

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 900**

21 Número de solicitud: 201731196

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

C07D 209/14 (2006.01)

A61K 31/4045 (2006.01)

A61K 31/407 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

10.10.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.04.2019

71 Solicitantes:

**FUNDACION PARA LA INVESTIGACION
BIOMEDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
LA PRINCESA (40.0%)**

C/ Diego de León, 62 - 1ª Planta

28006 MADRID ES;

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (39.0%) y

FUNDACIÓN TEÓFILO HERNANDO (21.0%)

72 Inventor/es:

DE LOS RÍOS SALGADO, Cristobal;

LAJARÍN CUESTA, María Rocío;

GARCÍA GARCÍA, Antonio y

LÓPEZ ARRIBAS, Raquel

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **NUEVOS DERIVADOS DE GRAMINA CON EFECTO PROTECTOR DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA, Y SU APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HUMANAS**

ES 2 708 900 A1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

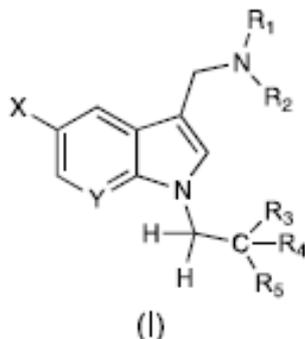


11 Número de publicación: **2 708 900**

21 Número de solicitud: 201731196

57 Resúmen:

Nuevos derivados de gramina con efecto protector de la actividad fosfatasa, y su aplicación en el tratamiento de enfermedades humanas.



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 humanas, entre las que se encuentran, pero no limitadas, diversos tipos de cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del sistema nervioso, dolor y en general, cualquiera que curse con una inactivación, inhibición o depresión de la actividad enzimática de proteínas fosfatasas. Las enzimas fosfatasas participan en infinidad de procesos celulares esenciales, por lo que su disfunción provoca alteraciones que conducen a muy diversas patologías, según la enzima específica afectada, el sistema orgánico dañado o el estado general del enfermo. Así, los compuestos reivindicados en esta invención impiden su inhibición enzimática mediante un mecanismo competitivo sobre los inhibidores endógenos o agentes externos, tanto sintéticos como naturales, que puede deberse tanto a una interacción química sobre estos inhibidores, como a una interacción sobre las propias enzimas fosfatasas, y de esta manera evitar que estos inhibidores se acerquen al sitio catalítico de la presente invención se puede enmarcar en el campo de la industria farmacéutica.

DESCRIPCIÓN**NUEVOS DERIVADOS DE GRAMINA CON EFECTO PROTECTOR DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA, Y SU APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HUMANAS**5 **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 química de nuevos derivados basados en el alcaloide natural gramina y su aplicación para el tratamiento de enfermedades humanas.

10

Estado de la técnica

La principal vía de regulación celular consiste en la fosforilación reversible de proteínas, llevada a cabo por enzimas cinasas y fosfatasas, sobre residuos de tirosina (Tyr) o serina y treonina (Ser/Thr); esta separación de funciones se debe a la diferente reactividad que implica la formación del éster de fosfato o su hidrólisis sobre el fenol de Tyr o los alcoholes alifáticos presentes en Ser o Thr (Olsen JV y col. *Cell* **2006**, 635). La unión del grupo fosfato, un grupo voluminoso y con carga negativa a pH fisiológico, afecta directamente a la función proteica provocando cambios conformacionales que alteran su función catalítica, su afinidad por distintos ligandos, su localización subcelular o su estabilidad. Los procesos de fosforilación y desfosforilación deben estar estrechamente controlados ya que su desregulación se asocia con gran variedad de enfermedades como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares o las enfermedades neurodegenerativas (Zhang M y col. *FEBS J* **2013**, 4739). Aunque existen evidencias de que tanto las enzimas cinasas como las fosfatasas se encuentran alteradas en estos escenarios patológicos, la mayoría de los esfuerzos para diseñar nuevos compuestos han estado dirigidos a la inhibición de cinasas (Cohen P, *Nat. Rev. Drug Disc.* **2002**, 309). Esta discriminación se debe, en parte, a la creencia de que las fosfatasas son inespecíficas. Por cada 10 Ser/Thr cinasas, hay una única fosfatasa, y esto ha sido malinterpretado como que las fosfatasas son más promiscuas y por tanto no adecuadas para ser consideradas dianas farmacológicas. Sin embargo, evidencias recientes demuestran lo contrario y nos presentan a las fosfatasas como prometedoras, aunque desafiantes, dianas terapéuticas (Zhang, **2013**; McConnell JL y col. *Mol. Pharmacol.* **2009**, 1249; Lajarín-Cuesta y col. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, 389).

30

Según su especificidad de sustrato, existen tres tipos de fosfatasa: Tyr fosfatasa, Ser/Thr fosfatasa y fosfatasa duales. Las Ser/Thr fosfatasa incluyen a las fosfoproteína fosfatasa (PPP, por sus siglas en inglés *phosphoprotein phosphatases*), las proteínas fosfatasa dependientes de metales y las fosfatasa basadas en aspartato (Fcp/Scp) (Shi Y *Cell* **2009**, 468). Desde el punto de vista terapéutico, las más importantes son las PPP, las cuales a su vez engloban a la fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1), fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A), calcineurina (Cn, PP2C o PP3), fosfoproteína fosfatasa 4 (PP4), fosfoproteína fosfatasa 5 (PP5), fosfoproteína fosfatasa 6 (PP6) y fosfoproteína fosfatasa 7 (PP7). A pesar de tratarse de una superfamilia de enzimas, las enzimas PP1 y PP2A cubren el 90 % de la actividad Ser/Thr fosfatasa dentro de las células (Oliver CJ *Front. Biosci.* **1998**, D961). Todos los miembros de la familia de las PPP comparten una alta homología en el sitio catalítico, tanto en la secuencia de aminoácidos como en el mecanismo de reacción de la hidrólisis de ésteres de fosfato, catalizada por metales. Seis aminoácidos conservados (tres histidinas, dos ácidos aspárticos y una asparragina) coordinan dos iones metálicos, que pueden ser Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} o Zn^{2+} (Zhang, **2013**). Estos metales se coordinan con una molécula de agua, activándola para realizar un ataque nucleofílico sobre el fósforo, eliminándolo del sustrato (Goldberg J *Nature* **1995**, 745). La mayoría de estas enzimas funcionan como holoenzimas, compuestas de una subunidad catalítica conservada y una gran variedad de subunidades reguladoras, que modulan la actividad de la primera, proveyéndolas de la especificidad de sustrato y una sublocalización celular específica (Shi, **2009**).

Los principales inhibidores naturales son el ácido okadaico (AO), la cantaridina, la nodularina, las microcistinas, la caliculina A, la fostriecina y la tautomicina. Estas toxinas ejercen una inhibición de amplio espectro sobre las enzimas PPP a través de su unión al sitio activo, muy próximo a los dos iones metálicos, siendo calcineurina y PP7 las menos afectadas. Dado que la subunidad catalítica está tan conservada, especialmente entre PP1 y PP2A, la selectividad de estas toxinas por cada subtipo de fosfatasa es pequeña, mostrando valores de CI_{50} similares (Zhang, **2013**; Swingle M y col. *Meth. Mol. Biol.* **2007**, 23). No obstante, PP1 y PP2A realizan el 90 % de la actividad Ser/Thr fosfatasa celular (Oliver, **1998**).

PP1 es una Ser/Thr fosfatasa ubicua y de gran importancia por estar involucrada en un amplio rango de procesos celulares como la transcripción de genes, la síntesis de proteínas, el metabolismo de lípidos y glucógeno, la contracción muscular y la plasticidad sináptica. Existe como una holoenzima compuesta por una subunidad catalítica (PP1c, 37 kDa) unida a más de 50 subunidades reguladoras (PIP, proteínas que interactúan con PP1). Hay cuatro isoformas de PP1c (PP1 α , PP1 β/δ , PP1 γ 1 y PP1 γ 2), con los metales Mn²⁺ y Fe²⁺ situados en su sitio activo. Las PIP dotan a PP1 de una sublocalización celular específica y especificidad de sustrato, e incluso pueden ser sustratos de PP1 por sí mismas. La interacción entre las PIP y PP1c ocurre principalmente a través de un motivo denominado RVxF, presente en más del 90 % de las PIP, y un bolsillo hidrofóbico RVxF/W de PP1c, situado remotamente respecto al sitio catalítico. Este bolsillo de reconocimiento está conservado solo en PP1c, por lo que los compuestos dirigidos a él serán selectivos para PP1. Los dos principales inhibidores endógenos de PP1 son I₁^{PP1} y I₂^{PP1} (Shi, **2009**).

PP2A es una de las enzimas más abundantes en las células eucariotas (1 % del total de las proteínas celulares) (Cohen PT y col. *Trends Biochem. Sci.* **1997**, 245), expresada de manera ubicua y muy conservada desde levaduras hasta humanos. PP2A participa en vías celulares esenciales como el ciclo celular, el metabolismo, la migración y las vías de supervivencia, entre otras. Su alteración está asociada a múltiples patologías como el cáncer, la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson o las enfermedades metabólicas. Se trata de una holoenzima heterotrimérica consistente en un núcleo heterodimérico y diferentes subunidades reguladoras (subunidad B). Dentro del núcleo heterodimérico, la subunidad catalítica (C o PP2Ac, 36 kDa) está siempre asociada a la subunidad estructural (A o PR65, 65 kDa). Los iones metálicos presentes en el sitio catalítico fueron identificados como dos iones de Mn²⁺ por Xing y col (*Cell* **2006**, 341). Tanto la subunidad C como la A existen en dos isoformas, α y β . Las subunidades reguladoras incluyen cuatro familias: B (B55 o PR55), B' (B56 o PR61), B'' (PR48, PR72 o PR130) y B''' (PR93 o PR110), y cada familia presenta de 2 a 5 isoformas con poca similitud entre ellas. La subunidad A presenta 15 repeticiones en tándem tipo HEAT (por sus siglas en inglés *huntingtin-elongation-A subunit-TOR*), reconociendo la subunidad C las repeticiones HEAT 11-15 y la subunidad B las repeticiones HEAT 2-8 (Shi, **2009**). Estas subunidades nunca se encuentran por separado *in vivo* y, aunque dímeros AC sí son abundantes en tejidos, la forma predominante de PP2A son heterotrímeros, es decir, el núcleo AC junto con la

subunidad B. La actividad enzimática completa de PP2A solo se consigue cuando la holoenzima heterotrimérica está formada. La diversidad de subunidades B con las que puede interactuar el núcleo AC (existen hasta 96 combinaciones), junto con sus diferentes expresiones según el tipo de tejido y la célula, son los responsables de la especificidad de sustrato y sublocalización celular de PP2A. El mecanismo de regulación de PP2A es extraordinariamente complejo (Haesen D y col. *Front. Oncol.* **2014**, 347). Tras la síntesis proteica de la subunidad C, para evitar que ejerza su actividad fosfatasa de manera indiscriminada, es inactivada mediante la unión de dos proteínas: $\alpha 4$ (que se une a la subunidad C libre) y PP2A-metilesterasa 1 (PME-1, que se une al dímero AC). Para generar las holoenzimas activas son necesarias enzimas reguladoras adicionales. En primer lugar, el activador fosfotirosil fosfatasa (PTPA, por sus siglas en inglés *phosphotyrosyl phosphatase activator*), con ATP y Mg^{2+} como cofactores necesarios, desfosforila PP2A en el residuo Tyr 307, promoviendo el plegamiento de la subunidad C en una conformación activa y permitiendo así a la enzima leucina carboxilo metiltransferasa 1 (LCMT-1) metilar el carboxilo terminal de la Leu 309 de PP2Ac. Esta metilación es clave, ya que aumenta la afinidad del núcleo catalítico hacia las subunidades B y permite la formación de la holoenzima heterotrimérica activa (Haesen, **2014**). Por otro lado, en respuesta a diferentes estímulos celulares, enzimas p60^{v-src} y p56^{lck}, factores de crecimiento o receptores de insulina pueden inducir la fosforilación de la Tyr 307, dando lugar a la inactivación de PP2A.

