

DESCRIPCIÓN

Título de la invención

COMPUESTO PENTACÍCLICO

Campo técnico

La presente invención se refiere a un compuesto pentacíclico o una sal farmacéuticamente aceptable de este que activa las neuronas colinérgicas y/o efecto neuroprotector, y al uso farmacéutico de este. La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto anterior como principio activo.

Técnica anterior

Las neuronas colinérgicas que liberan acetilcolina como un transmisor se proyectan ampliamente en el prosencéfalo desde los núcleos basales de Meynert y los núcleos septales del prosencéfalo basal hasta el hipocampo, amígdala y corteza cerebral, y están implicadas en la modulación de la memoria, aprendizaje, cognición y atención (referencia 1 de la bibliografía no relacionado con patentes). Además, las neuronas colinérgicas en el núcleo tegmental pedunculopontino y el núcleo tegmental laterodorsal del tronco del encéfalo se proyectan en el cuerpo estriado, núcleo accumbens, sustancia negra y tálamo y se considera que están implicadas en el control de la motivación y vigilancia (referencias 2 a 4 de la bibliografía no relacionada con patentes).

En particular, la función de las neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal se ha aclarado mediante análisis que utilizan muchos modelos en animales tales como el modelo de lesiones. Especialmente, se ha mostrado la correlación entre el trastorno funcional de las neuronas colinérgicas y la disminución de la memoria y el aprendizaje en los modelos en animales (referencias de la bibliografía no relacionada con patentes 5 a

7) y se ha mostrado que el rendimiento cognitivo mejora al aumentar la cantidad de acetilcolina utilizando un inhibidor de la colinesterasa y al potenciar la función de las neuronas colinérgicas (referencias 8 a 12 de la bibliografía no relacionada con patentes).

Se informó que el factor de crecimiento nervioso (NGF) muestra el efecto neuroprotector sobre las neuronas colinérgicas en el modelo animal que indica la pérdida de neuronas colinérgicas (Literatura no patente 13 a 15).

En particular para la enfermedad de Alzheimer (AD), se halló la pérdida de las neuronas colinérgicas de la etapa temprana de AD y es una de las características patológicas de la AD. La acumulación de placas seniles por depósitos de amiloide beta y ovillos neurofibrilares por agregación de la proteína tau son también características patológicas de AD, y en particular se conocen los ovillos neurofibrilares por incrementar el progreso del estado patológico y producir la muerte neuronal. Los ovillos neurofibrilares se hallan en el núcleo basal de Meynert y el córtex entorrinal de la etapa temprana de AD. Entre ellos, se informa que la pérdida de neuronas colinérgicas en el núcleo basal de Meynert por la agregación de proteína tau se halla en la etapa más temprana y que hay una correlación entre la pérdida y la reducción en el puntaje de la función cognitiva (Literaturas no patente 16 y 17). De modo similar a AD, la hiperfosforilación y la acumulación anormal de la proteína tau se halla en ratones genéticamente modificados que tienen una mutación P301S que se halló en la demencia frontotemporal familiar (ratones transgénicos P301S tau humana). En consecuencia, se forman los ovillos neurofibrilares, una característica patológica de AD (Literatura no patente 18) y llevan una disfunción cognitiva por alteración sináptica, neurodegeneración y pérdida de neuronas.

En base a estos hallazgos, los ratones transgénicos P301S tau humana se usan ampliamente como modelos animales de tipo AD (Literaturas no patente 19-22), y la mejora de la deterioro cognitivo y la supresión del progreso del estado patológico en la enfermedad de Alzheimer se pueden esperar suprimiendo los cambios patológicos de tipo AD en ratones transgénicos P301S tau humana.

Por otra parte, múltiples análisis que usan ratones genéticamente modificados y modelos animales de trastornos sugieren que el déficit del transporte axonal es una de las causas de pérdida de neuronas colinérgicas (Literaturas no patente 23-25). Entre ellas, el axón de neuronas colinérgicas que se proyecta desde el área del septo hasta el hipocampo se altera en un modelo de lesión de fimbria-fornix y alteración del transporte retrógrado de moléculas implicadas con la supervivencia y la función trae pérdida de neuronas (Literaturas no patente 26-28). La alteración del transporte retrógrado se halla también en ratones genéticamente modificados (Literaturas no patente 23 y 24) y pérdida de neuronas colinérgicas por lesión de fimbria-fornix refleja un aspecto del estado patológico. Por consiguiente, la mejora del deterioro cognitivo y la supresión del progreso del estado patológico en la enfermedad de Alzheimer se puede esperar por supresión o mejora de la pérdida de las neuronas colinérgicas en este modelo del trastorno.

La demencia con los cuerpos de Lewy (DLB) y la enfermedad de Parkinson (PD) son trastornos neurodegenerativos progresivos en donde los cuerpos de inclusión anormal (cuerpos de Lewy) principalmente compuestos por alfa sinucleína aparecen en neuronas y traen la degeneración y la pérdida de neuronas. La disfunción cognitiva se desarrolla si los cuerpos de Lewy se distribuyen principalmente en el cortex cerebral y el

parkinsonismo se desarrolla si los cuerpos de Lewy se distribuyen principalmente en tronco cerebral. Además de ello, también se desarrollan los síntomas psiquiátricos tales como alucinación visual, alucinación y delirio, trastorno del sueño y síntomas autonómicos. La diagnosis es demencia con cuerpos de Lewy si la demencia aparece antes o en el lapso de un año desde el inicio de parkinsonismo y la diagnosis es enfermedad de Parkinson con demencia (PDD) si el parkinsonismo apareció antes de un año o más desde el inicio de la demencia. La demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson con demencia y la enfermedad de Parkinson son enfermedades patológicamente similares y se refieren comprensivamente como enfermedad de cuerpos de Lewy (LBD) aunque son diferentes en la disfunción cognitiva y el orden de aparición y grado de parkinsonismo. En la demencia con cuerpos de Lewy y enfermedad de Parkinson con demencia, de modo similar a la enfermedad de Alzheimer, de nucleus basalis de Meynert, un núcleo de origen de nervio colinérgico, se degeneran y pierden y se informa que el trastorno neuronal colinérgico severo aparece en el hipocampo y el córtex (Literaturas no patente 29-31). Por otra parte, hay una correlación entre el progreso del trastorno neuronal colinérgico y la disfunción cognitiva (Literaturas no patente 29), y se demostró que los inhibidores de colinesterasa mejoran la función cognitiva. En base a estos hallazgos, la función cognitiva mejora por la mejoría de la función de neuronas colinérgicas, y de modo similar a la enfermedad de Alzheimer, mejora del deterioro cognitivo y supresión del progreso del estado patológico en demencia con cuerpos de Lewy y enfermedad de Parkinson con demencia se puede esperar por supresión o mejora de la pérdida de neuronas colinérgicas en varios modelos del trastorno.

Por lo tanto, basándose en estos hallazgos, se puede esperar

una mejora en la reducción del rendimiento cognitivo provocada por la disfunción de las neuronas colinérgicas si se consigue una activación funcional y/o efecto neuroprotector sobre las neuronas colinérgicas en la práctica clínica.

Además de las enfermedades anteriores, algunos ejemplos de enfermedades para las que se ha indicado que hay una asociación entre el descenso de la función cognitiva y la disfunción de las neuronas colinérgicas incluyen la Corea de Huntington, síndrome de Down, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), depresión mayor, esquizofrenia y similares.

Lista de Citas

Bibliografía no relacionada con patentes

[Referencia 1 de la bibliografía no relacionada con patentes] Everitt BJ *et al.* "Central cholinergic systems and cognition." *Annu. Rev. Psychol.* 48 (1997) 649-684

[Referencia 2 de la bibliografía no relacionada con patentes] Gullledge AT. *et al.* "Cholinergic inhibition of neocortical pyramidal neurons." *J. Neurosci.* 25 (2005) 10308-20

[Referencia 3 de la bibliografía no relacionada con patentes] Daniel Dautan D. *et al.* "A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem." *J. Neurosci.* 34 (2014) 4509-18

[Referencia 4 de la bibliografía no relacionada con patentes] M Steriade M. *et al.* "Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems." *J. Neurosci.* 10 (1990) 2541-59

[Referencia 5 de la bibliografía no relacionada con patentes] Fischer W. *et al.* "Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain neurons colinérgicas in rats during aging." *Neurobiol. Aging* 13 (1992) 9-23

[Referencia 6 de la bibliografía no relacionada con

patentes] Leanza G. *et al.* "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

[Referencia 7 de la bibliografía no relacionada con patentes] Leanza G. *et al.* "Selective immunolesioning of the basal forebrain cholinergic system disrupts short-term memory in rats." *Eur. J. Neurosci.* 8 (1996) 1535-44

[Referencia 8 de la bibliografía no relacionada con patentes] Ogura H. *et al.* "Donepezil, a centrally acting acetylcholinesterase inhibitor, alleviates learning deficits in hypocholinergic models in rats." *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 22 (2000) 89-95.

[Referencia 9 de la bibliografía no relacionada con patentes] Spowart-Manning L. *et al.* "Spatial discrimination deficits by excitotoxic lesions in the Morris water escape task." *Behav Brain Res.* 156 (2005) 269-76.

