $K_i = IC_{50}/(1+ [S]/K_m)$.

ERG Humano (hERG)

[0070] A técnica de *patch-clamp* de célula inteira foi usada para investigar os efeitos dos itens de teste sobre canais de potássio de hERG (gene relacionado a *ether-a-go-go* humano) em células CHO estavelmente transfectadas próximo da temperatura fisiológica ($36 \pm 1^\circ\text{C}$). Os efeitos de compostos sobre parâmetros de corrente de K^+ hERG foram avaliados em 4 concentrações (0,3-3-30-300 μM) em pelo menos 3 células CHO expressando estavelmente o canal de hERG. Para medições eletrofisiológicas as células foram semeadas em placas de cultura estéreis de 35 mm contendo 2 ml de meio de cultura sem Higromicina B. As células foram cultivadas em uma densidade que permitiu que células sozinhas (sem conexões visíveis com células vizinhas) fossem medidas. As células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada com CO_2 5% (umidade relativa de cerca de 95%). As células foram continuamente mantidas em e passadas em frascos de cultura estéreis contendo mistura de nutriente F-12 (DMEM/F-12 com L-Glutamina) suplementada com soro bovino fetal 10% e solução de penicilina/estreptomicina 10%. Todos os dias pelo menos três células foram tratadas com um bloqueador de IK_r seletivo (E-4031, substância de referência) para assegurar precisão do método. As placas de cultura de 35 mm sobre as quais as células foram semeadas em uma densidade permitindo que células sozinhas fossem registradas foram postas em um porta-placa do microscópio e continuamente perfundidas

(em aproximadamente 1 ml/min) com a solução de banho (cloreto de sódio 150 mM, cloreto de potássio, 4 mM, cloreto de cálcio 1,2 mM, cloreto de magnésio 1 mM, HEPES 10 mM, pH (NaOH) 7,4) em temperatura próximo da fisiológica ($36 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Após formação de uma vedação de Gigaohm entre os eletrodos do *patch* e células CHO estavelmente transfetadas com hERG individual (faixa de resistência da pipeta: 2,0 MΩ - 7,0 MΩ; faixa de resistência da vedação: $> 1 \text{ G}\Omega$) a membrana celular através da ponta da pipeta foi rompida para assegurar acesso elétrico ao interior da célula (configuração de *patch* de célula inteira). No caso da qualidade da vedação ser pobre, o processo de formação de vedação foi repetido com uma célula diferente e uma nova pipeta. Assim que uma vedação estável foi estabelecida, correntes de cauda de saída de hERG foram medidas quando da despolarização da membrana celular para -40 mV por 50 EM seguido por 500 EM a +20 mV (ativação de canais) de um potencial fixado de -80 mV e quando da subsequente repolarização para -40 mV por 500 EM. Este protocolo de tensão foi operado pelo menos 10 vezes em intervalos de 10 s. Se densidade de corrente foi julgada ser muito baixa para medição, uma outra célula foi registrada. Uma vez os registros de controle tendo sido efetuados, as células foram continuamente perfundidas com uma solução de banho contendo os itens de teste. Durante a lavagem do item de teste o protocolo de tensão indicado acima foi operado continuamente novamente em intervalos de 10 s até que o nível de estado uniforme de bloco foi atingido. As quatro concentrações de item de teste do composto foram aplicadas sequencialmente a 3 células de uma maneira cumulativa. Como correntes de cauda de hERG foram inibidas pelo item de teste, a curva de concentração-resposta foi gerada e valor de IC₅₀ calculado. Com base no valor de IC₅₀ a IC₂₀ foi estimada. Cada concentração do item de teste foi analisada em três experimentos (n=3).