En estos casos, la enzima PTPA puede estimular a PP2A para que actúe como una Tyr fosfatasa (lo que la convertiría en una fosfatasa dual) y se reactive a sí misma mediante autodesfosforilación. Por último, la desmetilación de la Leu 309 por PME-1 también conduce a la inactivación de PP2A por pérdida de afinidad con las subunidades B (Sontag JM y col. *Front. Mol. Neurosci.* **2014**, 16). Los principales inhibidores endógenos específicos de PP2A son I₁^{PP2A} (también llamado ANP32a o PHAP-I), I₂^{PP2A} (también llamado SET, PHAP-II o TAFI β) y CIP2A (por sus siglas en inglés *oncoprotein cancerous inhibitor of PP2A*). La expresión de CIP2A apenas es detectable en células normales pero sí tiene especial relevancia en tumorales, donde su sobreexpresión es indicadora de un mal pronóstico para el paciente (Haesen, **2014**). I₁^{PP2A} e I₂^{PP2A}, que están altamente expresados en cerebro, ejercen su inhibición a través de su unión directa a la subunidad C, aunque se desconocen los aminoácidos con los que interactúan. I₂^{PP2A} tiene una localización preferentemente nuclear, mientras que I₁^{PP2A} es citosólica, y ambos pueden ser modificados por fosforilación

o modificar su expresión en respuesta a estímulos celulares. El ejemplo más destacado de esta regulación es el mediado por la cinasa Bcr-abl, presente en pacientes con leucemia mieloide crónica y positivos para el cromosoma Filadelfia. Esta cinasa es capaz de promover la inhibición de PP2A a través de la sobreexpresión y fosforilación del I₂^{PP2A}, lo cual conduce a la inmortalidad de las células leucémicas y es clave en el paso de leucemia mieloide en fase crónica a fase blástica (Neviani P y col, *Cancer Cell* **2005**, 355). Otros inhibidores endógenos, como CIP2A y α4, también pueden estar sobreexpresados en ciertos subtipos de cáncer, como por ejemplo el cáncer de colon y el hepático (Haesen, **2014**). Ciertamente, PP2A se considera un importante supresor tumoral debido a su papel en el control del ciclo celular, por lo que es una de las dianas en terapia antineoplásica que más interés está despertando en los últimos años (Neviani y col. *Clin. Cancer Res.* **2014**, 2026). Reafirmando su papel antitumoral, se ha visto que mutaciones en las distintas subunidades de PP2A conllevan la disociación de la holoenzima y originan cánceres de ovario, pulmón o colon (Haesen, **2014**). En todos estos tipos de cánceres, restaurar la actividad de PP2A es una estrategia prometedora. En cuanto a enfermedades del sistema nervioso, los altos niveles de expresión en cerebro de las dos isoformas de PP2Ac junto con la expresión específica de ciertas isoformas de la subunidad B/PR55 y B'/PR61 sugieren que PP2A es clave para una función neuronal normal (Janssens V y col. *Biochem. J.* **2001**, 417). Dentro de las neuronas, esta fosfatasa está especialmente asociada con los neurofilamentos, sobre los que regula su estado de fosforilación y así su estabilidad e interacción con otros miembros del citoesqueleto. No obstante, el interés terapéutico sobre PP2A no radica en su papel sobre los neurofilamentos sino en la regulación que ejerce sobre el estado de fosforilación de la proteína asociada a microtúbulos tau. PP2A es la principal fosfatasa cerebral responsable de la desfosforilación de tau (> 70 %)(Liu F y col. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, 1942). Principalmente es la forma heterotrimérica con la subunidad reguladora Bα la que colocaliza con los microtúbulos y tau, uniéndose a ambos por lugares diferentes y pudiendo servir como punto de anclaje entre los dos (Sontag E y col. *J. Biol. Chem.* **1999**, 25490; Xu Y y col. *Mol. Cell* **2008**, 873). Mediante un ensayo *in vitro* de desfosforilación y estudios de mutagénesis dirigida, Xu y col. dilucidaron los aminoácidos de contacto entre la subunidad B y la proteína tau: dos fragmentos en la proteína tau ricos en aminoácidos lisina, y por tanto de naturaleza básica, interaccionan con un bolsillo de carácter ácido, rico en aminoácidos con carga positiva, presente en la subunidad Bα. El hecho de que haya dos secuencias de reconocimiento hace que la desfosforilación de tau llevada a cabo por PP2A sea mucho más

eficiente, ya que ambas secuencias consiguen una mejor aproximación de la proteína tau al sitio catalítico de PP2Ac (Xu, **2008**).

Desde que en 1986 Grundke-Iqbal y col. descubrieron que la proteína tau hiperfosforilada era el principal componente de los NFT (Grundke-Iqbal I y col. *J. Biol. chem.* **1986**, 6084), se han descubierto 30 residuos de Ser o Thr susceptibles de ser fosforilados (Gong CX y col. *J. Neural Transm.* **2005**, 813). Los aminoácidos clave para su disociación de los microtúbulos y autoagregación son Thr 231 y Ser 262, siendo también importantes Thr 181, Ser 199, Ser 202, Thr 212, Ser 396, Thr 403 y Ser 404 (Wang JZ y col. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, 59). Las fosfatasa
5 que actúan sobre la proteína tau son PP1, PP2A, calcineurina y PP5, las cuales en condiciones fisiológicas contribuyen a su desfosforilación en un 11, 71, 10 y 7 %, respectivamente (Figura 8) (Liu, **2005**). Por tanto, PP2A es la principal fosfatasa que actúa sobre tau, siendo capaz por sí sola de desfosforilar todos los aminoácidos críticos para su disociación y agregación. De hecho, de los 30 posibles residuos que tau puede tener
10 fosforilados, todos pueden ser desfosforilados por PP2A, excepto Thr 212 y Ser 396, que son desfosforilados preferentemente por PP1 y calcineurina.

En los cerebros de pacientes con la EA, la hiperfosforilación de la proteína tau se debe, al menos en parte, a una disminución del 50 % de la actividad fosfatasa cerebral total, especialmente en áreas de la corteza y el hipocampo (Gong CX y col. *J. Neurochem.* **1995**, 732 y *Curr. Med. Chem.* **2008**, 2321). Si se analiza la actividad de cada fosfatasa, PP2A se encuentra inhibida en un 50 % mientras que PP1 y PP5 en un 20 % (Liu, **2005**), por lo que PP2A es la enzima más afectada. Esta disfunción de PP2A en pacientes con la EA ha sido ampliamente demostrada, describiéndose déficits en la expresión génica de su subunidad C, afectando a la síntesis del ARN mensajero (Vogelsberg-Ragaglia V y col. *Exp. Neurol.* **2001**, 402) y de la proteína total (Sontag E y col. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2004**, 287). También la expresión de la subunidad B α en la corteza frontal y la temporal está disminuida, lo que correlaciona muy bien con la patología tau en pacientes con la EA. Así mismo, los mecanismos de regulación de PP2A están alterados. La metilación de PP2A se encuentra
25 muy disminuida debido tanto a un aumento en la actividad de la enzima PME-1 como a la disminución de la actividad de LCMT-1, lo que produce la inactivación de PP2A y la pérdida de afinidad por la subunidad B α , responsable de la desfosforilación de tau (Sontag E y col. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2004**, 1080). Además, hay un aumento en la fosforilación del

residuo Tyr 307 de PP2Ac, lo cual la inactiva igualmente (Zhang CE, *Neurobiol. Aging* **2008**, 1654). Por último, en modelos de EA, existe un incremento del 20 % en la expresión de los inhibidores endógenos I₁^{PP2A} e I₂^{PP2A}, así como una traslocación de este último del núcleo al citosol (Tanimukai H y col. *Am. J. Pathol.* **2005**, 1761).

5

La inhibición *in vivo* de PP2A conduce a signos y síntomas que remedan la EA, incluidos los déficits cognitivos. La sobreexpresión de cualquiera de los inhibidores endógenos, I₁^{PP2A} o I₂^{PP2A}, así como el silenciamiento de la subunidad B α , conducen a la hiperfosforilación de la proteína tau, su disociación de los microtúbulos y la formación de los NFT, la pérdida de dendritas, alteraciones de los marcadores sinápticos y déficits en los test de comportamiento y de memoria espacial (Sontag E y col. *Neuron* **1996**, 1201). Así mismo, el inhibidor AO es una buena herramienta farmacológica para el estudio de la EA puesto que también reproduce dichas alteraciones (Sun L y col. *Neurosci.* **2003**, 1175). No obstante, la inhibición de PP2A no solo conduce a una hiperfosforilación de la proteína tau por un descenso en su actividad fosfatasa, sino también por una regulación al alza de enzimas cinasas como GSK-3 β y cdk-5, las cuales aumentan su actividad si PP2A no es capaz de desfosforilarlas (Louis JV y col. *PNAS* **2011**, 6957). PP2A también regula el metabolismo de la APP a través de la desfosforilación de su residuo Thr 668, de manera que ante una disminución en la actividad de PP2A se favorece la producción de β A (Sontag E y col. *J. Neurosci.* **2007**, 2751). A su vez, cinasas como GSK-3 β regulan la actividad enzimática de PP2A a través de la fosforilación en Tyr 307 (Yao XQ y col. *Biochem. J.* **2011**, 335), la inhibición de LCMT-1 y la activación de PME-1 (Yao XQ y col. *FEBS Lett.* **2012**, 2522), así como por la acumulación citosólica de I₂^{PP2A} (Tanimukai, **2005**). Mención especial merece la interacción de PP2A y PP1 con el receptor de glutamato NMDA. Los receptores NMDA están formados básicamente por las subunidades NR1 y NR2, y en algunos casos por NR3. El papel de PP2A, constitutivamente asociada a este complejo proteico, consiste en desfosforilar a Ser 897 de la subunidad NR1, disminuyendo así la entrada de Ca²⁺ a través del receptor (Chan SF y col. *J. Neurosci.* **2001**, 7985). En condiciones patológicas, como la isquemia cerebral, se produce una sobreactivación del receptor NMDA que provoca la disociación de PP2A y una mayor permeabilidad de Ca²⁺. Por otra parte, PP1 regula la fosforilación de la subunidad NR2, lo que también limita la entrada de Ca²⁺, reduciendo así la posible muerte por excitotoxicidad, a la vez que activa vías de neuroprotección (Farinelli M y col. *PloS one* **2012**, e34047).

30

Por todo ello, la reactivación de Ser/Thr fosfatasa tiene el potencial de convertirse en una diana terapéutica factible para el tratamiento de gran variedad de enfermedades, como así lo demuestran numerosas evidencias preclínicas (Voronkov M y col. *Future Med. Chem.* **2011**, 821). Sin embargo, a diferencia de PP2A, no se conoce ningún compuesto que actúe sobre PP1 con indicación para la EA, presumiblemente por despertar menos interés terapéutico ya que PP1 solo es responsable de un 20 % de la actividad fosfatasa sobre tau. Por el contrario, más esfuerzos se han dirigido a desarrollar moduladores de la actividad de PP2A o compuestos con actividad dual sobre ambas fosfatasas. Según Voronkov y col. **(2011)**, existen diferentes familias de activadores de PP2A, que pueden ser agrupados en tres estrategias: 1) Activación alostérica. Los primeros activadores de PP2A descritos fueron aminas básicas como la protamina y la polilisina, que se encuentran cargadas positivamente en pH fisiológico y son capaces de aumentar la actividad de PP2A mediante interacción con su subunidad C (Pelech S y col. *Eur. J. Biochem.* **1985**, 245). Las ceramidas son el ejemplo clásico de activadores endógenos de PP2A, las cuales son segundos mensajeros de naturaleza lipídica generados por mecanismos dependientes de esfingomielinasa y que regulan el ciclo celular y la apoptosis. Las ceramidas pueden activar a PP2A por unión directa a su subunidad B, a través de la inhibición de su desmetilación o impidiendo la unión del inhibidor endógeno I_2^{PP2A} (Dobrowsky RT y col. *J. Biol. Chem.* **1993**, 15523). Recientemente, se ha visto que fenotiazinas como la perfenazina son capaces de inducir la apoptosis de células T en leucemia mieloide aguda a través de una interacción directa con la subunidad A α (Gutiérrez A y col. *J. Clin. Invest.* **2014**, 644); 2) Inhibición de una interacción inhibidora. El FTY720 (Fingolimod) es un análogo sintético de esfingosina aprobado para el tratamiento de la esclerosis múltiple por su activación de receptores de esfingosina 1-fosfato. No obstante, también es un potente activador de PP2A capaz de unirse al dominio de I_2^{PP2A} por el que se une a PP2Ac, provocando la disociación del inhibidor endógeno, así como su traslocación al núcleo (Neviani P y col. *J. Clin. Invest.* **2007**, 2408). Actualmente se están diseñando derivados de fingolimod carentes de actividad inmunosupresora (Neviani P y col. *J. Clin. Invest.* **2013**, 4144); 3) Modulación de enzimas que regulan PP2A a nivel postraduccional. Un ejemplo es la forskolina, que activa PP2A mediante la reducción de la fosforilación en Tyr307, por un mecanismo independiente de la activación de la adenilato ciclasa (Cristóbal I y col. *Leukemia* **2011**, 606).

Neviani y col. fueron los primeros en defender el potencial interés terapéutico de fármacos activadores de PP2A, a los que llamaron PAD (por sus siglas en inglés *PP2A-activating drugs*). Demostraron cómo el uso de los activadores de PP2A fingolimod y forskolina tenía un efecto sinérgico con el inhibidor de cinasas imatinib, para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y crónica (Neviani, **2007**). Actualmente, numerosas publicaciones defienden el uso de los PAD para el tratamiento del cáncer y de enfermedades neurodegenerativas. A continuación, se exponen los ejemplos más relevantes:

Stock y col. observaron que extractos de diferentes plantas del género *Coffea* mostraban una actividad inhibitoria de la desmetilación de PP2A, lo que reafirmaría los estudios epidemiológicos que muestran una correlación negativa entre el consumo del café y la incidencia de la EA y la enfermedad de Parkinson (Barranco-Quintana JL y col. *Neurol. Res.* **2007**, 91). Se determinó que el principal compuesto responsable de dicha actividad no era ni la cafeína ni ningún compuesto relacionado estructuralmente, sino el derivado indólico EHT (*N*-eicosanoilserotonina). Este compuesto es capaz de inhibir la desmetilación de Leu 309 mediante la formación de un complejo con PP2A que evita la interacción con PME-1, manteniendo así a la enzima en su forma activa. Posiblemente ese complejo también impida la unión de inhibidores endógenos (Basurto-Islas G y col. *Neurol. Aging* **2014**, 2701). En un modelo *in vivo* de EA inducido por la sobreexpresión del I_2^{PP2A} , el compuesto EHT, administrado vía oral durante 6 meses, mantuvo la actividad fosfatasa de PP2A, revirtió la hiperfosforilación de tau, disminuyó la expresión de βA y condujo a una reducción de los déficits cognitivos. La biguanida metformina es capaz de prevenir la hiperfosforilación de tau inducida por el AO o la fostriecina, en cultivo primario de neuronas murinas. El mecanismo propuesto es la interferencia con las proteínas MID y $\alpha 4$, las cuales regulan la degradación de PP2Ac vía proteasoma (Kickstein y col. *PNAS* **2010**, 21830). En modelos *in vivo* de isquemia cerebral e *in vitro* de excitotoxicidad inducida por glutamato, la subunidad B/PR55 de PP2A se encuentra disminuida. Parece ser que uno de los mecanismos por los que la melatonina ejerce un efecto neuroprotector en estos modelos es a través del mantenimiento de la actividad fosfatasa de PP2A, mediante la inhibición del descenso en la expresión de esta subunidad B (Koh PO *J. Pineal Res.* **2012**, 57). Varios artículos demuestran que la memantina también actúa como un activador de PP2A (Chohan MO y col. *FEBS Lett.* **2006**, 3973). En cultivo organotípico de rodajas de hipocampo de rata, tras la inducción de la hiperfosforilación de tau con AO, la memantina, pero no otros antagonistas del receptor

NMDA (como por ejemplo el ácido 5,7-dicloroquinurénico o el ácido D-2-amino-5-fosfopentanoico), es capaz de mantener la actividad fosfatasa de PP2A (Li L y col. *FEBS Lett.* **2004**, 261). Posteriormente, en células PC-12 tratadas con AO, se demostró que el mecanismo implicaba un bloqueo de la interacción entre el I_2^{PP2A} y PP2A, posiblemente mediante la inhibición de la traslocación del I_2^{PP2A} del núcleo al citosol. De hecho, en ausencia del I_2^{PP2A} la memantina carece de efecto sobre PP2A (Chohan, **2006**). También el fármaco donepezilo parece tener un efecto activador sobre PP2A, aunque el mecanismo es desconocido (Noh MY y col. *J. Neurochem.* **2013**, 562).