[Referencia 10 de la bibliografía no relacionada con patentes] Bruce AP. *et al.* "Choline acetyltransferase activity and cognitive domain score of Alzheimer's patients." *Neurobiol. Aging.* 21 (2000) 11-17

[Referencia 11 de la bibliografía no relacionada con patentes] Rogers SL. *et al.* "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

[Referencia 12 de la bibliografía no relacionada con patentes] Mori E. *et al.* "Donepezil for dementia with Lewy bodies: a randomized, placebo-controlled trial." *Ann Neurol.* 72 (2012) 41-52

[Referencia 13 de la bibliografía no relacionada con

patentes] Mufson EJ. **et al.** "Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction." *J. Chem. Neuroanat.* 26 (2003) 233-242

[Referencia 14 de la bibliografía no relacionada con patentes] Mufson EJ. **et al.** "Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implication." *Expert. Rev. Neurother.* 8 (2008) 1703-1718

[Referencia 15 de la bibliografía no relacionada con patentes] Schliebs R. **et al.** "The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease." *J. Neural. Transm* 113 (2006) 1625-1644

[Referencia 16 de la bibliografía no relacionada con patentes] Vana L **et al.** "Progression of tau pathology in cholinergic Basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *Am J Pathol.* 179 (2011) 2533-2550

[Referencia 17 de la bibliografía no relacionada con patentes] Gómez-Isla T **et al.** "Neuronal loss correlates with but exceeds ovillos neurofibrilares in Alzheimer's disease." *Ann Neurol.* 41 (1997) 17-24

[Referencia 18 de la bibliografía no relacionada con patentes] Lee VM **et al.** "Neurodegenerative tauopathies." *Annu Rev Neurosci.* 24 (2001) 1121-1159

[Referencia 19 de la bibliografía no relacionada con patentes] Allen B **et al.** "Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein." *J Neurosci* 22 (2002) 9340-9351

[Referencia 20 de la bibliografía no relacionada con patentes] Xu H **et al.** "Memory deficits correlate with tau and spine pathology in P301S MAPT transgenic mice." *Neuropathol Appl Neurobiol.* 40 (2014) 833-43

[Referencia 21 de la bibliografía no relacionada con

patentes] Yoshiyama Y *et al.* "Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model." *Neuron*. 53 (2007) 337-351

[Referencia 22 de la bibliografía no relacionada con patentes] Hoffmann NA *et al.* "Impaired plasticity of cortical dendritic spines in P301S tau transgenic mice." *Acta Neuropathol Commun.* 1 (2013) 82

[Referencia 23 de la bibliografía no relacionada con patentes] Salehi A *et al.* "Increased App Expression in a Mouse Model of Down's Syndrome Disrupts NGF Transport and Causes Cholinergic Neuron Degeneration" *Neuron* 51 (2006) 29-42

[Referencia 24 de la bibliografía no relacionada con patentes] Onishi T *et al.* "Early-onset cognitive deficits and axonal transport dysfunction in P301S mutant tau transgenic mice" *Neuroscience Research* 80 (2014) 76-85

[Referencia 25 de la bibliografía no relacionada con patentes] Xu W *et al.* "Amyloid precursor protein-mediated endocytic pathway disruption induces axonal dysfunction and neurodegeneration" *J Clin Invest.* 126 (2016) 1815-33

[Referencia 26 de la bibliografía no relacionada con patentes] Lapchak PA *et al.* "Effect of recombinant human nerve growth factor on presynaptic cholinergic function in rat hippocampal slices following partial septohippocampal lesions: measures of [³H]acetylcolina synthesis, [³H]acetylcolina release and choline acetyltransferase activity" *Neuroscience* 42 (1991) 639-49

[Referencia 27 de la bibliografía no relacionada con patentes] Gilmore ML *et al.* "Coordinate expression of the vesicular acetylcolina transporter and choline acetyltransferase following septohippocampal pathway lesions" *J Neurochem.* 71 (1998) 2411-20

[Referencia 28 de la bibliografía no relacionada con patentes] Gu H *et al.* "Recombinant human NGF-loaded microspheres promote survival of basal forebrain neurons colinérgicas 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

[Referencia 29 de la bibliografía no relacionada con patentes] Shimada, H. et al., "Mapping of brain acetilcolinasterase alterations in Lewy body disease by PET" *Neurology*, vol. 73, pp. 273-278, 2009.

[Referencia 30 de la bibliografía no relacionada con patentes] Tiraboschi, P. et al., "Cholinergic dysfunction in diseases with Lewy bodies" *Neurology* 54 (2000) 407-411.

[Referencia 31 de la bibliografía no relacionada con patentes] Perry, E. K. et. al., "Neocortical cholinergic activities differentiate Lewy body dementia from classical Alzheimer's disease", *NeuroReport*, vol. 5, pp. 747-749 (1994).

Compendio de la invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de este que active las neuronas colinérgicas y/o efecto neuroprotector y con un uso potencial como un agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy y enfermedad de Parkinson con demencia.

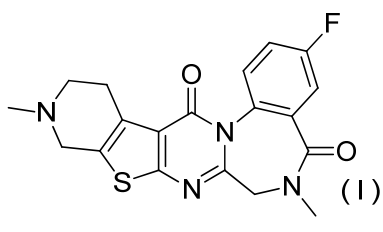
Solución al problema

Como resultado de estudios exhaustivos para resolver los problemas anteriores, los presentes inventores identificaron un compuesto pentacíclico o sales farmacéuticamente aceptables de este que activa las neuronas colinérgicas y/o efecto neuroprotector.

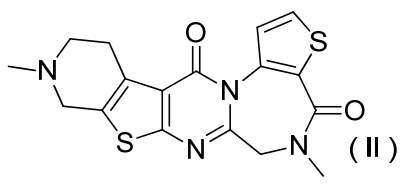
Es decir, la presente invención se refiere a los siguientes apartados <1> a <26>.

<1> Un compuesto seleccionado del grupo constituido por:

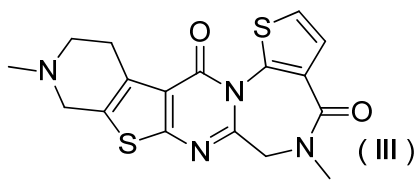
3-fluoro-6,11-dimetil-6,7,10,11,12,13-hexahidrobenczo[*f*]pirido[4'',3':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-*a*][1,4]diazepino-5,14-diona:



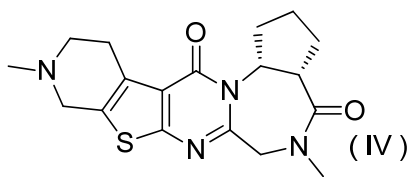
5,10-dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4'',3':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-*a*]tieno[2,3-*f*][1,4]diazepino-4,13-diona:



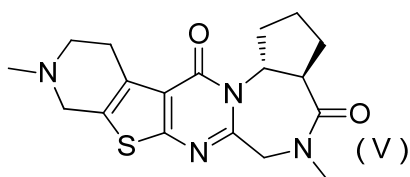
5,10-dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4'',3':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-*a*]tieno[3,2-*f*][1,4]diazepino-4,13-diona:



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

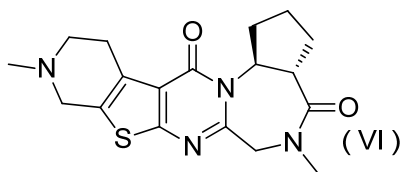


(3aR,14aR)-5,10-dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1H-ciclopenta[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepino-4,13(2H,14aH)diona:



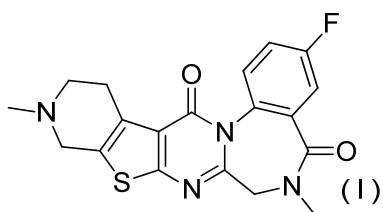
y

(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]diazepino-4,13(2H,14aH)diona:



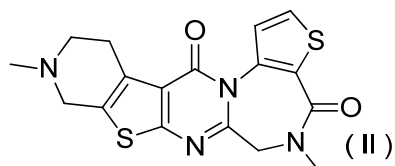
o una sal farmacéuticamente aceptable de estas.

<2> 3-Fluoro-6,11-dimetil-6,7,10,11,12,13-hexahidrobenczo[f]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-a][1,4]diazepino-5,14-diona o una sal farmacéuticamente aceptable de esta:

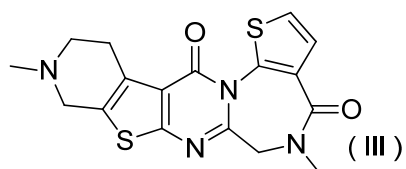


<3> 5,10-Dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-

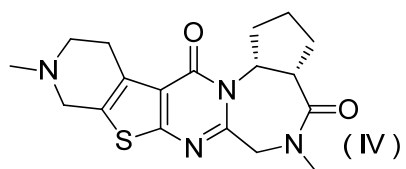
a]tieno[2,3-**f**][1,4]diazepino-4,13-diona o una sal farmacéuticamente aceptable de esta:



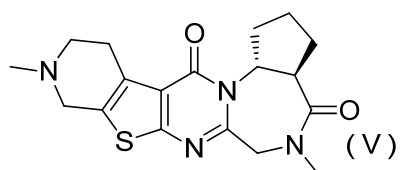
<4> 5,10-Dimetil-5,6,9,10,11,12-hexahidropirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-**a**]tieno[3,2-**f**][1,4]diazepino-4,13-diona o una sal farmacéuticamente aceptable de esta:



<5> (3**aS**,14**aR**)-5,10-Dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1**H**-ciclopenta[**f**]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-**a**][1,4]diazepino-4,13(2**H**,14**aH**)diona o una sal farmacéuticamente aceptable de esta:

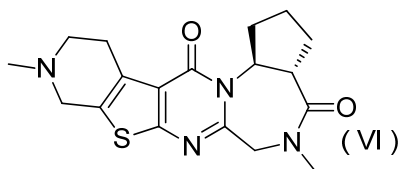


<6> (3**aR**,14**aR**)-5,10-Dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-octahidro-1**H**-ciclopenta[**f**]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-**a**][1,4]diazepino-4,13(2**H**,14**aH**)diona o una sal farmacéuticamente aceptable de esta:



<7> (3**aS**,14**aS**)-5,10-Dimetil-3,3a,5,6,9,10,11,12-

octahidro-1*H*-ciclopenta[*f*]pirido[4'',3'':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-*a*][1,4]diazepino-4,13(2*H*,14*aH*)diona o una sal farmacéuticamente aceptable de esta:



<8> Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> y uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables.

