



MD/EP 3664802 T2 2022.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3664802 (13) T2

(51) Int. Cl.:A61K 31/437 (2006.01.01)
A61P 25/28 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

<p>(21) Numărul de depozit: e 2020 0641</p> <p>(22) Data de depozit: 2018.08.07</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18759502.0, 2018.08.07</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european:3664802, 2020.06.17</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 201762541807 P</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.08.07</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: US</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 07/2022, 2022.07.31</p> <p>(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 08/2022, 2022.02.23</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 07/2020, 2020.07.31</p>
<p>(71) Solicitant: ALKERMES, INC., US</p> <p>(72) Inventatori: FULLER Nathan Oliver, US; LOWE John A.III, US</p> <p>(73) Titular: ALKERMES INC., US</p> <p>(74) Mandatar autorizat: SOKOLOVA Sofia</p>	

(54) Inhibitori biciclici ai deacetilazei histonei

(57) Rezumat:

1
Sunt furnizate în prezenta compuși și săruri farmaceutic acceptabile ale acestora, și compoziții farmaceutice cu aceștia, care sunt

2
folositori în tratamentul tulburărilor asociate cu inhibarea HDAC (ex. HDAC2).

Revendicări: 15

MD/EP 3664802 T2 2022.07.31

(54) Bicyclic inhibitors of histone deacetylase**(57) Abstract:**

1
Provided herein are compounds and pharmaceutically acceptable salts thereof, and pharmaceutical compositions thereof, which are useful in the treatment of conditions

2
associated with inhibition of HDAC (e.g., HDAC2).

Claims: 15

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****CONTEXT**

5 S-a demonstrat că inhibitorii deacetilazelor histonei (HDAC) modulează transcripția și induc
 stoparea creșterii celulare, diferențierea și apoptoza. Inhibitorii HDAC sporesc, de asemenea, efectele
 citotoxice ale agenților terapeutici utilizați în tratamentul cancerului, inclusiv radiațiile și medicamentele
 10 chimioterapeutice. Marks, P., Rifkind, R. A., Richon, V. M., Breslow, R., Miller, T., Kelly, W. K.
 Deacetilaza histonei și cancer: cauze și terapii. *Nat Rev Cancer*, 1, 194-202, (2001); și Marks, P. A.,
 Richon, V. M., Miller, T., Kelly, W. K. Inhibitori ai deacetilazei histonei. *Adv Cancer Res*, 91, 137-168,
 (2004). Mai mult, dovezile recente indică faptul că dereglarea transcripțională poate contribui la
 patogenia moleculară a anumitor tulburări neurodegenerative, cum ar fi boala Huntington, atrofia
 musculară spinală, scleroza laterală amiotropă și ischemia. Langley, B., Gensert, J. M., Beal, M. F.,
 15 Ratan, R. R. Remodelarea cromatinei și a rezistenței la stres în sistemul nervos central: inhibitorii ai
 deacetilazei histonei ca agenți neuroprotectori noi și cu largă eficiență, *Curr Drug Targets CNS*, 4, 41-50,
 (2005). O revizuire recentă a rezumat dovezile că activitatea aberantă a acetiltransferazei histonei (HAT)
 și deacetilazelor histonei (HDAC) poate reprezenta un mecanism de bază comun care contribuie la
 neurodegenerare. Mai mult, folosind un model de șoarece al depresiei, Nestler a evidențiat recent
 20 potențialul terapeutic al inhibitorilor de deacetilare a histonelor (HDAC5) în depresie. Tsankova, N. M.,
 Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R. L., Nestler, E. J. Reglarea susținută a cromatinei
 hipocampice într-un model de șoarece de depresie și acțiune antidepressivă. *Nat Neurosci*, 9, 519-525,
 (2006).

Există 18 deacetilaze ale histonei umane cunoscute, grupate în patru clase în funcție de structura
 domeniilor lor accesorii. Clasa I include HDAC1, HDAC2, HDAC3 și HDAC8 și are omologie cu drojdia
 25 RPD3. HDAC4, HDAC5, HDAC7 și HDAC9 aparțin clasei IIa și au omologie cu drojdia. HDAC6 și
 HDAC10 conțin două situsuri catalitice și sunt clasificate drept clasa IIb. Clasa III (sirtuinele) include
 SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 și SIRT7. HDAC11 este un alt membru recent identificat al
 familiei HDAC și a conservat reziduuri în centrul său catalitic care sunt împărțite atât de deacetilazele de
 clasă I, cât și de clasa II și este uneori plasat în clasa IV.

30 În schimb, HDAC-urile s-au dovedit a fi regulatori negativi puternici ai proceselor de memorie
 pe termen lung. Inhibitorii nespecifici HDAC îmbunătățesc plasticitatea sinaptică, precum și memoria pe
 termen lung (Levenson și colab., 2004, *J. Biol. Chim.* 279:40545-40559; Lattal și colab., 2007, *Behav*
Neurosci 121:1125-1131; Vecsey și colab., 2007, *J. Neurosci* 27:6128; Bredy, 2008, *Learn Mem* 15:460-
 467; Guan și colab., 2009, *Nature* 459:55-60; Malvaez și colab., 2010, *Biol. Psihiatrie* 67:36-43;
 35 Roozendaal et al., 2010, *J. Neurosci.* 30:5037-5046). De exemplu, inhibiția HDAC poate transforma un
 eveniment de învățare care nu duce la memorie pe termen lung într-un eveniment de învățare care are ca
 rezultat o memorie semnificativă pe termen lung (Stefanko și colab., 2009, *Proc. Natl. Acad. Sci. SUA*
 106:9447-9452). Mai mult, inhibarea HDAC poate genera, de asemenea, o formă de memorie pe termen
 lung care persistă dincolo de punctul în care memoria normală eșuează. S-a demonstrat că inhibitorii
 40 HDAC ameliorează deficiturile cognitive în modelele genetice ale bolii Alzheimer (Fischer și colab., 2007,
Nature 447:178-182; Kilgore și colab., 2010, *Neuropsychopharmacology* 35:870-880). Aceste
 demonstrații sugerează că modularea memoriei prin inhibarea HDAC are un potențial terapeutic
 considerabil pentru multe tulburări de memorie și cognitive.

În prezent, rolul HDAC-urilor individuale în memoria pe termen lung a fost explorat în două
 45 studii recente. Kilgore et al. 2010, *Neuropsychopharmacology* 35:870-880 a dezvăluit că inhibitorii
 nespecifici HDAC, cum ar fi butiratul de sodiu, inhibă HDAC de clasa I (HDAC1, HDAC2, HDAC3,
 HDAC8) cu un efect redus asupra membrilor familiei HDAC de clasa IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7,
 HDAC9). Acest lucru sugerează că inhibarea HDAC-urilor de clasa I poate fi critică pentru îmbunătățirea
 50 cogniției observată în multe studii. Într-adevăr, supraexpresia specifică a creierului anterior și a
 neuronului a HDAC2, dar nu a HDAC1, a scăzut densitatea coloanei dendritice, densitatea sinaptică,
 plasticitatea sinaptică și formarea memoriei (Guan și colab., 2009, *Nature*, 459:55-60). În schimb, șoarecii
 HDAC2 knockout au prezentat o densitate sinaptică crescută, plasticitate sinaptică crescută și densitate
 dendritică crescută în neuroni. Acești șoareci cu deficit de HDAC2 au prezentat, de asemenea, învățare și
 55 memorie îmbunătățite într-o baterie de paradigme comportamentale de învățare. Această lucrare
 demonstrează că HDAC2 este un regulator cheie al sinaptogenezei și al plasticității sinaptice. În plus,
 Guan și colab. a arătat că tratamentul cronic al șoarecilor cu SAHA (un inhibitor HDAC 1,2,3,6, 8) a
 reprodus efectele observate la șoarecii cu deficiență HDAC2 și a refuzat afectarea cognitivă la șoarecii cu
 supraexpresie HDAC2.

Inhibarea HDAC2 (selectiv sau în combinație cu inhibarea altor HDAC de clasa I) este o țintă
 60 terapeutică atractivă. O astfel de inhibiție are potențialul de a îmbunătăți cunoașterea și de a facilita

procesul de învățare prin creșterea densității sinaptice și dendritice în populațiile de celule neuronale. În plus, inhibarea HDAC2 poate fi, de asemenea, utilă din punct de vedere terapeutic în tratarea unei game largi de alte boli și tulburări.

REZUMAT

5 Sunt dezvăluți compuși și săruri acceptabile farmaceutic ale acestora și compoziții farmaceutice, care sunt utile în tratamentul stărilor asociate cu activitatea HDAC (de exemplu, HDAC2). Vezi, de exemplu, Tabelul 1.

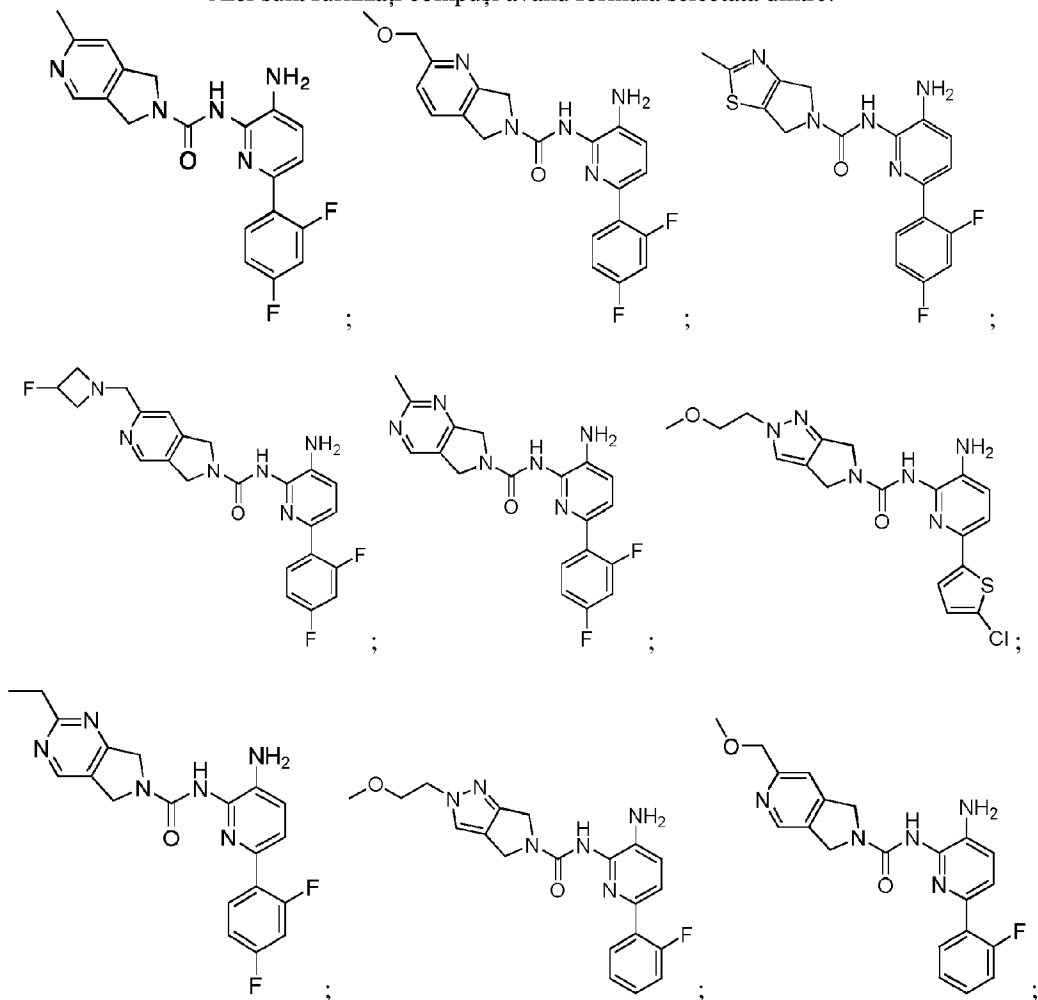
10 Unul dintre avantajele anumitor compuși descriși aici este că aceștia posedă parametri de siguranță îmbunătățiți. De exemplu, includerea unui atom suplimentar de fluor pe inelul fenil inferior al anumitor compuși a oferit o creștere de aproape 2 ori a siguranței, arătând mai puține efecte asupra progenitorilor eritroizi și mioelozii umani. Vezi, de exemplu, **Tabelul 4, Comparatorul 1 vs Compusul 10; Comparatorul 2 vs. Compusul 3; Comparatorul 5 vs. Compusul 1; și Comparatorul 6 vs. Compusul 2.** Un rezultat similar a fost observat între regioizomeri (comparați **Comparatorul 4 cu compusul 8**) și înlocuirea hidrogenului cu fluor (comparați **Comparatorul 3 cu Compusul 6**).

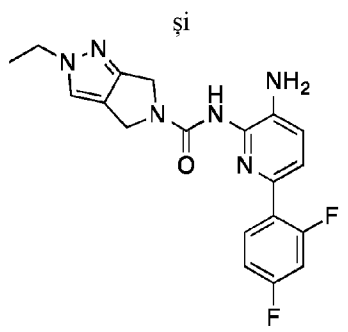
15 Condițiile care pot fi tratate prin compușii dezvăluți includ, dar nu se limitează la, tulburări neurologice, tulburări ale memoriei sau ale funcției cognitive, tulburări de învățare prin extincție, boli sau infecții fungice, boli inflamatorii, boli hematologice, boli neoplazice, tulburări psihiatrice și pierderi de memorie.

DESCRIERE DETALIATA

20 **1. Compuși**

Aici sunt furnizați compuși având formula selectată dintre:





sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestora.

Alte exemple de compuși incluși în prezenta dezvoltare sunt furnizate în secțiunea
 5 EXEMPLIFICARE. Sunt incluse sărurile acceptabile farmaceutice, precum și formele neutre ale acestor
 compuși.

2. Definiții

Așa cum sunt utilizați aici, termenii „subiect” și „pacient” pot fi utilizați interschimbabil și
 înseamnă un mamifer care are nevoie de tratament, *de ex.*, animale de companie (*de ex.*, câini, pisici și
 10 altele asemenea), animale de fermă (de *ex.*, vaci, porci, cai, oi, capre și altele asemenea) și animale de
 laborator (*de ex.*, șobolani, șoareci, cobai și altele asemenea). De obicei, subiectul este un om care are
 nevoie de tratament.

Sunt incluse sărurile acceptabile farmaceutice, precum și formele neutre ale compușilor descriși
 aici. Pentru utilizare în medicamente, sărurile compușilor se referă la „săruri acceptabile farmaceutice”
 15 netoxice. Formele de sare acceptabile farmaceutice includ săruri acide/anionice sau bazice/cationice
 acceptabile farmaceutice. Sărurile bazice/cationice acceptabile farmaceutice includ sărurile de sodiu,
 potasiu, calciu, magneziu, dietanolamină, n-metil-D-glucamină, L-lizină, L-arginină, amoniu,
 etanolamină, piperazină și trietanolamină. Sărurile acide/anionice acceptabile farmaceutice includ, *de ex.*,
 20 acetat, benzensulfonat, benzoat, bicarbonat, bitartrat, carbonat, citrat, diclorhidrat, gluconat, glutamat,
 glicolilarsanilat, hexilresorcinat, bromhidrat, clorhidrat, malat, maleat, malonat, mesilat, azotat, salicilat,
 stearat, succinat, sulfat, tartrat și tosilat.

Termenul "purtător acceptabil farmaceutic" se referă la un purtător, adjuvant sau vehicul netoxic
 care nu distruge activitatea farmacologică a compusului cu care este formulat. Purtătorii, adjuvanții sau
 25 vehiculele acceptabile farmaceutice care pot fi utilizați în compozițiile descrise aici includ, dar nu se
 limitează la, schimbătoare de ioni, alumină, stearat de aluminiu, lecitină, proteine serice, cum ar fi
 albumina serică umană, substanțe tampon cum ar fi fosfații, glicina, acid sorbic, sorbat de potasiu,
 amestecuri parțiale de gliceride de acizi grași vegetali saturați, apă, săruri sau electroliți, cum ar fi sulfat
 de protamină, fosfat acid disodic, fosfat acid de potasiu, clorură de sodiu, săruri de zinc, siliciu coloidal,
 30 trisilicat de magneziu, pirolidonă de polivinil, substanțe pe bază de celuloză, polietilen glicol,
 carboximetilceluloză de sodiu, poliacrilati, ceară, polimeri bloc de polietilen-polioxipropilenă, polietilen
 glicol și grăsime de lână.