Cálculo de vetor anfifílico ($\Delta\Delta G_{am}$) e predição de DIPL *in silico*

[0071] Vetor anfifílico ($\Delta\Delta G_{am}$) e predição de DIPL *in silico* foram computacionalmente determinados a partir da fórmula estrutural molecular para o composto de Fórmula I e compostos comparativos de acordo com os algoritmos publicados (Fischer, H.; Kansy, M.; Bur, D.; "CAFCA: a novel tool for the calculation of amphiphilic properties of charged drug molecules". *Chimia* **2000**, 54, 640-645; Fischer, H.; Atzpodien, E. A.; Csato, M; Doessegger, L.; Lenz, B.; Schmitt, G.; Singer, T.; "*In silico* assay for assessing phospholipidosis potential of small drug like molecules: training, validation and refinement using several datasets." *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 126–139).

[0072] O composto de Fórmula I tem atividade agonista parcial sobre hTAAR1 (EC₅₀ em μM), afinidade de ligação em hDAT (K_i em μM) e atividade de bloqueio de canal em hERG (IC₂₀ e IC₅₀ em μM) como mostrado na Tabela 1. A Tabela 1 também mostra o vetor anfifílico calculado ($\Delta\Delta G_{am}$ em kJ mol^{-1}) e estimativa de fosfolipidose *in silico* (predição negativa/positiva/limítrofe para DIPL *in vitro* e DIPL *in vivo*) para o composto de Fórmula I e compostos comparativos, conforme calculado usando o procedimento descrito acima.

Tabela 1

No. Exemplo	Estrutura	EC ₅₀ hTAAR1 (μM)	Eficácia hTAAR1 *(%)	IC ₅₀ hERG (μM)	IC ₂₀ hERG (μM)	Razão IC ₂₀ hERG/EC ₅₀ hTAAR1
1		0,0585	42	216,60	36,20	619
2		0,2632	38	-	-	-
3		0,0377	45	9,84	1,97	52
4		0,0619	49	49,67	12,42	201
5		0,0656	40	81,71	22,16	338

Tabela 1 –continuação-

No. Exemplo	Estrutura	EC ₅₀ hTAAR1 (μM)	Eficácia hTAAR1 *(%)	IC ₅₀ hERG (μM)	IC ₂₀ hERG (μM)	Razão IC ₂₀ hERG/EC ₅₀ hTAAR1
6		0,08	30	1,31	0,38	5
7		0,0849	57	11,39	3,67	43
8		0,1086	33	10,78	3,01	28
9		0,1437	32	4,46	1,14	8
10		0,1837	38	31,72	5,78	31

Tabela 1 –continuação-

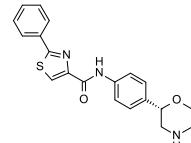
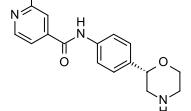
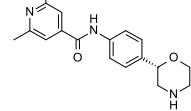
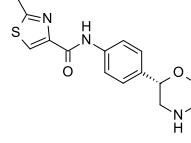
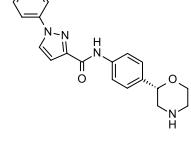
Tabela 1 –continuação-

Tabela 1 – continuação-

Tabela 1 – continuação-

Tabela 1 – continuação-

Tabela 1 – continuação-

No. Exemplo	Estrutura	Fosfolipidose $\Delta\Delta G_{\text{am}}$ (kJ mol ⁻¹)	Fosfolipi-dose <i>in silico</i> (<i>in vitro</i>)	Fosfolipi-dose <i>in silico</i> (<i>in vivo</i>)	K _i DAT (μM)	Razão K _i DAT / EC ₅₀ hTAAR1
16		-8,48	POSITIVA	POSITIVA	16,22	24
17		-4,53	NEGATIVA	NEGATIVA	10,32	15
18		-5,82	NEGATIVA	LIMÍTROFE	>26,1	>32
19		-4,59	NEGATIVA	NEGATIVA	21,9	21
20		-5,37	NEGATIVA	LIMÍTROFE	>26,1	>11