<9-1> La composición farmacéutica de acuerdo con el apartado <8>, que es un agente activador neuronal.

<9-2> La composición farmacéutica de acuerdo con el apartado <8>, que es un agente protector neuronal.

<10> La composición farmacéutica de acuerdo con el apartado <8>, para el tratamiento de la disfunción cognitiva.

<11> Un agente terapéutico para la disfunción cognitiva que comprende el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7>.

<12> Un método para tratar la disfunción cognitiva, que comprende administrar el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> a un paciente.

<13> El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> para su uso en el tratamiento de la disfunción cognitiva.

<14> Uso del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> para la elaboración de un agente terapéutico para la disfunción cognitiva.

<15> Un agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer que comprende el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7>.

<16> Un método para tratar la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> a un paciente.

<17> El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

<18> Uso del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> para la elaboración de un agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer.

<19> Un agente terapéutico para la demencia con cuerpos de Lewy que comprende el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7>.

<20> Un método para tratar la demencia con cuerpos de Lewy, que comprende administrar el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> a un paciente.

<21> El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> para su uso en el tratamiento de la demencia con cuerpos de Lewy.

<22> Uso del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> para la elaboración de un agente terapéutico para la demencia con cuerpos de Lewy.

<23> Un agente terapéutico para la enfermedad de Parkinson con demencia que comprende el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1>

a <7>.

<24> Un método para tratar la enfermedad de Parkinson con demencia, que comprende administrar el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> a un paciente.

<25> El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson con demencia

<26> Uso del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de los apartados <1> a <7> para la elaboración de un agente terapéutico para la enfermedad de Parkinson con demencia.

Efectos beneficiosos de la invención

Los compuestos pentacíclicos representados por las fórmulas (I) a (VI) (denominados en lo sucesivo "los compuestos (I) a (VI)") o sales farmacéuticamente aceptables de estos de acuerdo con la presente invención activan las neuronas y/o efecto neuroprotector, tal como muestran los datos de actividad en los ejemplos de las pruebas farmacológicas que se proporcionan más adelante. Los compuestos (I) a (VI) de la presente invención conllevan una mejora en el rendimiento cognitivo debido a su activación neuronal y/o efecto neuroprotector, y, por lo tanto, tienen un uso potencial como agentes terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy y enfermedad de Parkinson con demencia.

Descripción de las realizaciones

A continuación en la presente, se describirá el contenido de la presente invención detalladamente.

En la presente memoria descriptiva, las fórmulas estructurales de los compuestos pueden representar isómeros específicos por conveniencia; sin embargo, la presente invención

puede incluir isómeros rotacionales y tautómeros, así como también mezclas isoméricas, no se limita a las fórmulas descritas por conveniencia, y pueden ser cualquiera de los isómeros o una mezcla que contenga los isómeros en cualquier proporción.

Además, también pueden existir cristales polimórficos; sin embargo, la presente invención tampoco se limita a ninguno de ellos y puede ser una forma cristalina única o una mezcla de estos. Además, la presente invención también incluye las formas amorfas y los compuestos de acuerdo con la presente invención incluyen anhidratos y solvatos (especialmente hidratos).

La presente invención también incluye compuestos marcados con isótopos de los compuestos (I) a (VI). Los compuestos marcados con isótopos son los mismos que los compuestos (I) a (VI), excepto en que uno o más átomos son reemplazados por uno o más átomos que tienen una masa atómica o número másico diferente de los que se detectan normalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar a los compuestos de la presente invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor, fósforo, azufre, yodo y cloro, y específicamente incluyen ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , y similares.

Los compuestos marcados con isótopos anteriores, por ejemplo, compuestos en los que se incorporan isótopos radioactivos, tales como ^3H y/o ^{14}C , son útiles para el ensayo de distribución en tejidos de medicamentos y/o sustratos. ^3H y ^{14}C se consideran útiles debido a su fácil preparación y detección. Los isótopos ^{11}C y ^{18}F se consideran útiles en PET (siglas en inglés de la tomografía por emisión de positrones), el isótopo ^{125}I se considera útil en SPECT (siglas en inglés de la tomografía computarizada por emisión de fotón único) y todos ellos son útiles en la obtención de imágenes del cerebro. El reemplazo por isótopos

más pesados, tales como ^2H , da como resultado algunos tipos de ventajas terapéuticas, incluidos un aumento en el periodo de semivida *in vivo* o un descenso en la dosis requerida debido a una estabilidad metabólica más elevada, y por lo tanto se considera útil en ciertas situaciones. Los compuestos marcados con isótopos anteriores se pueden preparar de manera similar llevando a cabo los procedimientos divulgados en los siguientes Ejemplos utilizando reactivos marcados con isótopos de fácil utilización en lugar de los reactivos no marcados con isótopos.

Las "sales farmacéuticamente aceptables" en la presente memoria descriptiva no están limitadas manera particular siempre que sean sales formadas con los compuestos de acuerdo con la presente invención, y los ejemplos específicos incluyen sales de adición de ácido, tales como sales de ácidos inorgánicos, sales de ácidos orgánicos y sales de aminoácidos ácidos.

La "sal farmacéuticamente aceptable" en la presente memoria descriptiva es cualquier sal formada en una proporción adecuada a menos que exista cualquier descripción especialmente limitante, y el número de moléculas de ácido por molécula del compuesto en la sal formada no está limitado de manera particular; sin embargo, es preferible que el número de moléculas de ácido por molécula del compuesto sea de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2, y es más preferible que el número de moléculas de ácido por molécula del compuesto sea de aproximadamente 0.5, aproximadamente 1 o aproximadamente 2.

Los ejemplos preferidos de las sales de ácidos inorgánicos incluyen clorhidrato, bromhidrato, sulfato, nitrato y fosfato, y los ejemplos preferidos de sales de ácidos orgánicos incluyen acetato, succinato, fumarato, maleato, tartrato, citrato, lactato, estearato, benzoato, metanosulfonato, *p*-toluenosulfonato y bencenosulfonato.

Los ejemplos preferidos de las sales de aminoácidos ácidos incluyen aspartato y glutamato.

Cuando los compuestos (I) a (VI) de acuerdo con la presente invención se obtienen en forma libre, estos se pueden convertir en sales que puedan formar los compuestos (I) a (VI) o hidratos de estos, de acuerdo con un método convencional.

Cuando los compuestos (I) a (VI) de acuerdo con la presente invención se obtienen como sales de los compuestos (I) a (VI) o hidratos de los compuestos (I) a (VI), estos se pueden convertir en las formas libres de los compuestos (I) a (VI) de acuerdo con un método convencional.

Además, los diversos isómeros (por ejemplo, isómeros ópticos, isómeros rotacionales, estereoisómeros, etc.) obtenidos a partir de los compuestos (I) a (VI) de acuerdo con la presente invención se pueden purificar y aislar mediante medios de separación generales, tales como recristalización, método de sales diastereoméricas, método de resolución enzimática y diversas técnicas cromatográficas (por ejemplo, cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, cromatografía de gases, etc.).

[Preparación farmacéutica]

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención se podría preparar mezclando aditivos farmacéuticamente aceptables con un compuesto seleccionado a partir del grupo de compuestos (I) a (VI) o sales farmacéuticamente aceptables de estos. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se podría preparar mediante un método conocido, por ejemplo, el método descrito en las "Reglas generales para preparados" de la decimoséptima edición de la Farmacopea japonesa.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se podría administrar de forma adecuada a un paciente

dependiendo de la forma farmacéutica de esta.

La dosis de los compuestos (I) a (VI) de acuerdo con la presente invención o las sales farmacéuticamente aceptables de estos varía dependiendo de la gravedad de los síntomas, edad, sexo, peso corporal, forma farmacéutica, tipo de sal, tipo específico de enfermedad y otras afecciones; sin embargo, en general, la dosis para un adulto al día mediante administración oral es de aproximadamente 30 μg a 10 g, preferentemente de 100 μg a 5 g, y más preferentemente de 100 μg a 1 g; la dosis para un adulto al día mediante administración por inyección es de aproximadamente 30 μg a 1 g, preferentemente de 100 μg a 500 mg, y más preferentemente de 100 μg a 300 mg; y la dosis anterior se administra una vez o varias veces.

Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar como sondas químicas para capturar proteínas diana de compuestos bioactivos de bajo peso molecular. Es decir, los compuestos de la presente invención se pueden convertir en sondas de cromatografía por afinidad, sondas de fotoafinidad, etc., introduciendo grupos marcadores, conectores o similares en un resto diferente de un resto estructural esencial para el desarrollo de la actividad de los compuestos utilizando un método descrito, por ejemplo, en *J. Mass Spectrum. Soc. Jpn.* Vol. 51, N.º 5, 2003, págs. 492-498, documento WO2007/139149, o similares.

