

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2012.01.25	(73) Titular(es): ELI LILLY AND COMPANY LILLY CORPORATE CENTER, INDIANAPOLIS INDIANA 46285 US
(30) Prioridade(s): 2011.02.07 US 201161440092 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2014.01.15	(72) Inventor(es): ANNE MARIE CAMP US PETER THADDEUS GALLAGHER US ADAM JAN SANDERSON US ANDREW JAMES LEDGARD US DAVID ANDREW COATES US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.03.18 109/2015	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

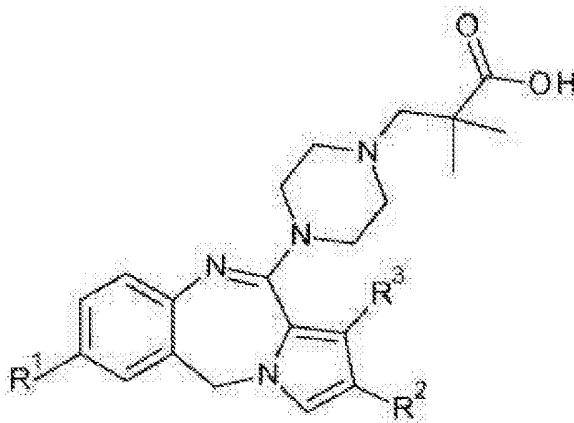
(54) Epígrafe: **COMPOSTOS DE ÁCIDO [(5H-PIRROLO[2,1-C][1,4]BENZODIAZEPIN- 11-IL)PIPERAZIN-1-IL]-2,2-DIMETIL-PROPANOICO SUBSTITUÍDO UTILIZADOS ENQUANTO AGONISTAS INVERSOS DE H1/ANTAGONISTAS DE 5-HT2A COM DUPLA ATIVIDADE**

(57) Resumo:
SÃO DESCRITOS UM ANTAGONISTA RECTOR DE H1/5-HT2A DUPLO DA FÓRMULA: AS SUAS UTILIZAÇÕES, E MÉTODOS PARA A SUA PREPARAÇÃO.

RESUMO

"COMPOSTOS DE ÁCIDO [(5H-PIRROLO[2,1-c][1,4]BENZODIAZEPIN-11-IL)PIPERAZIN-1-IL]-2,2-DIMETIL-PROPANOICO SUBSTITUÍDO UTILIZADOS ENQUANTO AGONISTAS INVERSOS DE H₁/ANTAGONISTAS DE 5-HT_{2A} COM DUPLA ATIVIDADE"

São descritos um antagonista recetor de H₁/5-HT_{2A} duplo da fórmula:



as suas utilizações, e métodos para a sua preparação.

DESCRIÇÃO

"COMPOSTOS DE ÁCIDO [(5H-PIRROLO[2,1-c][1,4]BENZODIAZEPIN-11-IL) PIPERAZIN-1-IL]-2,2-DIMETIL-PROPANOICO SUBSTITUÍDO UTILIZADOS ENQUANTO AGONISTAS INVERSOS DE H1/ANTAGONISTAS DE 5-HT_{2A} COM DUPLA ATIVIDADE"

A histamina desempenha um papel importante numa variedade de processos psicológicos através da sua interação com pelo menos quatro diferentes recetores acoplados à proteína G, os recetores H1-H4. No SNC, recetores H1 desempenham um papel chave no ciclo de regulação do sono e antagonistas/agonistas inversos de H1 são conhecidos por induzir sonolência.

Do mesmo modo, a serotonina desempenha importantes papéis em diversos processos fisiológicos através da sua interação com pelo menos catorze diferentes recetores acoplados à proteína G. A modulação de recetores 5-HT_{2A} no SNC desempenha um papel chave no ciclo de regulação do sono e os antagonistas de 5-HT_{2A} demonstraram ser capazes de melhorar o sono de ondas lentas e a manutenção do sono em pacientes com insónia.

Os compostos possuindo atividade agonista inversa ou antagonista de H1 ou 5-HT_{2A} têm sido utilizados no tratamento de insónia (e.g. doxepina e trazodona,

respetivamente) e têm apresentado efeitos farmacológicos significativos em estudos do sono em animais. Contudo, nenhuns agonistas inversos/antagonistas de H1/5-HT_{2A} com atividade dupla seletivos estão atualmente disponíveis comercialmente.

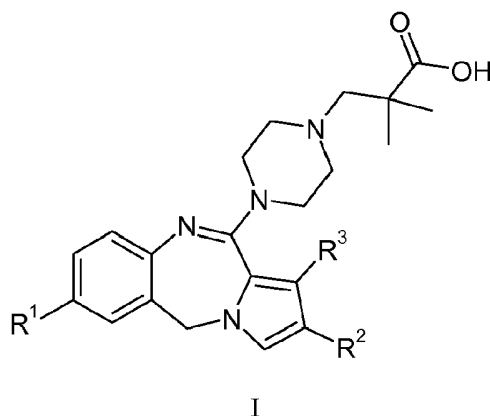
US 4192803 descreve determinados compostos 4-(5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazinilo substituídos para utilização como antipsicóticos e neuroléticos.

A presente invenção proporciona uma família de compostos de ácido (5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico substituído com alta potência agonista inversa para o recetor H1 e alta potência antagonista para o recetor 5-HT_{2A}. Determinados compostos da presente invenção são também seletivos para os recetores H1 e 5-HT_{2A}, em particular face a outros recetores de histamina, recetores de serotonina e outros recetores fisiologicamente relevantes, em particular face ao recetor 5-HT_{2C}, recetor GABA_A, recetores muscarínicos, recetores dopaminérgicos, recetores adrenérgicos, e o canal hERG. Através de modelos animais determinados compostos demonstraram também que poderão ser úteis no tratamento de distúrbios do sono caracterizados por fraca manutenção do sono. Como tal, crê-se que os compostos da invenção são úteis no tratamento de distúrbios do sono caracterizados por latência de sono fraca ou manutenção de sono fraca ou ambas, tais como o tratamento de insónia, como por exemplo insónia primária crónica ou transitória, ou insónia

secundária crónica ou transitória, ou ambas. Exemplos de insónia secundária incluem, mas não se limitam a insónia associada a distúrbios depressivos (e.g. distúrbio depressivo maior, distímia, e/ou ciclotímia), insónia associada a distúrbios de ansiedade (e.g. distúrbio de ansiedade generalizada e/ou fobia social), insónia associada a dor (e.g. fibromialgia, dor crónica dos ossos ou articulações, tais como associada a artrite inflamatória ou osteoartrite, ou dor neuropática diabética), insónia associada a reações alérgicas (e.g. asma alérgica, prurido, rinite, congestivo-namento, etc.), insónia associada a distúrbios pulmonares ou das vias aéreas (e.g. a apneia do sono obstrutiva, doença reativas das vias áreas, etc.), insónia associada a distúrbios psiquiátricos, demência, e/ou doenças neurodegenerativas, e/ou insónia associada a distúrbios do sono do ritmo circadiano (e.g. distúrbio do sono do trabalho por turnos, distúrbio do *jet lag*, síndrome do atraso das fases do sono, síndrome do sono antecipado, e síndrome do ciclo de 24 horas de sono-vigília alterado, etc.).

Além disto, determinados compostos da presente invenção demonstram potenciação dos seus efeitos no sono de movimento de olhos não-rápido (sono NREM) e manutenção do sono quando coadministrados com inibidores de recaptção de serotonina seletivos.

A presente invenção proporciona compostos da Fórmula I:



em que R¹ é cloro ou metilo;

R² é metilo, etilo, isopropilo, cloro, bromo, trifluorometilo, ou metiltio; e

R³ é hidrogénio ou metoxi;

ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

Num outro aspeto da invenção é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo um composto da Fórmula I ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em combinação com pelo menos um veículo, diluente, ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Além do mais, este aspeto da invenção proporciona uma composição farmacêutica adaptada ao tratamento de insónia, como por exemplo insónia caracterizada por latência do sono prolongada ou manutenção do sono fraca ou ambas, como por exemplo insónia primária, *jet lag*, distúrbio do sono do trabalho por turnos, síndrome do atraso das fases do sono, síndrome do sono antecipado, e/ou síndrome do ciclo de 24 horas de sono-vigília alterado, compreendendo um composto da Fórmula I ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em combinação com um ou mais excipientes, veículos, ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis.

Um outro modelo de realização deste aspeto da invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um composto de acordo com a Fórmula I, ou seu sal farmacêuticamente aceitável, em combinação com pelo menos um veículo, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável, e opcionalmente outros ingredientes terapêuticos. Ainda num outro modelo de realização deste aspeto da invenção, a composição farmacêutica compreende ainda um segundo agente terapêutico que é um inibidor de recaptação de serotonina, como por exemplo citalopram, paroxetina, fluoxetina e/ou fluvoxetina.

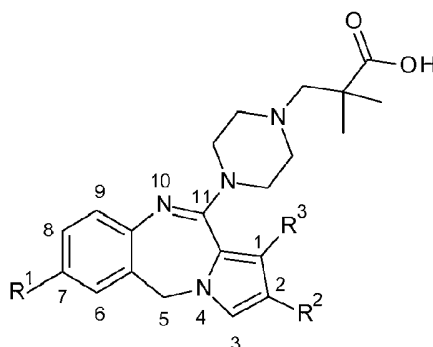
A presente invenção também proporciona compostos da Fórmula I para utilização num método de tratamento de insónia, como por exemplo insónia caracterizada por latência do sono prolongada ou manutenção do sono fraca ou ambas, como por exemplo insónia primária, *jet lag*, distúrbio do sono do trabalho por turnos, síndrome do atraso das fases do sono, síndrome do sono antecipado, e/ou síndrome do ciclo de 24 horas de sono-vigília alterado, num mamífero compreendendo a administração a um mamífero que precise de tal tratamento de uma quantidade eficaz de um composto da Fórmula I ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, ou a administração em simultâneo, em separado ou em combinação sequencial, de um segundo agente terapêutico que é um inibidor de recaptação de serotonina, como por exemplo citalopram, paroxetina, fluoxetina e/ou fluvoxetina. Num modelo de realização específico destes métodos de tratamento, o mamífero é um humano.

Esta invenção também proporciona um composto da Fórmula I ou um seu sal farmacologicamente aceitável para utilização em terapia. No âmbito deste aspecto, a invenção proporciona um composto da Fórmula I, ou um seu sal farmacologicamente aceitável, para utilização no tratamento de insônia. Em modelos de realização adicionais, a insônia é caracterizada por latência do sono prolongada ou manutenção do sono fraca ou ambas, como por exemplo insônia primária, *jet lag*, distúrbio do sono do trabalho por turnos, síndrome do atraso das fases do sono, síndrome do sono antecipado, e/ou síndrome do ciclo de 24 horas de sono-vigília alterado. Num outro modelo de realização deste aspecto, a invenção proporciona um composto de acordo com a Fórmula I, ou um seu sal farmacologicamente aceitável, para utilização em simultâneo, em separado ou em combinação sequencial com um inibidor de recaptção de serotonina, como por exemplo citalopram, paroxetina, fluoxetina e/ou fluvoxetina, no tratamento de insônia. Num modelo de realização específico deste aspecto das invenções, as utilizações são em mamíferos, em particular humanos.

Outro aspecto desta invenção proporciona a utilização de um composto da Fórmula I, ou um seu sal farmacologicamente aceitável, no fabrico de um medicamento para o tratamento de insônia, como por exemplo insônia primária caracterizada por latência do sono prolongada ou manutenção do sono fraca ou ambas, como por exemplo insônia primária, *jet lag*, distúrbio do sono do trabalho por

turnos, síndrome do atraso das fases do sono, síndrome do sono antecipado, e/ou síndrome do ciclo de 24 horas de sono-vigília alterado. Outro modelo de realização deste aspecto da invenção proporciona a utilização de um composto da Fórmula I, ou um seu sal farmacologicamente aceitável, e um segundo agente terapêutico que é um inibidor de recaptção de serotonina, como por exemplo citalopram, paroxetina, fluoxetina e/ou fluvoxetina, no fabrico de um medicamento para o tratamento de insónia, como por exemplo, insónia caracterizada por latência do sono prolongada e/ou manutenção do sono fraca, como por exemplo insónia primária, *jet lag*, distúrbio do sono do trabalho por turnos, síndrome do atraso das fases do sono, síndrome do sono antecipado, e/ou síndrome do ciclo de 24 horas de sono-vigília alterado.

Para que seja claro, a seguinte numeração da estrutura de anel tricíclico será utilizada ao longo do pedido de patente:



Os compostos desta invenção possuem porções básicas e acídicas, e reagem em conformidade com um número de ácidos e bases orgânicos e inorgânicos para formar sais

farmaceuticamente aceitáveis. Sais farmaceuticamente aceitáveis de cada uma dos compostos da presente invenção são considerados dentro do âmbito do presente pedido de patente. O termo "sal farmaceuticamente aceitável" tal como aqui é utilizado, diz respeito a qualquer sal de um composto da invenção que é substancialmente não-tóxico para organismos vivos. Tais sais incluem os que se encontram elencados no Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977), os quais são conhecidos junto dos especialistas da técnica.

Classes preferidas de compostos da presente invenção são compostos em que:

- 1) R^3 é hidrogénio;
- 2) R^3 é metoxi;
- 3) R^1 é cloro;
- 4) R^1 é metilo;
- 5) R^1 é cloro e R^3 é hidrogénio;
- 6) R^1 é metilo e R^3 é hidrogénio;
- 7) R^2 é metilo, etilo, ou isopropilo;
- 8) R^2 é metilo;
- 9) R^2 é cloro ou bromo;
- 10) R^2 é cloro;
- 11) R^2 é trifluorometilo; e
- 12) R^2 é metiltio.

Será entendido que compostos preferidos adicionais são aqueles que combinam as seleções preferidas

anteriormente referidas para um dado substituinte ou substituintes com seleções preferidas de outros substituintes. Exemplos de tais combinações incluem, mas não se limitam às seguintes classes preferidas de compostos:

13) compostos preferidos de qualquer uma das classes preferidas 7-12 (que são seleções preferidas para R²) em que R³ é hidrogénio (classe preferida 1);

14) compostos preferidos de qualquer uma das classes preferidas 7-12 (que são seleções preferidas para R²) em que R¹ é cloro e R³ é hidrogénio (classe preferida 5); e

15) compostos preferidos da classe preferida 8 em que R³ é metoxi (classe preferida 2).

Os compostos preferidos específicos são os descritos nos Exemplos incluindo as suas bases livres e seus sais farmacologicamente aceitáveis.

Um determinado composto preferido é

Ácido 3-[4-(7-cloro-2-metil-5H-pirrólo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico, ou um seu sal farmacologicamente aceitável (*i.e.* o composto de Exemplo 1 e seus sais farmacologicamente aceitáveis).

Abreviaturas aqui utilizadas são definidas como se segue:

"BSA" quer dizer albumina de soro bovino.

"DCG IV" quer dizer (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxiciclopropil)glicina.

"DCM" quer dizer diclorometano.

"DMEM quer dizer Meio de Eagle Mínimo modificado por Dulbecco.

"DMSO" quer dizer sulfóxido de dimetilo.

"DPBS" quer dizer solução salina de Dulbecco tamponada com fosfato.

"DSC" quer dizer calorimetria de varrimento diferencial.

"EtOAc" quer dizer acetato de etilo.

"GC" quer dizer cromatografia de gás.

"HBSS" quer dizer solução salina tamponada de Hank.

"HEPES" quer dizer ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinoetanossulfônico.

"HPLC" quer dizer cromatografia líquida de alta pressão.

"h" quer dizer hora ou horas.

"IBMX" quer dizer 3-isobutil-1-metilxantina

"IC₅₀" quer dizer a concentração à qual 50% da inibição máxima é alcançada.

"i.v." quer dizer intravenoso ou intravenosamente.

"i.p." quer dizer intraperitoneal.

"LC-MS" quer dizer HPLC - espectrografia de massa.