Termenii "tratament", "a trata" și "tratare" se referă la inversarea, atenuarea, reducerea
 probabilității de a dezvolta sau inhibarea progresului unei boli sau tulburări sau la unul sau mai multe
 35 simptome ale acesteia, așa cum este descris aici. În unele realizări, tratamentul poate fi administrat după
 ce unul sau mai multe simptome s-au dezvoltat, *i.e.*, tratament terapeutic. În alte variante de realizare,
 tratamentul poate fi administrat în absența simptomelor. De exemplu, tratamentul poate fi administrat
 unei persoane susceptibile înainte de apariția simptomelor (de exemplu, în lumina antecedentelor de
 simptome și/sau în lumina factorilor genetici sau a altor factori de susceptibilitate), *adică*, tratament
 40 profilactic. De asemenea, tratamentul poate fi continuat după ce simptomele s-au rezolvat, de exemplu
 pentru a preveni sau a întârzia reapariția acestora.

Termenul „cantitate eficientă” sau „cantitate eficientă terapeutică” include o cantitate dintr-un
 compus descris aici care va provoca un răspuns biologic sau medical al unui subiect, de exemplu, între
 0,01 - 100 mg/kg greutate corporală/zi din compusul furnizat, cum ar fi, de exemplu, 0,1 - 100 mg/kg
 greutate corporală/zi.

3. Utilizări, Formulare și Administrare

În unele exemple de realizare, compușii și compozițiile descrise aici sunt utili în tratarea stărilor
 asociate cu activitatea HDAC. Astfel de condiții includ, de exemplu, pe cele descrise mai jos.

Rapoarte recente au detaliat importanța acetilării histonelor în funcțiile sistemului nervos central
 („SNC”), cum ar fi diferențierea neuronală, formarea memoriei, dependența de droguri și depresia
 50 (Citrome, Psihofarmacol. Bull. 2003, 37, Suppl. 2, 74-88; Johannessen, CNS Drug Rev. 2003, 9, 199-
 216; Tsankova și colab., 2006, Nat. Neurosci. 9, 519-525). Astfel, într-un aspect, compușii și compozițiile
 furnizate pot fi utili în tratarea unei tulburări neurologice. Exemple de tulburări neurologice includ: (i)

boli neurodegenerative cronice, cum ar fi scleroza laterală amiotrofică familială și sporadică (FALS și, respectiv, ALS), boala Parkinson familială și sporadică, boala Huntington, boala Alzheimer familială și sporadică, scleroza multiplă, distrofia musculară olivo-pontocerebelă, atrofie, atrofie a sistemelor multiple, boala Wilson, paralizie supranucleară progresivă, boala difuză cu corp Lewy, degenerare corticodentatonigrală, epilepsie mioclonică familială progresivă, degenerare strionigră, distonie de torsiune, tremor familial, sindrom Down, sindrom Gilles de la Tourette, boala Hallervorden-S, neuropatie periferică diabetică, demență pugilistică, demență SIDA, demență legată de vârstă, tulburări de memorie asociate vârstei și boli neurodegenerative legate de amiloidoză, cum ar fi cele cauzate de proteina prionică (PrP) care este asociată cu encefalopatia spongiformă transmisibilă (boala Creutzfeldt-Jakob, sindromul Gerstmann-Straussler-Scheinker, scrapic și kuru), și cele cauzate de acumularea excesivă de cistatina C (angiopatie ereditară cu cistatina C); și (ii) tulburări neurodegenerative acute, cum ar fi leziuni cerebrale traumatice (de exemplu, leziuni cerebrale legate de intervenții chirurgicale), edem cerebral, leziuni ale nervilor periferici, leziuni ale măduvei spinării, boala Leigh, sindromul Guillain-Barre, tulburări de stocare lizozomală precum lipofuscinoza, boala Alper, sindromul piciorului neliniștit, vertij ca urmare a degenerării SNC; patologii care apar cu abuzul cronic de alcool sau droguri, inclusiv, de exemplu, degenerarea neuronilor din locus coeruleus și cerebel, tulburări de mișcare induse de droguri; patologii apărute odată cu îmbătrânirea, inclusiv degenerarea neuronilor cerebelosi și a neuronilor corticali care conduc la tulburări cognitive și motorii; și patologii apărute odată cu abuzul cronic de amfetamine, inclusiv degenerarea neuronilor ganglionilor bazali care duce la deficiențe motorii; modificări patologice rezultate din traumatisme focale precum accident vascular cerebral, ischemie focală, insuficiență vasculară, encefalopatie hipoxic-ischemică, hiperglicemie, hipoglicemie sau traumatism direct; patologii care apar ca efect secundar negativ al medicamentelor și tratamentelor terapeutice (de exemplu, degenerarea neuronilor cortexului cingulat și entorinal ca răspuns la dozele anticonvulsivante de antagoniști din clasa NMDA a receptorilor de glutamat) și demența asociată lui Wernicke-Korsakoff. Tulburările neurologice care afectează neuronii senzoriali includ ataxia lui Friedreich, diabetul, neuropatia periferică și degenerarea neuronală retiniană. Alte tulburări neurologice includ leziuni ale nervilor sau traumatisme asociate cu leziuni ale măduvei spinării. Tulburările neurologice ale sistemelor limbic și cortical includ amiloidoză cerebrală, atrofia lui Pick și sindromul Retts. Într-un alt aspect, tulburările neurologice includ tulburări de dispoziție, cum ar fi tulburările afective și anxietatea; tulburări ale comportamentului social, cum ar fi defecte de caracter și tulburări de personalitate; tulburări de învățare, memorie și inteligență, cum ar fi retardul mental și demența. Astfel, într-un aspect, compușii și compozițiile dezvăluite pot fi utili în tratarea schizofreniei, delirului, tulburării de deficit de atenție (ADD), tulburării schizoafective, bolii Alzheimer, sindromului Rubinstein-Taybi, depresiei, maniei, tulburărilor de deficit de atenție, dependenței de droguri, demenței, agitație, apatie, anxietate, psihoze, tulburări de personalitate, tulburări bipolare, tulburări afective unipolare, tulburări obsesiv-compulsive, tulburări de alimentație, tulburări de stres post-traumatic, iritabilitate, tulburare de conduită a adolescentului și dezinhibare.

Se crede că transcripția este un pas cheie pentru procesele de memorie pe termen lung (Alberini, 2009, *Physiol. Rev.* 89, 121-145). Transcripția este promovată de modificări specifice cromatinei, cum ar fi acetilarea histonelor, care modulează interacțiunile histonă-ADN (Kouzarides, 2007, *Cell*, 128:693-705). Enzimele modificatoare, cum ar fi acetiltransferazele histonei (HAT) și deacetilazele histonei (HDAC), reglează starea de acetilare pe cozile histonelor. În general, acetilarea histonelor promovează expresia genelor, în timp ce deacetilarea histonelor duce la tăcere genetică. Numeroase studii au arătat că o HAT puternică, proteina de legare a elementelor de răspuns (CREB)-proteina de legare (CBP), este necesară pentru formele de lungă durată de plasticitate sinaptică și memorie pe termen lung (pentru revizuire, vezi Barrett, 2008, *Learn Mem* 15:460-467). Astfel, într-un aspect, compușii și compozițiile furnizate pot fi utili pentru promovarea funcției cognitive și îmbunătățirea învățării și formării memoriei.

Compușii și compozițiile descrise aici pot fi, de asemenea, utilizați pentru tratarea bolilor sau infecțiilor fungice.

Într-un alt aspect, compușii și compozițiile descrise aici pot fi utilizați pentru tratarea bolilor inflamatorii cum ar fi accidentul vascular cerebral, artrita reumatoidă, lupusul eritematos, colita ulceroasă și leziunile cerebrale traumatice (Leoni și colab., *PNAS*, 99(5); 2995-3000 (2002); Suuronen și colab. *J. Neurochem.* 87; 407-416 (2003) și *Drug Discovery Today*, 10: 197-204 (2005).

Într-un alt aspect, compușii și compozițiile descrise aici pot fi utilizate pentru tratarea unui cancer cauzat de proliferarea celulelor neoplazice. Astfel de cancer includ, de exemplu, tumori solide, neoplasme, carcinoame, sarcoame, leucemii, limfoame și altele asemenea. Într-un aspect, cancerelor care pot fi tratate prin compușii și compozițiile descrise aici includ, dar nu se limitează la: cancer cardiac, cancer pulmonar, cancer gastrointestinal, cancer de tract genito-urinar, cancer de ficat, cancer de sistem nervos, cancer ginecologic, cancer hematologic, cancer de piele și cancer al glandei suprarenale. Într-un aspect, compușii și compozițiile descrise aici sunt utili în tratarea cancerelor cardiace selectate dintre sarcom (angiosarcom, fibrosarcom, rhabdomyosarcom, liposarcom), mixom, rhabdomyom, fibrom, lipom și

teratom. Într-un alt aspect, compușii și compozițiile descrise aici sunt utili în tratarea unui cancer pulmonar selectat dintre carcinom bronhogen (celule scuamoase, celule mici nediferențiate, celule mari nediferențiate, adenocarcinom), carcinom alveolar (bronșiolar), adenom bronșic, sarcom, limfom, condromatos, hamartom și mezoteliom. Într-un aspect, compușii și compozițiile descrise aici sunt utili în
5 tratarea unui cancer gastrointestinal selectat dintre cele de esofag (carcinom cu celule scuamoase, adenocarcinom, leiomiiosarcom, limfom), stomac (carcinom, limfom, leiomiiosarcom), pancreas (adenocarcinom ductal, insulinom, glucagonom, gastrinom, tumori carcinoide, vipom), intestinul subțire (adenocarcinom, limfom, tumori carcinoide, sarcom Kaposi, leiomiom, hemangiom, lipom, neurofibrom, fibrom) și intestinul gros (adenocarcinom, adenom tubular, adenom vilos, hamartom, leiomiom). Într-un
10 aspect, compușii și compozițiile descrise aici sunt utili în tratarea unui cancer de tract genito-urinar selectat dintre cel de rinichi (adenocarcinom, tumoră Wilm [nefroblastom], limfom, leucemie), vezică urinară și uretră (carcinom cu celule scuamoase, carcinom cu celule tranziționale, adenocarcinom), prostată (adenocarcinom, sarcom) și testicul (seminom, teratom, carcinom embrionar, teratocarcinom, coriocarcinom, sarcom, carcinom cu celule interstițiale, fibrom, fibroadenom, tumori adenomatoide, lipom). Într-un aspect, compușii și compozițiile descrise aici sunt utili în tratarea unui cancer hepatic
15 selectat dintre hepatom (carcinom hepatocelular), colangiocarcinom, hepatoblastom, angiosarcom, adenom hepatocelular și hemangiom.

În unele variante de realizare, compușii descriși aici se referă la tratarea unui cancer osos selectat dintre sarcom osteogen (osteosarcom), fibrosarcom, histiocitom fibros malign, condrosarcom, sarcom
20 Ewing, limfom malign (sarcom cu celule reticulate), mielom multiplu, cordon malign cu celule gigantice, osteocondrom (exostoze osteocartilaginoase), condrom benign, condroblastom, condromixofibrom, osteoid osteoid și tumori cu celule gigantice.

Într-un aspect, compușii și compozițiile descrise aici sunt utili în tratarea unui cancer al sistemului nervos selectat dintre cel de craniu (osteom, hemangiom, granulom, xantom, osteită
25 deformantă), meninge (meningiom, meningiosarcom, gliomatoză), creier (astrocitom, meduloblastom, gliom, ependimom, germinom [pinealom], glioblastom multiform, oligodendrogliom, schwannom, retinoblastom, tumori congenitale) și măduva spinării (neurofibrom, meningiom, gliom, sarcom).

Într-un aspect, compușii și compozițiile descrise aici sunt utili în tratarea unui cancer ginecologic selectat dintre cel de uter (carcinom endometrial), col uterin (carcinom cervical, displazie cervicală
30 pretumorală), ovare (carcinom ovarian [cistadenocarcinom seros, carcinom cistadenocarcinom mucinos, carcinom neclasificat], tumori cu celule granuloso-tecale, tumori cu celule Sertoli-Leydig, disgerminom, teratom malign), vulva (carcinom cu celule scuamoase, carcinom intraepitelial, adenocarcinom, fibrosarcom, melanom), vagin (carcinom cu celule clare, carcinom cu celule scuamoase, sarcom botryoid (rabdomyosarcom embrional) și al trompelor uterine (carcinom).

Într-un aspect, compușii și compozițiile descrise aici sunt utili în tratarea unui cancer de piele selectat dintre melanom malign, carcinom bazocelular, carcinom cu celule scuamoase, sarcom Karposi,
35 alunițe nevi displazici, lipom, angiom, dermatofibrom, cheloizi și psoriazis.

Într-un aspect, compușii și compozițiile descrise aici sunt utile în tratarea unui cancer al glandei suprarenale selectat dintre neuroblastoame.

Într-un aspect, compușii și compozițiile descrise aici sunt utili în tratarea cancerelor care includ, dar nu se limitează la: leucemii incluzând leucemii acute și leucemii cronice cum ar fi leucemia limfocitară acută (ALL), leucemia mieloidă acută (AML), leucemia limfocitară cronică (CLL), leucemie mielogenă cronică (CML) și leucemie cu celule păroase; limfoame cum ar fi limfoamele cu celule T cutanate (CTCL), limfoamele cu celule T periferice necutanate, limfoamele asociate cu virusul limfotrofic
45 cu celule T umane (HTLV), cum ar fi leucemia/limfomul cu celule T la adulți (ATLL), boala Hodgkin și limfoame non-Hodgkin, limfoame cu celule mari, limfoame difuze cu celule B mari (DLBCL); limfom Burkitt; mezoteliom, limfom primar al sistemului nervos central (SNC); mielom multiplu; tumori solide din copilărie, cum ar fi tumorile cerebrale, neuroblastomul, retinoblastomul, tumora Wilm, tumorile osoase și sarcoamele țesuturilor moi, tumorile solide comune ale adulților, cum ar fi cancerul capului și gâtului (de exemplu, oral, laringian și esofagian), cancer genito-urinar (de ex. , prostată, vezică urinară,
50 renal, uterin, ovarian, testicular, rectal și de colon), cancer pulmonar, cancer de sân, cancer pancreatic, melanom și alte tipuri de cancer de piele, cancer de stomac, tumori cerebrale, cancer de ficat și cancer tiroidian.

Într-un aspect, prezenta dezvăluire furnizează o metodă de tratare a unei stări descrise aici, cuprinzând administrarea unui subiect a unei cantități eficiente dintr-un compus, sau sare acceptabilă farmaceutic descrisă aici, sau o compoziție a acestuia.

De asemenea, este furnizat unul sau mai mulți dintre compușii sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora descriși aici, sau o compoziție furnizată, pentru tratarea unei afecțiuni descrise aici.

De asemenea, este furnizată utilizarea unuia sau mai multor compuși sau a sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora descrise aici pentru fabricarea unui medicament pentru tratarea unei afecțiuni descrise aici.

Subiecții pot fi de asemenea selectați să sufere de una sau mai multe dintre afecțiunile descrise înainte de începerea tratamentului cu unul sau mai mulți dintre compușii descriși sau sărurile sau compozițiile acceptabile farmaceutic.

Prezenta dezvoltare furnizează, de asemenea, compoziții acceptabile farmaceutic cuprinzând un compus descris aici sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia; și un purtător acceptabil farmaceutic. Aceste compoziții pot fi utilizate pentru a trata una sau mai multe dintre afecțiunile descrise mai sus.