Los ejemplos de grupos marcadores, conectores, etc., utilizados en sondas químicas incluyen los grupos que se muestran en el grupo constituido por los siguientes elementos (1)-(5):

(1) grupos marcadores de proteínas tales como grupos marcadores de fotoafinidad (por ejemplo, un grupo benzoílo, un grupo benzofenona, un grupo azida, un grupo carbonilazida, un grupo diaziridina, un grupo enona, un grupo diazo, un grupo nitro, etc.) y grupos de afinidad química (por ejemplo, un grupo cetona

en el que un átomo de carbono alfa es reemplazado por un átomo halógeno, un grupo carbamoilo, un grupo éster, un grupo alquiltio, un aceptor de Michael tal como una cetona α,β -insaturada o un éster, y un grupo oxirano);

(2) conectores escindibles, tales como -S-S-, -O-Si-O-, monosacáridos (un grupo glucosa, un grupo galactosa, etc.) o disacáridos (lactosa, etc.); y conectores oligopeptídicos escindibles mediante una reacción enzimática;

(3) grupos marcadores de captura tales como biotina y un grupo 3-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4*H*-3*a*,4*a*-diaz-4-bora-s-indacen-3-il)propionilo;

(4) grupos marcadores radioactivos tales como ^{125}I , ^{32}P , ^3H y ^{14}C ; grupos marcadores fluorescentes tales como fluoresceína, rodamina, dansilo, umbeliferona, 7-nitrofurazanilo y un grupo 3-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4*H*-3*a*,4*a*-diaz-4-bora-s-indacen-3-il)propionilo; grupos quimioluminiscentes tales como luciferina y luminol; y marcadores capaces de detectar iones de metales pesados tales como iones de metales lantanoides e iones de radio; o

(5) grupos que se unen a portadores sólidos tales como microesferas de vidrio, lechos de vidrio, placas de microvaloración, microesferas de agarosa, lechos de agarosa, microesferas de poliestireno, lechos de poliestireno, microesferas de nailon y lechos de nailon.

Las sondas preparadas introduciendo grupos marcadores, etc., seleccionados a partir del grupo constituido por los elementos (1) a (5) anteriores en los compuestos de la presente invención mediante los métodos descritos en los documentos anteriores o similares se pueden utilizar como sondas químicas para identificar proteínas marcadas útiles para la búsqueda de dianas de diseño farmacológicas novedosas, etc.

Ejemplos

Los compuestos (I) a (VI) de la presente invención se pueden producir, por ejemplo, mediante los métodos que se describen en los siguientes Ejemplos y los efectos de los compuestos se pueden confirmar mediante los métodos descritos en los siguientes Ejemplos de prueba. Sin embargo, estos son simplemente ejemplos y la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos específicos en ningún caso y se puede modificar dentro de un campo que no se aleje del alcance de la presente invención.

Los compuestos descritos con nombres de documento, etc., indican que los compuestos se produjeron de acuerdo con los documentos, etc.

Además, las abreviaturas utilizadas en la presente memoria descriptiva son muy conocidas y de uso común para un experto en la técnica. En la presente memoria descriptiva, se utilizan las siguientes abreviaturas.

DCE: 1,2-dicloroetano

DCM: diclorometano

DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina

DMT-MM: cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio

DMSO: sulfóxido de dimetilo

EDC: clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

HATU: hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio

HOBT: 1-hidroxibenzotriazol

n-: normal

NMM: *N*-metilmorfolina

t-: terciario

TBD: 1,3,4,6,7,8-hexahidro-2*H*-pirimido[1,2-*a*]pirimidina

TBME: éter *tert*-butil metílico

TEA: trietilamina

THF: tetrahidrofurano

¹H-RMN: espectrometría de resonancia magnética nuclear de protón

MS: espectrometría de masas

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

La expresión "temperatura ambiente" en los siguientes Ejemplos y Ejemplos de producción se refiere por lo general a entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 35 °C. El % se refiere al porcentaje en peso a menos que se especifique lo contrario.

Los desplazamientos químicos de los espectros de resonancia magnética nuclear de protón se denotan en unidades δ (ppm) respecto al tetrametilsilano y las constantes de acoplamiento se registran en hercios (Hz). Los patrones se designan como s: singulete, d: doblete, t: triplete, c: cuádruplete, m: multiplete, s: ancho, s a: singulete ancho.

Para la resolución óptica del compuesto, se utilizó Parallex Flex (TM) producida por Biotage (columna: una de CHIRALPAK (R) AD-H, IA, IB e IC producida por DAICEL; y CHIRALCEL (R) OD-H y OJ-H producida por DAICEL).

En las reacciones que utilizan un reactor de microondas en los Ejemplos de producción, Ejemplos de referencia y Ejemplos, se utilizó un Initiator (TM) o Initiator+ (TM) producido por Biotage.

Respecto a la cromatografía, como gel de sílice se utilizó gel de sílice 60 producida por Merck (malla 70-230 o malla 230-240 según ASTM) o PSQ60B producida por Fuji Silysia Chemical Ltd., o se utilizó una columna preempaquetada {columna: Columna Hi-Flash (TM) (gel de sílice) producida por Yamazen, tamaño: uno

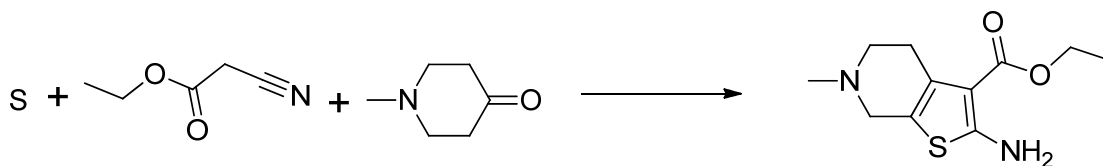
de S (16 x 60 mm), M (20 x 75 mm), L (26 x 100 mm), 2L (26 x 150 mm) y 3L (46 x 130 mm); o un cartucho de sílice Biotage (TM) SNAP Ultra producido por Biotage, tamaño: cualquiera de 10 g, 25 g y 50 g}.

Como gel de sílice con grupos NH, se utilizó CHROMATOREX NH-DM2035 producido por Fuji Silysia Chemical Ltd. o se utilizó una columna preempaquetada {columna: Columna Hi-Flash (TM) (Amino) producida por Yamazen, tamaño: uno de S (16 x 60 mm), M (20 x 75 mm), L (26 x 100 mm), 2L (26 x 150 mm), y 3L (46 x 130 mm); o Presep (TM) (Luer Lock) NH₂(HC) producida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., tamaño: uno de tipo M (14 g /25 mL), tipo L (34 g/70 mL), tipo 2L (50 g/100 mL) y tipo 3L (110 g/200 mL)}.

Como nombres de los compuestos que se muestran a continuación, excepto para los reactivos utilizados de manera general, se utilizaron lo que se muestran en "E-Notebook" versión 12 (PerkinElmer).

Ejemplo de producción 1:

Síntesis de 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-C]piridino-3-carboxilato de etilo



Se añadió TEA (61.6 mL, 442 mmol) a temperatura ambiente a una mezcla de 1-metil-4-piperidona (N.º CAS 1445-73-4) (51.5 mL, 442 mmol), cianoacetato de etilo (N.º CAS 105-56-6) (47.2 mL, 442 mmol), azufre (N.º CAS 7704-34-9) (14.2 g, 442 mmol) y etanol (800 mL). La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 15 horas y a continuación se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice con

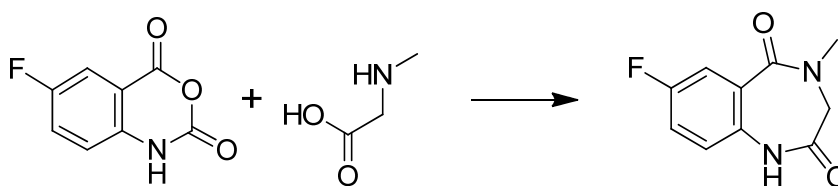
grupos NH, acetato de etilo). El residuo concentrado obtenido se purificó añadiendo acetato de etilo. Los precipitados se recogieron mediante filtración, se lavaron con acetato de etilo y se secaron a presión reducida para generar el compuesto del título (58.4 g).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) 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 (c, $J = 7.3$ Hz, 2H), 5.97 (s a., 2H).

MS (ESI) m/z : 241 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Ejemplo de producción 2:

Síntesis de 7-fluoro-4-metil-3,4-dihidro-1H-benzo[e][1,4]diazepino-2,5-diona



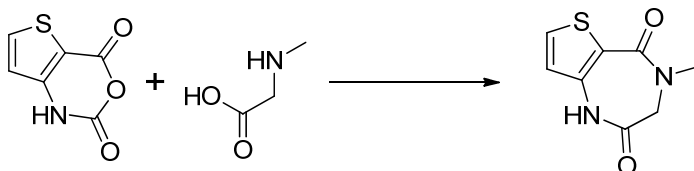
Se añadió sarcosina (N.º CAS 107-97-1) (5.16 g, 58.0 mmol) a temperatura ambiente a una solución de 6-fluoro-1H-benzo[d][1,3]oxazino-2,4-diona (N.º CAS 321-69-7) (10.0 g, 55.2 mmol) en piridina (100 mL) y la mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 8 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente. Los precipitados se recogieron por filtración y se lavaron con éter dietílico. El sólido obtenido se secó a presión reducida para generar el compuesto del título (5.34 g).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) 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 a., 1H).

MS (ESI) m/z : 209 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Ejemplo de producción 3:

Síntesis de 4-metil-3,4-dihidro-1H-tieno[3,2-

e] [1,4]diazepino-2,5-diona

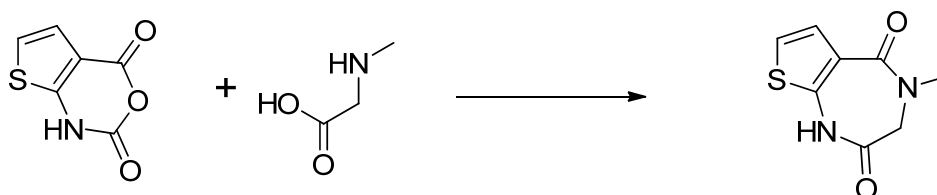
Una mezcla de 1*H*,2*H*,4*H*-tieno[3,2-*d*][1,3]oxazino-2,4-diona (N.º CAS 78756-28-2) (300 mg, 1.77 mmol), sarcosina (395 mg, 4.43 mmol) y agua (10 mL) se calentó a reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C. Los precipitados se recogieron por filtración y se lavaron secuencialmente con agua y éter dietílico. El sólido obtenido se secó a presión reducida para generar el compuesto del título (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 a., 1H).

