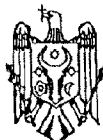




MD/EP 3680243 T2 2022.05.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3680243 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07D 495/22 (2006.01.01),
A61K 31/551 (2006.01.01),
A61P 25/28 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

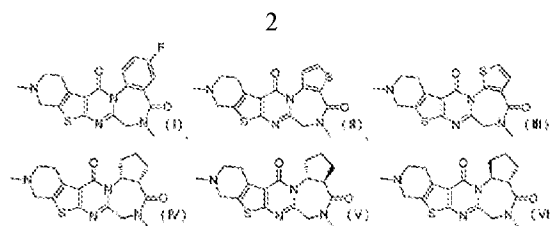
<p>(21) Numărul de depozit: e 2020 0725</p> <p>(22) Data de depozit: 2018.09.05</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18853415.0, 2018.09.05</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3680243, 2020.07.15</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 2017172169</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.09.07</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: JP</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 05/2022, 2022.05.31</p> <p>(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 43/2021, 2021.10.27</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 08/2020, 2020.08.31</p>
<p>(71) Solicitant: EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD., JP</p> <p>(72) Inventatori: OHASHI Yoshiaki, JP; NORIMINE Yoshihiko, JP; HOSHIKAWA Tamaki, JP; YOSHIDA Yu, JP; KOBAYASHI Yoshihisa, JP; SATO Nobuhiro, JP; HAGIWARA Koji, JP</p> <p>(73) Titular: EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD., JP</p> <p>(74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela</p>	

(54) Compus pentaciclic

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție oferă compuși reprezentați de formulele (I)-(VI) sau săruri acceptabile din punct de vedere farmaceutic ale acestora:



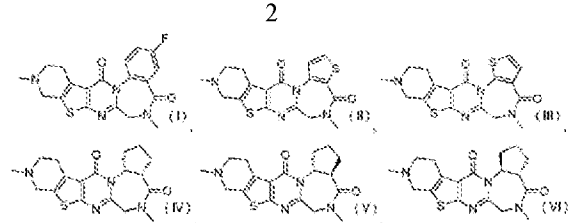
Revendicări: 14

MD/EP 3680243 T2 2022.05.31

(54) Pentacyclic compound**(57) Abstract:**

1

The present invention provides compounds represented by formulas (I) to (VI) or pharmaceutically acceptable salts thereof:



Claims: 14

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

5 Prezenta invenție se referă la un compus pentaciclic, sau la o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia care are activarea neuronilor colinergici și/sau efect neuroprotector și la utilizarea farmaceutică a acestuia. Prezenta invenție se referă, de asemenea, la compoziții farmaceutice care cuprind compusul menționat ca ingredient activ.

10 Stadiul tehnicii

Neuronii colinergici care eliberează acetilcolina ca transmițător sunt proiectați pe scară largă în prozencefal de la nucleul bazal al lui Meynert și nucleul septal al prozencefalului bazal la hipocamp, amigdala și cortexul cerebral și sunt implicați în modularea memoriei, învățării, cunoașterii și atenției (Literatura non-brevet 1). În plus, neuronii colinergici din nucleul tegmental pedunculopontin și nucleul
15 tegmental laterodorsal al trunchiului cerebral sunt proiectați în striatum, nucleul accumbens, substanța nigra și talamus și sunt considerați a fi implicați în controlul motivației și vigilenței (literaturi non-brevet).
2 până la 4).

În special, rolul neuronilor colinergici în prozencefalul bazal a fost mai clarificat prin analiză folosind multe modele animale, cum ar fi, modelul de leziune. În special, corelația dintre tulburarea
20 funcțională a neuronilor colinergici și scăderea memoriei și a învățării a fost demonstrată în modelele animale (literatura non-brevet 5 până la 7) și s-a demonstrat că performanța cognitivă este îmbunătățită prin creșterea cantității de acetilcolină folosind un inhibitor de colinesterază și îmbunătățind funcția neuronilor colinergici (literatura non-brevet 8 până la 12).

S-a raportat că factorul de creștere a nervilor (NGF) ilustrează efectul neuroprotector asupra
25 neuronilor colinergici la modelul animal, indicând pierderea neuronilor colinergici. (literatura non-brevet 13 până la 15).

În special pentru boala Alzheimer (AD), pierderea neuronilor colinergici se constată încă din stadiul incipient al AD și este una dintre caracteristicile patologice ale AD. Acumularea plăcilor senile prin depozitele de beta amiloid și încurcăturile neurofibrilare prin agregarea proteinei tau sunt, de
30 asemenea, caracteristici patologice ale AD, și în special încurcăturile neurofibrilare sunt cunoscute că cresc odată cu progresul stării bolii și provoacă moartea neuronală. Încurcăturile neurofibrilare se găsesc în nucleul bazal al lui Meynert și în cortexul entorinal din stadiul incipient al AD. Printre aceștia, se raportează că pierderea neuronilor colinergici în nucleul bazal al lui Meynert prin agregarea proteinei tau se găsește într-un stadiu incipient și că există o corelație între pierderea și o scădere a scorului funcției
35 cognitive (literatura non-brevet 16 și 17). Similar cu AD, hiperfosforilarea și acumularea anormală a proteinei tau se găsesc la șoarecii modificați genetic care au o mutație P301S care a fost găsită în demența frontotemporală familială (șoarecii transgenici P301S tau umani). În consecință, se formează încurcături neurofibrilare, o caracteristică patologică a AD (literatura non-brevet 18) și aduc disfuncție cognitivă prin afectarea sinaptică, neurodegenerare și pierderea neuronilor. Pe baza acestor descoperiri, șoarecii transgenici P301S tau umani sunt utilizați pe scară largă ca modele animale asemănătoare AD (literatura
40 non-brevet 19-22), iar îmbunătățirea declinului cognitiv și suprimarea progresului stării bolii în boala Alzheimer poate fi de așteptat prin suprimarea modificărilor patologice asemănătoare AD la șoarecii transgenici P301S tau umani.

Mai mult, analize multiple folosind șoarecii modificați genetic și modele animale de tulburări
45 sugerează că deficitul de transport axonal este una dintre cauzele pierderii neuronilor colinergici (literatura non-brevet 23-25). Printre aceștia, axonul neuronilor colinergici care se proiectează din zona septală către hipocamp este afectat într-un model lezionat de fimbria-fornix și afectarea transportului retrograd al moleculelor implicate cu supraviețuirea și funcționarea aduce pierderea neuronilor (literatura non-brevet 26-28). Deteriorarea transportului retrograd se găsește și la șoarecii modificați genetic (literatura non-brevet 23 și 24) și pierderea neuronilor colinergici prin leziunea fimbrii-fornix reflectă un
50 aspect al stării bolii. În consecință, îmbunătățirea declinului cognitiv și suprimarea progresului stării bolii în boala Alzheimer pot fi așteptate prin suprimarea sau îmbunătățirea pierderii neuronilor colinergici în acest model de tulburare.

Demența cu corpi Lewy (DLB) și boala Parkinson (PD) sunt tulburări neurodegenerative
55 progresive în care corpii de incluziune anormali (corpi Lewy) alcătuiți în principal din alfa sinucleină apar în neuroni și aduc degenerarea și pierderea neuronilor. Disfuncția cognitivă se dezvoltă dacă corpii Lewy sunt distribuiți în principal în cortexul cerebral, iar parkinsonismul se dezvoltă dacă corpii Lewy sunt distribuiți în principal în trunchiul cerebral. În plus, se dezvoltă și simptome psihiatrice precum halucinațiile vizuale, halucinațiile și iluziile, tulburările de somn și simptomele autonome. Diagnosticul este demența cu corpi Lewy dacă demența apare înainte, sau în decurs de un an de la debutul
60

parkinsonismului și diagnosticul este boala Parkinson cu demență (PDD) dacă parkinsonismul a apărut înainte de un an sau mai mult de la debutul demenței. Demența cu corpi Lewy, boala Parkinson cu demență și boala Parkinson sunt aceleași boli patologice și sunt denumite în mod cuprinzător boala cu corpi Lewy (LBD), deși acestea sunt diferite în ceea ce privește disfuncția cognitivă și ordinea aspectului și gradul de parkinsonism. În demența cu corpi Lewy și boala Parkinson cu demență, în mod similar cu boala Alzheimer, neuronii nucleului bazal al lui Meynert, nucleii de origine ai nervului colinergic, sunt degenerați și pierduți și se raportează că tulburarea neuronilor colinergici severă apare în hipocamp și cortex (literatura non-brevet 29-31). Mai mult, există o corelație între progresul tulburării neuronului colinergic și disfuncția cognitivă (literatura non-brevet 29), iar inhibitorii de colinesterază s-a demonstrat că îmbunătățesc funcția cognitivă. Pe baza acestor constatări, funcția cognitivă se îmbunătățește prin îmbunătățirea funcției neuronilor colinergici și, în mod similar cu boala Alzheimer, îmbunătățirea declinului cognitiv și suprimarea stării bolii progresul în demența cu corpi Lewy și boala Parkinson cu demență poate fi de așteptat prin suprimarea sau îmbunătățirea pierderii neuronilor colinergici în mai multe modele de tulburare.

Prin urmare, pe baza acestor constatări, se poate aștepta o îmbunătățire a performanței cognitive reduse cauzată de disfuncția neuronilor colinergici prin obținerea activării funcționale și/sau a efectului neuroprotector asupra neuronilor colinergici în practica clinică.

În plus față de bolile de mai sus, exemplele de boli pentru care a fost raportată asociere între scăderea funcției cognitive și disfuncția neuronilor colinergici includ coreea Huntington, sindromul Down, scleroza laterală amiotrofică (ALS), depresia majoră, schizofrenia și altele asemenea.

Lista citațiilor

Literatură non-brevet

- [Literatură non-brevet 1] Everitt BJ ș.a. "Central cholinergic systems and cognition." *Annu. Rev. Psychol.* 48 (1997) 649-684.
- [Literatură non-brevet 2] Gullledge AT. ș.a. "Cholinergic inhibition of neocortical pyramidal neurons." *J. Neurosci.* 25 (2005) 10308-20.
- [Literatură non-brevet 3] Daniel Dautan D. ș.a. "A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem." *J. Neurosci.* 34 (2014) 4509-18.
- [Literatură non-brevet 4] M Steriade M. ș.a. "Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems." *J. Neurosci.* 10 (1990) 2541-59.
- [Literatură non-brevet 5] Fischer W. ș.a. "Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rats during aging." *Neurobiol. Aging* 13 (1992) 9-23.
- [Literatură non-brevet 6] Leanza G.ș.a. "Selective lesioning of the basal forebrain cholinergic system by intraventricular 192 IgG-saporin: behavioural, biochemical and stereological studies in the rat." *Eur. J. Neurosci.* 7 (1995) 329-43.
- [Literatură non-brevet 7] Leanza G. ș.a. "Selective immunolesioning of the basal forebrain cholinergic system disrupts short-term memory in rats." *Eur. J. Neurosci.* 8 (1996) 1535-44.
- [Literatură non-brevet 8] Ogura H. ș.a. "Donepezil, a centrally acting acetylcholinesterase inhibitor, alleviates learning deficits in hypocholinergic models in rats." *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 22 (2000) 89-95.
- [Literatură non-brevet 9] Spowart-Manning L. ș.a. "Spatial discrimination deficits by excitotoxic lesions in the Morris water escape task." *Behav Brain Res.* 156 (2005) 269-76.
- [Literatură non-brevet 10] Bruce AP. ș.a. "Choline acetyltransferase activity and cognitive domain score of Alzheimer's patients." *Neurobiol. Aging.* 21 (2000) 11-17
- [Literatură non-brevet 11] Rogers SL. ș.a. "The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group." *Dementia.* 7 (1996) 293-303
- [Literatură non-brevet 12] Mori E. ș.a. "Donepezil for dementia with Lewy bodies: a randomized, placebo-controlled trial." *Ann Neurol.* 72 (2012) 41-52
- [Literatură non-brevet 13] Mufson EJ. ș.a. "Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction." *J. Chem. Neuroanat.* 26 (2003) 233-242
- [Literatură non-brevet 14] Mufson EJ. ș.a. "Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implication." *Expert. Rev. Neurother.* 8 (2008) 1703-1718
- [Literatură non-brevet 15] Schliebs R. ș.a. "The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease." *J. Neural. Transm* 113 (2006) 1625-1644
- [Literatură non-brevet 16] Vana L ș.a. "Progression of tau pathology in cholinergic Basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *Am J Pathol.* 179 (2011) 2533-2550.
- [Literatură non-brevet 17] Gómez-Isla T ș.a. "Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." *Ann Neurol.* 41 (1997) 17-24.