"MeOH" quer dizer metanol.

"mFST" quer dizer teste de natação forçada do ratinho; um modelo animal para atividade antidepressiva.

"min" quer dizer minutos.

"mp" quer dizer ponto de fusão.

"MS" quer dizer espectroscopia de massa.

"MS (ES+)" quer dizer espectroscopia de massa utilizando ionização por eletropulverização.

"MTBE" quer dizer éter metil-t-butílico.

"NMR" quer dizer ressonância magnética nuclear.

"p.o." quer dizer *per os*, através da boca.

"SCX-2" quer dizer colunas de permuta catiónica forte Biotage Isolute Flash SCX-2®.

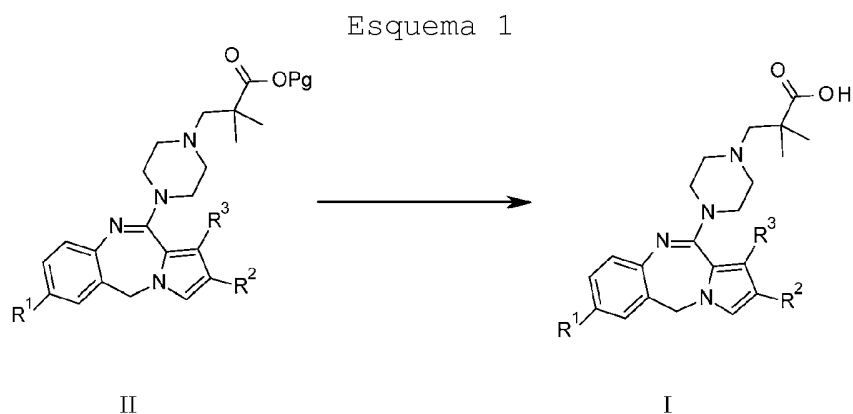
"THF" quer dizer tetra-hidrofurano.

Química Geral

Os compostos da presente invenção podem ser preparados de acordo com os seguintes esquemas sintéticos através de métodos gerais bem conhecidos e levados em conta na técnica. Condições de reação adequadas para os passos destes esquemas são bem conhecidas na técnica e substituições apropriadas de solventes e co-reagentes encontram-se no âmbito da especialidade. Do mesmo modo, será tido em consideração pelos especialistas na técnica que intermediários sintéticos possam ser isolados e/ou purificados através de diversas técnicas bem conhecidas como necessário ou desejado, e que frequentemente, será possível utilizar diversos intermediários diretamente em passos sintéticos subsequentes com pouca ou nenhuma purificação. Além do mais, o especialista na técnica irá ter em conta que em algumas circunstâncias, a ordem segundo a qual as porções são introduzidas não é crítica. A ordem de passos específica necessária para produzir os compostos da presente invenção depende do composto específico a ser sintetizado, o composto de partida, e a dependência rela-

tiva das porções substituídas, tal como é bem tido em consideração pelo químico especialista. Todos os substituintes, exceto se for indicado de outro modo, são tal como previamente definido, e todos os reagentes são bem conhecidos e tidos em consideração na técnica.

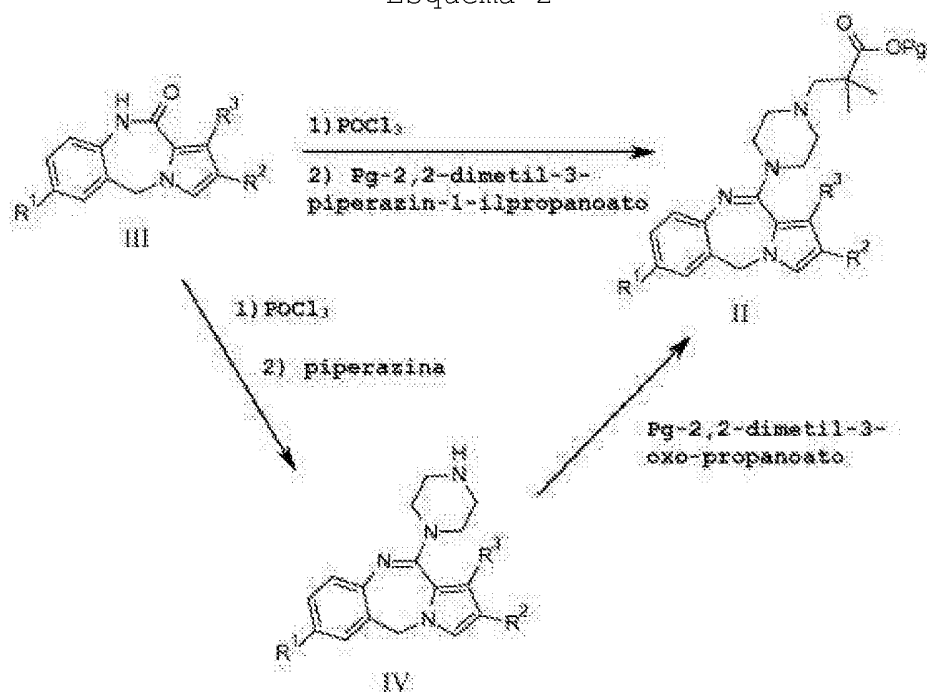
Geralmente, um composto da Fórmula I pode ser preparado a partir de um composto da Fórmula II em que Pg é um grupo protetor de carboxilo adequado (Esquema 1). Mais especificamente, um composto da Fórmula II em que Pg é um grupo C₁-C₃ alquilo é sujeito a reação com um agente de desproteção adequado tal como hidróxido de sódio aquoso num co-solvente orgânico tal como álcool isopropílico para proporcionar, a seguir à neutralização com um ácido, um composto da Fórmula I.



Geralmente, um composto da Fórmula II pode ser preparado a partir de um composto da Fórmula III ou um composto da Fórmula IV (Esquema 2). Mais especificamente, um composto da Fórmula III é sujeito a reação com cloreto de fosforilo num solvente adequado tal como metoxibenzeno ou diclorometano para proporcionar o intermediário

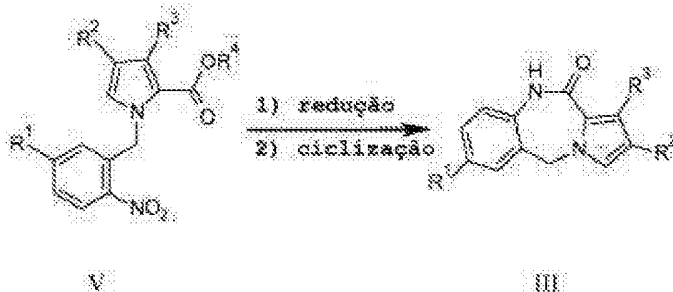
iminocloreto. O iminocloreto pode ser isolado ou sujeito a reação diretamente com 2,2-dimetil-3-piperazin-1-ilpropanoato de Pg na presença de uma base adequada tal como carbonato de potássio para proporcionar um composto da Fórmula II. A reação é realizada num solvente adequado tal como acetonitrilo. Em alternativa, o iminocloreto pode ser sujeito a reação com piperazina na presença de uma base adequada tal como carbonato de césio para proporcionar um composto da Fórmula IV. A reação é realizada num solvente adequado tal como acetonitrilo. Um composto da Fórmula IV é alquilado com 2,2-dimetil-3-oxopropanoato de Pg na presença de um agente de redução adequado tal como triacetoxiborohidreto de sódio para proporcionar um composto da Fórmula II. A reação é tipicamente realizada num solvente tal como diclorometano.

Esquema 2



Um composto da Fórmula III pode ser preparado a partir de um composto da Fórmula V em que R⁴ é metilo ou etilo (Esquema 3). Mais especificamente, um composto da Fórmula V é sujeito a reação com um agente adequado para redução do grupo nitro do arilo até à correspondente anilina. Agentes de redução adequados incluem hidrogénio na presença de um catalisador de metal de transição tal como platina; ferro em ácido acético; e dicloreto de estanho em ácido clorídrico. A anilina correspondente pode ser primeiramente isolada ou diretamente sujeita a reação sob condições de ciclização para proporcionar um composto da Fórmula III. A ciclização é realizada na presença de um ácido tal como ácido clorídrico ou uma base tal como *t*-butóxido de potássio. Um composto da Fórmula V em que R⁴ é metilo ou etilo pode ser preparado tal como descrito nas preparações ou através de procedimentos conhecidos nas técnicas de química para a produção de compostos estruturalmente análogos.

Esquema 3



Nas preparações ilustrativas e exemplos que se seguem, foram obtidos reagentes a partir de diversas fontes comerciais. Os solventes são geralmente removidos sob pres-

são reduzida (evaporados). Em alguns procedimentos rendimentos indicados são rendimentos brutos representativos para produtos que são isolados por evaporação ou filtração e usados diretamente sem purificação adicional.

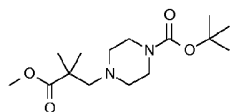
Preparação 1

Síntese de 2,2-dimetil-3-oxo-propanoato de metilo.

Adicionar 3-hidroxi-2,2-dimetilpropanoato de metilo (33 g, 250 mmol) a periodinano de Dess-Martin (106 g, 250 mmol) suspenso em DCM (1000 mL) a 0°C e agitar à temperatura ambiente durante 18 h. Filtrar a mistura de reação através de um leito de celite e concentrar o filtrado. Lavar o filtrado concentrado com pentano (2 x 200 mL). Separar a camada de pentano e concentrar *in vacuo* para dar 2,2-dimetil-3-oxo-propanoato de metilo (31,93 g, quantitativo). ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 9,59 (s, 1H), 3,67 (s, 3H), 1,26 (s, 6H).

Preparação 2

Síntese de 4-(3-metoxi-2,2-dimetil-3-oxopropil)piperazino-1-carboxilato de *tert*-butilo.

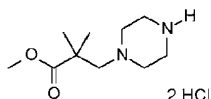


Agitar uma solução de 2,2-dimetil-3-oxo-pro-

propanoato de metilo (30,88 g, 237,31 mmoles) e piperazino-1-carboxilato de *tert*-butilo (34,00 g, 182,55 mmoles) em DCM (500 mL) à temperatura ambiente durante 20 minutos. Adicionar ácido acético (2 equiv); 20,92 mL, 365,09 mmoles) seguido de triacetoxiboro-hidreto de sódio (1,4 equiv; 54,17 g, 255,56 mmoles) ao longo de 0,5 h e agitar a mistura resultante agitada à temperatura ambiente de um dia para o outro. Cuidadosamente temperar com água (250 mL) e transferir a mistura para um funil de separação com DCM (300 mL). Lavar a camada orgânica resultante com salmoura. Secar sobre MgSO₄, filtrar e evaporar para dar 4-(3-metoxi-2,2-dimetil-3-oxopropil)piperazino-1-carboxilato de *tert*-butilo. (58 g, 100%). MS (m/z): 301,2 (M+1).

Preparação 3

Síntese de di-hidrocloreto de 2,2-dimetil-3-(piperazin-1-il)propanoato de metilo

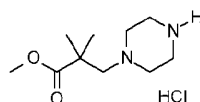


A uma solução de 4-(3-metoxi-2,2-dimetil-3-oxopropil)piperazino-1-carboxilato de *tert*-butilo (58,0 g, 193,08 mmoles) em álcool isopropílico (150 mL) adicionar uma solução 4M de cloreto de hidrogénio em dioxano (4 equiv); 193,08 mL, 772,31 mmoles) ao longo de 15 minutos, observando-se libertação do gás e um precipitado fino. Aquecer a 55°C durante 3 h para dar um precipitado branco. Arrefecer até aos 10°C e recolher o sólido branco através

de filtração, lavar com mais álcool isopropílico (30 mL), seguido de EtOAc. Secar num forno de vácuo a 45°C durante 1 h para dar di-hidrocloreto de 2,2-dimetil-3-(piperazin-1-il)propanoato de metilo (31 g, 59% de rendimento). MS (m/z): =201,1 (M+1).

Preparação 4

Síntese de hidrocloreto de 2,2-dimetil-3-(piperazin-1-il)propanoato de metilo.

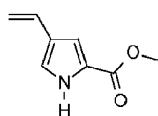


Dissolver di-hidrocloreto de 2,2-dimetil-3-(piperazin-1-il)propanoato de metilo (112,0 g, 409,95 mmoles) em água (250 mL). Adicionar bicarbonato de sódio sólido para dar uma camada aquosa de pH 4 e extrair a mistura numa solução de DCM a 10% em éter dietílico (300 mL) para remover alguma matéria sólida escura e alguma cor. Descartar a camada orgânica. Basificar a fase aquosa até ao pH 8 com solução aquosa de hidróxido de sódio 2M, depois saturar com cloreto de sódio sólido. Extrair numa solução de isopropanol a 10% em cloróformio. Adicionar mais hidróxido de sódio aquoso 2M para manter o pH 8. Repetir a extração numa solução de isopropanol a 10% em clorofórmio. Continuar o processo de extração até que 85% do material esperado tenha sido recuperado. Lavar o isopropanol em clorofórmio solução com salmoura, secar sobre Na₂SO₄, filtrar e evaporar para dar hidrocloreto de 2,2-dimetil-3-

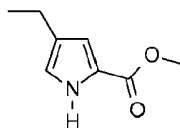
(piperazin-1-il)propanoato de metilo (82,1 g % de rendimento). MS (m/z): 201,1 (M+1).

Preparação 5

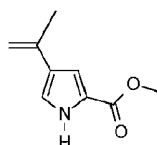
Síntese de 4-etenil-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo.



Desgaseificar, através de purga com azoto durante 10 minutos, uma solução de 4-bromo-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo (2,0 g, 9,8 mmoles), trietenilboroxinopiridina (1,3 equiv; 3,1 g, 12,7 mmoles), e carbonato de potássio (3 equiv; 4,1 g, 29,4 mmoles) numa mistura de 1,4-dioxano (20 mL) e água (10 mL). Adicionar tris(dibenzilidenoacetoni)bis-paládio ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$) (0,01 equiv; 0,0925 g, 98,0 μmoles) e 1,1'-bis(di-tert-butilfosfino)ferroceno (dtbpf) (0,03 equiv; 0,0853 g, 294,1 μmoles) e aquecer a 95°C durante 3 h. Arrefecer até à temperatura ambiente seguindo-se partilha entre água (50 mL) e uma mistura 1:1 de hexanos/éter dietílico (100 mL). A camada orgânica é lavada com água (2 x 50 mL) depois salmoura. Secar sobre Na_2SO_4 , filtrar e evaporar para dar 4-etenil-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo como um óleo cor de palha (1,5 g). Usar sem purificação adicional. 1H-NMR (CDCl_3), δ : 8,90 (1H, br. s), 7,02 (1H, m), 6,95 (1H, m), 6,56 (1H, q) 5,48 (1H, dd), 5,05 (1H, dd), 3,86 (3H, s).

Preparação 6**Síntese de 4-etil-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo.**

Carregar numa garrafa de Parr de 500 mL, uma mistura de paládio a 5% em carvão vegetal (0,2 g) em etanol (25 mL) e adicionar 4-etenil-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo (1,4 g, 9,3 mmoles). Hidrogenar a 206,8 kPa durante 3 h para dar conversão completa por LC-MS. Filtrar através de celite e evaporar para dar um óleo. Passar através de uma almofada de gel de sílica com iso-hexano/acetato de etilo (100:0 até 75:25) para dar o composto em epígrafe como um óleo amarelo pálido (1,12 g). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ : 8,87 (1H, br. s), 6,73-6,78 (2H, m), 3,83 (3H, s), 2,50 (2H, q, $J = 7,8$ Hz) e 1,19 (3H, t, $J = 7,3$ Hz).