MS (ESI) *m/z*: 197 [M+H]⁺

Ejemplo de producción 4:

Síntesis de 4-metil-3,4-dihidro-1*H*-tieno[2,3-
e] [1,4]diazepino-2,5-diona



Se añadió 1*H*,2*H*,4*H*-tieno[2,3-*d*][1,3]oxazino-2,4-diona (N.º CAS 103979-54-0) (600 mg, 3.55 mmol) a una solución de sarcosina (790 mg, 8.87 mmol) en agua (12 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1.5 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió cloroformo a la mezcla de reacción y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con cloroformo (dos veces) y acetato de etilo (3 veces). La fase orgánica combinada se secó con sulfato de sodio

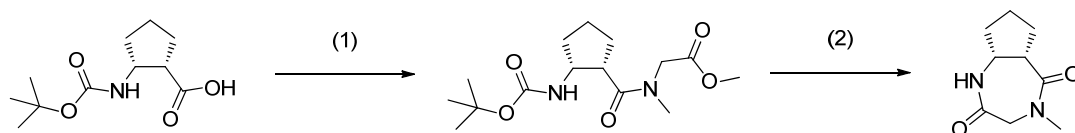
anhidro y se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida. El sólido resultante se secó para generar el compuesto del título (430 mg).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) 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 a., 1H).

MS (ESI) m/z : 197 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Ejemplo de producción 5:

Síntesis de (5a*S*, 8a*R*)-4-metiloctahidrociclopenta[*e*][1,4]diazepino-2,5-diona



(1) Síntesis de 2-((1*S*,2*R*)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)-*N*-metilciclopentanocarboxamido)acetato de metilo

Se añadieron secuencialmente con refrigeración con hielo TEA (22.2 mL, 159 mmol), HOBT/monohidrato (11.7 g, 76.3 mmol) y EDC (14.6 g, 76.3 mmol) a una mezcla de ácido (1*S*,2*R*)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)ciclopentano-1-carboxílico (N.º CAS 137170-89-9) (14.6 g, 63.6 mmol), clorhidrato del éster metílico de la sarcosina (N.º CAS 13515-93-0) (10.7 g, 76.3 mmol) y THF (150 mL). Después de agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 15 horas, se añadieron acetato de etilo y agua, y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó secuencialmente con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y una solución saturada de cloruro de sodio, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó dos veces mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 25-30% de acetato de etilo/*n*-heptano) para generar el compuesto del

título (16.1 g).

MS (ESI) m/z : 337 $[M+Na]^+$

(2) Síntesis de (5a*S*, 8a*R*)-4-metiloctahidrociclopenta[*e*][1,4]diazepino-2,5-diona

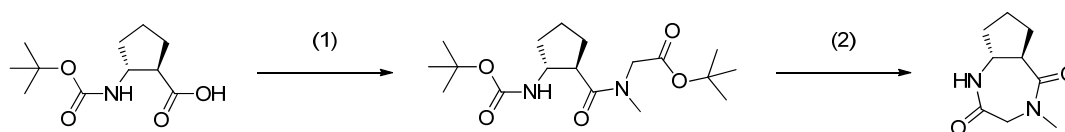
Se añadió con refrigeración con hielo una solución de cloruro de hidrógeno 4 N/1,4-dioxano (160 mL, 640 mmol) a 2-((1*S*,2*R*)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)-*N*-metilciclopentanocarboxamido)acetato de metilo (16.1 g, 51.3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 30 minutos, a continuación se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos y se concentró a presión reducida. Se añadió con refrigeración con agua TBD (8.57 g, 61.6 mmol) a una solución del residuo en metanol (130 mL). La mezcla de reacción se agitó con refrigeración con agua durante 3 horas y posteriormente se enfrió a 0 °C. El sólido resultante se recogió mediante filtración, se lavó 3 veces con metanol enfriado con hielo y se secó a presión reducida para generar el compuesto del título (5.22 g).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) 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 a., 1H).

MS (ESI) m/z : 183 $[M+H]^+$

Ejemplo de producción 6:

Síntesis de (5a*R*, 8a*R*)-4-metiloctahidrociclopenta[*e*][1,4]diazepino-2,5-diona



(1) Síntesis de 2-((1*R*,2*R*)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)-*N*-metilciclopentanocarboxamido)acetato de *t*-butilo

Se añadieron secuencialmente DIPEA (1.81 mL, 10.5 mmol) y HATU (1.99 g, 5.23 mmol) a temperatura ambiente a una mezcla de ácido (1*R*,2*R*)-*t*-butoxicarbonil-2-aminociclopentanocarboxílico (N.º CAS 245115-25-7) (1.00 g, 4.36 mmol), clorhidrato del éster *t*-butílico de sarcosina (N.º CAS 136088-69-2) (872 mg, 4.80 mmol) y DCM (10 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y a continuación se purificó directamente mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 30-50% de acetato de etilo/*n*-heptano) para generar el compuesto del título (1.61 g).

MS (ESI) *m/z*: 357 [M+H]⁺

(2) Síntesis de (5*aR*,8*aR*)-4-metiloctahidrociclopenta[*e*][1,4]diazepino-2,5-diona

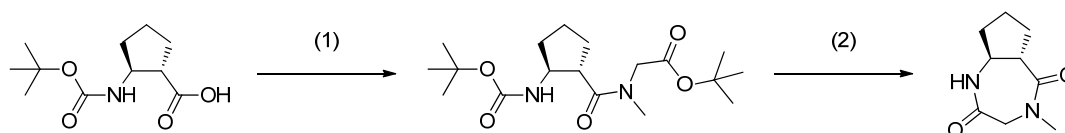
Se añadió una solución de cloruro de hidrógeno 4 N/1,4-dioxano (16 mL, 64 mmol) a temperatura ambiente a 2-((1*R*,2*R*)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)-*N*-metilciclopentanocarboxamido)acetato de *t*-butilo (1.61 g, 4.52 mmol) y la mezcla se agitó durante 20 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Se añadieron secuencialmente hidrogenocarbonato de sodio (0.911 g, 10.8 mmol), metanol (24 mL), NMM (0.099 mL, 0.90 mmol) y DMT-MM (12.3% H₂O, 1.80 g, 5.70 mmol) al residuo a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 20 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se lavó con DCM. El líquido lavado se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 5-20% de metanol/acetato de etilo) para generar el compuesto del título (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 a., 1H).

MS (ESI) m/z : 183 $[M+H]^+$

Ejemplo de producción 7

Síntesis de (5a*S*, 8a*S*)-4-metiloctahidrociclopenta[*e*][1,4]diazepino-2,5-diona



(1) Síntesis de 2-((1*S*,2*S*)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)-*N*-metilciclopentanocarboxamido)acetato de *t*-butilo

Se añadió HATU (1.99 g, 5.23 mmol) a temperatura ambiente a una mezcla de ácido (1*S*,2*S*)-*t*-butoxicarbonil-2-aminociclopentanocarboxílico (N.º CAS 143679-80-5) (1.00 g, 4.36 mmol), clorhidrato del éster *t*-butílico de sarcosina (872 mg, 4.80 mmol), DIPEA (1.81 mL, 10.5 mmol) y DCM (10 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche, y a continuación se purificó directamente mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 30-50% de acetato de etilo/*n*-heptano) para generar el compuesto del título (1.55 g).

MS (ESI) m/z : 357 $[M+H]^+$

(2) Síntesis de (5a*S*, 8a*S*)-4-metiloctahidrociclopenta[*e*][1,4]diazepino-2,5-diona

Se añadió una solución de cloruro de hidrógeno 4 N/1,4-dioxano (16 mL, 64 mmol) a temperatura ambiente a 2-((1*S*,2*S*)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)-*N*-metilciclopentanocarboxamido)acetato de *t*-butilo (1.55 g, 4.35 mmol) y la mezcla se agitó durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Se añadieron secuencialmente hidrogenocarbonato de sodio (0.877 g, 10.4 mmol), metanol (24 mL), NMM (0.096 mL, 0.87 mmol) y DMT-MM (12.3% H₂O, 1.73 g, 5.48 mmol) al residuo a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión

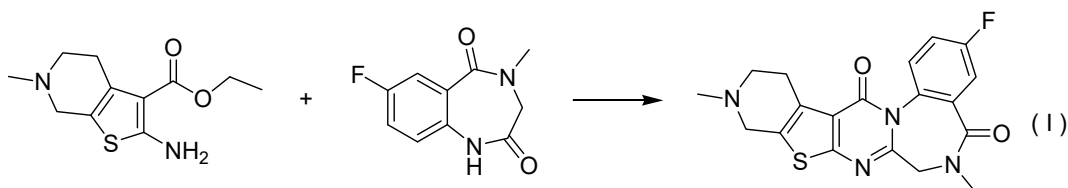
reducida y el residuo se lavó con DCM. El líquido lavado se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 0-20% de metanol/acetato de etilo) para generar el compuesto del título (753 mg).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) 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 a., 1H).