[Literatură non-brevet 18] Lee VM ș.a. "Neurodegenerative tauopathies." Annu. Rev. Neurosci. 24 (2001) 1121-1159.

[Literatură non-brevet 19] Allen B ș.a. "Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein." J. Neurosci. 22 (2002) 9340-9351.

5 [Literatură non-brevet 20] Xu H ș.a. "Memory deficits correlate with tau and spine pathology in P301S MAPT transgenic mice." Neuropathol. Appl. Neurobiol. 40 (2014) 833-43.

[Literatură non-brevet 21] Yoshiyama Y ș.a. "Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model." Neuron. 53 (2007) 337-351.

10 [Literatură non-brevet 22] Hoffmann NA ș.a. "Impaired plasticity of cortical dendritic spines in P301S tau transgenic mice." Acta Neuropathol Commun. 1 (2013) 82.

[Literatură non-brevet 23] Salehi A ș.a. "Increased App Expression in a Mouse Model of Down's Syndrome Disrupts NGF Transport and Causes Cholinergic Neuron Degeneration" Neuron 51 (2006) 29-42.

15 [Literatură non-brevet 24] Onishi T ș.a. "Early-onset cognitive deficits and axonal transport dysfunction in P301S mutant tau transgenic mice" Neuroscience Research 80 (2014) 76-85.

[Literatură non-brevet 25] Xu W ș.a. "Amyloid precursor protein-mediated endocytic pathway disruption induces axonal dysfunction and neurodegeneration" J. Clin. Invest. 126 (2016) 1815-33.

20 [Literatură non-brevet 26] Lapchak PA ș.a. "Effect of recombinant human nerve growth factor on presynaptic cholinergic function in rat hippocampal slices following partial septohippocampal lesions: measures of [3H]acetylcholine synthesis, [3H]acetylcholine release and choline acetyltransferase activity" Neuroscience 42 (1991) 639-49.

[Literatură non-brevet 27] Gilmor ML ș.a. "Coordinate expression of the vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase following septohippocampal pathway lesions" J. Neurochem. 71 (1998) 2411-20.

25 [Literatură non-brevet 28] Gu H ș.a. "Recombinant human NGF-loaded microspheres promote survival of basal forebrain cholinergic neurons and improve memory impairments of spatial learning in the rat model of Alzheimer's disease with fimbria-fornix lesion" Neurosci. Lett. 453 (2009) 204-9.

[Literatură non-brevet 29] Shimada, H. ș.a., "Mapping of brain acetylcholinesterase alterations in Lewy body disease by PET" Neurology, vol.73, pp. 273-278, 2009.

30 [Literatură non-brevet 30] Tiraboschi, P. ș.a., "Cholinergic dysfunction in diseases with Lewy bodies" Neurology 54 (2000) 407-411.

[Literatură non-brevet 31] Perry, E. K. et. al., "Neocortical cholinergic activities differentiate Lewy body dementia from classical Alzheimer's disease", NeuroReport, vol.5, pp.747-749 (1994).

35 Rezumatul invenției

Problema tehnică

Un obiect al prezentei invenții este acela de a furniza un compus sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia care are activarea neuronilor colinergici și/sau efect neuroprotector și are o potențială utilizare a unui agent terapeutic pentru boala Alzheimer, demența cu corpi Lewy și boala Parkinson cu demența.

40

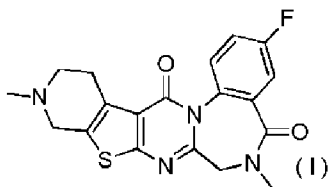
Soluția problemei

Ca rezultat al unor studii extinse pentru a rezolva problemele de mai sus, inventatorii prezentei au descoperit un compus pentaciclic sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestuia care are activarea neuronilor colinergici și/sau efect neuroprotector.

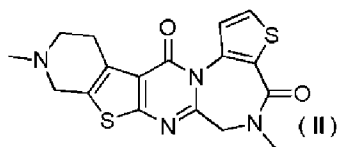
45 Aceasta înseamnă că, prezenta invenție se referă la următoarele <1> până la <26>.

<1> Un compus selectat din grupul care constă din:

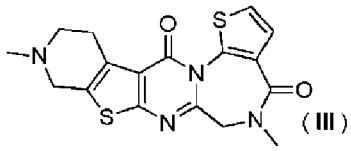
3-fluoro-6,11-dimetil-6,7,10,11,12,13-hexahidrobencof[pirido[4",3":4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-5,14-dionă:



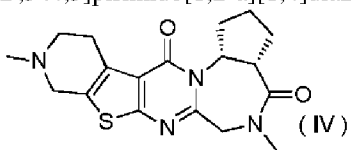
50 5,10-dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4",3":4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a]tieno[2,3-f][1,4]diazepin-4,13-dionă:



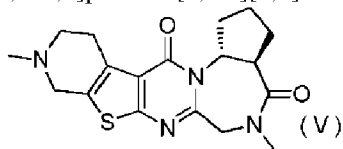
5,10-dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a]tieno[3,2-f][1,4]diazepin-4,13-dionă:



5 (3aS,14aR)-5,10-dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionă:



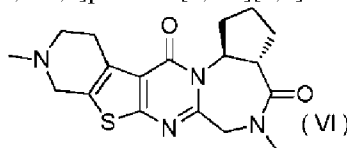
(3aR,14aR)-5,10-dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionă:



10

și

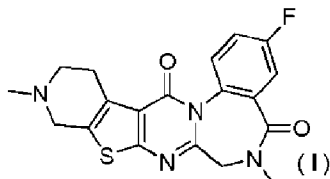
(3aS,14aS)-5,10-dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionă:



15

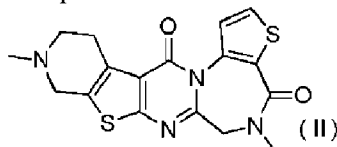
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

<2> 3-Fluoro-6,11-dimetil-6,7,10,11,12,13-hexahidrobencof]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-5,14-dionă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia:

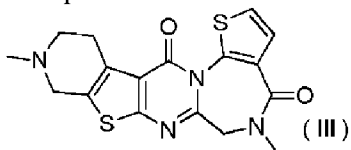


20

<3> 5,10-Dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a]tieno[2,3-f][1,4]diazepin-4,13-dionă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia:

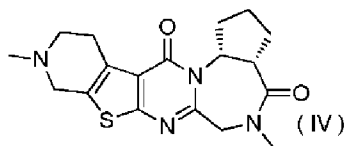


<4> 5,10-Dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a]tieno[3,2-f][1,4]diazepin-4,13-dionă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia:

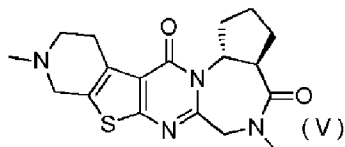


25

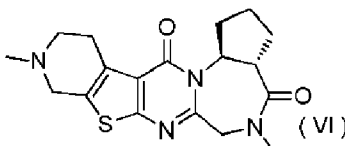
<5> (3aS,14aR)-5,10-Dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia:



5 <6> (3aR,14aR)-5,10-Dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia:



10 <7> (3aS,14aS)-5,10-Dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia:



<8> O compoziție farmaceutică care cuprinde compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia conform cu oricare dintre <1> până la <7> și unul sau mai mulți aditivi acceptabili farmaceutic.

15 <9> Un agent terapeutic pentru utilizare în tratamentul bolii Alzheimer care cuprinde compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia conform cu oricare dintre <1> până la <7>.

<10> Compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia conform cu oricare dintre <1> până la <7> pentru utilizare în tratamentul bolii Alzheimer.

20 <11> Un agent terapeutic pentru utilizare în tratamentul demenței cu corpi Lewy care cuprinde compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia conform cu oricare dintre <1> până la <7>.

<12> Compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia conform cu oricare dintre <1> până la <7> pentru utilizare în tratamentul demenței cu corpi Lewy.

<13> Un agent terapeutic pentru utilizare în tratamentul bolii Parkinson cu demență care cuprinde compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia conform cu oricare dintre <1> până la <7>.

25 <14> Compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia conform cu oricare dintre <1> până la <7> pentru utilizare în tratamentul bolii Parkinson cu demență.

Efectele avantajoase ale invenției

30 Compușii pentaciclici reprezentați prin formulele (I) până la (VI) (denumiți în continuare "compușii (I) până la (VI)", sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora conform prezentei invenții au activarea neuronilor și/sau efectul neuroprotector, așa cum sunt prezentate în datele de activitate din exemplele de teste farmacologice furnizate în cele ce urmează. Compușii (I) până la (VI) ai prezentei invenții conduc la o îmbunătățire a performanței cognitive datorită activării neuronilor și/sau efectului neuroprotector și astfel au o potențială utilizare ca agenți terapeutici pentru boala Alzheimer, demența cu corpi Lewy și boala Parkinson cu demență.

35 Descrierea exemplurilor de realizare

În continuare, va fi descris în detaliu conținutul prezentei invenții.

40 În prezenta descriere, formulele structurale ale compușilor pot reprezenta izomeri specifici pentru comoditate; totuși, prezenta invenție poate include izomeri de rotație și tautomeri, precum și amestecuri izomerice, nu se limitează la formulele descrise pentru comoditate și poate fi oricare dintre izomeri, sau un amestec care conține izomerii în orice proporție.

Mai mult, pot exista și cristale polimorfe; totuși, prezenta invenție nu este, de asemenea, limitată la niciuna dintre ele și poate fi o formă cristalină unică, sau un amestec al acestora. Mai mult, prezenta invenție include, de asemenea, forme amorfe, iar compușii conform prezentei invenții includ anhidrați și solvați (în special hidrați).

45 Prezenta invenție include, de asemenea, compuși marcați cu izotopi ai compușilor (I) până la (VI). Compușii marcați cu izotopi sunt aceiași cu compușii (I) până la (VI), cu excepția faptului că unul sau mai mulți atomi sunt înlocuiți cu unul sau mai mulți atomi care au o masă atomică sau un număr de masă diferit de cel găsit în general în natură. Exemple de izotopi care pot fi încorporați în compușii

prezentei invenții includ izotopi de hidrogen, carbon, azot, oxigen, fluor, fosfor, sulf, iod și clor și includ în mod specific ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I și alții asemenea.