10 Por último, el ion selenato (SeO_4^{2-}) es un activador de PP2A potente y específico para heterotrímeros compuestos por la subunidad B/PR55, la responsable de la defosforilación de la proteína tau, siendo su mecanismo de acción la estabilización del complejo PP2A/tau (Corcoran NM y col. *J. Clin. Neurosci.* **2010**, 1025). En varios modelos animales de EA, se ha observado cómo dosis bajas de Na_2SeO_4 vía oral reducen la hiperfosforilación de la proteína tau, previenen la formación de los NFT, la consiguiente neurodegeneración y el déficit cognitivo. Estos efectos son mediados por PP2A ya que el selenato no es capaz de reducir la hiperfosforilación de tau en ratones que coexpresan una subunidad B/PR55 defectuosa (Van Eersel J y col. *PNAS* **2010**, 13888). Recientemente, se ha completado el ensayo clínico fase IIa en el que se ha demostrado que su sal sódica es segura y bien tolerada en pacientes con EA, por lo que parece prometedor (Malpas CB y col. *J. Alz. Dis.* **2016**, 223).

Descripción de la invención

25 Descripción breve

El objeto de esta invención se refiere a nuevos compuestos basados en el esqueleto de gramina hasta ahora no descritos en la literatura científica, los cuales presentan en su molécula una o más actividades biológicas que los convierten en productos potencialmente útiles, solos o en combinación con otros fármacos, para el tratamiento de enfermedades humanas entre las que se encuentran, pero no limitadas, diversos tipos de cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del sistema

nervioso, dolor y en general, cualquiera que curse con una inactivación, inhibición o depresión de la actividad enzimática de proteínas fosfatasas.

Descripción de las figuras

5 **Figura 1.** Ampliación del modo de interacción del derivado **Ie** con los aminoácidos de la subunidad catalítica de PP2Ac, dentro de un radio de 8 Å.

Figura 2. Ampliación de los residuos con los que el derivado **Ir** puede interaccionar, en un radio de 8Å.

10

Descripción detallada

La presente invención se basa en la preparación química de una familia de compuestos, de fórmula general **I**, hasta ahora no descritos.

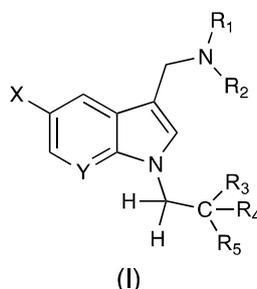
15 Estos nuevos compuestos, sometidos a evaluación farmacológica, han presentado interesantes actividades biológicas:

- Mantenimiento de la actividad fosfatasa en cultivos celulares de neuroblastoma humano sometidos a un modelo de inactivación de enzimas Ser/Thr fosfatasas
- 20 • Reducción de la $[Ca^{2+}]_c$ en cultivos celulares de neuroblastoma humano sometidos a despolarización por alto K^+
- Neuroprotección en cultivos celulares de neuroblastoma humano sometidos a un modelo de hiperfosforilación de la proteína tau
- Neuroprotección en cultivos celulares de neuroblastoma humano sometidos a un
- 25 modelo de estrés oxidativo

Los resultados obtenidos muestran que nos hallamos ante una familia de productos de alto interés terapéutico para el tratamiento de diversas enfermedades, como diversos tipos de cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del

30 sistema nervioso, dolor y en general, cualquiera que curse con una inactivación, inhibición o depresión de la actividad enzimática de proteínas fosfatasas

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



5 donde:

Y puede ser un átomo de nitrógeno o un resto CH (carbono unido a hidrógeno).

Cuando Y = N, X podrá ser un átomo de bromo o un resto alcóxido, es decir, un átomo de oxígeno unido a alquilo del tipo metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo, tert-butilo o mayores elongaciones y ramificaciones de cadenas hidrocarbonadas saturadas.

10

Cuando Y = CH, X podrá ser un átomo de cloro o hidrógeno.

R₁, R₂ pueden ser cadenas alquílicas del tipo metilo, etilo, propilo o formar un ciclo donde R₁, R₂ sean -CH₂(CH₂)_nCH₂-, siendo n un número natural entero entre 1 y 5.

15 R₃, R₄, R₅ definen el tipo sustitución sobre el nitrógeno indólico, pudiendo ser esta sustitución fenilo (-CR₃R₄R₅ = -C₆H₆ = -Ph), alquilo no ramificado (R₃, R₄ = H; R₅ = propilo, Pr) o etinilo (-CR₃R₄R₅ = -C≡CH).

20 Un compuesto de fórmula general (I), donde X = H, R₁ y R₂ son metilos (CH₃) y -CR₃R₄R₅ es fenilo (-Ph), ha sido previamente descrito en "DL-β-(3-Oxindolyl)alanine(DL-hydroxytryptophan). I. Synthesis" Comforth JW y col. (1951) *Biochemical Journal* **48**, 591-597, y en literatura científica posterior.

25 Un compuesto de fórmula general (I), donde X = H, R₁ y R₂ forman un ciclo tal que R₁, R₂ son -CH₂(CH₂)₃CH₂-, y -CR₃R₄R₅ es fenilo (-Ph) ha sido previamente descrito en "Solvent-free aminoalkylation of phenols and indoles assisted by microwave irradiation" Sharifi A y col. (2001) *Monatshefte fuer Chemie* **132**, 875-880; la sal de

clorhidrato de este mismo compuesto ha sido previamente descrita en Ehrhart G , Henning, I "1-Benzylgramine derivatives with serotonin antagonism" (1961) *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft* **294**, 550-555.

5

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

El término "alquilo" o "alquiladas" 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 pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como cicloalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxilo, halógeno, haloalquilo, amino, aminoalquilo, aminocicloalquilo, amonioalquilo, amoniocicloalquilo o, en general, cualquier sustituyente situado en cualquier posición.

15

En una realización preferida de la presente invención, R_1 y R_2 son metilo o forman un ciclo de piperidina con el N al que se unen ($-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2-$), y R_3 es fenilo, propilo, o etinilo.

En otra realización más preferida, los compuestos de la invención se seleccionan de la lista que comprende:

20

- 1-(1-butil-1*H*-indol-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 1-butil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-indol
- *N,N*-dimetil-1-(1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-indol-3-il)metanamina
- 3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-indol
- 1-(1-bencil-5-cloro-1*H*-indol-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 1-bencil-5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-indol
- 1-(1-butil-5-cloro-1*H*-indol-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 1-butil-5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-indol
- 1-(5-cloro-1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-indol-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-indol

25

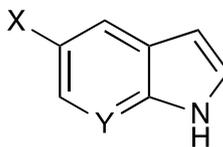
30

- 1-(1-bencil-5-bromo-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 1-bencil-5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina
- 1-(5-bromo-1-butyl-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 5-bromo-1-butyl-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina
- 5 • 1-(5-bromo-1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina
- 1-(1-bencil-5-metoxi-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 1-bencil-5-metoxi-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina

10 Los compuestos de la presente invención de fórmula (I) pueden ser obtenidos o producidos mediante una vía sintética química y/o conseguidos 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, una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, caracterizado porque comprende las

15 siguientes etapas:

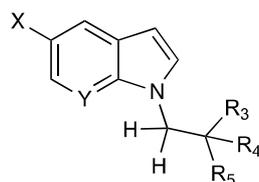
a) Reacción de un compuesto derivado de indol de fórmula (II),



(II)

20 en donde X representa los átomos y sustituyentes indicados más arriba al describir la fórmula general (I), en condiciones de sustitución nucleófila en medio básico sobre haluros de alquilo. Esta reacción daría lugar a compuestos con fórmula general (III),

25



(III)

en donde R_3 , R_4 y R_5 representan los átomos y sustituyentes indicados más arriba al describir la fórmula general (I)

5

b) Reacción de Mannich con los compuestos de fórmula general (III) en medio ácido débil, en presencia de formaldehído y dimetilamina o piperidina como fuentes de amina, para dar los compuestos de fórmula general (I).

10

c) Con el objeto de favorecer su manipulación y solubilidad acuosa, los compuestos objeto de la presente invención son sometidos a un tratamiento con ácido oxálico en disolvente orgánico, generando la sal de oxalato de los compuestos de fórmula general (I).

15

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 una composición farmacéutica con actividades farmacológicas, útiles para el tratamiento de patologías humanas 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, un derivado, profármacos o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

20

25

Los compuestos de la invención pueden estar en forma de aceites o sales de oxalato de forma cristalina, como compuestos libres o como solvatos y se pretende que ambas formas estén 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 expertos en la materia.

5

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, 10 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 el citado individuo. Ventajosamente, este 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 15 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 del mismo. La preparación de este profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir 20 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 R₁, R₂, R₃, R₄ o R₅. Los isómeros, los enantiómeros o los diastereoisómeros individuales, y las mezclas de los mismos caen, dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o los diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden 25 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 30 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.

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus isómeros, sus sales, sus profármacos o sus 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% y más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% del compuesto de fórmula (I), o de sus sales, sus 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}C o ^{14}C o un nitrógeno enriquecido en ^{15}N , están dentro del alcance de esta invención.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus profármacos y/o sus 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 adyuvantes y los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y los vehículos conocidos por los expertos 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 del 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, la edad y el estado del paciente, la gravedad de la alteración o del trastorno, y de la ruta y la frecuencia de administración.

5 En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en una forma sólida o una suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser suministrada 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
10 administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía oral, tópica, rectal o parenteral.

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

En otro aspecto, esta patente presenta un método para el tratamiento de pacientes afectados por enfermedades que afectan a la salud, consistente en la administración a los individuos afectados por estas dolencias de cantidades terapéuticamente efectivas de un
20 compuesto de fórmula (I), o una composición farmacéutica que lo incluya. A título de ejemplo, estas enfermedades podrían ser diversos tipos de cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del sistema nervioso, dolor y en general, las enfermedades susceptibles de beneficiarse de las actividades biológicas mostradas por los productos descritos en la presente invención.

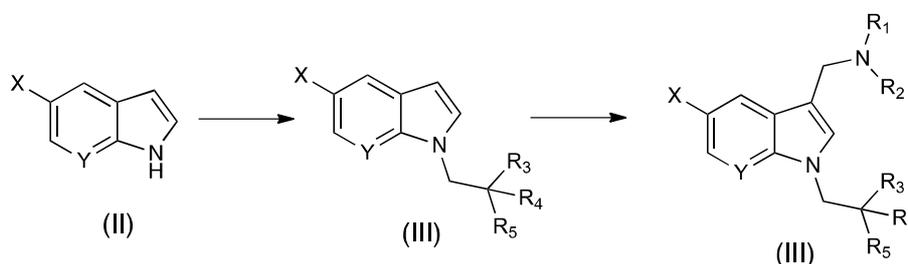
25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción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

EJEMPLOS

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

5 **1. OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCÓN**

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, Y, R₁, R₂, R₃, R₄ Y R₅ 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.

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

DMSO se refiere a dimetilsulfóxido,

AcOH se refiere al ácido acético,

AcOEt se refiere a acetato de etilo,

DMF se refiere a *N,N*-dimetilformamida

TLC se refiere a cromatografía en capa fina ("Thin Layer Chromatography"),

Ph se refiere a un resto fenilo

Para la preparación de los compuestos de forma general (II) donde X es un alcóxido, es decir, un átomo de oxígeno unido a un resto alquilo, los compuestos de forma general (II) donde X es un átomo de Br se someten a tratamiento con el alcóxido sódico (RO⁻Na⁺) de

elección en una mezcla de disolventes *N,N*-dimetilformamida y un alcohol en presencia de bromuro cuproso, manteniendo la mezcla en agitación durante varias horas, después de lo cual se eliminó el disolvente a vacío y se extrajo en una mezcla de agua y AcOEt. El producto, aislado de la fase orgánica, se purificó por cromatografía en columna.

5

Los compuestos de fórmula general (II) donde Y = CH son sometidos a condiciones de desprotonación en la amina con NaH en DMSO bajo atmósfera de argón, después de lo cual se añade al medio de reacción el correspondiente haluro de alquilo para proporcionar los compuestos con fórmula general (III), los cuales, una vez completada la reacción y posterior *work-up* por extracción con CH₂Cl₂ y evaporación del disolvente, se obtienen puros sin necesidad de purificación cromatográfica.

10

Los compuestos de fórmula general (II) donde Y = N son sometidos a condiciones de sustitución nucleófila en la amina con potasa (KOH) en presencia de un catalizador de transferencia de fase, como por ejemplo hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio en acetona bajo atmósfera de argón, después de lo cual se añade al medio de reacción el correspondiente haluro de alquilo para proporcionar los compuestos con fórmula general (III), los cuales, una vez completada la reacción y posterior *work-up* por extracción con CH₂Cl₂ y evaporación del disolvente, se aisló el producto que se purificó por cromatografía en columna.