Compozițiile descrise aici pot fi administrate pe cale orală, parenterală, prin inhalare de spray, topic, rectal, nazal, bucal, vaginal sau printr-un rezorv implantat. Termenul "parenteral" așa cum este utilizat aici include tehnici de injecție sau perfuzie subcutanată, intravenoasă, intramusculară, intraarticulară, intrasinovială, intrasternală, intratecală, intrahepatică, intralezională și intracraniană. Formele de dozare lichide, preparatele injectabile, formele de dispersie solide și formele de dozare pentru administrarea topică sau transdermică a unui compus sunt incluse aici.

De asemenea, trebuie înțeles că o doză specifică și un regim de tratament pentru orice pacient anume va depinde de o varietate de factori, inclusiv vârsta, greutatea corporală, starea generală de sănătate, sexul, dieta, timpul de administrare, rata de excreție, combinația de medicamente, judecata medicului curant și severitatea bolii particulare care este tratată. Cantitatea de compus furnizat în compoziție va depinde de asemenea de compusul particular din compoziție.

EXEMPLIFICARE

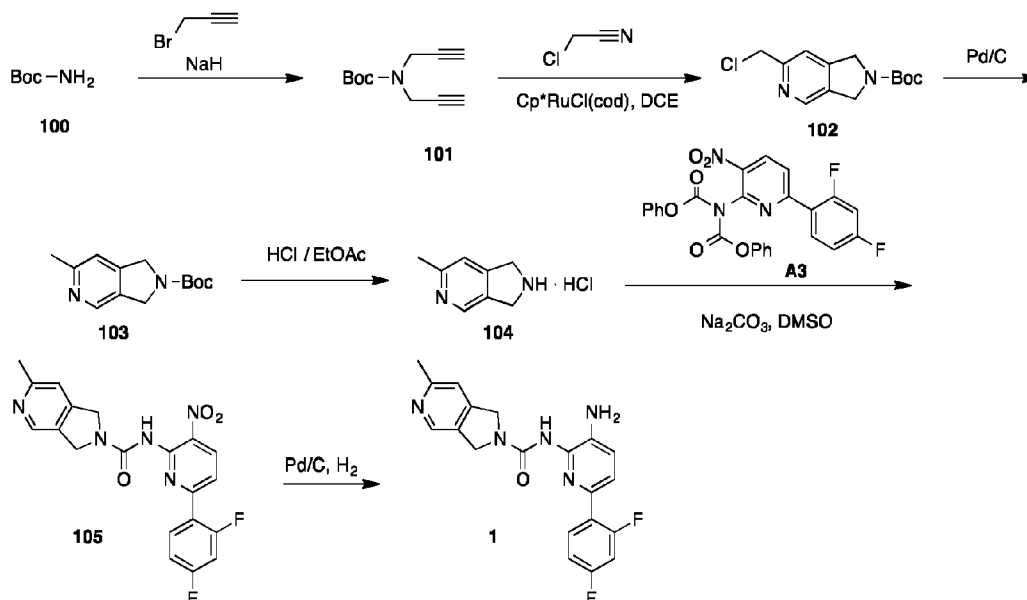
Informații generale

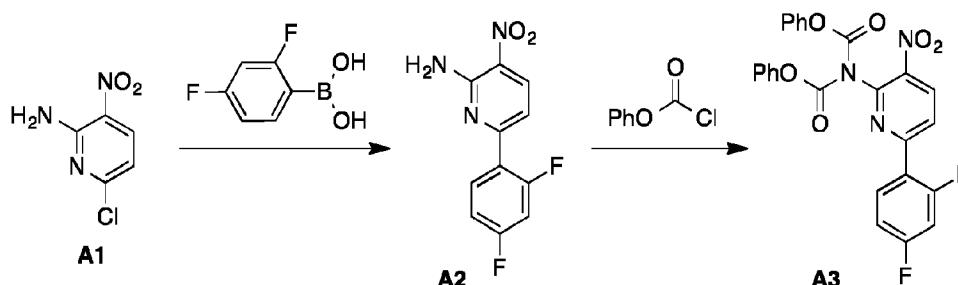
Petele au fost vizualizate prin lumină UV (254 și 365 nm). Purificarea prin coloană și cromatografie rapidă a fost efectuată folosind silicagel (200-300 mesh). Sistemele de solvenți sunt raportate ca raport dintre solvenți.

Spectrele ^1H RMN au fost înregistrate pe Bruker Avance III 400 MHz sau pe Bruker Fourier 300 MHz. Deplasările chimice ale ^1H sunt raportate în valori δ în ppm cu tetrametilsilan (TMS, = 0,00 ppm) ca standard intern. A se vedea, de exemplu, datele furnizate în **Tabelul 1**.

Spectrele LCMS au fost obținute pe un spectrometru de masă Agilent 1200 seria 6110 sau 6120 cu modul de ionizare ESI (+). (Coloană: C18 (50 × 4,6 mm, 5 μm) care funcționează în modul de ionizare ES (+) sau (-); T = 30°C; debit = 1,5 mL/min; lungime de undă detectată: 220 nm. Vezi, de exemplu, datele furnizate în **Tabelul 1**.

Exemplul 1. Sinteza compusului 1





Sinteza intermediarului 101. La o soluție de **Intermediar 100** (350 g, 3,00 moli) în DMF (5500 ml) la 0°C s-a adăugat NaH (360 g, 9,00 moli) și amestecul a fost agitat timp de 30 min la această temperatură. S-a adăugat o soluție de bromură de propargil (1,43 kg, 12,0 mol) în DMF (1500 mL) și amestecul de reacție a fost încălzit la temperatura camerei și agitat timp de 4 ore. Amestecul de reacție a fost apoi stins cu soluție saturată de clorură de amoniu și extras cu EtOAc (2000 mL x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu soluție apoasă saturată de NaCl (2000 ml x 2), uscate pe Na₂SO₄, filtrat și concentrat in vacuo. Produsul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană folosind silicagel pentru a se obține **Intermediar 101** (245 g, 42,5 %) sub formă de ulei galben. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 1,48 (s, 9H), 2,22 (t, 2H, J = 4,8 Hz), 4,17 (s, 4H).

Sinteza intermediarului 102. La o soluție de **Intermediar 101** (270 g, 1,40 mol) și Cp^{*}RuCl(cod) (13,5 g, 35,6 mmol) în 1,2-diclorețan uscat, degazat (2200 mL) s-a adăugat o soluție de cloracetoneitril (157 g, 2,10 moli) în 1,2-diclorețan uscat, degazat (500 mL) peste 15 minute sub atmosferă de Ar la temperatura camerei. Amestecul de reacție a fost apoi încălzit la 60°C și agitat timp de 0,5 ore, după care solventul a fost evaporat și reziduul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană folosind silicagel pentru a da **Intermediar 102** (210 g, 56,0 %) ca solid alb murdar. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 1,52 (s, 9H), 4,67 - 4,73 (m, 6H), 7,40 (d, 1H, J = 19,2 Hz), 8,50 (d, 1H, J = 15,6 Hz). MS 269,1 [M + H]⁺.

Sinteza intermediarului 103. O soluție de **Intermediar 102** (210 g, 784 mmol) în MeOH (4000 mL) a fost tratat cu Pd/C (21,0 g), iar amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei sub o atmosferă H₂ timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost apoi filtrat, iar filtratul a fost concentrat in vacuo pentru a se obține **Intermediar 103** (120 g, 65,6%) ca un solid alb murdar. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 1,53 (s, 9H), 2,98 (s, 3H), 4,86 - 4,90 (m, 4H), 7,53 - 7,60 (m, 1H), 8,62 - 8,67 (m, 1H). MS 235,1 [M + H]⁺.

Sinteza intermediarului 104. O soluție de HCl 4N (600 ml, HCl în EtOAc) a fost adăugată prin picurare la o soluție de 0°C de **Intermediar 103** (120 g, 513 mmol) în EtOAc (600 mL). Amestecul de reacție a fost apoi încălzit la temperatura camerei și agitat timp de 1 oră. Solventul a fost îndepărtat prin filtrare pentru a da **Intermediar 104** ca un solid alb. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) 2,75 (s, 3H), 4,73 - 4,80 (m, 4H), 7,97 (s, 1H), 8,20 (s, 1H). MS 135,1 [M + H]⁺.

Sinteza intermediarului 105. Un amestec de **Intermediar 104** (513 mmol), **Intermediar A3** (151 g, 308 mmol) și Na₂CO₃ (272 g, 2,57 mol) în DMSO a fost agitat la temperatura camerei timp de 3 ore. După ce reacția a ajuns la finalizare conform LCMS, amestecul de reacție a fost turnat în apă rece, extras cu EtOAc, iar straturile au fost separate. Stratul organic a fost apoi concentrat in vacuo, iar reziduul a fost triturat cu EtOAc, apoi filtrat pentru a furniza **Intermediar 105** (80,0 g, 38% din compusul 5) sub formă de solid galben. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) 2,49 (s, 3H), 4,70 - 4,96 (m, 4H), 7,29 - 7,35 (m, 2H), 7,45 - 7,49 (m, 1H), 7,50 - 7,51 (m, 1H), 8,08 - 8,14 (m, 1 H), 8,46 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 10,11 (brs, 1 H). MS 412,1 [M + H]⁺.

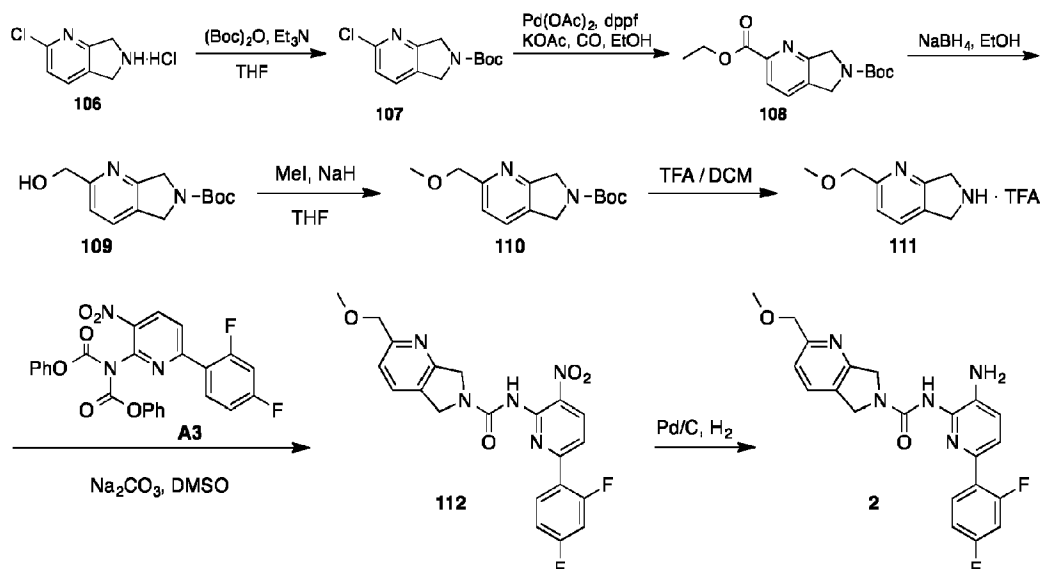
Sinteza compusului 1. Un amestec de **Intermediar 105** (80,0 g, 195 mmol) și Pd/C (8,00 g) în MeOH (2500 mL) s-au agitat la temperatura camerei timp de 1 oră sub atmosferă H₂. După 1 oră, Pd/C a fost îndepărtat prin filtrare prin Celite. Filtratul a fost concentrat și reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană cu silicagel pentru a se obține **Compusul 1** (52,0 g, 70,3 %) sub formă de solid gri. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) 2,48 (s, 3H), 4,77 (s, 4H), 5,28 (s, 2H), 7,16 - 7,18 (m, 2H), 7,28 - 7,31 (m, 2H), 7,40 - 7,42 (m, 1H), 7,92 - 7,94 (m, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,56 (s, 1H). MS 382,1 [M + H]⁺.

Sinteza intermediarului A2. Un amestec de **Intermediar A1** (300 g, 1,73 mol), acid 4-fluorfenilboronic (265 g, 1,91 mmol) și Cs₂CO₃ (1.13 kg, 3,46 mol) în dioxan/H₂O (6000 mL/600 mL) a fost tratat cu Pd(PPh₃)₄ (72.6 g, 86,3 mmol) sub o atmosferă de N₂. Amestecul a fost agitat la 95°C timp de 2 ore și apoi a fost concentrat in vid. Reziduul a fost preluat în EtOAc (4000 mL) și soluția rezultată a fost spălată cu saramură (1000 mL x 3). Straturile organice combinate au fost uscate pe Na₂SO₄ anhidru, filtrat și apoi concentrat in vacuo. Reziduul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel pentru a se obține **Intermediar A2** (240 g, brut) ca un solid galben. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm)

6,90 - 6,96 (m, 1H), 6,99 - 7,04 (m, 1H), 7,23 - 7,26 (m, 1H), 8,02 - 8,08 (m, 1H), 8,47 (d, 1H). , $J = 8,4$ Hz). MS 252,0 [M + H]⁺.

Sinteza intermediarului A3. S-a adăugat prin picurare carbonoclorurat de fenil (354 g, 2,27 mol) la o soluție agiată de **Intermediar A2** (240 g, brut) în piridină (4800 ml) la temperatura camerei. După ce adăugarea a fost finalizată, amestecul de reacție a fost încălzit la 50°C și agitat peste noapte. Amestecul a fost apoi concentrat in vacuo, iar reziduul brut a fost purificat prin recristalizare cu MTBE pentru a furniza **Intermediar A3** (240 g, 28,2% din compusul A1) ca solid galben. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 6,97 - 7,02 (m, 1H), 7,08 - 7,39 (m, 1H), 8,13 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 8,24 - 8,30 (m, 1H), 8,67 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz). MS 492,1 [M + H]⁺.

10 Exemplul 2. Sinteza compusului 2



Sinteza lui 107. Un amestec de clorhidrat de 2-clor-6,7-dihidro-5H-pirol[3,4-b]piridină (11 g, 57,9 mmol), TEA (17,5 g, 173,7 mmol) și (Boc)₂O (13,9 g, 63,7 mmol) în THF (250 mL) a fost agitat la temperatura camerei timp de 3 ore. Amestecul de reacție a fost apoi turnat în DCM (500 ml), spălat cu saramură (100 ml x 3), uscat pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (DCM : EtOAc = 100:1 ~ 10:1) pentru a da **107** (13,5 g, 92%) sub formă de solid alb. MS 255,2 [M+H]⁺.

Sinteza lui 108. Un amestec de **107** (13,5 g, 53,1 mmol), acetat de potasiu (10,4 g, 106,2 mmol), dppf (883 mg, 1,59 mmol) și acetat de paladiu (677 mg, 2,66 mmol) în etanol (20 mL) s-au agitat la 100°C timp de 16 ore sub o atmosferă de CO la 1,5 MPa. Amestecul de reacție a fost apoi răcit la temperatura camerei și filtrat prin Celite. Filtratul a fost concentrat *in vid* iar reziduul a fost dizolvat în DCM (500 ml), spălat cu saramură (10 ml x 3), uscat pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE : EtOAc = 8:1 - 3:1) pentru a da **108** (13,4 g, 86%) sub formă de solid alb. MS 292,1 [M+H]⁺.

Sinteza lui 109. Un amestec de **108** (13,4 g, 45,9 mmol) și NaBH₄ (10,4 g, 275,3 mmol) în etanol (260 mL) a fost agitat la temperatura camerei timp de 16 ore. Amestecul de reacție a fost concentrat *in vid* și reziduul a fost dizolvat cu DCM (500 ml), spălat cu saramură (100 ml x 3), uscat pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (DCM : MeOH = 100:1 ~ 20:1) pentru a da **109** (8,6 g, 75%) sub formă de solid alb. MS 251,4 [M+H]⁺.