MS (ESI) m/z : 183 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Ejemplo 1

Síntesis de 3-fluoro-6,11-dimetil-6,7,10,11,12,13-hexahidrobenczo[*f*]pirido[4'',3':4',5']tieno[2',3':4,5]pirimido[1,2-*a*][1,4]diazepino-5,14-diona



Se añadió oxiclórico de fósforo (4.65 mL, 49.9 mmol) a temperatura ambiente a una mezcla de 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridino-3-carboxilato de etilo (6.00 g, 25.0 mmol) obtenido en el Ejemplo de producción 1, 7-fluoro-4-metil-3,4-dihidro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepino-2,5-diona (5.20 g, 25.0 mmol) obtenido en el Ejemplo de producción 2 y DCE (300 mL). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 20 horas. Mientras se agitaba con refrigeración con hielo, se añadió etóxido de sodio (una solución al 20% en etanol, 80 mL, 207 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y acetato de etilo a la mezcla de reacción y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se

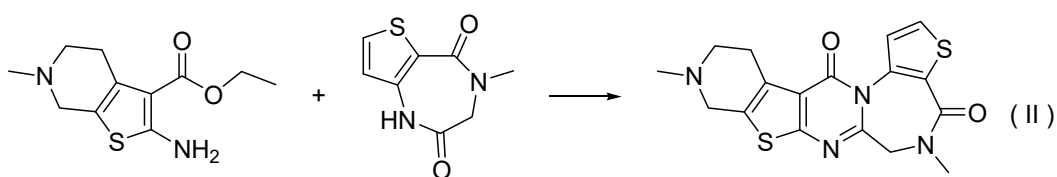
secó con sulfato de magnesio y se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó secuencialmente mediante cromatografía en columna (gel de sílice con grupos NH, 50-100% de acetato de etilo/*n*-heptano) y cromatografía en columna (gel de sílice, 0-50% de metanol/acetato de etilo). El sólido obtenido se purificó añadiendo TBME, y los precipitados se recogieron por filtración. El sólido obtenido se lavó con TBME y se secó a presión reducida para generar el compuesto del título (4.56 g).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) 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 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Ejemplo 2

Síntesis de 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]diazepino-4,13-diona



Se añadió oxicloruro de fósforo (0.157 mL, 1.68 mmol) a temperatura ambiente a una mezcla de 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridino-3-carboxilato de etilo (303 mg, 1.26 mmol) obtenido en el Ejemplo de producción 1, 4-metil-3,4-dihidro-1*H*-tieno[3,2-*e*][1,4]diazepino-2,5-diona (165 mg, 0.841 mmol) obtenido en el Ejemplo de producción 3 y 1,4-dioxano (10 mL). Se agitó la mezcla de reacción a 70 °C durante 2 horas, y después se agitó a 90 °C durante 5 horas. Se añadió etóxido de

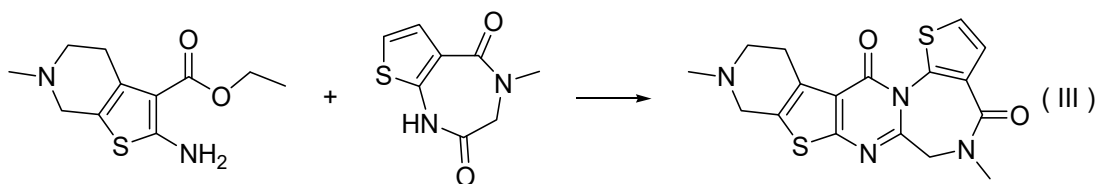
sodio (una solución al 20% en etanol, 2.60 mL, 6.73 mmol) a la mezcla de reacción y se enfrió hasta la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. Se añadieron acetato de etilo y una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio a la mezcla de reacción y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 50% de metanol/acetato de etilo) para generar el compuesto del título (90.0 mg).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) 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 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Ejemplo 3

Síntesis de 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]diazepino-4,13-diona



Se añadió oxicloruro de fósforo (1.43 mL, 15.3 mmol) a temperatura ambiente a una mezcla de 4-metil-3,4-dihidro-1H-tieno[2,3-e][1,4]diazepino-2,5-diona (1.00 g, 5.10 mmol) obtenida en el Ejemplo de producción 4, 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridino-3-carboxilato de etilo (1.84 g, 7.64 mmol) obtenido en el Ejemplo de producción 1 y 1,4-dioxano (30 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente

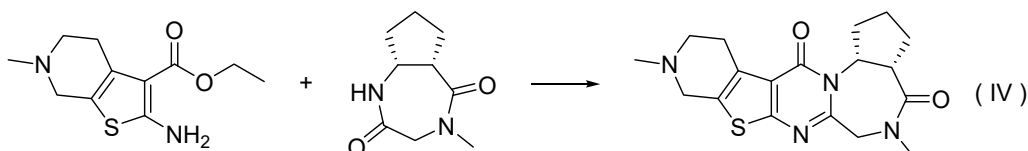
durante 5 minutos y se agitó a 90 °C durante 2 horas. Se añadió etóxido de sodio (una solución al 20% en etanol, 21.7 mL, 56.1 mmol) durante 5 minutos a la mezcla de reacción y se enfrió hasta la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 horas. Se añadieron secuencialmente acetato de etilo, una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y agua a la mezcla de reacción y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se secó con sulfato de magnesio anhidro y se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 20%-50% de metanol/acetato de etilo). El sólido obtenido se purificó añadiendo etanol, y los precipitados se recogieron por filtración. El sólido obtenido se lavó con etanol y se secó a presión reducida para generar el compuesto del título (712 mg).

^1H -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 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Ejemplo 4

Síntesis de (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]diazepino-4,13(2H,14aH)diona



Se añadió oxicloruro de fósforo (7.93 mL, 85.1 mmol) a temperatura ambiente a una mezcla de (5aS,8aR)-4-metiloctahidrociclopenta[e][1,4]diazepino-2,5-diona (3.10 g,

17.0 mmol) obtenida en el Ejemplo de producción 5-(2), 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*C*]piridino-3-carboxilato de etilo (8.18 g, 34.0 mmol) obtenido en el Ejemplo de producción 1 y DCE (300 mL). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 14.5 horas. Se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio a la mezcla de reacción a 0 °C, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3.5 horas y a continuación se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó secuencialmente con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y una solución saturada de cloruro de sodio, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice con grupos NH, 30%-60% de acetato de etilo/*n*-heptano). El sólido obtenido concentrado se purificó añadiendo TBME, y los precipitados se recogieron por filtración. El sólido obtenido se lavó 3 veces con TBME y se secó a presión reducida para generar el compuesto del título (3.70 g).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) 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 [M+H]⁺

Rotación específica: [α]_D²⁰ -146.0 (c 0.50, CHCl₃)

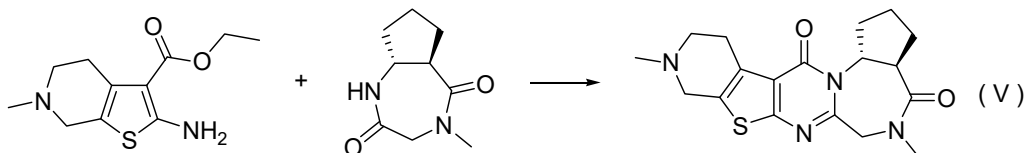
Análisis por HPLC:

(Condiciones del análisis) Columna: CHIRALPAK IB (fabricada por Daicel Chemical Industries, Ltd.) (0.46 cm φ x 15 cm), 40 °C, eluyente: hexano/etanol = 20/80 (v/v), caudal: 1 mL/min, detección: UV (254 nm).

(Resultados del análisis) Cuando el compuesto del título se analizó con las condiciones análisis anteriores, el tiempo de retención fue de 10.38 minutos, la pureza óptica fue >98%ee y la rotación óptica fue (-). Se confirmó el tiempo de retención del enantiómero mediante el producto sintetizado de manera similar utilizando una mezcla racémica como material de partida.

Ejemplo 5

Síntesis de (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]diazepino-4,13(2H,14aH) diona



Se añadió oxocloruro de fósforo (0.793 mL, 8.51 mmol) a temperatura ambiente a una mezcla de (5aR,8aR)-4-metiloctahidrociclopenta[e][1,4]diazepino-2,5-diona (310 mg, 1.70 mmol) obtenida en el Ejemplo de producción 6-(2), 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridino-3-carboxilato de etilo (613 g, 2.55 mmol) obtenido en el Ejemplo de producción 1 y DCE (16 mL). La mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante 2.5 horas y a continuación se volvió a la temperatura ambiente, y se añadieron acetato de etilo (15 mL) y una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (30 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 días, se añadió acetato de etilo y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice con grupos NH, 50%-70% de acetato de etilo/*n*-heptano). El producto obtenido se lavó 3 veces con éter dietílico, a continuación se lavó con TBME y se secó a presión

reducida para generar el compuesto del título (143 mg).

^1H -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 $[\text{M}+\text{H}]^+$

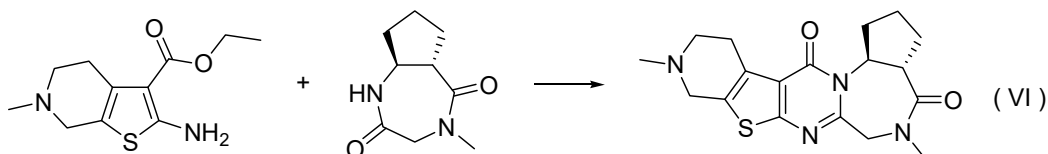
Análisis por HPLC:

(Condiciones del análisis) Columna: CHIRALPAK IC (fabricada por Daicel Chemical Industries, Ltd.) (0.46 cm ϕ x 15 cm), 40 °C, eluyente: etanol, caudal: 1 mL/min, detección: UV (254 nm)

(Resultados del análisis) El tiempo de retención del compuesto del título fue 6.64 minutos, la pureza óptica fue >99%ee y la rotación óptica fue (-).