*% de atividade agonista para hTAAR1 é relatada em uma escala calibrada de maneira que o efeito do ligante endógeno β -feniletilamina = 100% de agonismo

[0073] Foi surpreendentemente constatado que o composto de Fórmula I (exemplo 1) exibe uma combinação superior geral de propriedades em termos de atividade agonista potente em hTAAR1, seletividade alta contra hDAT, seletividade alta contra hERG, vetor pouco anfifílico e consequentemente risco de fosfolipidose baixo comparado com outros compostos TAAR1 da técnica anterior. Inspeção da Tabela 1 divulga que o exemplo 1 tem atividade agonista parcial em hTAAR1 ($EC_{50} = 0,059 \mu M$), é altamente seletivo contra hDAT ($K_i = 27,5 \mu M$; razão de seletividade = 471 vezes versus EC_{50} hTAAR1), é altamente seletivo contra hERG ($IC_{20} = 36,2 \mu M$; razão de seletividade = 619 vezes versus EC_{50} hTAAR1) e tem um vetor pouco anfifílico ($\Delta\Delta G_{am} = 3,47 \text{ kJ mol}^{-1}$) bem abaixo do limiar de preocupação para lipidose (predição de risco de DIPL *in silico* = negativa).

[0074] Inspeção da Tabela 1 divulga que análogos próximos do exemplo 1 têm propriedades inferiores comparado com exemplo 1 em uma ou mais considerações.

[0075] Por exemplo, o exemplo comparativo 2, que é o enantiômero *R* do exemplo 1, é menos potente em hTAAR1 ($EC_{50} = 0,2632 \mu M$), que ensina que a configuração *S* de estereoquímica absoluta, como no exemplo 1, é preferida a fim de obter potência maior em hTAAR1.

[0076] O exemplo comparativo 3 é显著mente mais potente em hERG ($IC_{20} = 1,97 \mu M$; razão de seletividade = 52-vezes versus EC_{50} hTAAR1) e também tem um vetor anfifílico显著mente superior ($\Delta\Delta G_{am} = - 6,3 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL positiva.

[0077] O exemplo comparativo 4 é显著mente mais potente em DAT ($K_i = 2,5 \mu M$; razão de seletividade = 40 vezes versus EC_{50} hTAAR1) e também tem um vetor anfifílico superior ($\Delta\Delta G_{am} = - 5,3 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL limítrofe.

[0078] O exemplo comparativo 5 é显著mente mais potente em DAT ($K_i = 1,5 \mu M$; razão de seletividade = 23 vezes versus EC_{50}

hTAAR1) e também tem um vetor anfifílico superior ($\Delta\Delta G_{am} = - 5,9 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL limítrofe.

[0079] O exemplo comparativo 6 é显著mente mais potente em hERG ($IC_{20} = 0,38 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 5-vezes versus EC_{50} hTAAR1), é mais potente em DAT ($K_i = 5,9 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 74-vezes versus EC_{50} hTAAR1) e também tem um vetor anfifílico显著mente superior ($\Delta\Delta G_{am} = - 8,46 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL positiva.

[0080] O exemplo comparativo 7 é显著mente mais potente em hERG ($IC_{20} = 3,57 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 43-vezes versus EC_{50} hTAAR1), é显著mente mais potente em DAT ($K_i = 0,79 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 9-vezes versus EC_{50} hTAAR1) e também tem um vetor anfifílico显著mente superior ($\Delta\Delta G_{am} = - 7,41 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL positiva.

[0081] O exemplo comparativo 8 é显著mente mais potente em hERG ($IC_{20} = 3,01 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 28-vezes versus EC_{50} hTAAR1).

[0082] O exemplo comparativo 9 é menos potente em hTAAR1 ($EC_{50} = 0,144 \mu\text{M}$), é显著mente mais potente em hERG ($IC_{20} = 1,14 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 8-vezes versus EC_{50} hTAAR1), é显著mente mais potente em DAT ($K_i = 0,48 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 3-vezes versus hTAAR1 EC_{50}) e também tem um vetor anfifílico显著mente superior ($\Delta\Delta G_{am} = - 8,83 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL positiva.