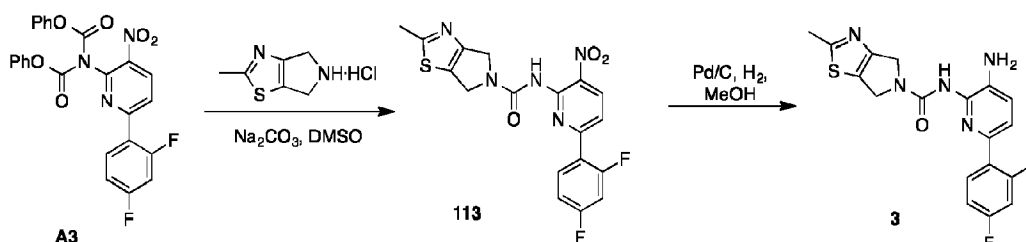
Sinteza lui 110. La un amestec de **109** (8,6 g, 34,4 mmol) în DMF (200 mL) la temperatura camerei s-a adăugat NaH (60% în ulei mineral) (4,1 g, 103,2 mmol). Amestecul rezultat a fost agitat la temperatura camerei timp de 30 min, după care a fost adăugat MeI (14,6 g, 103,2 mmol) sub formă de picături. Amestecul de reacție rezultat a fost agitat la temperatura camerei timp de 1 oră, iar soluția a fost apoi diluată cu apă (300 ml) și extrasă cu EtOAc (200 ml x 3). Stratul organic combinat a fost spălat cu saramură (100 ml x 3), uscat pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE : EtOAc = 8:1 ~ 3:1) pentru a da **110** (8,0 g, 88%) ca un solid alb murdar. MS 265,3 [M+H]⁺.

Sinteza lui 111. La o soluție de **110** (7,6 g, 28,8 mmol) în DCM (70 mL) într-o baie de gheață s-a adăugat TFA (38 mL) prin picurare. Soluția rezultată a fost agitată la temperatura camerei timp de 1 oră, după care solventul a fost îndepărtat *in vid* pentru a da **111** ca produs brut. MS 165,2 [M+H]⁺.

Sinteza lui 112. Un amestec de **111** (28,8 mmol, produs brut din ultima etapă), **A3** (11,8 g, 24 mmol) și Na_2CO_3 (25,4 g, 240 mmol) în DMSO (200 mL) s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 ore. Când reacția a ajuns la final, așa cum este indicat de LCMS, soluția a fost diluată cu apă (300 ml) și apoi extrasă cu EtOAc (200 ml x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (100 ml x 3), uscate pe Na_2SO_4 anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE: EtOAc = 1:1 la EtOAc) pentru a da **112** (7,0 g, 66%) sub formă de solid galben. MS 442,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

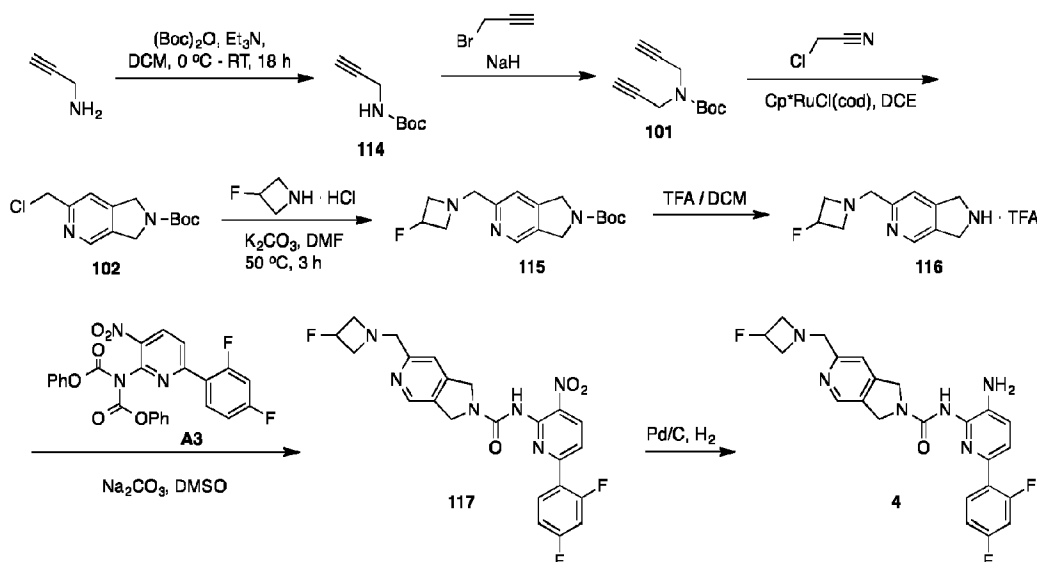
Sinteza compusului 2. Un amestec de **112** (7,0 g, 15,9 mmol) și Pd/C (2,3 g) în DCM/MeOH (140 mL/140 mL) s-au agitat la temperatura camerei timp de 2 ore sub atmosferă de H_2 . Pd/C a fost apoi îndepărtat prin filtrare prin Celite. Filtratul a fost concentrat și reziduul a fost recristalizat cu MTBE pentru a da **Compusul 2** (4,5 g, 69%) ca un solid galben deschis. MS 412,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Exemplul 3. Sinteza compusului 3



Sinteza compusului 3. Compusul **3** a fost sintetizat într-o manieră similară cu **1**, pentru a furniza **3** (28 mg, 22%) ca un solid alb murdar. MS 388 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Exemplul 4. Sinteza compusului 4



Sinteza lui 114. La o soluție de prop-2-in-1-amină (5,0 g, 90,9 mmol) și Et_3N (18,4 g, 181,8 mmol) în DCM (100 mL) răcit cu o baie de gheață s-a adăugat $(\text{Boc})_2\text{O}$ (23,8 g, 109,1 mmol) prin picurare. La finalizarea adăugării lui $(\text{Boc})_2\text{O}$, amestecul rezultat a fost lăsat să se încălzească la temperatura camerei și a fost agitat la temperatura camerei timp de 16 ore. Când reacția a fost completă, amestecul a fost diluat cu DCM (200 mL) și apoi spălat cu saramură (100 mL x 3). Stratul organic a fost uscat pe Na_2SO_4 și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE : EtOAc = 100:1 ~ 10:1) pentru a da **114** (10 g, 71%) ca ulei incolor. MS 178,3 $[\text{M} + 23]^+$, 100,3 $[\text{M} - 56]^+$.

Sinteza lui 101. La o soluție de **114** (10 g, 64,5 mmol) în DMF (200 mL) s-a adăugat lent NaH (60% în ulei mineral) (2,84 g, 71 mmol) în timp ce amestecul de reacție a fost răcit cu o baie de gheață. Amestecul de reacție rezultat s-a agitat la temperatura camerei timp de 1 oră, apoi s-a adăugat 3-bromoprop-1-înă (9,2 g, 77,4 mmol) în amestecul de mai sus și s-a agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. Reacția a fost apoi stinsă cu apă (500 ml) și extrasă cu t-BuOMe (250 ml x 3). Stratul organic combinat a fost spălat cu saramură (200 ml x 3), uscat pe Na_2SO_4 anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE: EtOAc = 100:1 ~ 10:1) pentru a da **101** (12 g, 96%) sub formă de ulei galben. MS 138,1 $[\text{M} - 56]^+$.

Sinteza lui 102. La o soluție de 2-cloracetoneitril (3,13 g, 41,4 mmol) și [Cp**RuCl*(cod)] (394 mg, 1,0 mmol) în DCE (40 mL) s-a adăugat o soluție de **101** (4,0 g, 20,7 mmol) în DCE (80 mL) prin picurare timp de 30 min sub atmosferă de N₂. Amestecul de reacție rezultat a fost agitat la 40°C timp de 16 ore. Solventul a fost apoi îndepărtat *in vid*, iar reziduul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE: EtOAc = 10:1 ~ 2:1) pentru a da **102** (2,1 g, 22%) sub formă de solid cafeniu. MS 269,3 [M + H]⁺.

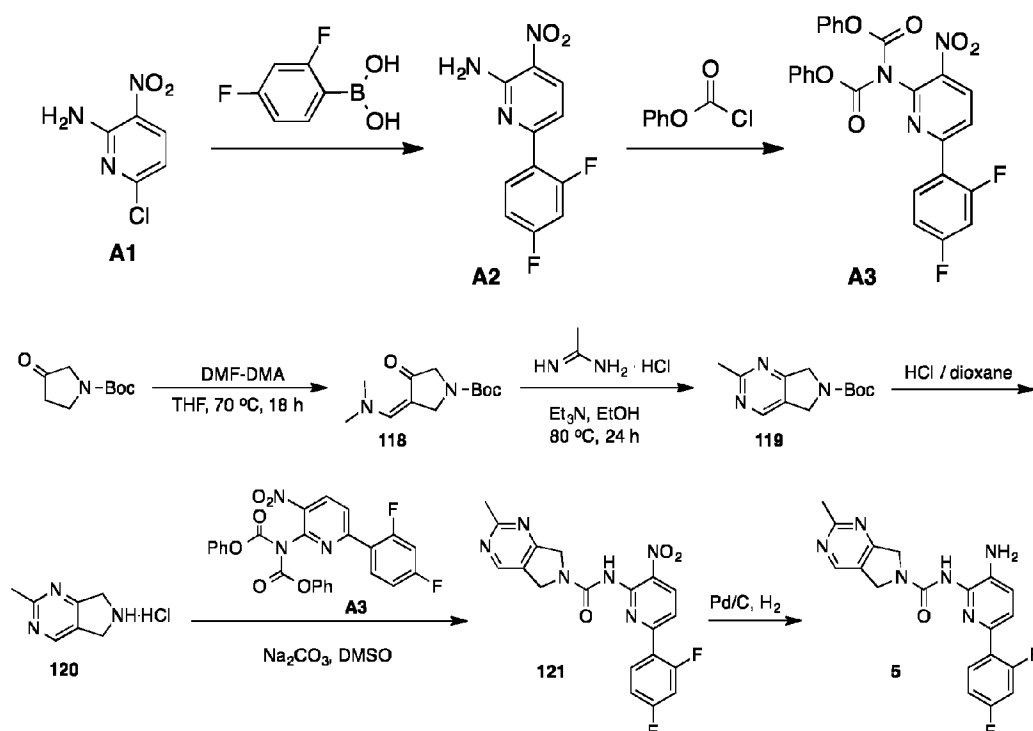
Sinteza lui 115. Un amestec de **102** (1,50 g, 5,6 mmol), clorhidrat de 3-fluorazetidină (932 mg, 8,4 mmol) și K₂CO₃ (2,32 g, 16,8 mmol) în DMF (30 mL) a fost agitat la 50 °C timp de 3 ore. Amestecul a fost apoi diluat cu apă (60 ml) și extras cu EtOAc (30 ml x 4). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (30 ml x 3), uscate pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (DCM: MeOH = 100:1 ~ 30:1) pentru a da **115** (1,4 g, 81%) sub formă de solid alb. MS 308,2 [M+H]⁺.

Sinteza lui 116. La o soluție de **115** (200 mg, 0,65 mmol) în DCM (4 mL) s-a adăugat TFA (2 mL) și amestecul de reacție rezultat a fost agitat la temperatura camerei timp de 1 oră. Când LCMS a indicat că reacția a fost terminată, solventul a fost îndepărtat *in vid* pentru a da **116** ca produs brut care a fost utilizat fără purificare suplimentară în etapa următoare. MS 208,2 [M+H]⁺.

Sinteza lui 117. Un amestec de **A3** (265 mg, 0,54 mmol) și **116** (0,65 mmol, produsul brut din ultima etapă) în DMSO (40 mL) a fost agitat la temperatura camerei timp de 10 minute, apoi Na₂CO₃ (458 mg, 4,32 mmol) a fost adăugat. Amestecul de reacție rezultat a fost agitat la temperatura camerei timp de 2 ore, apoi a fost diluat cu apă (80 ml) și extras cu EtOAc (40 ml x 4). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (40 ml x 3), uscate pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (DCM: MeOH = 100:1 ~ 50:1) pentru a da **117** (200 mg, 76%) sub formă de solid galben. MS 485,2 [M+H]⁺.

Sinteza compusului 4. Un amestec de **117** (200 mg, 0,41 mmol) și Pd/C (200 mg) în MeOH (8 mL) s-au agitat la temperatura camerei timp de 1 oră sub atmosferă de H₂. Pd/C a fost îndepărtat prin filtrare prin Celite, iar filtratul a fost concentrat pentru a furniza un reziduu brut, care a fost purificat prin Prep-TLC (DCM: MeOH = 10:1) de trei ori pentru a da **Compusul 4** (26 mg, 14%) sub formă de solid galben.

Exemplul 5. Sinteza compusului 5



Sinteza lui A2. Un amestec de 6-clor-3-nitropiridin-2-amină (4,58 g, 26,4 mmol), acid 2,4-difluorfenilboronic (5,00 g, 31,7 mmol) și Cs₂CO₃ (25,73 g, 79,2 mmol) în dioxan/H₂O (100 mL/10 mL) a fost tratat cu Pd(PPh₃)₄ (1,10 g, 0,95 mmol) sub atmosferă de N₂. Amestecul a fost agitat la 100°C timp de 2 ore și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost dizolvat în EtOAc (200 mL) și soluția a fost spălată cu saramură (100 mL x 3). Stratul organic a fost uscat pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE: EtOAc = 7:1 ~ 5:1) pentru a da **A2** (4,0 g, 61%) sub formă de solid galben. MS 252,1 [M + H]⁺.

Sinteza A3. O soluție agitată de **A2** (4.0 g, 15,94 mmol) în piridină (60 mL) s-a tratat cu carbonoclorurat de fenil (7,50 g, 47,81 mmol) prin picurare la 0°C. După ce adăugarea a fost finalizată, amestecul de reacție a fost agitat la 50°C timp de 4 ore. Amestecul a fost apoi concentrat *in vid*, iar reziduul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE: DCM = 3:2 ~ 1:1) pentru a da

A3 (7.1 g, 91%) sub formă de solid galben. MS 492,1 [M + H]⁺.

Sinteza lui 118. O soluție de 3-oxopirrolidin-1-carboxilat de terț-butil (15,0 g, 81,1 mmol) și DMF-DMA (29,0 g, 243,3 mmol) în THF (150 mL) a fost agitată la 70 °C timp de 16 ore. Soluția a fost concentrată *in vid* pentru a da **118** ca produs brut care a fost utilizat direct în etapa următoare. MS 241,1 [M + H]⁺.

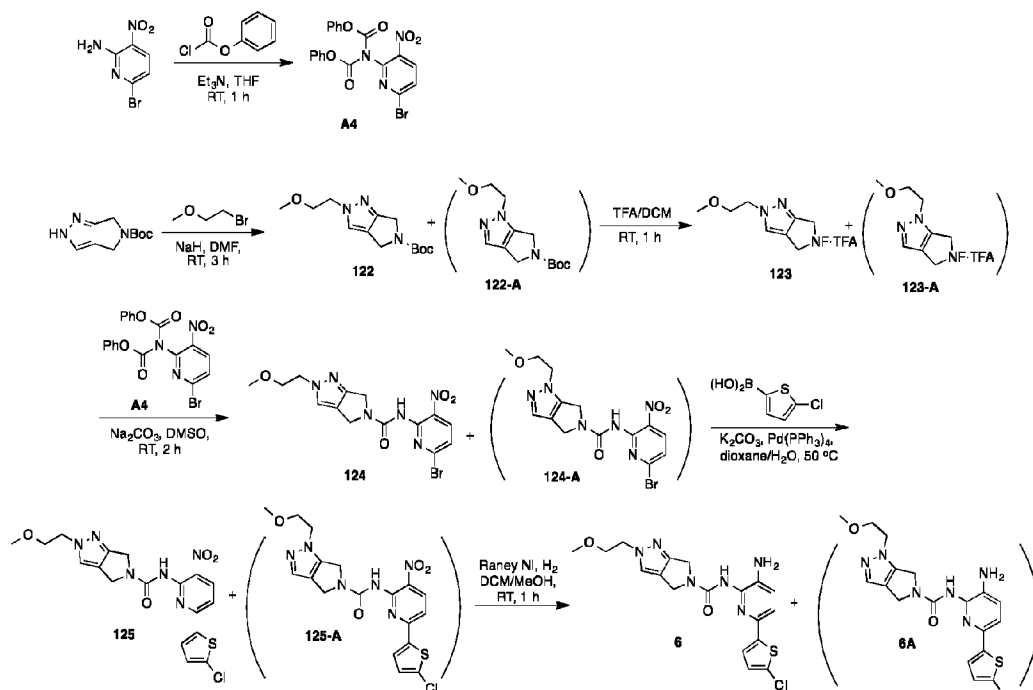
Sinteza lui 119. La o soluție de **118** (81.1 mmol, produs brut din ultima etapă) în EtOH (100 mL) s-a adăugat Et₃N (40,4 g, 0,4 mol) și clorhidrat de acetimidamidă (30,1 g, 0,32 mol). Soluția rezultată a fost agitată la 80°C timp de 24 ore. După ce solventul a fost îndepărtat *in vid*, reziduul a fost diluat cu apă (100 ml) și extras cu DCM (50 ml x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (50 ml x 3), uscate pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE: DCM = 10:1 ~ 1:2) pentru a da **119** (10.5 g, 55%) sub formă de solid maro. MS 236,2 [M + H]⁺.