15

20

Los compuestos de fórmula general (III) se añadieron a una mezcla de formaldehído, y HN(CH₃)₂ o piperidina como fuente de amina, en AcOH glacial a 0 °C y en atmósfera de argón, después de lo cual se mantuvo la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 a 5 h. Cuando la reacción no evaluó más (TLC), se interrumpió con solución acuosa básica, extrayendo el compuesto puro con CH₂Cl₂ y posterior evaporación.

25

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

30 **Ejemplo 1.- Síntesis de los compuestos de la invención y su caracterización analítica y espectral**

1.1. Procedimiento para la síntesis de compuestos de fórmula (II) donde X = OCH₃

Se siguió el método descrito por Wu y col. (*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14426-1427. A una disolución de 5-bromo-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina (1 equiv, 1 g, 5,07 mmol) en una mezcla de DMF (6,31 ml/mmol, 32 ml) y CH₃OH (4 ml/mmol, 20 ml), bajo argón y agitación, se
 5 añadió consecutivamente CH₃ONa (53 equiv, 14,5 g, 268,7 mmol) y CuBr (2 equiv, 1,45 g, 10,1 mmol), a temperatura ambiente. La mezcla se calentó a reflujo de 175 °C durante 4,5 h. Cuando la reacción no evolucionó más, se enfrió a temperatura ambiente y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se disolvió en agua (30 ml) y se extrajo con AcOEt (3 × 30 ml/mmol). La fase orgánica combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente
 10 se evaporó a vacío. El crudo de reacción se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (99/1). El producto resultante (5-metoxi-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina, compuesto de fórmula general (II) donde X = OCH₃ e Y = N es un sólido blanco (451 mg, 60 %). RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 9,23 (bs, 1H, NH), 8,12 (bs, 1H, H6), 7,49 (d, 1H, J₄₋₆ = 2,1, H4), 7,31 (d, 1H, J₂₋₃ = 3,0 Hz, H2), 6,45 (d, 1H, J₂₋₃ = 3,0 Hz, H3), 3,90 (s, 3H, CH₃). Datos espectrales acordes con la literatura (Wu, **2006**).

1.2. Procedimiento general I para la síntesis de compuestos de fórmula (III) donde Y = CH (N-alkilación de 5-X-indol)

20 A una solución de indol o 5-cloroindol (1 equiv.) en DMSO (1,4-5 ml/mmol de sustrato) se adicionó hidruro sódico (60% en aceite mineral, 1,2 equiv.) bajo argón. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente con agitación durante 1 o 2 h, tras lo cual se añadió el correspondiente haluro de alquilo (1,2–1,7 equiv), dejándose en agitación 1-2 h más, siguiendo la evolución de la reacción por TLC. Cuando la reacción se completó, se
 25 adicionó agua (10 ml/mmol de sustrato) para parar la reacción, y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 30 ml/mmol de sustrato). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío. Los productos resultantes son aceites amarillentos que no necesitaron purificación adicional por cromatografía.

30 - *1-butil-1H-indol (IIIa)*. Siguiendo el **Procedimiento General I**, indol (250 mg, 2,13 mmol) [DMSO (8 ml), NaH (102 mg, 2,56 mmol), yoduro de butilo (291 μl, 2,56 mmol)] dio lugar a **IIIa** (339 mg, 92 %). RMN de ¹H (acetona-*d*₆, 300 MHz) δ 7,67 (ddd, 1H, J₄₋₇ = 0,9 Hz, J₄₋₆ = 1,2 Hz, J₄₋₅ = 7,8 Hz, H4), 7,44 (dm, 1H, J₆₋₇ = 8,1 Hz, H7), 7,26 (ddd, 1H, J₄₋₆ = 1,2 Hz,

$J_{5-6} = 7,4$ Hz, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H6), 7,22 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,0$ Hz, H2), 7,13 (ddd, 1H, $J_{5-7} = 0,9$ Hz, $J_{5-6} = 7,4$ Hz, $J_{4-5} = 7,8$ Hz, H5), 6,52 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,6$ Hz, $J_{2-3} = 3,0$ Hz, H3), 4,12 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 6,9$ Hz, NCH₂), 1,79 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1,32 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,95 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 8,8$ Hz, CH₃). Datos espectrales acordes con la literatura (Baehn S y col. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 3590-3593).

5
 - *1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol (IIIb)*. Siguiendo el **Procedimiento General I**, indol (250 mg, 2,13 mmol) [DMSO (8 ml), NaH (102 mg, 2,56 mmol), 3-bromoprop-1-ino (285 μ l, 2,56 mmol)] dio lugar a **IIIb** (289 mg, 87 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 7,70 (dm, 1H, $J_{4-5} = 7,8$ Hz, H4), 7,53 (dm, 1H, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H7), 7,34 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H2), 7,29 (ddd, 1H, $J_{4-6} = 1,2$ Hz, $J_{5-6} = 7,2$ Hz, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H6), 7,19 (ddd, 1H, $J_{5-7} = 0,9$ Hz, $J_{4-5} = 7,8$ Hz, $J_{5-6} = 7,2$ Hz, H5), 6,58 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,7$ Hz, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H3), 4,98 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CCH}} = 2,7$ Hz, CH₂), 2,92 (t, 1H, $J_{\text{CHCCH}_2} = 2,7$ Hz, CH).

15
 - *1-bencil-5-cloro-1H-indol (IIIc)*. Siguiendo el **Procedimiento General I**, 5-cloroindol (294 mg, 1,94 mmol) [DMSO (9 ml), NaH (93 mg, 2,33 mmol), bromuro de bencilo (275 μ l, 2,33 mmol)] dio lugar a **IIIc** (434 mg, 93 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 7,69 (dd, 1H, $J_{4-7} = 0,7$ Hz, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,40–7,13 (m, 8H, Ar), 6,56 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,9$ Hz, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H3), 5,33 (s, 2H, CH₂). Datos espectrales acordes con la literatura (Evans DA y col. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10780).

25
 - *1-butil-5-cloro-1H-indol (IIIId)*. Siguiendo el **Procedimiento General I**, 5-cloroindol (294 mg, 1,94 mmol) [DMSO (9 ml), NaH (93 mg, 2,34 mmol), yoduro de butilo (265 μ l, 2,33 mmol)] dio lugar a **IIIId** (384 mg, 95 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 7,61 (bd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,38 (bd, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,27 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H2), 7,16 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 6,45 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,9$ Hz, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H3) 4,11 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,2$ Hz, NCH₂), 1,75 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1,29 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,90 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,2$ Hz, CH₃).

30
 - *5-cloro-1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol (IIIe)*. Siguiendo el **Procedimiento General I**, 5-cloroindol (245 mg, 1,62 mmol) [DMSO (8 ml), NaH (78 mg, 1,94 mmol), 3-bromoprop-1-ino (252 μ l, 2,26 mmol)] dio lugar a **IIIe** (300 mg, 98 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 7,63 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,50 (bd, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,40 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,0$ Hz,

H2), 7,21 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 6,50 (dd, 1H, $J_{3-7} = 0,9$ Hz, $J_{2-3} = 3,0$ Hz, H3), 5,03 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CCH}} = 2,7$ Hz, CH₂), 2,95 (t, 1H, $J_{\text{CHCCH}_2} = 2,7$ Hz, CH).

5 *1.2. Procedimiento general II para la síntesis de compuestos de fórmula (III) donde Y = N (N-alquilación de 5-X-7-azaindol)*

Basado en el procedimiento descrito por García-Frutos y col. (*J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9173-9177), a una disolución del sustrato correspondiente de fórmula general (II) con Y = N (1 equiv) en acetona (11 ml/mmol), se añadieron KOH (1,5 equiv), hidrógenosulfato de tetrabutilamonio (catalizador de transferencia de fase) (0,2 equiv) y el correspondiente haluro de alquilo (1,2 equiv). La mezcla se calentó a 75 °C con agitación en atmósfera inerte durante 2–5 h. Una vez completada la reacción, monitorizada por TLC, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se añadió agua (10 ml/mmol). La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 30 ml/mmol) y la fase orgánica combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna flash, utilizando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo (85/15), obteniéndose el producto como un aceite.

20 - *1-bencil-5-bromo-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (III f)*. Siguiendo el **Procedimiento General II**, 5-bromo-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (350 mg, 1,78 mmol) [KOH (168 mg, 2,70 mmol), [CH₃(CH₂)₃]₄N(HSO₄) (51 mg, 0,15 mmol), bromuro de bencilo (252 μl, 2,13 mmol), acetona (20 ml)] dio lugar a **III f** (506 mg, > 99 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 8,32 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H6), 8,14 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,55 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H2), 7,28 (m, 5H, Ar), 6,50 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,3$ Hz, H3), 5,52 (s, 2H, CH₂). Datos espectrales acordes con la literatura (Laha JK y col. *Chem. Comm.* **2016**, 52, 4329-4332)

30 - *5-bromo-1-butil-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (III g)*. Siguiendo el **Procedimiento General II**, 5-bromo-1H-pirrolo[2,3-b]piridina (350 mg, 1,78 mmol) [KOH (168 mg, 2,70 mmol), [CH₃(CH₂)₃]₄N(HSO₄) (51 mg, 0,15 mmol), 1-iodobutano (243 μl, 2,13 mmol), acetona (20 ml)] dio lugar a **III g** (452 mg, > 99 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 8,33 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H6), 8,05 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,42 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,6$ Hz, H2), 6,42 (d, 1H, $J_{2-3} = 3,6$ Hz, H3), 4,26 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,2$ Hz, NCH₂), 1,79 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1,26 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,87 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,5$ Hz, CH₃).

- *5-bromo-1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrolo[2,3-b]piridina* (**IIIh**). Siguiendo el **Procedimiento General II**, 5-bromo-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina (400 mg, 2,03 mmol) [KOH (192 mg, 3,09 mmol), [CH₃(CH₂)₃]₄N(HSO₄) (59 mg, 0,15 mmol), 3-bromoprop-1-ino (271 μ l, 2,44 mmol), acetona (23 ml)] dio lugar a **IIIh** (255 mg, 53 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 8,32 (d, 1H, J₄₋₆ = 2,1 Hz, H6), 8,11 (d, 1H, J₄₋₆ = 2,1 Hz, H4), 7,60 (d, 1H, J₂₋₃ = 3,3 Hz, H2), 6,51 (d, 1H, J₂₋₃ = 3,3 Hz, H3), 5,14 (d, 2H, J_{CH₂CCH} = 2,7 Hz, CH₂), 2,94 (t, 1H, J_{CHCCH₂} = 2,7 Hz, CH).

- *1-bencil-5-metoxi-1H-pirrolo[2,3-b]piridina* (**IIIi**). Siguiendo el **Procedimiento General II**, 5-metoxi-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina (80 mg, 0,054 mmol) [KOH (51 mg, 0,82 mmol), [CH₃(CH₂)₃]₄N(HSO₄) (16 mg, 0,04 mmol), bromuro de bencilo (77 μ l, 0,65 mmol), acetona (6 ml)] dio lugar a **IIIi** (128 mg, > 99 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 8,10 (d, 1h, J₄₋₆ = 2,7 Hz, H6), 7,52 (d, 1H, J₄₋₆ = 2,7 Hz, H4), 7,42 (d, 1H, J₂₋₃ = 3,3 Hz, H2), 7,27 (m, 5H, Ar), 6,43 (d, 1H, J₂₋₃ = 3,3 Hz, H3), 5,49 (s, 2H, CH₂), 3,84 (s, 3H, CH₃).

1.3. Procedimiento general III para la síntesis de compuestos de fórmula (I) (reacción de Mannich)

Una disolución de dimetilamina (40 %_{aq}) o piperidina (1–1,5 equiv.) y formaldehído (37 %_{aq}, 1–2 equiv.) en AcOH glacial (0,3–5,5 ml/mmol), bajo atmósfera de argón y agitada durante 10 min, se adicionó a una solución de **IIIa-i** (1 equiv.) en AcOH glacial (0,1-2 ml/mmol) a 0 °C, dejando en agitación durante 5 min, después de lo cual se llevó la disolución a temperatura ambiente y se agitó durante 2-24 h. Cuando la reacción dejó de evolucionar (TLC), se añadió NaOH_{aq} (30%) hasta pH 14. La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 \times 30 ml/mmol de sustrato) y la fase orgánica resultante se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío. En ciertos casos, los productos obtenidos necesitaron purificación por cromatografía en columna utilizando alúmina básica como fase estacionaria. Posteriormente, todo los productos, en forma de aceites, se salinizaron a sales de oxalato. Las sales de oxalato se prepararon mediante la adición gota a gota de una solución de ácido oxálico 1 M en acetato de etilo seco (1 equiv), bajo argón, al compuesto (**I**) previamente disuelto en acetato de etilo.

Una vez añadida la cantidad necesaria de ácido, se mantuvieron en agitación 2 h. El sólido formado se decantó por centrifugación y las trazas de disolvente se evaporaron a vacío. Los disolventes empleados en la salinización se secaron previamente sobre MgSO₄ anhidro.

5 - *1-(1-butil-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (Ia)*. Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIa** (174 mg, 1 mmol) [dimetilamina (127 µl, 1,00 mmol), formaldehído (76 µl, 1,00 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **Ia**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (79 mg, 34 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 7,67 (dm, 1H, J₄₋₅ = 8,1 Hz, H4), 7,37 (dm, 1H, J₆₋₇ = 8,1 Hz, H7), 7,15 (m, 2H, H5 y H6), 7,01 (ddd, 1H, J₄₋₅ = 8,1 Hz, J₅₋₆ = 7,8 Hz, H5), 4,16 (t, 2H, J_{NCH₂CH₂} = 6,9 Hz, NCH₂CH₂), 3,56 (s, 2H, C3CH₂), 2,19 [s, 6H, N(CH₃)₂], 1,80 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1,33 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,92 (t, 3H, J_{CH₂CH₃} = 7,2 Hz, CH₃).

