

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/063862 A2

(43) Fecha de publicación internacional
10 de junio de 2010 (10.06.2010)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2009/070522
- (22) Fecha de presentación internacional: 23 de noviembre de 2009 (23.11.2009)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad: P200803413
1 de diciembre de 2008 (01.12.2008) ES
- (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (UAM)** [ES/ES]; Ciudad Universitaria de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **CONDE RUZAFÁ, Santiago** [ES/ES]; Instituto de Química Médica (IQM), C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **RODRÍGUEZ FRANCO, M^a Isabel** [ES/ES]; Instituto de Química Médica (IQM), C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **GONZÁLEZ MUÑOZ, Gema Cristina** [ES/ES]; Instituto de Química Médica (IQM), C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **VILLARROYA SÁNCHEZ, Mercedes** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Ciudad Universitaria de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **GARCÍA LÓPEZ, Manuela** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Ciudad Universitaria de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **GARCÍA GARCÍA, Antonio** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Ciudad Universitaria de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).
- (74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))



WO 2010/063862 A2

(54) Title: 5,6-DIHYDRODIBENZO[b,f][1,4,5]THIADIAZEPINE DERIVATIVES AND THE USE THEREOF IN THE TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

(54) Título : DERIVADOS DE 1,4,5-DIBENZO (b,f) TIADIAZEPINAS 5,6-DIHIDRO Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

(57) Abstract: Chemical compounds derived from the 5,6-dihydrodibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazepine heterocyclic system and the use thereof as pharmaceutical compositions for the treatment of diseases of the central nervous system that are caused by a series of processes included in that which is generally known as neurodegeneration, specifically for the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease or Huntington's disease.

(57) Resumen: Compuestos químicos derivados del sistema heterocíclico 1,4,5- dibenzo[b,f]tiadiazepinas 5,6-dihidro y su uso como composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, provocadas por una serie de procesos incluidos en lo que genéricamente se denomina neurodegeneración, en concreto para el tratamiento de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington.

DERIVADOS DE 1,4,5-DIBENZO[*b,f*]TIADIAZEPINAS 5,6-DIHI
USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS

5 La presente invención se refiere a compuestos químicos derivados del sistema heterocíclico 1,4,5-dibenzo[*b,f*]tiadiazepina 5,6-dihidro y su uso como agentes para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, provocadas por una serie de procesos incluidos en lo que genéricamente se denomina neurodegeneración. Así, la presente
10 invención se encuadra dentro del campo de la química, bioquímica y de la industria farmacéutica.

ESTADO DE LA TECNICA ANTERIOR

15 El progresivo envejecimiento de la población mundial trae consigo la indeseada consecuencia de un aumento de las enfermedades neurodegenerativas y demencias seniles. Entre estas, la enfermedad de Alzheimer, EA en lo sucesivo, es la enfermedad neurodegenerativa más común, responsable de aproximadamente dos tercios del total de casos de
20 demencia (variando entre 42% y 81% según distintos estudios), con una prevalencia muy relacionada con la edad, que se aproxima al 50% en la población mayor de 85 años, y que afecta más a las mujeres que a los hombres (Nussbaum R. L. et al., *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348, 1356-1364).

25 Varios son los procesos bioquímicos afectados en los cerebros de pacientes de EA: metabolismo anómalo y agregación de la proteína amiloide, hiperfosforilación de la proteína tau, presencia incontrolada de especies oxidantes, alteraciones de la homeostasis de los iones calcio (Ca^{2+} en lo sucesivo), pérdida neuronal, problemas en la neurotransmisión
30 colinérgica, etc. Sin duda, una mejora de cualquiera de estas patologías por separado sería una aproximación correcta, si bien incompleta, al

tratamiento de la enfermedad. En la actualidad, los fármacos empleados para el tratamiento de la EA son agentes que mejoran la neurotransmisión colinérgica, capaces de aliviar los déficits cognitivos y de memoria asociados a la EA, aunque sólo de manera temporal (Mossello E. et al.,
5 *Arch. Gerontol. Geriatr. Suppl.* **2004**, 9, 297-307).

Ante esta situación, resulta obvia la conveniencia de disponer de fármacos capaces de actuar en los primeros estadios de la enfermedad o, mejor aún, que produzcan una actividad protectora en la fase presintomática de
10 la enfermedad, en el caso ideal de disponer de un sistema de diagnóstico precoz adecuado (Finehout E. J. et al., *Ann. Neurol.* **2007**, 61, 120-129), y que sean capaces de restablecer o, al menos, mantener los procesos fisiológicos afectados en las enfermedades neurodegenerativas en los niveles más próximos posibles a la normalidad funcional.

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

30 **DESCRIPCION DE LA INVENCION**

La presente invención está relacionada con las propiedades antioxidantes y reguladoras del equilibrio iónico de Ca^{2+} y, en general, preventivas de ciertos procesos patológicos de una familia de compuestos descritos en la presente invención.

5

Más concretamente, la presente invención se refiere a una familia de compuestos con la característica estructural común de ser derivados del sistema heterocíclico 1,4,5-dibenzo[*b,f*]tiadiazepinas 5,6-dihidro que presentan propiedades farmacológicas potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

10

La presente invención se basa en que los inventores han observado en compuestos de fórmula general I interesantes propiedades farmacológicas que los hacen útiles como agentes terapéuticos con aplicación en posibles tratamientos de enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

15

En los estudios farmacológicos a que han sido sometidos, los compuestos objeto de la presente invención han mostrado una serie de actividades potencialmente muy útiles en tratamientos de enfermedades neurodegenerativas, sin perjuicio de que en estudios mas profundos, vayan apareciendo nuevas propiedades biológicas de posible interés. Las actividades estudiadas, y que han mostrado resultados positivos, han sido:

20

- 25 - Actividad antioxidante mediante captación de radicales libres.
- Modulación de los canales de calcio disminuyendo la entrada de dichos iones.
- Capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y penetrar en el sistema nervioso central.

30

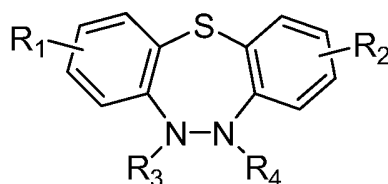
Como se ha descrito anteriormente, y cada vez existe un mayor número de

evidencias experimentales, la presencia de especies oxidantes por encima de niveles fisiológicamente aceptables, el llamado estrés oxidativo, se encuentra muy en el origen de la enfermedad de Alzheimer (Borghetti R. et al., *Neurobiol. Aging* **2007**, *28*, 1009-1014), y a su vez está fuertemente relacionado con entradas incontroladas de iones Ca^{2+} (Huang H. M. et al., *Life Sci.* **2000**, *66*, 1879-1892). Finalmente, un fármaco cuya diana terapéutica esté en el interior del cerebro o, en general, del sistema nervioso central, debe de tener la propiedad de penetrar en dicho sistema atravesando la barrera hematoencefálica.

10

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general **I**, o a un isómero, sal farmacéuticamente aceptable y/o solvato del mismo (a partir de ahora compuestos de la invención):

15



(I)

donde:

R_1, R_2 son grupos iguales o distintos y se seleccionan cada uno de forma independiente de la lista que comprende un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), un grupo alcoxilo, un halógeno, un grupo haloalquilo, un grupo nitro, un grupo amino ó un grupo aminoalquilo;

R_3, R_4 son grupos iguales o distintos, y se seleccionan cada uno de forma independiente de entre un átomo de hidrógeno o un grupo acilo ($-\text{COR}_5$); donde

25

R_5 se selecciona de un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_3$), sustituido o no sustituido.

incluyendo ambos enantiómeros o sus mezclas en cualquier proporción, en el caso de que existan carbonos quirales o, en general, cualquier tipo de isomería.

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

En una realización preferida de los compuestos de la invención, R_1 y/o R_2

15 son un átomo de hidrógeno, un haloalquilo, un grupo alcoxilo, un halógeno o un grupo nitro.

El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por

20 ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo, sec-butilo, n-pentilo, 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 un cicloalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxilo, halógeno, nitro, amino o amonio. En general, cualquier

25 sustituyente puede estar situado en cualquier posición. Preferiblemente el grupo alquilo es sustituido por un halógeno, denominado "haloalquilo" o un por grupo amino, denominado "aminoalquilo".

El término "haloalquilo" se refiere a un radical de fórmula $R_a-CH_{3-n}X_n$,

30 donde R_a representa el grupo alquilo, según se definió anteriormente, X representa un grupo halógeno seleccionado de entre cloro, flúor, bromo o

yodo, y n toma los valores de 1, 2 ó 3, dependiendo del número de átomos de halógeno. Preferiblemente X es cloro o flúor y/o n es 3. Más preferiblemente es un grupo trifluorometil.

5 El término "alcoxilo" se refiere en la presente invención a un grupo de fórmula $-OR_a$, donde R_a es un grupo alquilo según se definió anteriormente, por ejemplo un metoxilo, etoxilo o propoxilo. Preferiblemente es un metoxilo o etoxilo, más preferiblemente un metoxilo.

10 El término "amino" se refiere en la presente invención a un grupo de fórmula $-NH_2$, $-NHR_a$ o $-NR_aR_b$. Donde R_a y/o R_b puede ser un grupo alquilo o cicloalquilo, denominados alquilamino o cicloalquilamino.

El término "acilo" se refiere, en la presente invención, a un derivado de
15 ácido carboxílico por eliminación de un grupo hidroxilo. Los derivados de ácido carboxílico tienen como fórmula general R_5-CO- , donde R_5 se refiere un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C_1-C_6) con las acepciones anteriores, sustituido o no sustituido. Ejemplos de grupo acilo, pero sin limitarse puede ser acetilo, propionilo, butanoico o hexanoilo,
20 preferiblemente son acetilo o propionilo. R_5 , cuando es un grupo alquilo, puede ser lineal o ramificado e incluir enlaces dobles o triples. Además, R_5 , cuando es un grupo alquilo, puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como un alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxilo, halógeno, haloalquilo, nitro,
25 amino, amonioalquilo o amoniocicloalquilo. Preferiblemente puede estar sustituido por 1 o más sustituyentes seleccionados de entre un grupo alquilo (C_1-C_3), amino o heterocicloalquilo. Y estos sustituyentes, a su vez, pueden estar igualmente sustituidos o no, si están sustituidos preferiblemente lo están por grupos alquilo como los descritos
30 anteriormente. En una realización preferida R_5 es un alquilo sustituido por un grupo dimetilamino.

El término "heterocicloalquilo" se refiere, en la presente invención, a un radical estable monocíclico o bicíclico de 3 a 10 miembros, que está saturado o parcialmente saturado, y que consiste en átomos de carbono y de al menos un heteroátomo seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno o azufre. Preferiblemente el heteroátomo es nitrógeno, y más preferiblemente el ciclo es un anillo de 5 ó 6 miembros. Ejemplos de heterocicloalquilos pueden ser, sin limitarse a piperidin, piperazin, purina, pirazolin o pirrolidin. En una realización preferida, R₅ es un alquilo sustituido por heterocicloalquilos, sustituidos o no sustituidos, seleccionados de entre piperidin, piperazin o pirrolidin.

En una realización preferida de los compuestos de la presente invención, los grupos acilo forman una agrupación tipo amida con los átomos de nitrógeno que forman parte del heterociclo de tiadiazepina.

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

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I), por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc., carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, dicho compuesto de fórmula (I) en dicho individuo.

Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento 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 compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos y se pretende que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica, siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación bien conocidos por los técnicos en la materia. Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus isómeros, sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico 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 aún superiores

al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% del compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

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

Otra realización preferida de la presente invención, comprende los siguientes compuestos de la invención, o cualquiera de sus formas enantioméricas R, S y/o mezclas racémicas:

- 15 • 1,4,5-(2-Cloro-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-(3-Cloro-5,6-diacetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-(2-Cloro-5,6-diacetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-(4-Cloro-5,6-diacetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-(2-Metoxi-5,6-diacetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 20 • 1,4,5-(2-Nitro-6-acetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-(2-Trifluorometil-5,6-diacetil-5,6-dihidro)
dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-[3-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[(4-metilpiperazin-1-
il)acetil]]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 25 • 1,4,5-[4-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[(piperidin-1-
il)acetil]]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-[3-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis(3'-dimetilamino
propionil)]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-[3-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[3'-(piperidin-1-
il)propionil]]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 30

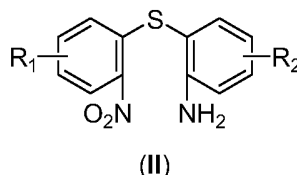
- 1,4,5-[3-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[3'-(pirrolidin-1-il)propionil]]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.

5 Los compuestos de la presente invención de fórmula (I) pueden ser obtenidos o producidos mediante una vía sintética química u obtenidos a partir de una materia natural de distinto origen.

En otro aspecto de la presente invención se describe un procedimiento de obtención de los compuestos de la invención de fórmula (I) o un isómero, sal farmacéuticamente aceptable y/o solvato del mismo caracterizado por las siguientes etapas:

a) Reacción de un sulfuro diarílico de fórmula (II),

15

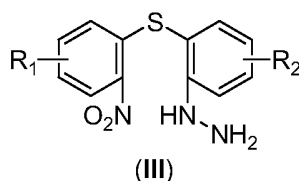


en que R_1 y R_2 son los descritos anteriormente, en condiciones de nitrosación, por ejemplo con un nitrito alcalino en medio ácido. Esta reacción da lugar a una N-nitrosoamina, que en general no necesita ser aislada y purificada para la siguiente reacción, siendo reducida a la correspondiente hidrazina (III)

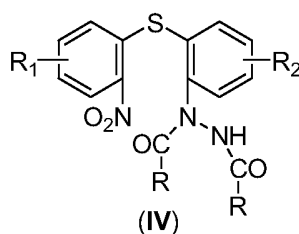
b) Reducción de N-nitrosoamina a hidrazina (III), por algún procedimiento general, bien conocido en síntesis orgánica, tal como por ejemplo el tratamiento con dicloruro de estaño o hidruro de litio y aluminio.

25

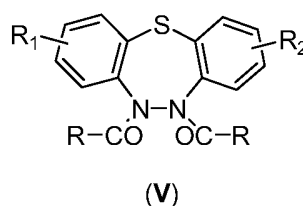
11



- c) Acilación de la hidrazina (III) mediante un exceso de algún agente acilante en las condiciones habituales, por ejemplo un cloruro o anhídrido de ácidos sencillos de cadena alquílica, lineal o ramificada (C₂-C₅) en presencia de una base seleccionada entre trietilamina o piridina, en un disolvente aprótico seleccionado entre cloruro de metileno o piridina.