Sinteza lui 120. O soluție de **119** (600 mg, 2,55 mmol) în dioxan/HCl (4 N, 10 mL) s-a agitat la temperatura camerei timp de 1 oră. Soluția a fost concentrată *in vid* pentru a da **120** (340 mg, 77%) ca solid alb care a fost utilizat fără purificare suplimentară. MS 136,2 [M + H]⁺.

Sinteza lui 121. Un amestec de **A3** (231 mg, 0,47 mmol) și **120** (160 mg, 0,94 mmol) în DMSO (5 mL) a fost agitat la temperatura camerei timp de 10 min. Apoi Na₂CO₃ (399 mg, 3,76 mmol) a fost adăugat în amestecul de mai sus și amestecul rezultat a fost agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. După ce reacția a ajuns la final, așa cum este indicat de LCMS, amestecul de reacție a fost diluat cu apă (30 mL) și extras cu EtOAc (10 mL x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (10 ml x 3), uscate pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrate *in vid*. Reziduul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (DCM: MeOH = 100:1 ~ 50:1) pentru a furniza **121** (120 mg, 62%) sub formă de solid galben. MS 413,2 [M + H]⁺.

Sinteza compusului 5. Un amestec de **121** (120 mg, 0,29 mmol) și Pd/C (120 mg) în MeOH (5 mL) s-au agitat la temperatura camerei timp de 30 de minute sub atmosferă de H₂. Pd/C a fost apoi îndepărtat prin filtrare prin Celite, filtratul a fost concentrat, iar reziduul brut rezultat a fost purificat prin Prep-TLC (DCM: MeOH = 10:1) pentru a da **Compusul 5** (52 mg, 47%) sub formă de solid alb. MS 383,2 [M + H]⁺, 405,0 [M + Na]⁺.

Exemplul 6. Sinteza compusului 6



Sinteza lui A4. O soluție agitată de 6-brom-3-nitropiridin-2-amină (5,0 g, 23,0 mmol) și Et₃N (6,9 g, 69,0 mmol) în THF (60 mL) a fost tratat cu fenil carbonoclorurat (10,8 g, 69,0 mmol) prin picurare la 0°C. După ce adăugarea a fost finalizată, amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 1 oră.

Amestecul de reacție a fost apoi filtrat și concentrat *in vid*. Reziuul brut rezultat a fost recristalizat din eter de petrol pentru a da A4 (10,2 g, 97%) ca un solid galben deschis. MS 458,0, 460,0 [M+H]⁺.

Sinteza lui 122 și 122-A. La o soluție de 4,6-dihidropirol[3,4-c]pirazol-5(2H)-carboxilat de terț-butil (15,0 g, 71,8 mmol) în DMF (150 mL) s-a adăugat NaH (60% în ulei mineral) (8,6 g, 215,4 mmol) în timp ce amestecul de reacție a fost răcit cu o baie de gheață. Când adăugarea a fost completă, amestecul rezultat a fost lăsat să se încălzească la temperatura camerei și a fost agitat la temperatura camerei timp de 30 de minute. În acest moment, s-a adăugat 1-brom-2-metoxietan (19,8 g, 143,6 mmol) în amestecul de reacție și agitarea a fost continuată la temperatura camerei timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost apoi stins cu apă (300 ml) și extras cu EtOAc (150 ml x 3). Stratul organic combinat a fost spălat cu saramură (100 ml x 3), uscat pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziuul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (DCM: MeOH = 100:1 ~ 30:1) pentru a da un amestec de **122** și **122-A** (19,0 g, 99%) ca ulei incolor. MS 268,2 [M + H]⁺.

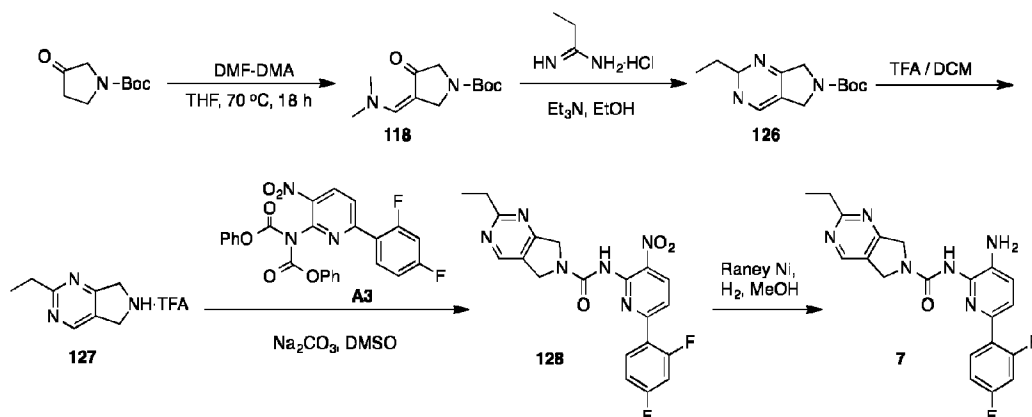
Sinteza lui 123 și 123-A. La o soluție de **122** și **122-A** (6,5 g, 24,3 mmol) în DCM (60 mL) răcită cu o baie de gheață s-a adăugat TFA (30 mL). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 1 oră, după care solventul a fost îndepărtat *in vid* pentru a da **123** și **123-A** ca un amestec de produs brut care a fost utilizat direct în etapa următoare fără purificare suplimentară. MS 168,1 [M+H]⁺.

Sinteza lui 124 și 124-A. La o soluție de **123** și **123-A** (24,3 mmol, produs brut din ultima etapă) și A4 (9,3 g, 20,3 mmol) în DMSO (200 mL) s-a adăugat Na₂CO₃ (21,5 g, 203 mmol), iar amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 4 ore. Amestecul a fost apoi diluat cu apă (400 ml) și extras cu EtOAc (200 ml x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (100 ml x 3), uscate pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziuul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (DCM: MeOH = 100:1 ~ 30:1) pentru a da un amestec de **124** și **124-A** (4,5 g, 50%) sub formă de solid galben. MS 411,0, 413,1 [M+H]⁺.

Sinteza lui 125 și 125-A. Un amestec de **124** și **124-A** (500 mg, 1,22 mmol), acid 5-clorotiofen-2-ilboronic (237 mg, 1,46 mmol) și K₂CO₃ (169 mg, 1,23 mmol) în dioxan/H₂O (10 mL/2 mL) a fost tratat cu Pd(PPh₃)₄ (45 mg, 0,06 mmol) sub atmosferă de N₂. Amestecul de reacție a fost agitat la 50°C timp de 3 ore și apoi concentrat *in vid*. Reziuul a fost preluat în EtOAc (30 mL) și soluția rezultată a fost spălată cu saramură (10 mL x 3). Stratul organic a fost apoi uscat pe Na₂SO₄ anhidru și concentrat *in vid*. Reziuul brut a fost purificat prin Prep-TLC (DCM: MeOH = 20:1) pentru a da un amestec de **125** și **125-A** (450 mg, 82%) sub formă de solid galben. MS 449,2 [M + H]⁺.

Sinteza Compusului 6 și a Compusului 6A. Un amestec de **125** și **125-A** (450 mg, 1,0 mmol) și Raney Ni (100 mg) în DCM/MeOH (6 mL/6 mL) s-au agitat la temperatura camerei timp de 1 oră sub atmosferă de H₂. Raney Ni a fost apoi îndepărtat prin filtrare prin Celite, filtratul a fost concentrat *in vid*, iar reziuul a fost purificat prin Prep-TLC (DCM: MeOH = 10:1). Amestecul de regioizomeri a fost apoi separat prin utilizarea HPLC chirală (Coloană: Chiralcel OD-3; Solvent: MeOH; Viteza de curgere: 2 ml/min; RT_{1843A} = 3,477 min, RT_{1843A} = 4,142 min) pentru a da **Compusul 6** (99 mg, 24%) sub formă de solid alb (MS 419,2 [M+H]⁺) și **Compusul 6A** (50 mg, 12%) sub formă de solid alb. MS 419,2 [M+H]⁺.

Exemplul 7. Sinteza compusului 7



Sinteza lui 118. O soluție de 3-oxopirrolidin-1-carboxilat de terț-butil (600 mg, 3,24 mmol) și DMF-DMA (1,2 g, 9,72 mmol) în THF (10 mL) a fost agitată la 70°C timp de 16 ore. Soluția a fost concentrată *in vid* pentru a da **118** ca produs brut care a fost utilizat direct în etapa următoare. MS 241,1 [M + H]⁺.

Sinteza lui 126. La o soluție de **118** (3,24 mmol, produs brut din ultima etapă) în EtOH (10 mL) s-a adăugat Et₃N (1,6 g, 16,2 mol) și clorhidrat de propionimidamidă (1,4 g, 13,0 mmol). Soluția rezultată a fost agitată la 80°C timp de 20 ore, după care solventul a fost îndepărtat *in vid*, reziuul a fost diluat cu

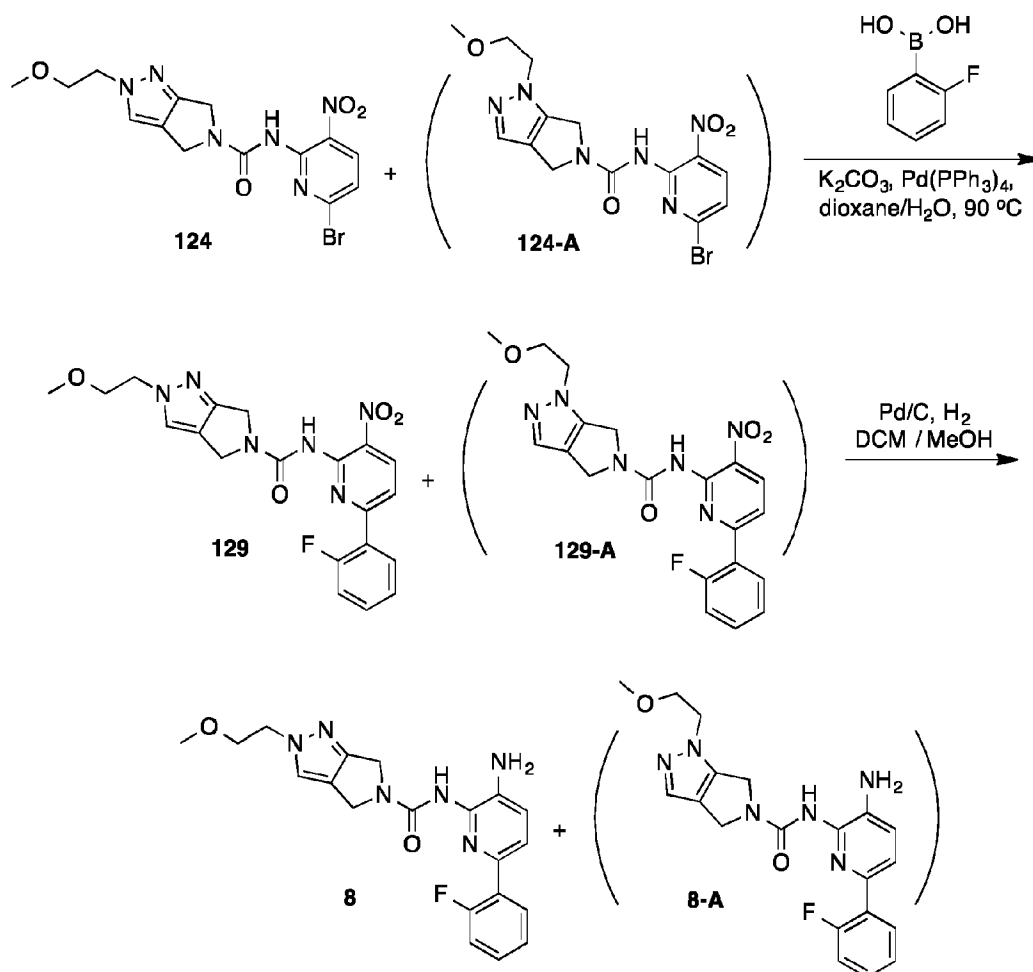
apă (10 mL), iar amestecul a fost apoi extras cu DCM (10 mL x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (10 mL x 3), uscate pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrate *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE: DCM = 10:1 ~ 1:2) pentru a da **126** (450 mg, 56%) sub formă de solid maro. MS 250,2 [M + H]⁺.

Sinteza lui 127. O soluție de **126** (300 mg, 1,2 mmol) în DCM (6 mL) a fost tratat cu TFA (3 mL) și amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 1 oră. După 1 oră, reacția a fost completă, așa cum este indicat de LCMS, și amestecul de reacție a fost concentrat *in vid* pentru a da **127** ca produs brut care a fost utilizat direct în etapa următoare fără purificare suplimentară. MS 150,2 [M + H]⁺.

Sinteza lui 128. Un amestec de **A3** (294 mg, 0,6 mmol) și **127** (1,2 mmol, produsul brut din ultima etapă) în DMSO (10 mL) a fost agitat la temperatura camerei timp de 10 min. Apoi Na₂CO₃ (636 mg, 6,0 mmol) s-au adăugat, iar amestecul rezultat s-a agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. După ce reacția a fost completă, așa cum este indicat de LCMS, amestecul de reacție a fost diluat cu apă (30 mL) și extras cu EtOAc (10 mL x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (10 mL x 3), uscate pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrate *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (DCM: MeOH = 100:1 ~ 50:1) pentru a furniza **128** (136 mg, 53%) sub formă de solid galben. MS 427,2 [M + H]⁺.

Sinteza compusului 7. Un amestec de **128** (120 mg, 0,28 mmol) și Raney Ni (120 mg) în MeOH (5 mL) s-au agitat la temperatura camerei timp de 1 oră sub atmosferă de H₂. Raney Ni a fost apoi îndepărtat prin filtrare prin Celite, filtratul a fost concentrat, iar reziduul brut a fost purificat prin Prep-TLC (DCM: MeOH = 10:1) pentru a da **Compusul 7** (80 mg, 72%) sub formă de solid galben. MS 397,1 [M + H]⁺.

Exemplul 8. Sinteza compusului 8

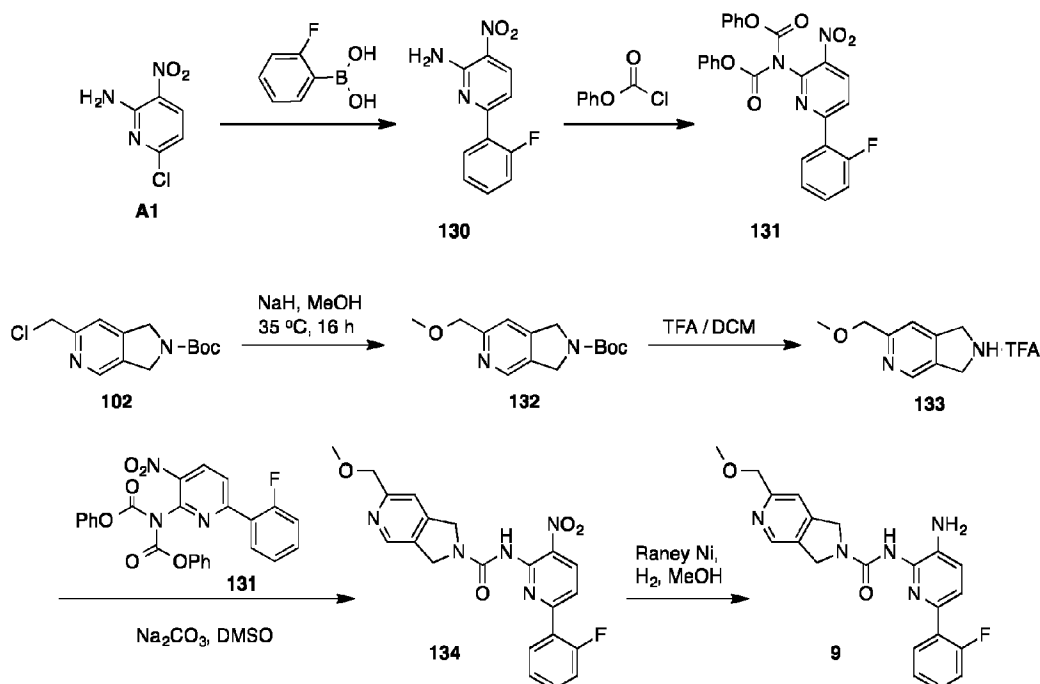


Sinteza lui 129 și 129-A. Un amestec de **124** și **124-A** (350 mg, 0,85 mmol), acid 2-fluorfenilboronic (143 mg, 1,02 mmol) și K₂CO₃ (352 mg, 2,55 mmol) în dioxan/H₂O (10 mL/2 mL) a fost tratat cu Pd(PPh₃)₄ (49 mg, 0,04 mmol) sub atmosferă de N₂. Amestecul de reacție a fost agitat la 90°C timp de 3 ore și apoi concentrat *in vid*. Reziduul brut a fost preluat în EtOAc (30 mL), iar soluția rezultată a fost spălată cu saramură (10 mL x 3). Stratul organic a fost uscat pe Na₂SO₄ anhidru și apoi

concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin Prep-TLC (PE: EA = 5: 1) pentru a da un amestec de **129** și **129-A** (300 mg, 83%) sub formă de solid galben. MS 427,2 [M + H]⁺.

Sinteza Compusului 8 și a Compusului 8A. Un amestec de **129** și **129-A** (300 mg, 0,70 mmol) și Pd/C (80 mg) în DCM/MeOH (5 mL/5 mL) s-au agitat la temperatura camerei timp de 1 oră sub atmosferă de H₂. Pd/C a fost apoi îndepărtat prin filtrare prin Celite, filtratul a fost concentrat, iar reziduul brut a fost purificat prin Prep-TLC (DCM: MeOH = 10:1). Amestecul de regioizomeri a fost apoi separat folosind HPLC chiral (Coloană: Chiralcel OJ-3; Solvent: MeOH; Viteza de curgere: 2 mL/min; RT₁₈₄₉ = 1,201 min, RT_{1849A} = 2,244 min) pentru a da **8** (105 mg, 37%) sub formă de solid galben (MS 397,2 [M+H]⁺) și **8A** (98 mg, 35%) sub formă de solid galben. MS 397,2 [M+H]⁺.

10 Exemplit 9. Sinteza compusului 9



Sinteza lui 130. Un amestec de 6-clor-3-nitropiridin-2-amină (0,5 g, 2,9 mmol), acid 2-fluorfenilboronic (487 mg, 3,48 mmol) și K₂CO₃ (1.20 g, 8,7 mmol) în dioxan/H₂O (10 mL/1 mL) a fost tratat cu Pd(PPh₃)₄ (17 mg, 0,01 mmol) sub atmosferă de N₂. Amestecul de reacție a fost agitat la 90°C timp de 2 ore și apoi concentrat *in vid*. Reziduul brut a fost preluat în EtOAc (200 mL) și soluția rezultată a fost spălată cu saramură (100 mL x 3). Stratul organic a fost apoi uscat pe Na₂SO₄ anhidru și concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE: EtOAc = 10:1 ~ 3:1) pentru a da **130** (301 mg, 45%) sub formă de solid galben. MS 234,2 [M + H]⁺.

Sinteza lui 131. La o soluție agitată de **130** (301 mg, 1,3 mmol) în piridină (10 mL) s-a adăugat prin picurare carbonoclorurat de fenil (608 mg, 3,9 mmol) în timp ce amestecul de reacție a fost răcit cu o baie de gheață. Amestecul de reacție rezultat a fost agitat la 55 °C timp de 4 ore, după care amestecul de reacție a fost concentrat *in vid*. Reziduul brut rezultat a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE: EtOAc = 8:1 ~ 3:1) pentru a da **131** (500 mg, 82%) sub formă de solid galben. MS 474,2 [M + H]⁺.

Sinteza lui 132. Un balon răcit cu baie de gheață de MeOH (30 mL) a fost tratat cu NaH (60% în ulei mineral) (940 mg, 23,5 mmol) și amestecul de reacție a fost agitat la 0 °C timp de 30 de minute. Compusul **102** (2.1 g, 7,8 mmol) s-a adăugat apoi, iar amestecul de reacție s-a agitat la 35°C timp de 16 ore. În acest moment, amestecul de reacție a fost stins cu apă (30 ml), extras cu DCM (10 ml x 3), iar straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (10 ml x 3), uscate pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul brut rezultat a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (PE: EtOAc = 100:1 ~ 10:1) pentru a da **132** (1.8 g, 94%) ca un solid de culoare bej. MS 265,1 [M + H]⁺.

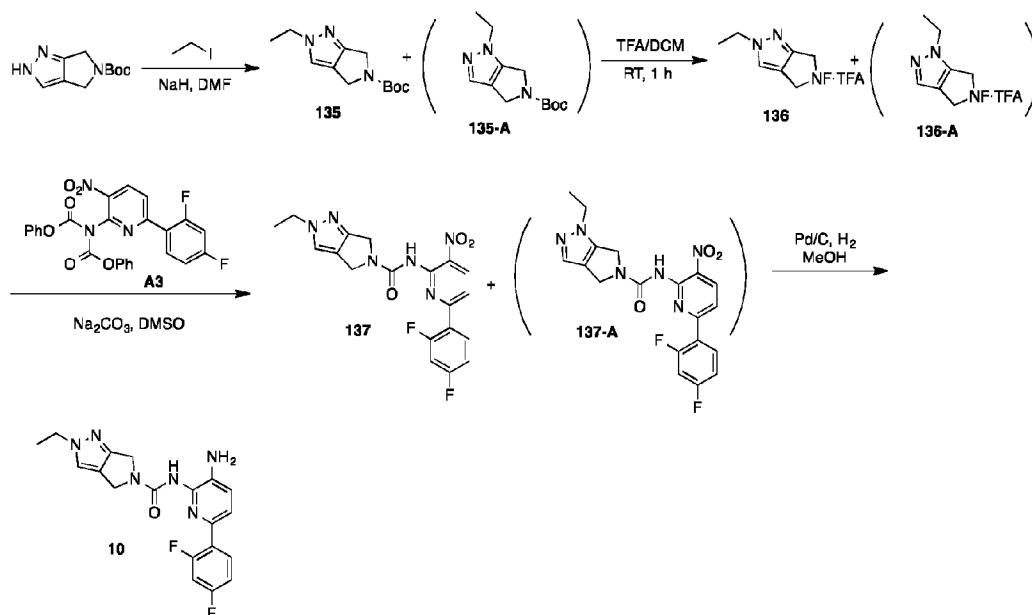
Sinteza lui 133. La o soluție de **132** (220 mg, 0,83 mmol) în DCM (6 mL) s-a adăugat TFA (2 mL) prin picurare, cu amestecul de reacție răcit într-o baie de gheață. Reacția a fost agitată la temperatura camerei 1 oră, după care solventul a fost îndepărtat *in vid* pentru a da **133** ca produs brut care a fost utilizat direct în etapa următoare. MS 165,1 [M + H]⁺.

Sinteza lui 134. Un amestec de **131** (313 mg, 0,64 mmol) și **133** (0.83 mmol, produsul brut din ultima etapă) în DMSO (10 mL) a fost tratat cu Na₂CO₃ (678 mg, 6,4 mmol), iar amestecul de reacție a fost apoi agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. În acest moment, amestecul de reacție a fost diluat

cu apă (20 mL) și extras cu EtOAc (20 mL x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (20 ml x 3), uscate pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (EA la EA: MeOH = 50:1) pentru a da **134** (200 mg, 74%) sub formă de solid galben. MS 424,0 [M+H]⁺.

5 **Sinteza compusului 9.** Un amestec de **134** (200 mg, 0,47 mmol) și Pd/C (200 mg) în DCM/MeOH (4 mL/4 mL) au fost agitate la temperatura camerei timp de 1 oră sub atmosferă de H₂. Pd/C a fost apoi îndepărtat prin filtrare prin Celite, filtratul a fost concentrat și reziduul brut rezultat a fost purificat prin Prep-TLC (DCM: MeOH = 10:1) pentru a da **Compusul 9** (105 mg, 57%) sub formă de solid galben. MS 394,2 [M+H]⁺.

10 **Exemplul 10. Sinteza compusului 10**



15 **Sinteza lui 135 și 135-A.** La o soluție de 4,6-dihidropirol[3,4-c]pirazol-5(2H)-carboxilat de terț-butil (250 mg, 1,2 mmol) în DMF (5 mL) s-a adăugat NaH (96 mg, 2,4 mmol (60% în ulei mineral)), amestecul de reacție fiind răcit cu o baie de gheață. Amestecul rezultat a fost agitat la temperatura camerei timp de 1 oră, după care s-a adăugat iodetan (374 mg, 2,4 mmol) și amestecul de reacție rezultat a fost agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost apoi diluat cu apă (10 ml) și extras cu EtOAc (10 ml x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (10 ml x 3), uscate pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid* pentru a da **135** și **135-A** ca produs brut. MS 238,2 [M + H]⁺.

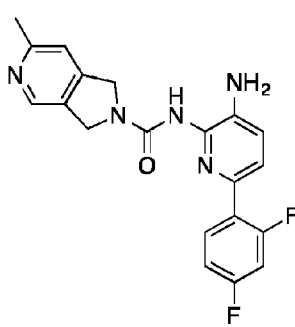
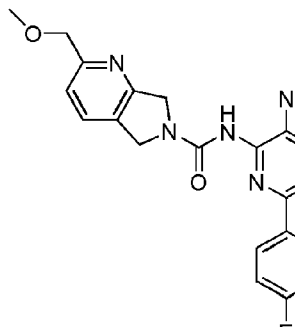
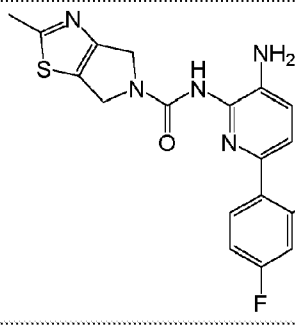
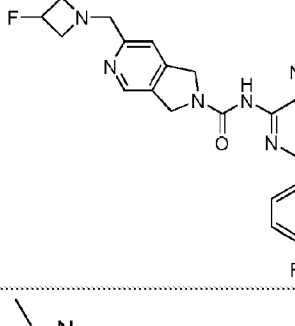
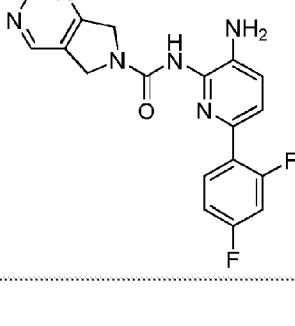
20 **Sinteza lui 136 și 136-A.** La o soluție de **135** și **135-A** (1,2 mmol, produs brut din ultima etapă) în DCM (6 mL) sa adăugat TFA (2 mL) prin picurare în timp ce amestecul de reacție a fost răcit cu o baie de gheață. Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei 1 oră, după care solventul a fost îndepărtat *in vid* pentru a da **136** și **136-A** ca produs brut care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. MS 138,2 [M + H]⁺.

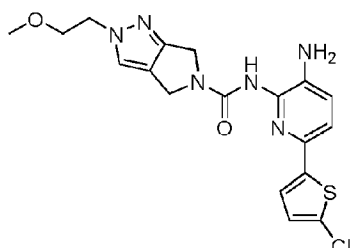
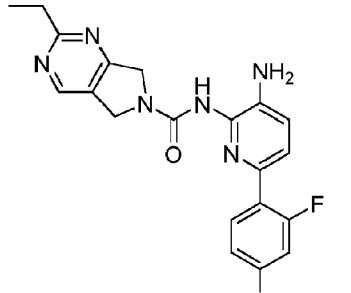
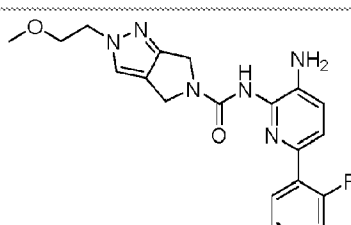
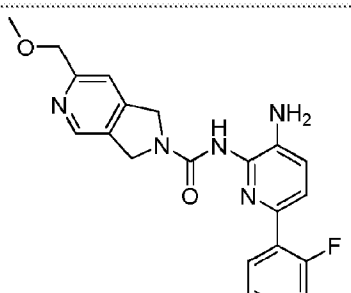
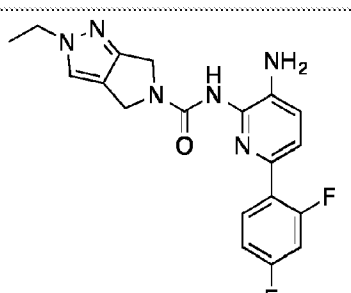
25 **Sinteza lui 137.** Un amestec de **136** și **136-A** (1,2 mmol, produs brut din ultima etapă) și **A3** (491 mg, 1,0 mmol) în DMSO (10 mL) a fost agitat la temperatura camerei timp de 10 minute, apoi Na₂CO₃ (848 mg, 8,0 mol) s-a adăugat, iar amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost apoi diluat cu apă (20 mL) și extras cu EtOAc (20 mL x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (20 ml x 3), uscate pe Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat *in vid*. Reziduul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (DCM: MeOH = 100:1 ~ 50:1) pentru a da un produs brut care a fost un amestec de regioizomeri **137** și **137-A**. Produsul brut a fost purificat suplimentar prin Prep-TLC (DCM: MeOH = 30:1) pentru a da **137** (150 mg, 36%) sub formă de solid galben. MS 415,1 [M + H]⁺.

35 **Sinteza compusului 10.** Un amestec de **137** (150 mg, 0,36 mmol) și Pd/C (150 mg) în MeOH (5 mL) s-au agitat la temperatura camerei timp de 1 oră sub atmosferă de H₂. Pd/C a fost apoi îndepărtat prin filtrare prin Celite, filtratul a fost concentrat și reziduul a fost purificat prin Prep-TLC (DCM : MeOH = 15 : 1) pentru a da **Compusul 10** (85 mg, 61%) sub formă de solid galben. MS 385,1 [M + H]⁺.

40

Tabelul 1. Date spectrometrice pentru compuși

Nr.	Structura	MS Calc.	MS găsit	¹ Date H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆)
1		381	382	δ 2,48 (s, 3H), 4,77 (s, 4H), 5,28 (s, 2H), 7,16 - 7,18 (m, 2H), 7,28 - 7,31 (m, 2H), 7,40 - 7,42 (m, 1H), 7,92 - 7,94 (m, 1 H), 8,45 (s, 1H), 8,56 (s, 1H).
2		411	412	δ 8,59 (s, 1 H), 7,98 - 7,92 (m, 1 H), 7,81 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,43 - 7,40 (m, 1 H), 7,36 - 7,26 (m, 2H), 7,18 - 7,14 (m, 2H), 5,28 (s, 2H), 4,77 (s, 4H), 4,51 (s, 2H), 3,37 (s, 3H).
3		387	388	δ 8,55 (s, 1 H), 7,95 (q, J = 8,80 Hz, 1 H), 7,42 (d, J = 2,40 Hz, 1 H), 7,33-7,27 (m, 1 H), 7,19-7,14 (m, 2H), 5,27 (s, 2H), 4,68 (d, J = 34,40 Hz, 4H), 2,70 (s, 3H).
4		454	455	δ 8,59 (s, 1 H), 8,50 (s, 1 H), 7,97 - 7,91 (m, 1 H), 7,41 (dd, J = 8,0, 2,0 Hz, 1 H), 7,37 (s, 1 H), 7,33 - 7,27 (m, 1 H), 7,19 - 7,14 (m, 2H), 5,29 - 5,26 (m, 2,5 H), 5,14 - 5,12 (m, 2,5 H), 0,5H), 4,80 (s, 4H), 3,76 (s, 2H), 3,66 - 3,58 (m, 2H), 3,28 - 3,24 (m, 1H), 3,22 - 3,19 (m, 1H).
5		382	383	δ 8,70 (s, 1 H), 8,65 (s, 1 H), 7,97 - 7,91 (m, 1 H), 7,42 (dd, J = 8,0, 2,0 Hz, 1 H), 7,33 - 7,27 (m, 1 H), 7,18 - 7,14 (m, 2H), 5,29 (s, 2H), 4,77 (d, J = 5,6 Hz, 4H), 2,64 (s, 3H).

Nr.	Structura	MS Calc.	MS găsit	¹ Date H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆)
6		418	419	δ 8,41 (s, 1 H), 7,56 (s, 1 H), 7,51 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1 H), 7,34 (d, <i>J</i> = 4,0 Hz, 1 H), 7,12 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1 H), 7,05 (d, <i>J</i> = 4,0 Hz, 1 H), 5,24 (s, 2H), 4,50 (s, 4H), 4,26 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 2H), 3,68 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H), 3,24 (s, 3H).
7		396	396	δ 8,73 (s, 1 H), 8,64 (s, 2H), 7,97 -7,91 (m, 1 H), 7,42 (dd, <i>J</i> = 8,0, 3,0 Hz, 1 H), 7,32 - 7,26 (m, 1 H), 7,18 - 7,14 (m, 2H), 5,29 (s, 2H), 4,78 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz, 4H), 2,92 (q, <i>J</i> = 7,6 Hz, 2H), 1,29 (t, <i>J</i> = 7,6 Hz, 3H).
8		396	397	δ 8,47 (s, 1 H), 7,93 - 7,89 (m, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 7,45 - 7,43 (m, 1 H), 7,35 - 7,28 (m, 1 H), 7,25 - 7,22 (m, 2H), 7,17 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1 H), 5,24 (s, 2H), 4,51 (s, 4H), 4,26 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H), 3,68 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 2H), 3,24 (s, 3H).
9		393	394	δ 8,58 (s, 1 H), 8,53 (s, 1 H), 7,93 - 7,89 (m, 1 H), 7,46 - 7,44 (m, 2H), 7,35 - 7,32 (m, 1 H), 7,28 - 7,22 (m, 2H), 7,17 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1 H), 5,28 (s, 2H), 4,83 (s, 4H), 4,52 (s, 2H), 3,38 (s, 3H).
10		384	385	δ 8,47 (s, 1 H), 7,96 - 7,93 (m, 1 H), 7,60 (s, 1 H), 7,40 (dd, <i>J</i> = 8,0, 2,4 Hz, 1 H), 7,32 - 7,26 (m, 1 H), 7,18 - 7,14 (m, 2H), 5,25 (s, 2H), 4,52 (s, 4H), 4,13 (q, <i>J</i> = 7,2 Hz, 2H), 1,38 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 3H), 3,24 (s, 3H).

Analiza enzimatică HDAC2 și HDAC1 (date HDAC2 IC₅₀)

Următoarele descriu un protocol de testare pentru măsurarea deacetilării unui substrat peptidic de către enzimele HDAC2 sau HDAC1. Enzima, substratul și cofactorii sunt combinați într-un godeu al unei plăci de microtitrare și incubati timp de 3 ore la 25 °C. La sfârșitul incubării, reacția este stinsă prin adăugarea unui tampon care conține SDS. Substratul și produsul sunt separate și cuantificate electroforetic folosind LabChip 3000 Drug Discovery System de la Caliper Life Sciences pe bază de microfluide. Substratul peptidic utilizat în acest test este FAM-TSRHK(AC)KL-CONH₂ (FAM este carboxifluoresceină). Peptida trebuie să aibă o puritate >98% prin electroforeză capilară.

1. Într-un godeu al unei plăci cu 384 de godeuri, adăugați 5 μ L de tampon enzimatic 2X. Folosind Labcyte Echo 550, adăugați 100 nl compus. Enzima și compusul pot fi pre-incubate în acest moment, dacă se dorește.
 2. Adăugați 5 μ L de tampon de substrat 2X.
 3. Se incubează placa la 25°C timp de 17 ore.
 4. Terminați reacția prin adăugarea a 40 μ L de tampon de oprire 1,55X.
 5. Creați un job pe un aparat Caliper LabChip® 3000 Drug Discovery System.
 6. Încărcați placa și începeți electroforeza folosind laser albastru (480 nm) pentru excitare și CCD verde (520 nm) pentru detectare (CCD2).
- Timp de reacție = 17 ore; Temperatura de reacție = 25 °C.

Amestecul de reacție pentru testarea finală

- 100 mM HEPES, pH 7,5 0,1% BSA 0,01% Triton X-100 25 mM KCl
1% DMSO (din compus) 1 μ M FAM-TSRHK(AC)KL-CONH₂ 5 nM Enzimă HDAC
(activitatea specifică poate varia de la lot la lot, iar concentrația enzimei poate fi necesar să fie ajustată pentru a produce o conversie de -10-20% a substratului la produs).

- Peptidele de substrat și de produs prezente în fiecare probă sunt separate electroforetic folosind instrumentul de electroforeză capilară LabChip 3000. Pe măsură ce peptidele de substrat și de produs sunt separate, se observă două vârfuri de fluorescență. Modificarea intensității relative de fluorescență a vârfurilor de substrat și de produs este parametrul măsurat, reflectând activitatea enzimei. Electroforegramele capilare (fișiere de achiziție RDA) sunt analizate folosind software-ul HTS Well Analyzer (Caliper Life Sciences). Activitatea enzimatică din fiecare probă este determinată ca raport produs la sumă (PSR): $P/(S+P)$, unde P este înălțimea vârfului peptidei produsului și S este înălțimea vârfului peptidei substrat. Pentru fiecare compus, activitatea enzimatică este măsurată la diferite concentrații (12 concentrații de compus distanțate la intervale de diluție de 3x). Probele de control negative (inhibare 0% în absența inhibitorului) și probele de control pozitiv (inhibare 100%, în prezența a 20 mM EDTA) sunt asamblate în replici a câte patru și sunt utilizate pentru a calcula valorile procentuale de inhibare pentru fiecare compus la fiecare concentrare. Inhibare procentuală (P_{inh}) se determină folosind următoarea ecuație: $P_{inh} = (PSR_{0\%} - PSR_{inh}) / (PSR_{0\%} - PSR_{100\%}) * 100$, unde PSR_{inh} este raportul sumei produsului în prezența inhibitorului, $PSR_{0\%}$ este rația medie a produsului în absența inhibitorului și a $PSR_{100\%}$ este raportul mediu al sumei produsului în probele de control cu inhibiție de 100%.

Valorile IC₅₀ ale inhibitorilor sunt determinate prin ajustarea curbelor de inhibiție (P_{inh} față de concentrația inhibitorului) prin modelul doză-răspuns sigmoidal cu 4 parametri folosind software-ul XLfit 4 (IBDS).

- Rezultatele acestui test pentru anumiți compuși sunt raportate în **Tabelul 2**, de mai jos. În tabel, „A” indică o valoare K_d mai mică de 0,1 μ M; „B” o valoare K_d cuprinsă între 0,1 μ M și 0,5 μ M; „C” o valoare K_d mai mare de 0,5 μ M și mai mică sau egală cu 5,0 μ M; și „D” o valoare K_d mai mare de 5,0 μ M.

Tabel 2

Compus Nr.	HDAC2 IC50, (μ M)	HDAC1 IC50, (μ M)
1	B	B
2	C	B
3	C	B

Compus Nr.	HDAC2 IC50, (μ M)	HDAC1 IC50, (μ M)
6	C	C
7	C	B
8	C	B

Compus Nr.	HDAC2 IC50, (μ M)	HDAC1 IC50, (μ M)
4	C	B
5	C	C

Compus Nr.	HDAC2 IC50, (μ M)	HDAC1 IC50, (μ M)
9	C	B
10	B	B

Testul de inhibare enzimatică HDAC2 în lizat de celule SH-SY5Y**Cultură celulară și tratamente cu inhibitori**

5 Celulele SH-SY5Y (Sigma) au fost cultivate în Mediu Esențial Modificat Eagle suplimentat cu ser fetal bovin 10% și pen/strep. Douăzeci și patru de ore înainte de dozarea compusului, 20 uL de celule au fost plasate pe plăci albe cu 384 de godeuri la o densitate de 1500 celule/godeu. Compușii au fost diluați în serie în DMSO pur și apoi diluați 1:100 v/v în mediu fără FBS și amestecați. Mediul a fost îndepărtat din celulele placate și compușii diluați în mediu fără ser (1% v/v DMSO final) au fost adăugați și incubați la 37°C timp de cinci ore. S-au adăugat apoi zece uL de reactiv HDAC-Glo 2 cu 0,1% Triton X-100, placa a fost amestecată și lăsată să se dezvolte la temperatura camerei timp de 100 de minute.

10 Plăcile au fost apoi citite cu un luminometru Spectramax LMax utilizând un timp de integrare de 0,4 s. Curbele de răspuns la doză au fost construite cu date normalizate în care CI-994 la 100 uM a fost definit ca inhibare 100% și DMSO singur ca inhibare 0%.

15 Rezultatele acestui test pentru anumiți compuși sunt raportate în **Tabelul 3** de mai jos. În tabel, „A” indică o valoare IC₅₀ cuprinsă între 0,1 μM și 1 μM; „B” indică o valoare IC₅₀ cuprinsă între 1,0 μM și 1,5 μM; iar „C” indică o valoare IC₅₀ mai mare de 1,5 μM.

Tabel 3

Compus Nr.	HDAC2 IC ₅₀ , SH-SY5Y Cell Lizat (uM)	Compus Nr.	HDAC2 IC ₅₀ , SH-SY5Y Cell Lizat (uM)
1	A	6	C
2	B	7	A
3	A	8	A
4	B	9	A
5	B	10	A

Testul CFU eritroid și mieloid

20 Progenitorii clonogenici ai liniilor eritroide umane (CFU-E, BFU-E), granulocite-monocite (CFU-GM) și multipotențiale (CFU-GEMM) au fost evaluați într-o formulare de mediu semisolidă pe bază de metilceluloză care conține rhIL-3 (10 ng/mL), rhGM-SCF (10 ng/mL), rhSCF (50 ng/mL) și Epo (3 U/mL).

Celule

25 Celulele normale de densitate ușoară a măduvei osoase umane derivate din măduva osoasă normală (NorCal Biologics, California) și calificate la ReachBio, au fost stocate în faza gazoasă a azotului lichid (-152°C) până când este necesar pentru test. În ziua experimentului, celulele au fost dezghețate rapid, conținutul fiecărei fiole a fost diluat în 10 ml de mediu Dulbecco modificat Iscove care conține 10% ser fetal bovin (IMDM + 10% FBS) și spălat prin centrifugare (aproximativ 1200 r.p.m pentru 10 minute, temperatura camerei). Supernatantul a fost aruncat și peletele celulare resuspendate într-un volum cunoscut de IMDM + 10% FBS. A fost efectuată o numărare de celule (3% acid acetic glacial) și o evaluare a viabilității (testul de excludere cu albastru tripan) pentru proba de măduvă osoasă.

Compuși

35 În ziua experimentului, compușii au fost dizolvați în DMSO la o concentrație stoc de 10 mM. S-au preparat diluții în serie din concentrația stoc pentru a obține concentrații de 2 și 0,4 mM. Când s-a adăugat la mediul pe bază de metilceluloză la 1:1000 (v/v), au fost atinse concentrațiile de testare finale de 10, 2 și 0,4 μM. În plus, 5-FU a fost evaluat la 1,0, 0,1 și 0,01 μg/mL.

Rezumatul metodei

40 În formulările de mediu pe bază de metilceluloză descrise mai sus au fost formați progenitorii clonogeni ai descendenței eritroide umane (CFU-E și BFU-E) și mioide (CFU-GM). Toți compușii au

fost adăugați în mediu pentru a da concentrațiile finale dorite (10, 2 și 0,4 μM). 5-Fluorouracil (Sigma Aldrich) a fost utilizat ca control pozitiv pentru proliferarea progenitoarelor (inhibarea creșterii coloniilor) și a fost introdus în culturile de măduvă osoasă umană la 1,0, 0,1 și 0,01 μg/mL. Au fost de asemenea inițiate culturi de control cu solvent (care nu conțin compus, dar 0,1% DMSO), precum și controale standard (care nu conțin compus și fără DMSO).

Testele progenitoarelor mieloidă și eritroidă umane au fost inițiate la $2,0 \times 10^4$ celule per cultură. După 14 zile de cultură, coloniile mieloidă și eritroidă au fost evaluate microscopic și marcate de personal instruit. Coloniile au fost împărțite în următoarele categorii în funcție de dimensiune și morfologie: CFU-E, BFU-E, CFU-GM și CFU-GEMM.

10 Analize statistice ale numerelor CFC

Media \pm o abatere standard a trei culturi replicate a fost calculată pentru progenitorii din fiecare categorie (CFU-E, BFU-E etc.). Au fost efectuate teste t cu două cozi pentru a evalua dacă a existat o diferență în numărul de colonii generate între controlul cu solvent și culturile tratate. Datorită subiectivității potențiale a enumerării coloniilor, o valoare p mai mică de 0,01 este considerată semnificativă. Pentru a calcula concentrația de inhibare de 50% a creșterii coloniilor (IC_{50}) pentru fiecare compus, a fost generată o curbă doză-răspuns care reprezintă graficul logaritmului concentrației de compus față de procentul de creștere a coloniei de control folosind software-ul XLfit (IDBS). Concentrația de 50% inhibare a creșterii coloniilor (IC_{50}) a fost calculată pe baza potrivirii curbei sigmoide utilizând formula Doză-Răspuns, Model unic: $y = A + [(B - A)/(1 + ((C/x)^D))]$, unde A = valoarea inițială (răspunsul de bază), B = răspuns maxim, C = centru (concentrația medicamentului care provoacă un răspuns la jumătatea distanței dintre A și B) și D = panta curbei la mijloc. În plus, grafice și curbe suplimentare de răspuns la doză au fost generate utilizând GraphPad Prism 7.0.