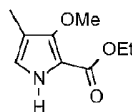
Preparação 7**Síntese de 4-(prop-1-en-2-il)-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo.**

Misturar 4-iodo-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo (1,5 g, 5,98 mmoles), 4,4,5,5-tetrametil-2-(prop-1-en-2-

il)-1,3,2-dioxaborolano (3,01 g, 17,98 mmoles) 1,1'-bis(di-tert-butilfosfino)ferroceno (dtbpf) (0,3 g, 0,06 mmoles), tris(dibenzilidenoacetoni)bis-paládio ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$) (0,3 g, 0,06 mmoles), fosfato de tripotássio (2,54 g, 11,95 mmoles) e metanol (12 mL). Aquecer a mistura num tubo selado num micro-ondas a 140°C durante 30 minutos. Arrefecer, filtrar a mistura de reação e lavar o sinterizado com metanol, evaporar o filtrado sob pressão reduzida e cromatografar em sílica eluindo com iso-hexano/diclorometano (elução gradiente, 100:0 até 0:100). Evaporar as frações contendo produto para dar 4-(prop-1-en-2-il)-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo. (0,679 g, 68,79% de rendimento). MS (m/z): 166,1 (M+1).

Preparação 8

Síntese de 3-metoxi-4-metil-1H-pirrole-2-carboxilato de etilo.

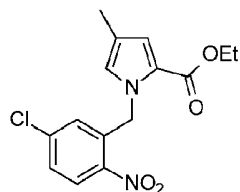


Adicionar sulfato de dimetilo (3 mL, 3,99 g, 31,63 mmoles) a uma mistura de éster de etilo de ácido 3-hidroxi-4-metil-1H-pirrole-2-carboxílico (3,5 g, 20,69 mmoles) e hidróxido de sódio 2M (75 mL, 1500 mmoles) e agitar a mistura de reação vigorosamente durante 30 min à temp. ambiente (aplicação de banho de arrefecimento com água). Recolher o precipitado resultante e lavar com água. Adicionar mais sulfato de dimetilo (3 mL, 3,99 g, 31,63

mmoles) ao filtrado e agitar durante 30 minutos. Recolher o precipitado resultante e lavar com água. Adicionar mais sulfato de dimetilo (3 mL, 3,99 g, 31,63 mmoles) ao filtrado e agitar durante 1h. Combinar os precipitados isolados e secar num forno de vácuo a 50°C durante 30 minutos para dar 3-metoxi-4-metil-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo (3,221 g, 84,98% de rendimento). MS (m/z): 184,09 (M+1).

Preparação 9

Síntese de 1-(5-cloro-2-nitrobenzil)-4-metil-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo.



Agitar vigorosamente uma solução de 2-(bromo-metil)-4-cloro-1-nitro-benzeno (25,02 g, 99,88 mmoles) em DCM (200 mL), e adicionar a isto uma solução de 4-metil-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo (15 g, 97,92 mmoles) em DCM (200 mL). Depois adicionar hidróxido de tetra-*n*-butilamónio 30-hidratado (0,508 g) e arrefecer a mistura agitada sob azoto até aos 5°C utilizando um banho de gelo externo. Adicionar hidróxido de sódio aq. a 25% (200 mL) gota a gota ao longo de 15 minutos observando a subida da temperatura interna até aos 10°C. Agitar e deixar a aquecer até à temperatura ambiente. Agitar à temperatura ambiente durante 3,5 h. Adicionar mais hidróxido de sódio aq. a 50% (20 mL)

e agitar à temperatura ambiente durante mais 1 h. Parar a agitação e deixar separar as camadas. Transferir para um funil de separação e lavar a camada orgânica com ácido clorídrico 1N (200mL), observando se o pH desta camada é ácido utilizando papel indicador. De seguida lavar a camada orgânica com água (600 mL) e depois salmoura (600 mL) e finalmente secar sobre Na₂SO₄. Filtrar a mistura e remover o solvente *in vacuo* a 40°C para dar óleo cor-de-laranja. Purificar passando através de uma almofada de gel de sílica com iso-hexano/acetato de etilo (eluição gradiente desde 10 até 20%) para dar 1-(5-cloro-2-nitrobenzil)-4-metil-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo como um óleo amarelo (33 g, quantitativo). MS (m/z): 322,98 (M+1).

Preparação 9 alternativa

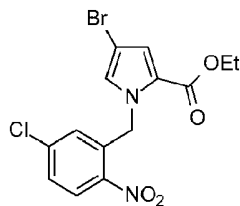
Síntese de 1-(5-cloro-2-nitrobenzil)-4-metil-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo.

Sob uma atmosfera de azoto com agitação adicionar carbonato de céσιο (96 g, 295 mmoles) a uma solução de 4-metil-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo (30 g, 196 mmoles) em DMF (240 mL) e aquecer a mistura de reação até aos 40°C a 45°C durante 1 hora. Arrefecer a mistura de reação até à temperatura ambiente e adicionar uma solução de 2-(bromometil)-4-cloro-1-nitro-benzeno (54 g, 216 mmoles) em DMF (120 mL) gota a gota. Agitar a suspensão resultante durante 1,5 h a 2,0 h, filtrar os sólidos e enxaguar o bolo de filtração com DMF (45 mL). Transferir os sólidos para um

recipiente de reação limpo, adicionar água (200 mL) e arrefecer a suspensão até aos 10°C até 15°C com agitação durante 1 h a 2 h. Filtrar a suspensão, enxaguar com água (75 mL) e transferir os sólidos para outro recipiente de reação. Adicionar etanol (125 mL) e agitar a suspensão a 5°C a 10°C durante 1 h a 2 h. Filtrar os sólidos, enxaguar o bolo de filtração com etanol (20 mL), e secar os sólidos num forno a menos de 50°C sob pressão reduzida para dar 1-(5-cloro-2-nitrobenzil)-4-metil-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo como um sólido amarelo (54 g, 94,1% de pureza, 73,3% de rendimento).

Preparação 10

Síntese de etil-4-bromo-1-(5-cloro-2-nitrobenzil)-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo.



Lavar hidreto de sódio suspenso em óleo mineral a 60% (1,2 equiv; 1,1 g, 27,52 mmoles) com uma pequena quantidade de iso-hexano (x 2). Suspender em N,N-dimetilacetamida (15 mL) e arrefecer num banho de gelo. Adicionar 4-bromo-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo (5,0 g, 22,93 mmoles) em porções ao longo de 15 minutos deixando que a libertação do gás diminua entre adições. Agitar à tempe-

ratura ambiente durante 15 minutos para dar uma solução castanha. Adicionar 2-(bromometil)-4-cloro-1-nitro-benzeno (1,15 equiv; 6,61 g, 26,37 mmoles) em porções ao longo de 15 minutos e agitar solução púrpura resultante à temperatura ambiente durante 2,5 h. Arrefecer num banho de gelo e temperar com água (10 mL). Partilhar entre ácido clorídrico 1M (100 mL) e EtOAc (300 mL). Lavar a camada orgânica com água (2 x 100 mL) depois salmoura. Secar sobre Na₂SO₄ e descolorir com carvão vegetal ativado. Filtrar através de celite e evaporar para dar etilo 4-bromo-1-(5-cloro-2-nitrobenzil)-1H-pirrole-2-carboxilato de etilo como um óleo cor-de-laranja (9,1 g, quantitativo). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8,12 (1H, d), 7,40 (1H, dd), 7,07 (1H, d), 6,92 (1H, d), 6,53 (1H, d), 5,87 (2H, s), 4,17 (2H, q), 1,25 (3H, t).

Os seguintes compostos são preparados essencialmente através do método da Preparação 10.

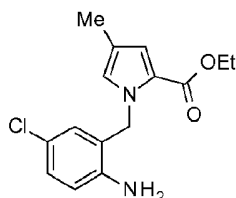
Preparação N°.	Nome	Estrutura	Dados físicos
11	4-Metil-1-(5-metil-2-nitrobenzil)-1H-pirrole-2-carboxilato de etilo		MS (m/z): 303,09 (M+1).
12	1-(5-Metil-2-nitrobenzil)-4-(trifluorometil)-1H-pirrole-3-carboxilato de etilo		¹ H NMR (d ₆ -DMSO) δ: 8,06 (1H, d), 7,90 (1H, s), 7,37 (1H, d), 7,25 (1H, s), 6,31 (1H, s), 5,87 (2H, s), 4,09 (2H, q), 2,27 (3H, s), 1,13 (3H, t)

(continuação)

Preparação N°.	Nome	Estrutura	Dados físicos
13	4-Cloro-1-(5-cloro-3-nitrobenzil)-1H-pirrole-3-carboxilato de metilo		¹ H NMR (CDCl ₃) δ: 8,16 (1H, d), 7,40 (1H, dd), 6,98 (1H, d), 6,88 (1H, d), 6,53 (1H, d), 5,86 (2H, s), 3,73 (3H, s)
14	1-(5-Cloro-3-nitrobenzil)-4-(metilsulfanil)-1H-pirrole-3-carboxilato de metilo		MS (m/z): 340,98 (M+1)
15	4-Bromo-1-(5-metil-2-nitrobenzil)-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo		MS (m/z): 352,98 (M+1)
16	1-(5-Cloro-2-nitrobenzil)-4-etil-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo		MS (m/z): 323,18 (M+1)
17	1-(5-Cloro-3-nitrobenzil)-4-(prop-1-en-2-il)-1H-pirrole-3-carboxilato de metilo		MS (m/z): 334,98 (M+1)
18	1-(5-Cloro-3-nitrobenzil)-4-(trifluorometil)-1H-pirrole-3-carboxilato de etilo		¹ H NMR (CDCl ₃) δ: 8,14 (1H, d), 7,43 (1H, dd), 7,25 (1H, s), 7,22 (1H, d), 6,51 (1H, d), 5,92 (2H, s), 4,20 (2H, q), 1,28 (3H, t).
19	1-(5-Metil-2-nitrobenzil)-4-(metilsulfanil)-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo		MS (m/z): 321,03 (M+1)

(continuação)

Preparação N°.	Nome	Estrutura	Dados físicos
20	1-(5-Cloro-2-nitro-benzil)-3-metoxi-4-metil-1H-pirrole-2-carboxilato de etilo		MS (m/z): 353,13 (M+1)
21	3-Metoxi-4-metil-1-(5-metil-3-nitro-benzil)-1H-pirrole-3-carboxilato de etilo		MS (m/z): 333,18 (M+1)

Preparação 22**Síntese de 1-(2-amino-5-clorobenzil)-4-metil-1H-pirrole-2-carboxilato de etilo.**

Carregar platina(S) a 5%/carvão vegetal (2,5 g), e 1-(5-cloro-2-nitrobenzil)-4-metil-1H-pirrole-2-carboxilato de etilo (16,0 g, 49,57 mmoles) numa garrafa de Parr de 500 mL. Adicionar etanol (200 mL) depois dibrometo de zinco (0,22 equiv; 2,46 g, 10,91 mmoles) e colocar a mistura sob hidrogénio a 275,8 kPa e hidrogenar à temperatura ambiente de um dia para o outro, monitorizando a formação de um intermediário parcialmente hidrogenado. Remover a garrafa de Parr, aquecer cuidadosamente num banho de água para dissolver o material cristalizado, e filtrar através de

celite. Combinar com o filtrado de uma operação idêntica e evaporar para dar 1-(2-amino-5-clorobenzil)-4-metil-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo um sólido esbranquiçado. Colocar sob alto vácuo para remover o etanol residual para dar o material (35 g, quantitativo). MS (m/z): 293,1 (M+1).

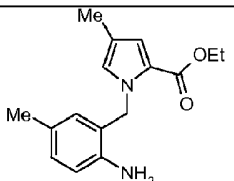
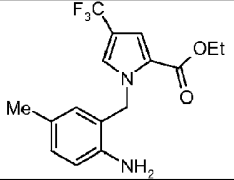
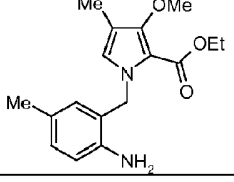
Preparação 22 alternativa

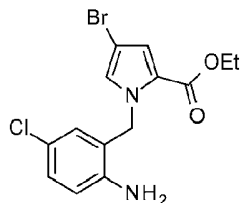
Síntese de 1-(2-amino-5-clorobenzil)-4-metil-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo.

Num recipiente de reação sob azoto carregar uma solução de 1-(5-cloro-2-nitrobenzil)-4-metil-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo (100,0 g, 310 mmoles) em THF (800 mL) e adicionar dibrometo de zinco (0,22 equiv; 15,4 g, 68,4 mmoles) com agitação à temperatura ambiente. Carregar uma lama de platina(S) a 5%/carvão vegetal (13,3 g) em THF (25 mL), e colocar o recipiente sob hidrogénio a 380 kPa. Hidrogenar à temperatura ambiente durante 30 h. a 40 h., monitorizando a formação de um intermediário parcialmente hidrogenado e filtrar sobre diatomite. Enxaguar o adjuvante de filtração com THF (300 mL) e concentrar o filtrado, abaixo de 40°C, até chegar um volume de aproximadamente 200 mL. Adicionar DCM (250 mL), concentrar a solução, a menos de 40°C, para alcançar um volume de aproximadamente 200 mL, e adicionar mais DCM (600 mL). Este processo pode ser repetido tanto quanto necessário para remover níveis indesejados de THF da mistura de reação. Carregar água (500 mL), separar as camadas, e lavar a camada orgânica com água

(300 mL), seguida de solução aquosa de cloreto de sódio a 25% (250 mL). Concentrar a solução, 40°C, para alcançar um volume de aproximadamente 200 mL, adicionar heptano (400 mL), e concentrar a solução, a menos de 40°C, para alcançar um volume de aproximadamente 200 mL. Adicionar heptano (400 mL) e aquecer a mistura de reação até aos 40-45°C com agitação ao longo de 2-3 h. Arrefecer a mistura de reação até aos 5-10°C e continuar a agitar a esta temperatura durante 1-2 h. Filtrar os sólidos resultantes e secar num forno a menos de 50°C sob pressão reduzida para dar 1-(2-amino-5-clorobenzil)-4-metil-1*H*-pirrole-2-carboxilato de etilo (81,4 g, 95,8% de pureza, 85,9% de rendimento) como um sólido amarelo.

Os seguintes compostos são preparados essencialmente através do método da Preparação 22.

Preparação Nº.	Nome	Estrutura	MS (m/z): (M+1).
23	1-(3-Amino-5-metilbenzil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirrole-3-carboxilato de etilo		273,09
24	1-(3-Amino-5-metilbenzil)-4-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirrole-2-carboxilato de etilo		327,18
25	1-(3-Amino-5-metilbenzil)-3-metoxi-4-metil-1 <i>H</i> -pirrole-2-carboxilato de etilo		303,19

Preparação 26**Síntese de 1-(2-amino-5-clorobenzil)-4-bromo-1H-pirrole-2-carboxilato de etilo.**

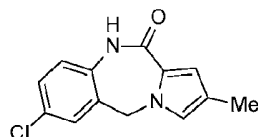
A uma solução bem agitada de 4-bromo-1-(5-cloro-2-nitrobenzil)-1H-pirrole-2-carboxilato de etilo (9,1 g, 23,48 mmoles) em ácido acético (60,00 mL) a 70°C, adicionar ferro (5 equiv; 6,56 g, 117,38 mmoles) em porções ao longo de 0,5 h. A meio da adição, observa-se uma exotermia para manter uma temperatura de 85°C com o banho de óleo removido. A mistura de reação irá tornar-se mais espessa à medida que a exotermia se dissipa e pode ser adicionado o restante ferro. Agitar a 85°C durante 0,5 h. Arrefecer até à temperatura ambiente e verter em água (200 mL). Extrair em clorofórmio (2 x 200 mL). Combinar camadas orgânicas e lavar com água (2 x 100 mL) depois solução aquosa saturada de NaHCO₃. Secar sobre Na₂SO₄, filtrar e evaporar até ao composto em epígrafe como um óleo cor-de-laranja (7,7 g, 92% de rendimento). MS (m/z): 358,98 (M+1).

Os seguintes compostos são preparados essencialmente através do método da Preparação 26.