[0083] O exemplo comparativo 10 é menos potente em hTAAR1 ($EC_{50} = 0,184 \mu\text{M}$) e é mais potente em hERG ($IC_{20} = 5,78 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 31-vezes versus EC_{50} hTAAR1).

[0084] O exemplo comparativo 11 é menos potente em ($EC_{50} = 0,203 \mu\text{M}$), é显著mente mais potente em hERG ($IC_{20} = 2,59 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 13-vezes versus EC_{50} hTAAR1), é

significantemente mais potente em DAT ($K_i = 2,33 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 12-vezes versus hTAAR1 EC_{50}) e também tem um vetor anfifílico显著mente superior ($\Delta\Delta G_{\text{am}} = - 6,18 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL positiva.

[0085] O exemplo comparativo 12 é menos potente em hTAAR1 ($EC_{50} = 0,212 \mu\text{M}$), é significantemente mais potente em hERG ($IC_{20} = 3,21 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 15-vezes versus EC_{50} hTAAR1), é significantemente mais potente em DAT ($K_i = 1,78 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 8-vezes versus EC_{50} hTAAR1) e tem também um vetor anfifílico显著mente superior ($\Delta\Delta G_{\text{am}} = - 6,59 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL positiva.

[0086] O exemplo comparativo 13 é significantemente menos potente em hTAAR1 ($EC_{50} = 0,405 \mu\text{M}$), é mais potente em hERG ($IC_{20} = 9,14 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 23-vezes versus EC_{50} hTAAR1), é significantemente mais potente em DAT ($K_i = 1,31 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 3-vezes versus EC_{50} hTAAR1) e tem também um vetor anfifílico显著mente superior ($\Delta\Delta G_{\text{am}} = - 6,23 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL positiva.

[0087] O exemplo comparativo 14 é significantemente menos potente em hTAAR1 ($EC_{50} = 0,447 \mu\text{M}$), é significantemente mais potente em DAT ($K_i = 7,32 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 16-vezes versus EC_{50} hTAAR1) e tem também um vetor anfifílico显著mente superior ($\Delta\Delta G_{\text{am}} = - 6,96 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL positiva.

[0088] O exemplo comparativo 15 é significantemente menos potente em hTAAR1 ($EC_{50} = 0,663 \mu\text{M}$), é significantemente mais potente em hERG ($IC_{20} = 2,40 \mu\text{M}$; razão de seletividade = 4-vezes versus EC_{50} hTAAR1) e tem também um vetor anfifílico显著mente superior ($\Delta\Delta G_{\text{am}} = - 7,4 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL positiva.

[0089] O exemplo comparativo 16 é显著mente menos potente em hTAAR1 ($EC_{50} = 0,666 \mu M$), é显著mente mais potente em hERG ($IC_{20} = 3,35 \mu M$; razão de seletividade = 5-vezes versus EC_{50} hTAAR1) e tem também um vetor anfifílico significantemente superior ($\Delta\Delta G_{am} = - 8,48 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL positiva.

[0090] O exemplo comparativo 17 é显著mente menos potente em hTAAR1 ($EC_{50} = 0,673 \mu M$) e é mais potente em DAT ($K_i = 10,32 \mu M$; razão de seletividade = 15-vezes versus EC_{50} hTAAR1).

[0091] O exemplo comparativo 18 é显著mente menos potente em hTAAR1 ($EC_{50} = 0,827 \mu M$) e tem também um vetor anfifílico superior ($\Delta\Delta G_{am} = - 5,82 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL limítrofe.

[0092] O exemplo comparativo 19 é显著mente menos potente em hTAAR1 ($EC_{50} = 1,025 \mu M$) e é mais potente em hERG ($IC_{20} = 8,32 \mu M$; razão de seletividade = 8-vezes versus EC_{50} hTAAR1).