Compușii marcați cu izotopi de mai sus, de exemplu, compuși în care sunt încorporați izotopi radioactivi, cum ar fi, ^3H și/sau ^{14}C , sunt utili pentru analiza distribuției tisulare a medicamentelor și/sau substraturilor. ^3H și ^{14}C sunt considerați a fi utili din cauza ușurinței preparării și detectării acestora. Izotopi ^{11}C și ^{18}F sunt considerați a fi utili pentru PET (tomografie cu emisie de pozitroni), izotopul ^{125}I este considerat a fi util pentru SPECT (tomografia computerizată cu emisie de foton unic) și toți sunt utili pentru imagistica cerebrală. Înlocuirea cu izotopi mai grei, cum ar fi, ^2H , are ca rezultat unele tipuri de avantaje terapeutice, inclusiv o creștere a perioadei de înjumătățire in vivo, sau o scădere a dozei necesare datorită stabilității metabolice mai mari și, prin urmare, este considerat a fi util în anumite situații. Compușii marcați cu izotopii de mai sus pot fi preparați în mod similar prin efectuarea procedurilor dezvăluite în exemplele următoare utilizând reactivi ușor utilizabili marcați cu izotopi în loc de reactivi nemarcați cu izotopi.

"Sărurile acceptabile farmaceutic" din prezenta descriere nu sunt limitate în mod special atâta timp cât sunt săruri formate cu compușii conform prezentei invenții, iar exemplele specifice includ săruri de adiție acidă, cum ar fi, săruri de acid anorganic, săruri de acid organic și săruri acide ale aminoacizilor.

"Sarea acceptabilă farmaceutic" din prezenta descriere este orice sare formată într-un raport adecvat, cu excepția cazului în care există o descriere limitativă în mod special și numărul de molecule de acid per moleculă de compus din sarea formată nu este limitat în mod special; cu toate acestea, este preferabil ca numărul de molecule de acid per molecula de compus să fie de aproximativ 0,5 până la aproximativ 2 și este mai preferabil ca numărul de molecule de acid per molecula de compus să fie aproximativ 0,5, aproximativ 1 sau aproximativ 2.

Exemplele preferate de săruri ale acidului anorganic includ clorhidrat, bromhidrat, sulfat, nitrat și fosfat; și exemplele preferate de săruri ale acidului organic includ acetat, succinat, fumarat, maleat, tartrat, citrat, lactat, stearat, benzoat, metansulfonat, p-toluensulfonat și benzensulfonat.

Exemplele preferate de săruri acide ale aminoacizilor includ aspartatul și glutamatul.

Când compușii (I) până la (VI) conform prezentei invenții sunt obținuți într-o formă liberă, ei pot fi transformați în săruri care pot fi formate de compușii (I) până la (VI) sau hidrați ai acestora conform unei metode convenționale.

Când compușii (I) până la (VI) conform prezentei invenții sunt obținuți ca săruri ale compușilor (I) până la (VI) sau hidrați ai compușilor (I) până la (VI), ei pot fi transformați în forme libere de compușii (I) până la (VI) conform unei metode convenționale.

Mai mult decât atât, diferiți izomeri (de ex., izomeri optici, izomeri rotaționali, stereoizomeri, etc.) obținuți din compușii (I) până la (VI) conform prezentei invenții pot fi purificați și izolați prin mijloace generale de separare, cum ar fi, recristalizare, metoda sării diastereomerice, metoda disocierii enzimatică și diverse tehnici cromatografice (de ex., cromatografia în strat subțire, cromatografia pe coloană, gaz-cromatografia, etc.).

[Preparare farmaceutică]

Compoziția farmaceutică conform prezentei invenții poate fi produsă prin amestecarea aditivilor acceptabili farmaceutic cu un compus selectat din grupul de compuși (I) până la (VI), sau dintre sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora. Compoziția farmaceutică conform prezentei invenții poate fi produsă printr-o metodă cunoscută, de exemplu, metoda descrisă în General Rules for Preparations of The Japanese Pharmacopoeia Ediția a șaptesprezecea.

Compoziția farmaceutică conform prezentei invenții poate fi administrată în mod adecvat unui pacient, în funcție de forma de dozare a acesteia.

Doza de compuși (I) până la (VI) conform prezentei invenții sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora variază în funcție de severitatea simptomelor, vârstă, sex, greutate corporală, formă de dozare, tip de sare, tip specific de boală și alte condiții; totuși, în general, doza pentru un adult pe zi prin administrare orală este de aproximativ 30 μg până la 10 g, de preferință 100 μg până la 5 g, și mai preferabil 100 μg până la 1 g; doza pentru un adult pe zi prin administrare prin injecție este de aproximativ 30 μg până la 1 g, de preferință 100 μg la 500 mg, și mai preferabil 100 μg până la 300 mg; iar doza de mai sus se administrează o dată sau de mai multe ori.

Compușii prezentei invenții pot fi utilizați ca probe chimice pentru captarea proteinelor țintă ale compușilor bioactivi cu greutate moleculară mică. Adică, compușii prezentei invenții pot fi transformați în probe de cromatografie de afinitate, probe de fotoafinitate, etc., prin introducerea de grupări de marcare, linkerii sau altele asemenea într-un fragment diferit de un fragment structural esențial pentru dezvoltarea activității compușilor folosind o metodă descrisă, de exemplu, în J. Mass Spectrum. Soc. Jpn. Vol. 51, No. 5, 2003, pp. 492-498, WO2007/139149, sau altele asemănătoare.

Exemple de grupări de marcare, linkerii, etc., utilizate în probele chimice includ grupările prezentate în grupul format din următoarele (1) până la (5):

- (1) grupări de marcarea a proteinelor, cum ar fi, grupări de marcarea a fotoafinității (de ex., o grupare benzoil, o grupare benzofenonă, o grupare azidă, o grupare carbonilazidă, o grupare diaziridină, o grupare enonă, o grupare diazo, o grupare nitro, etc.) și grupări de afinitate chimică (de ex., o grupare cetona în care atomul de carbon alfa este înlocuit cu un atom de halogen, o grupare carbamoil, o grupare ester, o grupare alchilio, un acceptor Michael, cum ar fi, cetona α,β -nesaturată, sau ester și o grupare oxiran);
- (2) linkeri scindabili, cum ar fi, -S-S-, -O-Si-O-, monozaharide (o grupare glucoză, o grupare galactoză, etc.), sau dizaharide (lactoză, etc.); și linkeri oligopeptidici scindabili prin reacția enzimatică;
- (3) grupări fishing tag, cum ar fi, biotina și o grupare 3-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4H-3a,4a-diaza-4-bora-s-indacen-3-il)propionil;
- (4) grupări de marcarea radioactive, cum ar fi, ^{125}I , ^{32}P , ^3H , and ^{14}C ; grupări de marcarea fluorescente, cum ar fi, fluoresceină, rodamină, dansil, umbeliferonă, 7-nitrofurazanil și o grupare 3-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4H-3a,4a-diaza-4-bora-s-indacen-3-il)propionil; grupări chemiluminiscente, cum ar fi, luciferină și luminol; și markeri capabili să detecteze ioni de metale grele, cum ar fi, ionii metalelor din seria lantanide și ionii de radiu; sau
- (5) grupări care urmează să fie atașate la purtători solizi, cum ar fi, granule de sticlă, straturi de sticlă, plăci de microtitrare, granule de agaroză, straturi de agaroză, granule de polistiren, straturi de polistiren, granule de nailon și straturi de nailon.

Probele obținute prin introducerea grupărilor de marcarea, etc., selectate dintre grupările care constau din cele menționate anterior (1) până la (5) în compuşii prezentei invenții prin metodele descrise în documentele menționate anterior sau asemănător pot fi utilizate ca probe chimice pentru identificarea proteinelor marcate utile pentru a căuta noi medicamente proiectate ca ținte, etc.

Exemple

Compușii (I) până la (VI) ai prezentei invenții pot fi produși, de exemplu, prin metodele descrise în următoarele exemple, iar efectele compușilor pot fi confirmate prin metodele descrise în următoarele Exemple de Testare. Totuși, acestea sunt doar exemple, iar prezenta invenție nu este limitată la exemplele specifice care urmează în orice caz și poate fi modificată într-un interval care nu se îndepărtează de scopul prezentei invenții așa cum s-a definit în revendicările anexate.

Compușii descriși cu nume de document, etc., indică faptul că compușii au fost produși conform documentelor, etc.

Mai mult, abrevierile utilizate în prezenta descriere sunt binecunoscute și comune unei persoane de specialitate în domeniu. În prezenta descriere, sunt utilizate următoarele abrevieri.

- DCE: 1,2-dicloroetan
 DCM: diclorometan
 DIPEA: N,N-diizopropiletilamină
 DMT-MM: clorură de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfoliniu
 DMSO: dimetilsulfoxid
 EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidă clorhidrat
 HATU: hexafluorofosfat de 0-(7-azabenzotiazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluroniu
 HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
 n-: normal
 NMM: N-metilmorfolină
 t-: terțiar
 TBD: 1,3,4,6,7,8-hexahidro-2H-pirimido[1,2-a]pirimidină
 TBME: butil metil eter terțiar
 TEA: trietilamină
 THF: tetrahidrofuran
 ^1H -NMR: spectrometrie de rezonanță magnetică nucleară de protoni
 MS: spectrometrie de masă
 HPLC: cromatografie lichidă de înaltă performanță

Termenul "temperatura camerei" din următoarele Exemple și Exemple de Producție se referă în general la aproximativ 10°C până la aproximativ 35°C . % se referă la procente în greutate, dacă nu se specifică altfel.

Deplasările chimice ale spectrelor de rezonanță magnetică nucleară de protoni sunt notate în unități δ (ppm) față de tetrametilsilan, iar constantele de cuplare sunt înregistrate în Hertz (Hz). Modelele sunt desemnate ca s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: cvartet, m: multiplu, br: larg, br.s: singlet larg.

Pentru rezoluția optică a compusului, s-a utilizat Parallax Flex (TM) produs de Biotage (culoara: una dintre CHIRALPAK (R) AD-H, IA, IB și IC produse de DAICEL; și CHIRALCEL (R) OD-H și OJ-H produsă de DAICEL).

În reacțiile care utilizează un reactor cu microunde în Exemplele de Producție, Exemplele de Referință și Exemple, s-a utilizat Inițiator (TM), sau Inițiator+ (TM) produs de Biotage.

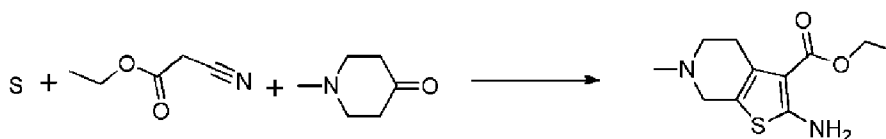
În ceea ce privește cromatografia, ca silicagel, s-a utilizat Silica Gel60 produs de Merck (70-230 mesh, sau 230-400 mesh ASTM) sau PSQ60B produs de Fuji Silysia Chemical Ltd., sau o coloană pre-umplută {coloana: coloană Hi-Flash (TM) (Silicagel) produsă de YAMAZEN, dimensiune: una dintre S (16 x 60 mm), M (20 x 75 mm), L (26 x 100 mm), 2L (26 x 150 mm) și 3L (46 x 130 mm); sau cartuș Biotage (TM) SNAP Ultra Silica Cartridge produs de Biotage, dimensiune: s-a utilizat unul dintre 10 g, 25 g și 50 g}.

