

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 924**

21 Número de solicitud: 201830933

51 Int. Cl.:

**A61K 31/15** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**27.09.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.03.2020**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**28.10.2020**

Fecha de concesión:

**03.12.2020**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**14.12.2020**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (80.0%)  
C/ Serrano, 117  
28006 Madrid (Madrid) ES y  
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO  
RAMÓN Y CAJAL (20.0%)**

72 Inventor/es:

**PÉREZ FERNÁNDEZ, Ruth;  
CANAL MARTÍN, Andrea;  
SÁNCHEZ BARRENA, María José y  
MANSILLA APARICIO, Alicia**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **ACILHIDRAZONAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS**

57 Resumen:

Acilhidrazonas para el tratamiento de enfermedades neurológicas.

La presente invención se refiere a un grupo de compuestos con un núcleo estructural de acilhidrazona que presentan capacidad moduladora de la interacción entre las proteínas NCS-1 y Ric8a, implicadas en el proceso de regulación del número de sinapsis y la probabilidad de liberación de neurotransmisores. Estos compuestos, por tanto, son útiles para el tratamiento de enfermedades neurológicas en las que está afectado el número de sinapsis, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington o enfermedad de Parkinson.

ES 2 750 924 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.  
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## DESCRIPCIÓN

### Acilhidrazonas para el tratamiento de enfermedades neurológicas

5 La presente invención se refiere a un grupo de compuestos con un núcleo estructural de acilhidrazonas que presentan una actividad moduladora de la interacción entre las proteínas NCS-1 y Ric8a, implicadas en el proceso de regulación del número de sinapsis y la probabilidad de liberación de neurotransmisores. Debido a esto, los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de enfermedades neurológicas en las que  
10 está afectado el número de sinapsis, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington o enfermedad de Parkinson.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 Con el fin de transmitirlos impulsos nerviosos destinados a coordinar cada función en el organismo, las neuronas se comunican mediante sinapsis. Estas, requieren de la formación de un locus liberador de neurotransmisores en la neurona pre sináptica y un campo receptor asociado en la neurona post sináptica. Para un correcto funcionamiento de la transmisión nerviosa, es necesario un balance adecuado entre el número de sitios  
20 liberadores y la probabilidad de liberación de neurotransmisor. En ocasiones, se producen desequilibrios en este balance afectando negativamente al funcionamiento del sistema nervioso. Cuando el desequilibrio es por exceso de sinapsis se ve afectado el neurodesarrollo causando trastornos como el síndrome de Angelman, el síndrome del cromosoma X frágil y síndrome de Rett, otros trastornos del espectro autista, epilepsia,  
25 trastorno bipolar entre otros. En otras ocasiones el problema es la pérdida sináptica cada vez más frecuente como consecuencia del envejecimiento de la población mundial, y que tiene como consecuencia el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Huntington, Parkinson etc.

30 La restauración sináptica por medio de fármacos tiene un gran valor terapéutico. Se ha demostrado que inhibiendo la interacción entre las proteínas sensor de calcio neuronal 1 (NCS-1) y el factor de intercambio de guanilos (Ric8a), se restaura el número normal de sinapsis en un modelo animal de síndrome de X frágil (Mansilla, A. *et. al.* PNAS 2017, 114, E999-E1008). Sin embargo, en la actualidad no se han publicado compuestos que  
35 estabilicen la interacción del complejo proteico (NCS-1:Ric8a) y restablezca la sinapsis

perdidas, lo que contribuiría a una mejora de las funciones cognitivas y de la memoria alteradas en las enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer.

Se han descrito compuestos con un núcleo estructural de acilhidrazona que son útiles para el tratamiento de enfermedades neurológicas como la epilepsia (Angelova *et al.*, J. *Drug Dev Res.* 2016 Nov, 77(7):379-392) o como la enfermedad de Alzheimer (Dias Viegas FP *et al.* *Eur J Med Chem.* 2018 Mar 10, 147:48-65), aunque no se han descrito compuestos de este tipo que traten de forma eficiente enfermedades neurológicas mejorando el número de sinapsis mediante la modulación de la interacción de las proteínas NCS-1 y Ric8a.

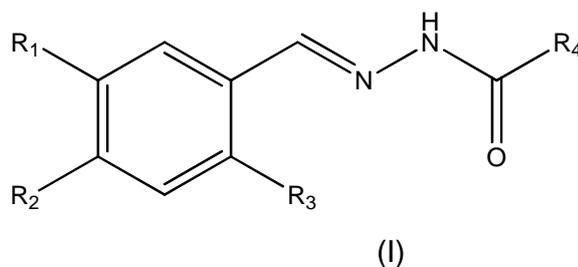
## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El complejo proteico formado por NCS-1 y Ric8 regula el número de sinapsis y la probabilidad de liberación de neurotransmisores, por lo que es considerado una buena diana terapéutica para el tratamiento de las enfermedades en las que la sinapsis está alterada. A partir de estudios de espectroscopía de fluorescencia se ha comprobado la afinidad de los compuestos por *d*NCS-1 (sensor neuronal de calcio de *Drosophila*). El sensor neuronal de calcio de *Drosophila* (*d*NCS-1) se conserva desde levaduras hasta humanos.

Por otro lado, mediante técnicas de inmunoprecipitación con las proteínas humanas, se ha demostrado la capacidad para promover (activar) la unión de ambas proteínas en forma de complejo NCS-1/Ric8a

25

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



donde

30  $R_1$  se selecciona de entre OH,  $\text{NO}_2$  o halógeno;

$R_2$  y  $R_3$  se seleccionan independientemente de entre H,  $\text{NO}_2$  o halógeno;

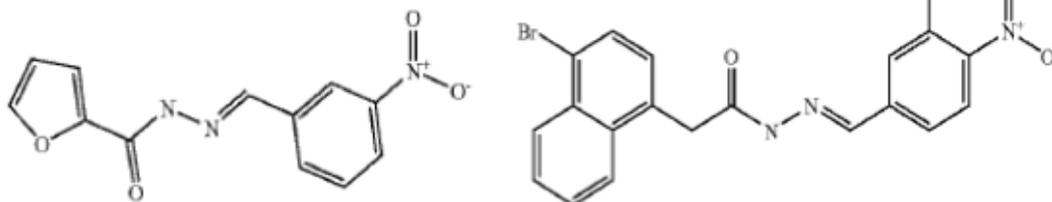
R<sub>4</sub> se selecciona de entre:

- arilo opcionalmente sustituido por un grupo OH o por un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,
- heteroarilo opcionalmente sustituido por halógeno, o
- un grupo CHR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, donde R<sub>5</sub> se selecciona de entre OH o H y R<sub>6</sub> se selecciona de entre arilo, heteroarilo o un grupo [CH<sub>2</sub>]<sub>n</sub>-O-[alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>], donde n es un valor entre 1 y 4;

o cualquiera de sus isómeros o sales, para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurológica que se selecciona de entre enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y otras enfermedades neurodegenerativas, así como síndrome de Angelman, síndrome del cromosoma del X frágil, síndrome de Rett, síndromes del espectro autista, epilepsia, esquizofrenia, desorden bipolar, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friederich, parálisis supranuclear progresiva, demencia frontotemporal, demencia de cuerpos de Lewy, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob;

15

con la condición de que el compuesto de fórmula (I) no es alguno de los siguientes compuestos:



20 En una realización preferida, R<sub>1</sub> es OH.

En otra realización preferida, R<sub>2</sub> es NO<sub>2</sub>.

En otra realización más preferida cuando R<sub>1</sub> es OH, R<sub>2</sub> es NO<sub>2</sub>.

25

En otra realización preferida, R<sub>3</sub> es H.

En otra realización aún más preferida cuando R<sub>1</sub> es OH y R<sub>2</sub> es NO<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> es H.

30 En otra realización preferida, R<sub>1</sub> es NO<sub>2</sub>.

En otra realización preferida, R<sub>2</sub> es halógeno, preferiblemente R<sub>2</sub> es cloro.

En otra realización más preferida cuando R<sub>1</sub> es NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> es halógeno, preferiblemente R<sub>2</sub> es cloro.

5

En otra realización aún más preferida cuando R<sub>1</sub> es NO<sub>2</sub> y R<sub>2</sub> es halógeno, preferiblemente R<sub>2</sub> es cloro, R<sub>3</sub> es H.

En otra realización más preferida cuando R<sub>1</sub> es NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> es H.

10

En otra realización aún más preferida cuando R<sub>1</sub> es NO<sub>2</sub> y R<sub>2</sub> es H, R<sub>3</sub> es halógeno, preferiblemente R<sub>3</sub> es flúor.

En otra realización preferida, R<sub>1</sub> es halógeno, preferiblemente R<sub>1</sub> es flúor.

15

En otra realización preferida, R<sub>2</sub> es H.

En otra realización más preferida cuando R<sub>1</sub> es halógeno, preferiblemente flúor, R<sub>2</sub> es H.

20

En otra realización aún más preferida cuando R<sub>1</sub> es halógeno, preferiblemente R<sub>1</sub> es flúor, y R<sub>2</sub> es H, R<sub>3</sub> es NO<sub>2</sub>.

En otra realización preferida, R<sub>4</sub> es un heteroarilo que se selecciona de entre tiofenilo o furanilo, donde dichos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos por halógeno.

25

En otra realización preferida, R<sub>4</sub> es un arilo que se selecciona de entre fenilo o naftilo, donde el fenilo puede estar opcionalmente sustituido por alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y el naftilo puede estar opcionalmente sustituido por OH.

30

En otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) para uso según se ha descrito anteriormente, se selecciona de la siguiente lista:

- (E)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)furan-2-carbahidrazida (A3H2)
- (E/Z)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-2-(1H-indol-3-il)acetohidrazida (A3H3)
- (E)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-3-metoxipropanhidrazida (A3H4)

35

- ( $\pm$ )-(E/Z)-2-hidroxi-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-2-fenilacetohidrazida (A3H6)
- (E/Z)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)tiofen-2-carbohidrazida (A3H8)
- (E)-4-(tert-butil)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)benzohidrazida (A3H17)
- 5     • (Z)-5-cloro-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)tiofen-2-carbohidrazida (A3H18)
- (E/Z)-3-hidroxi-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-2-naftohidrazida (A3H19)
- (Z)-N-(4-cloro-3-nitrobenziliden)furan-2-carbohidrazida (A5H2)
- ( $\pm$ )-(E/Z)-N-(4-cloro-3-nitrobenziliden)-2-hidroxi-2-fenilacetohidrazida (A5H6)
- 10    • (E/Z)-N-(4-cloro-3-nitrobenziliden)tiofen-2-carbohidrazida (A5H8)
- (E)-N-(5-fluoro-2-nitrobenziliden)furan-2-carbohidrazida (A7H2)
- (E/Z)-N-(5-fluoro-2-nitrobenziliden)tiofen-2-carbohidrazida (A7H8)
- (E)-N-(2-fluoro-5-nitrobenziliden)furan-2-carbohidrazida (A8H2)
- (E)-(N-(2-fluoro-5-nitrobenziliden)-2-hidroxi-2-fenilacetohidrazida (A8H8)

15

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un compuesto que se selecciona de entre:

- (E)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)furan-2-carbahidrazida (A3H2)
- (E/Z)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-2-(1H-indol-3-il)acetohidrazida (A3H3)
- 20    • (E)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-3-metoxipropanhidrazida (A3H4)
- (E)-4-(tert-butil)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)benzohidrazida (A3H17)
- (Z)-5-cloro-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)tiofen-2-carbohidrazida (A3H18)
- (E/Z)-3-hidroxi-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-2-naftohidrazida (A3H19)
- (E)-N-(5-fluoro-2-nitrobenziliden)furan-2-carbohidrazida (A7H2)
- 25    • (E/Z)-N-(5-fluoro-2-nitrobenziliden)tiofen-2-carbohidrazida (A7H8)
- (E)-N-(2-fluoro-5-nitrobenziliden)furan-2-carbohidrazida (A8H2)
- (E)-(N-(2-fluoro-5-nitrobenziliden)-2-hidroxi-2-fenilacetohidrazida (A8H8)

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un compuesto del segundo aspecto de la invención para su uso como medicamento.

30

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto del segundo aspecto de la invención y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35

El término "arilo" se refiere en la presente invención a un radical fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo o antracilo, preferiblemente fenilo y naftilo. El radical arilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como alquilo, haloalquilo, aminoalquilo, dialquilamino, hidroxilo, alcoxilo, fenilo, mercapto, halógeno, nitro, ciano y alcoxycarbonilo.

El término "heteroarilo" se refiere a un arilo, como se ha definido anteriormente, que contiene al menos un átomo distinto de carbono, tales como S, N, ó O, formando parte del anillo aromático. Ejemplos de radicales heteroarilo incluyen, tiofenilo, furanilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, piridinilo, pirazinilo, piridazinilo, pirimidinilo, triazinilo, tienofuranilo, tienopirrolilo, pirrolopirazolilo, benzotiofenilo, benzofuranilo, indolilo, isoindolilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo, imidazopiridinilo, pirazolopiridinilo, isoquinolinilo, quinolinilo, quinolizinilo, naftiridinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo. Los grupos heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos en cualquiera de sus posiciones por uno o más sustituyentes o por dos sustituyentes formando un ciclo condensado al heteroarilo y dichos sustituyentes se seleccionan independientemente entre tales como CF<sub>3</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, S-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, CN, O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, NO<sub>2</sub>, COO-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, NHCO-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, NH<sub>2</sub> y NH-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y más preferiblemente entre CF<sub>3</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, CN y NO<sub>2</sub>.

El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 6, y más preferiblemente de 1 a 4, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcoxycarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

El término "halógeno" se refiere, en la presente invención, a flúor, cloro, bromo o yodo.

Los compuestos de la invención, en su uso terapéutico o formando parte de una composición farmacéutica, pueden estar en 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 que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación bien conocidos por los técnicos en la materia.

Los compuestos de la invención para uso terapéutico o formando parte de una composición farmacéutica se preparan en forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. Estos preparados pueden ser administrados por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicho preparado se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración del compuesto de fórmula (I) proporcionado por esta invención se efectúa por vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.). La preparación de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse en diferentes manuales manejados por los expertos en la materia.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales farmacéuticamente aceptables, 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 comprende un compuesto de la invención, o una sal, estereoisómero o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

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

del alcance de esta invención.

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

## 10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1.** Muestra los resultados de ensayos de inmunoprecipitación en células HEK293 transfectadas con V5-Ric8a y NCS-1 humanos y en presencia o no de los compuestos. El carril DMSO representa un control positivo de la interacción.

15

**FIG. 2.** Muestra la representación de la emisión de fluorescencia del complejo dNCS-1-ligando en presencia de Calcio, en concentraciones crecientes de ligando. El ajuste de las curvas se ha realizado considerando una estequiometría 1:1. Para la correcta comparación de las curvas las intensidades se han normalizado y representado como  $(I_0 - I)/I_0 \cdot X$ . El valor de  $r^2$  es de 0.998.

20

## EJEMPLOS

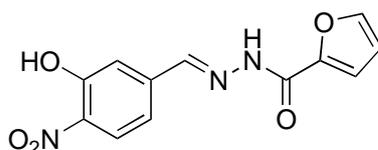
A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

25

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

Preparación y obtención de **(E)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)furan-2-carbahidrazida (A3H2)**.

30

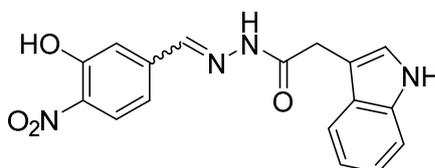


**A3H2**

3-hidroxi-4-nitrobenzaldehído (319 mg, 1.91 mmol), hidrazida de ácido 2-furoico (200 mg, 1.59 mmol), MeOH (60 mL). El producto se filtra y lava con MeOH a t.a. para obtener el compuesto como un sólido amarillo (0.30 g, 70%) (E > 99). **P.f.:** 256 - 257 °C. **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.07 (s, 1H), 11.18 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.98 (m, 2H), 7.49 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.40 – 7.26 (m, 2H), 6.72 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz). **<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.5, 152.3, 146.7, 145.2, 140.5, 140.0, 137.2, 125.9, 118.3, 118.5, 116.8, 112.6. **Anal. Calcd**, para C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: C, 52.37%; H, 3.30%; N, 15.27%. **Hallado:** C, 52.43%; H, 3.30%; N, 15.11%. **HPLC-MS:** t<sub>R</sub>: 7.02 min (Columna ACE-Excel 3 C18-PFP, gradiente 15-85% H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 0.1 % de fórmico), [M+H]<sup>+</sup> = 276 m/z.

10

Preparación y obtención de **(E/Z)-N'-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-2-(1H-indol-3-il)acetohidrazida (A3H3)**.

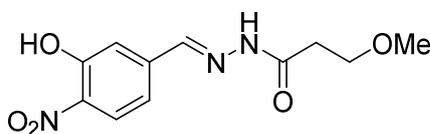


A3H3

3-hidroxi-4-nitrobenzaldehído (330 mg, 1.97 mmol), hidrazida indol-3-acético (300 mg, 1.58 mmol), MeOH (60 mL). Se filtra y lava el producto con MeOH para obtenerlo como un sólido naranja (0.30 g, 70%) (E:Z = 40:60). **P.f.:** 216 – 217 °C. **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.79 (s, 1H, E), 11.54 (s, 1H, Z), 11.19 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.70-7.65 (m, 1H), 7.39-7.36 (m, 1H), 7.27-7.25 (m, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.02-6.98 (m, 1H), 6.92-6.88 (m, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.72-6.68 (m, 1H), 5.89 (s, 1H), 3.68 (s, 2H). **<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 172.1, 150.8, 148.1, 142.8, 137.4, 136.4, 130.5, 125.9, 123.9, 122.6, 121.0, 120.2, 119.2, 116.7, 111.9, 110.6, 42.5. **Anal. Calcd**, para C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: C, 60.35 %; H, 4.17 %; N, 16.56 %. **Hallado:** C, 60.13 %; H, 4.20 %; N, 16.56 %. **HPLC-MS:** t<sub>R</sub>: 8.45 min (Columna ACE-Excel 3 C18-PFP, gradiente 15-85% H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 0.1 % de fórmico), [M+H]<sup>+</sup> = 339 m/z.

25

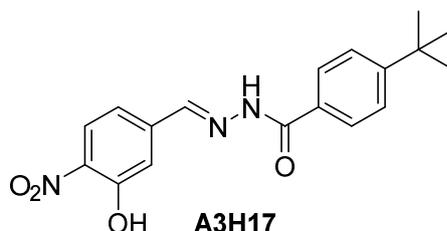
Preparación y obtención de **(E)-N'-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-3-metoxipropanhidrazida (A3H4)**.



A3H4

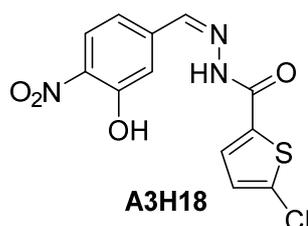
3-hidroxi-4-nitrobenzaldehyde (339 mg, 2.0 mmol), hidrazida de ácido 3-metoxipropiónico (180  $\mu$ L, 1.69 mmol), MeOH (60 mL). Se ha purificado mediante cromatografía en columna automática por sistema Biotage usando DCM / MeOH (0- 6 %) como eluyentes obteniendo un sólido amarillo (437 mg, 97 %) (E > 99). **P.f.:** 163 -  
 5 164°C. **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  11.61 (s, 1H), 11.13 (s, 2H), 8.13 (s, 1H), 7.95-7.92 (m, 3H), 3.66-3.58 (m, 2H), 3.24 (s, 3H), 2.47 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz). **<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  172.1, 151.8, 143.1, 140.2, 139.8, 136.6, 125.3, 117.4, 67.4, 57.4, 34.4. **Anal. Calcd**, para C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: C, 49.44 %; H, 4.90 %; N, 15.72 %. **Hallado:** C, 49.51 %; H, 4.82 %; N, 15.61 %. **HPLC-MS:** t<sub>R</sub>: 6.47 min (Columna ACE-Excel 3 C18-PFP, gradiente 15-85% H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 0.1 % de fórmico), [M+H]<sup>+</sup> = 268 m/z.  
 10

Preparación y obtención de **(E)-4-(*tert*-butil)-N'-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)benzohidrazida (A3H17).**



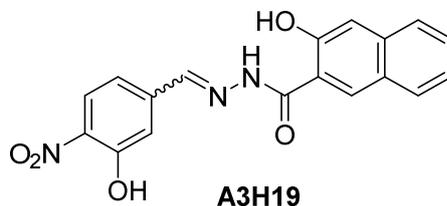
3-hidroxi-4-nitrobenzaldehído (267 mg, 1.6 mmol), hidrazida del ácido 4-*tert*-butilbenzoico (255.5 mg, 1.33 mmol), EtOH (60 mL). Se lava y filtra con EtOH para obtener un sólido amarillo (430 mg, 95 %) (E > 99). **P.f.:** 220-221°C. **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  12.01 (s, 2H), 11.19 (s, 2H), 8.42 (s, 2H), 7.97 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 5H), 7.61 – 7.49 (m, 7H), 7.31 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.34 (s, 1H), 3.18 (s, 6H),  
 20 1.32 (s, 9H). **<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  155.4 (C-1), 152.8 (C-1), 145.5 (C-1), 141.4 (C-1), 137.6 (C-1), 130.8 (C-1), 128.1 (C-1), 126.4 (C-1), 125.7 (C-1), 118.5 (C-1), 116.8 (C-1), 49.1 (C-1), 39.9 (C-1), 35.2 (C-1), 31.4 (C-1). **Anal. Calcd**, para C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 63.33 %; H, 5.61 %; N, 12.31 %; **Hallado:** C, 63.10 %; H, 6.08 %; N, 12.25 %. **HPLC-MS:** t<sub>R</sub>: 9.72 min (Columna ACE-Excel 3 C18-PFP, gradiente 15-85% H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 0.1 % de fórmico), [M+H]<sup>+</sup> = 342 m/z.  
 25

Preparación y obtención de **(Z)-5-cloro-N'-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)tiofen-2-carbohidrazida (A3H18).**



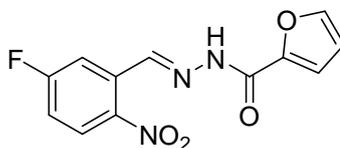
3-hidroxi-4-nitrobenzaldehído (279 mg, 1.71 mmol), hidrazida del ácido 5-clorotiopfen-2-carboxílico (249.7 mg, 1.41 mmol), EtOH (60 mL). Se lava y filtra con EtOH para obtener un sólido amarillo (404 mg, 90 %) (*Z* > 99) **m.p.**: 255-256°C. **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.17 (s, 1H, H-2), 11.28 (s, 1H, H-8), 8.12 – 7.94 (m, 2H, H-10, 14), 7.94 – 7.79 (m, 1H, H-11), 7.51 (m, 1H, H-4), 7.33-7.31 (m, 2H, H-13, 6). **<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 161.2 (C-1), 152.8 (C-7), 143.3 (C-15), 140.3 (C-9), 138.2 (C-12), 137.9 (C-11), 135.2 (C-10), 130.3 (C-5), 127.2 (C-4), 126.6 (C-6), 118.6 (C-13), 117.4 (C-14). **Anal. Calcd**, para C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: C, 44.25 %; H, 2.48 %; N, 12.90 %; S, 9.84 %. Hallado: C, 44.16 %; H, 2.58 %; N, 12.85 %; S, 9.87%. **HPLC-MS**: t<sub>R</sub>: 9.48 min (Columna ACE-Excel 3 C18-PFP, gradiente 15-85% H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 0.1 % de fórmico), [M+H]<sup>+</sup> = 326 m/z.

Preparación y obtención de **(E/Z)-3-hidroxi-N'-(3-hidroxi-4-nitrobenzyliden)-2-naftohidrazida (A3H19)**.



3-hidroxi-4-nitrobenzaldehído (198 mg, 1.18 mmol), hidrazida de ácido 3-hidroxi-2-naftoico (206 mg, 0.98 mmol), EtOH (60 mL). El producto se filtra y lava con EtOH para obtener un sólido amarillo (287 mg, 83 %) (*E:Z* = 88:12). **P.d.**: 264-265°C. **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.13 (s, 1H, H-2, *E*), 12.05 (s, 1H, H-2, *Z*), 11.21 (s, 2H, H-10, 21), 8.44 (m, 2H, H-4, 7), 7.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-14, 17), 7.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-6), 7.60 – 7.43 (m, 2H, H-15, 16), 7.43 – 7.30 (m, 3H, H-11, 12, 19). **<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.2 (C-1), 154.2 (C-20), 152.8 (C-9), 146.4 (C-4), 140.9 (C-8), 137.8 (C-5), 136.3 (C-22), 131.1 (C-18), 129.1 (C-13), 128.7 (C-7), 127.3 (C-12), 126.4 (C-6), 126.3 (C-17), 124.3 (C-14), 121.2 (C-16), 118.6 (C-15), 117.0 (C-11), 111.0 (C-19). **Anal. Calcd**, para C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: C, 61.54 %; H, 3.73 %; N, 11.96 %. **Hallado**: C, 61.51 %; H, 3.76 %; N, 11.97 %. **HPLC-MS**: t<sub>R</sub>: 9.38 min (Columna ACE-Excel 3 C18-PFP, gradiente 15-85% H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 0.1 % de fórmico), [M+H]<sup>+</sup> = 353 m/z.

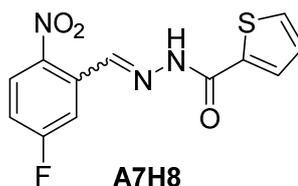
Preparación y obtención de **(E)-N'-(5-fluoro-2-nitrobenziliden)furan-2-carbohidrazida (A7H2)**.



A7H2

5-fluoro-2-nitrobenzaldehido (250 mg, 1.5 mmol), hidrazida del ácido 2-furoico (150 mg, 1.2 mmol), MeOH (50 mL). Se purifica por cromatografía en columna automática de sílica sistema Biotage, DCM / MeOH (0 – 3%) obteniendo un sólido amarillo (0.330 g, 99 %) (E > 99). **P.f.:** 194 - 195 ° C. **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 12.33 (s, 1H, H-2), 8.91 (s, 1H, H-4), 8.23 (dd, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-14), 8.00 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-7), 7.81 (dd, *J* = 9.6, 2.9 Hz, 1H, H-12), 7.56 (dd, *J* = 9.0, 2.9 Hz, 1H, H-13), 7.40 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-10), 6.75 (dd, *J* = 3.4, 1.8 Hz, 1H, H-8). **<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 165.66 (C-1), 162.30 (C-9) 146.31 (C-7), 144.49 (C-4), 132.26 (C-6), 132.19 (C-11), 128.30 (C-14), 128.25 (C-5), 117.58 (C-13), 117.50 (C-10), 113.96 (C-12), 112.16 (C-8). **Anal. Calcd**, para C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 51.99 %; H, 2.91 %; N, 15.16 %. **Hallado:** C, 51.94 %; H, 2.91 %; N, 15.00 %%. **HPLC-MS:** t<sub>R</sub>: 7.00 min (Columna ACE-Excel 3 C18-PFP, gradiente 15-85% H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 0.1 % de fórmico), [M+H]<sup>+</sup> = 278 m/z.

Preparación y obtención de **(E/Z)-N'-(5-fluoro-2-nitrobenziliden)tiofen-2-carbohidrazida (A7H8)**.

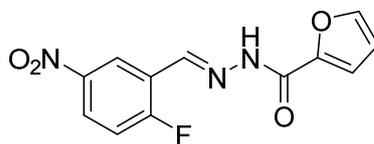


A7H8

5-fluoro-2-nitrobenzaldehido (220 mg, 1.3 mmol), hidrazida del ácido 2-tiofenocarboxílico (160 mg, 1.1 mmol), MeOH (50 mL). Se filtra y lava el sólido obtenido por cristalización como sólido naranja (0.270 g, 82 %) (E:Z = 26:74). **P.f.:** 218 - 219 ° C. **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 12.33 (s, 1H, H-2, E), 12.32 (s, 1H, H-2, Z), 8.89 (s, 1H, H-7), 8.25 (dd, *J* = 9.1, 5.0 Hz, 1H, H-14), 8.00 (s, 2H, H-8, 10), 7.86 (s, 1H, H-4), 7.57 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-12), 7.27 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H-13). **<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 165.66 (C-1), 162.31 (C-9), 147.16 (C-7), 144.55 (C-4), 133.05 (C-11), 132.65 (C-6), 128.23 (C-14), 127.98 (C-5), 117.59 (C-13), 117.54 (C-10), 114.84 (C-12), 114.21 (C-8). **Anal. Calcd**, para C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S: C, 49.15 %; H, 2.75 %; N, 14.33 %; S, 10.93 %. **Hallado:** C, 49.29 %; H, 2.82 %; N, 14.21 %; S, 10.92 %. **HPLC-MS:** t<sub>R</sub>: 8.25 min (Columna ACE-

Excel 3 C18-PFP, gradiente 15-85% H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 0.1 % de fórmico), [M+H]<sup>+</sup> = 294 m/z.

Preparación y obtención de **(E)-N'-(2-fluoro-5-nitrobenziliden)furan-2-carbohidrazida (A8H2)**.



**A8H2**

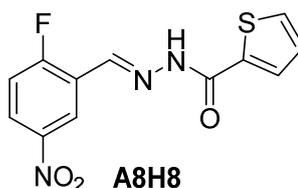
5

2-fluoro-5-nitrobenzaldehido (240 mg, 1.44 mmol), hidrazida de ácido 2-furoico (150 mg, 1.2 mmol), MeOH (50 mL). Se purifica por cromatografía en columna automática de sílica sistema Biotage usando DCM / MeOH (9– 10%) obteniendo un sólido naranja (0.26 g, 75 %) (E > 99). **P.f.:** 187 - 188 ° C. **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 12.23 (s, 1H, H-2), 8.68 (m, 2H, H-9, 10), 8.35 (m, 1H, H-14), 8.00 (m, 1H, H-4), 7.63 (m, 1H, H-12), 7.38 (s, 1H, H-7), 6.75 (m, 1H, H-13). **<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 165.47 (C-1), 162.31 (C-6), 153.61 (C-9), 146.40 (C-4), 143.84 (C-10), 138.59 (C-8), 126.79 (C-7), 126.64 (C-14), 123.40 (C-5), 123.24 (C-13), 118.00 (C-10), 117.65 (C-12), 112.20 (C-8). **Anal. Calcd**, para C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 51.99 %; H, 2.91 %; N, 15.16 %. **Hallado:** C, 51.90 %; H, 2.91 %; N, 15.05 %. **HPLC-MS:** t<sub>R</sub>: 6.97 min (Columna ACE-Excel 3 C18-PFP, gradiente 15-85% H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 0.1 % de fórmico), [M+H]<sup>+</sup> = 278 m/z.

10

15

Preparación y obtención de **(E)-N'-(2-fluoro-5-nitrobenziliden)-2-hidroxi-2-fenilacetohidrazida (A8H8)**.



**A8H8**

20

2-fluoro-5-nitrobenzaldehido (220 mg, 1.3 mmol), hidrazida del ácido mandélico (150 mg, 1.1 mmol), MeOH (50 mL). Se purifica por cromatografía en columna automática de sílica sistema Biotage usando DCM / MeOH (0 – 4%) obteniendo un sólido blanco (0.16 g, 50 %) (E > 99). **P.f.:** 237 - 238 ° C. **<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 12.20 (s, 1H, H-2), 8.82 (s, 1H, H-10), 8.69 (s, 1H, H-8), 8.35 (m, 1H, H-14), 8.06 (s, 1H, H-7), 7.96 (s, 1H, H-4), 7.64 (m, 1H, H-12), 7.27 (m, 1H, H-13). **<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>): δ 165.57 (C-1), 163.35 (C-6), 161.49 (C-9), 144.43 (C-4), 144.27 (2C, C-7, 14), 132.64 (C-11), 126.76 (2C, C-8, 10), 126.6 (C-5), 118.06 (C-13), 117.78 (C-12). **Anal. Calcd**, para C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S: C, 49.15 %; H, 2.75 %; N, 14.33 %; S, 10.93 %. **Hallado:** C, 49.36 %; H,

25

2.79 %; N, 14.24 %; S, 10.95 %. **HPLC-MS**:  $t_R$ : 7.85 min (Columna ACE-Excel 3 C18-PFP, gradiente 15-85% H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 0.1 % de fórmico),  $[M+H]^+$  = 318 m/z.

Ejemplo 2. Ensayos de modulación de la interacción NCS1/Ric8a in vitro.

5

Con el fin de evaluar la capacidad de los compuestos de la invención A3H3, A5H2 y A3H4 para modular la interacción entre NCS-1 y Ric8a humanos, se transfectaron células HEK293 con una versión de Ric8a marcada con el epítipo V5 (Ric8a-V5) y NCS-1, incubándose las células y el posterior lisado celular con el producto a ensayar. Posteriormente mediante la técnica de inmunoprecipitación se valoró la cantidad de Ric8a-V5 unido a NCS-1. Los datos (Fig. 1), indican que la presencia de los compuestos permite la interacción con Ric8-a y demuestran que la presencia del producto A3H3 incrementa la unión de NCS-1 con Ric8a en más del doble.

10

15

Ejemplo 3. Medida de la afinidad de los compuestos por la proteína NCS-1.

Mediante la técnica de espectroscopía de fluorescencia se midió la afinidad de los compuestos por  $\alpha$ NCS-1. Se analiza la intensidad de emisión del complejo donde la señal se monitoriza a concentraciones crecientes de ligando (1:0 a 1:30 equivalentes) manteniendo constante la concentración de proteína 7.8  $\mu$ L, 30.8  $\mu$ M, 1 eq.). Con ello, se obtiene su constante de afinidad a través de la constante de disociación aparente. En la Fig. 2 se muestra como ejemplo la gráfica de A3H3, A3H2 y A3H4. Los experimentos se realizan a 5 °C con  $\alpha$ NCS-1 en buffer 50 mM Tris, pH 7.9, 125 mM NaCl, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> con 5 % DMSO en un volumen total de 300  $\mu$ L. El experimento se realiza a la longitud de onda de excitación de 295 nm, y a la longitud de onda de emisión de 345 nm (máximo de emisión) en función del compuesto en un Jobin Yvon Fluoromax4 Spectrofluorimeter equipado con un Peltier Thermostat, los valores obtenidos son el resultado del promedio normalizado de las tres repeticiones para cada medida. Los compuestos estudiados no presentan emisión en el rango de fluorescencia medido. Las constantes de afinidad encontradas para los compuestos testados son las siguientes:

20

25

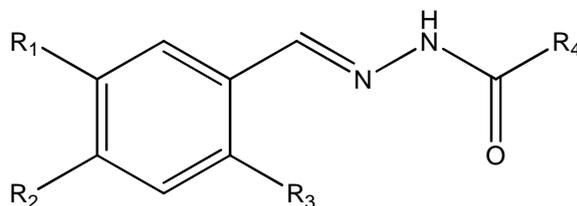
30

Compuesto	$K_d$ ( $\mu$ M)
A3H2	32 $\pm$ 2
A3H3	43 $\pm$ 6
A3H4	61 $\pm$ 9

A5H2	$3.2 \pm 0.3$
A5H6	$3.2 \pm 0.3$
A5H8	$19 \pm 8$
A7H2	$25 \pm 4$
A7H8	$4 \pm 1$
A8H2	$7 \pm 1$
A8H8	$14 \pm 2$

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



(I)

5 donde

$R_1$  se selecciona de entre OH,  $\text{NO}_2$  o halógeno;

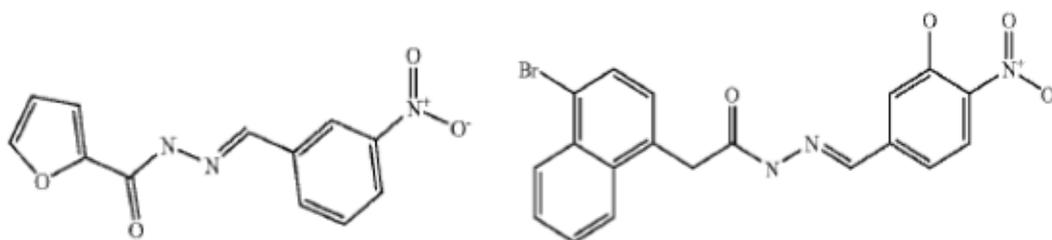
$R_2$  y  $R_3$  se seleccionan independientemente de entre H,  $\text{NO}_2$  o halógeno;

$R_4$  se selecciona de entre:

- arilo opcionalmente sustituido por un grupo OH o por un alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ,
- 10 - heteroarilo opcionalmente sustituido por halógeno, o
- un grupo  $\text{CHR}_5\text{R}_6$ , donde  $R_5$  se selecciona de entre OH o H y  $R_6$  se selecciona de entre arilo, heteroarilo o un grupo  $[\text{CH}_2]_n\text{-O-}[\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_4]$ , donde n es un valor entre 1 y 4;

o cualquiera de sus isómeros o sales, para su uso en el tratamiento de una enfermedad  
 15 que se selecciona de entre enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Angelman, síndrome del cromosoma del X frágil, síndrome de Rett síndromes del espectro autista, esquizofrenia, desorden bipolar, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friederich, parálisis supranuclear progresiva, demencia frontotemporal, demencia de cuerpos de Lewy, enfermedad de Creutzfeldt-  
 20 Jakob;

con la condición de que el compuesto de fórmula (I) no es alguno de los siguientes compuestos:



25

2. Compuesto para uso según la reivindicación 1, donde  $R_1$  es OH.

3. Compuesto para uso según la reivindicación 2, donde  $R_2$  es  $\text{NO}_2$ .
4. Compuesto para uso según la reivindicación 3, donde  $R_3$  es H.
- 5  
5. Compuesto para uso según la reivindicación 1, donde  $R_1$  es  $\text{NO}_2$ .
6. Compuesto para uso según la reivindicación 5, donde  $R_2$  es halógeno.
- 10  
7. Compuesto para uso según la reivindicación 6, donde  $R_2$  es cloro.
8. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, donde  $R_3$  es H.
9. Compuesto para uso según la reivindicación 5, donde  $R_2$  es H.
- 15  
10. Compuesto para uso según la reivindicación 9, donde  $R_3$  es halógeno.
11. Compuesto para uso según la reivindicación 10, donde  $R_3$  es flúor.
- 20  
12. Compuesto para uso según la reivindicación 1, donde  $R_1$  es halógeno.
13. Compuesto para uso según la reivindicación 12, donde  $R_1$  es flúor.
14. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, donde  $R_2$  es  
25 H.
15. Compuesto para uso según la reivindicación 14, donde  $R_3$  es  $\text{NO}_2$ .
16. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde  $R_4$  es  
30 un heteroarilo que se selecciona de entre tiofenilo o furanilo, donde dichos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos por halógeno.
17. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde  $R_4$  es un arilo que se selecciona de entre fenilo o naftilo, donde el fenilo puede estar

opcionalmente sustituido por alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y el naftilo puede estar opcionalmente sustituido por OH.

18. Compuesto de fórmula (I) para uso según la reivindicación 1 que se selecciona de la siguiente lista:

5

10

15

20

- (E)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)furan-2-carbahidrazida
- (E/Z)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-2-(1H-indol-3-il)acetohidrazida
- (E)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-3-metoxipropanhidrazida
- (±)-(E/Z)-2-hidroxi-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-2-fenilacetohidrazida
- (E)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)tiofen-2-carbohidrazida
- (E)-4-(tert-butil)-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)benzohidrazida
- (Z)-5-cloro-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)tiofen-2-carbohidrazida
- (E/Z)-3-hidroxi-N-(3-hidroxi-4-nitrobenziliden)-2-naftohidrazida
- (Z)-N-(4-cloro-3-nitrobenziliden)furan-2-carbohidrazida
- (±)-(E/Z)-N-(4-cloro-3-nitrobenziliden)-2-hidroxi-2-fenilacetohidrazida
- (E/Z)-N-(4-cloro-3-nitrobenziliden)tiofen-2-carbohidrazida
- (E)-N-(5-fluoro-2-nitrobenziliden)furan-2-carbohidrazida
- (E/Z)-N-(5-fluoro-2-nitrobenziliden)tiofen-2-carbohidrazida
- (E)-N-(2-fluoro-5-nitrobenziliden)furan-2-carbohidrazida
- (E)-N-(2-fluoro-5-nitrobenziliden)-2-hidroxi-2-fenilacetohidrazida.

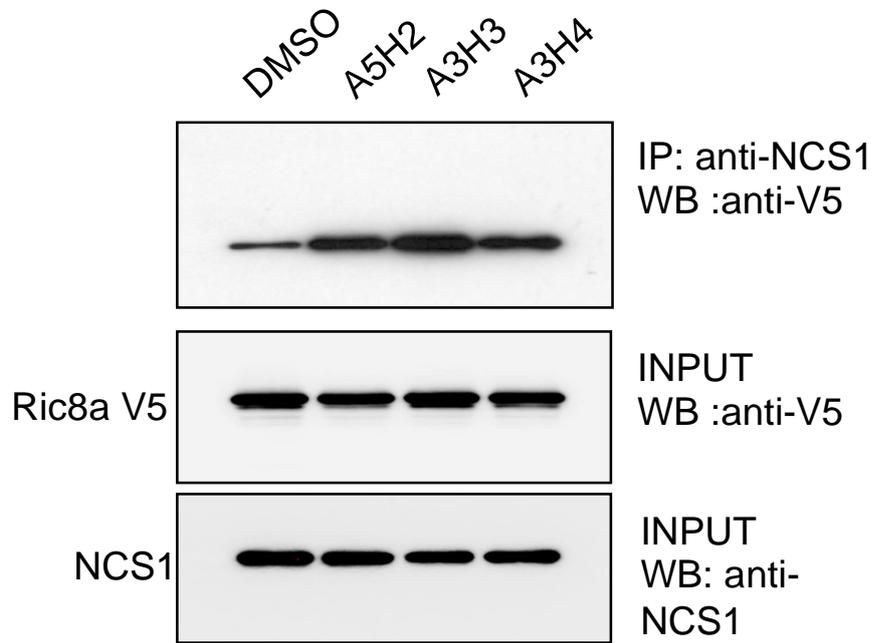


FIG. 1

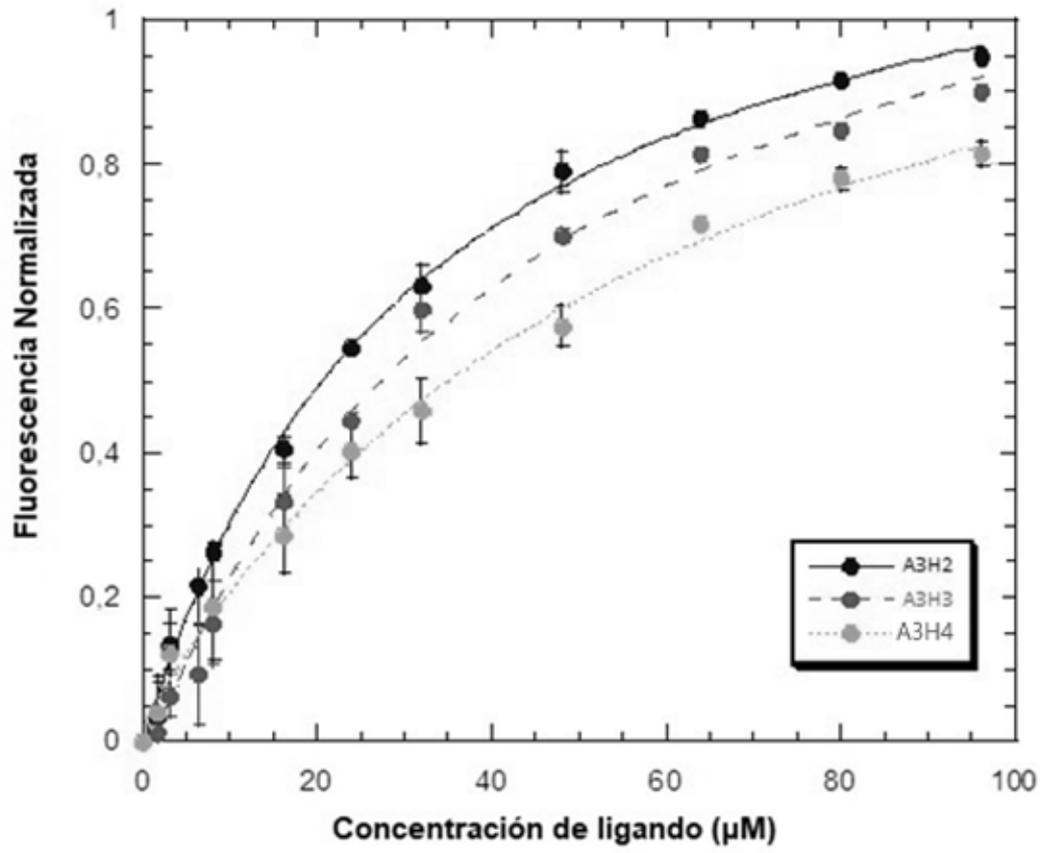


FIG. 2