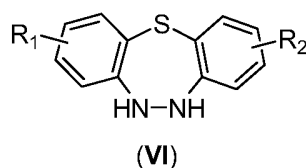
- d) Ciclación de esta hidrazida (IV) mediante una reacción clásica en síntesis orgánica en que por tratamiento con una base fuerte en un disolvente polar aprótico se obtienen las *N,N'*-dihidrazidas derivadas del sistema heterocíclico 1,4,5-dibenzo[*b,f*]tiadiazepina (V).



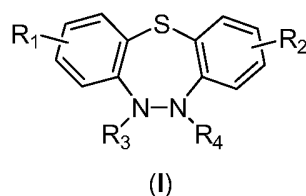
- e) Hidrólisis de las dihidrazidas de fórmula general (V) siguiendo métodos comunes y muy conocidos en síntesis orgánica, tales como el tratamiento con hidróxido potásico en etanol, para obtener el heterociclo base (VI), que corresponde a la fórmula general (I), cuando R₃ y R₄ son hidrógeno:

20

12



- f) Derivatización del sistema heterocíclico básico (VI) para conseguir los productos finales objeto de la presente invención, de fórmula general (I).
- 5 Estos derivados se obtienen siguiendo metodologías particulares según la naturaleza de los grupos R_3 y R_4 , descritos anteriormente.



10

- Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de los compuestos representados con la fórmula general (I) en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica, y preferiblemente ese medicamento o composición farmacéutica se utiliza para el tratamiento de
- 15 patologías o enfermedades provocadas por procesos oxidativos y disfunciones de la homeostasis de los iones Ca^{2+} o, en general, de enfermedades susceptibles de beneficiarse de las actividades biológicas mostradas por los productos descritos en la presente invención, o bien de una sal, derivado, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptables del
- 20 mismo.

- Los compuestos de la invención, sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen, pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales
- 25 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 fórmula (I), o un profármaco, solvato, derivado o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I), preferiblemente junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente al menos otro agente terapéutico activo.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica útil para el tratamiento de patologías o enfermedades del sistema nervioso que puedan ser provocadas por procesos oxidativos, o que al menos dichos procesos jueguen un papel patológicamente significativo o, en general, de enfermedades susceptibles de beneficiarse de las actividades biológicas mostradas por los productos descritos en la presente invención, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende un compuesto, en cantidad terapéuticamente efectiva, de fórmula (I), o mezclas de los mismos, una sal, profármaco, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a un paciente.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica de la invención en el grupo de enfermedades del sistema nervioso de carácter neurodegenerativo a que pertenecen, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención: enfermedades de Alzheimer, Creutzfeldt- Jakob, Parkinson o Huntington, la demencia con cuerpos de Lewy o, en general, las enfermedades resultado de un

deterioro de las neuronas causado por procesos de oxidación o de otro tipo tales como desequilibrios en la concentración de iones calcio, sistemas de neurotransmisión, etc, que el sistema nervioso del paciente afectado no es capaz de controlar.

5

El alcance de un proceso neurodegenerativo en la presente invención es aquel tal como la pérdida neuronal, fallos en los procesos de neurotransmisión o procesos derivados de fallos en el control de las especies oxidantes creadas en el cerebro que dan lugar a estrés oxidativo patológico.

10

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

15

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

25

En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una

30

realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.). Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid, o en otros habituales o similares de las Farmacopeas Española y de Estados Unidos.

10

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

15

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de pacientes afectados por enfermedades del sistema nervioso central en las que tengan lugar procesos oxidativos incontrolados u otros procesos en las que los productos de la presente invención produzcan un efecto benéfico. Este tratamiento consiste en la administración a los individuos afectados por estas enfermedades de cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de fórmula (I), o una composición farmacéutica que lo incluya. A título de ejemplo, enfermedades contempladas en esta invención son las enfermedades de Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob, Parkinson o Huntington, la demencia con cuerpos de Lewy o, en general, las enfermedades resultado de un deterioro de las neuronas causado por procesos de tipo estrés oxidativo, desequilibrios iónicos o fallos en algún sistema de neurotransmisión que el sistema nervioso del paciente afectado no es capaz de controlar.

30

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

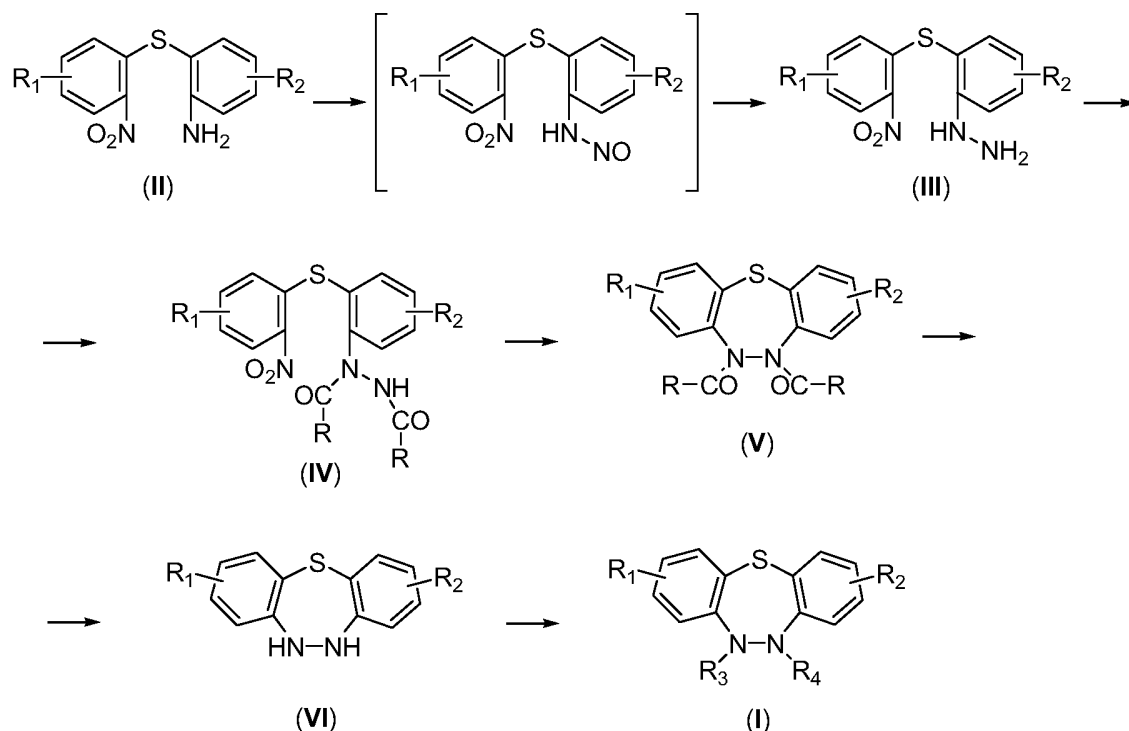
EJEMPLOS

10

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

15 EJEMPLO 1. OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCIÓN

Los compuestos cuya actividad biológica es objeto de la presente invención se sintetizaron siguiendo un procedimiento general en síntesis orgánica. Dicho procedimiento está representado en el siguiente esquema de reacciones, en que los sustituyentes R, R₁, R₂, R₃ y R₄ representan a grupos químicos tal como han sido definidos anteriormente:



Esquema 1: Síntesis de los compuestos de fórmula (I)

- 5 Esta síntesis en varios pasos parte del sulfuro diarílico (II), obtenido por procedimientos habituales en síntesis orgánica, de fácil ejecución por parte de cualquier experto en este campo. Este compuesto (II) se sometió a condiciones de nitrosación, haciendo reaccionar la amina con nitrito sódico en un medio ácido. En general, la N-nitrosoamina resultante se obtuvo con una pureza suficiente como para no ser necesario su aislamiento y purificación, siendo reducida a la correspondiente hidrazina (III) mediante tratamiento con dicloruro de estaño o hidruro de litio y aluminio. Esta hidrazina (III) se aciló por medio de un exceso de agente acilante para obtener la N,N' -dihidrazida (IV) que se cicló en un medio alcalino, a las
- 10 N,N' -dihidrazidas derivadas de 1,4,5-(5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiazepina (V). Algunos de estos compuestos de fórmula general (V) están también incluidos como ejemplos y sometidos a evaluación biológica. Para llegar a los productos de fórmula general (I), las dihidrazidas (V) fueron
- 15

hidrolizadas con potasa etanólica para obtener los heterociclos básicos (VI), que fueron derivatizados mediante agentes acilantes habitualmente utilizados en química de aminoácidos, tales como hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP) en un disolvente polar y básico, como por ejemplo una mezcla de trietilamina en dimetilformamida, obteniéndose los productos de fórmula general (I).

En particular, y siguiendo el protocolo de síntesis representado en el Esquema 1, se obtuvieron y caracterizado los siguientes compuestos:

10

Compuesto 1: 1,4,5-(2-Cloro-5,6-dihidro)dibenzo[b,f]tiadiazepina.

Sólido amarillo. Punto de fusión: 121-123 °C. EM: $m/z = 249 [M+H]^+$. 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.60 (d, 1H, $J=7.4$ Hz), 7.52 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 7.46 (t, 1H, $J=7.4$ Hz), 7.39 (dd, 1H, $J=8.4$ Hz, $J=2.0$ Hz), 7.34-7.27 (m, 3H), 5.22 (s, 2H, 2NH). ^{13}C -RMN (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 151.6 (C), 150.0 (C), 135.5 (C), 132.4 (C), 131.8 (C), 131.2 (C), 130.2 (C), 129.9 (C), 129.5 (C), 129.4 (C), 128.7 (C), 127.6 (C). Pureza: 97% (HPLC).

15

Compuesto 2: 1,4,5-(3-Cloro-5,6-diacetil-5,6-dihidro)dibenzo[b,f]

tiadiazepina. Sólido blanco. Punto de fusión: 146-149 °C. EM: $m/z = 333 [M+H]^+$, 335 $[M+2H]^+$, 354 $[M+Na]^+$, 687 $[2M+Na]^+$. 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.63-7.09 (m, 7H, aromáticos), 2.12 (s, 3H, CH_3), 2.03 (s, 3H, CH_3). ^{13}C -RMN (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 167.2($COCH_3$), 166.8 ($COCH_3$), 140.1 (C), 139.4 (C), 131.0 (C), 129.6 (C), 129.4 (C), 129.1 (C), 128.6 (C), 128.0 (C), 127.7 (C), 127.0 (C), 125.9 (C), 125.6 (C), 21.8 (CH_3), 21.7 (CH_3). Pureza: 95% (HPLC).

20

Compuesto 3: 1,4,5-(2-Cloro-5,6-diacetil-5,6-dihidro)dibenzo[b,f]

tiadiazepina. Sólido blanco. Punto de fusión: 195-197 °C. EM: $m/z = 333 [M+H]^+$, 335 $[M+2H]^+$. 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.67-7.03 (m, 7H, aromáticos), 2.12 (s, 3H, CH_3), 2.02 (s, 3H, CH_3). ^{13}C -RMN (100 MHz,

30

CDCl₃), δ (ppm): 170.1 (COCH₃), 168.2 (COCH₃), 140.4 (C), 139.6 (C), 130.4 (C), 129.7 (C), 129.4 (C), 128.7 (C), 128.3 (C), 127.6 (C), 127.3 (C), 126.1 (C), 122.5 (C), 117.8 (C), 22.0 (CH₃), 21.9 (CH₃). Pureza: 100% (HPLC).

5

Compuesto 4: **1,4,5-(4-Cloro-5,6-diacetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.** Sólido blanco. Punto de fusión: 119-121 °C. EM: $m/z = 333$ [M+H]⁺, 335 [M+2H]⁺, 354 [M+Na]⁺, 687 [2M+Na]⁺. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.64-7.14 (m, 7H, aromáticos), 2.19 (s, 3H, CH₃), 2.02 (s, 10 3H, CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.3 (COCH₃), 167.5 (COCH₃), 139.4 (C), 134.5 (C), 133.2 (C), 130.6 (C), 129.7 (C), 128.8 (C), 128.7 (C), 128.6 (C), 128.1 (C), 126.8 (C), 126.2 (C), 125.8 (C), 22.3 (CH₃), 22.2 (CH₃). Pureza: 100% (HPLC).

15 **Compuesto 5:** **1,4,5-(2-Metoxi-5,6-diacetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.** Sólido amarillo. Punto de fusión: 99-101 °C. EM: $m/z = 329$ [M+H]⁺, 351 [M+Na]⁺, 679 [2M+Na]⁺. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.61-7.19 (m, 7H, aromáticos), 3.78 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃), 2.03 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.5 (COCH₃), 168.1 20 (COCH₃), 157.3 (C), 143.2 (C), 135.8 (C), 132.0 (C), 127.3 (C), 125.6 (C), 123.5 (C), 122.8 (C), 121.4 (C), 120.1 (C), 116.9 (C), 113.2 (C), 56.4 (C, CH₃), 22.2 (CH₃), 21.9 (CH₃). Pureza: 97% (HPLC).

Compuesto 6: **1,4,5-(2-Nitro-6-acetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.** Sólido amarillo. Punto de fusión: 111-113 °C. EM: $m/z = 302$ [M+H]⁺. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.15(d, 1H, $J=2.4$ Hz), 7.88 (dd, 1H, $J=8.9$ Hz, $J=2.5$ Hz), 7.62 (td, 1H, $J=5.7$ Hz, $J=3.2$ Hz), 7.44 (m, 2H), 7.37(m, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.80 (d, 1H, $J=8.8$ Hz), 2.02 (s, 3H). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.5 (COCH₃), 151.2 (C), 144.2 (C), 30 141.6 (C), 132.8 (C), 131.4 (C), 130.6 (C), 129.9 (C), 127.7 (C), 126.4 (C), 123.3 (C), 117.1 (C), 116.4 (C), 20.6 (CH₃). Pureza: 100% (HPLC).

- Compuesto 7: 1,4,5-(2-Trifluorometil-5,6-diacetil-5,6-dihidro) dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.** Sólido amarillo. Punto de fusión: 125-127 °C. EM: $m/z = 367 [M+H]^+$. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.82-7.27 (m, 7H, aromáticos), 2.21 (s, 3H, CH_3), 2.09 (s, 3H, CH_3). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 169.8 (COCH_3), 168.4 (COCH_3), 142.2 (C), 135.2 (C), 129.8 (C), 129.0 (C), 128.6 (C), 128.2 (C), 127.9 (C), 127.5 (C), 127.1 (C), 126.5 (C), 124.6 (C), 123.2 (C), 122.6 (C), 22.0 (CH_3), 21.4 (CH_3). Pureza: 100% (HPLC).
- 5
- Compuesto 8: 1,4,5-[3-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[(4-metilpiperazin-1-il)acetil]]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.** Sólido amarillo. Punto de fusión: 174-176 °C. EM: $m/z = 529 [M]^+$, $531 [M+2H]^+$. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.70-7.12 (m, 7H, aromáticos), 3.25-3.0 (m, 4H), 2.62-2.0 (m, 22H, alifáticos). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 167.5 (CO), 167.2 (CO), 140.5 (C), 139.8 (C), 130.8 (C), 130.2 (C), 129.2 (C), 128.6 (C), 128.3 (C), 127.8 (C), 127.6 (C), 127.4 (C), 127.2 (C), 125.9 (C), 59,8 (C), 59,6 (C), 54,8 (2C) , 54,7 (2C), 52,7 (2C), 52,5 (2C), 45,9 (2C). Pureza: 100% (HPLC).
- 15
- Compuesto 9: 1,4,5-[4-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[(piperidin-1-il)acetil]]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.** Sólido amarillo. Punto de fusión: 131-133°C. EM: $m/z = 499 [M]^+$, $501 [M+2H]^+$. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.62-7.10 (m, 7H, aromáticos), 3.44-3.01 (m, 4H), 2.98-2.17 (m, 20H, alifáticos). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 169.4 (CO), 166.5 (CO), 139.4 (C), 134.5 (C), 133.4 (C), 130.6 (C), 130.1 (C), 128.6 (C), 128.3 (C), 127.9 (C), 127.1 (C), 126.7 (C), 125.8 (C), 124.9 (C), 61,3 (C), 60,6 (C), 54,2 (2C) , 54,0 (2C), 25.7 (2C), 25,6 (2C), 23.8 (C), 23.5 (C). Pureza: 100% (HPLC).
- 20
- Compuesto 10: 1,4,5-[3-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis(3'-dimetilamino propionil)]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.** Sólido amarillo. Punto de fusión:
- 25
- 30

138-140 °C. EM: $m/z = 447 [M]^+$. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, MeOH), δ (ppm): 8.07-7.24 (m, 7H, aromáticos), 2.82-2.69 (m, 8H, alifáticos), 2.48-2.40 (m, 12H, alifáticos). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, MeOH), δ (ppm): 173.1 (CO), 170.5 (CO), 141.2 (C), 138.9 (C), 132.2 (C), 131.3 (C), 131.0 (C), 130.8 (C),
5 130.4 (C), 130.0 (C), 129.8 (C), 129.4 (C), 129.0 (C), 128.2 (C), 56,1 (C), 55,9 (C), 44,7 (C), 44,1 (C), 31,7 (2C) , 31,1 (2C). Pureza 95% (HPLC).

Compuesto 11: 1,4,5-[3-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[3'-(piperidin-1-
10 il)propionil]]dibenzo[b,f]tiadiazepina. Sólido amarillo. Punto de fusión: 151-153 °C. EM: $m/z = 527 [M]^+$. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, MeOH), δ (ppm): 8.07-7.28 (m, 7H, aromáticos), 3.69-1.80 (m, 28H, alifáticos). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, MeOH), δ (ppm): 173.1 (CO), 170.5 (CO), 141.2 (C), 138.9 (C), 132.2 (C), 131.3 (C), 131.0 (C), 130.8 (C), 130.4 (C), 130.0 (C), 129.8 (C),
15 129.4 (C), 129.0 (C), 128.2 (C), 56,1 (2C), 55,9 (2C), 51,6 (C) , 51,4 (C), 31,7 (C), 31,1 (C), 26,5 (2C) , 26,0 (2C), 23,8 (C), 23,5 (C). Pureza 100% (HPLC).

Compuesto 12: 1,4,5-[3-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[3'-(pirrolidin-1-
20 il)propionil]]dibenzo[b,f]tiadiazepina. Sólido amarillo. Punto de fusión: 180-182 °C. EM: $m/z = 499 [M]^+$, 501 [M+2H] $^+$. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, MeOH), δ (ppm): 8.05-7.18 (m, 7H, aromáticos), 3.64-1.92 (m, 24H, alifáticos). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, MeOH), δ (ppm): 173.1 (CO), 170.5 (CO), 141.2 (C), 138.9 (C), 132.2 (C), 131.3 (C), 131.0 (C), 130.8 (C), 130.4 (C),
25 130.0 (C), 129.8 (C), 129.4 (C), 129.0 (C), 128.2 (C), 55,6 (2C), 55,4 (2C), 51,6 (C) , 51,4 (C), 31,7 (C), 31,1 (C), 24,0 (2C) , 23,9 (2C). Pureza 100% (HPLC).

EJEMPLO 2. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS ESTUDIADAS EN LOS
30 **COMPUESTOS DE LA INVENCION**

2.1 Propiedades neuroprotectoras de los compuestos objeto de la invención

Se evaluó el efecto citoprotector de los compuestos en células de neuroblastoma humano, concretamente el potencial neuroprotector de estos compuestos frente al estrés oxidativo producido por rotenona y oligomicina A, bloqueantes de la cadena respiratoria de la mitocondria según fue descrito por Halliwell B. en *J. Neurochem.* **1992**, 59, 1609-1623 y por Newhouse K. et al. en *Toxicological Sciences* **2004**, 79, 137-146, respectivamente. El parámetro de viabilidad que se midió en ambos modelos era la actividad de la enzima lactatodeshidrogenasa (LDH en lo sucesivo), una enzima que se libera al medio extracelular cuando muere la célula (Arias E. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 1346-1353).

El método experimental utilizado, siguiendo un procedimiento previamente descrito (Arias E. et al., *Neuropharmacology* **2004**, 46, 103-114) es el siguiente: células SHSY5Y de neuroblastoma humano fueron sembradas y cultivadas en un medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) conteniendo 15 aminoácidos no esenciales y suplementada con un 10% de suero fetal de ternera, glutamina 1 milimolar, 50 unidades por mililitro de penicilina y 50 microgramos por mililitro de estreptomina, manteniéndolas a 37°C en aire humidificado conteniendo 5% de dióxido de carbono. En los ensayos, las células SH-SY5Y fueron subcultivadas en placas de 48 pocillos con una densidad de sembrado de 1×10^5 células por pocillo, o bien en placas de 96 pocillos con una densidad de sembrado de 2×10^5 células por pocillo. En los experimentos de citotoxicidad, las células así preparadas fueron tratadas con los compuestos a medir en DMEM libre de suero.

Para estudiar la acción citoprotectora de los diferentes compuestos contra la muerte celular inducida por una combinación de rotenona con

oligomicina A 30 micromolar y 10 micromolar respectivamente. Todos los compuestos fueron evaluados a varias concentraciones empleando protocolos de pre- y co-incubación. En el primer protocolo de preincubación las células fueron tratadas con el producto a evaluar durante 5 24 horas. Después, los medios fueron reemplazados por medios frescos que aún contenían el compuesto más el agente citotóxico, y fueron así mantenidos por un período adicional de 24 horas. En condiciones de co-incubación, el agente citotóxico y el compuesto a evaluar fueron añadidos de forma simultánea y mantenidos en incubación durante 24 horas. La 10 viabilidad celular fue comprobada midiendo la actividad de la enzima LDH, como se ha explicado anteriormente, mediante el kit "Cytotoxicity Cell Death" (Roche-Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante de dicho kit. La actividad LDH total fue definida como la suma de las actividades LDH intra y extracelular. La actividad LDH liberada por 15 las células al morir fue definida como el porcentaje de la actividad LDH extracelular frente a la actividad LDH total. Las muestras se analizaron espectrofotométricamente en un lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF), empleando el filtro adecuado (490 nm), obteniendo los valores de absorbancia mediante el programa DeltaSOFTII Versión 3,71 20 EMS.

En todos los ensayos farmacológicos se utilizó un control positivo como comparación y para evaluar la bondad del método empleado. En este caso se utilizó trolox, un bien conocido captador de radicales libres, núcleo 25 activo del antioxidante natural vitamina E (Petersen R. C. et al., *New. Engl. J. Med.* **2005**, 352, 2379-2388); los resultados obtenidos para los compuestos descritos como **Compuestos 1 a 12** que se muestran en la siguiente Tabla 1, vienen expresados en porcentaje de la actividad neuroprotectora.

Tabla 1.- Porcentaje de neuroprotección frente a la mezcla de rotenona (30 μM) y oligomicina A (10 μM) de las dibenzotiadiazepinas a tres concentraciones, en condiciones de pre- y co-incubación.

5	Comp.	Pre-incubación			Co-incubación		
		0,3 μM	1 μM	3 μM	0,3 μM	1 μM	3 μM
	1	90.3***	90.2***	84.4***	40.5**	31.4**	38.8**
	2	79.8***	88.9***	91.1***	9.3	38.3**	38.3**
	3	64.8***	76.6***	81.5***	49.0**	59.2**	63.2**
10	4	n.d	n.d	48.5***	n.d	n.d	n.d
	5	89.7***	97.0***	95.7***	49.9**	50.1**	53.8**
	6	83.8***	75.8**	72.7**	26.2*	27.8*	21.9*
	7	76.4***	91.1***	92.2***	20.7*	35.0**	35.8**
	8	86.0***	96.4***	97.5***	43.3**	38.2**	35.6**
15	9	90.5***	83.9***	83.4***	50.6**	42.6**	35.7*
	10	75.9***	92.1***	96.1***	8.1**	20.4**	15.9**
	11	84.6***	90.4***	96.4***	53.0**	55.4**	63.0**
	12	99.3***	94.6***	92.4**	40.7**	45.9**	32.7**
	Trolox	--	--	56.1***	--	--	55.7***

20 Los resultados son la media de 4 experimentos independientes (por triplicado). n.d= no determinado.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

25 Como conclusión de este apartado, estos resultados indican que los compuestos objeto de la presente invención son capaces de reducir la presencia de especies radicálicas con el consiguiente efecto neuroprotector, lo que las convierte en potenciales fármacos para el tratamiento de patologías generadas o favorecidas por estrés oxidativo o presencia de especies radicálicas en general.

30

2.2 Medida de la capacidad antioxidante de los compuestos: Captación de peróxido de hidrógeno por los compuestos objeto de la invención.

5 Con el fin de determinar si los compuestos objetos de la invención presentaban capacidad antioxidante, se seleccionaron 4 compuestos que habían dado buenos resultados como agentes neuroprotectores, los compuestos **2**, **5**, **8** y **11**. La evaluación se llevó a cabo utilizando una sonda, la DCFH-DA (2,7-diclorofluoresceína diacetato), que atraviesa la
10 membrana celular y es hidrolizada por esterasas celulares pasando a su forma no fluorescente DCFH₂, la cual sufre una reacción de oxidación con los radicales de oxígeno pasando a su forma fluorescente DCF (Molina-Jiménez M. F. et al., *Brain Res.* **2004**, 1009, 9-16). La disminución de fluorescencia en presencia de los compuestos objeto de la evaluación,
15 añadidos a la vez que el tóxico, indicaría un efecto secuestrador de radicales libres.

El protocolo seguido consistió en sembrar las células a una densidad de 2×10^5 células por pocillo en placas negras de 96 pocillos, y mantenerlas
20 durante 24 horas en el incubador. A continuación, se cargaron las células con 10 μ M de DCFH-DA, se incubaron durante unos 45 minutos y, seguidamente, se añadió el tóxico, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración 60 μ M, que induce la formación de radicales libres, más el compuesto a las concentraciones más neuroprotectoras durante 2 horas.
25 Transcurrido este tiempo, se despegaron las células y se midió la fluorescencia en un citómetro de flujo (Cytomics FC 500 MPL de la firma Beckman Coulter, 2 láseres: azul (488 nm) y rojo (633 nm), 5 PMT para fluorescencias con un rango de 185 a 900 nm).

30 Los resultados de la capacidad antioxidante, (expresados como % de la reducción de la fluorescencia generada por H₂O₂) a una concentración 60

μM , generadora de ROS, para los compuestos de la invención, son los siguientes:

- **Compuesto 3:** 24,0%
- **Compuesto 5:** 21,1%
- 5 • **Compuesto 8:** 22,2%
- **Compuesto 11:** 23,1%
- Trolox: 29.6%

Igual que en el apartado 2.1, estos resultados son una nueva prueba de la
10 capacidad antioxidante y captadora de radicales libres de los compuestos objeto de la invención, reforzando su atractivo como potenciales fármacos útiles para el tratamiento de patologías en las que al menos una de las causas sea el estrés oxidativo.

15 **2.3 Actividad de los compuestos objetos de la invención como moduladores de la concentración de calcio citosólica.**

Igualmente se estudió si el mecanismo neuroprotector de los compuestos objeto de la invención podría tener también alguna relación con una
20 disminución de la sobrecarga de calcio citosólico. En efecto, es conocido que la alteración de la homeostasis del calcio puede estar implicada en el desarrollo de diferentes enfermedades neurodegenerativas (Weiss J. H. et al., *J. Neurochem.* **1994**, 62, 372-375; Goodman Y. et al., *Exp. Neurol.* **1994**, 128, 1-12; Ueda K. et al., *J. Neurochem.* **1997**, 68, 265-271). Una
25 sobrecarga de calcio neuronal puede activar distintos procesos patológicos como la alteración del potencial de membrana mitocondrial o la producción de radicales libres que llevarán finalmente a la muerte celular (De Keyser J. et al., *Acta Clin. Belg.* **1999**, 54, 302-305). Por lo tanto, un bloqueo de la
30 entrada excesiva de calcio a las células podría estar relacionado con el efecto neuroprotector observado. Para este estudio se seleccionaron los mismos 4, entre los 12 compuestos que se muestran en esta patente, que

- habían sido evaluados como antioxidantes frente a H_2O_2 , los compuestos **2**, **5**, **8** y **11**. Las células SH-SY5Y se sembraron en placas opacas de 96 pocillos, y se mantuvieron durante 24h en el incubador; seguidamente se incubaron en oscuridad durante 40 min a 37 °C en una solución Krebs-HEPES (compuesto por: NaCl (144mM), KCl(5,9mM), $MgCl_2$ (1,2mM), $CaCl_2$ (2mM), HEPES (10mM), glucosa (11mM)) que contenía la sonda fluorescente fluo-4/AM (10 μ M), ácido plurónico F-127 (0,02%) y probenecid (1 mM). El ácido plurónico es un detergente de baja toxicidad que se utiliza para impedir la formación de micelas y facilitar así la carga de las células con el fluo-4/AM, un quelante de iones calcio, el cual emite fluorescencia al unirse a él. El probenecid es un inhibidor del transportador aniónico de la membrana plasmática y su uso reduce la pérdida de la sonda fluorescente.
- 15 Una vez finalizada la incubación con la solución de carga, las células se lavaron con Krebs-HEPES y, posteriormente, se mantuvieron 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, para permitir la hidrólisis del enlace éster de la sonda por las esterasas intracelulares. A continuación se inyectaron los compuestos a las concentraciones deseadas, en los distintos pocillos de la placa, tras introducirla en un lector de fluorescencia en placas modelo Fluostar Optima (BMG Labtechnologies) donde se cuantificó la fluorescencia emitida por el Fluo-4/AM midiendo a las longitudes de onda de 485 nm (excitación) y 520 nm (emisión).
- 25 En todos los experimentos con los diferentes tratamientos se comprobó el estado del cultivo celular, aplicando un pulso despolarizante (70 mM de KCl) a un pocillo control y como control positivo se utilizó nifedipino, un bloqueante de los canales de calcio voltaje-dependientes del subtipo L.

Los resultados del bloqueo de la concentración de calcio, expresados como % de fluorescencia para los compuestos de la invención, son los siguientes:

- **Compuesto 3:** 17,8% a 3 μ M
- 5 • **Compuesto 5:** 15,0% a 3 μ M
- **Compuesto 6:** 4,7% a 3 μ M
- **Compuesto 7:** 28,1% a 3 μ M
- **Compuesto 8:** 14,5% a 3 μ M
- **Compuesto 9:** 30,7% a 3 μ M
- 10 • **Compuesto 10:** 21,9% a 3 μ M
- **Compuesto 11:** 5,2% a 3 μ M
- **Compuesto 12:** 13,1% a 3 μ M
- Nifedipino: 65.2% a 3 micromolar.

15 Los resultados descritos indican como muy probable un doble mecanismo para la acción neuroprotectora que muestran los compuestos objeto de esta invención:

- Como antioxidante mediante captación de radicales libres
- Favoreciendo la disminución de iones calcio en el citosol por modulación
- 20 de los canales de calcio voltaje-dependientes.

La actividad neuroprotectora mediante este doble mecanismo hace que estos compuestos resulten muy atractivos por su potencial utilidad para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

25 **2.4 Capacidad de penetración en el sistema nervioso central.**

Teniendo en cuenta el papel central que juega el cerebro en el organismo, cabe esperar que la propia evolución lo haya protegido de forma especial. Esto es cierto para todo el sistema nervioso central y de forma muy

30 particular para el cerebro, que aparece como un órgano blindado, un

sistema aparte dentro del conjunto del organismo, separado por una membrana de características especiales llamada barrera hematoencefálica (BHE en lo sucesivo) que selecciona el paso de determinadas moléculas en ambos sentidos. Es decir, de nada sirve obtener un producto que
5 muestre una alta actividad *in vitro*, con un gran potencial para el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas si *in vivo* no es capaz de alcanzar su diana terapéutica. Resulta entonces de gran importancia conocer si la molécula o familia de moléculas objeto de una investigación del tipo de la que se presenta en esta patente son capaces
10 de atravesar la BHE antes de alcanzar fases posteriores del desarrollo del potencial fármaco, en orden a introducir nuevas modificaciones en la molécula o, incluso, detener la línea de investigación si se confirma la incapacidad de los productos para penetrar en el sistema nervioso central a través de la BHE, con el consiguiente ahorro de unas inversiones cada
15 vez más elevadas.

Existen algunos métodos *in vitro* para evaluar dicha capacidad de penetración, siendo la llamada metodología PAMPA (*Parallel Artificial Membrana Permeation Assay*, descrita por Di L. et al. en *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 223-232) la más empleada debido a la máxima precisión y verosimilitud que ofrecen sus resultados (Rodríguez-Franco M. I. et al., *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 459-462; Pavón F. J. et al., *Neuropharmacol.* **2006**, 51, 358-366; Reviriego F. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16458-16459). En el caso de los productos objeto de esta invención, se estudió
25 su capacidad de atravesar la BHE utilizando dicha metodología PAMPA en la forma que se describe a continuación. Los experimentos se realizaron empleando dos microplacas de 96 pocillos en un montaje tipo *sandwich*. La microplaca superior (Millipore Ref. MAIPS4510) está provista de 96 filtros hidrófobos de PVDF, donde se deposita una disolución de extracto
30 lipídico de cerebro de cerdo (Avanti Polar Lipids) en dodecano. La

microplaca inferior posee 96 pocillos con forma de lágrima (Millipore Ref. MAMCS9610).

La microplaca receptora se rellenó con 180 μ L por pocillo de una mezcla
 5 compuesta por buffer fosfato salino de pH 7.4 (PBS) y EtOH en proporción
 70:30. El filtro de la placa donadora se cubrió con 4 μ L de una disolución
 del extracto lipídico de cerebro de cerdo en dodecano (20 mg mL⁻¹). A
 continuación, se añadieron 180 μ L de una disolución PBS:EtOH (70:30) de
 los compuestos a evaluar sobre la microplaca donadora, que se situó de
 10 forma cuidadosa sobre la placa receptora. Después de 280 minutos de
 incubación a 25° C la placa donadora se separó cuidadosamente y se
 determinó la concentración de los compuestos en la placa receptora
 mediante espectroscopía UV. El método mide la permeabilidad,
 expresando como tal la velocidad de paso de una barrera de un grosor
 15 dado en millonésimas de centímetro (cm x 10⁻⁶) por segundo. Los
 resultados se expresan como el valor medio más/menos la desviación
 estándar de tres ensayos independientes conteniendo cada uno de ellos
 cuatro repeticiones de cada compuesto a analizar. Previamente, el método
 fue validado con 15 fármacos comerciales: testosterona, verapamilo,
 20 imipramina, desipramina, astemizol, progesterona, promazina,
 clorpromazina, clonidina, corticosterona, piroxicam, hidrocortisona,
 cafeína, aldosterona, lomefloxacina, enoxazina y ofloxacina, que ofrecieron
 valores comprendidos entre 22,9 \pm 0,1 (testosterona) y 0,6 \pm 0,01
 (ofloxacina), coherentes con los valores de permeabilidad descritos para
 25 dichos compuestos.

Los resultados obtenidos fueron:

		<u>Permeabilidad^a</u>	<u>Clasificación^b</u>
	Compuesto 2	10,1 \pm 0,1	SNC+
30	Compuesto 3	12,4 \pm 0,5	SNC+
	Compuesto 4	10,0 \pm 0,3	SNC+

	Compuesto 5	12,6 ± 0,3	SNC+
	Compuesto 6	2,0 ± 0,1	SNC+/-
	Compuesto 7	1,0 ± 0,1	SNC+/-
	Compuesto 8	5,9 ± 0,2	SNC+
5	Compuesto 9	7,3 ± 0,2	SNC+
	Compuesto 10	14,2 ± 0,1	SNC+
	Compuesto 11	5,3 ± 0,2	SNC+
	Compuesto 12	1,7 ± 0,1	SNC+/-

10 ^a Permeabilidad experimental, expresada en paso del producto por una membrana de un grosor dado en millonésimas de centímetro ($\text{cm} \times 10^{-6}$) por segundo, siguiendo el método descrito por Di L. et al. en *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 223-232. ^β SNC+ significa que penetra en el SNC y SNC- significa que no lo hace.