Ca silicagel NH, s-a utilizat CHROMATOREX NH-DM2035 produs de Fuji Silysia Chemical Ltd., sau o coloană pre-umplută {coloana: coloană Hi-Flash (TM) (Amino) produsă YAMAZEN, dimensiune: una dintre S (16 x 60 mm), M (20 x 75 mm), L (26 x 100 mm), 2L (26 x 150 mm) și 3L (46 x 130 mm); sau Presep (TM) (Luer Lock) NH2(HC) produsă de Wako Pure Chemical Industries, Ltd., dimensiune: una de tip M (14 g/25 mL), tip L (34 g/70 mL), tip 2L (50 g/100 ml) și tipul 3L (110 g/200 ml).

Ca denumiri ale compușilor prezentați mai jos, cu excepția reactivilor utilizați în general, au fost utilizate cele prezentate în "E-Notebook" Versiunea 12 (PerkinElmer).

Exemplu de Producție 1

Sinteza etil 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-3-carboxilatului



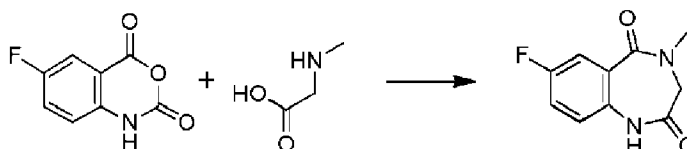
TEA (61,6 mL, 442 mmol) s-a adăugat la temperatura camerei la un amestec de 1-metil-4-piperidonă (CAS No. 1445-73-4) (51,5 mL, 442 mmol), etil cianoacetat (CAS No. 105-56-6) (47,2 mL, 442 mmol), sulf (CAS No. 7704-34-9) (14,2 g, 442 mmol), și etanol (800 mL). Amestecul de reacție s-a agitat la 40°C timp de 15 ore, și apoi s-a concentrat sub presiune redusă. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe coloană (NH gel de silice, acetat de etil). Reziduul concentrat obținut s-a triturat cu acetat de etil. Precipitatele s-au colectat prin filtrare, s-au spălat cu acetat de etil, și s-au uscat sub presiune redusă pentru a obține compusul din titlu (58,4 g).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,33 (t, J = 7,0 Hz, 3H), 2,44 (s, 3H), 2,62-2,70 (m, 2H), 2,79-2,88 (m, 2H), 3,37 (t, J = 2,0 Hz, 2H), 4,26 (q, J = 7,3 Hz, 2H), 5,97 (s l, 2H).

MS (ESI) m/z: 241 [M+H]⁺

Exemplu de Producție 2

Sinteza 7-fluoro-4-metil-3,4-dihidro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dionei



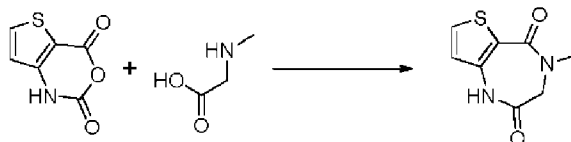
Sarcozina (CAS No. 107-97-1) (5,16 g, 58,0 mmol) s-a adăugat la temperatura camerei la o soluție de 6-fluoro-1H-benzo[d][1,3]oxazin-2,4-dionă (CAS No. 321-69-7) (10,0 g, 55,2 mmol) în piridină (100 mL), și amestecul de reacție s-a agitat la 100°C timp de 8 ore. Amestecul de reacție s-a răcit la temperatura camerei. Precipitatele s-au colectat prin filtrare și s-au spălat cu dietil eter. Solidul obținut s-a uscat sub presiune redusă pentru a obține compusul din titlu (5,34 g).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,30 (s, 3H), 3,90 (s, 2H), 6,97 (dd, J = 8,8, 4,5 Hz, 1H), 7,20 (ddd, J = 8,6, 7,6, 2,9 Hz, 1H), 7,67 (dd, J = 9,0, 3,1 Hz, 1H), 7,99 (s l, 1H).

MS (ESI) m/z: 209 [M+H]⁺

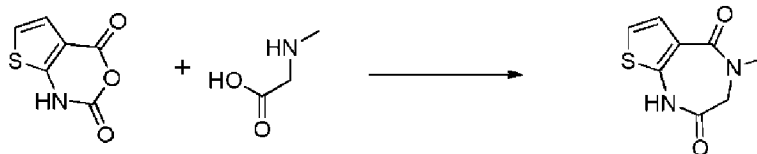
Exemplu de Producție 3

Sinteza 4-metil-3,4-dihidro-1H-tieno[3,2-e][1,4]diazepin-2,5-dionei



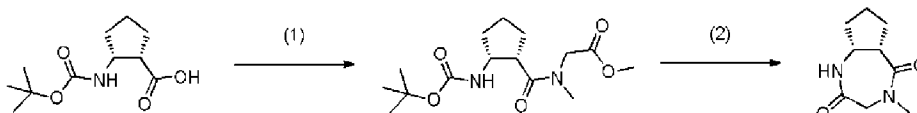
Un amestec de 1H,2H,4H-tieno[3,2-d][1,3]oxazin-2,4-dionă (CAS No. 78756-28-2) (300 mg, 1,77 mmol), sarcosină (395 mg, 4,43 mmol), și apă (10 mL) s-a încălzit sub reflux timp de 2 ore. Amestecul de reacție s-a răcit la 0°C. Precipitatul s-a colectat prin filtrare, și s-a spălat secvențial cu apă și dietil eter. Solidul obținut s-a uscat sub presiune redusă pentru a obține compusul din titlu (165 mg).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,24 (s, 3H), 4,00 (s, 2H), 6,72 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 7,52 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 7,96 (s l, 1H).

MS (ESI) m/z: 197 [M+H]⁺**Exemplu de Producție 4****Sinteza 4-metil-3,4-dihidro-1H-tieno[2,3-e][1,4]diazepin-2,5-dionei**

5 1H,2H,4H-tieno[2,3-d][1,3]oxazine-2,4-diona (CAS No. 103979-54-0) (600 mg, 3,55 mmol) s-a adăugat la o soluție de sarcosină (790 mg, 8,87 mmol) în apă (12 mL). Amestecul de reacție s-a încălzit sub reflux timp de 1,5 ore. Amestecul de reacție s-a răcit la temperatura camerei. La amestecul de reacție s-a adăugat cloroform, și stratul organic s-a separat. Stratul apos s-a extras cu cloroform (de două ori) și acetat de etil (de 3 ori). Stratul organic combinat s-a uscat peste sulfat de sodiu anhidru și s-a filtrat, și filtratul s-a concentrat sub presiune redusă. Solidul obținut s-a uscat pentru a obține compusul din titlu (430 mg).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,23 (s, 3H), 3,99 (s, 2H), 6,90 (d, J = 5,9 Hz, 1H), 7,29 (d, J = 5,7 Hz, 1H), 8,39 (s 1, 1H).

MS (ESI) m/z: 197 [M+H]⁺**Exemplu de Producție 5****Sinteza (5aS,8aR)-4-metiloctahidrociclopenta[e][1,4]diazepin-2,5-dionei**

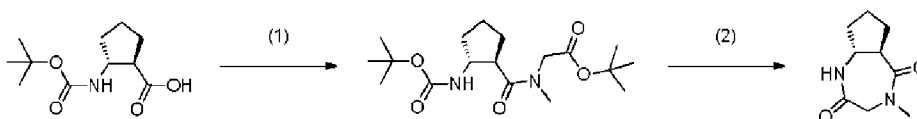
20 **(1) Sinteza metil 2-((1S,2R)-2-((t-butoxycarbonyl)amino)-N-metilciclopentancarboxamid)acetatului**

TEA (22,2 mL, 159 mmol), HOBT/monohidrat (11,7 g, 76,3 mmol), și EDC (14,6 g, 76,3 mmol) s-au adăugat secvențial sub răcire cu gheață la un amestec de acid (1S,2R)-2-((t-butoxycarbonyl)amino)ciclopentan-1-carboxilic (CAS No. 137170-89-9) (14,6 g, 63,6 mmol), sarcosină metil ester clorhidrat (CAS No. 13515-93-0) (10,7 g, 76,3 mmol), și THF (150 mL). După ce amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 15 ore, s-au adăugat acetat de etil și apă, și stratul organic s-a separat. Stratul apos s-a extras cu acetat de etil. Stratul organic combinat s-a spălat secvențial cu o soluție apoasă, saturată de bicarbonat de sodiu și o soluție saturată de clorură de sodiu, s-a uscat peste sulfat de sodiu anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat sub presiune redusă. Reziduu obținut s-a purificat de două ori prin cromatografie pe coloană (gel de silice, 25-30% acetat de etil/n-heptan) pentru a obține compusul din titlu (16,1 g).

MS (ESI) m/z: 337 [M+Na]⁺**(2) Sinteza (5aS,8aR)-4-metiloctahidrociclopenta[e][1,4]diazepin-2,5-dionei**

35 O soluție de acid clorhidric 4 N/1,4-dioxan (160 mL, 640 mmol) s-a adăugat sub răcire cu gheață la metil 2-((1S,2R)-2-((t-butoxycarbonyl)amino)-N-metilciclopentancarboxamid)acetat (16,1 g, 51,3 mmol). Amestecul de reacție s-a agitat la aceeași temperatură timp de 30 minute, apoi s-a agitat la temperatura camerei timp de 45 minute, și s-a concentrat sub presiune redusă. S-a adăugat TBD (8,57 g, 61,6 mmol) sub răcire cu apă la o soluție de reziduu în metanol (130 ml). Amestecul de reacție s-a agitat sub răcire cu apă timp de 3 ore, și apoi s-a răcit la 0°C. Solidul care a rezultat s-a colectat prin filtrare, s-a spălat de 3 ori cu metanol răcit cu gheață, și s-a uscat sub presiune redusă pentru a obține compusul din titlu (5,22 g).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,41-1,59 (m, 2H), 1,78-1,98 (m, 2H), 2,00-2,15 (m, 1H), 2,36-2,53 (m, 1H), 3,08 (s, 3H), 3,18-3,32 (m, 1H), 3,49 (dd, J = 15,5, 1,7 Hz, 1H), 3,91-4,04 (m, 1H), 4,51 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 5,54 (s 1, 1H).

MS (ESI) m/z: 183 [M+H]⁺**Exemplu de Producție 6****Sinteza (5aR,8aR)-4-metiloctahidrociclopenta[e][1,4]diazepin-2,5-dionei**

50 **(1) Sinteza t-butil 2-((1R,2R)-2-((t-butoxycarbonyl)amino)-N-metilciclopentancarboxamid)acetatului**

DIPEA (1,81 mL, 10,5 mmol) și HATU (1,99 g, 5,23 mmol) s-au adăugat secvențial la temperatura camerei la un amestec de acid (1R,2R)-t-butoxicarbonil-2-aminociclopentancarboxilic (CAS No. 245115-25-7) (1,00 g, 4,36 mmol), sarcozină t-butil ester clorhidrat (CAS No. 136088-69-2) (872 mg, 4,80 mmol), și DCM (10 mL). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 1 oră și apoi s-a purificat direct prin cromatografie pe coloană (gel de silice, 30-50% acetat de etil/n-heptan) pentru a obține compusul din titlu (1,61 g).

MS (ESI) m/z: 357 [M+H]⁺

(2) Sinteza (5aR,8aR)-4-metiloctahidrociclopenta[e][1,4]diazepin-2,5-dionei

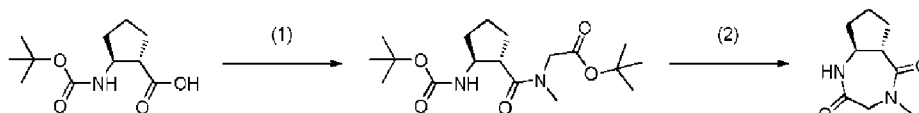
O soluție de acid clorhidric 4 N/1,4-dioxan (16 mL, 64 mmol) s-a adăugat la temperatura camerei la t-butil 2-((1R,2R)-2-((t-butoxicarbonil)amino)-N-metilciclopentancarboxamid)acetat (1,61 g, 4,52 mmol), și amestecul s-a agitat timp de 20 ore. Amestecul de reacție s-a concentrat sub presiune redusă. La reziduu s-au adăugat secvențial bicarbonat de sodiu (0,911 g, 10,8 mmol), metanol (24 mL), NMM (0,099 mL, 0,90 mmol), și DMT-MM (12,3% H₂O, 1,80 g, 5,70 mmol) la temperatura camerei, și amestecul s-a agitat timp de 20 ore. Amestecul de reacție s-a concentrat sub presiune redusă, și reziduu s-a spălat cu DCM. Lichidul spălat s-a concentrat sub presiune redusă, și reziduu s-a purificat prin cromatografie pe coloană (gel de silice, 5-20% metanol/acetat de etil) pentru a obține compusul din titlu (745 mg).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,56-1,88 (m, 3H), 1,91-2,02 (m, 1H), 2,13-2,23 (m, 1H), 2,26-2,39 (m, 1H), 3,07 (s, 3H), 3,08-3,16 (m, 1H), 3,51-3,62 (m, 1H), 3,79 (d, J = 18,0 Hz, 1H), 4,58 (d, J = 18,0 Hz, 1H), 6,76 (s l, 1H).

MS (ESI) m/z: 183 [M+H]⁺

Exemplu de Producție 7

Sinteza (5aS,8aS)-4-metiloctahidrociclopenta[e][1,4]diazepin-2,5-dionei



(1) Sinteza t-butil 2-((1S,2S)-2-((t-butoxycarbonyl)amino)-N-metilciclopentancarboxamid)acetatului

La temperatura camerei s-a adăugat HATU (1,99 g 5,23 mmol) la un amestec de acid (1S,2S)-t-butoxicarbonil-2-aminociclopentancarboxilic (CAS No. 143679-80-5) (1,00 g, 4,36 mmol), sarcozină t-butil ester clorhidrat (872 mg, 4,80 mmol), DIPEA (1,81 mL, 10,5 mmol), și DCM (10 mL). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei peste noapte, și apoi s-a purificat direct prin cromatografie pe coloană (gel de silice, 30-50% acetat de etil/n-heptan) pentru a obține compusul din titlu (1,55 g).

MS (ESI) m/z: 357 [M+H]⁺

(2) Sinteza (5aS,8aS)-4-metiloctahidrociclopenta[e][1,4]diazepin-2,5-dionei

O soluție de acid clorhidric 4 N/1,4-dioxan (16 mL, 64 mmol) s-a adăugat la temperatura camerei la t-butil 2-((1S,2S)-2-((t-butoxicarbonil)amino)-N-metilciclopentancarboxamid)acetat (1,55 g, 4,35 mmol), și amestecul s-a agitat timp de 16 ore. Amestecul de reacție s-a concentrat sub presiune redusă. S-au adăugat secvențial bicarbonat de sodiu (0,877 g, 10,4 mmol), metanol (24 mL), NMM (0,096 mL, 0,87 mmol), și DMT-MM (12,3% H₂O, 1,73 g, 5,48 mmol) la reziduu la temperatura camerei, și amestecul s-a agitat timp de 3 ore. Amestecul de reacție s-a concentrat sub presiune redusă, și reziduu s-a spălat cu DCM. Lichidul spălat s-a concentrat sub presiune redusă, și reziduu s-a purificat prin cromatografie pe coloană (gel de silice, 0-20% metanol/acetat de etil) pentru a obține compusul din titlu (753 mg).

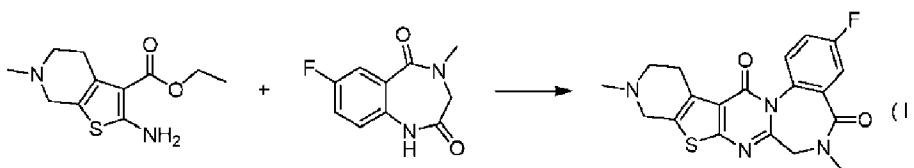
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,55-1,88 (m, 3H), 1,91-2,02 (m, 1H), 2,11-2,22 (m, 1H), 2,25-2,40 (m, 1H), 3,07 (s, 3H), 3,07-3,16 (m, 1H), 3,51-3,62 (m, 1H), 3,78 (d, J = 18,0 Hz, 1H), 4,57 (d, J = 18,0 Hz, 1H), 6,54 (s l, 1H).

MS (ESI) m/z: 183 [M+H]⁺

Exemplu 1

Sinteza 3-fluoro-6,11-dimetil-6,7,10,11,12,13-

hexahidrobenzof[pirido[4''3'':4',5]tieno[2'3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-5,14-dionei



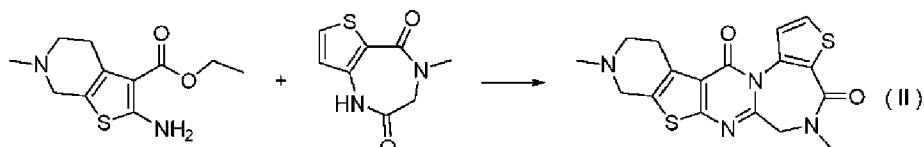
Oxilorură de fosfor (4,65 mL, 49,9 mmol) s-a adăugat la temperatura camerei la un amestec de etil 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-3-carboxilat (6,00 g, 25,0 mmol) obținut în Exemplu de Producție 1, 7-fluoro-4-metil-3,4-dihidro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dionă (5,20 g, 25,0 mmol) obținută în Exemplu de Producție 2, și DCE (300 mL). Amestecul de reacție s-a agitat la 80°C timp de 20 ore. În timpul agitării sub răcire cu gheață, la amestecul de reacție s-a adăugat etoxid de sodiu (o soluție 20% în etanol, 80 mL, 207 mmol). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 20 minute. La amestecul de reacție s-au adăugat o soluție apoasă, saturată de bicarbonat de sodiu și acetat de etil și stratul organic s-a separat. Stratul apos s-a extras cu acetat de etil. Stratul organic combinat s-a uscat peste sulfat de magneziu și s-a filtrat, și filtratul s-a concentrat sub presiune redusă. Reziduul s-a purificat secvențial prin cromatografie pe coloană (NH gel de silice, 50-100% acetat de etil/n-heptan) și cromatografie pe coloană (gel de silice, 0-50% metanol/acetat de etil). Solidul obținut s-a triturat cu TBME, și precipitatele s-au colectat prin filtrare. Solidul obținut s-a spălat cu TBME și s-a uscat sub presiune redusă pentru a obține compusul din titlu (4,56 g).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,51 (s, 3H), 2,66-2,76 (m, 1H), 2,77-2,88 (m, 1H), 3,04-3,18 (m, 2H), 3,25 (s, 3H), 3,57-3,75 (m, 2H), 4,09 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,47 (d, J = 14,8 Hz, 1H), 7,25-7,31 (m, 1H), 7,60-7,64 (m, 1H), 7,67 (dd, J = 9,0, 4,7 Hz, 1H).

MS (ESI) m/z: 385 [M+H]⁺

Exemplu 2

Sinteza 5,10-dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4'',3'':4',5']tieno[2'3':4,5]pirimido[1,2-a]tieno[2,3-f][1,4]diazepin-4,13-dionei



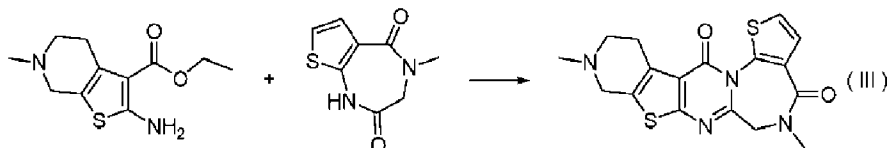
Oxilorură de fosfor (0,157 mL, 1,68 mmol) s-a adăugat la temperatura camerei la un amestec de etil 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-3-carboxilat (303 mg, 1,26 mmol) obținut în Exemplu de Producție 1, 4-metil-3,4-dihidro-1H-tieno[3,2-e][1,4]diazepin-2,5-dionă (165 mg, 0,841 mmol) obținută în Exemplu de Producție 3, și 1,4-dioxan (10 mL). Amestecul de reacție s-a agitat la 70°C timp de 2 ore, și apoi s-a agitat la 90°C timp de 5 ore. La amestecul de reacție s-a adăugat etoxid de sodiu (o soluție 20% în etanol, 2,60 mL, 6,73 mmol), s-a răcit la temperatura camerei. Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp der 40 minute. La amestecul de reacție s-au adăugat acetat de etil și o soluție apoasă, saturată de bicarbonat de sodiu, și stratul organic s-a separat. Stratul apos s-a extras cu acetat de etil. Stratul organic combinat s-a uscat peste sulfat de sodiu anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat sub presiune redusă. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe coloană (gel de silice, 50% metanol/acetat de etil) pentru a obține compusul din titlu (90,0 mg).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,51 (s, 3H), 2,66-2,87 (m, 2H), 3,07-3,20 (m, 2H), 3,26 (s, 3H), 3,56-3,74 (m, 2H), 4,21 (d, J = 15,0 Hz, 1H), 4,56 (d, J = 15,0 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 5,3 Hz, 1H).

MS (ESI) m/z: 373 [M+H]⁺

Exemplu 3

Sinteza 5,10-dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4''3'':4',5']tieno[2'3':4,5]pirimido[1,2-a]tieno[3,2-f][1,4]diazepin-4,13-dionei



Oxilorură de fosfor (1,43 mL, 15,3 mmol) s-a adăugat la temperatura camerei la un amestec de 4-metil-3,4-dihidro-1H-tieno[2,3-e][1,4]diazepin-2,5-dionă (1,00 g, 5,10 mmol) obținută în Exemplu de Producție 4, etil 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-3-carboxilat (1,84 g, 7,64 mmol) obținut în Exemplu de Producție 1, și 1,4-dioxan (30 mL). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 5 minute, și s-a agitat la 90°C timp de 2 ore. S-a adăugat etoxid de sodiu (o soluție 20% în etanol, 21,7 mL, 56,1 mmol) timp de 5 minute la amestecul de reacție, s-a răcit la temperatura camerei. Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 1,5 ore. La amestecul de reacție s-au adăugat secvențial acetat de etil, o soluție apoasă, saturată de bicarbonat de sodiu, și apă, și stratul organic s-a separat. Stratul apos s-a extras cu acetat de etil. Stratul organic combinat s-a uscat peste sulfat de magneziu anhidru și s-a filtrat, și filtratul s-a concentrat sub presiune redusă. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe coloană (gel de silice, 20%-50% metanol/acetat de etil). Solidul obținut s-a triturat cu

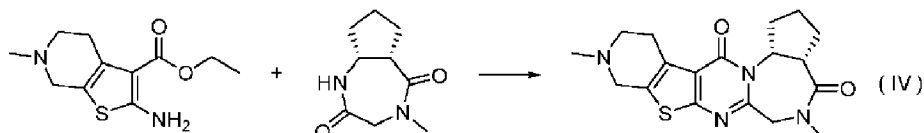
etanol, și precipitatele s-au colectat prin filtrare. Solidul obținut s-a spălat cu etanol, și s-a uscat sub presiune redusă pentru a obține compusul din titlu (712 mg).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,52 (s, 3H), 2,71-2,87 (m, 2H), 3,05-3,30 (m, 5H), 3,59-3,75 (m, 2H), 4,23 (d, $J = 14,8$ Hz, 1H), 4,57 (d, $J = 14,8$ Hz, 1H), 7,35 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H), 7,39 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H).

MS (ESI) m/z : 373 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Exemplu 4

Sinteza (3aS,14aR)-5,10-dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3''':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionei



Oxiclură de fosfor (7,93 mL, 85,1 mmol) s-a adăugat la temperatura camerei la un amestec de (5aS,8aR)-4-metiloctahidrociclopenta[e][1,4]diazepin-2,5-dionă (3,10 g, 17,0 mmol) obținută în Exemplu de Producție 5-(2), etil 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-3-carboxilat (8,18 g, 34,0 mmol) obținut în Exemplu de Producție 1, și DCE (300 mL). Amestecul de reacție s-a agitat la 80°C timp de 14,5 ore. O soluție apoasă, saturată de bicarbonat de sodiu s-a adăugat la amestecul de reacție la 0°C, amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 3,5 ore, și apoi stratul organic s-a separat. Stratul apos s-a extras cu acetat de etil. Stratul organic combinat s-a spălat secvențial cu o soluție apoasă, saturată de bicarbonat de sodiu și o soluție saturată de clorură de sodiu, s-a uscat peste sulfat de magneziu anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat sub presiune redusă. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe coloană (NH gel de silice, 30-60% acetat de etil/n-heptan). Reziduul concentrat obținut s-a triturat cu TBME, și precipitatele s-au colectat prin filtrare. Solidul obținut s-a spălat de 3 ori cu TBME, și s-a uscat sub presiune redusă pentru a obține compusul din titlu (3,70 g). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,51-1,73 (m, 2H), 1,94-2,18 (m, 2H), 2,30-2,41 (m, 1H), 2,44-2,59 (m, 4H), 2,71-2,82 (m, 2H), 3,04-3,19 (m, 5H), 3,42-3,54 (m, 1H), 3,64 (s, 2H), 4,17 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 4,75 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 5,69-5,82 (m, 1H).

MS (ESI) m/z : 359 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Rotație specifică: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -146,0$ (c 0,50, CHCl_3)

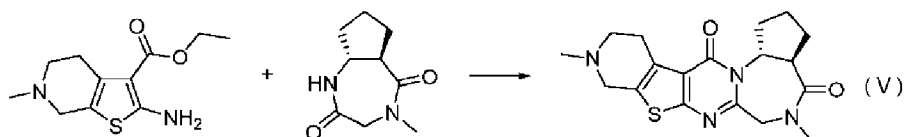
Analiza prin HPLC:

(Condiții de analiză) Coloană: CHIRALPAK IB (produsă de Daicel Chemical Industries, Ltd.) (0,46 cm ϕ x 15 cm), 40°C, eluent: etanol/hexan = 20/80 (v/v), debit: 1 ml/min., detecție: UV (254 nm).

(Rezultatele analizei) Când compusul din titlu a fost analizat în condițiile de analiză de mai sus, timpul de retenție a fost de 10,38 minute, puritatea optică a fost > 98%ee, iar rotația optică a fost (-). Timpul de retenție al enantiomerului a fost confirmat de produsul sintetizat în mod similar folosind un amestec racemic ca materie primă.

Exemplu 5

Sinteza (3aR,14aR)-5,10-dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3''':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionei



Oxiclură de fosfor (0,793 mL, 8,51 mmol) s-a adăugat la temperatura camerei la un amestec de (5aR,8aR)-4-metiloctahidrociclopenta[e][1,4]diazepin-2,5-dionă (310 mg, 1,70 mmol) obținută în Exemplu de Producție 6-(2), etil 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-3-carboxilat (613 mg, 2,55 mmol) obținut în Exemplu de Producție 1, și DCE (16 mL). Amestecul de reacție s-a agitat la 70°C timp de 2,5 ore și apoi s-a adus din nou la temperatura camerei, și s-a adăugat acetat de etil (15 mL) și o soluție apoasă, saturată de bicarbonat de sodiu (30 mL). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 5 zile, s-a adăugat acetat de etil și s-a separat stratul organic. Stratul apos s-a extras cu acetat de etil. Stratul organic combinat s-a uscat peste sulfat de sodiu anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat sub presiune redusă. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe coloană (NH gel de silice, 50-70% acetat de etil/n-heptan). Produsul obținut s-a spălat de 3 ori cu dietil eter, apoi s-a spălat cu TBME, și s-a uscat sub presiune redusă pentru a obține compusul din titlu (143 mg).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,29-1,49 (m, 1H), 1,68-1,83 (m, 1H), 1,82-2,21 (m, 3H), 2,50 (s, 3H), 2,76 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H), 2,98-3,23 (m, 6H), 3,40-3,54 (m, 1H), 3,57-3,68 (m, 2H), 4,17-4,34 (m, 2H), 5,30 (d, $J = 17,4$ Hz, 1H).

MS (ESI) m/z: 359 [M+H]⁺

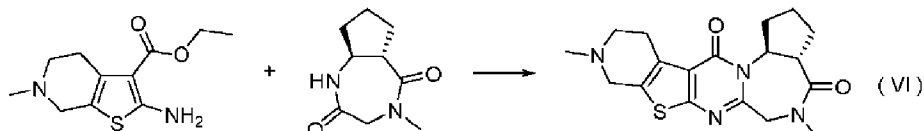
Analiză prin HPLC:

(Condiții de analiză) Coloană: CHIRALPAK IC (produsă de Daicel Chemical Industries, Ltd.) (0,46 cm φ x 15 cm), 40°C, eluent: etanol, debit: 1 mL/min., detecție: UV (254 nm)

(Rezultatele analizei) Timpul de retenție al compusului din titlu a fost de 6,64 minute, puritatea optică a fost > 99%ee, iar rotația optică a fost (-).

Exemplu 6

Sinteza (3aS,4aS)-5,10-dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4''3'':4',5']tieno[2'3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionei



Oxiclorură de fosfor (0,859 mL, 9,22 mmol) s-a adăugat la temperatura camerei la un amestec de (5aS,8aS)-4-metiloctahidrociclopenta[e][1,4]diazepin-2,5-dionă (336 mg, 1,84 mmol) obținută în Exemplu de Producție 7-(2), etil 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-3-carboxilat (665 mg, 2,77 mmol) obținut în Exemplu de Producție 1, și DCE (17 mL). Amestecul de reacție s-a agitat la 60°C timp de 3,5 ore, și apoi s-a adus din nou la temperatura camerei. S-au adăugat acetat de etil (15 mL) și o soluție apoasă, saturată de bicarbonat de sodiu (30 mL) la amestecul de reacție. După ce amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 5 zile, s-a adăugat acetat de etil, și stratul organic s-a separat. Stratul apos s-a extras cu acetat de etil. Stratul organic combinat s-a uscat peste sulfat de sodiu anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat sub presiune redusă. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe coloană (NH gel de silice, 40-80% acetat de etil/n-heptan). Produsul obținut s-a spălat de 3 ori cu dietil eter și s-a uscat sub presiune redusă pentru a obține compusul din titlu (166 mg).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,31-1,50 (m, 1H), 1,69-1,83 (m, 1H), 1,84-1,97 (m, 1H), 1,97-2,20 (m, 2H), 2,50 (s, 3H), 2,73-2,80 (m, 2H), 3,02-3,23 (m, 6H), 3,41-3,55 (m, 1H), 3,57-3,69 (m, 2H), 4,19-4,34 (m, 2H), 5,30 (d, J = 17,2 Hz, 1H).

MS (ESI) m/z: 359 [M+H]⁺

(Condiții de analiză) Coloană: CHIRALPAK IC (produsă de Daicel Chemical Industries, Ltd.) (0,46 cm φ x 15 cm), 40°C, eluent: etanol, debit: 1 mL/min., detecție: UV (254 nm)

(Rezultatele analizei) Timpul de retenție al compusului din titlu a fost de 8,34 minute, puritatea optică a fost > 99%ee, iar rotația optică a fost (+).

Exemple de teste farmacologice

Următoarele teste farmacologice au fost efectuate folosind compuși din Exemplele 1 la 6.

Măsurarea eliberării de acetilcolină (ACh) în sistemul de cultură a neuronului septal primar de sobolan în prezența NGF

(1) Cultură de neuron septal primar de sobolan

Zona septală a fost izolată de la șobolani Sprague-Dawley (SD) (Charles River Laboratories Japan, Inc.) la o vârstă fetală de 18 zile și cultivată. Mai exact, feteșii au fost îndepărtați aseptice de la femelele de șobolani gestante sub anestezie cu izofluran. Creierul a fost extras din fiecare făt și s-a scufundat în mediu L-15 răcit cu gheață (11415-064, Thermo Fisher Scientific). Zona septală a fost disecată din creierul extras sub un microscop stereoscopic. Zona septală disecată a fost supusă unui tratament enzimatic într-o soluție de enzimă care conține 0,25% tripsină (15050-065, Thermo Fisher Scientific) și 0,01% DNază (D5025-150KU, Sigma) la 37°C timp de 30 de minute, dispersând astfel celulele. În acest caz, reacția enzimatică a fost încheiată prin adăugarea de ser de cal inactivat (26050-088, Thermo Fisher Scientific). Soluția tratată cu enzimă a fost centrifugată la 1000 rpm timp de 3 minute și supernatantul a fost îndepărtat. La masa celulară obținută s-a adăugat un mediu în cantitate de 10 mL. Mediul utilizat a fost mediu Dulbecco's Modified Eagle's (044-29765, WAKO) suplimentat cu supliment de N₂ (17502-048, Thermo Fisher Scientific), piruvat de sodiu 1 mM (11360-070, Thermo Fisher Scientific) și penicilină-streptomicină (15140-1221, Thermo Fisher Scientific). Celulele masei celulare la care s-a adăugat mediu au fost redispersate prin pipetare blândă, apoi s-au centrifugat din nou la 1000 rpm timp de 3 minute, iar supernatantul a fost îndepărtat. Mediul într-o cantitate de 10 mL a fost adăugat la masa celulară obținută, iar dispersia celulară a fost filtrată printr-o plasă de nailon de 40 μm (Cell Strainer) pentru a îndepărta masa celulară, obținându-se astfel o suspensie de celule neuronale. Suspensia de celule neuronale a fost diluată cu mediu și s-au adăugat 10% ser bovin inactivat (26140-079, Thermo Fisher Scientific) și 10% ser de cal inactivat. După aceea, 100 μL/godeu de suspensie au fost însămânțați într-o placă cu 96 de godeuri (354461, CORNING) pre-acoperită cu poli-D-lizina, astfel încât densitatea inițială a culturii a fost de 1,4 x 10⁵ celule/cm². După ce celulele însămânțate au fost cultivate sub 5%

CO₂-95% aer într-un incubator la 37°C timp de 2 zile, întregul mediu a fost înlocuit cu 120 µL de mediu proaspăt, iar celulele au fost ulterior cultivate timp de 5 zile.

(2) Adăugarea compusului

5 În a 7-a zi de cultură, compusul a fost adăugat în următorul mod. O soluție a compusului de testat în DMSO a fost diluată cu mediu astfel încât concentrația să fie de 10 ori mai mare decât concentrația finală. NGF (450-01, PEPRO TECH, INC.) a fost preparat la 0,3 ng/mL. Aceste două soluții au fost adăugate fiecare într-o cantitate de 15 µL/godeu, iar amestecul a fost bine amestecat. Concentrația finală de DMSO a fost de 0,1% sau mai mică. Mai mult, doar DMSO și NGF au fost adăugate la grupul martor.

10 **(3) Măsurarea eliberării ACh**

La o zi după adăugarea compusului, o cantitate de ACh eliberată a fost măsurată prin HPLC în felul următor. Un tampon încălzit a fost adăugat la 100 µL/godeu în godeu după ce mediul a fost eliminat, iar tamponul a fost imediat îndepărtat. După aceea, s-a adăugat un tampon la care s-au adăugat 10 µm colină, 10 µm fizostigmină și 6 mM KCl la 120 µL/godeu. Tamponul a fost preparat prin adăugarea a 125 mM NaCl, 25 mM acid 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetansulfonic, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 2,2 mM CaCl₂ (2H₂O), și glucoză 10 mM la apă sterilizată, iar pH-ul final al soluției a fost setat la 7,4. După ce placa cu 96 de godeuri la care a fost adăugat tamponul a fost incubată sub 5% CO₂-95% aer într-un incubator la 37°C timp de 40 de minute, s-au colectat 80 µL de tampon. O soluție standard internă IPHC (5 x 10⁻⁷ M) a fost adăugat într-o cantitate de 6 µL la tamponul colectat, iar tamponul a fost transferat într-un tub pentru măsurarea HPLC și supus măsurării HPLC. Rezultatele sunt reprezentate de efectul fiecărui compus ca procent (% din martor) al concentrației de ACh în tamponul grupului martor, iar concentrațiile de compus care arată o creștere cu 20% față de concentrația de ACh din tamponul grupului martor sunt prezentate în Tabelul 1 care urmează.

[Tabelul 1]

Exemplu	Concentrația (µM) care arată o creștere cu 20%, sau mai mult față de cantitatea de ACh din grupul martor
1	0,1
2	0,1
3	0,1
4	0,1
5	0,1
6	0,03

25 **Măsurarea nivelurilor de expresie a mARNa colin acetiltransferazei (ChAT) în zona septală a șobolanului**

(1) Administrarea compusului

În acest studiu, au fost utilizați șobolani masculi SD (Charles River Laboratories Japan, Inc.) cu o greutate corporală de aproximativ 250 până la 350 g. Compusul a fost dizolvat în acid clorhidric 0,01 mol/L și administrat oral.

(2) Prelevarea de probe

La 24 de ore după administrarea compusului, întregul țesut cerebral a fost colectat sub anestezie cu pentobarbital. Septul medial a fost izolat din creierul întreg pe gheață și congelat cu azot lichid și apoi depozitat la -80°C.

35 **(3) Măsurarea nivelurilor de expresie mARN ChAT**

Pentru purificarea ARN, în acest studiu a fost utilizat kitul RNeasy Plus Mini (#74136: QIAGEN). Purificarea ARN a fost efectuată prin metoda descrisă în kit. După purificarea ARN, concentrația totală de ARN a fost măsurată folosind QIAxpert Instrument (QIAGEN). cADN a fost sintetizat folosind kitul de sinteză SuperScript (R) VILO (TM) cADN (#11754: Thermo Fisher Scientific). Sinteza cADN a fost realizată prin metoda descrisă în kit. cADN sintetizat a fost diluat de 4 ori cu apă fără RNază și soluția de cADN diluată a fost utilizată ca probă. Taqman Universal PCR Master Mix (#4304437: Thermo Fisher Scientific), Taqman (R) Gene Expression Assays, INVENTORIED (#4331182: Thermo Fisher Scientific), RNază fără apă și soluția de cADN au fost amestecate în cantități de 10 µl, 1 µl, 4 µl, respectiv 5 µl, iar amestecul rezultat a fost utilizat ca soluție probă pentru măsurare. Reacția în lanț cantitativă a polimerazei (qPCR) a fost efectuată utilizând ABI PRISM (R) 7900HT (Thermo Fisher Scientific) printr-o metodă cu probă de fluorescență. Analiza a fost efectuată prin SDS 2.4 (Thermo Fisher Scientific). Rezultatele au fost calculate prin procentul cantității de niveluri de expresie ale mARN ChAT în grupul de administrare a compusului crescut de la cantitatea de niveluri de

expresie de mARN ChAT în grupul de administrare a vehiculului. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2 care urmează.

[Tabelul 2]

Exemplu	Doza	Cantitatea (%) crescută din cantitatea de niveluri de expresie a mARN ChAT în grupul de administrare a vehiculului
1	10 mg/kg	73,3
2	3 mg/kg	38,0
3	10 mg/kg	56,4
4	10 mg/kg	42,4
5	3 mg/kg	33,6
6	10 mg/kg	32,0

5 **Măsurarea acetilcolinei (ACh) în Lichidul cefalorahidian (CSF) la șobolan**

(1) Baza

Corelația dintre creșterea și scăderea neurotransmițătorilor intracerebrali și cei din lichidul cefalorahidian (CSF) a fost evidențiată de studiile pe rozătoare, iar corelația a fost observată și la om Lowe S ș.a. Psychopharmacology 219 (2012) 959-970). Astfel, modificările acetilcolinei în CSF au fost

10 măsurate pentru a determina modificările acetilcolinei intracerebrale de către compușii de testat.

(2) Administrarea compusului

În acest studiu, au fost utilizați șobolani masculi Fischer344 (Charles River Laboratories Japan, Inc.) cu o greutate corporală de aproximativ 150 până la 250 g. Compușii de testat au fost administrați oral la șobolani o dată pe zi la 10 mg/kg timp de trei zile. Vehiculul utilizat a fost acid clorhidric 0,01

15 mol/L.

(3) Prelevarea de probe

La 24 de ore după administrarea vehiculului și a compușilor de testat, CSF a fost colectat din cisterna magna într-un tub care conține inhibitori de AchE sub anestezie cu pentobarbital. CSF colectat a fost centrifugat la 3500 x g la 4°C timp de 10 minute și supernatantul a fost colectat. Supernatantul

20 colectat a fost înghețat cu azot lichid și apoi depozitat la -80°C.

(4) Măsurarea Ach prin LC-MS

La 10 μL de CSF s-au adăugat 50 μL de clorură de acetilcolină-d9 (ACh-d9) la o concentrație finală de 0,34 nmol/L, ca standard intern. Amestecul a fost pipetat și centrifugat la 1500 x g la 4°C timp de 10 minute. Supernatantul a fost colectat și supus la LC/MS (NexeraX2 (MS), TSQ Altis (HPLC)), iar

25 Ach a fost detectată ca ion precursor la m/z 146,050 și ca ion produs la m/z 87,071 și ACh-d9 ca un standard intern a fost detectată ca ion precursor la m/z 155,088 și ca ion produs la m/z 87,000. Rezultatele au fost prezentate ca calcule ale unui procent de creștere a concentrației de ACh în CSF în grupul de administrare a compusului de testat în raport cu cel din grupul de administrare a vehiculului (% din martor). Rezultatele au fost prezentate în Tabelul 3.

30 [Tabelul 3]

Exemplu	Cantitatea (%) crescută în raport cu cantitatea de ACh din CSF din grupul de administrare a vehiculului
1	160,0
3	156,8

Evaluare la soarecele transgenic P301S tau uman

(1) Administrarea compusului

În acest studiu, compușii de testat au fost administrați oral la șoareci transgenici P301S tau umani o dată pe zi timp de trei luni de la vârsta de patru luni până la vârsta de șapte luni. Vehiculul

35 utilizat a fost acid clorhidric 0,01 mol/L.

(2) Prelevarea de probe

În ziua inițială a administrării (în vârstă de patru luni) și în ziua următoare a administrării finale, șoarecii din grupul de administrare vehicul și grupul de administrare a compusului de testat au fost aneestizați sub pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) și perfuzați cu PBS. După perfuzie, creierul anterior, inclusiv zona septală medială, a fost colectat și fixat cu paraformaldehidă 4%.

40

(3) Pregătirea secțiunii înghețate coronale a creierului

Creierul anterior colectat, inclusiv zona septală medială, a fost scufundat și agitat peste noapte în paraformaldehidă 4%. Soluția de imersie a fost înlocuită cu soluție de zaharoză 7,5%. Acesta a fost scufundat și agitat peste noapte în soluție de zaharoză 7,5%, iar soluția de imersie a fost înlocuită cu soluție de zaharoză 15% și acesta a fost scufundat și agitat peste noapte. Soluția de imersie a fost înlocuită cu soluție de zaharoză 30% și acesta a fost scufundat și agitat peste noapte. Secțiunile înghețate coronale ale creierului cu grosimea de 30 μm au fost preparate din creierul anterior, inclusiv zona septală medială, folosind un microtom (Leica, SM2000R).

(4) Imunohistochimia celulelor pozitive de colin acetiltransferază (ChAT).

Secțiunile înghețate coronale ale creierului pregătite au fost colorate cu DAB (KIT SUBSTRAT DAB PEROXIDAZĂ (Vector, SK-4100)) utilizând un anticorp ChAT (Santa Cruz, SC-20672) ca anticorp primar. Imaginea secțiunii care include zona septală medială, așa cum se arată în "The mouse Brain in stereotaxic coordinates" (EDIȚIA A TREIA COMPACT, Keith B.J. Franklin & George Paxinos) a fost luată de un microscop cu fluorescență all-in-one (KEYENCE, BZ-X710) și celulele pozitive ChAT din jurul axei majore a zonei septale mediale au fost numărate de software-ul de analiză BZ (KEYENCE). Rezultatele au fost prezentate ca procent din numărul de celule ChAT pozitive din grupul de administrare a vehiculului și din grupul de administrare a compusului de testat în raport cu numărul de celule ChAT pozitive la momentul administrării inițiale (vârsta de patru luni). Datele sunt exprimate ca medie ±SEM. Diferențele dintre grupul la momentul administrării inițiale și grupul tratat cu vehicul (semnificativ: *) au fost analizate printr-un test t nepereche și de asemenea, diferențele dintre grupul tratat cu vehicul și grupul tratat cu compus (semnificativ: #) au fost analizate prin testul t nepereche. O valoare de $P < 0,05$ a fost considerată semnificativă statistic. Analizele statistice au fost efectuate folosind GraphPad Prism versiunea 7.02. Rezultatele au fost prezentate în Tabelul 4.