15 Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 142–144 °C. RMN de ¹³C (DMSO-d₆, 75,4 MHz) δ 163,4; 135,8; 131,6; 127,7; 121,7; 119,7; 118,8; 110,3; 102,3; 50,8; 45,3; 41,1; 31,7; 19,4; 13,5. Anal. Elem. calc. para C₁₅H₂₂N₂·H₂O·C₂H₂O₄: C, 60,34; H, 7,74; N, 8,28. Encontrado: C, 60,54; H, 7,62; N, 7,97.

20 - *1-butil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (Ib)*. Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIa** (170 mg, 0,98 mmol) [piperidina (97 µl, 0,98 mmol), formaldehído (74 µl, 0,98 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **Ib**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (209 mg, 79 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 7,73 (dm, 1H, J₄₋₅ = 7,8 Hz, H4), 7,36 (dm, 1H, J₆₋₇ = 8,1 Hz, H7), 7,14 (m, 2H, H2 y H6), 7,02 (ddd, 1H, J₄₋₅ = 7,8 Hz, J₅₋₆ = 7,8 Hz, H5), 4,12 (t, 2H, J_{NCH₂CH₂} = 7,1 Hz, NCH₂CH₂), 3,62 (s, 2H, C3CH₂), 2,41 (m, 4H, H2'), 1,78 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1,53 (m, 4H, H3'), 1,43 (m, 2H, H4'), 1,33 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,92 (t, 3H, J_{CH₂CH₃} = 7,2 Hz, CH₃).

30 Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 156–158 °C. RMN de ¹³C (DMSO-d₆, 75,4 MHz) δ 164,4; 135,8; 131,5; 128,0; 121,7; 119,7; 118,9; 110,3; 101,2; 51,2; 50,5; 45,4; 31,8; 22,6; 21,5; 19,5; 13,5. Anal. Elem. calc. para C₁₈H₂₆N₂·C₂H₂O₄: C, 66,64; H, 7,83; N, 7,77. Encontrado: C, 66,28; H, 7,68; N, 7,64.

- *N,N-dimetil-1-(1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol-3-il)metanamina (Ic)*. Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIb** (167 mg, 1,08 mmol) [dimetilamina (136 μ l, 1,08 mmol), formaldehído (81 μ l, 1,08 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **Ib** como un aceite amarillo que no requirió purificación (228 mg, > 99 %). RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,71 (dm, 1H, $J_{4-5} = 8,1$ Hz, H4), 7,47 (dm, 1H, $J_{6-7} = 8,4$ Hz, H7), 7,26 (s, 1H, H2), 7,20 (ddd, 1H, $J_{4-6} = 1,2$ Hz, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, $J_{6-7} = 8,4$ Hz, H6), 7,07 (ddd, 1H, $J_{5-7} = 1,2$ Hz, $J_{4-5} = 8,1$ Hz, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, H5), 5,02 (d, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,4$ Hz, NCH_2CCH), 3,59 (s, 2H, C_3CH_2), 2,93 (t, 1H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,4$ Hz, CH), 2,21 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 168–170 $^\circ\text{C}$. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,2; 135,6; 131,0; 127,9; 122,1; 120,2; 119,0; 110,5; 103,8; 78,8; 76,0; 50,8; 41,3; 35,3. Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 63,56; H, 6,00; N, 9,27. Encontrado: C, 63,73; H, 6,03; N, 8,94.

- *3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol (Id)*. Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIb** (118 mg, 0,76 mmol) [piperidina (75 μ l, 0,76 mmol), formaldehído (58 μ l, 0,76 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **Id**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (191 mg, > 99 %). RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,75 (dm, 1H, $J_{4-5} = 8,1$ Hz, H4), 7,46 (dm, 1H, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H7), 7,22 (s, 1H, H2), 7,19 (ddd, 1H, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H6), 7,07 (ddd, 1H, $J_{4-5} = 8,1$ Hz, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, H5), 5,01 (d, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,4$ Hz, NCH_2CCH), 3,61 (s, 2H, C_3CH_2), 2,92 (t, 1H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,4$ Hz, CH), 2,40 (m, 4H, H_2'), 1,53 (m, 4H, H_3'), 1,41 (m, 2H, H_4').

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 162–164 $^\circ\text{C}$. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,1; 135,5; 131,1; 128,2; 122,1; 120,2; 119,0; 110,5; 103,2; 78,8; 76,1; 51,3; 50,3; 35,3; 22,6; 21,4. Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 63,32; H, 6,71; N, 7,77. Encontrado: C, 63,09; H, 6,51; N, 7,80.

- *1-(1-bencil-5-cloro-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (Ie)*. Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIc** (219 mg, 0,91 mmol) [dimetilamina (115 μ l, 0,91 mmol), formaldehído (68 μ l, 0,91 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **Ie** como un aceite

amarillo que no requirió purificación (269 mg, > 99 %). RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,79 (bd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,36–7,14 (m, 7H, Ar), 7,11 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,1$ Hz, H6), 5,34 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,57 (s, 2H, C_3CH_2), 2,22 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$].

- 5 Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 177–179 °C. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,3; 137,4; 135,7; 134,4; 133,5; 129,1; 128,6; 127,6; 127,0; 124,9; 122,0; 118,5; 50,6; 49,4; 41,3.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{ClN}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 61,78; H, 5,44; N, 7,20. Encontrado: C, 61,67;
10 H 5,51; N, 6,99.

- *1-bencil-5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol* (**If**). Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIc** (219 mg, 0,91 mmol) [piperidina (90 μl , 0,91 mmol), formaldehído (68 μl , 0,91 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **If**. El crudo se purificó por cromatografía en
15 columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (90/10) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (278 mg, 91 %). RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,77 (bd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,37–7,16 (m, 7H, Ar), 7,08 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 5,38 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,60 (s, 2H, C_3CH_2), 2,39 (m, 4H, H_2'), 1,53 (m, 4H, H_3'), 1,42 (m, 2H, H_4').

20 Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 198–200 °C. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,1; 137,4; 134,4; 133,4; 129,3; 128,6; 127,6; 127,1; 124,8; 121,9; 118,5; 112,3; 51,4; 50,3; 49,4; 22,7; 21,6. Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{ClN}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 64,41; H, 5,88; N, 6,53. Encontrado: C, 64,30; H, 5,79; N, 6,29.

25 - *1-(1-butil-5-cloro-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina* (**Ig**). Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIId** (168 mg, 0,81 mmol) [dimetilamina (102 μl , 0,81 mmol), formaldehído (61 μl , 0,81 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **Ig** como un aceite
30 amarillo que no requirió purificación (210 mg, > 99 %). RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,71 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,37 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,21 (s, 1H, H2), 7,11 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 4,14 (t, 2H, $\text{JNCH}_2\text{CH}_2 = 7,2$ Hz, NCH_2CH_2), 3,53 (s, 2H, C_3CH_2), 2,18 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 1,78 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,29 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,93 (t, 3H, $\text{J}_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,2$ Hz, CH_3).

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 150–152 °C. RMN de ¹³C (DMSO-d₆, 75,4 MHz) δ 163,7; 134,3; 133,2; 128,9; 124,7; 121,7; 118,3; 112,0; 102,5; 50,5; 45,6; 31,7; 19,3; 13,5. Anal. Elem. calc. para C₁₅H₂₁ClN₂·H₂O·C₂H₂O₄: C, 54,76; H, 6,76; N, 7,51. Encontrado: C, 54,48; H, 6,32; N, 7,83.

- *1-butil-5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-indol (Ih)*. Siguiendo el **Procedimiento General III, III d** (212 mg, 1,02 mmol) [piperidina (101 µl, 1,02 mmol), formaldehído (76 µl, 1,02 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **Ih**. El crudo se purificó por cromatografía en columna de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente (287 mg, 92 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 7,73 (d, 1H, J₄₋₆ = 2,1 Hz, H4), 7,38 (d, 1H, J₆₋₇ = 8,7 Hz, H7), 7,20 (s, 1H, H2), 7,10 (dd, 1H, J₄₋₆ = 2,1 Hz, J₆₋₇ = 8,7 Hz, H6), 4,14 (t, 2H, J_{NCH₂CH₂} = 7,2 Hz, NCH₂CH₂), 3,57 (s, 2H, C3CH₂), 2,37 (m, 4H, H2'), 1,78 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1,52 (m, 4H, H3'), 1,42 (m, 2H, H4'), 1,29 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,91 (t, 3H, J_{CH₂CH₃} = 7,5 Hz, CH₃).

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 184–186 °C. RMN de ¹³C (D₂O + gotas de acetona-d₆ para calibración, 75,4 MHz) δ 165,5; 134,5; 133,3; 128,7; 125,5; 122,3; 117,7; 112,0; 100,9; 52,1; 51,1; 46,0; 31,3; 22,8; 21,0; 19,3; 12,8. Anal. Elem. calc. para C₁₈H₂₅ClN₂·C₂H₂O₄: C, 60,83; H, 6,89; N, 7,09. Encontrado: C, 60,48; H, 6,75; N, 7,01.

- *1-(5-cloro-1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (Ii)*. Siguiendo el **Procedimiento General III, III e** (121 mg, 0,64 mmol) [dimetilamina (81 µl, 0,64 mmol), formaldehído (48 µl, 0,64 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **Ii** como un aceite amarillo que no requirió purificación (149 mg, 95 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 7,72 (d, 1H, J₄₋₆ = 2,1 Hz, H4), 7,48 (d, 1H, J₆₋₇ = 8,7 Hz, H7), 7,32 (s, 1H, H2), 7,17 (dd, 1H, J₄₋₆ = 2,1 Hz, J₆₋₇ = 8,7 Hz, H6), 5,04 (d, 2H, J_{NCH₂CCH} = 2,4 Hz, NCH₂CCH), 3,54 (s, 2H, C3CH₂), 2,96 (t, 1H, J_{NCH₂CCH} = 2,4 Hz, CH), 2,19 [s, 6H, N(CH₃)₂].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 170–172 °C. RMN de ¹³C (DMSO-d₆, 75,4 MHz) δ 164,1; 134,1; 132,5; 129,1; 125,1; 122,1; 118,6; 112,2; 104,1; 78,5; 76,3; 50,7; 41,5; 35,6. Anal. Elem. calc. para C₁₄H₁₅ClN₂·C₂H₂O₄: C, 57,06; H, 5,09; N, 8,32. Encontrado: C, 56,73; H, 5,05; N, 8,03.

- *5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol* (**lj**). Siguiendo el **Procedimiento General III, Ille** (117 mg, 0,62 mmol) [piperidina (61 μ l, 0,62 mmol), formaldehído (47 μ l, 0,62 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **lj**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (50/50) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (175 mg, > 99 %). RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 7,76 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,47 (d, 1H, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H7), 7,29 (s, 1H, H2), 7,17 (dd, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, $J_{6-7} = 8,7$ Hz, H6), 5,03 (d, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,4$ Hz, NCH_2CCH), 3,57 (s, 2H, C3CH_2), 2,95 (t, 1H, $J_{\text{NCH}_2\text{CCH}} = 2,4$ Hz, CH), 2,38 (m, 4H, H2'), 1,52 (m, 4H, H3'), 1,41 (m, 2H, H4').

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 187–189 $^\circ\text{C}$. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,3; 134,1; 132,7; 129,4; 125,2; 122,1; 118,6; 112,2; 103,3; 78,5; 76,4; 51,3; 49,9; 35,6; 22,6; 21,5. Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\cdot\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 60,56; H, 5,62; N, 7,43. Encontrado: C, 60,14; H, 5,73; N, 7,14.

- *1-(1-bencil-5-bromo-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)-N,N-dimetilmetanamina* (**lk**). Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIf** (134 mg, 0,47 mmol) [dimetilamina (118 μ l, 0,47 mmol), formaldehído (70 μ l, 0,47 mmol), ácido acético glacial (2,5 ml)] dio lugar a **lk** como un aceite verdoso que no requirió purificación (161 mg, > 99 %). RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,32 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H6), 8,24 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,41 (s, 1H, H2), 7,27 (m, 5H, Ar), 5,47 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,52 (s, 2H, C3CH_2), 2,17 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 203–205 $^\circ\text{C}$. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 175,7; 155,2; 154,0; 146,9; 144,1; 140,5; 139,0; 138,1; 137,2; 132,1; 122,3; 111,3; 61,6; 58,4; 51,7. Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrN}_3\cdot\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 52,55; H, 4,64; N, 9,68. Encontrado: C, 52,42; H, 4,64; N, 9,41.

- *1-bencil-5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina* (**ll**)
Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIf** (280 mg, 0,98 mmol) [piperidina (96 μ l, 0,98 mmol), formaldehído (73 μ l, 0,98 mmol), ácido acético glacial (2,5 ml)] dio lugar a **ll**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un

aceite amarillo (372 mg, > 99 %). RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,31 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,4$ Hz, H6), 8,27 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,4$ Hz, H4), 7,38 (s, 1H, H2), 7,27 (m, 5H, Ar), 5,46 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,55 (s, 2H, C_3CH_2), 2,35 (m, 4H, H_2'), 1,50 (m, 4H, H_3'), 1,38 (m, 2H, H_4').

- 5 Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 214–216 °C. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,0; 145,4; 143,4; 137,5; 133,3; 130,0; 128,6; 127,6; 127,3; 121,9; 111,8; 51,5; 50,2; 47,5; 22,8; 21,6. Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{BrN}_3\cdot\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 55,71; H, 5,10; N, 8,86. Encontrado: C, 55,58; H, 5,05; N, 8,52.

- 10 - *1-(5-bromo-1-butil-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (Im)*. Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIg** (174 mg, 0,69 mmol) [dimetilamina (87 μl , 0,69 mmol), formaldehído (52 μl , 0,69 mmol), ácido acético glacial (1,7 ml)] dio lugar a **Im** como un aceite que no requirió purificación (198 mg, 93 %). RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,27 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,4$ Hz, H6), 8,19 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,4$ Hz, H4), 7,38 (s, 1H, H2), 4,25 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 6,9$ Hz, NCH_2CH_2), 3,52 (s, 2H, C_3CH_2), 2,17 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 1,81 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,27 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,93 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,5$ Hz, CH_3).

- Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 181–183 °C. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,2; 145,5; 143,1; 133,3; 129,9; 121,6; 111,5; 101,8; 50,9; 43,9; 41,5; 31,6; 19,3; 13,5. Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\cdot\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$: C, 48,01; H, 5,54; N, 10,50. Encontrado: C, 48,43; H, 5,46; N, 10,35.

- 25 - *5-bromo-1-butil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina (In)*. Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIg** (125 mg, 0,49 mmol) [piperidina (49 μl , 0,49 mmol), formaldehído (37 μl , 0,49 mmol), ácido acético glacial (1,8 ml)] dio lugar a **In**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (175 mg, > 99 %). RMN de ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,27 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H6), 8,22 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,1$ Hz, H4), 7,35 (s, 1H, H2), 4,24 (t, 2H, $J_{\text{NCH}_2\text{CH}_2} = 7,2$ Hz, NCH_2CH_2), 3,55 (s, 2H, C_3CH_2), 2,35 (m, 4H, H_2'), 1,81 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1,51 (m, 4H, H_3'), 1,40 (m, 2H, H_4'), 1,28 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,90 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,2$ Hz, CH_3).

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 208–210 °C. RMN de ¹³C (D₂O + gotas de acetona-d₆ para calibración, 75,4 MHz) δ 215,8; 145,4; 143,7; 134,4; 130,7; 122,7; 112,1; 100,4; 52,6; 51,3; 45,2; 31,8; 23,2; 21,4; 19,7; 13,2. Anal. Elem. calc. para C₁₇H₂₄BrN₃·C₂H₂O₄: C, 51,83; H, 5,95; N, 9,54. Encontrado: C, 51,95; H, 5,81; N, 9,46.

- *1-(5-bromo-1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrololo[2,3-b]piridin-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (Io)*. Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIh** (143 mg, 0,61 mmol) [dimetilamina (77 µl, 0,61 mmol), formaldehído (46 µl, 0,61 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **Io**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (50/50) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (114 mg, 64 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 8,31 (d, 1H, J₄₋₆ = 2,4 Hz, H6), 8,24 (d, 1H, J₄₋₆ = 2,4 Hz, H4), 7,35 (s, 1H, H2), 5,10 (d, 2H, J_{NCH₂CCH} = 2,4 Hz, NCH₂CCH), 3,56 (s, 2H, C3CH₂), 2,93 (t, 1H, J_{NCH₂CCH} = 2,4 Hz, CH), 2,19 [s, 6H, N(CH₃)₂].

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 179–181 °C. RMN de ¹³C (DMSO-d₆, 75,4 MHz) δ 164,1; 145,0; 143,6; 132,6; 130,3; 121,8; 112,1; 103,1; 78,7; 75,9; 50,8; 41,7; 33,7. Anal. Elem. calc. para C₁₃H₁₄BrN₃·C₂H₂O₄: C, 47,14; H, 4,22; N, 10,99. Encontrado: C, 47,22; H, 4,34; N, 10,55.

- *5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrololo[2,3-b]piridina (Ip)*. Siguiendo el **Procedimiento General III, IIIh** (113 mg, 0,48 mmol) [piperidina (47 µl, 0,48 mmol), formaldehído (36 µl, 0,48 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **Ip**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (1/99) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (143 mg, 89 %). RMN de ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) δ 8,31 (d, 1H, J₄₋₆ = 2,1 Hz, H6), 8,28 (d, 1H, J₄₋₆ = 2,1 Hz, H4), 7,50 (s, 1H, H2), 5,10 (d, 2H, J_{NCH₂CCH} = 2,4 Hz, NCH₂CCH), 3,60 (s, 2H, C3CH₂), 2,92 (t, 1H, J_{NCH₂CCH} = 2,4 Hz, CH), 2,38 (m, 4H, H2'), 1,53 (m, 4H, H3'), 1,42 (m, 2H, H4').

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 198–200 °C. RMN de ¹³C (DMSO-d₆, 75,4 MHz) δ 163,9; 145,0; 143,4; 132,6; 130,1; 122,0;

112,0; 102,7; 78,6; 75,9; 51,5; 50,2; 33,6; 22,8; 21,6. Anal. Elem. calc. para $C_{16}H_{18}BrN_3 \cdot C_2H_2O_4$: C, 51,20; H, 4,77; N, 9,95. Encontrado: C, 50,81; H, 4,74; N, 9,68.

- *1-(1-bencil-5-metoxi-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)-N,N-dimetilmetanamina (Iq)*.

5 Siguiendo el **Procedimiento General III, Ili** (73 mg, 0,31 mmol) [dimetilamina (39 μ l, 0,31 mmol), formaldehído (23 μ l, 0,31 mmol), ácido acético glacial (1,5 ml)] dio lugar a **Iq** como un aceite amarillo que no requirió purificación (67 mg, 74 %). RMN de 1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,03 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,7$ Hz, H6), 7,63 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,7$ Hz, H4), 7,33 (s, 1H, H2), 7,27 (m, 5H, Ar), 5,45 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,86 (s, 3H, CH_3), 3,54 (s, 2H, $C3CH_2$), 2,18 [s, 6H, $N(CH_3)_2$].

10

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 187–189 $^{\circ}C$. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,3; 151,5; 142,3; 138,0; 133,8; 132,3; 128,6; 127,4; 127,2; 119,9; 110,3; 101,7; 56,1; 51,0; 47,4; 41,3. Anal. Elem. calc. para $C_{18}H_{21}N_3 \cdot C_2H_2O_4$: C, 62,33; H, 6,01; N, 10,90. Encontrado: C, 62,10; H, 5,92; N, 10,68.

15

- *1-bencil-5-metoxi-3-(piperidin-1-ilmetil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina (Ir)*. Siguiendo el **Procedimiento General III, Ili** (60 mg, 0,25 mmol) [piperidina (25 μ l, 0,25 mmol), formaldehído (19 μ l, 0,25 mmol), ácido acético glacial (2 ml)] dio lugar a **Ir**. El crudo se purificó por cromatografía en columna flash de alúmina utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (50/50) como eluyente, obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo (66 mg, 78 %). RMN de 1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ 8,02 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,4$ Hz, H6), 7,67 (d, 1H, $J_{4-6} = 2,4$ Hz, H4), 7,30 (s, 1H, H2), 7,27 (m, 5H, Ar), 5,44 (s, 2H, NCH_2Ph), 3,86 (s, 3H, CH_3), 3,57 (s, 2H, $C3CH_2$), 2,37 (m, 4H, $H2'$), 1,52 (m, 4H, $H3'$), 1,40 (m, 2H, $H4'$).

25

Se preparó la sal de oxalato de acuerdo a lo descrito en el Procedimiento General III. Pf 195–197 $^{\circ}C$. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz) δ 164,3; 151,5; 142,3; 138,0; 133,7; 132,4; 128,6; 127,5; 127,3; 120,2; 110,3; 56,1; 51,2; 50,4; 47,5; 22,7; 21,5. Anal. Elem. calc. para $C_{21}H_{25}N_3O \cdot C_2H_2O_4$: C, 64,93; H, 6,40; N, 9,88. Encontrado: C, 64,55; H, 6,33; N, 9,60.

30

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

2.1. Materiales y Métodos

- Reactivos. Medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, por sus siglas en inglés Eagle's minimum essential medium), medio F12, penicilina/estreptomicina, gentamicina, L-glutamina, tripsina/EDTA, bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), memantina, rotenona, melatonina, AO y DMSO fueron suministrados por Sigma-Aldrich/Merck. La oligomicina A se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania). Los aminoácidos no esenciales, el suero fetal bovino (SFB) se obtuvo de Gibco (Madrid, España). El kit de fosfato de *p*-nitrofenol (pNPP) para medir la actividad fosfatasa fue suministrado por VWR. Todo el material estéril (frascos de cultivo, tubos Falcon, pipetas y placas multipocillo) se obtuvo de Corning (Madrid, España).

- Cultivos de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. En 1970, J.L. Biedler desarrolló la línea celular SH-SY5Y, como un subclón de la línea SK-N-SH, y estableció las condiciones básicas para su cultivo (Biedler JL y col. *Cancer Res.* **1978**, 38, 3751-3757. Proviene de un neuroblastoma metastásico de una niña de 4 años, por lo que presentan un fenotipo neuronal, y pueden ser diferenciadas con diferentes sustancias, como el ácido retinoico (Korecka JA y col. *PLoS One* **2013**, 8, e63862. Estas células en cultivo son mayoritariamente adherentes, crecen en monocapa con tendencia a agregarse y presentan una morfología tipo epitelial con pequeñas prolongaciones. Este modelo celular ha sido ampliamente utilizado para experimentos in vitro que requieran células de tipo neuronal.

Además, al ser de origen humano, expresan una serie de proteínas específicas que no están presentes en cultivos primarios de roedores. Las células SH-SY5Y no diferenciadas presentan actividad Tyr-hidroxilasa (Kume T y col. *Neurosci. Lett.* **2008**, 443, 199-203), transportador de dopamina y sus receptores tipos 2 y 3 (Arun P y col. *J. Neurochem.* **2008**, 106, 1669-1680), receptores muscarínicos y nicotínicos (Gould J y col. *Neurosci. Lett.* **1992**, 145, 37-40), canales de Ca²⁺, Na⁺ y K⁺ dependientes de voltaje (Reeve HL y col. *Neurosci. Lett.* **1992**, 135, 37-40; Reuveny E y col. *Brain Res.* **1993**, 603, 64-73), receptores purinérgicos P2X7 (Larsson KP y col. *J. Neurochem.* **2002**, 83, 285-298) y receptores opioides (Kazmi SM y col. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1986**, 137, 813-820).

Estas células se encuentran almacenadas en criotubos en un tanque con N₂ líquido (-173 °C). Para su descongelación, que debe ser lo más rápida posible, se resuspende el volumen

del criotubo en 10 ml de medio de cultivo precalentado a 37 °C. El medio de crecimiento para la línea celular SH-SY5Y consiste en una mezcla (1:1) de medios EMEM y F12, enriquecida con SFB al 10 % (previamente inactivado por calor, a 56 °C durante 30 min), penicilina /estreptomina (100 UI/ml y 100 µg/ml, respectivamente), aminoácidos no esenciales (0,1 mM), NaHCO₃ (23 mM) y piruvato sódico (1 mM). A continuación, se centrifugan las células a 800 rpm durante 10 min, el precipitado se resuspende en medio de cultivo fresco y se traspasa a un frasco de cultivo. Así, las células se mantuvieron en cultivo en monocapa en frascos estériles de 75-150 cm², sustituyéndoles el medio de cultivo por medio fresco cada 3-4 días.

Cuando las células alcanzaron una confluencia mayor del 80 %, se realizaron los pases y las siembras en placas, utilizando la tripsina/EDTA como proteasa para romper las uniones de las células entre ellas y al plástico de los frascos de cultivo. Tras una centrifugación a 800 rpm durante 10 min, las células se resuspendieron en medio fresco al 10 % de SFB y se traspasaron a frascos de cultivo o se sembraron en placas. Para su almacenamiento, se depositaron en los criotubos suspendidas en medio celular con un 10 % de SFB y un 10 % de DMSO (actuando el DMSO como agente crioprotector) y se congelaron lentamente (1 h a 0 °C, 24 h a -80 °C y finalmente traspase al tanque de N₂ a -173 °C).

- Incubación de los compuestos. Los compuestos en forma de sal de oxalato se alicuotaron en soluciones madre a una concentración 10 mM. Todas las alícuotas se almacenaron a -20 °C.

- Experimentos de neuroprotección y actividad enzimática en células SH-SY5Y. Para evaluar el efecto neuroprotector y la actividad fosfatasa de los derivados de gramina objeto de esta invención, las células SH-SY5Y se preincubaron con los compuestos 24 h después de su siembra, sin haber alcanzado la confluencia. Después de lo cual, se procedió a la coincubación de los compuestos con el correspondiente tóxico, cambiando el medio de cultivo por medio fresco con un 1 % de SFB. Una vez finalizadas las 20–24 h de coincubación, se midió la viabilidad neuronal por el método de la reducción del MTT o la actividad fosfatasa por el método del pNPP, que serán explicados en detalle más adelante.

Para los ensayos de neuroprotección con rotenona/oligomicina A (30 µM/10 µM, respectivamente), los compuestos se evaluaron a la concentración de 10 nM. Para los

experimentos con AO (20 nM para neuroprotección y 15 nM para la actividad fosfatasa), los compuestos se cribaron a 0,1 μ M.

5 - Método de la reducción del MTT para la medición de la viabilidad celular. Este método, que usa el MTT o bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio como sustrato, se desarrolló en la década de los 80 (Mosmann y col. *J. Immunol. Meth.* **1983**, 65, 55-63) y permite medir la viabilidad celular de forma rápida, económica y sencilla. Se trata de un ensayo colorimétrico, comúnmente utilizado para el cribado de compuestos, el cual
10 extrapola la viabilidad celular a partir del metabolismo mitocondrial. Las enzimas mitocondriales deshidrogenasas de las células viables, o metabólicamente activas, son capaces de reducir el MTT (coloración amarilla, soluble en medio acuoso) a formazán (coloración morada, insoluble). Así, se utiliza la función mitocondrial como marcador de viabilidad celular asumiendo que la reducción del MTT será proporcional al número de células viables.

15 Para llevar a cabo el método, el MTT, disuelto en agua (12 mM), se añade directamente a los pocillos (concentración final 1,2 mM) y se incuba durante 2 h en el caso de las células SH-SY5Y o 30 min en el caso de neuronas de corteza motora y de rodajas de hipocampo de rata. Tras retirar el medio, se añade DMSO que lisa las células y solubiliza el formazán
20 resultante. La absorbancia se mide a 540 nm en un lector de placas multipocillo FLUOstar Optima (BMG, Alemania), siendo la señal dependiente de la concentración. A mayor absorbancia, mayor viabilidad celular.