[0093] Finalmente, o exemplo comparativo 20 é显著mente menos potente em hTAAR1 ($EC_{50} = 2,48 \mu M$), é显著mente mais potente em hERG ($IC_{20} = 2,49 \mu M$; razão de seletividade = 1-vezes versus EC_{50} hTAAR1) e tem também um vetor anfifílico superior ($\Delta\Delta G_{am} = - 5,37 \text{ kJ mol}^{-1}$) e então uma predição de DIPL limítrofe.

[0094] Desta maneira, levando em consideração todos os dados na Tabela 1, o composto de Fórmula 1 (exemplo 1) é o composto mais preferido geral para o uso pretendido como um agente terapêutico seguro e eficaz para tratamento em humanos de distúrbios relacionados a TAAR1, especialmente para o tratamento de distúrbios crônicos do SNC, tais como depressão, distúrbios de ansiedade, distúrbio bipolar, distúrbio de déficit de atenção e hiperatividade (ADHD), distúrbios relacionados ao estresse, distúrbios psicóticos tal como esquizofrenia, doenças neurológicas tal como doença de Parkinson, distúrbios

neurodegenerativos tal como doença de Alzheimer, epilepsia, enxaqueca, hipertensão, abuso de substância, vício e distúrbios metabólicos tais como distúrbios alimentares, diabetes, complicações diabéticas, obesidade, dislipidemia, distúrbios de consumo de energia e assimilação, distúrbios e mau funcionamento de homeostase de temperatura corporal, distúrbios do sonho e ritmo circadiano e distúrbios cardiovasculares. Os distúrbios mais preferidos são esquizofrenia, distúrbio bipolar ou depressão.

[0095] O composto de Fórmula I e os sais farmaceuticamente aceitáveis do composto de Fórmula 1 podem ser usados como medicamentos, por exemplo, na forma de preparações farmacêuticas. As preparações farmacêuticas podem ser administradas oralmente, por exemplo, na forma de comprimidos, comprimidos revestidos, drágeas, cápsulas de gelatina dura e macia, soluções, emulsões ou suspensões. A administração pode, no entanto, ser também realizada retalmente, por exemplo, na forma de supositórios, ou parenteralmente, por exemplo, na forma de soluções para injeção.

[0096] O composto de Fórmula I pode ser processado com carreadores farmaceuticamente inertes, inorgânicos ou orgânicos para a produção de preparações farmacêuticas. Lactose, amido de milho ou seus derivados, talco, ácidos esteáricos ou seus sais e similar podem ser usados, por exemplo, como tais carreadores para comprimidos, comprimidos revestidos, drágeas e cápsulas de gelatina dura. Carreadores adequados para cápsulas de gelatina mole são, por exemplo, óleos vegetais, ceras, gorduras, polióis semissólidos e líquidos e similar. Dependendo da natureza da substância ativa quaisquer carreadores são, no entanto, geralmente requeridos no caso de cápsulas de gelatina mole. Carreadores adequados para a produção de soluções e xaropes são, por exemplo, água, polióis, glicerol, óleo vegetal e similar. Carreadores adequados para supositórios são, por

exemplo, óleos naturais ou endurecidos, polióis semilíquidos ou líquidos e similar.

[0097] As preparações farmacêuticas podem, além disso, conter conservantes, solubilizantes, estabilizadores, agentes umectantes, emulsificantes, adoçantes, corantes, saborizante, sais para variação da pressão osmótica, tampões, agentes de mascaramento ou antioxidantes. Elas podem também conter ainda outras substâncias terapeuticamente valiosas.

[0098] Medicamentos contendo um composto de Fórmula I ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e um carreador terapeuticamente inerte são também um objeto da presente invenção, como é um processo para sua produção, que compreende trazer o composto de Fórmula I e/ou sais de adição ácidos farmaceuticamente aceitáveis e, se desejado, uma ou mais outras substâncias terapeuticamente valiosas em uma forma de administração galênica junto com um ou mais carreadores terapeuticamente inertes.

[0099] As indicações mais preferidas de acordo com a presente invenção são aquelas que incluem distúrbios do sistema nervoso central, por exemplo, o tratamento ou prevenção de depressão, esquizofrenia e distúrbios bipolares.

[0100] A dosagem pode variar dentro de limites amplos e vai, com certeza, ter que ser ajustada para as necessidades individuais em cada caso particular. No caso de administração oral a dosagem para adultos pode variar de a partir de cerca de 0,01 mg a cerca de 1000 mg por dia de um composto de Fórmula geral I ou da quantidade correspondente de um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. A dosagem diária pode ser administrada como dose única ou em doses divididas e, ainda, o limite superior pode ser também excedido quando isso for verificado ser indicado.

Formulação de Comprimido (Granulação a Úmido)

<u>Item</u>	<u>Ingredientes</u>	<u>mg/comprimido</u>			
1.	Composto de Fórmula I	5	25	100	500
2.	Lactose Anidra DTG	125	105	30	150
3.	Sta-Rx 1500	6	6	6	30
4.	Celulose Microcristalina	30	30	30	150
5.	Estearato de magnésio	1	1	1	1
	Total	<u>167</u>	<u>167</u>	<u>167</u>	<u>831</u>

Procedimento de Fabricação

1. Misturar os itens 1, 2, 3 e 4 e granular com água purificada.
2. Secar os grânulos a 50°C.
3. Passar os grânulos por equipamento de moagem adequado.
4. Adicionar o item 5 e misturar por três minutos; prensar em uma prensa adequada.

Formulação em Cápsula

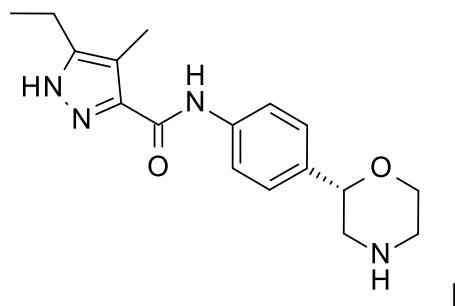
<u>Item</u>	<u>Ingredientes</u>	<u>mg/cápsula</u>			
1.	Composto de Fórmula I	5	25	100	500
2.	Lactose hidratada	159	123	148	--
3.	Amido de milho	25	35	40	70
4.	Talco	10	15	10	25
5.	Estearato de magnésio	1	2	2	5
	Total	<u>200</u>	<u>200</u>	<u>300</u>	<u>600</u>

Procedimento de Fabricação

1. Misturar os itens 1, 2 e 3 em um misturador adequado por 30 minutos.
2. Adicionar os itens 4 e 5 e misturar por 3 minutos.
3. Encher em uma cápsula adequada.

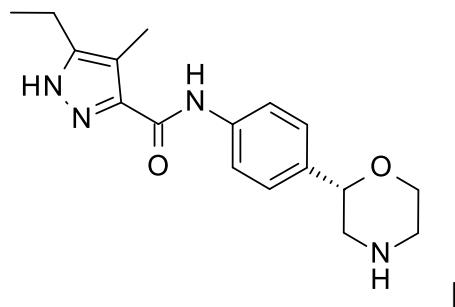
REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a Fórmula I:



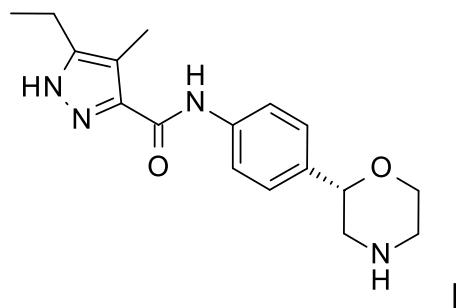
que é 5-etyl-4-metil-N-[4-[(2S)morfolin-2-il]fenil]-1H-pirazol-3-carboxamida, ou um sal de adição de ácido farmaceuticamente aceitável do mesmo.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta a Fórmula I:



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

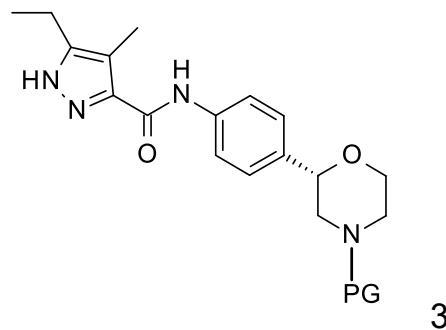
3. Sal de adição de ácido farmaceuticamente aceitável do composto da fórmula I de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta a Fórmula I:



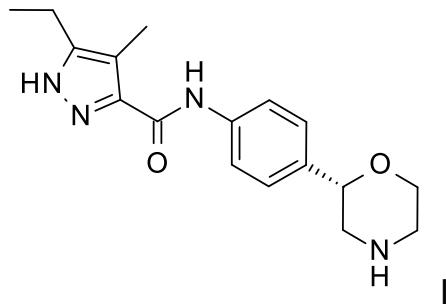
cujo composto é 5-etyl-4-metil-N-[4-[(2S)morfolin-2-il]fenil]-1H-pirazol-3-carboxamida.

4. Processo para a fabricação do composto de Fórmula I como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que compreende

a) clivar o grupo de proteção N (PG) a partir de compostos de fórmula



em um composto de fórmula



em que PG é $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ -terc-butila (BOC) e, se desejado,

b) converter os compostos obtidos em sais de adição de ácidos farmaceuticamente aceitáveis.

5. Composto de Fórmula I, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para uso como substância terapeuticamente ativa.

6. Composto de Fórmula I, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento de depressão, distúrbios de ansiedade, distúrbio bipolar, distúrbio de déficit de atenção e hiperatividade (ADHD), distúrbios relacionados ao estresse, esquizofrenia, doença de Parkinson, doença

de Alzheimer, epilepsia, enxaqueca, hipertensão, abuso de substância, vício, distúrbios alimentares, diabetes, complicações diabéticas, obesidade, dislipidemia, distúrbios de consumo de energia e assimilação, distúrbios e mau funcionamento de homeostase de temperatura corporal, distúrbios do sono e ritmo circadiano e distúrbios cardiovasculares.

7. Composto de Fórmula I, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento de depressão.

8. Composto de Fórmula I, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento de distúrbio bipolar.

9. Composto de Fórmula I, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento de esquizofrenia.

10. Composto de Fórmula I, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento de abuso de substância.

11. Composto de Fórmula I, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento de vício.

12. Composto de Fórmula I, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento de distúrbios alimentares.

13. Composto de Fórmula I, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento de diabetes.

14. Preparação farmacêutica oral, caracterizada pelo fato de que compreende o composto de Fórmula I como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a preparação farmacêutica oral

está em uma forma selecionada do grupo consistindo em comprimidos, comprimidos revestidos, drágeas, cápsulas de gelatina dura e mole, soluções, emulsões e suspensões.

15. Uso de um composto de Fórmula I como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para o tratamento de depressão, distúrbios de ansiedade, distúrbio bipolar, distúrbio de déficit de atenção e hiperatividade (ADHD), distúrbios relacionados ao estresse, esquizofrenia, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, epilepsia, enxaqueca, hipertensão, abuso de substância, vício, distúrbios alimentares, diabetes, complicações diabéticas, obesidade, dislipidemia, distúrbios de consumo de energia e assimilação, distúrbios e mau funcionamento de homeostase da temperatura corporal, distúrbios do sono e ritmo circadiano e distúrbios cardiovasculares.