Ejemplo 6

Síntesis de (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]diazepino-4,13(2H,14aH) diona



Se añadió oxiclورو de fósforo (0.859 mL, 9.22 mmol) a temperatura ambiente a una mezcla de (5aS,8aS)-4-metiloctahidrociclopenta[e][1,4]diazepino-2,5-diona (336 mg, 1.84 mmol) obtenida en el Ejemplo de producción 7-(2), 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridino-3-carboxilato de etilo (665 mg, 2.77 mmol) obtenido en el Ejemplo de producción 1 y DCE (17 mL). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 3.5 horas y posteriormente se volvió a la temperatura ambiente. Se añadieron acetato de etilo (15 mL) y una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (30 mL) a la mezcla de reacción. Después de agitar la mezcla de reacción a temperatura

ambiente durante 5 días, se añadió acetato de etilo y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice con grupos NH, 40%-80% de acetato de etilo/*n*-heptano). El producto obtenido se lavó 3 veces con éter dietílico y se secó a presión reducida para generar el compuesto del título (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]⁺

(Condiciones del análisis) Columna: CHIRALPAK IC (fabricada por Daicel Chemical Industries, Ltd.) (0.46 cm φ x 15 cm), 40 °C, eluyente: etanol, caudal: 1 mL/min, detección: UV (254 nm)

(Resultados del análisis) El tiempo de retención del compuesto del título fue 8.34 minutos, la pureza óptica fue >99%ee y la rotación óptica fue (+).

Ejemplos de pruebas farmacológicas

Se llevaron a cabo las siguientes pruebas farmacológicas utilizando los compuestos de los Ejemplos 1 a 6.

Medición de la liberación de acetilcolina (ACh) en el sistema de cultivo de neuronas septales primarias de ratas en presencia de NGF

(1) Cultivo de neurales septales primarias de rata

Se aisló el área septal de ratas Sprague-Dawley (SD) (Charles River Laboratories Japan, Inc.) con una edad fetal de 18 días y se cultivó. Específicamente, se extrajeron asépticamente los fetos de ratas preñadas con anestesia con isoflurano. Se extrajo el cerebro de cada feto y se sumergió en

medio L-15 enfriado con hielo (11415-064, Thermo Fisher Scientific). Se diseccionó el área septal del cerebro extraído con un microscopio estereoscópico. El área septal diseccionada se sometió a un tratamiento enzimático en una solución enzimática que contenía un 0.25% de tripsina (15050-065, Thermo Fisher Scientific) y un 0.01% de ADNasa (D5025-150KU, Sigma) a 37 °C durante 30 minutos y se dispersaron de esta manera las células. En este caso, se hizo finalizar la reacción enzimática añadiendo suero de caballo inactivado (26050-088, Thermo Fisher Scientific). La solución tratada con enzima se centrifugó a 1000 rpm durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante. Se añadió un medio en una cantidad de 10 mL a la masa celular obtenida. El medio utilizado fue medio Eagle modificado por Dulbecco (044-29765, WAKO) complementado con un complemento de N2 (17502-048, Thermo Fisher Scientific), piruvato de sodio 1 mM (11360-070, Thermo Fisher Scientific) y penicilina-estreptomicina (15140-1221, Thermo Fisher Scientific). Las células de la masa celular a la cual se añadió el medio se redispersaron pipeteando suavemente y a continuación se centrifugaron de nuevo a 1000 rpm durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante. Se añadió el medio en una cantidad de 10 mL a la masa celular obtenida y la dispersión de células se filtró a través de una malla de nailon de 40 μm (Cell Strainer) para separar la masa celular y obtener de esta manera una suspensión de células neuronales. La suspensión de células neuronales se diluyó con el medio, y se añadieron suero bovino inactivado al 10% (26140-079, Thermo Fisher Scientific) y suero de caballo inactivado al 10%. Después, se sembraron 100 μL /pocillo de la suspensión en una placa de 96 pocillos (354461, CORNING) prerrecubierta con poli-D-lisina de manera que la densidad del cultivo inicial fue de 1.4×10^5 células/cm². Después de cultivar las células sembradas en un 5%

de CO₂-95% de aire en una incubadora a 37 °C durante 2 días, se reemplazó todo el medio con 120 µL de medio fresco y las células se cultivaron posteriormente durante 5 días.

(2) Adición del compuesto

Se añadió el compuesto el 7.º día del cultivo de la siguiente manera. Una solución del compuesto de prueba en DMSO se diluyó con el medio de manera que la concentración fuera 10 veces superior a la concentración final. Se preparó factor de crecimiento nervioso NGF(450-01, PEPRO TECH, INC.) a 0.3 ng/mL. Se añadieron estas dos soluciones, cada una en una cantidad de 15 µL/pocillo, y la mezcla se mezcló bien. La concentración final de DMSO fue de un 0.1% o menos. Además, únicamente se añadieron DMSO y NGF (siglas en inglés de factor de crecimiento nervioso) al grupo de control.

(3) Medición de la liberación de ACh

Un día después de la adición del compuesto, se midió la liberación de una cantidad de ACh mediante HPLC de la siguiente manera. Se añadieron 100 µL/pocillo de un tampón calentado al pocillo después de eliminar el medio y el tampón se eliminó inmediatamente. Después, se añadieron 120 µL/pocillo de un tampón al cual se añadieron colina 10 µM, fisostigmina 10 µM y KCl 6 mM. El tampón se preparó añadiendo NaCl 125 mM, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico 25 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.2 mM (2H₂O) y glucosa 10 mM a agua esterilizada, y el pH final de la solución se fijó a 7.4. Después de incubar en un 5% de CO₂-95% de aire en una incubadora a 37 °C durante 40 minutos la placa de 96 pocillos a la cual se añadió el tampón, se recogieron 80 µL de tampón. Se añadió una solución de patrón interno de IPHC (5 x 10⁻⁷ M) en una cantidad de 6 µL al tampón recogido y el tampón se transfirió a un tubo para la medición por HPLC y se sometió a medición por HPLC. Los resultados

se representan mediante el efecto de cada compuesto como el porcentaje (% del control) de la concentración de ACh en el tampón del grupo de control, y las concentraciones de compuesto que mostraron un incremento de un 20% respecto a la concentración de ACh en el tampón del grupo del control se muestran en la siguiente Tabla 1.

[Tabla 1]

Ejemplo	Concentración (μM) que muestra un incremento de un 20% o más respecto a la cantidad de ACh en el grupo de control
1	0.1
2	0.1
3	0.1
4	0.1
5	0.1
6	0.03

Medición de los niveles de expresión de ARNm de colinacetiltransferasa (ChAT) en el área septal de las ratas

(1) Administración del compuesto

En este estudio, se utilizaron ratas SD macho (Charles River Laboratories Japan, Inc.) con un peso corporal de aproximadamente 250 a 350 g. El compuesto se disolvió en ácido clorhídrico 0.01 mol/L y se administró por vía oral.

(2) Muestreo

24 horas después de la administración del compuesto, se extrajo todo el tejido cerebral con anestesia con pentobarbital. Se aisló el septum medio a partir del cerebro entero en hielo y se congeló con nitrógeno líquido, y a continuación se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

(3) Medición de los niveles de expresión del ARNm de ChAT

Para la purificación del ARN, se utilizó el Mini Kit RNeasy

Plus (n.º 74136: QIAGEN) en este estudio. La purificación del ARN se realizó según el método descrito en el kit. Después de la purificación del ARN, se midió la concentración total de ARN utilizando el Instrumento QIAxpert (QIAGEN). Se sintetizó el ADNc utilizando el Kit de Síntesis de ADNc SuperScript (R) VILO (TM) (n.º 11754: Thermo Fisher Scientific). La síntesis del ADNc se realizó según el método descrito en el kit. El ADNc sintetizado se diluyó 4 veces con agua exenta de ARNasa y la solución de ADNc diluido se utilizó como una muestra. Se mezclaron la mezcla Maestra para PCR Taqman Universal (n.º 4304437: Thermo Fisher Scientific), Ensayos de Expresión Génica Taqman (R), INVENTARIADOS (n.º 4331182: Thermo Fisher Scientific), agua exenta de ARNasa y la solución de ADNc en cantidades de 10 µL, 1 µL, 4 µL y 5 µL, respectivamente, y la mezcla resultante se utilizó como una solución de muestra de la medición. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo utilizando ABI PRISM (R) 7900HT (Thermo Fisher Scientific) mediante un método con sonda fluorescente. El análisis se realizó mediante SDS 2.4 (Thermo Fisher Scientific). Los resultados se calcularon mediante el porcentaje de la cantidad de niveles de expresión de ARNm de ChAT en el grupo de administración del compuesto que aumentó respecto a la cantidad de niveles de expresión de ARNm de ChAT en el grupo de administración del vehículo. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 2.

[Tabla 2]

Ejemplo	Dosis	Incremento de la cantidad (%) respecto a la cantidad de niveles de expresión de ARNm de ChAT en el grupo de administración de vehículo
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

Medición de acetilcolina (ACh) en fluido cerebroespinal de
rata (CSF)

(1) Antecedentes

La correlación entre el incremento y la reducción de neurotransmisores intracerebrales y aquellos en el fluido cerebroespinal (CSF) fue revelada por estudios en roedores y la correlación también se vio en seres humanos (Lowe S et al. Psychopharmacology 219 (2012) 959-970). Así, los cambios en la acetilcolina en CSF se midieron a fin de determinar los cambios en la acetilcolina intracerebral por los compuestos de ensayo.

(2) Administración de compuestos

Es este estudio, se usaron ratas macho Fischer344 (Charles River Laboratories Japan, Inc.) con un peso corporal de aproximadamente 150 a 250 g. Los compuestos de ensayo se administraron oralmente a las ratas una vez por día a 10 mg/kg durante tres días. El vehículo usado era de 0.01 mol/L de ácido clorhídrico.