25 - Método del pNPP para la medición de la actividad fosfatasa. El *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) actúa como sustrato cromogénico para la mayoría de enzimas fosfatasas. Al desfosforilarlo, generan *p*-nitrofenol, el cual en condiciones alcalinas produce *p*-nitrofenolato, sustancia que absorbe a 405 nm. Es un método inespecífico ya que mide la actividad fosfatasa total de la muestra, pero en presencia de un inhibidor específico de Ser/Thr fosfatasas, como el AO, se acepta que los cambios en la absorbancia se deben a la
30 actividad de estas enzimas (McAvoy T y col. *Curr. Prot. Mol. Biol.* **2010**, Ch.18:18.

Para medir la actividad fosfatasa de las muestras se utilizó el kit Biosciences Phosphatase Assay (VWR, España), que proporciona tanto el sustrato de reacción como el buffer para la reacción. Se elimina el medio de cultivo de los pocillos y se añade 100 μ l por pocillo de una mezcla 1:1 de sustrato y buffer de reacción, siendo la concentración final de pNPP 10 mM.

La mezcla de reacción se incubó en oscuridad a 37 °C durante 30 minutos y la absorbancia se midió a 405 nm en un lector de placas FLUOstar Optima (BMG, Alemania), siendo la señal de absorbancia dependiente de la concentración. La mayor absorbancia a esta longitud de onda es indicativa de mayor actividad fosfatasa.

5

- Análisis estadístico y representación de los datos farmacológicos. Los valores de los resultados farmacológicos se expresan como la media \pm error estándar, habiéndose utilizado siempre al menos cuatro experimentos independientes para cada valor. Las comparaciones entre los grupos experimentales y el control se realizaron mediante un análisis estadístico de la varianza (ANOVA) seguido de un test *post hoc* Newman-Keuls, en el resto de experimentos. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) y $p \leq 0,001$ (***). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0. (California, EE.UU.).

10

15 En los experimentos de neuroprotección, el % Viabilidad celular se calcula tomando como 100 % el promedio de las absorbancias obtenidas en las células sin tratamiento, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{Absorbancia media células tratadas}) / (\text{Absorbancia media células control}) \times 100$$

20 De manera análoga, el % Actividad fosfatasa se calcula tomando como 100 % el promedio de las absorbancias obtenidas en las células sin tratamiento, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad fosfatasa} = (\text{Absorbancia media células tratadas}) / (\text{Absorbancia media células control}) \times 100$$

25 El % Protección se calcula tomando como 100 % el promedio de la muerte celular obtenida en los pocillos tratados únicamente con el tóxico, aplicando la fórmula:

$$\% \text{ Protección} = 100 - [(\% \text{ muerte células con tóxico y compuesto}) / (\% \text{ muerte células sólo tóxico}) \times 100]$$

30 El % Mantenimiento de la actividad fosfatasa se calcula tomando como 100 % el promedio de la actividad fosfatasa obtenida en los pocillos tratados únicamente con el tóxico, aplicando la fórmula:

$$\% \text{ Mantenimiento actividad} = 100 - [(\% \text{ actividad fosfatasa en células con tóxico y compuesto}) / (\% \text{ actividad fosfatasa en células sólo tóxico}) \times 100]$$

2.2. Evaluación de la actividad fosfatasa de los compuestos objeto de la invención

Existen diferentes alternativas para medir la actividad fosfatasa de una muestra biológica, ya sea mediante ensayos colorimétricos o métodos radioactivos. Estos últimos son la manera clásica de medir la actividad fosfatasa, mediante el uso de sustratos marcados con [γ - ^{32}P]-ATP (Kililea SD y col. *Meth. Mol. Biol.* **1998**, 93, 23-33) que, si bien presentan la ventaja de ser una medida muy precisa de la cinética de la reacción de desfosforilación, tienen el gran inconveniente de su naturaleza radiactiva. En relación a los ensayos colorimétricos, el método del verde malaquita y el del *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) son los más utilizados. El verde malaquita es un compuesto capaz de formar complejos con los fosfatos libres en solución acuosa, los cuales absorben a una longitud de onda de 620 nm (Baykov AA y col. *Anal. Biochem.* **1988**, 171, 266-270). Se trata de un ensayo preciso pero complicado, puesto que requiere el aislamiento por inmunoprecipitación de la enzima fosfatasa, la limpieza de la muestra biológica de fosfatos y la necesidad de añadir exógenamente un sustrato o péptido fosforilado, lo cual encarece el ensayo (McAvoy, **2010**). En cuanto al método del *p*NPP, esta sustancia actúa como sustrato cromogénico para la mayoría de las enzimas fosfatasas (Tyr fosfatasas y Ser/Thr fosfatasas), las cuales, al desfosforilarlo, generan *p*-nitrofenol, que en condiciones alcalinas produce el *p*-nitrofenolato, que presenta una gran absorbancia a 405 nm (McAvoy, **2010**). Se trata de un método sencillo, puesto que no requiere de un tratamiento específico de las muestras, y económico, apto para el cribado farmacológico de un gran número de compuestos. Por ello, el método de elección fue el ensayo colorimétrico del *p*NPP. No obstante, es un método inespecífico, puesto que mide la actividad fosfatasa total de la muestra, pero en presencia de un inhibidor específico de Ser/Thr fosfatasas, como el AO, se acepta que los cambios en la absorbancia se deben a la actividad de enzimas Ser/Thr fosfatasas.

Se llevó a cabo la puesta a punto del ensayo en base a los experimentos de neuroprotección con AO, modificándose ligeramente el protocolo utilizado puesto que era necesaria una concentración de AO capaz de inhibir a las enzimas PPP, pero sin llegar a causar muerte celular, ya que eso disminuiría la actividad fosfatasa registrada, no por inhibición de las enzimas sino por un menor número de células viables en los pocillos. Se redujo la concentración de AO de 20 a 15 nM, una concentración todavía adecuada para inhibir PP1 y PP2A (Swingle M y col. *Meth. Mol. Biol.* **2007**, 365, 23-38; McAvoy, **2010**;

Perez M y col. *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 1484), así como el tiempo de exposición de 20 a 18 h. Bajo estas condiciones experimentales, el AO disminuyó la actividad fosfatasa total en un 32 %, de manera estadísticamente significativa, pero sin afectar a la viabilidad celular, medida por el método de la reducción del MTT. De esta manera, se establece una ventana
5 adecuada entre la actividad fosfatasa de los pocillos sin tratamiento y los pocillos tratados con AO, dentro de la cual los compuestos pueden mostrar su capacidad para mantener la actividad Ser/Thr fosfatasa en presencia del inhibidor AO.

Se evaluaron todos los derivados de gramina objeto de la presente invención en su forma de
10 sal de oxalato a la concentración de 0,1 μ M, sometiendo a los cultivos de neuroblastoma al tóxico AO a una concentración de 15 nM durante 18 h. En la Tabla 1 se puede observar cómo, de los 18 compuestos nuevos evaluados, 14 fueron capaces de evitar la inhibición inducida por el AO. Si se expresan los datos como % de mantenimiento de la actividad fosfatasa (calculado tal y como se ha explicado en el apartado anteriormente), los
15 compuestos llegan a alcanzar hasta un 50 % de mantenimiento de la actividad, observándose los mejores resultados en los derivados **le** (54 %), **lc** (52 %), **lj** (42 %) y **ll** (41 %).

20

Compuesto	X	Y	R ₁ ,R ₂	CR ₃ R ₄ R ₅	% Actividad fosfatasa
Basal	-	-	-	-	100
AO	-	-	-	-	61 ± 3 ^{###}
Gramina	H	CH	CH ₃	-	80 ± 5 [*]
Memantina	-	-	-	-	77 ± 3 [*]
Ia	H	CH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	78 ± 4 ^{ns}
Ib	H	CH	-(CH ₂) ₅ -	CH ₂ CH ₂ CH ₃	82 ± 3 [*]
Ic	H	CH	CH ₃	C≡CH	86 ± 4 ^{**}
Id	H	CH	-(CH ₂) ₅ -	C≡CH	81 ± 4 ^{ns}
Ie	Cl	CH	CH ₃	Ph	86 ± 6 ^{**}
If	Cl	CH	-(CH ₂) ₅ -	Ph	79 ± 6 ^{ns}
Ig	Cl	CH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	80 ± 4 [*]
Ih	Cl	CH	-(CH ₂) ₅ -	CH ₂ CH ₂ CH ₃	83 ± 5 ^{**}
Ii	Cl	CH	CH ₃	C≡CH	81 ± 2 [*]
Ij	Cl	CH	-(CH ₂) ₅ -	C≡CH	86 ± 4 ^{**}
Ik	Br	N	CH ₃	Ph	81 ± 5 [*]
Il	Br	N	-(CH ₂) ₅ -	Ph	82 ± 4 ^{**}
Im	Br	N	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	80 ± 4 [*]
In	Br	N	-(CH ₂) ₅ -	CH ₂ CH ₂ CH ₃	80 ± 5 [*]
Io	Br	N	CH ₃	C≡CH	82 ± 4 [*]
Ip	Br	N	-(CH ₂) ₅ -	C≡CH	81 ± 3 ^{ns}
Iq	CH ₃ O	N	CH ₃	Ph	83 ± 3 ^{**}
Ir	CH ₃ O	N	-(CH ₂) ₅ -	Ph	84 ± 4 [*]

Tabla 1. Efecto de la gramina y sus derivados objeto de la invención sobre la actividad fosfatasa total, medido por la técnica del pNPP. Los datos como actividad fosfatasa de los cultivos respecto a la situación sin tratamientos, y se expresan como la media \pm error estándar de al menos 5 experimentos. Los compuestos se evaluaron a la concentración de 0,1 μ M y la memantina a 10 nM. ### $p < 0,001$, respecto a las células sin tratar; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ y ^{n.s.} = no significativo, respecto a las células tratadas solo con AO.

Las posiciones que más han afectado a la actividad son la *N*-alquilación y las sustituciones en el anillo bencénico fusionado. Tanto la no sustitución, como la introducción de un Cl en C5 o la modificación por un anillo de piridina, ofrecen excelentes resultados, mostrando una buena actividad fosfatasa en prácticamente todos sus derivados. En la familia Derivados Piridínicos (Y = N), el cambio del Br, presente en los derivados **Ik** y **Il**, por el grupo CH₃O, que caracteriza a los derivados **Iq** y **Ir**, no supone un aumento en su actividad, ya que los cuatro compuestos mantienen la actividad fosfatasa de forma similar (35 %). La presencia de dimetilamina o piperidina en C3 no se puede asociar con un aumento o disminución en la actividad.

2.3. Estudio de docking molecular de los mejores compuestos y PP2Ac

Con el objetivo de profundizar y complementar los estudios sobre la actividad fosfatasa, se analizó, mediante técnicas de docking molecular, la interacción entre PP2Ac y algunos de los derivados de gramina sintetizados. Los derivados **le** y **lr** se seleccionaron por su destacable actividad fosfatasa. El derivado **le**, el mejor compuesto activador de fosfatasa de toda la familia de derivados objeto de esta invención, adopta una pose capaz de establecer un enlace de hidrógeno fuerte entre el nitrógeno protonado de la dimetilamina del compuesto y el grupo hidroxilo de la Ser 120 ($d = 1,75 \text{ \AA}$). También presenta una interacción hidrofóbica plana π - π con el Trp 200 ($d = 4,04 \text{ \AA}$), así como una interacción iónica de transferencia de carga con la His 191 ($d = 3,06 \text{ \AA}$) (Figura 1). Otra de las poses del compuesto **le** generada por el programa de docking molecular, muestra un posible enlace de halógeno entre el cloro y el oxígeno de la Ser 120 ($d = 3,66 \text{ \AA}$) (Figura 1). No obstante, los enlaces de halógeno son más débiles e infrecuentes que los enlaces de hidrógeno (Bissantz C y col. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5061-5084, por lo que la pose más probable sería la que presenta el enlace de hidrógeno fuerte (Figura 1)

En general, la familia de Derivados Piridínicos (Y = N) destaca por el buen mantenimiento de la actividad fosfatasa, sobresaliendo el derivado **Ir**. El estudio de su docking molecular es de especial interés dado que presenta piperidina, bioisómero del benceno, como anillo fusionado al pirrol, y un grupo OCH₃ en posición C5, ambos propuestos durante la fase de diseño con el fin de favorecer nuevas interacciones. Si bien no se ha encontrado ninguna interacción con el nitrógeno de la piridina, el oxígeno del grupo metoxilo es capaz de aceptar un enlace de hidrógeno del hidroxilo de la Ser 120 (d = 2,23 Å). Además, este compuesto se adapta muy bien al bolsillo hidrofóbico, presentando numerosas interacciones con los residuos Ala 216 (con la cadena hidrocarbonada de la piperidina, d = 3,59 Å), Ile123 (con el grupo bencilo, d = 4,01 Å) y Val 126 (con el grupo bencilo, d = 3,86 Å) (Figura 2).

2.4. Evaluación del perfil neuroprotector de los compuestos de la invención

Con el fin de evaluar si esta familia de nuevos activadores de enzimas fosfatasas presentan una actividad farmacológica interesante para su posicionamiento terapéutico, a modo de ejemplo en el tratamiento de patologías del sistema nervioso, se llevaron a cabo experimentos de neuroprotección en varios modelos *in vitro* que remedan algunas de estas patologías. La capacidad de los compuestos para reducir o mitigar el daño causado por los tóxicos propuestos se monitorizó mediante de la reducción de MTT según se ha explicado anteriormente.