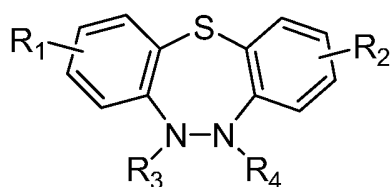
15

La conclusión que se extrae de estos resultados es que los productos objeto de la presente invención, al ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, son también capaces de alcanzar sus dianas terapéuticas en el cerebro, una condición casi imprescindible para formar parte de fármacos útiles para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso en general y neurodegenerativas en particular, tales como la enfermedad de Alzheimer.

20

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general (I)



5

donde:

- R₁, R₂ son grupos iguales o distintos y se seleccionan cada uno de forma independiente de la lista que comprende un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C₁-C₆), un grupo alcoxilo, un halógeno, un grupo haloalquilo, un grupo nitro, un grupo amino ó un grupo aminoalquilo; y
- R₃, R₄ son grupos iguales o distintos, y se seleccionan cada uno de forma independiente de entre un átomo de hidrógeno o un grupo acilo (COR₅); donde
- 15 R₅, se selecciona de un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃), sustituido o no sustituido.

o un isómero, sal farmacéuticamente aceptable y/o solvato del mismo.

- 20 2. Compuesto según la reivindicación 1, donde R₁ y/o R₂ son un átomo de hidrógeno, un haloalquilo, un grupo alcoxilo, un halógeno o un grupo nitro.
3. Compuesto según la reivindicación 2, donde R₁ y/o R₂ son un halógeno
25 seleccionado de entre un átomo de cloro o de flúor.
4. Compuesto según la reivindicación 2, donde R₁ y/o R₂ son un grupo

alcoxilo seleccionado entre metoxilo o etoxilo.

5. Compuesto según la reivindicación 2, donde R_1 y/o R_2 son el grupo trifluorometil.

5

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R_3 y R_4 es un grupo acilo (COR_5).

7. Compuesto según la reivindicación 6, donde R_5 es un alquilo sustituido por 1 o más sustituyentes seleccionados de entre un grupo alquilo (C1-C3), amino o heterociclo.

10

8. Compuesto según la reivindicación 7, donde el alquilo es sustituido por un metilo o un propilo.

15

9. Compuesto según la reivindicación 7, donde el alquilo es sustituido por un grupo dimetilamino.

20

10. Compuesto según la reivindicación 7, donde el alquilo es sustituido por un heterociclo seleccionado de la lista que comprende piperidin, piperazin o pirrolidin.

11. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado de la lista que comprende:

25

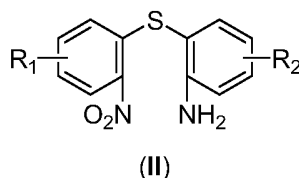
- 1,4,5-(2-Cloro-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-(3-Cloro-5,6-diacetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-(2-Cloro-5,6-diacetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-(4-Cloro-5,6-diacetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-(2-Metoxi-5,6-diacetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-(2-Nitro-6-acetil-5,6-dihidro)dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.

30

- 1,4,5-(2-Trifluorometil-5,6-diacetil-5,6-dihidro) dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-[3-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[(4-metilpiperazin-1-il)acetil]]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 5 • 1,4,5-[4-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[(piperidin-1-il)acetil]]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-[3-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis(3'-dimetilamino propionil)]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 1,4,5-[3-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[3'-(piperidin-1-il)propionil]]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.
- 10 • 1,4,5-[3-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[3'-(pirrolidin-1-il)propionil]]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina.

12. Procedimiento de obtención del compuesto de fórmula general (I), que
15 comprende las siguientes etapas:

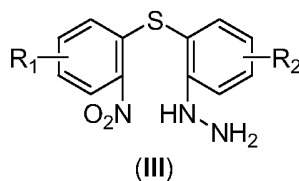
- a. nitrosación de un sulfuro diarílico de fórmula (II),



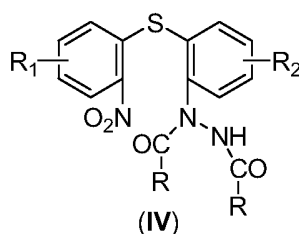
donde: R₁ y R₂ están descritos en la reivindicación 1;

20

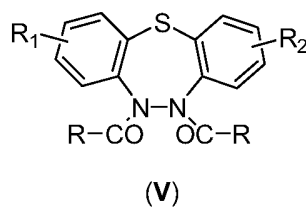
- b. reducción de la N-nitrosoamina obtenida en el paso (a),
obteniéndose la hidrazina (III);



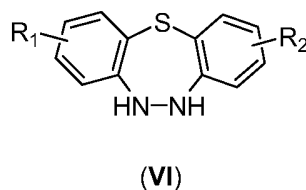
- c. acilación de la hidrazina (III) obtenida en el paso (b),
obteniéndose las *N,N'*-dihidrazidas (IV);



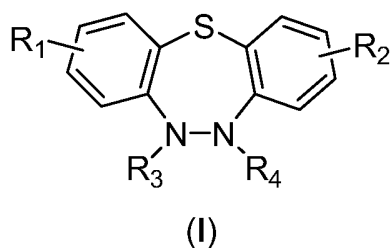
- 5 d. ciclación de la *N,N'*-hidrazida (IV) obtenida en el paso (c);



- e. hidrólisis de derivados de 1,4,5-dibenzo[*b,f*]tiadiazepina (V)
obtenido en el paso (d);



- 10 f. derivatización del heterociclo (VI) obtenido en paso (e),
llegándose a los compuestos de fórmula general (I):



- 15 13. Procedimiento según la reivindicación 12, donde la nitrosación del paso
(a) se lleva a cabo con nitrito alcalino en medio ácido.

14. Procedimiento según la reivindicación 12, donde la reducción del paso (b) se lleva a cabo mediante tratamiento con dicloruro de estaño o hidruro de litio y aluminio.
- 5 15. Procedimiento según la reivindicación 12, donde la acilación del paso (c) se lleva a cabo mediante un exceso de un agente acilante seleccionado de entre un cloruro o anhídrido de ácidos sencillos de cadena alquílica, lineal o ramificada (C₂-C₅) en presencia de una base seleccionada entre trietilamina o piridina, en un disolvente aprótico
10 seleccionado entre cloruro de metileno o piridina.
16. Procedimiento según la reivindicación 12, donde la ciclación del paso (d) se lleva a cabo mediante tratamiento con una base fuerte en un disolvente polar aprótico.
15
17. Procedimiento según la reivindicación 12, donde la hidrólisis de paso (e) se lleva a cabo mediante tratamiento con hidróxido potásico en etanol.
- 20 18. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
19. Composición según la reivindicación 18, que además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.
25
20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, que además comprende un agente terapéutico activo.
21. Uso del compuesto de fórmula general (I) para la elaboración de un
30 medicamento.

22. Uso del compuesto de fórmula general (I) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de trastornos o enfermedades en los que estén implicados procesos oxidativos.

5 23. Uso según la reivindicación 22, donde los trastornos o enfermedades pertenece al grupo de las enfermedades neurodegenerativas.

24. Uso según la reivindicación 23, donde la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de
10 Parkinson o enfermedad de Huntington.

15

20

25