(3) Muestreo

A 24 horas después de la administración del vehículo y los compuestos de ensayo, el CSF se recolectó de la cisterna magna

en un tubo que contiene los inhibidores de AchE bajo anestesia pentobarbital. El CSF recolectado se centrifugó a 3500 x g a 4 °C durante 10 minutos y el sobrenadante se recolectó. El sobrenadante recolectado se enfrió con nitrógeno líquido, y luego se almacenó a -80 °C.

(4) Medición de Ach por LC-MS

A 10 µL de CSF se añadieron 50 µL de cloruro de acetilcolina-d9 (ACh-d9) a una concentración final de 0.34 nmol/L como un estándar interno. La mezcla se pipeteó y se centrifugó a 1500 x g a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se recolectó y se sometió a LC/MS (NexeraX2 (MS), TSQ Altis (HPLC)), y se detectó Ach como ion precursor a m/z 146,050 y como ion de producto a m/z 87,071 y ACh-d9 como un estándar interno se detectó como ion precursor a m/z 155,088 y como ion de producto a m/z 87,000. Los resultados se mostraron como cálculos de un porcentaje de incremento en la concentración de ACh en CSF en el grupo de administración del compuesto de ensayo con respecto al del grupo de administración de vehículo (% de control). Los resultados se mostraron en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Ejemplo	Cantidad (%) incrementada con respecto a desde la cantidad de ACh en CSF el grupo de administración de vehículo
1	160.0
3	156.8

Evaluación en ratón transgénico P301S de tau humana

(1) Administración del compuesto

En este estudio, los compuestos de ensayo se administraron en forma oral a ratones transgénicos P301S tau humana una vez por día durante tres meses de cuatro a siete meses de edad. El vehículo usado era de 0.01 mol/L de ácido clorhídrico.

(2) Muestreo

El día inicial de la administración (cuatro meses de edad) y el día siguiente de la administración final, los ratones del grupo de administración de vehículo y el grupo de administración del compuesto de ensayo se anestesiaron bajo pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) y se perfundieron con PBS. Después de la perfusión, el cerebro anterior incluyendo el área septal media se recolectó y se fijó con 4% de paraformaldehído.

(3) Preparación de la sección congelada de la corona cerebral

El cerebro anterior recolectado incluyendo el área septal media se sumergió y se agitó durante la noche en 4% de paraformaldehído. La solución de inmersión se reemplazó con solución de sacarosa al 7.5%. Se sumergió y se agitó durante la noche en solución de sacarosa al 7.5%, y la solución de inmersión se reemplazó con solución al 15% de sacarosa y se sumergió y se agitó durante la noche. La solución de inmersión se reemplazó con solución al 30% de sacarosa y se sumergió y se agitó durante la noche. Secciones congeladas coronales de cerebro con 30 μ m de espesor se prepararon a partir del cerebro anterior incluyendo el área septal media usando un micrótopo (Leica, SM2000R).

(4) Inmunohistoquímica de células positivas de colina acetiltransferasa (ChAT)

Las secciones congeladas coronales de cerebro preparadas se tiñeron con DAB (DAB PEROXIDASE SUBSTRATE KIT (Vector, SK-4100)) usando un anticuerpo de ChAT (Santa Cruz, SC-20672) como un anticuerpo primario. La imagen de la sección incluyendo el área septal media como se muestra en "The mouse Brain in stereotaxic coordinates" (COMPACT THIRD EDITION, Keith B.J. Franklin & George Paxinos) se tomó por un microscopio de fluorescencia "todo en uno" (KEYENCE, BZ-X710) y las células positivas de ChAT alrededor

del eje mayor del área septal media se contaron mediante software de análisis BZ (KEYENCE). Los resultados se mostraron como un porcentaje de la cantidad de células positivas de ChAT en el grupo de administración de vehículo y el grupo de administración del compuesto de ensayo con respecto a la cantidad de células positivas de ChAT al momento de la administración inicial (cuatro meses de edad). Los datos se expresaron como la media $\pm$ SEM. Las diferencias entre el grupo al momento de la administración inicial y el grupo tratado con vehículo (significativo: *) se analizó por una prueba t no en pares, y también las diferencias entre el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con compuesto (significativo: #) se analizó por prueba t no en pares. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism versión 7.02. Los resultados se mostraron en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Grupo de tratamiento	Relación (%) de la cantidad de células positivas de ChAT en comparación con aquella en la administración inicial
Grupo en el momento inicial de administración	100.0 $\pm$ 4.5
Grupo de administración de vehículo	83.0 $\pm$ 5.8*
Ejemplo 1 grupo de administración (dosis: 10 mg/kg)	105.0 $\pm$ 4.0 [#]
Ejemplo 3 grupo de administración (dosis: 5 mg/kg)	105.3 $\pm$ 4.3 [#]

Efecto neuroprotector y restaurador de neuronas colinérgicas usando modelo de rata con lesión de fimbria-fornix

(1) Preparación de modelo de rata con lesión de fimbria-fornix

En este estudio, se usaron ratas macho Sprague-Dawley (Charles River Laboratories Japan, Inc.) con un peso corporal de aproximadamente 250 a 350 g. La rata se anestesió bajo la combinación de tres fármacos: midazolam (2 mg/kg s.c.), clorhidrato de medetomidina (0.15 mg/kg s.c.) y tartrato de butorfanol (2.5 mg/kg s.c.) y se fijaron con un aparato de estereotaxis cerebral (Narishige Co., Ltd.). El cráneo se expone y se perforó un agujero de 5 mm de ancho en el cráneo desde la línea media 2 mm posterior al bregma. Una navaja de afeitar de 4 mm de ancho se perforó en el bregma con 5.5 mm de profundidad para cortar el fimbria-fornix. Después de la hemostasis, se suturó el cuero cabelludo. Después de la operación, la rata se

devolvió a la jaula y se recuperó de la anestesia. En el grupo operado simulado, se perforó un agujero de 5 mm de ancho en el cráneo desde la línea media 2 mm posterior al bregma, pero no se perforó la navaja.

(2) Administración del compuesto

Los compuestos de ensayo se administraron por vía oral a las ratas una vez por día desde cinco días a nueve días después de la operación (Ejemplo 1: 10 mg/kg) o desde siete días hasta catorce días después de la operación (Ejemplo 3: 3 mg/kg). El vehículo usado era de 0.01 mol/L de ácido clorhídrico. En el grupo operado simulado, el vehículo se administró por vía oral una vez por día de modo similar al grupo de administración del compuesto de ensayo.

(3) Muestreo

Las ratas se anestesiaron bajo pentobarbital y se perfundieron de modo transcardíaco con PBS helado. Después de la perfusión, el cerebro anterior incluyendo el área septal media se recolectó y se sumergió y se agitó durante la noche con 4% de paraformaldehído. La solución de inmersión se reemplazó con solución de sacarosa al 7.5%. Se sumergió y se agitó durante la noche en solución de sacarosa al 7.5%, y la solución de inmersión se reemplazó con solución al 15% de sacarosa y se sumergió y se agitó durante la noche. La solución de inmersión se reemplazó con solución al 30% de sacarosa y se sumergió y se agitó durante la noche. Secciones congeladas coronales de cerebro con 30 µm de espesor se prepararon a partir del cerebro anterior incluyendo el área septal media usando un micrótopo (Leica, SM2000R).

(4) Inmunohistoquímica de células positivas de colina acetiltransferasa (ChAT) y transportador de acetilcolina vesicular (VACHT)

Las secciones congeladas coronales de cerebro preparadas se

tiñeron con DAB (DAB PEROXIDASE SUBSTRATE KIT (Vector, SK-4100)) usando un anticuerpo de ChAT (Santa Cruz, SC-20672) o un anticuerpo de VACHT (Merck Millipore, ABN100) como un anticuerpo primario. La imagen de la sección incluyendo el área septal media o hipocampo como se muestra en "The mouse Brain in stereotaxic coordinates" (COMPACT THIRD EDITION, Keith B.J. Franklin & George Paxinos) se tomó por un microscopio de fluorescencia "todo en uno" (KEYENCE, BZ-X710) y las células positivas de ChAT del área septal media o densidad óptica (OD) en VACHT de hipocampo se midieron por software de análisis BZ (KEYENCE). Los resultados se mostraron como un porcentaje de la cantidad de células positivas de ChAT del área septal media u OD en VACHT de hipocampo en el grupo de administración de vehículo y el grupo de administración del compuesto de ensayo con respecto a la cantidad de células positivas de ChAT del área septal media u OD en VACHT de hipocampo en el grupo operado simulado. Los datos se expresaron como la media $\pm$ SEM. Las diferencias entre el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con compuesto (significativo: #) se analizó por prueba t no en pares. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism versión 7.02. Los resultados se mostraron en las Tablas 5 y 6.

[Tabla 5]

Ejemplo	Cantidad de células positivas de ChAT (%) con la administración inicial	Cantidad de células positivas de ChAT (%) en el grupo de administración de vehículo	Cantidad de células positivas de ChAT (%) en el grupo de administración del compuesto de ensayo
1	59.9 ± 6.0	43.3 ± 12.3	79.1 ± 15.7
3	57.0 ± 7.5	38.4 ± 5.0	74.1 ± 9.3 [#]

[Tabla 6]

Ejemplo	OD en VAcHT de hipocampo (%) con la administración inicial	OD en VAcHT de hipocampo (%) en el grupo de administración de vehículo	OD en VAcHT de hipocampo (%) en el grupo de administración del compuesto de ensayo
1	35.4 ± 4.4	22.8 ± 9.5	77.2 ± 14.6 [#]
3	51.7 ± 13.1	19.5 ± 6.4	66.1 ± 14.2 [#]

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.