- *Neuroprotección en células SH-SY5Y dañadas por exposición a ácido okadaico*. El AO es un potente inhibidor de las Ser/Thr fosfatasas con cierta selectividad para PP2A (PP2A), induce la hipofosforilación de la proteína Tau en cultivos primarios neuronales y en líneas de neuroblastoma, lo que las lleva a la consiguiente degeneración neuronal y a la pérdida sináptica debido a la formación de agregados intracelulares de esta proteína, siendo una de las evidencias morfológicas de la existencia de una demencia de corte neurodegenerativo de tipo Alzheimer. Por este motivo, el uso de AO remeda el escenario de degeneración que sufren las neuronas de un paciente con una enfermedad neurodegenerativa como la de Alzheimer. Así, los cultivos de neuroblastoma humano en placas de 48 pocillos se preincubaron con los compuestos a la concentración de 0,1 μM durante 24 horas, según lo descrito en el capítulo de materiales y métodos. Finalmente, la viabilidad celular se determinó midiendo la capacidad de reducción del MTT

Todos los compuestos de fórmula general (I) mostraron un marcado perfil neuroprotector frente al daño generado por AO (Tabla 2), lo que les convierte en potenciales fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

- 5 Tabla 3.- Efecto de los derivados indólicos de fórmula general (I), a la concentración de 0,1 μ M, sobre la viabilidad celular de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y sometida al daño generado por ácido okadaico 20 nM durante 20 h, medida por el método de la reducción del MTT. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de al menos 5 experimentos. Los compuestos se evaluaron a la concentración de 0,1 μ M y la memantina a
10 10 nM. ***p < 0,001, **p < 0,01, n.s.= no significativo

Compuesto	X	Y	R ₁ ,R ₂	CR ₃ R ₄ R ₅	% Protección
Gramina	H	CH	CH ₃	-	45 ± 2 ^{***}
Memantina	-	-	-	-	63 ± 2 ^{***}
la	H	CH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	50 ± 3 ^{***}
lb	H	CH	-(CH ₂) ₅ -	CH ₂ CH ₂ CH ₃	55 ± 4 ^{***}
lc	H	CH	CH ₃	C≡CH	74 ± 2 ^{**}
ld	H	CH	-(CH ₂) ₅ -	C≡CH	58 ± 5 ^{***}
le	Cl	CH	CH ₃	Ph	88 ± 2 ^{***}
lf	Cl	CH	-(CH ₂) ₅ -	Ph	59 ± 4 ^{***}
lg	Cl	CH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	93 ± 1 ^{***}
lh	Cl	CH	-(CH ₂) ₅ -	CH ₂ CH ₂ CH ₃	98 ± 1 ^{***}
li	Cl	CH	CH ₃	C≡CH	43 ± 6 ^{**}
lj	Cl	CH	-(CH ₂) ₅ -	C≡CH	55 ± 7 [*]
lk	Br	N	CH ₃	Ph	84 ± 2 ^{***}
ll	Br	N	-(CH ₂) ₅ -	Ph	57 ± 4 ^{***}
lm	Br	N	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	55 ± 4 ^{***}
ln	Br	N	-(CH ₂) ₅ -	CH ₂ CH ₂ CH ₃	98 ± 1 ^{***}
lo	Br	N	CH ₃	C≡CH	63 ± 5 ^{**}
lp	Br	N	-(CH ₂) ₅ -	C≡CH	68 ± 3 ^{***}
lq	CH ₃ O	N	CH ₃	Ph	51 ± 5 ^{***}
lr	CH ₃ O	N	-(CH ₂) ₅ -	Ph	62 ± 2 ^{***}

- Neuroprotección en células SH-SY5Y dañadas por exposición al cóctel formado por rotenona y oligomicina A (R/O). Debido a la importancia que el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial tienen en la etiopatogenia de la EA, también se evaluó el efecto de los derivados de gramina sobre el daño producido por el cóctel R/O en células SH-SY5Y.

5 Teniendo en cuenta que la gramina presentó propiedades neuroprotectoras frente a este modelo a las concentraciones comprendidas entre 10 nM y 0,3 µM, se decidió utilizar la concentración de 10 nM para la evaluación de sus derivados. En la Tabla 3 se puede observar que las familias de Derivados no sustituidos (X = H) y Derivados Piridínicos (Y = N) alcanzan el 40 % de neuroprotección, equiparándose al compuesto hit gramina y al control melatonina (por ejemplo los derivados **Id** ó **Ir**).

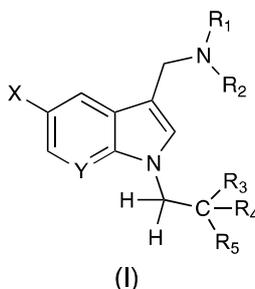
10

En conclusión, los compuestos descritos en esta invención con fórmula general (**I**), que presentan en la mayoría de los casos una capacidad activadora de enzimas fosfatasas, y en particular de PP2A, en situaciones de inhibición como la exacerbada por AO, muestran un

15 perfil neuroprotector en varios modelos *in vitro* de patologías del sistema nervioso.

REIVINDICACIONES

1.- Compuestos de fórmula general (I):



5

donde:

Y puede ser un átomo de nitrógeno o un resto CH (carbono unido a hidrógeno).

10 2.- Compuestos según la reivindicación 1, donde Y = N, X podrá ser un átomo de bromo o un resto alcóxido, es decir, un átomo de oxígeno unido a alquilo del tipo metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo, tert-butilo o mayores elongaciones y ramificaciones de cadenas hidrocarbonadas saturadas.

15 3.- Compuestos según la reivindicación 1, donde Y = CH, X podrá ser un átomo de cloro o hidrógeno.

20 4.- Compuestos según la reivindicaciones 2 y 3, R₁, R₂ pueden ser cadenas alquílicas del tipo metilo, etilo, propilo o formar un ciclo donde R₁, R₂ sean -CH₂(CH₂)_nCH₂-, siendo n un número natural entero entre 1 y 5.

25 5.- Compuestos de la reivindicación 4, donde R₃, R₄, R₅ definen el tipo sustitución sobre el nitrógeno indólico, pudiendo ser esta sustitución fenilo (-CR₃R₄R₅ = -C₆H₅ = -Ph), alquilo no ramificado (R₃, R₄ = H; R₅ = propilo, Pr) o etinilo (-CR₃R₄R₅ = -C≡CH).

6.- Compuestos de la reivindicación 5, excluyendo un compuesto de fórmula general (I), donde X = H, R₁ y R₂ son metilos (CH₃) y -CR₃R₄R₅ es fenilo (-Ph).

7.- Compuestos de la reivindicación 5, excluyendo un compuesto de fórmula general (I), donde X = H, R₁ y R₂ forman un ciclo tal que R₁, R₂ son -CH₂(CH₂)₃CH₂-, y -CR₃R₄R₅ es fenilo (-Ph)

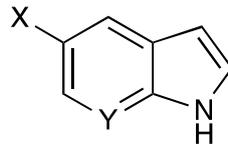
8.- Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, seleccionados de la lista que comprende:

5

- 1-(1-butil-1*H*-indol-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 1-butil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-indol
- *N,N*-dimetil-1-(1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-indol-3-il)metanamina
- 3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-indol
- 10 • 1-(1-bencil-5-cloro-1*H*-indol-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 1-bencil-5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-indol
- 1-(1-butil-5-cloro-1*H*-indol-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 1-butil-5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-indol
- 1-(5-cloro-1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-indol-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 15 • 5-cloro-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-indol
- 1-(1-bencil-5-bromo-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 1-bencil-5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina
- 1-(5-bromo-1-butil-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 5-bromo-1-butil-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina
- 20 • 1-(5-bromo-1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 5-bromo-3-(piperidin-1-ilmetil)-1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina
- 1-(1-bencil-5-metoxi-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina
- 1-bencil-5-metoxi-3-(piperidin-1-ilmetil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina

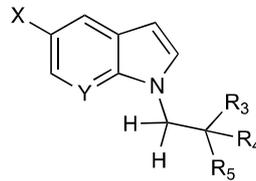
25 9.- Procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende los siguientes pasos:

a) reacción de un derivado de indol de fórmula (II),



(II)

5 en donde X representa los átomos y sustituyentes indicados más arriba al describir la fórmula general (I), en condiciones de sustitución nucleófila en medio básico sobre haluros de alquilo. Esta reacción daría lugar a compuestos con fórmula general (III),



(III)

- 10 b) Reacción de Mannich con los compuestos de fórmula general (III) en medio ácido débil, en presencia de formaldehído y dimetilamina o piperidina como fuentes de amina, para dar los compuestos de fórmula general (I).
- c) Reacción de salinización por tratamiento con ácido oxálico en disolvente orgánico, generando la sal de oxalato de los compuestos de fórmula general (I).

15

- 10.- Uso de los compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la elaboración de un medicamento
- 11.- Uso de los compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades humanas
- 20 12.- Uso de los compuestos según la reivindicación anterior, donde las enfermedades se seleccionan de la lista que comprende que cursan con una inactivación, inhibición o depresión de la actividad enzimática de proteínas fosfatasas.
- 13.- Uso de los compuestos según la reivindicación anterior, donde las enfermedades afectadas por una inactivación de enzimas fosfatasas son enfermedades

neurodegenerativas, cáncer, enfermedades metabólicas o enfermedades infecciosas

5 13.- Uso de los compuestos objeto de esta invención como agentes reguladores de la actividad enzimática de enzimas fosfatasas

14.- Uso de los compuestos objeto de esta invención como agentes reguladores de la actividad enzimática de enzimas serina/treonina fosfatasas

10

15.- Uso de los compuestos objeto de esta invención como agentes reguladores de la actividad enzimática de la enzima fosfatasa 2^a

FIG.1

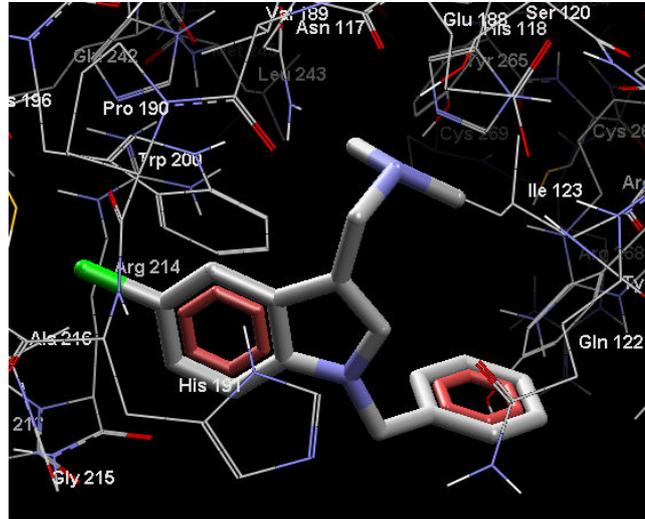
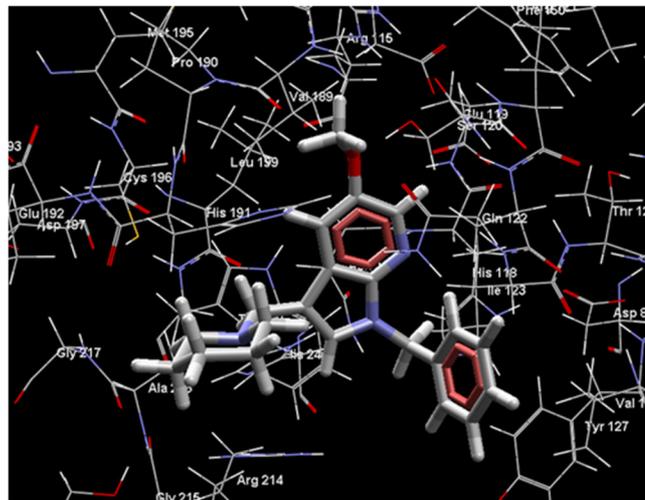


FIG.2





- ②¹ N.º solicitud: 201731196
②² Fecha de presentación de la solicitud: 10.10.2017
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MUSELLA SIMONA et al. Identification of an indol-based derivative as potent and selective varicella zoster virus (VZV) inhibitor. European Journal of Medicinal Chemistry NOV 29 2016. , 29/11/2016, Vol. 124, Páginas 773-781, ISSN 0223-5234(print) ISSN 1768-3254(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.ejmech.2016.09.014>. páginas775, esquema 1, compuesto 4b	1, 3-15
X	YANG TIANMING et al. Amphiphilic Indole Derivatives as Antimycobacterial Agents: Structure-Activity Relationships and Membrane Targeting Properties. Journal of Medicinal Chemistry APR 13 2017. , 13/04/2017, Vol. 60, Páginas 2745-2763, ISSN 0022-2623(print) ISSN 1520-4804(electronic), <DOI: doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01530>. Tabla 2, compuestos 4, 5, tabla 3, compuestos 25b-32b, 39b y 5, y tabla 5, página 2747, esquemas 1 y 2.	1, 3-15
X	WO 0224685 A1 (YANG JI CHEMICAL COMPANY LTD et al.) 28/03/2002, página 29, compuesto 1H, páginas 104, 105, tabla 29, compuestos 4.15	1-7, 10-15
X	GO MEI-LIN et al. Amino Derivatives of Indole As Potent Inhibitors of Isoprenyleysteine Carboxyl Methyltransferase. Journal of Medicinal Chemistry OCT 14 2010. , 30/09/2010, Vol. 53, Páginas 6838-6850, ISSN 0022-2623, <DOI: doi: 10.1021/jm1002843>. tabla 1, compuestos 4-1 al 4-10	1, 10-15
X	VERBISCAR A J. Synthesis of 1-p-chlorobenzyl-7-azaindole-3- -piperidylmethanol as a potential antimalarial agent.. Journal of medicinal chemistry United States Feb 1972. , 31/01/1972, Vol. 15, Páginas 149 - 152, ISSN 0022-2623 (Print), <DOI: pubmed: 4400149>. esquema 1, compuesto 10	1, 10-15
X	WO 2015153498 A1 (EPITHERAPEUTICS APS et al.) 08/10/2015, página 108, compuesto 83 y página 109, compuestos 86	1, 10-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
12.06.2018

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D471/04 (2006.01)

C07D209/14 (2006.01)

A61K31/4045 (2006.01)

A61K31/407 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS