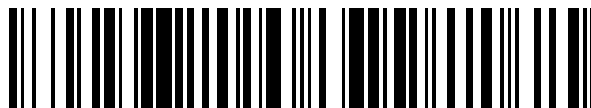


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 596 630**

(21) Número de solicitud: 201500509

(51) Int. Cl.:

**C07D 513/04** (2006.01)

**A61K 31/554** (2006.01)

(12)

## SOLICITUD DE PATENTE

A2

(22) Fecha de presentación:

**10.07.2015**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

**11.01.2017**

(71) Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE  
LA PRINCESA (51.0%)  
C/ Diego de León 62  
28006 Madrid ES;  
FUNDACIÓN TEÓFILO HERNANDO (25.0%) y  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (24.0%)**

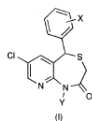
(72) Inventor/es:

**DE LOS RÍOS SALGADO , Cristóbal ;  
GARCÍA GARCÍA , Antonio ;  
MARTÍNEZ SANZ, Francisco Javier;  
LAJARÍN CUESTA, Rocío;  
ARRANZ TAGARRO , Juan Alberto ;  
MORENO ORTEGA, Ana José y  
CANO ABAD, María Francisca**

(54) Título: **Derivados de 5-arilpirido [2,3-e][1,4]tiazepinona con actividad bloqueante del intercambiador 5 sodio/calcio mitocondrial**

(57) Resumen:

Derivados de 5-arilpirido[2,3-e][1,4]tiazepinona con actividad bloqueante del intercambiador sodio/calcio mitocondrial.



La presente invención se refiere a compuestos de fórmula general (I), y su uso en la manufactura de medicamentos útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, ictus, epilepsia, diabetes o, en general, cualquier enfermedad o patología producida por alteración de las funciones biológicas donde está implicado el intercambiador sodio/calcio mitocondrial. Estas enfermedades se han descrito que cursan con una disfunción mitocondrial y una alteración de la homeostasia del  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas. Por ello, los compuestos de fórmula general (I) tienen como dianas biológicas el intercambiador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria. Además, dada la carencia de

herramientas farmacológicas potentes y selectivas para estudiar el intercambiador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria, los compuestos de la invención son útiles para estudiar la fisiología y la fisiopatología de esta diana biológica en los procesos donde se ha descubierto su papel, o en futuras observaciones experimentales. La presente invención se puede enmarcar en el campo de la industria farmacéutica.

**DESCRIPCIÓN**

DERIVADOS DE 5-ARILPIRIDO[2,3-e][1,4]TIAZEPINONA CON  
ACTIVIDAD BLOQUEANTE DEL INTERCAMBIADOR SODIO/CALCIO  
MITOCONDRIAL

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se incluye en el campo de la  
investigación e industria farmacéutica. En particular, se  
centra en la síntesis de nuevos derivados del bloqueante  
del intercambiador sodio/calcio mitocondrial CGP37157 y su  
aplicación para el estudio intercambiador sodio/calcio  
mitocondrial, así como para el tratamiento de enfermedades  
está implicada esta diana biológica.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

En general se acepta que la alteración del mecanismo  
que regula finamente los niveles de calcio citosólico puede  
llevar a la muerte neuronal por excitotoxicidad (Science  
1979, 2006, 700-702) o neurodegeneración (Aging cell, 2007,  
6, 337-350). Los niveles de calcio deben moverse en torno a  
un punto crítico, más allá del cual, una señal  
citoprotectora puede convertirse en citotóxica (Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6421-6425). También se acepta que  
la disfunción mitocondrial está implicada en la patogénesis  
de las enfermedades neurodegenerativas (en lo sucesivo EN)  
como la de Alzheimer (en lo sucesivo EA) (Aging cell, 2007,  
6, 337-350), en la de Parkinson (en lo sucesivo EP)  
(Antioxid. Redox Signal, 2009, 11, 2135-2149), en la  
esclerosis lateral amiotrófica (en lo sucesivo ELA) (Trends  
Neurosci., 2005, 28, 494-500) o en el ictus (Biochim.  
Biophys. Acta, 2010, 1802, 80-91). En este contexto, se ha  
sugerido que la acumulación de calcio en la mitocondria

podría jugar un papel neuroprotector al retirarlo del citoplasma cuando se encuentra en exceso (J. Neurosci. 1995, 15, 1318-1328). Esto se podría conseguir con el enlentecimiento del ritmo de salida del calcio mitocondrial a través del intercambiador sodio/calcio mitocondrial (en lo sucesivo mNCX) lo que impediría los cambios bruscos en la concentración de calcio citosólico, protegiendo a las células de un estímulo tóxico que las conduce a la muerte.

En los últimos años, como consecuencia de la mejora en las condiciones higiénicas y sanitarias, la esperanza de vida ha aumentado de manera espectacular (Eurostat Pocketbooks. Living conditions in Europe. Data 2002-2005. 2007 edition). Desafortunadamente, este hecho ha traído consigo un aumento en la población de las EN asociadas al envejecimiento, entre las que destaca la EA.

Varios son los procesos bioquímicos afectados en los cerebros de pacientes de enfermedades neurodegenerativas: metabolismo anómalo y agregación de la proteína aberrantes,, presencia incontrolada de especies oxidantes, alteraciones de la homeostasis de los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$  en lo sucesivo), pérdida neuronal, problemas en la neurotransmisión colinérgica, etc. Sin duda, una mejora de cualquiera de estas patologías por separado sería una aproximación correcta, si bien incompleta, al tratamiento de la enfermedad. En la actualidad, los fármacos empleados para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas generalmente no mejoran los síntomas de la enfermedad ni frenan su avance (Arch. Gerontol. Geriatr. Suppl. 2004, 9, 297-307). En esta enfermedades, así como en la diabetes, donde se ha visto que la alteración del calcio celular es una pieza clave, moduladores de la homeostasia del calcio celular han sido escasamente estudiados y, de estos pocos,

ninguno ha llegado a la clínica. Más aún, en esta homeostasia del calcio celular, la mitocondria juega un papel clave. Igualmente, fármacos dirigidos hacia la mitocondria han sido escasamente utilizados clínica, aún cuando el mNCX ha sido descrito por tener un papel clave en diversas enfermedades.

Ante esta situación, resulta obvia la conveniencia de disponer de fármacos capaces de actuar a nivel mitocondrial sobre el mNCX de forma potente y selectiva, para así evaluar que contribución tiene esta intervención en las señal citoprotectora que deriva de la regulación del calcio celular y que, en una situación ideal, esta regulación se capaz de producir efectos beneficiosos en las enfermedades objeto de estudio.

Los estudios llevados a cabo tanto en modelos animales como en humanos demuestran que la pérdida del equilibrio entre las especies oxidantes generadas por el metabolismo cerebral y los mecanismos protectores antioxidantes produce el llamado estrés oxidativo; esta situación acontece cuando dichos sistemas defensivos disminuyen su eficacia y son desbordados. Este estrés oxidativo aumenta con la edad y se encuentra entre las primeras causas de la patogénesis de la EA (*Neurobiol. Aging* 2007, 28, 1009-1014) (*Prog. Neurobiol.* 1999, 57, 301-323) posiblemente asociado a disfunciones de las mitocondrias neuronales (*Antioxid. Redox Signal.* 2007, 9, 1647-1658). Asimismo, se conoce que los productos con propiedades antioxidantes son capaces de prevenir la apoptosis inducida por el péptido amiloide, así como las alteraciones de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en cultivos de neuronas corticales (*Life Sci.* 2000, 66, 1879-1892). 66, 1879-1892).

Por otra parte, el ictus es la principal causa de discapacidad en países desarrollados y una de las primeras causas de muerte (*Neuropharmacology* 2008, 55, 250-256).

5 Sin embargo, a pesar de todo el esfuerzo científico y económico, todavía no se dispone a fecha de hoy de fármacos realmente eficaces para el tratamiento de estas enfermedades. Así, se acepta que la búsqueda de nuevas  
10 dianas a las que dirigir nuestros esfuerzos, en la búsqueda de fármacos con actividad citoprotectora capaces de detener el avance de la enfermedad desde los primeros síntomas, es una prioridad de primer orden.

En este contexto, el mNCX es la diana que proponemos en  
15 esta invención basándonos tanto en resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio con el conocido bloqueante de dicho intercambiador CGP37157, donde se observó una protección frente a sobrecarga de calcio en células  
20 cromafines bovinas (JPET 2009, 330, 844-854) y en rodajas de hipocampo de rata (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010, 400, 140-144), como con los compuestos derivados de CGP37157.

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

### **Descripción breve**

El objeto de esta invención se refiere a nuevos compuestos, derivados del bloqueante del intercambiador sodio/calcio mitocondrial CGP37157 hasta ahora no descritos  
30 en la literatura científica, que presentan en su molécula una actividad biológicas relacionada con la interacción sobre el mNCX, que los convierten en productos potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades

neurodegenerativas, ictus, epilepsia y diabetes, y todas las enfermedades donde el mNCX estaría implicado.

### Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han sintetizado una familia de nuevos compuestos, de fórmula general **I**, hasta ahora no descritos.

Estos nuevos compuestos, sometidos a evaluación farmacológica, han presentado interesantes actividades biológicas:

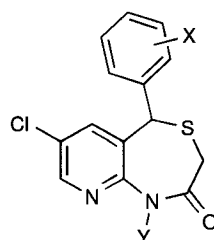
- Bloqueo de la salida de calcio de la mitocondria a través del intercambiador Na/Ca mitocondrial
- Carencia de efectos sobre canales de Ca y Na voltaje dependientes del plasmalema
- Neuroprotección en cultivos celulares y preparados tisulares sometidos a modelos de sobrecarga de calcio y de estrés oxidativo
- Neuroprotección en cultivos celulares de neuroblastoma humano frente a estrés oxidativo

Los resultados obtenidos muestran que nos hallamos ante una familia de productos de alto interés terapéutico para el tratamiento de diversas enfermedades que cursan con la alteración del calcio celular, en base a su acción protectora frente a estímulos tóxicos relacionados con estrés oxidativo y sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos dos eventos fisiopatológicos se han correlacionado íntimamente con los procesos neurodegenerativos que conducen a la muerte neuronal en las EN y en el ictus, según apuntan numerosos trabajos de reciente publicación. Así pues, son productos

potencialmente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de EN y el ictus.

Análogamente, los compuestos de la presente invención pueden ser utilizados para el estudio del mNCX y su papel en procesos fisiológicos y fisiopatológicos, ya que las herramientas farmacológicas actualmente utilizadas, como la benzotiazepina CGP37157 son poco potentes y nada selectivas. CGP37157 ha sido el fármaco de elección durante los últimos treinta años para estudiar el mNCX, aun sabiendo su baja potencia y selectividad. Además, su desarrollo clínico fue abandonado por sus insuficientes propiedades farmacocinéticas, como es su baja vida media biológica y solubilidad. Los compuestos de la presente invención han sido diseñados para presentar mejor solubilidad acuosa. Mediante la sustitución del anillo de benceno fusionado por uno de piridina, se ha conseguido la mejora en el log P, haciéndolo más apropiado para su uso como medicamento.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a los mismos productos de fórmula general (I):



(I)

donde:

X representa hidrógeno o un átomo diferente a hidrógeno, bien de naturaleza electronegativa, libre o unido a cadenas alquílicas, bien grupos alquilo

lineales o ramificados. La sustitución de este grupo se puede localizar en cualquiera de las posiciones del anillo de benceno. Se contempla la posibilidad de presentar dos grupos X iguales o diferentes en distintas posiciones del anillo de benceno.

Y representa un átomo de hidrógeno o grupos alquilo o vinilo. En general, cualquier grupo químico capaz de generar la molécula representada en la fórmula general I.

Los compuestos de la presente invención pueden ser mezclas racémicas o especies enantioméricamente puras o la mezcla en cualquier proporción de ambos enantiómeros.

Por "compuesto de la invención" también se refiere en la presente invención a cualquiera de sus derivados, un isómero, sal farmacéuticamente aceptable y/o solvato del mismo.

El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, ter-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 6 átomos de carbono. Los radicales alquilo que puedan presentar los grupos X o Y pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un cicloalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxilo, halógeno, haloalquilo, nitro, amino, aminoalquilo, aminocicloalquilo, amonioalquilo, amoniocicloalquilo o, en general, cualquier sustituyente situado en cualquier posición.

En una realización preferida de la presente invención, X es bromo, cloro, fluor, metilo, isopropilo, hidrógeno, triflurometilo, etóxido, metóxido. En otra realización preferida, Y es hidrógeno.

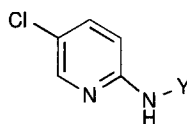
En otra realización más preferida, el compuesto de la invención se selecciona de la lista que comprende:

- 7-cloro-5-fenil-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona
- 7-cloro-5-(o-toluil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona
- 7-cloro-5-(2'-isopropilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona
- 7-cloro-5-(2'-isopropilfenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona
- 7-cloro-5-(2'-trifluorometilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona
- 7-cloro-5-(2'-metoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona
- 7-cloro-5-(4'-metoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona
- 7-cloro-5-(2'-etoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona
- 7-cloro-5-(4'-fluorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona
- 7-cloro-5-(2'-bromofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona
- 7-cloro-5-(2'-clorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona

Los compuestos de la presente invención de fórmula (I) pueden ser obtenidos o producidos mediante una vía

sintética química u obtenidos a partir de una materia natural de distinto origen. Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los compuestos de la invención de fórmula (I), o un isómero, sal farmacéuticamente aceptable y/o solvato del mismo, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

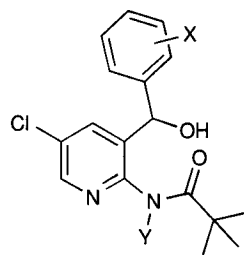
a) Protección de una piridina de fórmula (II),



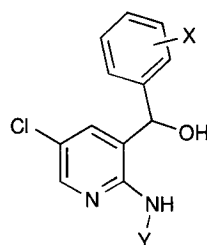
(II)

en donde Y representa los átomos y sustituyentes indicados más arriba al describir la fórmula general (I), en condiciones de reacción de sustitución con el reactivo cloruro de pivaloilo. Esta reacción daría lugar a la anilina análoga sustituida en el grupo amino con el protector Piv (tertbutilcarbonil).

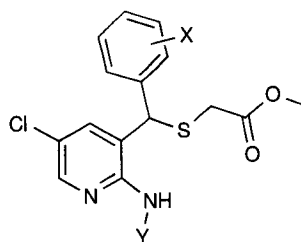
b) Reacción de adición nucleófila a arilaldehídos provistos con la sustitución X indicada previamente, bajo condiciones de orto-litiación en atmósfera inerte y baja temperatura, rindiendo la familia de compuestos con estructura general (III).

**(III)**

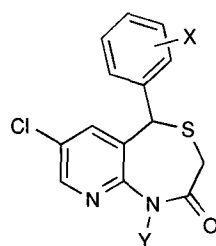
c) Desprotección del grupo pivaloil (terbutilcarbonil) con hidróxido potásico, rindiendo los intermedios con estructural general **(IV)**

**(IV)**

d) Reacción con tioglicolato de metilo, aplicado en exceso o en disolución de cloruro de metileno, en condiciones anhidras y alta temperatura, en presencia de un ácido prótico. El derivado tiolado provoca la salida de hidroxilo, generando un tioeter de fórmula general **(V)**

**(V)**

e) Reacción con una base litiada como hexametildisililamido de litio (LiHMDS) que genera amido y produce una adición nucleófila intramolecular sobre el éster colgante. Este último evento lleva a la formación de un heterociclo de siete miembros con estructura de 1,4-tiazepina, dentro de la fórmula general (**I**), que representa la estructura del producto final.



(I)

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de los compuestos representados con la fórmula general (**I**) para el estudio del mNCX tanto en modelos in vitro, ex vivo, in vivo o en humanos, y conocer la implicación de esta diana biológica en procesos fisiológicos o patológicos.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de los compuestos representados con la fórmula general (**I**) en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica con actividad citoprotectora y/o bloqueadora del mNCX, útiles para el tratamiento de patologías o enfermedades neurodegenerativas, del ictus o, en general, de enfermedades susceptibles de beneficiarse de las actividades biológicas mostradas por los productos descritos en la presente invención, o bien de una sal, derivado, profármacos o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos y se pretende que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica, siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación bien conocidos por los técnicos en la materia.

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus isómeros, sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos habituales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo materiales considerados tóxicos a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% del compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

A menos que se indique lo contrario, los compuestos de la invención también incluyen compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, compuestos que tienen dicha estructura, a excepción de la sustitución de un hidrógeno por un deuterio o por tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$  o un nitrógeno enriquecido en  $^{15}\text{N}$ , o un azufre enriquecido en  $^{35}\text{S}$  están dentro del alcance de esta invención.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que incluye un compuesto de fórmula (I), o un profármaco, solvato, derivado o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z y E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales en las cadenas X e Y. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del derivado farmacéuticamente aceptable no es crítica, siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I), por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc., carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, dicho compuesto de fórmula (I) en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un receptor biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un receptor biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.). Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A.

Ediciones, Madrid, o en otros habituales o similares de la Farmacopea Europea y de los Estados Unidos.

5 El uso de los compuestos de la invención es compatible con su uso en protocolos en que los compuestos de la fórmula (I), o sus mezclas se usan por sí mismos o en combinaciones con otros tratamientos o cualquier procedimiento médico.

10 En otro aspecto, esta patente presenta un método para el tratamiento de pacientes afectados por enfermedades neurodegenerativas, diabetes, epilepsia, ictus, o cualquier enfermedades donde el mNCX ejerza un papel consistente en la administración a los individuos afectados por estas enfermedades de cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de fórmula (I), o una composición farmacéutica que lo incluya. A título de ejemplo, enfermedades neurodegenerativas contempladas en esta invención son las enfermedades de Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob, Parkinson o 15 Huntington, la demencia con cuerpos de Lewy o, en general, las enfermedades susceptibles de beneficiarse de las actividades biológicas mostradas por los productos descritos en la presente invención.

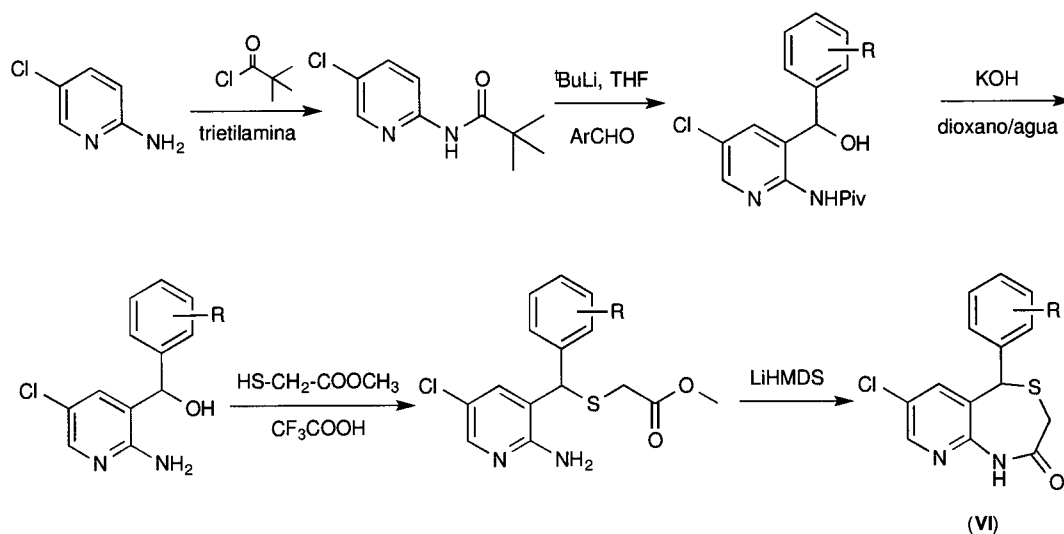
25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

**EJEMPLOS**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que desarrollan el proceso de selección de los compuestos de la invención.

**1. OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCIÓN**

Los compuestos cuya actividad biológica es objeto de la presente invención se sintetizaron siguiendo un procedimiento general en síntesis orgánica. Dicho procedimiento está representado en el siguiente Esquema de reacciones:



Los compuestos de fórmula (I) según la presente invención en los que X e Y tienen los significados definidos en la reivindicación 1, pueden ser preparados según se describe a continuación a partir de productos accesibles comercialmente o cuya preparación se encuentra suficientemente descrita en el estado de la técnica. Los compuestos esquematizados en la formula VI son ejemplos de la fórmula más genérica I, a la cual se puede llegar por

alquilación del N de la benzotiazepina según protocolos suficientemente descritos, incorporando así la sustitución Y.

5 En la presente memoria se utilizan las siguientes abreviaciones con los significados que se detallan:

Et<sub>3</sub>N se refiere a trietilamina,

<sup>t</sup>BuLi se refiere al reactivo tertButillitio,

THF se refiere al disolvente tetrahidrofurano,

10 TFA se refiere al ácido trifluoroacético

ArCHO se refiere a cualquier aldehído aromático formado por un benceno y la sustitución X en cualquiera de las posiciones del anillo de benceno, según se describe en la reivindicación 1

15 LiHMDS se refiere al reactivo hexametildisililamiduro de litio

todos ellos grupos, reactivos o disolventes habituales en síntesis orgánica.

20 Una síntesis para un derivado en concreto, el derivado con un grupo Fluor (-F) como sustituyente X en posición para del anillo bencénico, según se describe en la reivindicación 1, sería el siguiente:

25 La primera etapa es la reacción de protección del grupo NH<sub>2</sub> de la 2-amino-5-cloropiridina, por medio del reactivo cloruro de pivaloilo (PivCl), que evita la acidez del grupo NH<sub>2</sub> en la etapa posterior. Esta reacción transcurre lentamente (48 horas), pero con buenos rendimientos (98%). El producto se obtiene puro sin necesidad de realizar purificación por cromatografía.

30 La piridina protegida se somete a la reacción de orto-litiación. En esta reacción se aprovecha el efecto ortodirigente de la amida, lo que provoca la litiación en posición 3 del anillo de piridina la base <sup>t</sup>BuLi. La adición de <sup>t</sup>BuLi debe hacerse a -78 °C y en condiciones anhidras,

35

consiguiendo controlar la reacción cinéticamente. En un primer paso,  $t\text{BuLi}$  nos da una solución incolora, y a partir de la adición de 1.5 equivalentes, la solución adquiere una tonalidad amarilla, indicativa de que ha terminado de desprotonar el grupo NH y ha comenzado la orto-litiación. Finalizada la adición, se deja 15 minutos a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  para estabilizar la reacción, para posteriormente aumentar la temperatura a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  acelerando el proceso de orto-litiación. Se mantiene la reacción a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 120 minutos, apreciándose cómo la solución adquiere una coloración anaranjada durante este tiempo, señal de que la reacción de orto-litiación se ha completado. En este momento es necesario volver a bajar la temperatura a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  para añadir gota a gota el aldehído correspondiente. Se produce la reacción de adición nucleófila del carbanión al grupo carbonilo. El proceso se deja 120 minutos a temperatura ambiente durante los cuales se va monitorizando por TLC cada 30 minutos para seguir el curso de la reacción. Transcurrido este tiempo, cuando se corrobora que la reacción no evoluciona más, se adiciona  $\text{H}_2\text{O}$  (15 mL), que interrumpe la reacción y destruye el posible exceso de producto litiado sobrante. La mezcla de reacción se extrae con dietiléter tres veces, y las fases orgánicas combinadas se secan con sulfato de magnesio anhidro, para después ser filtradas y evaporadas de disolvente.

El control de tiempo y temperatura de la reacción es esencial para evitar la formación de productos secundarios. Siguiendo el "work-up", el producto obtenido se purifica por columna cromatográfica. Este producto es el intermedio utilizado en la siguiente etapa donde se debe eliminar el grupo protector para que no dificulte las siguientes reacciones. Así, el tratamiento con hidróxido potásico 2M en 1,4-dioxano y agua por partes iguales, a reflujo y

durante 24 h, conduce a la formación del producto con estructura del tipo (IV) donde la amina se encuentra libre.

Este intermedio sufre una reacción de adición nucleófila por parte del tioglicolato de metilo en TFA/diclorometano a 45 °C durante 24 h. En estas condiciones, se produce la salida del grupo alcohol, quedando un intermedio del tipo (V). Una vez pasado ese tiempo la reacción se concentra y se disuelve en diclorometano, lavándose con solución saturada de bicarbonato sódico, posteriormente con solución de hidróxido sódico al 30%, y finalmente con salmuera (todos los lavados con un volumen de 30 ml). La fase orgánica resultante se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra, evapora, y se purifica por cromatografía flash con gel de sílice con mezclas acetato de etilo:hexano como eluyente. Una vez purificado, se somete a reacción con LiHMDS a -78 °C durante 15 min, dejándose agitando a temperatura ambiente durante 24 h más. La reacción se interrumpe por adición de 50 ml de una solución saturada de cloruro amónico. La mezcla se extrae en tres veces con 30 ml de diclorometano, y la fase orgánica combinada se lava tres veces con 50 ml de salmuera, se seca con sulfato de sodio, se filtra y evapora, obteniéndose un sólido amarillo que es purificado por cromatografía flash de gel de sílice neutralizada con 2% de amoniaco, utilizando mezclas de acetato de etilo:hexano como eluyente. Así, se obtienen los productos deseados con estructura general (I).

En el caso en que se desee obtener un compuesto de fórmula (I) en el que el grupo Y sea distinto de hidrógeno, la síntesis partiría de un intermedio del tipo II que habría sido previamente alquilado con haluros de alquilo, donde el alquilo tiene la estructura de Y, en presencia de

hidruro sódico en THF, o por otros métodos clásicos de síntesis orgánica.

5

### EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

#### **Ejemplo 1.- Síntesis de los compuestos de la invención**

10

**Procedimiento general para la síntesis de N-[5-cloro-3-[hidroxiarilmetil]piridin-2-il]pivalamida (III).** Se sigue un procedimiento experimental previamente descrito (Turner et al. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 3401), con ligeras modificaciones. A una solución de 1 equiv de N-(5-cloropiridin-2-il)pivalamida (**IIa**, Y = H) (Ichikawa et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 1930) en THF seco (15 ml), <sup>t</sup>BuLi (1.7 M en hexanos, 2.7 equiv) fue añadido gota a gota a -78 °C bajo atmósfera de argón, y la mezcla se agitó a esta temperatura durante 15 min, para después mantenerla agitándose durante 2 h a 0 °C. Posteriormente, la reacción se enfrió hasta -78 °C, y el correspondiente arilaldehído (1.1 equiv) fue inyectado en THF seco (5 ml) gota a gota, permitiéndose que se agite a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se interrumpió por adición de agua (15 ml), y una vez a temperatura ambiente, se extrajo con dietiléter (3 × 30 ml), y la fase orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (3 × 50 ml), y secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro. Una vez filtrada y evaporado el disolvente, se obtuvo un aceite amarillo que fue purificado por cromatografía flash automatizada utilizando mezclas de acetato de etilo:hexano como eluyente.

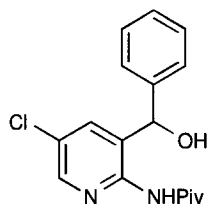
20

25

30

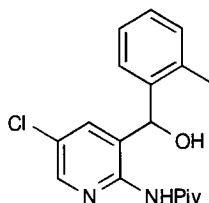
**N-[5-cloro-3-[hidroxi(fenyl)metil]piridin-2-il]pivalamida (**IIIa**).**

35



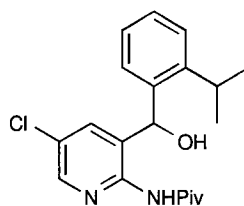
5  
10 Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de *N*-[5-cloro-3-[hidroxiarilmetil]piridin-2-il]pivalamida (**III**), la reacción de **IIa** (500 mg, 2,35 mmol) con benzaldehído (2,58 mmol, 274 mg) rindió **IIIa** (257 mg, 30%).  
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,78 (m, 2H), 8,21 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,49 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,30-7,22 (m, 5H), 5,79 (s, 1H), 5,23 (bs, 1H), 1,13 (s, 9H).

15  
*N*-[5-cloro-3-[hidroxi(*o*-toluil)metil]piridin-2-il]pivalamida (**IIIb**)



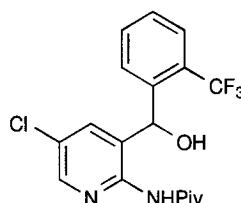
20  
25 Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de *N*-[5-cloro-3-[hidroxiarilmetil]piridin-2-il]pivalamida (**III**), la reacción de **IIa** (500 mg, 2,35 mmol) con *o*-tolualdehído (2,58 mmol, 310 mg) rindió **IIIb** (433 mg, 55%).  
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,97 (s, 1H), 8,20 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,62 (m, 1H), 7,49 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,32-7,22 (m, 2H), 7,13 (m, 1H), 5,86 (s, 1H), 4,90 (bs, 1H), 2,00 (s, 3H), 1,34 (s, 9H).  
30

35  
*N*-[5-cloro-3-[hidroxi(2'-isopropilfenil)metil]piridin-2-il]pivalamida (**IIIc**).



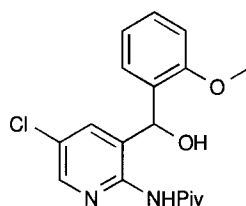
5 Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de *N*-[5-cloro-3-[hidroxiarilmetil]piridin-2-il]pivalamida (**III**), la reacción de **IIa** (500 mg, 2,35 mmol) con 2-isopropilbenzaldehído (2,58 mmol, 383 mg) rindió **IIIc** (405  
10 mg, 48%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,60 (s, 1H), 8,25 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 1H), 7,83 (m, 1H), 7,45 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 1H), 7,36-7,31 (m, 2H), 7,29-7,24 (m, 1H), 5,95 (s, 1H), 4,71 (bs, 1H), 2,63 (p,  $J$  = 6,9 Hz, 1H), 1,41 (s, 9H), 1,21 (d,  $J$  = 6,9 Hz, 3H), 0,69 (d,  $J$  = 6,9 Hz, 3H).

15 *N*-[5-cloro-3-[hidroxi(2'-trifluorometilfenil)metil]piridin-2-il]pivalamida (**IIId**).



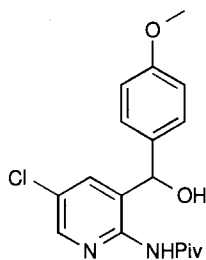
20 Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de *N*-[5-cloro-3-[hidroxiarilmetil]piridin-2-il]pivalamida (**III**), la reacción de **IIa** (500 mg, 2,35 mmol) con 2-trifluorometilbenzaldehído (2,58 mmol, 449 mg) rindió **IIId**  
25 (450 mg, 50%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,36 (s, 1H), 8,23-8,21 (m, 2H), 7,71 (m, 1H), 7,61 (m, 1H), 7,44 (m, 1H), 7,40 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 1H), 6,11 (bs, 1H), 4,71 (d,  $J$  = 2,7 Hz, 1H), 1,39 (s, 9H).

30 *N*-[5-cloro-3-[hidroxi(2'-metoxifenil)metil]piridin-2-il]pivalamida (**IIIe**).



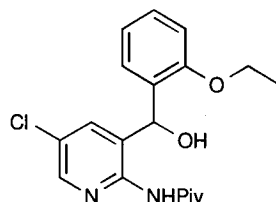
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de *N*-[5-cloro-3-[hidroxiarilmetil]piridin-2-il]pivalamida (**III**), la reacción de **IIa** (500 mg, 2,35 mmol) con 2-metoxibenzaldehído (2,58 mmol, 352 mg) rindió **IIIe** (620 mg, 76%). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,61 (s, 1H), 8,32 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,38-7,30 (m, 2H), 7,09 (m, 1H), 6,90 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 5,90 (s, 1H), 4,38 (bs, 1H), 3,74 (s, 3H), 1,27 (s, 9H).

*N*-[5-cloro-3-[hidroxil(4'-metoxifenil)metil]piridin-2-yl]pivalamida (**IIIIf**).



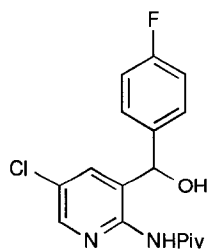
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de *N*-[5-cloro-3-[hidroxiarilmetil]piridin-2-il]pivalamida (**III**), la reacción de **IIa** (500 mg, 2,35 mmol) con 4-metoxibenzaldehído (2,58 mmol, 352 mg) rindió **IIIIf** (444 mg, 54%). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,28 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 8,22 (s, 1H), 7,55 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,20 (m, 1H), 6,87 (m, 1H), 5,77 (s, 1H), 3,80 (s, 3H), 1,25 (s, 9H).

*N*-[5-cloro-3-[hidroxi (2'-etoxifenil)metil]piridin-2-il]pivalamida (**IIIg**).



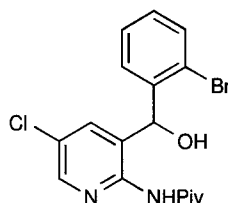
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de *N*-[5-cloro-3-[hidroxiarilmetil]piridin-2-il]pivalamida (**III**), la reacción de **IIa** (400 mg, 1,88 mmol) con 2-etoxibenzaldehído (2,07 mmol, 311 mg) rindió **IIIg** (376 mg, 55%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,50 (s, 1H), 8,30 (d,  $J$  = 1,8 Hz, 1H), 7,46-7,40 (m, 2H), 7,31-7,21 (m, 1H), 7,00 (m, 1H), 6,82 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 1H), 5,90 (s, 1H), 4,10-3,85 (m, 2H) 1,32-1,20 (m, 12H).

*N*-[5-cloro-3-[hidroxi (4'-fluorofenil)metil]piridin-2-il]pivalamida (**IIIh**).



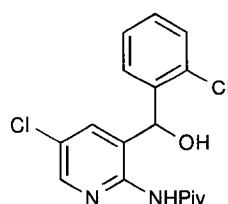
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de *N*-[5-cloro-3-[hidroxiarilmetil]piridin-2-il]pivalamida (**III**), la reacción de **IIa** (2 g, 9,41 mmol) con 4-fluorobenzaldehído (10,03 mmol, 1,28 g) rindió **IIIh** (2,47 g, 78%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,30 (d,  $J$  = 1,8 Hz, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,51 (m, 1H), 7,27 (m, 2H), 7,07 (m, 2H), 5,60 (s, 1H), 4,35 (bs, 1H) 1,25 (s, 9H).

*N*-[5-cloro-3-[hidroxi (2'-bromofenil)metil]piridin-2-il]pivalamida (**IIIi**).



Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de *N*-[5-cloro-3-[hidroxiarilmetil]piridin-2-il]pivalamida (**III**), la reacción de **IIa** (500 mg, 2,35 mmol) con 2-bromobenzaldehído (2,58 mmol, 478 mg) rindió **IIIi** (693 mg, 74%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,10 (s, 1H), 8,15 (d,  $J$  = 1,8 Hz, 1H), 7,80 (m, 1H), 7,40 (m, 2H), 7,32 (d,  $J$  = 1,8 Hz, 1H), 7,11 (m, 1H), 5,80 (s, 1H), 5,30 (bs, 1H), 1,32 (s, 9H).

*N*-[5-cloro-3-[hidroxi (2'-clorofenil)metil]piridin-2-il]pivalamida (**IIIj**).



Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de *N*-[5-cloro-3-[hidroxiarilmetil]piridin-2-il]pivalamida (**III**), la reacción de **IIa** (500 mg, 2,35 mmol) con 2-clorobenzaldehído (2,58 mmol, 363 mg) rindió **IIIj**, (805 mg, 97%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,24 (d,  $J$  = 1,8 Hz, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,93 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 1H), 7,43-7,38 (m, 2H),

7,28 (m, 2H), 5,85 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 4,98 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 1,38 (s, 9H).

5

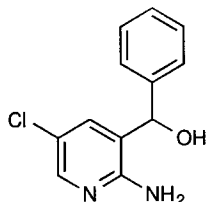
**Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metanol (IV).** A una solución de *N*-[5-cloro-3-[hidroxiarilmetil]piridin-2-il]pivalamida (**III**) en 1,4 dioxano (50 ml), fue añadido 50 ml de una solución acuosa de KOH 2M. La reacción se agitó a reflujo durante 24 h. Posteriormente, se enfrió y se extrajo tres veces con acetato de etilo (50 ml). La fase orgánica combinada se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y evaporó el disolvente, obteniendo un sólido amarillo con datos espectrales de acuerdo con su estructura, no necesitando de purificación adicional.

10

15

(2-amino-5-cloropiridin-3-il)(fenil)metanol (**IVa**).

20



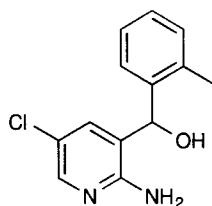
25

Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metanol (**IV**), la reacción de **IIIa** (205 mg, 0,65 mmol) rindió **IVa** (152 mg, >99%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,85 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,41-7,30 (m, 5H), 7,23 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 5,68 (s, 1H), 4,90 (bs, 3H).

30

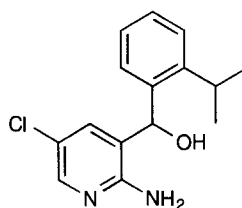
(2-amino-5-cloropiridin-3-il)(*o*-toluyl)metanol (**IVb**).

35



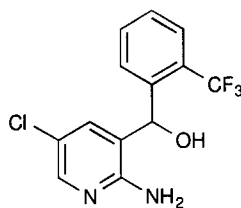
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metanol (**IV**), la reacción de **IIIb** (404 mg, 1,21 mmol) rindió **IVb** (300 mg, 99%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,72 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,39-7,29 (m, 1H), 7,29-7,10 (m, 3H), 6,98 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 5,80 (s, 1H), 5,02 (bs, 2H), 2,21 (s, 3H).

(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (2'-isopropil)metanol (**IVc**).



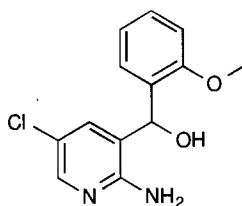
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metanol (**IV**), la reacción de **IIIc** (404 mg, 1,21 mmol) rindió **IVc** (242 mg, 72%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,80 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 7,71 (m, 1H), 7,44 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 7,34-7,29 (m, 2H), 7,26-7,21 (m, 1H), 5,90 (s, 1H), 4,99 (bs, 2H), 2,60 (p,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 1,20 (d,  $J = 6,9$  Hz, 3H), 0,66 (d,  $J = 6,9$  Hz, 3H).

(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (2'-trifluorometilfenil)metanol (**IVd**).



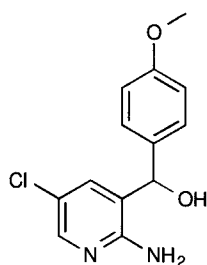
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metanol (**IV**), la reacción de **IIIId** (436 mg, 1,13 mmol) rindió **IVd** (342 mg, >99%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,81 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 7,72 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,62-7,60 (m, 2H), 7,49 (m, 1H), 7,05 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 4,94 (bs, 2H), 4,09 (bs, 1H).

(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (2'-metoxifenil)metanol (**IVe**).



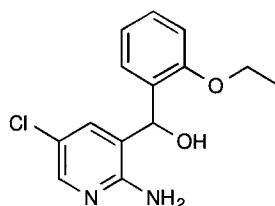
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metanol (**IV**), la reacción de **IIIIf** (620 mg, 1,78 mmol) rindió **IVe** (404 mg, 86%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,93 (m, 1H), 7,35 (m, 1H), 7,21-7,17 (m, 2H), 6,99 (m, 2H), 5,90 (s, 1H), 5,08 (bs, 2H), 3,85 (s, 3H).

(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (4'-metoxifenil)metanol (**IVf**).



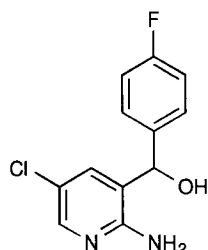
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metanol (**IV**), la reacción de **III f** (387 mg, 1,11 mmol) rindió **IV f** (293 mg, >99%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,91 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 7,28 (m, 3H), 6,91 (m, 2H), 5,65 (s, 1H), 4,83 (bs, 2H), 3,82 (s, 3H), 2,40 (bs, 1H).

(2-amino-5-cloropiridin-3-il)(2'-etoxifenil)metanol (**IVg**).



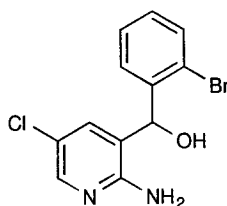
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metanol (**IV**), la reacción de **III g** (376 mg, 1,04 mmol) rindió **IV g** (269 mg, 93%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,71 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 7,41 (bs, 1H), 7,29-7,24 (m, 2H), 6,95 (m, 1H), 6,87 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 5,94 (s, 1H), 4,04 (m, 2H), 1,35 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H).

(2-amino-5-cloropiridin-3-il)(4'-fluorofenil)metanol (**IVh**).



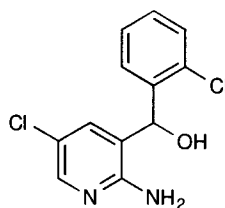
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metanol (**IV**), la reacción de **IIIh** (2,47 g, 7,33 mmol) rindió **IVh** (1,85 g, >99%). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,95 (m, 1H), 7,52-7,45 (m, 3H), 7,42 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,30-7,15 (m, 2H), 6,40 (bs, 3H), 5,89 (s, 1H).

(2-amino-5-cloropiridin-3-il)(2'-bromofenil)metanol (**IVi**).



Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metanol (**IV**), la reacción de **IIIi** (414 mg, 0,92 mmol) rindió **IVi** (257 mg, 89%). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,76 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,55 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,46 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,36 (m, 1H), 7,22 (m, 1H), 7,05 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 5,97 (s, 1H), 4,90 (m, 3H).

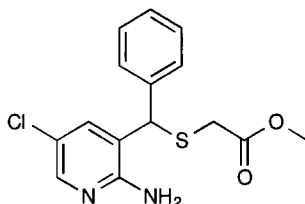
(2-amino-5-cloropiridin-3-il)(2'-clorofenil)metanol (**IVj**).



5 Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metanol (**IV**), la reacción de **IIIj** (1.00 g, 2,84 mmol) rindió **IVj** (807 mg, 75%). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,62 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,39 (m, 1H), 7,27 (m, 1H), 7,20 (m, 2H), 5,92 (s, 1H), 4,97 (bs, 3H).

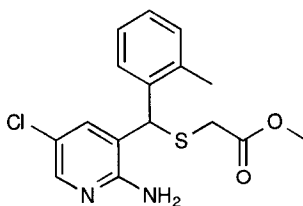
15 **Procedimiento general para la síntesis de 2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metiltio]acetate de metilo (V).** Se sigue un procedimiento experimental previamente descrito (Pei et al. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 92), con ligeras modificaciones. A una solución de (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metanol **IV** (1 equiv) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (10 ml), tioglicolato de metilo (4-6 equiv) y ácido trifluoroacético (10 ml) fueron añadidos bajo atmósfera de Ar. La reacción se agitó a 45 °C durante 24 h. Posteriormente, se eliminó el disolvente bajo presión reducida y el crudo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml), se lavó sucesivamente con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (30 ml), de NaOH al 30% (30 ml), y de salmuera (30 ml). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y evaporó, para obtener un aceite amarillo que fue purificado por cromatografía flash automatizada, utilizando mezclas de acetate de etilo:hexano como eluyente.

2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (fenil)metiltio]acetato de metilo (**Va**).



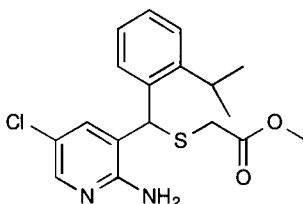
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (aril)metiltio]acetato de metilo (**V**), la reacción de **IVa** (198 mg, 0,84 mmol) con tioglicolato de metilo (3,37 mmol, 358 mg) rindió **Va** (183 mg, 67%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,92 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 7,50-7,34 (m, 5H), 7,07 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 5,53 (bs, 2H), 5,23 (s, 1H), 3,74 (s, 3H), 3,21 (d,  $J = 16,5$  Hz, 1H), 3,11 (d,  $J = 16,5$  Hz, 1H).

2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (o-toluil)metiltio]acetato de metilo (**Vb**).



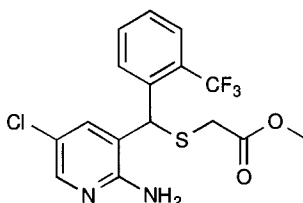
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (aril)metiltio]acetato de metilo (**V**), la reacción de **IVb** (330 mg, 1,33 mmol) con tioglicolato de metilo (5,31 mmol, 564 mg) rindió **Vb** (280 mg, 63%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,95 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 7,84 (m, 1H), 7,37-7,19 (m, 3H), 6,98 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 5,45 (s, 1H), 5,37 (bs, 1H), 3,74 (s, 3H), 3,20 (d,  $J = 16,5$  Hz, 1H), 3,12 (d,  $J = 16,5$  Hz, 1H).

2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (2'-  
isopropilfenil)metiltio]acetato de metilo (**Vc**).



Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 2-  
[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (aril)metiltio]acetato de  
metilo (**V**), la reacción de **IVc** (242 mg, 0,875 mmol) con  
tioglicolato de metilo (3,50 mmol, 371 mg) rindió **Vc** (234  
mg, 73%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,87 (d,  $J$  = 2,4 Hz,  
1H), 7,81 (m, 1H), 7,28-7,19 (m, 3H), 6,91 (d,  $J$  = 2,4 Hz,  
1H), 5,51 (s, 1H), 5,37 (bs, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,14 (d,  $J$   
= 16,5 Hz, 1H), 3,05 (d,  $J$  = 16,5 Hz, 1H), 2,79 (p,  $J$  = 6,9  
Hz, 1H), 1,11 (d,  $J$  = 6,9 Hz, 1H), 0,91 (d,  $J$  = 6,9 Hz,  
1H).

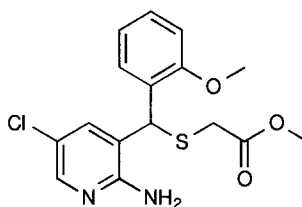
2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (2'-  
trifluorometilfenil)metiltio]acetato de metilo (**Vd**).



Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 2-  
[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (aril)metiltio]acetato de  
metilo (**V**), la reacción de **IVd** (315 mg, 0,85 mmol) con  
tioglicolato de metilo (4,90 mmol, 521 mg) rindió **Vd** (137

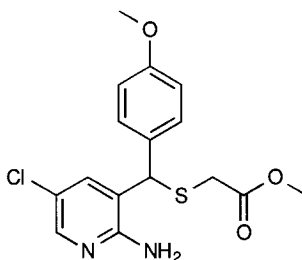
mg, 41%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,21 (m, 1H), 7,93 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 1H), 7,76-7,70 (m, 2H), 7,53-7,45 (m, 1H), 6,90 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 1H), 5,65 (bs, 1H), 5,60 (s, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,23 (d,  $J$  = 17,1 Hz, 1H), 3,08 (d,  $J$  = 16,5 Hz, 1H).

2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (2'-metoxifenil)metiltio]acetato de metilo (**Ve**).



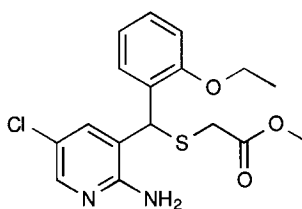
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (aril)metiltio]acetato de metilo (**V**), la reacción de **IVe** (461 mg, 1,75 mmol) con tioglicolato de metilo (6,98 mmol, 741 mg) rindió **Ve** (511 mg, 83%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,92 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 1H), 7,64 (dd,  $J$  = 7,8, 1,5 Hz, 1H), 7,33-7,27 (m, 2H), 7,04 (m, 1H), 6,90 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H), 5,63 (s, 1H), 5,21 (bs, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,71 (s, 3H), 3,20 (d,  $J$  = 15,9 Hz, 1H), 3,13 (d,  $J$  = 15,9 Hz, 1H).

2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (4'-metoxifenil)metiltio]acetato de metilo (**Vf**).



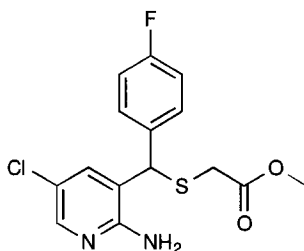
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 2-  
 [(2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metiltio]acetato de  
 metilo (**V**), la reacción de **IVf** (345 mg, 1,30 mmol) con  
 tioglicolato de metilo (5,21 mmol, 553 mg) rindió **Vf** (360  
 mg, 78%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,92 (d,  $J$  = 2,4 Hz,  
 1H), 7,64 (dd,  $J$  = 6,9, 2,1 Hz, 2H), 7,11 (d,  $J$  = 2,4 Hz,  
 1H), 6,94 (dd,  $J$  = 6,9, 2,1 Hz, 2H), 5,61 (bs, 1H), 5,18  
 (s, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,21 (d,  $J$  = 16,8 Hz,  
 1H), 3,13 (d,  $J$  = 16,8 Hz, 1H).

2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il)(2'-  
 etoxifenil)metiltio]acetato de metilo (**Vg**).



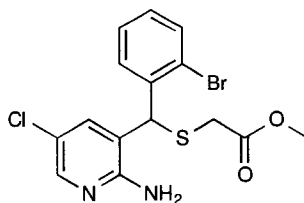
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 2-  
 [(2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metiltio]acetato de  
 metilo (**V**), la reacción de **IVg** (269 mg, 0,96 mmol) con  
 tioglicolato de metilo (3,86 mmol, 410 mg) rindió **Vg** (165  
 mg, 47%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,93 (d,  $J$  = 2,4 Hz,  
 1H), 7,65 (dd,  $J$  = 7,8, 1,8 Hz, 1H), 7,39 (d,  $J$  = 2,4 Hz,  
 1H), 7,28 (m, 1H), 7,07 (m, 1H), 6,90 (m, 1H), 5,70 (s,  
 1H), 5,27 (bs, 1H), 4,05 (m, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,21 (m,  
 2H), 1,36 (t,  $J$  = 6,9 Hz, 3H).

2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (4'-  
fluorofenil)metiltio]acetato de metilo (**Vh**).



Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 2-  
[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (aril)metiltio]acetato de  
metilo (**V**), la reacción de **IVh** (2,14 g, 8,47 mmol) con  
tioglicolato de metilo (33,88 mmol, 3,60 g) rindió **Vh** (2,22  
g, 77%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,93 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H),  
7,47 (m, 2H), 7,10 (m, 2H), 7,01 (m, d,  $J = 2,4$  Hz, 1H),  
5,39 (bs, 1H), 5,22 (s, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,22 (d,  $J =$   
15,0 Hz, 1H), 3,10 (d,  $J = 15,0$  Hz, 1H).

2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (2'-  
bromofenil)metiltio]acetato de metilo (**Vi**).



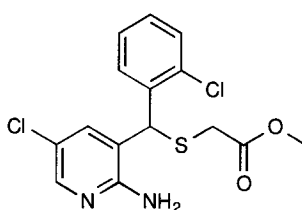
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 2-  
[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (aril)metiltio]acetato de  
metilo (**V**), la reacción de **IVi** (568 mg, 1,81 mmol) con  
tioglicolato de metilo (8,45 mmol, 897 mg) rindió **Vi** (236  
mg, 32%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,86 (m, 2H), 7,55 (m,

1H), 7,45 (m, 1H), 7,25 (m, 1H), 6,90 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 5,60 (s, 1H), 5,40 (bs, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,21 (d,  $J = 16,5$  Hz, 1H), 3,09 (d,  $J = 16,5$  Hz, 1H).

5

2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il) (2'-clorofenil)metiltio]acetato de metilo (**vj**).

10



15

Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metiltio]acetato de metilo (**v**), la reacción de **ivj** (864 mg, 2,29 mmol) con tioglicolato de metilo (9,17 mmol, 973 mg) rindió **vj** (599 mg, 73%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,86 (m, 2H), 7,34 (m, 2H), 7,26 (m, 1H), 6,88 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 5,87 (bs, 1H), 5,58 (s, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,18 (d,  $J = 16,5$  Hz, 1H), 3,07 (d,  $J = 16,5$  Hz, 1H).

20

25

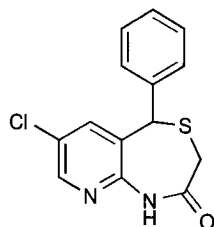
**Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-aril-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (I).** A una solución de 2-[(2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metiltio]acetate de metilo (**v**, 1 equiv) en THF recién destilado, LiHMDS (2 equiv, 1.0 M en hexano) se añadió gota a gota a  $-78^\circ\text{C}$  bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante 15 min y seguidamente lentamente atemperada hasta temperatura ambiente, permitiéndose agitar durante 24 h más. La reacción se paró por adición de solución saturada de

30

35

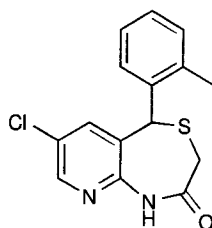
cloruro amónico (50 ml), y se extrajo con diclorometano (30 ml) tres veces. La fase orgánica resultante se lavó con salmuera (50 ml) tres veces, y se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó, obteniéndose un aceite amarillo, el cual se purificó mediante columna de cromatografía automatizada de gel de sílice neutralizada con 2% de NH<sub>3</sub>, usando mezclas de acetato de etilo:hexano.

7-cloro-5-fenil-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**Ia**).



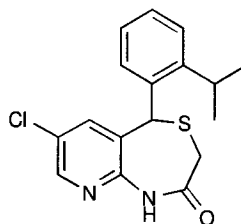
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-aril-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**I**), la reacción de **Va** (183 mg, 0,57 mmol) con LiHMDS (1,13 mmol, 1,13 ml) rindió **Ia** (90 mg, 54%) como un sólido blanco. Pf 180-182 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,32 (s, 1H), 8,32 (s, 1H), 7,47-7,38 (m, 5H), 7,28 (m, 1H), 5,65 (s, 1H), 3,39 (d, J = 12,9 Hz, 1H), 3,11 (d, J = 12,9 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (75,4 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 149,7, 146,0, 136,8, 136,7, 130,6, 128,9, 128,8, 128,3, 127,7, 45,9, 31,1. EMAR: m/z (M + H)<sup>+</sup> calc. para C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>2</sub>OS 291,0359, encontrado, 291,0361.

7-cloro-5-(o-toluil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**Ib**).



Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 7-  
 cloro-5-aril-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-  
 ona (**I**), la reacción de **Vb** (287 mg, 0,85 mmol) with LiHMDS  
 (1,71 mmol, 1,71 ml) rindió **Vb** (145 mg, 55%) como un sólido  
 blanco. Pf 184-186 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,29 (d,  $J$   
 = 2,4 Hz, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,67 (m, 1H), 7,37-7,22 (m,  
 3H), 7,13 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 1H), 5,84 (s, 1H), 3,38 (d,  $J$  =  
 13,2 Hz, 1H), 3,14 (d,  $J$  = 13,2 Hz, 1H), 2,10 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$   
 RMN (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  148,8, 146,6, 137,3, 136,4,  
 133,8, 131,6, 130,0, 129,9, 129,2, 128,9, 126,7, 43,4,  
 32,1, 19,6. EMAR:  $m/z$  ( $M + H$ ) $^+$  calc. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{OS}$   
 305,0515, encontrado 305,0518.

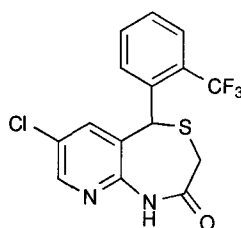
7-cloro-5-(2'-isopropilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-  
 e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**Ic**).



Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 7-  
 cloro-5-aril-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-  
 ona (**I**), la reacción de **Vc** (104 mg, 0,29 mmol) con LiHMDS  
 (0,57 mmol, 572  $\mu\text{l}$ ) rindió **Ic** (75 mg, 78%) como un sólido  
 blanco. Pf 189-191 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,28 (d,  $J$   
 = 2,4 Hz, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,71 (d,  $J$  = 7,8 Hz, 1H), 7,38

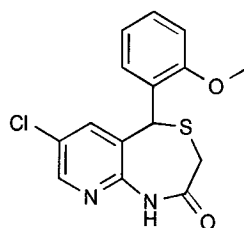
(m, 3H), 7,19 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 6,02 (s, 1H), 3,42 (d,  $J = 12,9$  Hz, 1H), 3,13 (d,  $J = 12,9$  Hz, 1H), 2,84 (p,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 1,24 (d,  $J = 6,9$  Hz, 3H), 0,90 (d,  $J = 6,9$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  148,2, 146,9, 146,4, 137,4, 131,9, 130,5, 129,7, 129,6, 129,1, 126,7, 126,2, 42,4, 32,1, 29,0, 24,1, 23,4. EMAR:  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_2\text{OS}$  333,0828, encontrado 333,0838.

7-cloro-5-(2'-trifluorometilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**Id**).



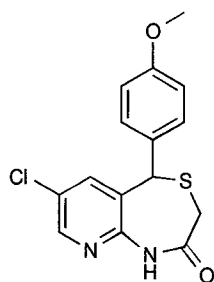
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-aril-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**I**), la reacción de **Vd** (136 mg, 0,35 mmol) con LiHMDS (0,70 mmol, 699  $\mu\text{l}$ ) rindió **Id** (63 mg, 50%) como un sólido blanco. Pf 199–201 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8,44 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 8,15 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,93–7,85 (m, 2H), 7,69 (m, 1H), 7,10 (m, 1H), 5,90 (s, 1H), 3,46 (d,  $J = 12,9$  Hz, 1H), 3,09 (d,  $J = 12,9$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75,4 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  149,2, 146,5, 135,3, 133,4, 133,3, 132,2, 129,7, 129,1, 128,2, 127,1 (c,  $J = 29,4$  Hz), 125,7, 122,1, 41,6, 31,7. EMAR  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> calc. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{OS}$  359,0233, encontrado 359,0230.

7-cloro-5-(2'-metoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**Ie**).



5 Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-aril-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**I**), la reacción de **Ve** (511 mg, 1,45 mmol) con LiHMDS (3,09 mmol, 3,09 ml) rindió **Ie** (147 mg, 32%) como un sólido blanco. Pf 191-193 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,65 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 1H), 7,65 (m, 2H), 7,35 (m, 1H), 7,25 (m, 1H), 7,10 (m, 1H), 6,91 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H), 6,06 (s, 1H), 3,72 (s, 3H), 3,35 (d,  $J$  = 12,9 Hz, 1H), 3,13 (d,  $J$  = 12,9 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156,7, 148,7, 146,3, 137,3, 130,7, 130,3, 130,1, 129,7, 123,9, 120,8, 111,3, 55,7, 39,9, 32,0. EMAR:  $m/z$  ( $M + H$ ) $^+$  calc. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$  321,0465, encontrado 321,0458.

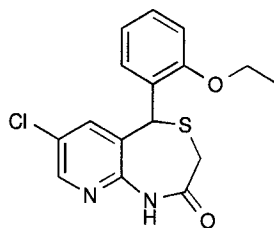
20 7-cloro-5-(4'-metoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**If**).



25 Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-aril-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**I**), la reacción de **Vf** (360 mg, 1,02 mmol) con LiHMDS (2,23 mmol, 2,23 ml) rindió **If** (101 mg, 30%) como un sólido blanco. Pf 223-225 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,65 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 1H), 7,65 (m, 2H), 7,35 (m, 1H), 7,25 (m, 1H), 7,10 (m, 1H), 6,91 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H), 6,06 (s, 1H), 3,72 (s, 3H), 3,35 (d,  $J$  = 12,9 Hz, 1H), 3,13 (d,  $J$  = 12,9 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156,7, 148,7, 146,3, 137,3, 130,7, 130,3, 130,1, 129,7, 123,9, 120,8, 111,3, 55,7, 39,9, 32,0. EMAR:  $m/z$  ( $M + H$ ) $^+$  calc. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$  321,0465, encontrado 321,0458.

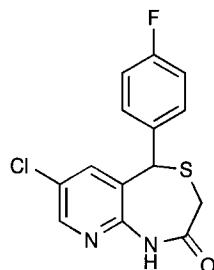
= 2,1 Hz, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,41 (dd,  $J$  = 1,8, 6,9 Hz, 2H), 7,35 (d,  $J$  = 2,1 Hz, 1H), 7,00 (dd,  $J$  = 1,8, 6,9 Hz, 2H), 5,63 (s, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,40 (d,  $J$  = 12,9 Hz, 1H), 3,14 (d,  $J$  = 12,9 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159,7, 160,0, 148,5, 146,4, 137,6, 130,9, 130,6, 129,8, 127,2, 114,6, 55,5, 46,4, 32,1. Anal. Calc. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ : C, 56,16; H, 4,08; N, 8,73. Encontrado: C, 55,85; H, 4,33; N, 8,27.

7-cloro-5-(2'-etoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-*e*][1,4]tiazepin-2(1*H*)-ona (**Ig**).



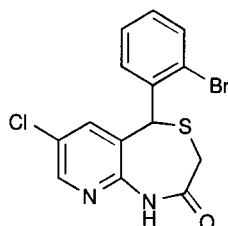
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-aril-3,5-dihidropirido[2,3-*e*][1,4]tiazepin-2(1*H*)-ona (**I**), la reacción de **Vg** (165 mg, 0,45 mmol) con LiHMDS (0,90 mmol, 896  $\mu\text{l}$ ) rindió **Ig** (61 mg, 46%) como un sólido blanco. Pf 190-192 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,67 (d,  $J$  = 2,1 Hz, 1H), 7,67 (m, 2H), 7,34 (m, 2H), 7,06 (m, 1H), 6,87 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H), 5,98 (s, 1H), 3,93 (m, 2H), 3,32 (d,  $J$  = 15,0 Hz, 1H), 3,17 (d,  $J$  = 15,0 Hz, 1H), 1,23 (t,  $J$  = 6,9 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163,4, 163,2, 156,0, 146,1, 137,8, 130,1, 129,9, 128,6, 122,3, 120,7, 112,4, 63,9, 40,7, 31,9, 14,7. Anal. Calc. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ : C, 57,40; H, 4,52; N, 8,37. Encontrado: C, 57,13; H, 4,62; N, 8,14.

7-cloro-5-(4'-fluorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**1h**).



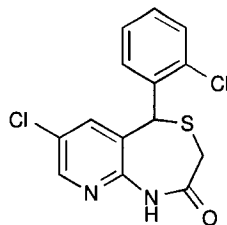
Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-aril-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**1**), la reacción de **Vh** (2,22 g, 6,51 mmol) con LiHMDS (13,02 mmol, 13,0 ml) rindió **1h** (1,43 g, 71%) como un sólido blanco. Pf 201-203 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,81 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 7,81 (s, 1H), 7,45 (m, 2H), 7,27 (m, 1H), 7,14 (m, 2H), 5,61 (s, 1H), 3,36 (d,  $J = 12,9$  Hz, 1H), 3,12 (d,  $J = 12,9$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  RMN (50,2 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  168,7, 161,7 (d,  $J = 245,0$  Hz), 149,6, 146,1, 136,9, 133,1 (d,  $J = 4,0$  Hz), 131,0 (d,  $J = 8,5$  Hz), 130,5, 127,7, 115,6 (d,  $J = 22,1$  Hz), 45,1, 31,1. IR (KBr)  $1694\text{ cm}^{-1}$ . EMAR:  $m/z$  ( $\text{M} + \text{H}^+$ ) calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClFN}_2\text{OS}$  309,0265, encontrado, 309,0259. Anal. Calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClFN}_2\text{OS}$ : C, 54,46; H, 3,26; N, 9,07. Encontrado: C, 54,70; H, 3,58; N, 8,90.

7-cloro-5-(2'-bromofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**1i**).



Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 7-  
 cloro-5-aril-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-  
 ona (**I**), la reacción de **Vi** (236 mg, 0,59 mmol) con LiHMDS  
 (1,18 mmol, 1,18 ml) rindió **Ii** (123 mg, 56%) como un sólido  
 blanco. Pf 200-202 °C.  $^1\text{H}$  RMN (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10,50 (s, 1H), 7,83 (d,  $J$  = 7,8 Hz, 1H), 7,72 (d,  $J$  = 8,1 Hz, 1H), 7,59 (m, 1H), 7,40 (m, 1H), 7,10 (m, 1H), 5,86 (s, 1H), 3,36 (d,  $J$  = 12,9 Hz, 1H), 3,12 (d,  $J$  = 12,9 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  RMN (50,2 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168,6, 149,7, 146,3, 135,9, 134,8, 133,6, 131,0, 130,7, 128,8, 128,4, 127,9, 123,8, 45,4, 31,1. EMAR:  $m/z$  ( $M + H$ ) $^+$  calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrClN}_2\text{OS}$  368,9464, encontrado 368,9458. Anal. Calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClFN}_2\text{OS}$ : C, 45,46; H, 2,73; N, 7,58. Encontrado: C, 45,34; H, 3,04; N, 7,38.

7-cloro-5-(2'-clorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-  
 e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona (**Ij**).



Siguiendo el Procedimiento general para la síntesis de 7-  
 cloro-5-aril-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-  
 ona (**I**), la reacción de **Vj** (599 mg, 1,68 mmol) con LiHMDS  
 (3,36 mmol, 3,36 ml) rindió **Ij** (258 mg, 47%) como un sólido

blanco. Pf 182-184 °C.  $^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  10,44 (s, 1H), 7,85 (dd,  $J = 1,5, 6,9$  Hz, 1H), 7,58-7,41 (m, 3H), 7,19 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 5,88 (s, 1H), 3,33 (d,  $J = 12,9$  Hz, 1H), 3,14 (d,  $J = 12,9$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  RMN (50,2 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  168,7, 149,7, 146,4, 136,2, 133,4, 132,8, 130,8, 130,4, 130,3, 128,9, 128,0, 127,8, 43,0, 31,1. EMAR:  $m/z$  ( $M + H$ ) $^+$  calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OS}$  324,9969, encontrado, 324,9970. Anal. Calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OS}$ : C, 51,70; H, 3,10; N, 8,61. Encontrado: C, 51,68; H, 3,56; N, 8,37.

## **Ejemplo 2.- Propiedades biológicas de los compuestos objeto de la invención.**

### **2.1. Bloqueo de la salida de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial**

Para evaluar la habilidad de los derivados **Ia-j** para regular la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, se han llevado a cabo dos protocolos experimentales. En el primer bloque de experimentos, útil para el cribado de un gran número de compuestos, células HeLa se estimularon con histamina, la cual interacciona con sus receptores específicos del tipo 1 de la membrana plasmática acoplados a proteínas G, lo que induce la acción enzimática de fosfolipasa C, que transforma  $\text{PIP}_2$  en  $\text{IP}_3$ . El  $\text{IP}_3$  se une a su receptor específico del retículo endoplásmico y de esta interacción se dispara la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos del retículo al citosol; este  $\text{Ca}^{2+}$  liberado es rápidamente captado por las mitocondrias, ya que ambas organelas tienen íntimos nexos de unión. La subida de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior mitocondrial y su subsiguiente salida, ya que la

mitocondria no tiene la capacidad de almacenar  $\text{Ca}^{2+}$ , se puede monitorizar por la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  luminiscente aecuorina dirigida a la mitocondria. La exposición en este experimento de potenciales bloqueantes del mNCX debería modificar la forma e intensidad de los registros de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. El uso de células HeLa es un modelo apropiado para medir la actividad bloqueante de mNCX, ya que esta línea celular no posee canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, ni tampoco intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática, que son dianas biológicas reconocidas de este tipo de derivados de tiazepina análogas a CGP37157. Los parámetros cinéticos estudiados sobre los registros de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial han sido la constante de aclaramiento, definida como tasa de caída ( $\tau_{\text{off}}$ ), la constante de captación, definida como la tasa de subida ( $\tau_{\text{on}}$ ), el área bajo la curva (AUC) y el pico máximo alcanzado de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial.

Este protocolo experimental parte de la siembra de células HeLa, las cuales son transfectadas con una aecuorina dirigida a la mitochondrial y de baja afinidad a  $\text{Ca}^{2+}$ . Después de 48 h de expresión, las células se incuban con su grupo prostético, celenteracina native (2,5  $\mu\text{M}$ ), durante 1,5 h. La bioluminiscencia inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  se registra con un luminómetro construido a tal efecto. La cantidad de fotones fue calibrada en términos de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ) lisando las células con digitonina (100  $\mu\text{M}$ ) y utilizando un muy alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (hasta 10 mM) al final de cada experimento para neutralizar irreversiblemente toda la aecuorina funcional, según se ha descrito en la literatura (Rizzuto, R. et al. *Nature* **1992**, 358, 325). La monocapa de células que expresan la aecuorina mitochondrial se perfundió durante todo el experimento con

tampón extracelular Krebs-HEPES conteniendo (en mM) 125 NaCl, 5 KCl, 1 Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub>, 5,5 glucosa, 20 HEPES, 1 Ca<sup>2+</sup>, con pH 7.4 a temperatura ambiente (24 ± 2 °C). Para los experimentos con histamina, un pulso de esta a 100 μM de 30 s fue aplicado (Figura 1).

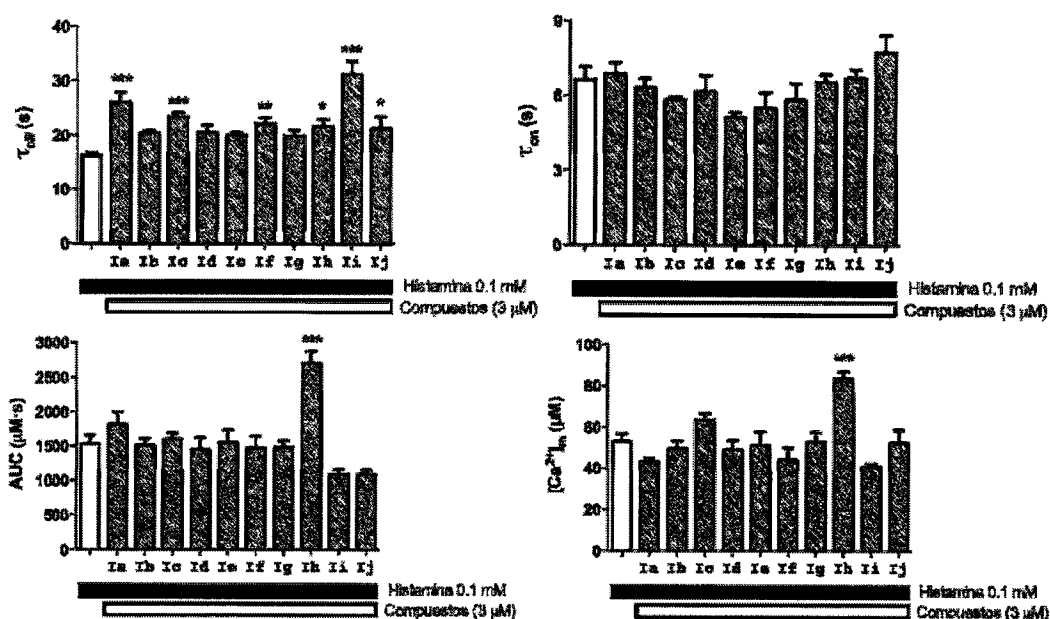


Figura 1. Efecto de los compuestos Ia-j objeto de la invención sobre la oscilación del Ca<sup>2+</sup> mitocondrial provocada por histamina 0,1 mM en células HeLa. Media de al menos 10 experimentos con células de 4 cultivos diferentes. Los datos son expresados como media ± eem. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, respecto del control en ausencia de compuestos (barras blancas).

Como se aprecia en la figura 1, el compuesto **Ih** incrementó profundamente la AUC y el pico máximo. Los compuestos **Ia**, **Ic**, **If**, **Ih**, **Ii** e **Ij** enlentecieron la salida de Ca<sup>2+</sup> de la mitocondria.

Según los datos obtenidos y que se reflejan en la figura 1, el compuesto **Ih** se posiciona como el más prometedor candidato para evaluar su actividad bloqueadora de mNCX en el segundo tipo de experimentos, donde se utilizan células permeabilizadas con digitonina, de acuerdo con el protocolo experimental que se describe a continuación.

Siguiendo el protolo de siembra y expresión de aecuatorin anteriormente descrito, una vez que la señal de lumiscencia alcanzó un nivel estacionario, las células fueron permeabilizadas durante 15 s con 100  $\mu\text{M}$  digitonin en una solución intracelular que contiene (en mM): 130 KCl, 10 NaCl, 1  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , 1 ATP, 5 succinato de sodio, 10 HEPES, (pH 7 a 24 °C), suplementado con 0,5 mM EGTA. Las células se estabilizan durante 2 min con esta solución intracelular y, posteriormente, se reemplaza con otra conteniendo 5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  en vez de EGTA. Una vez que el  $\text{Ca}^{2+}$  entra en la matriz mitocondrial y alcanza un pico, la solución se reemplaza por otra conteniendo los compuestos, a diferentes concentraciones, **Ih** o CGP37157, utilizado como compuesto de referencia con propósitos comparativos o por un solución con KCl 10 mM y en ausencia de  $\text{Na}^+$ , que marca la situación de parada total del mNCX ( $\text{Na}^+$ ).

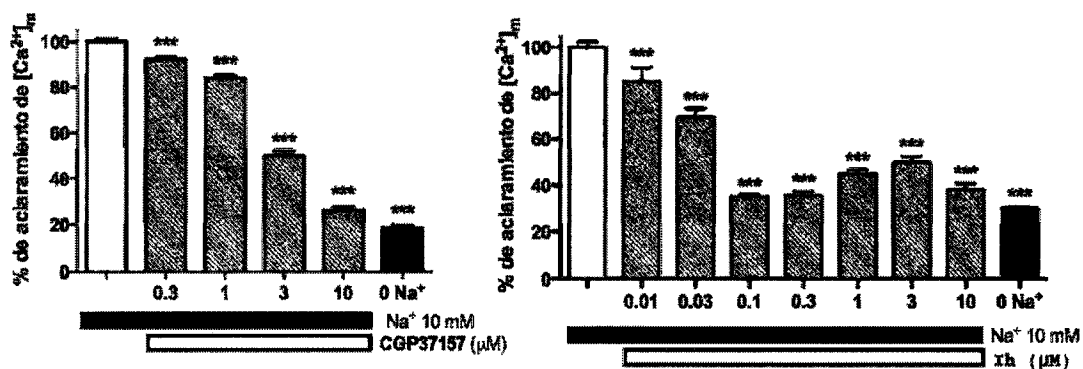


Figura 2. Efecto sobre el aclaramiento de  $[Ca^{2+}]_m$  inducido por 10 mM de  $Na^+$ , medido con aecuatorina mitocondrial. La captación de  $Ca^{2+}$  por las mitocondria fue provocada por aplicación de una solución intracelular con 5  $\mu M$  de  $Ca^{2+}$ , y su posterior liberación se indujo con una solución intracelular conteniendo  $Na^+$  10 mM. Los datos son expresados como media  $\pm$  eem de al menos 10 experimentos con células de 4 cultivos diferentes. \*\*\*p < 0.001, respecto de la máxima actividad del mNCX en ausencia de compuestos (barras blancas).

Según se aprecia en la Figura 2, la liberación de  $Ca^{2+}$  observada en una situación de parada total de la actividad del mNCX, debe ser atribuida a la actividad de la bomba  $Ca^{2+}/H^+$ . Como se observa en la gráfica de la izquierda de la Figura 2, el CGP37157, desde 3  $\mu M$ , promovió una gran y significativa reducción del aclaramiento de  $[Ca^{2+}]_m$ . Con estos datos, se calculó una  $EC_{50}$  of 1.6  $\mu M$  was, similar a la previamente descrita (Pei, Y. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 92). El compuesto seleccionado **1h** produjo un dramático bloqueo del aclaramiento de  $[Ca^{2+}]_m$  clearance en un amplio rango de concentraciones desde 10 nM, mostrando una  $EC_{50}$  de 56 nM; siendo por tanto 29 veces más potente que el compuesto de referencia CGP37157.

## 2.2. Bloqueo de las corrientes de $Ca^{2+}$ a través de canales de $Ca^{2+}$ dependientes de voltaje

Por tanto, nos encontramos ante una nueva herramienta farmacológica para estudiar el mNCX de forma más precisa que con el fármaco que se ha utilizado durante los últimos 30 años. No obstante, teniendo en cuenta la reconocida actividad bloqueadora de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de

voltaje (CCDV) por parte de CGP37157 (Baron, KT et al *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, 340, 295), una pregunta lógica es si la familia de compuestos **I**, y en particular **Ih**, podría también estar bloqueando CCDV. Para contestar esta pregunta, se han realizado experimentos de patch-clamp, registrándose la modulación ejercida por **Ih** y CGP37157 sobre las corrientes de globales  $\text{Ca}^{2+}$  con la configuración de parche perforado en célula completa, en células cromafines bovinas sometidas a pulsos despolarizantes, según el protocolo que se describe a continuación.

Para generar el parche, se utilizó anfotericina B como agente permeabilizante, según un protocolo convenientemente descrito (Rae, J. *J. Neurosci. Methods* **1991**, 37, 15). Un sello de más de 5  $\text{G}\Omega$  fue inducido en solución estándar Tyrode compuesta por (en mM): 137 NaCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\text{CaCl}_2$ , 5,3 KCl, 10 glucosa y 10 HEPES; tetrodotoxina se aplicó a 1  $\mu\text{M}$  para bloquear las corrientes de  $\text{Na}^+$ . La solución intracelular, donde se aplicó anfotericina B para inducir el parche perforado, tuvo la siguiente composición (en mM): 100 CsCl, 14 EGTA, 20 TEA-Cl, 10 NaCl, 5 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP, and 20 HEPES/CsOH, pH 7,3. La corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se registraron a temperatura ambiente (22-25 °C), utilizando una amplificador de patch-clamp EPC-10 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) controlado por un software PULSE sobre una estación de trabajo compatible con IBM. La resistencia de acceso se monitorizó hasta que bajó a menos de 20  $\text{M}\Omega$ . En todos los registros, el potencial de reposo fue -80 mV. La corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a pulsos despolarizantes de 50 ms depolarizing voltage steps, desde -80 to 0 mV. La amplitud de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  se midió en el pico máximo de corriente durante el pulso despolarizante de 50 ms. pulse. Este protocolo fue aplicado cada 15 s durante los siguientes 3 min, en donde se alcanza el máximo grado de

bloqueo. Las señales se filtraron a 5 kHz, digitalizadas a 50 kHz, y sustraída la corriente de fuga mediante un protocolo P/4.

Según este protocolo, la administración de CGP37157 a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  bloqueó la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  un  $38 \pm 4\%$ , mientras que el compuesto **Ih** a la misma concentración, solo reduce la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  un  $11 \pm 1\%$ . Siendo esta una concentración mucho más alta que la observada como  $\text{EC}_{50}$  para bloquear mNCX, este dato de bloqueo nos habla de la alta selectividad que presenta **Ih** hacia su diana mitocondrial. Más aun, experimentos similares llevados a cabo sin la presencia del bloqueador de canales de  $\text{Na}^+$  tetrodotoxina evidencia que **Ih** tampoco interacción con los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje.

### **2.3. Actividad neuroprotectora de los compuestos de la invención.**

Se evaluó el efecto citoprotector de los compuestos en células cromafines bovinas, células de neuroblastoma humano y en rodajas de hipocampo de rata. Los tóxicos empleados fueron veratridina 20  $\mu\text{M}$  en células cromafines bovinas, que produce daño por despolarización mediante el aumento del tiempo de apertura de los canales de  $\text{Na}^+$ , alto  $\text{K}^+$  (70 mM) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, que produce daño por despolarización mediante la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, el cóctel de rotenona 30  $\mu\text{M}$  más oligomicina A 10  $\mu\text{M}$  en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, que provoca estrés oxidativo mediante el bloqueo de la cadena respiratoria mitocondrial según se describe en *J. Neurochem.* **1992**, 59, 1609-1623 y en *Toxicological Sciences* **2004**, 79, 137-146, y glutamato 1 mM en rodajas de hipocampo de rata, que produce daño por despolarización y

excitotoxicidad mediante activación de los receptores de glutamatao sensibles a *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA)

Para el estudio de la muerte por veratridina, se eligió el método colorimétrico de liberación de lactato deshidrogenasas (LDH) mediante un protocolo previamente descrito (Nicolau S. et al *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, 330, 844). La veratridina causa la sobrecarga de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  por retraso en la inactivación de canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje, lo que incrementa la entrada de este ion y la consiguiente despolarización. En estos experimentos, se utilizó como compuesto protector de referencia el bloqueador de canales de  $\text{Na}^+$  tetrodotoxina (TTX). En estos experimentos se utilizaron células cromafines bovinas de la médula adrenal bovina siguiendo el método descrito previamente por Livett et al (*Physiol. Rev.* **1984**, 64, 1103-1161) con algunas modificaciones (Moro, M.A. et al. *Anal. Biochem.* **1990**, 185, 243). Las células se suspendieron en un medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con un 5% de suero fetal bovino, citosina arabinósido 10  $\mu\text{M}$ , fluorodesoxiuridina 10  $\mu\text{M}$ , 50 UI  $\text{ml}^{-1}$  de penicilina y 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de estreptomycin. Seguidamente se sembraban a una densidad de  $2 \times 10^5$  células por pocillo en placas Costar de 48 pocillos.

Para estudiar la acción citoprotectora de los diferentes compuestos contra la muerte celular inducida por una sobrecarga de calcio inducida por veratridina 20  $\mu\text{M}$ , todos los compuestos se evaluaron a la concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Para ello, las células se trataron con el producto a evaluar durante 24 horas. Después, los medios se reemplazaron por medios frescos que aún contenían el compuesto más los agentes citotóxicos, y se mantuvieron así por un período adicional de 24 horas. El parámetro de viabilidad que se midió fue la actividad de la enzima

lactatodeshidrogenasa (LDH en lo sucesivo), una enzima que se libera al medio extracelular cuando muere la célula (*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 1346-1353), midiendo la actividad de la enzima LDH mediante el kit "Cytotoxicity Cell Death" (Roche-Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante de dicho kit. Las muestras se analizaron espectrofotométricamente en un lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF), empleando el filtro adecuado (490 nm), obteniendo los valores de absorbancia mediante el programa DeltaSOFTIII Versión 3,71 EMS. La actividad LDH total se definió como la suma de las actividades LDH intra y extracelular. La actividad LDH liberada por las células al morir fue definida como el porcentaje de la actividad LDH extracelular frente a la actividad LDH total.

Para la medida de viabilidad celular en los experimentos con células de neuroblastoma humano SH-SY5Y o rodajas de hipocampo de rata se utilizó el ensayo que se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazan), lo que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas (*J. Immunol.Meth.* **1983**, 65, 55-63). El método experimental utilizado, siguiendo un procedimiento previamente descrito (*Neuropharmacology* **2004**, 46, 103-114) es el siguiente: las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano se sembraron y cultivaron en un medio MEM-F12 conteniendo 15 aminoácidos no esenciales y suplementada con un 10% de suero fetal de ternera, glutamina 1 mM, 50 un./ml y 0,05 mg/ml de estreptomicina, manteniéndolas a 37°C en aire humidificado conteniendo 5% de dióxido de carbono. En los ensayos, las células SH-SY5Y fueron subcultivadas en placas de 48 pocillos con una densidad de sembrado de  $1 \times 10^5$  células por

pocillo. En los experimentos de citotoxicidad, las células así preparadas fueron tratadas con los compuestos a medir en MEM-F12 con un 1% de suero.

5 Para las rodajas de hipocampo, se sigue un protocolo previamente descrito (Lorrio S. et al *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, 4, 1267). Se somete a anestesia con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) a ratas Sprague-Dawley de dos meses de edad y entre 275 y 325 g de peso, siguiendo un protocolo  
10 de sacrificio indicado por la Directiva del Consejo de la Unión Europea, y aprobado por el Comité de Ética de experimentación animal de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Se hicieron los máximos esfuerzos para reducir el número de animales y su sufrimiento. Se decapitan y los cerebros se separan rápidamente del cráneo y se sumergen en un tampón de disección helado de Krebs-bicarbonato (pH 7.4), que contiene (en mM): NaCl 120, KCl, CaCl<sub>2</sub> 0.5, NaHCO<sub>3</sub> 26, MgSO<sub>4</sub> 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, glucose 11, y sacarosa 200. Los hipocampos  
15 son rápidamente extraídos y cortados en rodajas de 300 µm de grosor con un cortador McIlwain tissue. Las rodajas obtenidas se sumergen por separado en tampón Krebs a 4 °C durante 45 a 34 °C para estabilizar el preparado.

25 Los experimentos de viabilidad celular se llevaron a cabo a 37 °C. Las células se trataron con los compuestos a evaluar durante 24 horas. Las rodajas de hipocampo no se sometieron a este periodo de preincubación. Los medios se reemplazaron por medios frescos que aún contenían el compuesto más los agentes citotóxicos, y se mantuvieron por un período  
30 adicional de 24 horas, 2 horas en el caso de rodajas de hipocampo. La viabilidad celular se comprobó midiendo la reducción de MTT soluble, de color amarillo, a un formazán insoluble de color azul. Para ello, se añadieron 5 mg/ml del reactivo de MTT comercial (Sigma) a cada pocillo con  
35

0,5 ml de medio, manteniendo las placas de cultivo durante 2 horas, 30 min en el caso de rodajas de hipocampo, en oscuridad y a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se retiró suavemente el medio sobrenadante, quedando depositado un precipitado que se disolvió con 0,3 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Tras 10 minutos agitando se tomaron muestras de los pocillos y se leyó la absorbancia en un lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF) a una longitud de onda de 540 nanómetros. Los valores de absorbancia obtenidos con el tóxico solo y con cada compuesto en presencia del tóxico se restaron del valor de absorbancia obtenido en condiciones basales, sin tratamiento. El valor obtenido de la resta de los valores de absorbancia basal menos tóxico solo, se consideró el 100 % de muerte y los valores obtenidos con los compuestos en presencia de tóxico se normalizaron como porcentajes de dicho valor. Para calcular el porcentaje de supervivencia, se restaron estos valores de 100.

En todos los ensayos farmacológicos se utilizó un control positivo como comparación y para evaluar la bondad del método empleado. En el caso de los experimentos con rotenona/oligomicina A se utilizó Melatonina 0,3  $\mu\text{M}$ , sustancia con reconocida actividad antioxidante. En el caso de los experimentos con 70 mM  $\text{K}^+$ , se utilizó como sustancia protectora de referencia el calcio-antagonista nifedipino 3  $\mu\text{M}$ . En el caso de los experimentos con Glu 1 mM, se utilizó como sustancia protectora de referencia el bloqueador de receptores de NMDA memantina 10  $\mu\text{M}$ .

Los resultados obtenidos para los compuestos descritos como **compuestos Ia a Ij** que se muestran en las Tabla 1, 2, 3 y 4, vienen expresados en porcentaje de protección.

**Tabla 1.-** Porcentaje de protección ejercido por los compuestos **Ia** a **Ij**, a la concentración de 10  $\mu\text{M}$ , frente a veratridina 20  $\mu\text{M}$  en células cromafines bovinas, medido como liberación de LDH

| Compuesto       | X  | R                  | % Protección <sup>a</sup> |
|-----------------|----|--------------------|---------------------------|
| <b>TTX</b>      | -  | -                  | 88 $\pm$ 10***            |
| <b>CGP37157</b> | CH | 2-Cl               | 76 $\pm$ 13***            |
| <b>Ia</b>       | N  | H                  | 6 $\pm$ 3 <sup>ns</sup>   |
| <b>Ib</b>       | N  | 2-CH <sub>3</sub>  | 14 $\pm$ 7 <sup>ns</sup>  |
| <b>Ic</b>       | N  | 2- <sup>i</sup> Pr | 49 $\pm$ 8**              |
| <b>Id</b>       | N  | 2-CF <sub>3</sub>  | 17 $\pm$ 4 <sup>ns</sup>  |
| <b>Ie</b>       | N  | 2-OMe              | 27 $\pm$ 8*               |
| <b>If</b>       | N  | 4-OMe              | 27 $\pm$ 8*               |
| <b>Ig</b>       | N  | 2-OEt              | 17 $\pm$ 9 <sup>ns</sup>  |
| <b>Ih</b>       | N  | 4-F                | 22 $\pm$ 9 <sup>ns</sup>  |
| <b>Ii</b>       | N  | 2-Br               | 23 $\pm$ 4 <sup>ns</sup>  |
| <b>Ij</b>       | N  | 2-Cl               | 22 $\pm$ 9 <sup>ns</sup>  |

<sup>a</sup>Datos expresados como media  $\pm$  eem de al menos 4 cultivos diferentes por triplicado. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, y ns = no significativo

Los compuestos **Ic**, **Ie** e **If** protegieron ligeramente frente al daño producido por veratridina, en una magnitud menor que el compuesto cabeza de serie CGP37157. Cabe destacar la sólida actividad bloqueante de canales de Na<sup>+</sup> que presenta CGP37157, razón de su amplia protección en este modelo.

**Tabla 2.-** Porcentaje de protección ejercido por los compuestos **Ia** a **Ij**, a la concentración de 3  $\mu\text{M}$ , frente a la exposición a solución extracelular con 70 mM K<sup>+</sup> en células

de neuroblastoma humano SH-SY5Y, medido por el método de la reducción de MTT.

|    | Compuesto  | X  | R                  | % Protección <sup>a</sup> |
|----|------------|----|--------------------|---------------------------|
| 5  | Nifedipino | -  | -                  | 24 ± 2*                   |
|    | CGP37157   | CH | 2-Cl               | 36 ± 6*                   |
|    | Ia         | N  | H                  | 21 ± 3*                   |
|    | Ib         | N  | 2-CH <sub>3</sub>  | 20 ± 3*                   |
| 10 | Ic         | N  | 2- <sup>i</sup> Pr | 28 ± 5*                   |
|    | Id         | N  | 2-CF <sub>3</sub>  | 19 ± 4 <sup>ns</sup>      |
|    | Ie         | N  | 2-OMe              | 17 ± 3 <sup>ns</sup>      |
|    | If         | N  | 4-OMe              | 10 ± 3 <sup>ns</sup>      |
|    | Ig         | N  | 2-OEt              | 28 ± 2*                   |
| 15 | Ih         | N  | 4-F                | 27 ± 4*                   |
|    | Ii         | N  | 2-Br               | 30 ± 2**                  |
|    | Ij         | N  | 2-Cl               | 33 ± 3*                   |

<sup>a</sup>Datos expresados como media ± eem de al menos 4 cultivos diferentes por triplicado. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, y ns = no significativo

Los compuestos **Ia**, **Ib**, **Ic**, **Ig**, **Ih**, **Ii** e **Ij** protegieron ligeramente frente al daño producido por alto K<sup>+</sup>, pero ninguno de ellos supera a CGP37157 en perfil neuroprotector. Es necesario recordar que CGP37157 es un bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> muy potente, lo que podría explicar este efecto.

**Tabla 3.-** Porcentaje de protección ejercido por los compuestos **Ia** a **Ij**, a la concentración de 10 µM, frente a glutamato 1 mM en rodajas de hipocampo de rata, medido por el método de la reducción de MTT.

| Compuesto | X | R | % Protección <sup>a</sup> |
|-----------|---|---|---------------------------|
|-----------|---|---|---------------------------|

|    |                  |    |                    |                      |
|----|------------------|----|--------------------|----------------------|
|    | <b>Memantina</b> | -  | -                  | 43 ± 5***            |
|    | <b>CGP37157</b>  | CH | 2-Cl               | 37 ± 9***            |
|    | <b>Ia</b>        | N  | H                  | 33 ± 5*              |
| 5  | <b>Ib</b>        | N  | 2-CH <sub>3</sub>  | 27 ± 14*             |
|    | <b>Ic</b>        | N  | 2- <sup>i</sup> Pr | 33 ± 4***            |
|    | <b>Id</b>        | N  | 2-CF <sub>3</sub>  | 42 ± 10**            |
|    | <b>Ie</b>        | N  | 2-OMe              | 13 ± 8 <sup>ns</sup> |
|    | <b>If</b>        | N  | 4-OMe              | 34 ± 7***            |
| 10 | <b>Ig</b>        | N  | 2-OEt              | 11 ± 8 <sup>ns</sup> |
|    | <b>Ih</b>        | N  | 4-F                | 20 ± 8 <sup>ns</sup> |
|    | <b>Ii</b>        | N  | 2-Br               | 28 ± 6**             |
|    | <b>Ij</b>        | N  | 2-Cl               | 27 ± 10**            |

<sup>a</sup>Datos expresados como media ± eem de al menos 4 cultivos diferentes por triplicado. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, y ns = no significativo

La mayoría de los compuestos ejercen un efecto protector importante frente al daño provocado por Glu. Cabe destacar los valores observados con **Ic** e **If**, además de **Id**, que supera en protección a CGP37157.

**Tabla 4.-** Porcentaje de protección ejercido por los compuestos **Ia** a **Ij**, a la concentración de 0,3 µM, frente a rotenona 30 µM más 10 µM en 1 mM en en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, medido por el método de la reducción de MTT.

| Compuesto | X | R | % Protección <sup>a</sup> |
|-----------|---|---|---------------------------|
|-----------|---|---|---------------------------|

|    |                   |    |                    |                      |
|----|-------------------|----|--------------------|----------------------|
|    | <b>Melatonina</b> | -  | -                  | 27 ± 3***            |
|    | <b>CGP37157</b>   | CH | 2-Cl               | 18 ± 3 <sup>ns</sup> |
|    | <b>Ia</b>         | N  | H                  | 30 ± 5***            |
| 5  | <b>Ib</b>         | N  | 2-CH <sub>3</sub>  | 21 ± 4 <sup>ns</sup> |
|    | <b>Ic</b>         | N  | 2- <sup>i</sup> Pr | 19 ± 8 <sup>ns</sup> |
|    | <b>Id</b>         | N  | 2-CF <sub>3</sub>  | 18 ± 2 <sup>ns</sup> |
|    | <b>Ie</b>         | N  | 2-OMe              | 19 ± 3 <sup>ns</sup> |
|    | <b>If</b>         | N  | 4-OMe              | 23 ± 8 <sup>ns</sup> |
| 10 | <b>Ig</b>         | N  | 2-OEt              | 26 ± 6*              |
|    | <b>Ih</b>         | N  | 4-F                | 24 ± 5*              |
|    | <b>Ii</b>         | N  | 2-Br               | 21 ± 5 <sup>ns</sup> |
|    | <b>Ij</b>         | N  | 2-Cl               | 11 ± 2 <sup>ns</sup> |

<sup>a</sup>Datos expresados como media ± eem de al menos 4 cultivos diferentes por triplicado.

\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001, y ns = no significativo

Solo tres compuestos protegieron frente al daño evocado por rotenona y oligomicina A, **Ia**, **Ig** e **Ih**, en magnitudes comparables al neuroprotector de referencia melatonina.

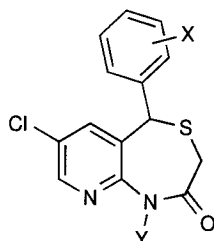
A la vista de estos resultados, los compuestos objeto de la invención, que presentan una actividad reguladora del mNCX, destacando el compuesto **Ih**, presentan una aparente actividad neuroprotectora en varios modelos in vitro de neurodegeneración. Cabe destacar el perfil neuroprotector de **Ia** y **Ic**, que mitigaron el daño producido por tóxicos en tres de cuatro modelos probados. El mejor bloqueador de la familia, el compuesto **Ih**, protegió frente al daño producido por alto K<sup>+</sup> y por el coctel de rotenonona y oligomicina A, sugiriendo que la regulación de mNCX juega un papel parcial en la señal citoprotectora, pero que no aumenta el daño, como se venía suponiendo en el caso de un gran acúmulo de Ca<sup>2+</sup> dentro de la mitocondria. Según se aprecia

en los valores encontrados con **Ih** a las concentraciones ensayas, no se aprecia que una reducción considerable de la tasa de aclaramiento mitocondrial pueda ser tan dañina como se esperaba.

Por otra parte, el propio descubrimiento de una herramienta farmacológica como **Ih**, casi 30 veces más potente que CGP37157 y muchísimo más selectiva, suponen un gran avance científico para el estudio del mNCX y su implicación en procesos fisiológicos y patológicos.

**REIVINDICACIONES**

1.- Compuesto de fórmula general **(I)**:



donde:

X representa hidrógeno o un átomo diferente a hidrógeno, bien de naturaleza electronegativa, libre o unido a cadenas alquílicas, bien grupos alquilo lineales o ramificados. La sustitución de este grupo se puede localizar en cualquiera de las posiciones del anillo de benceno. Se contempla la posibilidad de presentar dos grupos X iguales o diferentes en distintas posiciones del anillo de benceno.

Y representa un átomo de hidrógeno o grupos alquilo o vinilo. En general, cualquier grupo químico capaz de generar la molécula representada en la fórmula general **I**.

Los compuestos de la presente invención pueden ser mezclas racémicas o especies enantioméricamente puras o la mezcla en cualquier proporción de ambos enantiómeros.

2. Compuesto según la reivindicación 1 en el que Y es H.

3. Compuesto según la reivindicación 2 en el que X es H, metilo, metoxilo, etoxilo, fluor, cloro, bromo, isopropilo, o trifluorometilo

5

4. Compuesto según la reivindicación 3 en el que X es H, metilo en posición *orto*, metoxilo en posición *orto* o *para*, etoxilo en posición *orto*, fluor en posición *para*, cloro en posición *orto*, bromo en posición *orto*, isopropilo en posición *orto*, o trifluorometilo en posición *orto*, respecto a la posición de unión al núcleo de tiazepina.

10

5. Compuestos según la reivindicación 4, denominados como:

15

- 7-cloro-5-fenil-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona

- 7-cloro-5-(*o*-toluil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona

20

- 7-cloro-5-(2'-isopropilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona

- 7-cloro-5-(2'-isopropilfenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona

25

- 7-cloro-5-(2'-trifluorometilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona

- 7-cloro-5-(2'-metoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona

- 7-cloro-5-(4'-metoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona

30

- 7-cloro-5-(2'-etoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona

- 7-cloro-5-(4'-fluorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona

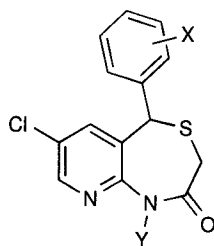
35

- 7-cloro-5-(2'-bromofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona
- 7-cloro-5-(2'-clorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][1,4]tiazepin-2(1H)-ona

6. Composición farmacéutica caracterizada porque comprende un compuesto de fórmula **I** según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

7.- Composición según la reivindicación 6 caracterizada porque comprende, además, uno o más agentes terapéuticos adicionales.

8. Uso de un compuesto de fórmula general (**I**)



en el que X e Y tienen los significados definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un isómero o el racemato, o cualquier proporción de los enantiómeros, sal farmacéuticamente aceptable y/o solvato del mismo para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de trastornos o enfermedades en los que estén implicados procesos patológicos como etiología de dichos trastornos o enfermedades.

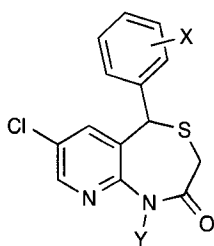
9. Uso según la reivindicación 8 caracterizado porque los trastornos o enfermedades son aquellos en los que está implicado un déficit o disfunción de la memoria, enfermedades neurodegenerativas, ictus, epilepsia y

diabetes, y todas las enfermedades donde el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial estaría implicado

10. Uso según la reivindicación 9 caracterizado porque que dicha enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica o cualquier otra que se caracterice por procesos neurodegenerativos tales como la pérdida neuronal, fallos en los procesos de neurotransmisión o aparición de agregados del péptido amiloide.

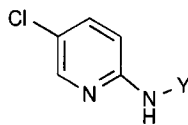
11. Uso de los compuestos de la invención según la reivindicación 1 para el estudio biológico, bioquímico, farmacológico, fisiológico, bien sea clínico, preclínico o en investigación básica en todas sus facetas, del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial.

12. Procedimiento para la obtención de un compuesto fórmula general (I):



en el que X e Y tienen los significados definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un isómero o el racemato, o cualquier proporción de los enantiómeros, sal farmacéuticamente aceptable y/o solvato del mismo, caracterizado por las siguientes etapas:

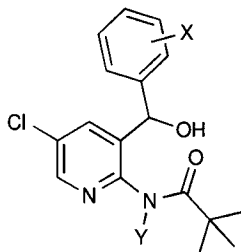
a) Protección de una piridina de fórmula (II),



(II)

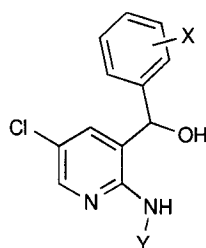
en donde Y representa los átomos y sustituyentes indicados más arriba al describir la fórmula general (I), en condiciones de reacción de sustitución con el reactivo cloruro de pivaloilo. Esta reacción daría lugar a la anilina análoga sustituida en el grupo amino con el protector Piv (tertbutilcarbonil).

b) Reacción de adición nucleófila a arilaldehídos provistos con la sustitución X indicada previamente, bajo condiciones de orto-litiación en atmósfera inerte y baja temperatura, rindiendo la familia de compuestos con estructura general (III).



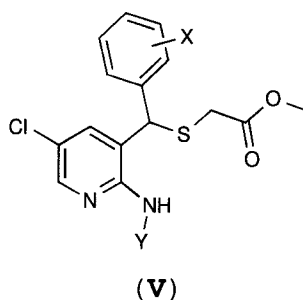
(III)

c) Desprotección del grupo pivaloil (terbutilcarbonil) con hidróxido potásico, rindiendo los intermedios con estructural general (IV)



## (IV)

d) Reacción con tioglicolato de metilo, aplicado en exceso o en disolución de cloruro de metileno, en condiciones anhidras y alta temperatura, en presencia de un ácido prótico. El derivado tiolado provoca la salida de hidroxilo, generando un tioeter de fórmula general (V)



e) Reacción con una base litiada como hexametildisililamiduro de litio (LiHMDS) que genera amiduro y produce una adición nucleófila intramolecular sobre el éster colgante. Este último evento lleva a la formación de un heterociclo de siete miembros con estructura de 1,4-tiazepina, dentro de la formula general (I), que representa la estructura del producto final.