Preparação Nº.	Nome	Estrutura	MS (m/z): (M+1).
27	1-(2-Amino-5-clorobenzil)-4-cloro-1H-pirrole-3-carboxilato de metilo		298,99 / 301,09
28	1-(2-Amino-5-clorobenzil)-4-(metilsulfanil)-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo		311,13
29	1-(3-Amino-5-metilbenzil)-4-bromo-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo		322,98
30	1-(2-Amino-5-clorobenzil)-4-etil-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo		293,14
31	1-(2-Amino-5-clorobenzil)-4-(propan-2-il)-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo		307,09

Preparação 32

Síntese de 7-cloro-2-metil-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona.



A uma solução de 1-[(2-amino-5-cloro-fenil)metil]-4-metil-pirrole-2-carboxilato de etilo (35 g,

119,55 mmoles) em sulfóxido de dimetilo (120 mL) adicionar t-butóxido de potássio (14,76 g, 131,5 mmoles) ao longo de 10 minutos. Aquecer a 80°C (temperatura do banho de óleo) ao longo de 1 h. Deixar arrefecer depois verter em água (400 mL). Recolher o sólido castanho em pó resultante através de filtração, lavando bem com água. Secar o sinterizado por sucção o máximo possível depois transferir para um prato e secar num forno de vácuo a 55°C sobre pentóxido de fósforo de um dia para o outro, para dar 7-cloro-2-metil-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona. (22 g, 91%). MS (m/z): 247,1 (M+1).

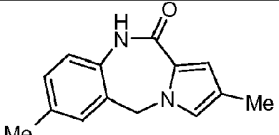
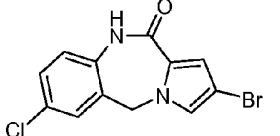
Preparação 32 alternativa

Síntese de 7-cloro-2-metil-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona.

A uma solução de 1-[(2-amino-5-cloro-fenil)metil]-4-metil-pirrole-2-carboxilato de etilo (20 g, 68,3 mmoles) em sulfóxido de dimetilo (60 mL) adicionar t-butóxido de potássio (8,4 g, 74,9 mmoles) em DMSO (40 mL) e aquecer a mistura de reação até aos 75-80°C durante 1-2 h. Adicionar água (200 mL) lentamente, arrefecer até à temperatura ambiente, e agitar durante 1-2 h. Filtrar os sólidos, lavar o bolo de filtração com água (75 mL), e transferir os sólidos para um recipiente de reação limpo. Adicionar THF (100 mL) e aquecer a mistura de reação até aos 30-35°C até que os sólidos se dissolvam. Adicionar DCM (350 mL) e continuar a agitar a 30-35°C durante 1-2 h.

Adicionar ácido clorídrico 1N (250 mL) e continuar a agitar a 30-35°C durante 1-2 h. Separar as camadas, lavar a camada orgânica com ácido clorídrico 1N (250 mL) seguido de solução aquosa de cloreto de sódio a 25% (50 mL), e concentrar a solução, a menos de 50°C, para alcançar um volume de aproximadamente 25 mL. Adicionar etanol (50 mL), concentrar a solução, a menos de 50°C, para alcançar um volume de aproximadamente 25 mL, e adicionar mais etanol (50 mL). Concentrar a solução, a menos de 50°C, para alcançar um volume de aproximadamente 25 mL, aquecer a mistura de reação até aos 45-50°C, e agitar durante 1-2 h. Arrefecer a mistura de reação até aos 5-10°C com agitação ao longo de 2-3 h, e filtrar os sólidos resultantes. Enxaguar o bolo de filtração com etanol (25 mL) e secar num forno a menos de 50°C sob pressão reduzida para dar 7-cloro-2-metil-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona como um sólido esbranquiçado (14,9 g, 99,9% de pureza, 88,5% de rendimento).

Os seguintes compostos são preparados essencialmente através do método da Preparação 32.

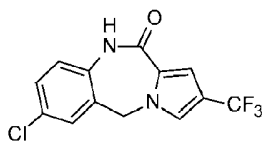
Preparação N°.	Nome	Estrutura	MS (m/z): (M+1).
33	2,7-Dimetil-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[3,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona		227,09
34	2-Bromo-7-cloro-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[3,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona		312,93

(continuação)

Preparação N°.	Nome	Estrutura	MS (m/z): (M+1).
35	7-Metil-2-(trifluorometil)-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[3,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona		281,14
36	2,7-Dicloro-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[3,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona		267,04
37	7-Cloro-3-(metilsulfanil)-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona		279,04 [M+H] ⁺ 579,02 [2M+Na] ⁺
38	2-Bromo-7-metil-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona		291,04/ 292,99
39	7-Cloro-2-(1-metiletil)-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[3,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona		275,19
40	7-Cloro-3-(trifluorometil)-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona		300,99
41	7-Cloro-2-etil-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona		261,19
42	1-Metoxi-2,7-dimetil-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona		257,14

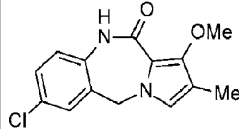
Preparação 43

Síntese alternativa de 7-cloro-2-(trifluorometil)-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona.



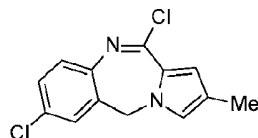
Adicionar dicloreto de estanho (3 equiv; 3,02 g, 15,77 mmol) em ácido clorídrico 5M (20 mL, 100 mmol) a 1-(5-cloro-2-nitrobenzil)-4-(trifluorometil)-1H-pirrole-2-carboxilato de etilo (1 equiv; 1,98 g, 5,26 mmoles) e etanol (100 mL) a 50°C. Aquecer de um dia para o outro e depois durante mais 26 h, remover a maior parte do etanol *in vacuo* e diluir a solução resultante com água e recolher o precipitado resultante através de filtração, lavar bem com água e secar *in vacuo* a 40°C. Absorver o sólido em sílica, cromatografar eluindo com DCM/metanol (5:95) para dar um aminoéster não ciclizado (0,260 g) e 7-cloro-2-(trifluorometil)-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona (0,613 g). Aquecer o éster não ciclizado numa mistura de ácido clorídrico 5M (10 mL, 50 mmol) durante 80 h. Remover o etanol *in vacuo* e recolher o sólido precipitado resultante através de filtração e lavar com água para dar 7-cloro-2-(trifluorometil)-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona (0,17 g). Combinar com a 7-cloro-2-(trifluorometil)-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona anterior para dar (0,794 g, 50% de rendimento). MS (m/z): 300,99 (M+1).

O seguinte composto é preparado essencialmente através do método da Preparação 43.

Preparação Nr.	Nome	Intermediário	MS (m/z): (M+1).
44	7-Cloro-1-metoxi-2-metil-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-11-ona		277,09

Preparação 45

Síntese de 7,11-dicloro-2-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina.



A uma suspensão de 7-cloro-2-metil-5,10-di-hidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona (40,6 g, 164,58 mmoles) em metoxibenzeno (250 mL) a 70°C adicionar N,N-dimetilanilina (2,8 equiv; 58,59 mL, 460,8 mmoles) numa porção seguida de cloreto de fosforilo (2,3 equiv (molar); 35,18 mL, 378,52 mmoles) ao longo de 20 minutos, controlando a exotermia por adição. Aquecer a solução escura resultante a 90°C durante 1,5 h. Adicionar mais cloreto de fosforilo (0,33 equiv; 5,05 mL, 54,31 mmoles) e aquecer a mistura a 90°C durante mais 1h para dar conversão completa. Evaporar quase até à secura e partilhar o resíduo entre água (500 mL) e acetato de etilo (2 x 500 mL). Combinar as camadas orgânicas e lavar com água (500 mL) depois salmoura. Secar sobre Na₂SO₄, filtrar e evaporar em sílica. Passar através de uma almofada de gel de sílica com iso-hexano/acetato de etilo (eluição gradiente desde 5 até

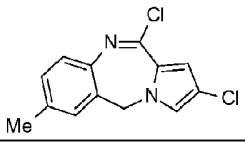
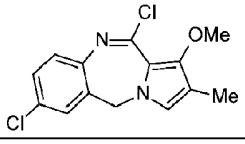
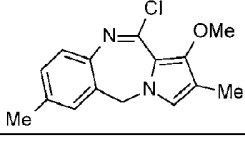
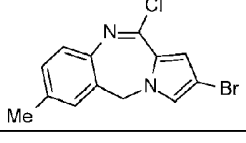
25%). Combinar as frações do produto e evaporar até uma pequena quantidade de solvente. Adicionar iso-hexano (150 mL) e recolher o pó amarelo resultante através de filtração, para dar 7,11-dicloro-2-metil-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepina (34,0 g, 78% de rendimento). MS (*m/z*): 265,1 (*M*+1).

Síntese alternativa:

Sob uma atmosfera de N₂ adicionar cloreto de fosforilo (124 g, 819 mmol) a uma mistura de 7-cloro-2-metil-5,10-di-hidro-11*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-11-ona (100 g, 405 mmol), *N,N*-dimetilaniлина (138 g, 1,14 mol) e anisole (550 mL). Aquecer até aos 80-85°C e agitar durante 4 h a 6 h. Concentrar até um total de 1,5 volumes a 2,5 volumes enquanto a temperatura é mantida abaixo dos 75°C. Arrefecer até aos 15-25°C. Adicionar diclorometano (600 mL) gota a gota e agitar durante 1 h. Adicionar a mistura resultante a água (600 mL) enquanto a temperatura é mantida entre os 10°C e os 35°C. Agitar durante 1 h. e depois separar as camadas. Extrair a camada aquosa com diclorometano (600 mL). Lavar as camadas orgânicas combinadas com HCl 1,0N (600 g) seguido de NaHCO₃ a 7% (600 g). Filtrar a camada orgânica através de diatomite (20 g a 30 g) e sílica gel (60 g a 100 g). Concentrar o filtrado resultante num total de 1,5 volumes a 2,5 volumes enquanto a temperatura é mantida abaixo dos 45°C. Adicionar heptano (270 g a 410 g) e concentrar o filtrado resultante num

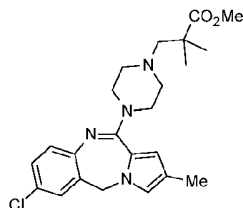
total de 1,5 volumes a 2,5 volumes enquanto a temperatura é mantida abaixo dos 45°C. Adicionar heptano (150 g a 210 g), arrefecer até aos 5°C a 10°C, e agitar durante 2 h a 3 h. Filtrar, enxaguar o bolo de filtração com heptano, e secar sob vácuo, a menos de 45°C, para obter o composto em epígrafe como um sólido amarelo pálido (90% a 95% de rendimento)

Os seguintes compostos são preparados essencialmente através do método da Preparação 45.

Preparação N°.	Nome	Estrutura	MS (m/z): (M+1).
46	3,11-Dicloro-7-metil-5H-pirrolo[3,1-c][1,4]benzodiazepina		265,09/267,04
47	7,11-Dicloro-1-metoxi-3-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina		295,09/297,04
48	11-Cloro-2,7-dimetil-1-metoxi-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina		275,14/277,09
49	2-Bromo-11-cloro-7-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina		309,04/310,98

Preparação 50

Síntese de 3-[4-(7-cloro-2-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo.



Adicionar cloreto de fosforilo (1,47 mL, 2,43 g, 15,85 mmoles) a 7-cloro-2-metil-5,10-di-hidro-11H-pirrolo-[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona (1,117 g, 4,53 mmoles) em DCM (50 mL) e agitar à temperatura ambiente ao longo de um fim-de-semana. Adicionar gelo-água à mistura de reação depois adicionar DCM, separar a camada aquosa e lavar a camada de DCM com água e solução de hidrogenocarbonato de sódio. Secar a solução em DCM com $MgSO_4$, filtrar e evaporar o solvente *in vacuo* para dar 7,11-dicloro-2-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina (1,167 g).

Dissolver di-hidrocloreto de 2,2-dimetil-3-(piperazin-1-il)propanoato de metilo (1,61 g, 5,89 mmoles) em água e carregar em dois cartuchos SCX-2 (10 g). Lavar os cartuchos com metanol e eluir com amoníaco 2M em metanol. Concentrar *in vacuo*, depois dissolver o óleo resultante em acetonitrilo (40 mL). Adicionar 7,11-dicloro-2-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina (1,167 g, 4,4 mmoles) à solução de acetonitrilo. Dividir a solução de acetonitrilo e colocar dentro de 2 tubos de micro-ondas, adicionar carbonato de potássio (0,89 g, 6,79 mmoles) a cada tubo de micro-ondas e aquecer e agitar a 140°C no micro-ondas durante 3,5 h. Deixar a mistura de reação arrefecer, filtrar, lavar o sólido recolhido no sinterizado com aceto-

nitrilo depois concentrar o filtrado *in vacuo*, adicionar metanol e depois evaporar até à *secura*. Tratar com mais metanol e recolher o precipitado resultante, lavar o precipitado com metanol para dar 3-[4-(7-cloro-2-metil-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo como um sólido cristalino (1,1 g). MS (m/z): 429,18 (M+1).

Síntese alternativa de 3-[4-(7-cloro-2-metil-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo.

A uma suspensão de 7,11-dicloro-2-metil-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepina (34,0 g, 128,23 mmoles) em acetonitrilo (300 mL) adicionar hidrocloreto de 2,2-dimetil-3-(piperazin-1-il)-propionato de metilo (2,1 equiv; 63,75 g, 269,29 mmoles) e carbonato de potássio (4 equiv; 70,89 g, 512,93 mmoles). Aquecer a mistura ao refluxo de um dia para o outro. Evaporar até à *secura*. Partilhar o resíduo entre água (500 mL) e EtOAc (2 x 500 mL). Combinar a camadas orgânicas e lavar com água (500 mL) depois salmoura. Secar sobre sulfato de sódio, filtrar e evaporar até um óleo castanho. Adicionar iso-hexano (~150 mL) e um cristal de semente da Preparação 50. Deixar a cristalizar ao longo de 2 h, depois transferir o balão para um frigorífico e deixar a repousar. Recolher o sólido cristalino pesado resultante através de filtração, lavando com iso-hexano frio. Secar num forno de vácuo a 40°C durante 1 h, para dar 3-[4-(7-cloro-2-metil-5*H*-pirrolo[2,1-

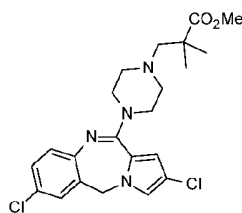
c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo (53,6 g, 97% de rendimento). MS (m/z): 429,18 (M+1).

Segunda síntese alternativa de 3-[4-(7-cloro-2-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo.

Aquecer uma mistura de 7,11-dicloro-2-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina (10,0 g, 37,7 mmol), dihidroclorato de 2,2-dimetil-3-(piperazin-1-il)-propionato de metilo (19,4 g, 71,0 mmol), di-isopropilamina (22,9 g, 226 mmol), e acetonitrilo (80 g) a 80°C a 85°C durante 22 h a 26 h. Arrefecer até aos 30°C a 40°C e adicionar acetato de etilo (80 g). Adicionar água (80 g) gota a gota. Agitar 40 min a 60 min e separar as camadas. Extrair a camada aquosa com acetato de etilo (60 g a 80 g). Lavar as camadas orgânicas combinadas com cloreto de sódio aquoso a 25% (2 X 40 g). Concentrar a camada orgânica até um total de 1,5 volumes e 3,5 volumes enquanto a temperatura é mantida a menos de 50°C. Adicionar heptano (41 g a 55 g) a 40°C a 50°C) e agitar durante 2 h a 3 h. Concentrar até um total de 1,5 volumes a 3,0 volumes enquanto a temperatura é mantida abaixo dos 50°C. Arrefecer até aos 0°C a 10°C e agitar durante 2 h a 3 h. Filtrar, lavar o bolo de filtração com heptano (3,0 g a 10,0 g), e secar sob vácuo, a menos de 60°C, para produzir o composto em epígrafe (16,0 g, 94,7% %p/p ensaio, 94% de rendimento) como um sólido amarelo, leve.

Preparação 51

Síntese de 3-[4-(2,7-dicloro-5H-pirrólo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo.



Adicionar cloreto de fosforilo (5 equiv; 4,36 mL, 7,19 g, 46,89 mmoles) a 2,7-dicloro-5,10-di-hidro-11H-pirrólo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona (1 equiv; 2,505 g, 9,38 mmoles) em clorofórmio (80 mL) e aquecer e agitar a 50°C de um dia para o outro. Decantar a solução da reação e evaporar *in vacuo* até um óleo. Dissolver o óleo em DCM, lavar com solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio saturada. Secar a solução em DCM sobre Na₂SO₄, filtrar e concentrar até à secura para dar 2,7,11-tricloro-5H-pirrólo[2,1-c][1,4]benzodiazepina como um sólido colorido de cor creme. Paralelamente dessalinizar hidrocloreto de 2,2-dimetil-3-(piperazin-1-il)propanoato de metilo (0,837 g, 3,54 mmoles) através de dissolução em metanol, adicionar a solução metanólica a uma coluna SCX-2 (10 g) lavar com metanol e depois eluir com solução 2,5M de amoníaco em metanol, evaporar a fração de amoníaco em metanol para dar 2,2-dimetil-3-(piperazin-1-il)propanoato de metilo (0,665 g) como um óleo. Misturar este óleo com 2,7,11-tricloro-5H-

pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepina (0,505 g 1,77 mmoles), carbonato de potássio (0,733 g, 5,31 mmoles) e acetonitrilo (20 mL) e aquecer ao refluxo de um dia para o outro. Arrefecer a mistura de reação até à temperatura ambiente e filtrar, lavando o sinterizado com EtOAc, depois evaporar o filtrado *in vacuo* até um sólido. Cromatografar em sílica eluindo com metanol/DCM (eluição gradiente 2:98 a 8:92). Evaporar as frações contendo produto para dar 3-[4-(2,7-dicloro-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo (0,69 g). MS (m/z): 449,13/451,07 (M+1).

Os seguintes compostos são preparados essencialmente através do método da Preparação 51.

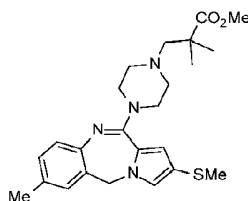
Preparação Nr.	Nome	Estrutura	MS (m/z) : (M+1) .
52	3-[4-(3,7-Dimetil-5 <i>H</i> -pirrolo[3,1- <i>c</i>][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo		409,23
53	3-[4-(2-Bromo-7-cloro-5 <i>H</i> -pirrolo[2,1- <i>c</i>][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo		493,00/ 495,00
54	3-[4-(7-Cloro-2-etil-5 <i>H</i> -pirrolo[2,1- <i>c</i>][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo		443,18
55	3,3-Dimetil-3-[4-(7-metil-3-(trifluorometil)-5 <i>H</i> -pirrolo[2,1- <i>c</i>][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-propanoato de metilo		463,17

(continuação)

Preparação Nr.	Nome	Estrutura	MS (m/z) : (M+1) .
56	3-[4-(7-Cloro-3-(trifluorometil)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo		483,17
57	3-[4-(7-Cloro-2-(1-metiletil)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo		457,07/459. 17
58	3,3-Dimetil-3-[4-(7-metil-3-(trifluorometil)-5H-pirrolo[3,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-propanoato de metilo		463,17
59	3-[4-(3-Bromo-7-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo		473,12/475,07

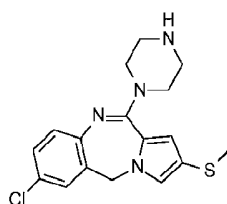
Preparação 60

Síntese de 2,2-dimetil-3-[4-(7-metil-2-(metilsulfanil)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-propanoato de metilo.



Tratar 1-(5-metil-2-nitrobenzil)-4-(metilsulfanil)-1H-pirrole-2-carboxilato de metilo (3,49 mmoles; 1,12 g) com ácido acético (15 mL) depois tratar com ferro, pó (10,5 mmoles; 585 mg) depois lentamente aquecer num banho

de óleo a 80°C. Após algumas horas aumentar a temperatura do banho de óleo para 90°C. Depois deixar a reação a 60°C durante 2 dias. Depois concentrar até à secura para remover o ácido acético depois tratar com EtOAc e lavar através de uma almofada de sílica com mais EtOAc até que a cor laranja pare de sair. Concentrar o eluente vermelho até à secura depois tratar com metanol depois re-concentrar e dissolver em DCM (20 mL) e tratar com cloreto de fosforilo (1,0 mL). Aquecer a reação num banho de óleo a 50°C de um dia para o outro. Depois arrefecer a reação até à TA e tratar com gelo depois lavar duas vezes com água e depois NaHCO₃ (aq). Secar a camada orgânica ao longo de MgSO₄, filtrar e concentrar até um alcatrão. Entretanto dissolver di-hidrocloreto de 2,2-dimetil-3-(piperazin-1-il)-propanoato de metilo (1,60 g, 5,86 mmoles) em água depois carregar num cartucho SCX-2 (2 x 10 g) e lavar com metanol e depois eluir com amoníaco em metanol. Concentrar a solução básica até à secura num óleo. Depois dissolver este óleo em acetonitrilo (50 mL) e adicionar a uma mistura do alcatrão e carbonato de potássio (1,0 g) depois aquecer até refluxo. Após 2 horas, submeter a reação ao micro-ondas até 140°C durante 2 horas. Depois filtrar a reação e extrair com acetonitrilo e acetona. Combinar e concentrar os licorões-mãe até à secura em sílica depois purificar através de cromatografia *flash* em sílica (40 g) (EtOAc a 10-50% em hexano). Retomar as frações que contém produto limpo, combinar e concentrar para dar 2,2-dimetil-3-[4-(7-metil-2-(metilsulfanil)-5H-pirrólo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-propanoato de metilo (418 mg; 27% de rendimento). MS (m/z): 441,18 (M+1).

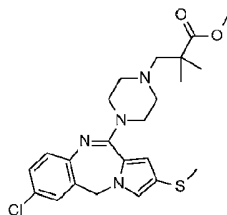
Preparação 61**Síntese de 7-cloro-2-(metilsulfanil)-11-(piperazin-1-il)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina.**

Adicionar cloreto de fosforilo (5 equiv; 2,21 mL, 3,64 g, 23,76 mmoles) a 7-cloro-2-(metilsulfanil)-5,10-dihidro-11H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-ona (1,38 g, 4,75 mmoles) em clorofórmio (20 mL) e aquecer e agitar a 45°C durante 2 h. Aumentar a temperatura da reação até aos 60°C e agitar durante mais 2 h. Remover o clorofórmio *in vacuo* e dissolver o resíduo em DCM (100 mL) e lavar com solução de bicarbonato de sódio saturada (100 mL). Filtrar a camada DCM através de uma frita de separação de fases e evaporar o solvente *in vacuo* para dar um óleo viscoso. Dissolver o óleo em acetonitrilo (10 mL) e adicionar carbonato de céσιο (3 equiv; 4,65 g, 14,26 mmoles). Adicionar a esta mistura piperazina (10 equiv; 4,09 g, 47,52 mmoles) em acetonitrilo seco (10 mL) e aquecer e agitar a mistura sob refluxo de um dia para o outro. Arrefecer a mistura de reação e adicionar solução saturada de cloreto de amónio (100 mL) e extrair em EtOAc (2 x 50 mL). Combinar a camadas orgânicas e lavar com água (3 x 100

mL), secar sobre $MgSO_4$, filtrar e evaporar o solvente *in vacuo* para dar 7-cloro-2-(metilsulfanil)-11-(piperazin-1-il)-5H-pirrólo[2,1-c][1,4]benzodiazepina (1,0 g, 60%). MS (m/z): 347,13 (M+1).

Preparação 62

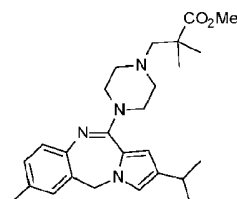
Síntese de 3-[4-(7-cloro-2-(metilsulfanil)-5H-pirrólo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo.



Adicionar 2,2-dimetil-3-oxo-propanoato de metilo (0,928 g, 7,13 mmoles) em DCM (5 mL) a 7-cloro-2-(metilsulfanil)-11-(piperazin-1-il)-5H-pirrólo[2,1-c][1,4]benzodiazepina (1,0 g, 2,85 mmoles) em DCM (10 mL) e agitar sob azoto durante 30 minutos à temperatura ambiente. Adicionar triacetoxiboro-hidreto de sódio (3 equiv; 1,89 g, 8,56 mmoles) à mistura de reação e agitar sob azoto de um dia para o outro à temperatura ambiente. Adicionar metanol e aplicar numa coluna SCX-2, lavar com metanol e eluir com amoníaco 2M em metanol. Evaporar a solução de metanol para dar 3-[4-(7-cloro-2-(metilsulfanil)-5H-pirrólo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo (1,23 g, 84%). MS (m/z): 461,12 (M+1).

Preparação 63

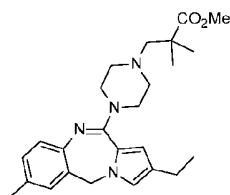
Síntese de 2,2-dimetil-3-{4-[7-metil-2-(propan-2-il)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il]piperazin-1-il}propanoato de metilo.



Misturar 3-[4-(2-bromo-7-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo (1,00 equiv; 600,00 mg, 1,27 mmoles), 4,4,5,5-tetrametil-2-(prop-1-en-2-il)-1,3,2-dioxaborolano (3,00 equiv; 638,93 mg, 3,80 mmoles) em metanol (15 mL). Adicionar uma mistura pré-misturada de 1,09% em peso de tris(dibenzilidenoacetoni)bis-paládio ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$), 1,16% em peso de 1,1'-bis(di-tert-butilfosfino)ferroceno (dtbpf) e 97,75% em peso de fosfato de tripotássio (1,06 g) e aquecer a 140°C durante 25 min num micro-ondas. Filtrar a mistura de reação através de celite e diluir até um volume de 25 mL com metanol. Hidrogenar a solução metanólica passando a 1 mL/min através de um hidrogenador de fluxo H-Cube® utilizando um cartucho catalítico de Pd a 10%/C a 50°C. Evaporar o solvente *in vacuo* para dar 2,2-dimetil-3-{4-[7-metil-2-(propan-2-il)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il]piperazin-1-il}propanoato de metilo. MS (m/z): 437,28 (M+1).

Preparação 64

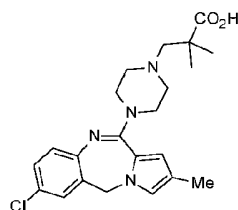
Síntese de 3-[4-(2-etil-7-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo.



Misturar 3-[4-(2-bromo-7-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo (1,00 equiv; ; 620,00 mg, 1,31 mmoles), trietenilboroxinopiridina (1,5 equiv; 472,79 mg, 1,96 mmoles;) em metanol (15 mL). Adicionar uma mistura pré-misturada de 1,09% em peso de tris(dibenzilidenoacetil)bis-paládio ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$), 1,16% em peso de 1,1'-bis(di-tert-butilfosfino)ferroceno (dtbpf) e 97,75% em peso de fosfato de tripotássio (1,10 g) e aquecer a 140°C durante 25 min num micro-ondas. Filtrar a mistura de reação através de celite e diluir até um volume de 25 mL com metanol. Hidrogenar a solução metanólica passando a 1 mL/min através de um hidrogenador de fluxo H-Cube® utilizando um cartucho catalítico de Pd a 10%/C a 50°C. Evaporar o solvente *in vacuo* para dar 3-[4-(2-etil-7-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo. MS (m/z): 423,18 (M+1).

Exemplo 1

Síntese de ácido 3-[4-(7-cloro-2-metil-5H-pirrólo[2,1-c]-[1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico.



A uma suspensão de 3-[4-(7-cloro-2-metil-5H-pirrólo[2,1-c]-[1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo (28,0 g, 65,27 mmoles) numa mistura de álcool isopropílico (150 mL) e água (150 mL) adicionar hidróxido de sódio (3 equiv; 7,83 g, 195,82 mmoles) e aquecer a 70°C durante 4 h para dar uma solução transparente. Aquecer a 70°C durante mais 1 h depois arrefecer ligeiramente. Adicionar ácido clorídrico 5M para dar pH 8 e precipitar um sólido branco. Adicionar mais ácido clorídrico 5M para dar um pH entre 6,5 e 7. Reduzir o volume de solvente para metade e depois arrefecer o balão num frigorífico durante 0,5 h. Recolher o sólido branco resultante através de filtração e secar de um dia para o outro num forno de vácuo a 40°C sobre pentóxido de fósforo para dar o ácido 3-[4-(7-cloro-2-metil-5H-pirrólo[2,1-c]-[1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico (26,5 g, 98% de rendimento). MS (m/z): 415,3 (M+1). Ponto de fusão por DSC = 246,5°C (início).

Os seguintes compostos são preparados essencialmente através do método do Exemplo 1.

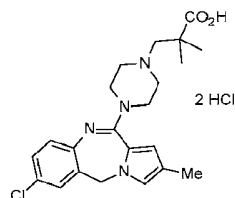
Exemplo Nr.	Nome	Estrutura	MS (m/z) : (M+1) .
2	Ácido 3-[4-(3,7-dimetil-5H-pirrolo[3,1-c]-[1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		395,28
3	Ácido 3-[4-(2-bromo-7-cloro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		480,97
4	Ácido 3-[4-(7-cloro-2-etil-5H-pirrolo[2,1-c]-[1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		429,18
5	Ácido 2,2-dimetil-3-[4-[7-metil-2-(trifluorometil)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il]piperazin-1-il]propanoico		449,18
6	Ácido 3-[4-(7-cloro-3-(trifluorometil)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-3,3-dimetilpropanoico		468,62
7	Ácido 3-[4-(2,7-dicloro-5H-pirrolo[2,1-c]-[1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		435,18
8	Ácido 3-[4-(7-cloro-2-(metilsulfanil)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-3,3-dimetilpropanoico		447,17

(continuação)

Exemplo Nr.	Nome	Estrutura	MS (m/z) : (M+1) .
9	Ácido 2,2-dimetil-3-{4-[7-metil-2-(propan-2-il)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il]piperazin-1-il}propanoico		423,17
10	Ácido 3-[4-(2-etil-7-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		409,18
11	Ácido 3-{4-[7-cloro-2-(propan-2-il)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il]piperazin-1-il}-2,2-dimetilpropanoico		443,18
12	Ácido 2,2-dimetil-3-{4-[7-metil-2-(metilsulfanil)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il]piperazin-1-il}propanoico		427,18

Exemplo 13

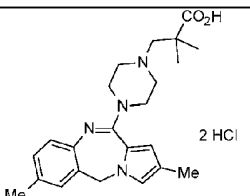
Síntese de di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(7-cloro-2-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico.



A uma suspensão de ácido 3-[4-(7-cloro-2-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico (24,25 g, 58,44 mmoles) em álcool

isopropílico (250 mL) a 60°C, adicionar uma solução 4M de cloreto de hidrogénio em dioxano (2,4 equiv; 35,07 mL, 140,26 mmoles) ao longo de 10 minutos para dar uma solução transparente. Deixar a arrefecer ligeiramente depois evaporar até um sólido esbranquiçado. Triturar com uma pequena quantidade de éter dietílico e recolher sólido creme em pó através de filtração. Secar num forno de vácuo a 40°C de um dia para o outro. Moer até um pó fino e secar num forno de vácuo a 60°C durante 6 h. Monitorizar os níveis de álcool isopropílico residual através de 1H NMR. Dissolver em etanol quente (350 mL) e evaporar até à secura. Triturar com etanol (50 mL) e evaporar outra vez até à secura. Triturar com éter dietílico seco (200 mL) e recolher o sólido resultante através de filtração. Secar durante 6 h num forno de vácuo a 50°C para dar di-hidroclorato de ácido 3-[4-(7-cloro-2-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico (26,9 g, 94% de rendimento) MS (m/z): 415,2 (M+1).

Os seguintes compostos são preparados essencialmente através do método do Exemplo 13.

Exemplo Nr.	Nome	Estrutura	MS (m/z) : (M+1) .
14	Di-hidroclorato de ácido 3-[4-(2,7-dimetil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		395,28

(continuação)

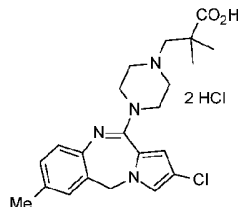
Exemplo Nr.	Nome	Estrutura	MS (m/z) : (M+1) .
15	Di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(2-bromo-7-cloro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		480,97
16	Di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(7-cloro-2-etil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		429,18
17	Di-hidrocloreto de ácido 2,2-dimetil-3-[4-[7-metil-2-(trifluorometil)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il]piperazin-1-il]propanoico		449,18
18	Di-hidrocloreto de ácido 3-[4-[7-cloro-2-(trifluorometil)-5H-pirrolo[3,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il]piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		469,07
19	Di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(2,7-dicloro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		434,68
20	Hidrocloreto de ácido 3-[4-[7-cloro-2-(metilsulfanil)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il]piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		446,98
21	Di-hidrocloreto de ácido 2,2-dimetil-3-[4-[7-metil-2-(propan-2-il)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il]piperazin-1-il]propanoico		423,18
22	Di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(2-etil-7-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		409,18

(continuação)

Exemplo Nr.	Nome	Estrutura	MS (m/z) : (M+1) .
23	Di-hidrocloreto de ácido 3-{4-[7-cloro-2-(propan-2-il)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il]piperazin-1-il}-2,2-dimetilpropanoico		443,18
24	Di-hidrocloreto de ácido 2,2-dimetil-3-{4-[7-metil-2-(metilsulfanil)-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il]piperazin-1-il}propanoico		427,18

Exemplo 25

Síntese de Di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(2-cloro-7-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico.



Dissolver di-hidrocloreto de 2,2-dimetil-3-(piperazin-1-il)-propanoato de metilo (1,49 g, 5,47 mmoles) em água e absorver numa coluna SCX2. Lavar a coluna com metanol e eluir 2,2-dimetil-3-piperazin-1-il-propanoato de metilo com amoníaco 2M em metanol. Remover o metanol *in vacuo* e adicionar o 2,2-dimetil-3-(piperazin-1-il)propanoato de metilo a acetonitrilo (12 mL). Adicionar 2,11-dicloro-7-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina (0,85

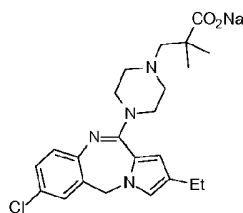
g, 3,22 mmoles) e bicarbonato de sódio (0,405 g, 4,83 mmoles) à solução de acetonitrilo. Aquecer e agitar no micro-ondas durante 30 minutos a 140°C. Arrefecer até à temperatura ambiente, absorver a mistura de reação em sílica e purificar através de cromatografia (eluição gradiente com EtOAc/iso-hexano desde 0:100% até 100:0%). Recolher as frações que contêm produto e evaporar o solvente *in vacuo* e dissolver o resíduo em metanol (10 mL) e adicionar hidróxido de lítio (0,235 g, 9,65 mmoles). Aquecer e agitar a solução metanólica no micro-ondas durante 12,5 minutos a 140°C. Arrefecer até à temperatura ambiente e acidificar com ácido acético e depois evaporar o solvente sob pressão reduzida. Dissolver o resíduo em HCl 2M (aq) em excesso e depois evaporar até à secura. Dissolver o resíduo em água e imobilizar numa resina macroporosa de hidrogenocarbonato de polistireno (PL-HCO₃). Lavar a resina com água e eluir a partir da resina com HCl 2M (aq). Evaporar a solução até à secura para dar di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(2-cloro-7-metil-5H-pirrólo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico (0,177 g; 11,28% de rendimento). MS (m/z): 415,18 (M+1).

Os seguintes compostos são preparados essencialmente através do método do Exemplo 25.

Exemplo Nr.	Nome	Estrutura	MS (m/z): (M+1).
26	Di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(7-cloro-1-metoxi-2-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		445,18
27	Di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(1-metoxi-3,7-dimetil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		425,18
28	Di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(2-bromo-7-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico		459,07, 461,07

Exemplo 29

Síntese de 3-[4-(7-cloro-2-etil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de sódio.

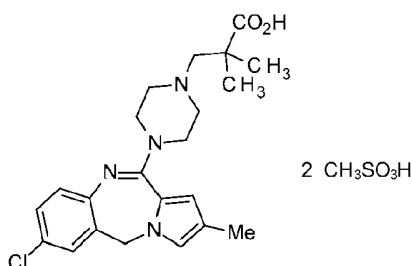


Dissolver di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(7-cloro-2-etil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico (201 mg, 400 μ moles em água e metanol (5 mL) depois carregar num cartucho SCX-2 (2 g). Lavar com metanol e depois eluir com amoníaco em metanol. Concentrar a solução básica até à secura para dar ácido 3-[4-(7-cloro-2-etil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-

il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico (160 mg, 373 μ moles). Depois tratar com hidróxido de sódio 2N (187 μ L, (373 μ moles) e água (3 mL) para provocar a solução. Em seguida secar por congelação para produzir 3-[4-(7-cloro-2-etil-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de sódio (164 mg, 98% de rendimento). MS (m/z): 429,18 (M+1).

Exemplo 30

Síntese de Di-metanossulfonato de ácido 3-[4-(7-cloro-2-metil-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico



Adicionar acetonitrilo (5 mL) a ácido 3-[4-(7-cloro-2-metil-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico (0,106 g, 0,255 mmol) para criar uma lama. Adicionar ácido metanossulfônico (0,050 ml, 0,075 g, 0,76 mmol) à lama em agitação (1000 rpm) e agitar a solução resultante a 60°C até se precipitar um sólido branco. Arrefecer esta lama, e isolar o sólido através de filtração para obter di-metanossulfonato de

ácido 3-[4-(7-cloro-2-metil-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico (0,15 g).

Dados da literatura (Morairty SR, Hedley L, Flores J, Martin R, Kilduff TS. (2008) Selective 5-HT_{2A} and 5-HT₆ recetor, antagonists promote sleep in rats. *Sleep* 31, 34-44.; e Barbier, A.J., e Bradbury, M.J., *Histaminergic Control of Sleep- Wake Cycles: Recent Therapeutic Advances for Sleep and Wake Disorders, CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, vol 6, pg. 31-43 (2007)) e dados gerados em estudos animais não-clínicos apoiam o papel dos agonistas inversos de H₁/antagonistas de 5-HT_{2A} com dupla atividade no tratamento de insónia e no tratamento sintomático de insónia associada a outros distúrbios tais como distúrbios depressivos, distúrbios de ansiedade, dor, alergias, distúrbios dos pulmões ou das vias aéreas, distúrbios psiquiátricos, demência, e/ou doenças neurodegenerativas, e/ou distúrbios do sono do ritmo circadiano. Verificou-se especificamente que determinados agonistas inversos de H₁/antagonistas de 5-HT_{2A} com dupla atividade são eficazes no aumento do tempo total de sono utilizando roedores monitorizados com EEG sem hipoatividade desproporcionada ou clinicamente relevante, redução do sono REM, ou hipersonolência.

Para melhor demonstrar as características dos presentes compostos, os compostos podem ser sujeitos aos seguintes ensaios *in vitro* e *in vivo*:

Ensaaios de ligação e de atividade in vitro:**Ensaio competitivo de ligação a H1**

Experiências de ligação a [³H]-pirilamina são realizadas em SPA (ensaio de proximidade de cintilação) formato de 96 cavidades. As membranas usadas neste ensaio são preparadas a partir de células HEK-293 que expressam de modo estável o recetor H1 recombinante (humano). A incubação é iniciada pela adição de uma mistura de pérolas de SPA WGA PVT (1 mg/cavidade, Perkin Elmer (MA, USA) RPNQ0001) e 3 µg de membranas para o tampão de ensaio (Tris 67 mM; pH 7,6) contendo [³H]-Pirilamina 3,5 nM e variando as concentrações do composto de teste (curvas de resposta à concentração de 10 pontos). Ligação não-específica é determinada na presença de Triprolidina 10 µM. Amostras são incubadas durante quatro horas à temperatura ambiente (22° C) e depois lidas num Microbeta Trilux.

Ensaio competitivo de ligação a 5-HT_{2A}

Experiências de ligação a [³H]-cetanserina são realizadas em formato SPA de 96 cavidades. As membranas usadas neste ensaio são preparadas a partir de células AV-12 que expressam de forma estável o recetor 5-HT_{2A} recombinante (humano). A incubação é iniciada através da adição de uma mistura de pérolas de SPA WGA YSi (1 mg/cavidade, Perkin Elmer (MA, USA), RPNQ0011) e 2 µg de membranas para tampão de ensaio (Tris 67 mM, EDTA 0,5 mM;

pH 7,6) contendo [³H]-Cetanserina 3,1 nM e variando as concentrações do composto de teste (curvas de resposta à concentração de 10 pontos). Ligação não específica é determinada na presença de 1-(1-Naftil)piperazina 20 µM. Amostras foram incubadas durante quatro horas à temperatura ambiente (22° C) e depois lidas num Microbeta Trilux.

Ensaio competitivo de ligação a 5-HT_{2c}

Experiências de ligação a [¹²⁵I]-(±)DOI são realizadas em formato SPA de 96 cavidades. As membranas usadas neste ensaio são preparadas a partir de células AV-12 que expressam de forma estável o recetor 5-HT_{2c} recombinante (humano). A incubação é iniciada através da adição de uma mistura de pérolas SPA WGA PVT (0,5 mg/cavidade, Perkin Elmer (MA, USA), RPNQ0001) e 2,5 µg de membranas para tampão de ensaio (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 0,5 mM, pargilina 10 µM, ácido ascórbico a 0,1%, pH 7,4) contendo [[¹²⁵I]-(±)DOI 0,2 nM e variando as concentrações do composto de teste (curvas de resposta à concentração de 10 pontos). Ligação não específica é determinada na presença de 1-(1-Naftil)piperazina 20 µM. As amostras são incubadas durante quatro horas à temperatura ambiente (22° C) e depois lidas num Microbeta Trilux.

Análise de dados de ligação

As curvas são avaliadas utilizando uma equação não linear logística de 4 parâmetros para obter a

concentração de competidor que provoca a inibição de 50% de ligação a radioligando (IC_{50}). As constantes de dissociação no equilíbrio (K_i) são calculadas de acordo com a equação $K_i = IC_{50}/(1+L/K_d)$, em que L é igual à concentração de radioligando utilizada na experiência e K_d é igual à constante de dissociação no equilíbrio do radioligando para o recetor, determinada a partir da análise de saturação padrão ou experiências competitivas homólogas. Valores reportados para K_i , em que valores n são indicados, são apresentados como média geométrica \pm o erro padrão da média (SEM), com o número de determinações repetidas indicado por n. As médias geométricas são calculadas através da equação $GeoMean = 10^{(Average) (\log K_i 1 + \log K_i 2 + \dots \log K_i n)/\sqrt{n}}$.

Antagonismo a $GABA_A$ utilizando recetores nativos em culturas neuronais primárias

A atividade dos compostos nos recetores $GABA_A$ nativos é avaliada monitorizando os fluxos de cálcio utilizando um sistema FLIPR® (Leitor de Placas de Imagens Fluométricas (FLIPR®, Molecular Devices) de formato de 96 cavidades. Resumidamente, os neurónios embriónicos corticais são dissociados a partir de embriões de ratazana E18 e colocados em placas de densidade ótima FLIPR® de 96 cavidades revestidas com poli-D-lisina de fundo transparente de paredes negras. Depois de carregar as células com um corante sensível ao cálcio (Fluo4-AM, Molecular Devices), as células são imersas numa solução contendo

baixo teor em cloreto (cloreto substituído por gluconato). Sob estas condições a ativação de recetores GABA_A provoca um efluxo de iões cloreto (na direção do gradiente químico), que resulta na despolarização da membrana e consequentemente ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VGCCs). O influxo de cálcio através de VGCCs é registado e analisado *offline* utilizando o sistema FLIPR®. Para uma validação farmacológica do ensaio, as curvas de resposta à concentração (CRC) são registadas para o agonista padrão (GABA) e antagonista padrão (Gabazina). Quaisquer efeitos são determinados em modo CRC em função de uma concentração fixa de agonista GABA a 10 µM (equivalente a uma resposta GABA EC₉₀).

Métodos:

Os efeitos antagonistas dos compostos são quantificados utilizando curvas de resposta à dose de 10 pontos comparando as respostas da fluorescência do pico ao agonista GABA na presença e ausência do composto. A janela de ensaio é definida como sendo a resposta máxima obtida através de GABA na sua concentração EC₉₀ pré-determinada menos a resposta obtida por uma concentração de gabazine (50 µM) completamente inibidora. Os efeitos antagonistas são calculados como uma percentagem da janela de ensaio. Todos os dados são calculados como valores IC₅₀ relativos utilizando um programa de ajustamento da curva logística de quatro parâmetros (Prism Graphpad® 3.01). As potências antagonistas para todos os compostos são comparadas com gabazine com três repetições em cada realização de ensaio.

Os compostos exemplificados ou seus sais exemplificados são testados essencialmente tal como descrito anteriormente e verificou-se que têm alta afinidade para os recetores H1 e 5-HT_{2A} e seletividade sobre o recetor 5-HT_{2C}. Verificou-se que as K_i para os recetores H1 e 5-HT_{2A} para os compostos exemplificados são menos de 100 nM e 200 nM, respetivamente, enquanto que se verificou que as K_i para o recetor 5-HT_{2C} são maiores que 1000 nM.

Além disto, os compostos da invenção podem ser testados em ensaios de ligação e ensaios de atividade funcional através de métodos bem conhecidos para outros recetores fisiologicamente importantes tais como, mas não se limitando a, o canal hERG, outros recetores de serotonina (especificamente recetores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, falta de atividade agonista em recetores 5-HT_{2B}, recetores 5-HT_{2C}, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, e 5-HT₇), recetores muscarínicos, recetores dopaminérgicos (especificamente D1, D2, e D3), recetores GABA_A, recetores adrenérgicos e transportadores de monoamina. Determinados compostos exemplificados são testados nestes recetores e mostraram falta de atividade significativa.

Os compostos do Exemplos 1 e 13 são testados essencialmente tal como descrito anteriormente e verificou-se que possuem perfis de atividade tal como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Dados de Seletividade

	Exemplo 1	Exemplo 13
K _i de H1 (nM)	27,3	16,8
K _i de 5-HT _{2A} (nM)	57,5	63,2
EC ₅₀ (nM) de Agonista de 5-HT _{2B}	>10000	>10000
K _i de 5-HT _{2C} (nM)	3810	2370
GABA _A IC ₅₀ (μM)	-	>50
Canal hERG (μM)	>100	>100
K _i de Dopamina D ₁ (nM)	3790	1860
K _i de Dopamina D ₂ (nM)	>4500	3420
K _i de Dopamina D ₃ (nM)	>5680	>4110
K _i de 5-HT _{1A} (nM)	>6940	-
K _i de 5-HT _{1B} (nM)	>5580	>5580
K _i de 5-HT _{1D} (nM)	>3980	>8550
K _i de 5-HT _{1E} (nM)	-	>5370
K _i de 5-HT _{1F} (nM)	-	>8250
K _i de 5-HT ₅ (nM)	>8830	>9090
K _i de 5-HT ₆ (nM)	2690	>5830
K _i de 5-HT ₇ (nM)	>2060	>3970
K _i de alfa _{1A} Adrenérgico (nM)	>8910	>8910
K _i de alfa _{1B} Adrenérgico (nM)	>10900	>10900
K _i de alfa _{2A} Adrenérgico (nM)	>9030	>8470
K _i de alfa _{2B} Adrenérgico (nM)	>4980	>4800
K _i de alfa _{2C} Adrenérgico (nM)	>4020	>5330
Transportador de Serotonina	>641	>515
Transportador de Norepinefrina	>682	>526
Transportador de Dopamina	>879	>880

Portanto, espera-se que doses fisiologicamente relevantes dos compostos da invenção proporcionem inibição substancial de recetores H1 e 5-HT_{2A} *in vivo*, ao ao mesmo tempo que não interagem substancialmente com outros recetores fisiologicamente relevantes, e é por isso esperado que proporcionem a farmacologia desejada ao mesmo tempo que evitam efeitos indesejados associados com a atividade fora do alvo. Tais efeitos indesejados incluem, mas não se limitam aos seguintes: atividade antagonista de 5-HT_{2C} associada ao aumento de peso que emerge do tratamento, atividade agonista de 5-HT_{2B} associada com valvulopatia, modulação do canal hERG associada com prolongamento QT, e atividade GABA_A associada a atividade epilética. Além disto, é evitada a interferência com a fisiologia sono/vigília através da seletividade sobre os recetores de dopamina, outros recetores de serotonina, recetores adrenérgicos, e transportadores de monoamina.

Ocupância do Recetor 5-HT_{2A}: Ocupância do recetor é ensaiada para demonstrar a extensão da interação com o Recetor 5-HT_{2A} *in vivo*. Resumidamente, a ratasanas Sprague-Dawley macho (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) pesando aproximadamente 230-280 gramas é dado acesso a comida e água *ad lib* até ter início o protocolo experimental de 3 horas. É utilizado 1 mg/kg de cetanserina (antagonista de 5-HT_{2A} não seletivo) como um controlo positivo para estabelecer a validade do ensaio. Os compostos de teste ou de controlo são administrados através de sonda oral num veículo constituído por hidroxipropil-

beta-ciclodextrina a 20%. MDL 100907 ((R)-(+)- α -(2,3-Dimetoxifenil)-1-[2-(4-fluorofenil)etil]-4-piperidinometanol), um antagonista de 5-HT_{2A} seletivo, é utilizado como um marcador. MDL 100907 é suspenso em água com 5 μ l de ácido láctico diluído (mg/ml), diluído até 6 μ g/ml com solução salina, e administrado num volume de 1 mL/kg intravenosamente através da veia lateral da cauda para produzir uma dose de marcador de 3 μ g/kg. É administrado composto de teste às ratazanas, cetanserina, ou veículo (N = 4), seguido um hora depois por uma dose intravenosa de 3 μ g/kg de marcador de MDL 100907. É no momento da administração do marcador que a ocupância do recetor (RO) deve ser medida. Quinze minutos após a administração do marcador, as ratazanas são sacrificadas através de deslocação cervical. São recolhidas amostras de plasma e são removidas amostras do córtex frontal e cerebelo. O nível de marcador MDL 100907 é medido em cada amostra cortical e cerebelar. A RO é calculada utilizando o método de proporção bem conhecido o qual usa uma região de densidade de recetor alta representativa da ligação total (córtex frontal) normalizada por uma área sem recetor ou com níveis muito baixos de recetor (cerebelo). Esta região, referenciada como a região nula, representa ligação não específica da sonda do ligando. A proporção de veículo dos níveis de marcador no córtex referente ao cerebelo representa 0% de ocupância. Uma proporção de 1 representa 100% de ocupância e é alcançada quando toda a ligação específica ao recetor 5-HT_{2A} do marcador MDL 100907 é bloqueada. As proporções do intermediário do marcador

cortical para cerebelar a partir do grupo pré-tratado de composto de teste são interpoladas linearmente entre a proporção de níveis de marcador nos animais tratados com veículo (0% de ocupância) e uma proporção de 1 (100% de ocupância) de modo a determinar a percentagem de RO de 5-HT_{2A}.

Análise MDL 100907: Amostras de córtex e cerebelo são pesadas e colocadas em tubos de centrifugação cónicos em gelo. Quatro volumes (p/v) de acetonitrilo contendo ácido fórmico a 0,1% são adicionados a cada tubo. As amostras são depois homogeneizadas e centrifugadas a 14000 RPM (21920 x g) durante 16 minutos. Sobrenadante é diluído adicionando 100-900 µL de água esterilizada em frascos de injeção de HPLC para análise por LC/MS/MS. Análise de MDL 100907 é realizada utilizando uma HPLC Agilent modelo 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) e um espectómetro de massa API 4000. A separação cromatográfica é realizada numa coluna C18 de 2,1 X 50 mm (Agilent número parcial 971700-907) com uma fase móvel constituída por acetonitrilo a 60% em água com conteúdo global de ácido fórmico de 0,1%. A deteção de MDL 100907 é conseguida através da monitorização da transição iónica do precursor para produto com uma proporção de massa para carga (m/z) de 374,2 para 123,0. Padrões são preparados adicionando quantidades conhecidas de analito a amostras de tecido cerebral de ratas não tratadas e processando tal como descrito anteriormente.

Métodos Estatísticos: Curvas para cada estudo são ajustadas a uma função logística de 4 parâmetros com a base fixada em

0% utilizando JMP® versão 8.0 (SAS Institute Inc, Cary NC) e a ED₅₀ absoluta é calculada pelo *software*. Os valores são dados como médias, erros padrão e intervalos de confiança de 95%. O composto do Exemplo 13 é testado essencialmente tal como descrito e verificou-se que alcança ocupância alta do recetor de 5-HT_{2A} com uma EC₅₀ de 0,27 mg/kg (SE=0,069, CI de 95%=0,16-0,48 mg/kg).

Ocupância do Recetor H1 de Histamina: A RO de H1 é ensaiada para demonstrar a extensão da interação com o recetor H1 *in vivo*. Resumidamente, é dado a ratasanas Sprague-Dawley macho (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) pesando aproximadamente 230-280 gramas acesso *ad lib* a comida e água até ter início o protocolo experimental de 3 horas. O di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(8-fluorodibenzo[b,f][1,4]-oxazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico é utilizado como um controlo positivo e doxepina é utilizada como um marcador. Os compostos de teste e controlo são administrados através de sonda oral num veículo constituído por hidroxipropil-beta-ciclodextrina a 20%. A doxepina é dissolvida em água esterilizada (100 µg/ml), diluída até 2 µg/ml com solução salina, e administrada num volume de 0,5 mL/kg intravenosamente através da veia lateral da cauda para produzir uma dose de marcador de 1 µg/kg. É administrado às ratasanas o composto de teste, 15 mg/kg de controlo positivo, ou veículo, seguido 1 hora mais tarde por uma dose de "marcador" intravenoso de doxepina (N = 4). É no momento da administração do marcador que a RO deve ser medida. 40 min após a administração do marcador, as

ratazanas são sacrificadas por deslocação cervical. As amostras de plasma são recolhidas e o córtex frontal é removido. O nível de marcador de doxepina é medido em cada amostra cortical. A RO é calculada utilizando uma comparação dos níveis de marcador dentro do tecido sob condições de veículo (0% de ocupância) e condições de controlo positivo (100% de ocupância). 15 mg/kg de controlo positivo administrados intravenosamente com um pré-tratamento de 30 minutos são pré-determinados para representar bloqueio total da ligação específica do marcador a recetores H1. Grupos de tratamento adicionais com doses de composto de teste são interpolados linearmente entre grupos de veículo e de controlo positivo para calcular a percentagem de RO de H1.

Análise de Doxepina: Amostras corticais são pesadas e colocadas em tubos de centrifugação cónicos em gelo. Quatro volumes (p/v) de acetonitrilo contendo ácido fórmico a 0,1% são adicionados a cada tubo. As amostras são homogeneizadas e centrifugadas utilizando um a 14000 RPM (21920 x g) durante 16 minutos. O sobrenadante é diluído com 100-900 µL de água esterilizada em frascos de injeção de HPLC para análise de LC/MS/MS. A análise de LC/MS/MS de doxepina foi realizada utilizando uma HPLC Agilent modelo 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) e um espectómetro de massa API 4000. A separação cromatográfica usou uma coluna 2,1 X 50 mm C18 (número parcial Agilent 971700-907) e uma fase móvel utilizando um método gradiente consistindo em condições iniciais de acetonitrilo (ACN) a 10% em água com um

conteúdo global de ácido fórmico de 0,1%, após 1 min - ACN a 10%, 2 min - ACN a 90%, 2,9 min - ACN a 90%, 3,1 min - ACN a 10%, 5,5 min - Parar. A detecção de doxepina foi conseguida através da monitorização da transição iónica do precursor para o produto com uma proporção de massa para carga (m/z) de 280 para 107,1. Os padrões são preparados adicionando quantidades de analito às amostras de tecido cerebral de ratas não tratadas e processando tal como descrito anteriormente.

Métodos Estatísticos: As curvas são ajustadas a uma logística de 4 parâmetros (nenhum se mantendo constante) utilizando Prism® versão 3.02 (GraphPad Software, San Diego, CA) e a ED₅₀ relativa é calculada pelo *software*. Valores são dados como médias ± o erro padrão da média. O composto do Exemplo 13 é testado essencialmente como descrito e verificou-se que alcança R0 de H1 elevada com uma EC₅₀ de 0,3 mg/kg.

Agonismo Inverso de H1: Para determinar a natureza agonista inversa dos compostos da presente invenção, são medidos os seus efeitos nos níveis de fosfato de Mio-Inositol 1 (IP1) em células HEK293 transfectadas com o recetor H1 recombinante humano (HEK293/hm H1 clone R-40). Resumidamente, as células H1 HEK293/hm (clone R-40) são cultivadas até uma confluência de ~90% (DMEM/F12 3:1, FBS a 5%, HEPES 20 mM, G418 a 500 µg/ml, Pen/Strep/Glutamina a 1%) e colhidas no dia do ensaio utilizando 1x Tripsin/EDTA (PAA Pasching, Austria L11-003). 35 µl de células (300K) são semeados em

placas de fundo sólido branco de meia área de 96C (Corning, UK 3688) em tampão de estimulação (NaCl 146 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 4,2 mM, MgCl₂ 0,5 mM, Glucose 5,5 mM, HEPES 10 mM e LiCl 50 mM). Os compostos de teste são inicialmente dissolvidos em DMSO a 100% a 1 mM, e diluídos em série (semi-log) em DMSO a 100% para dar curvas de resposta à dose de 10 pontos (Biomek 2000, Beckman Coulter UK). Estas são adicionalmente diluídas até uma concentração de ensaio final de x2 em tampão de estimulação utilizando o Cybiwell (CiBio Jena, Germany) e são adicionados 35 µl às células na placa de ensaio (concentração máxima final de 10 µM). As células mais o composto são incubadas durante 1 hora e 30 min a 37°C/CO₂ a 5% antes da adição de 15 µl de cada um dos reagentes do kit de deteção de IP1 HTRF (CisBio 62P1APEC). A placa de células é incubada durante mais uma hora à temperatura ambiente antes de ser medida a acumulação de IP1 (leitor de placas Envision, Perkin Elmer). A acumulação de IP1 (nM) é calculada por extrapolação a partir da realização da curva IP1 padrão no dia do ensaio. Os valores EC₅₀ são calculados utilizando um ajustamento da curva de 4 parâmetros (Graph Pad Prism v3.02). Os valores de eficácia negativos são expressos em relação ao controlo positivo Tripelenamina (10 µM, Sigma, UK P5514). Os compostos representativos da presente invenção são ensaiados essencialmente tal como descrito e verificou-se que são agonistas inversos do recetor H1. O composto 13 é testado essencialmente tal como descrito e verificou-se que suprime totalmente a atividade constitutiva (126 ± 6%) com uma IC₅₀ de 53,9 ± 37 nM.

Inibição de Atividade de Sacudir a Cabeça Induzida por DOI:

A atividade antagonista do recetor 5-HT_{2A} *in vivo* dos compostos da presente invenção é demonstrada pela sua capacidade para bloquear a atividade de sacudir a cabeça induzida pelo agonista do recetor 5-HT_{2A} 2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI). (ver por exemplo Bartoszyk GD, van Amsterdam C, Böttcher H, Seyfried CA. EMD 281014, a new selective serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonist. Eur J Pharmacol. 2003 473: 229-230.) Resumidamente, ratinhos C57BL/6J machos (20-25 g, Charles River) são alojados em condições de alojamento padrão (32 ratinhos numa gaiola IVC grande, fase de luz das 07,00 a 19,00, temperatura constante (19-23°C) e humidade (50% +/-10), comida e água *ad lib*). Os ratinhos receberam ou veículo (Metilcelulose a 0,25%), ou DOI (3 mg/kg em solução salina) ou composto de teste a 10 mg/kg PO mais DOI (3 mg/kg em solução salina). Os compostos de teste são avaliados individualmente em grupos de quatro por experiência com n=4 para cada composto, juntamente com o veículo e DOI+veículo (n=8). Após um tempo de pré-tratamento do composto de teste de 60 minutos os ratinhos recebem ou veículo (solução salina) ou 3 mg/kg de DOI doseados subcutaneamente, e são depois colocados em câmaras de observação de perspex transparente. Cinco minutos após a administração de DOI ou veículo o número de sacudimentos de cabeça visualmente registados exibidos por cada rato individualmente são contados durante 15 minutos. Os dados são analisados utilizando um Teste ANOVA e Teste de Dunnet *post-hoc*. Os compostos exem-

plificados são testados essencialmente tal como descrito e verificou-se que inibem a resposta de sacudimento da cabeça induzida por DOI em mais de 90% a 10 mg/kg. O composto do Exemplo 13 é testado essencialmente tal como descrito e verificou-se que inibe a resposta de sacudimento da cabeça induzida por DOI em 100% a 10 mg/kg.

Monitorização de sono e comportamento em ratazanas: Os compostos representativos da presente invenção são testados em ratazanas no que diz respeito à sua capacidade para aumentar a quantidade de sono ou diminuir a interrupção do sono ou ambas sem efeitos indesejados tais como inibição do sono REM, enfraquecimento motor do despertar, e/ou insónia rebote. Os animais de teste são continuamente monitorizados através de eletroencefalogramas (EEG), eletromiogramas (EMG), e movimento para medir o sono não REM cumulativo, sono total cumulativo, duração média do surto, duração do surto de sono mais longo, insónia rebote, inibição do sono REM e intensidade da atividade locomotora durante a vigília total. Os métodos para tais estudos são conhecidos na técnica (ver por exemplo métodos descritos em Edgar DM, Seidel WF. Modafinil induces wakefulness without intensifying motor activity or subsequent rebound hypersomnolence in the rat. *J Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1997; 283: 757-769; van Gelder RN, Edgar DM, Dement WC. Real-time automated sleep scoring: validation of a microcomputer-based system for mice. *Sleep* 1991, 14: 48-55; e Gross BA, Walsh CM, Turakhia AA, Booth V, Mashour GA, Poe GR. Open-source logic-based automated sleep scoring

software using electrophysiological recordings in rats. *J Neurosci Methods*. 2009; 184(1):10-8.) Os estudos são conduzidos tal como se segue:

Preparação dos Animais. Ratazanas Wistar, macho, adultas (aproximadamente 270-300 g no momento da cirurgia) são ajustadas cirurgicamente para registo crónico de EEG, EMG, e movimento tal como se segue: As ratazanas são cirurgicamente preparadas com um implante craniano consistindo em quatro parafusos de aço inoxidável para registo do EEG (dois frontais [3,9 mm anteriores a partir de bregma, e $\pm 2,0$ mm mediolateralmente] e dois occipitais [6,4 mm posteriores a partir de bregma, $\pm 5,5$ mm mediolateralmente]), e com dois fios de aço inoxidável revestidos com Teflon para registo de EMG (posicionado sob os músculos do trapézio nugal). Todos os condutores são soldados num conector em miniatura (Microtech, Boothwyn, PA) antes à cirurgia. A junção do implante é fixa ao esqueleto pela combinação dos parafusos de registo de EEG de aço inoxidável, cianoacrilato aplicado entre o conector do implante e o esqueleto, e acrílico dental. A atividade locomotora é monitorizada através de um transmissor em miniatura (Minimitter PDT4000G, Philips Respironics, Bend, OU) cirurgicamente colocado no abdómen. São permitidas pelo menos 3 semanas para recuperação.

Ambiente de Registo. Cada ratazana é alojada individualmente dentro de uma gaiola de microisolamento modificada com um elevador na parte superior com um filtro de

policarbonato para permitir mais altura vertical. Um cabo flexível que restringe minimamente os movimentos é conectado numa das extremidades a um comutador fixo ao topo da gaiola e na outra extremidade ao implante craniano do animal. Cada gaiola está localizada em compartimentos ventilados, separados de uma câmara de registo de sonovigília de aço inoxidável. Comida e água estão disponíveis *ad libitum* e a temperatura ambiente é mantida em cerca de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. Um ciclo de luz-escurecimento de 24 h (LE 12:12) utilizando luz fluorescente é mantido ao longo do estudo. A média da humidade relativa é de aproximadamente 50%. Os animais não são incomodados durante pelo menos 30 h antes e após cada tratamento.

Desenho do Estudo e doseamento. O veículo (placebo, metilcelulose 15 centipoise a 0,25% em água) ou um dos níveis de dose do composto de teste é administrado oralmente a 1 mL/kg pseudoaleatoriamente de tal forma que nenhuma ratazana receba o mesmo tratamento duas vezes, e nenhuma ratazana receba mais do que dois dos 8 tratamentos em qualquer um dos estudos. Cada ratazana é removida da sua gaiola durante cerca de um minuto para ser pesada e tratada. Antes e após cada tratamento existe um período de pelo menos 6 dias de "limpeza".

Recolha de Dados. A discriminação de sono e de vigília total pode ser automatizada (e.g., Van Gelder *et al.* 1991 (anteriormente referido); Edgar *et al.* 1997 (anteriormente referido); Winrow CJ, *et al.*, *Neuropharmacology* 2010;

58(1):185-94.; e Gross *et al.*, 2009 (anteriormente referido). O EEG é amplificado e filtrado (X10000, passo da banda de 1-30 Hz), EMG é amplificado e integrado (passo da banda de 10-100 Hz, integração RMS), e a atividade locomotora não específica (LMA) é monitorizada simultaneamente. Os estados de excitação são classificados em períodos de 10 segundos como sono não REM, sono REM, vigília total, ou vigília total teta-dominada. A atividade locomotora (LMA) é registada como contagens por minuto e é detetada por recetores de telemetria disponíveis comercialmente (ER4000, Minimitter, Bend, OR).

Análise Estatística. Todos os animais que possuam pelo menos um resultado estão incluídos nos resultados sumários (por exemplo, incluimos dados apropriados de um tratamento de um animal para o qual os dados de telemetria são utilizáveis mas os dados EEG não são). O período de observação pós-tratamento é dividido em intervalos pós-dosagem apropriados a cada Resultado, em que o tempo de dosagem é definido como o início da Hora = 0, e os resultados são resumidos no período de observação calculando ou a média de hora a hora ou o valor cumulativo ao longo de cada período (ver legenda da Tabela 1 para definição precisa de cada Resultado). Os surtos de sono são analisados na escala logarítmica para estabilizar a variação, todas as outras variáveis são analisadas na escala linear. Cada resultado em cada período é analisado através da análise de covariância utilizando o grupo de tratamento e data de tratamento como fatores e o intervalo

de pré-tratamento correspondente, 24 horas antes, como a covariável. Médias ajustadas e a mudança entre as médias do veículo e os seus correspondentes erros padrão são resumidas para cada grupo de tratamento. Os resultados analisados na escala logarítmica são retro-transformados para reportar médias geométricas e resultados proporção-para-veículo médios.

Os compostos dos Exemplos 13-28 são testados essencialmente tal como descrito. Verificou-se que os compostos dos Exemplos 13, 15, 16, 18 e 19 aumentam significativamente o tempo de sono NREM cumulativo e o tempo de sono cumulativo total sem significativas insónia rebote, inibição do sono REM ou inibição da intensidade locomotora (LMI) a 3 mg/kg. O composto do Exemplo 13 é testado essencialmente tal como descrito e verificou-se que possui o perfil de sono e a intensidade de atividade locomotora tal como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Composto do Exemplo 13.

Dose (mg/kg PO)	<u>Variáveis de eficácia</u>			<u>Variáveis de efeito indesejável</u>			
	<u>Sono NREM cumulativo</u>			<u>Insónia Rebote</u>			
	N	Média Aj.	SE	N	Média Aj.	ICL	
10	10	51,8	6,5	10	3,1	-6,1	
	3	39,5	5,5	14	-7,8	-15,8	
1	14	28,0	5,5	14	-9,7	-17,7	
	0,50	22,2	5,3	15	-7,2	-15,1	
	0,25	15,2	5,4	15	-1,9	-9,7	
	0,10	5,9	8,1	5	-5,4	-17,2	
	0,03	9	5,1	6,4	9	-0,7	-10,1

(continuação)

Dose (mg/kg PO)	<u>Sono Cumulativo Total</u>			<u>Inibição de REM</u>		
	N	Média Adj.	SE	N	Média Adj.	ICL
10	10	52,8	7,3	10	2,9	-4,6
3	14	42,3	6,2	14	7,0	0,7
1	14	30,6	6,1	14	2,6	-3,7
0,50	15	25,1	6,0	15	5,8	-0,5
0,25	15	17,7	6,1	15	4,7	-1,7
0,10	5	5,9	9,0	5	1,0	-8,0
0,03	9	7,3	7,2	9	1,8	-5,8

Dose (mg/kg PO)	<u>Surto de Sono Médio</u>			<u>Intensidade da Atividade Locomotora</u>		
	N	Média Adj.	SE	N	Média Adj.	ICL
10	10	2,3	0,3	10	-0,11	-3,09
3	14	1,8	0,2	13	-1,49	-4,19
1	14	1,6	0,2	10	-2,94	-5,87
0,50	15	1,4	0,1	14	-0,14	-2,75
0,25	15	1,2	0,1	12	-0,58	-3,30
0,10	5	1,1	0,2	5	-0,35	-4,29
0,03	9	1,1	0,1	9	-0,97	-4,07

Dose (mg/kg PO)	<u>Surto de Sono mais Longo</u>		
	N	Média Adj.	SE
10	10	3,1	0,4
3	14	2,7	0,3
1	14	2,5	0,3
0,50	15	1,8	0,2
0,25	15	1,7	0,2
0,10	5	1,7	0,3
0,03	9	1,3	0,2

(continuação)

Tabela 2. Estatística dos Resultados: Abreviaturas: N = tamanho da amostra; Média Aj. = valor da média do grupo ajustada relativamente aos controlos do veículo; SE = erro padrão da Média; LCL = limite de confiança abaixo dos 95%, NREM = não REM, i.e., todos os sonos que não o sono REM.

Definições e unidades - as médias são diferenças ajustadas a partir dos controlos dos veículos:

Sono cumulativo: ao longo das primeiras 6 horas pós-tratamento, em minutos ("Sono Total" indica sono NREM + sono REM).

Surto de Sono Médio: média de hora a hora - surtos de sono médios, ao longo das primeiras 6 horas pós-tratamento, expressas como o *n* vezes o aumento relativamente aos controlos do veículo.

Surto de sono mais longo: o surto de sono mais longo nas primeiras 6 horas pós-tratamento, expresso como *n* vezes o aumento relativamente aos controlos do veículo.

Insónia rebote: minutos cumulativos de sono NREM+REM durante as primeiras 3 horas do período de luz acesa, i.e., 7^a, 8^a e 9^a horas pós-tratamento.

Inibição de REM: minutos cumulativos de sono REM durante as primeiras 12 horas pós-tratamento.

Intensidade da Atividade Locomotora (IMA): expressa em contagens IMA por minuto de vigília total definida por EEG, em média ao longo das primeiras 6 horas pós-tratamento.

Eficácia Determinante. A eficácia limiar para cada uma das quatro variáveis de eficácia é calculada representando graficamente o aumento em cada variável em relação aos controlos do veículo durante o período de 6 horas após o tratamento em função do log(dose). A eficácia limiar para cada variável é aquela dose que dá o valor do limiar da eficácia definido; +30 min de sono não REM acumulado adicional, +25 min de sono total acumulado adicional, 1,75x o aumento na duração do surto de sono médio, e 1,5x o aumento da duração do surto de sono mais longo. Verificou-se que o composto do Exemplo 13 possui doses de eficácia limiar tal como é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3	Dose eficaz estimada (mg/kg)	Intervalo de confiança de 95% (mg/kg)
acumulação NREM = 30 min	1,2	0,89-1,6
acumulação de sono total = 25 min	0,58	0,40-0,86
surto de sono mais longo (aumento de 1,75 vezes)	0,21	0,098-0,44
surto de sono médio (aumento de 1,5 vezes)	0,77	0,44-1,4

Efeitos indesejáveis determinantes. Cada variável com resultado de "efeito indesejável" (ver legenda da Tabela 4 para definições), é representada graficamente em função do log(dose).

O valor do limiar para inibição de REM é definido como uma redução cumulativa do sono REM de -10 min. O valor do limiar para insónia rebote é definido como -20 min. O valor do limiar para LMI reduzido é definido como -5 contagens de atividade locomotora por minuto de vigília total definida por EEG. Um efeito indesejável significativo é definido como ocorrendo quando o limite mais baixo de confiança desce abaixo do valor do limiar para todas as doses iguais ou superiores à dose eficaz média. Para compostos exemplificados, não foram observadas ocorrências indesejáveis de inibição do REM, insónia rebote, ou redução em LMI em doses superiores a pelo menos 10 mg/Kg. (valor negativo indica inibição de REM, insónia rebote e LMI reduzido, respetivamente).

Embora seja possível administrar compostos utilizados nos métodos desta invenção diretamente sem qualquer

formulação, os compostos são geralmente administrados sob a forma de composições farmacêuticas compreendendo pelo menos um composto da Fórmula I, ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, como ingrediente ativo e pelo menos um veículo, diluente e/ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Estas composições podem ser administradas através de diversas vias incluindo oral, sublingual, nasal, subcutânea, intravenosa, e intramuscular. Tais composições farmacêuticas e processos para a sua preparação são bem conhecidos na técnica. Ver, e.g., Remington: The Science and Practice of Pharmacy (University of the Sciences in Philadelphia, ed., 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins Co., 2005).

As composições são preferencialmente formuladas sob a forma de uma dosagem unitária, cada dosagem contendo entre cerca de 0,1 e cerca de 60 mg, mais usalmente cerca de 1 e cerca de 30 mg, como por exemplo entre cerca de 2 e cerca de 10 mg do ingrediente ativo. O termo "forma de dosagem unitária" diz respeito a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para sujeitos humanos e outros mamíferos, contendo cada unidade uma quantidade pré-determinada de material ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com pelo menos um veículo, diluente e/ou excipiente farmacêuticamente aceitável adequado.

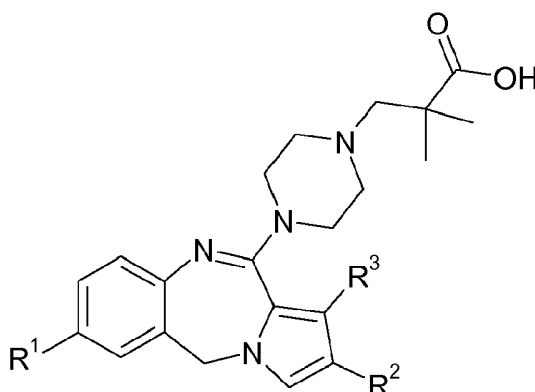
Os compostos da Fórmula I são geralmente eficazes ao longo de uma ampla gama de dosagens. Por exemplo, dosagens diárias normalmente encontram-se dentro da gama de

cerca de 0,002 até cerca de 1,0 mg/kg, mais usualmente entre cerca de 0,015 até 0,5 mg/kg, e como por exemplo entre 0,03 e 0,15 mg/kg de peso corporal. Em alguns casos níveis de dosagem abaixo do limite mais baixo da gama supracitada podem ser mais do que adequados, enquanto que noutros casos podem ser ainda aplicadas doses maiores sem causar qualquer efeito colateral nocivo, e portanto não se pretende que as dosagens supracitadas limitem de modo nenhum o âmbito da invenção. Será entendido que a quantidade do composto realmente administrado será determinada por um médico, à luz das circunstâncias relevantes, incluindo a condição a ser tratada, a via de administração escolhida, o composto ou compostos particulares administrados, a idade, o peso, e resposta do paciente individual, e a gravidade dos sintomas do paciente.

Lisboa, 12 de maio de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto da fórmula



em que R¹ é cloro ou metilo;

R² é metilo, etilo, isopropilo, cloro, bromo, trifluorometilo, ou metiltio; e

R³ é hidrogénio ou metoxi;

ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

2. Um composto de acordo com a Reivindicação 1, em que R³ é hidrogénio, ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

3. Um composto de acordo com a Reivindicação 1 ou com a Reivindicação 2, em que R¹ é cloro, ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

4. Um composto de acordo com a Reivindicação 1

que é o ácido 3-[4-(7-Cloro-2-metil-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]-benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico, ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

5. Um composto de acordo com a Reivindicação 1 que é o di-hidrocloreto de ácido 3-[4-(7-Cloro-2-metil-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-11-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico.

6. Uma composição farmacêutica compreendendo um composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 5, ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em combinação com pelo menos um veículo, diluente, ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

7. Um composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 5, ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, para utilização em terapia.

8. Um composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 5, ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, para utilização no tratamento de insónia.

9. Um composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 5, ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, para utilização no tratamento de insónia em que a insónia é caracterizada por dificuldades em iniciar o sono ou manter o sono ou ambas.

10. Um composto para a utilização de acordo com a Reivindicação 8 ou 9 num humano.

11. Uma composição farmacêutica compreendendo um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em combinação com pelo menos um veículo, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável, e um inibidor de recaptção de serotonina seletivo.

Lisboa, 12 de maio de 2015

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

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

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * US 4192803 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * *Journal of Pharmaceutical Science*, 1977, vol. 66, 2-19
- * MORAIRTY SR ; HEDLEY L ; FLORES J ; MARTIN R ; KILDUFF TS. Selective 5-HT_{2A} and 5-HT₆ receptor antagonists promote sleep in rats. *Sleep*, 2008, vol. 31, 34-44
- * BARBIER, A.J. ; BRADBURY, M.J. Histaminergic Control of Sleep- Wake Cycles: Recent Therapeutic Advances for Sleep and Wake Disorders. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 2007, vol. 6, 31-43
- * BARTOSZYK GD ; VAN AMSTERDAM C ; SÖT-TCHER H ; SEYFRIED CA. EMD 281014, a new selective serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.*, 2003, vol. 473, 229-230
- * EDGAR DM ; SEIDEL WF. Modafinil induces wakefulness without intensifying motor activity or subsequent rebound hypersomnolence in the rat. *J Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 1997, vol. 283, 757-769
- * VANGELDER RN ; EDGAR DM ; DEMENT WC. Real-time automated sleep scoring: validation of a microcomputer-based system for mice. *Sleep*, 1991, vol. 14, 48-55
- * GROSS BA ; WALSH CM ; TURAKHIA AA ; BOOTH V ; MASHOURGA ; POE GR. Open-source logic-based automated sleep scoring software using electrophysiological recordings in rats. *J Neurosci Methods*, 2009, vol. 184 (1), 10-8
- * WINROW CJ et al. *Neuropharmacology*, 2010, vol. 58 (1), 185-94
- * Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Lippincott Williams & Wilkins Co, 2005.