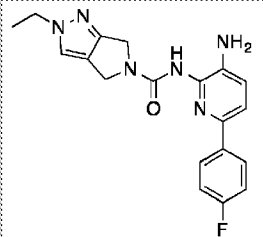
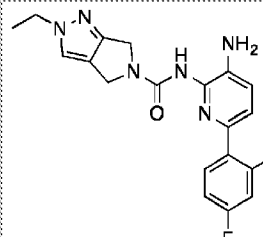
Evaluarea morfologică a coloniilor

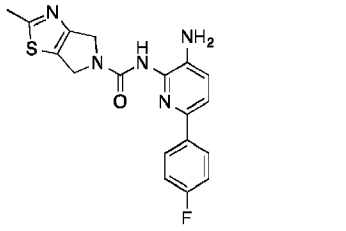
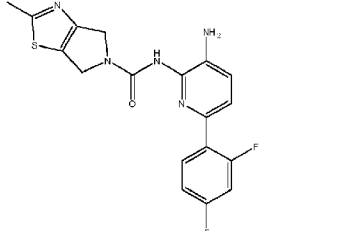
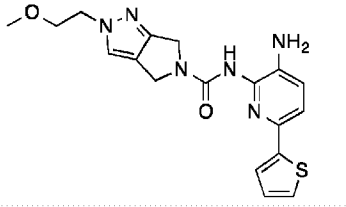
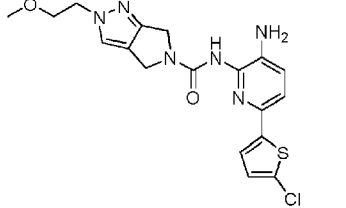
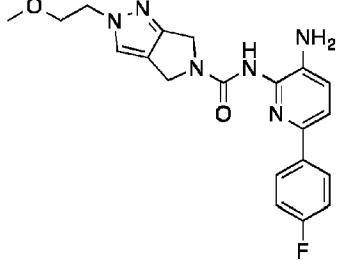
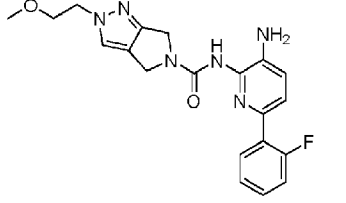
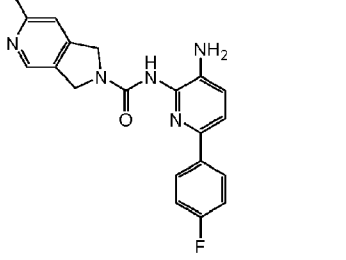
Au fost făcute fotografiile ale coloniilor reprezentative derivate din progenitor hematopoietic din diferite linii, ilustrând coloniile în prezența controlului solvent, precum și coloniile în prezența compușilor de testat.

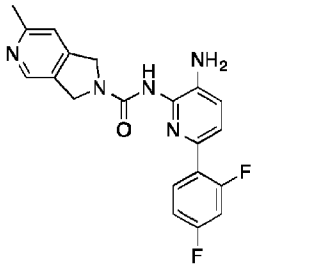
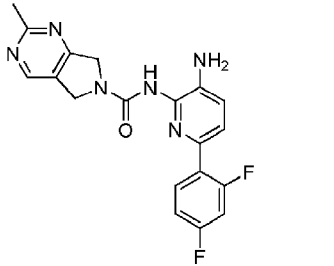
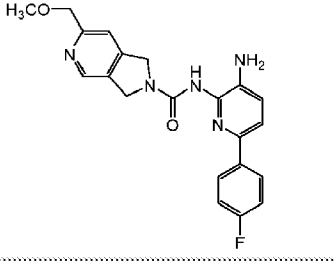
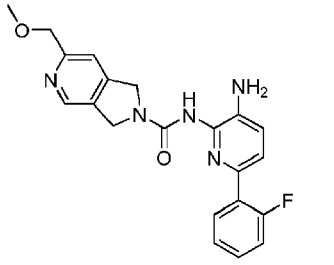
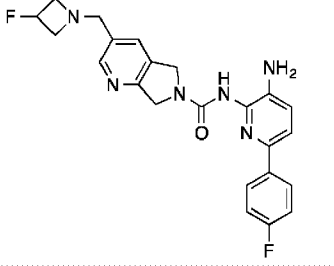
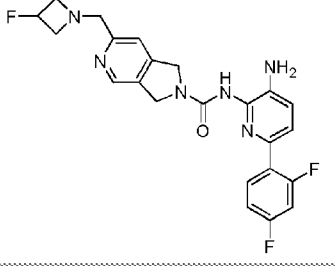
Numărarea coloniilor eritroidă (CFU-E și BFU-E), mieloidă (CFU-GM) și cu potențial multiplu (CFU-GEMM) a fost efectuată de personal instruit. A fost analizată distribuția tipurilor de colonii, precum și a coloniei generale și a morfologiei celulare. Pentru analiza statistică, numerele de colonii din culturile tratate cu compus au fost comparate cu culturile de control cu solvent. 5-FU a fost utilizat ca control pozitiv pentru toxicitate în aceste teste și efectele inhibitoare obținute pentru acest compus au fost exact cele așteptate. Experimentul a fost utilizat pentru a evalua efectul potențial al compușilor de testat asupra proliferării eritroidă umane și a progenitorilor mieloidă într-un mediu pe bază de metilceluloză. Valorile IC_{50} au fost calculate din XLfit. Curbele de răspuns la doză pentru toxicitatea eritroidă și mieloidă generate de XLfit. În cele din urmă, potrivirea curbei de regresie neliniară și $IC_{50s} \pm 95\%$ CI, au fost calculate cu Prism 7.0.-GEMM.

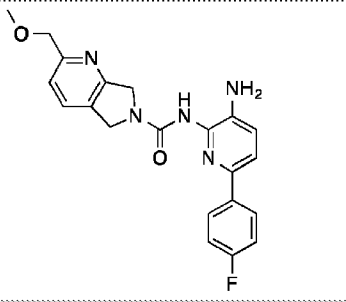
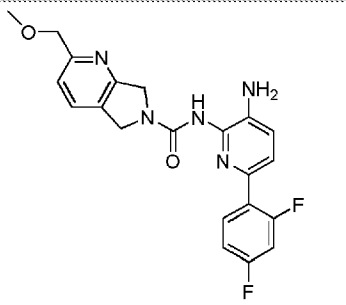
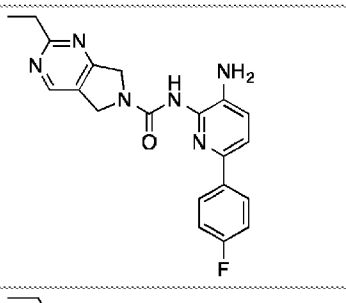
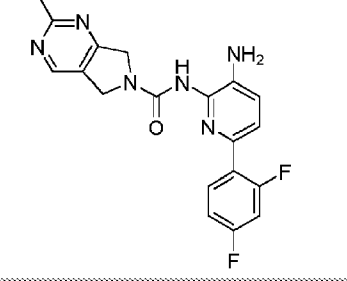
Rezultatele sunt afișate în **Tabelul 4**.

Tabel 4

Compus	Structura	Eritroid % control rămas la doza de 10 uM	Mieloid % control rămas la doza de 10 uM
Comparatorul 1		22	34
10		38	77

Compus	Structura	Eritroid % control rămas la doza de 10 uM	Mieloid % control rămas la doza de 10 uM
Comparatorul 2		45	103
3		89	109
Comparatorul 3		18	9
6		69	82
Comparatorul 4		28	39
8		72	75
Comparatorul 5		25.7	66.1

Compus	Structura	Eritroid % control rămas la doza de 10 uM	Mieloid % control rămas la doza de 10 uM
1		53	100
5		69	82
Comparatorul 6		22.9	58.9
9		87	102
Comparatorul 7		35	82
4		62	102

Compus	Structura	Eritroid % control rămas la doza de 10 uM	Mieloid % control rămas la doza de 10 uM
Comparatorul 8		33	70
2		62	92
Comparatorul 9		60	79
7		69	105

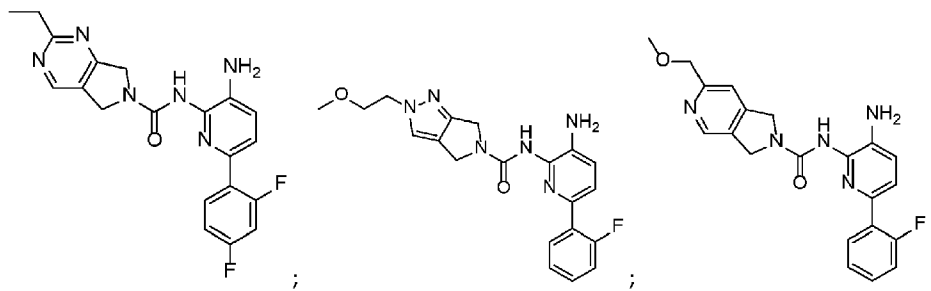
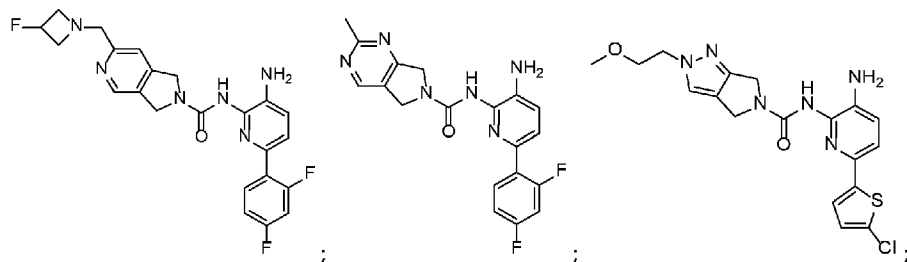
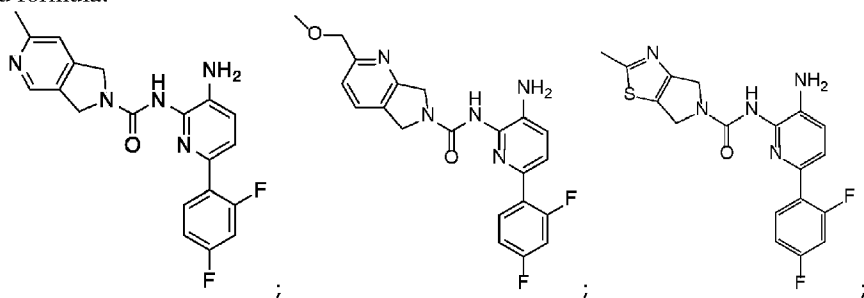
Dacă nu este definit altfel, tuturor termenilor tehnici și științifici utilizați aici li se acordă semnificația cunoscută în mod obișnuit cuiva cu calificare obișnuită în domeniu.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

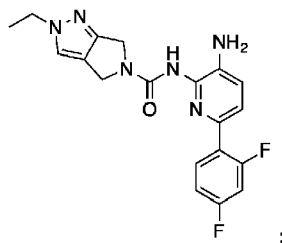
- F. F. WAGNER ET AL: "Kinetically selective inhibitors of histone deacetylase 2 (HDAC2) as cognition enhancers", CHEMICAL SCIENCE, vol. 6, no. 1, 1 January 2015 (2015-01-01) , pages 804-815, XP055300906, United Kingdom ISSN: 2041-6520, DOI: 10.1039/C4SC02130D
- WO-A1-2017/007755
- WO-A1-2018/132531

(57) Revendicări:

1. Un compus cu formula:

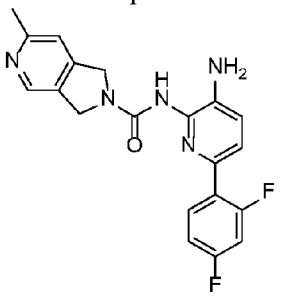


sau



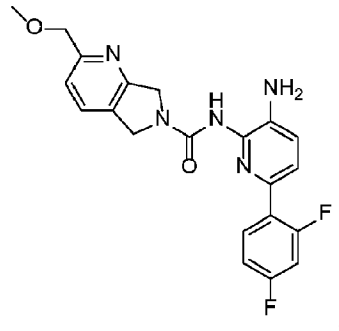
sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia.

2. Compus conform revendicării 1, în care compusul are formula:



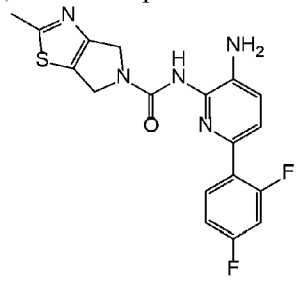
sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia.

3. Compus conform revendicării 1, în care compusul are formula:



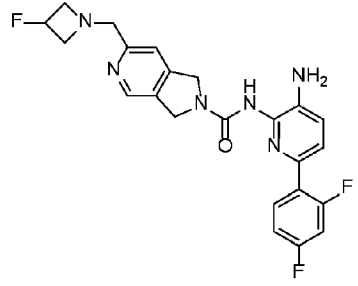
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

4. Compus conform revendicării 1, în care compusul are formula:



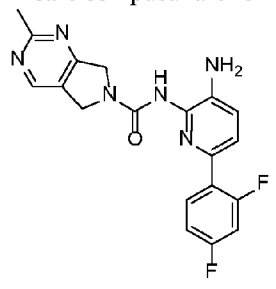
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

5. Compus conform revendicării 1, în care compusul are formula:



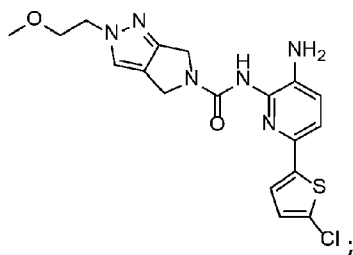
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

6. Compus conform revendicării 1, în care compusul are formula:



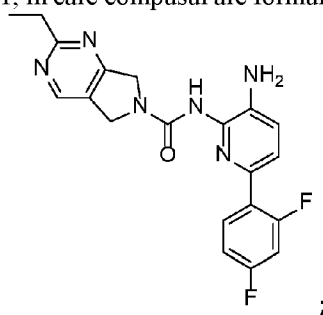
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

7. Compus conform revendicării 1, în care compusul are formula:



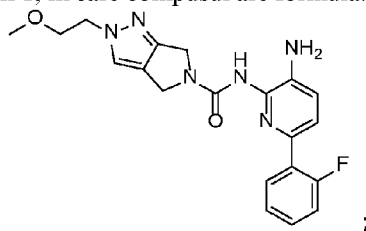
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

8. Compus conform revendicării 1, în care compusul are formula:



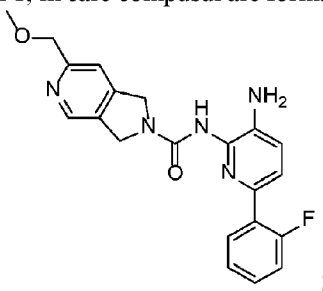
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

9. Compus conform revendicării 1, în care compusul are formula:



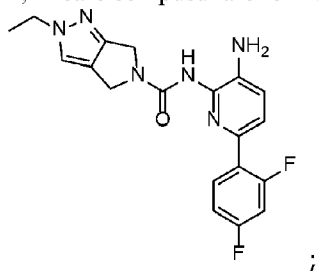
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

10. Compus conform revendicării 1, în care compusul are formula:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

11. Compus conform revendicării 1, în care compusul are formula:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

12. Compoziție farmaceutică cuprinzând: un compus conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 11, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia; și un purtător acceptabil farmaceutic.

13. Compus conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 11, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în tratarea unei afecțiuni la un subiect selectată dintre o tulburare neurologică, tulburare sau afectare a memoriei sau a funcției cognitive, tulburare de învățare prin extincție, boală fungică sau infecție, boală inflamatorie, boală hematologică, tulburări psihiatrice și boală neoplazică.

14. Compus pentru utilizare conform revendicării 13, în care starea este:

a. o tulburare a funcției cognitive sau o afectare asociată cu boala Alzheimer, boala Huntington, pierderea memoriei indusă de convulsii, schizofrenie, sindrom Rubinstein Taybi, sindrom Rett, sindrom X fragil, demență cu corp Lewy, demență vasculară, demență frontotemporală, ADHD, dislexie, tulburare socială și bipolară, tulburări cognitive și de învățare asociate cu autism, traumatism cranian, tulburare de deficit de atenție, tulburare de anxietate, răspuns la frică condiționat, tulburare de panică, tulburare obsesiv-compulsivă, tulburare de stres posttraumatic (PTSD), fobie, tulburare de anxietate socială, recuperare a dependenței de substanțe, tulburare de memorie asociată vârstei (AAMI), declin cognitiv legat de vârstă (ARCD), ataxie sau boala Parkinson; sau

b. o boală hematologică selectată dintre leucemie mieloidă acută, leucemie promielocitică acută, leucemie limfoblastică acută, leucemie mieloidă cronică, sindroame mielodisplazice și anemia cu celule seceră; sau

c. o boală neoplazică; sau

d. o tulburare de învățare prin extincție selectată dintre extincția fricii și tulburarea de stres post-traumatic.

15. Compus pentru utilizare conform revendicării 14, în care starea este boala Alzheimer, boala Huntington, demența frontotemporală, ataxia Freidreich, tulburarea de stres post-traumatic (PTSD), boala Parkinson sau recuperarea dependenței de substanțe.