[Tabelul 4]

Grup de tratament	Raportul (%) dintre numărul de celule pozitive ChAT comparativ cu cel din administrarea inițială
Grup în momentul administrării inițiale	100,0±4,5
Grup de administrare vehicul	83,0±5,8*
Exemplul 1 grup de administrare (Doza: 10 mg/kg)	105,0±4,0#
Exemplul 3 grup de administrare (Doza: 5 mg/kg)	105,3±4,3#

Efect neuroprotector și restaurator asupra neuronilor colinergici folosind modelul de șobolan afectat cu fimbria-fornix

(1) Prepararea modelului de șobolan afectat cu fimbria-fornix

În acest studiu, au fost utilizați șobolani masculi Sprague-Dawley (Charles River Laboratories Japan, Inc.) cu o greutate corporală de aproximativ 250 până la 350 g. Șobolanul a fost anesteziat sub combinația de trei medicamente: midazolam (2 mg/kg sc), clorhidrat de medetomidină (0,15 mg/kg sc) și tartrat de butorfanol (2,5 mg/kg sc) și fixat cu un aparat de stereotaxie cerebrală (Narishige Co., Ltd.). Craniul a fost expus și o gaură cu lățimea de 5 mm a fost forată în craniu de la linia mediană 2 mm în spatele Bregma. Un aparat de ras cu lățimea de 4 mm a fost străpuns în Bregma la 5,5 mm adâncime pentru a tăia fimbria-fornix. După hemostază, scalpul a fost suturat. După operație, șobolanul a fost adus înapoi în cușcă și recuperat din anestezie. În grupul operat simulat, s-a făcut o gaură cu lățimea de 5 mm în craniu de la linia mediană 2 mm în spatele Bregma, dar nu a fost străpuns aparatul de ras.

(2) Administrarea compusului

Compușii de testat au fost administrați oral la șobolani o dată pe zi, de la cinci zile la nouă zile după operație (Exemplul 1: 10 mg/kg) sau de la șapte zile până la paisprezece zile după operație (Exemplul 3: 3 mg/kg). Vehiculul utilizat a fost acid clorhidric 0,01 mol/L. În grupul operat simulat, vehiculul a fost administrat oral o dată pe zi, similar grupului de administrare a compusului de testat.

(3) Prelevarea de probe

Șobolanii au fost anesteziați sub pentobarbital și perfuzați transcordial cu PBS rece ca gheata. După perfuzie, creierul anterior, inclusiv zona septală medială, a fost colectat și scufundat și agitat peste noapte cu paraformaldehidă 4%. Soluția de imersie a fost înlocuită cu soluție de zaharoză 7,5%. Acesta a fost scufundat și agitat peste noapte în soluție de zaharoză 7,5%, iar soluția de imersie a fost înlocuită cu soluție de zaharoză 15% și acesta a fost scufundat și agitat peste noapte. Soluția de imersie a fost înlocuită cu soluție de zaharoză 30% și acesta a fost scufundat și agitat peste noapte. Secțiunile înghețate coronale ale creierului cu grosimea de 30 μm au fost preparate din creierul anterior, inclusiv zona septală medială, folosind un microtom (Leica, SM2000R).

(4) Imunohistochimie celulelor pozitive de colin acetiltransferaza (ChAT) și a transportatorului vezicular de acetilcolină (VAcHT)

Secțiunile înghețate coronale ale creierului pregătite au fost colorate cu DAB (KIT SUBSTRAT DAB PEROXIDAZĂ (Vector, SK-4100)) folosind un anticorp ChAT (Santa Cruz, SC-20672), sau un anticorp VAcHT (Merck Millipore, ABN100) ca anticorp primar. Imaginea secțiunii care include zona septală medială, sau hipocampul așa cum se arată în "The mouse Brain in stereotaxic coordinates" (EDIȚIA A TREIA COMPACT, Keith B.J. Franklin și George Paxinos) a fost luată de un microscop cu fluorescență all-in-one (KEYENCE, BZ-X710) și celulele pozitive ChAT ale zonei septale mediale, sau densitatea optică (OD) în VAcHT hipocampal au fost măsurate prin software-ul de analiză BZ (KEYENCE). Rezultatele au fost prezentate ca procent din numărul de celule ChAT pozitive ale zonei septului medial, sau OD în VAcHT hipocampal în grupul de administrare a vehiculului și grupul de administrare a compusului de testat în raport cu numărul de celule pozitive ChAT din zona septală medială, sau OD în VAcHT hipocampal în grupul operat simulat. Datele sunt exprimate ca medie \pm SEM. Diferențele dintre grupul tratat cu vehicul și grupul tratat cu compus (semnificativ: #) a fost analizată prin testul t nepereche. O valoare de $P < 0,05$ a fost considerată semnificativă statistic. Analizele statistice au fost efectuate folosind GraphPad Prism versiunea 7.02. Rezultatele au fost prezentate în Tabelele 5 și 6.

[Tabelul 5]

Exemplu	Numărul de celule pozitive ChAT (%) la administrarea inițială	Numărul de celule pozitive ChAT (%) în grupul de administrare a vehiculului	Numărul de celule pozitive ChAT (%) în grupul de administrare a compusului de testat
1	59,9 \pm 6,0	43,3 \pm 12,3	79,1 \pm 15,7
3	57,0 \pm 7,5	38,4 \pm 5,0	74,1 \pm 9,3 [#]

[Tabelul 6]

Exemplu	OD în VAcHT hipocampal (%) la administrarea inițială	OD în VAcHT hipocampal (%) în grupul de administrare a vehiculului	OD în VAcHT hipocampal (%) în grupul de administrare a compusului de testat
1	35,4 \pm 4,4	22,8 \pm 9,5	77,2 \pm 14,6 [#]
3	51,7 \pm 13,1	19,5 \pm 6,4	66,1 \pm 14,2 [#]

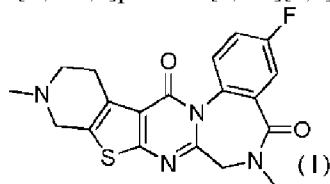
20

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

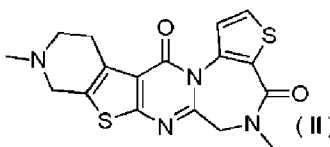
- EP-A2- 0 441 517
- HUANG,G. et al.: "A simple heterocyclic fusion reaction and its application for expeditious syntheses of rutaecarpine and its analogs", Tetrahedron Letters, vol. 55, no. 26, 2014, pages 3607-3609, XP028848490, DOI: doi:10.1016/j.tetlet.2014.04.120
- DECKER,M.: "Novel inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase derived from the alkaloids dehydroevodiamine and rutaecarpine", European Journal of Medicinal Chemistry, vol. 40, no. 3, 2005, pages 305-313, XP004756855, ISSN: 0223-5234, DOI: doi:10.1016/j.ejmech.2004.12.003
- JP-A- S5 424 896
- JP-A- H09 118 621
- USTALAR, A. et al.: "Microwave assisted synthesis of 2, 3-dihydro- 4H-benzo[4,5]thiazolo[3,2-a]furo[2,3-d]pyr imidin-4-ones and 6, 7-dihydro-5H-furo[2,3-d]thiazolo[3,2-a]pyr imidin-5-ones using Mn (OAc) 3", Tetrahedron Letters, vol. 58, no. 6, 24 December 2016 (2016-12-24), pages 516-519, XP029883613, ISSN: 0040-4039, DOI: doi:10.1016/j.tetlet.2016.12.067

(57) Revendicări:**1. Compus selectat din grupul care constă din:**

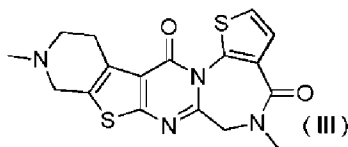
3-fluoro-6,11-dimetil-6,7,10,11,12,13-hexahidrobencof[pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-5,14-dionă:



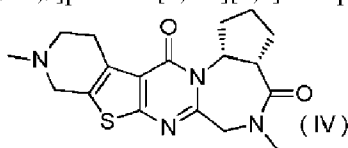
5,10-dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a]tieno[2,3-f][1,4]diazepin-4,13-dionă:



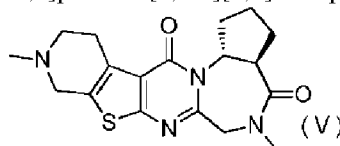
5,10-dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a]tieno[3,2-f][1,4]diazepin-4,13-dionă:



(3aS,14aR)-5,10-dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionă:



(3aR,14aR)-5,10-dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionă:



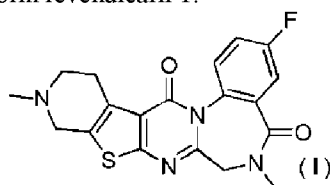
și

(3aS,14aS)-5,10-dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionă:

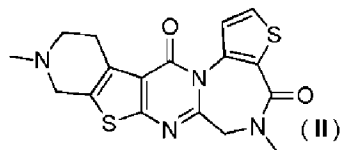


sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

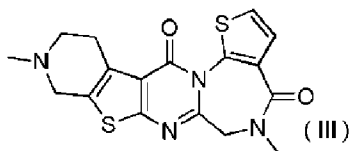
2. 3-Fluoro-6,11-dimetil-6,7,10,11,12,13-hexahidrobencof[pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-5,14-dionă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia conform revendicării 1:



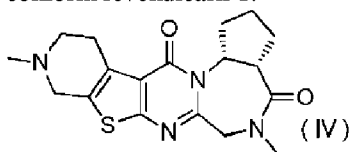
3. 5,10-Dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a]tieno[2,3-f][1,4]diazepin-4,13-dionă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia conform revendicării 1:



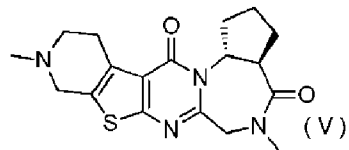
4. 5,10-Dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a]tieno[3,2-f][1,4]diazepin-4,13-dionă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia conform revendicării 1:



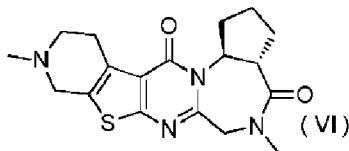
5. (3aS,14aR)-5,10-Dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia conform revendicării 1:



6. (3aR,14aR)-5,10-Dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia conform revendicării 1:



7. (3aS,14aS)-5,10-Dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepin-4,13(2H,14aH)-dionă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia conform revendicării 1:



8. Compoziție farmaceutică care cuprinde compusul sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 7 și unul sau mai mulți aditivi acceptabili farmaceutic.

9. Agent terapeutic pentru utilizare în tratamentul bolii Alzheimer care cuprinde compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 la 7.

10. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 la 7 pentru utilizare în tratamentul bolii Alzheimer.

11. Agent terapeutic pentru utilizare în tratamentul demenței cu corpi Lewy care cuprinde compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 7.

12. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 la 7 pentru utilizare în tratamentul demenței cu corpi Lewy.

13. Agent terapeutic pentru utilizare în tratamentul bolii Parkinson cu demență, care cuprinde compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 7.

14. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1 la 7 pentru utilizare în tratamentul bolii Parkinson cu demență.