

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
30 de mayo de 2014 (30.05.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/078971 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07D 285/135 (2006.01) A61P 29/02 (2006.01)
A61K 31/433 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CL2013/000085
- (22) Fecha de presentación internacional:
21 de noviembre de 2013 (21.11.2013)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
3253-2012
22 de noviembre de 2012 (22.11.2012) CL
- (71) Solicitante: UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
[CL/CL]; Barrio Universitario s/n, Edificio EMPREUDEC,
Concepción (CL).
- (72) Inventores: ZÁRRAGA OLAVARRIA, Miguel; Barrio
Universitario s/n, Edificio EMPREUDEC, Concepción
(CL). BRAUCHI ULLOA, Sebastián; Barrio
Universitario s/n, Edificio EMPREUDEC, Concepción
(CL). LESPAY REBOLLEDO, Carolyne; Barrio
Universitario s/n, Edificio EMPREUDEC, Concepción
(CL).
- (74) Mandatario: SEPÚLVEDA BARRERA, Ximena; Barrio
Universitario s/n, Edificio EMPREUDEC, Concepción
(CL).
- (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, BN,
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, IR, IS, JP, KE,
KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV,
SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))



WO 2014/078971 A1

(54) Title: TRPV-1 RECEPTOR ANTAGONIST COMPOUND DERIVED FROM 1,3,4-THIADIAZOLE ALKYLAMIDES AND CHALCONES

(54) Título : COMPUESTO ANTAGONISTA DEL RECEPTOR TRPV-1, DERIVADOS DE 1,3,4-TIADIAZOL ALQUILAMIDAS Y DE CHALCONAS

(57) Abstract: This technology comprises compounds derived from 1,3,4-thiadiazole alkylamides and chalcone, which inhibit the activation of the TRPV-1 receptor by means of capsaicin and temperature. Said compounds have a strong antagonist activity in the mode of activation of the TRPV-1 receptor by capsaicin and by temperature. The invention also relates to the use of said compounds in the treatment of diseases wherein the TRPV-1 receptor is overactivated, such as chronic pain.

(57) Resumen: Esta tecnología comprende compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas y de chalcona, los cuales inhiben la activación del receptor TRPV-1 por capsaicina y temperatura. Estos compuestos presentan una potente actividad antagonista para el modo de activación del receptor TRPV-1 por capsaicina y por temperatura. También se divulga el uso de estos compuestos en el tratamiento de enfermedades en las que el receptor TRPV-1 se encuentra sobreactivado, como por ejemplo el dolor crónico.

**COMPUESTO ANTAGONISTA DEL RECEPTOR TRPV-1,
DERIVADOS DE 1,3,4-TIADIAZOL ALQUILAMIDAS Y DE CHALCONAS.**

Sector técnico

- 5 La presente tecnología está orientada al sector farmacéutico, principalmente a la elaboración de fármacos antagonistas del receptor TRPV-1, para tratar enfermedades en las que él se encuentre sobreactivado, como por ejemplo el dolor crónico.

10 **Técnica anterior**

Un blanco para el desarrollo de drogas destinadas a combatir el dolor crónico inflamatorio, son los receptores de potencial transitorio vainilloide 1 o receptores TRPV-1, ya que estos están relacionados con la modulación de las señales nociceptivas debido a su expresión en fibras sensoriales C y A δ , principalmente (1, 2). Estos receptores se encuentran sobreactivados en estas
15 fibras sensoriales bajo condiciones patológicas y tienen un rol directo en el mantenimiento de la inflamación neurogénica (3, 4, 5, 6). Además representan un posible tratamiento para el dolor neuropático debido a la sobreexpresión de estos receptores en fibras no dañadas vecinas a las fibras dañadas.

20 Los receptores TRPV-1 son canales catiónicos no selectivos con permeabilidad a calcio conocidos como nociceptores polimodales debido a que pueden ser activados por varios ligandos tanto físicos y químicos desde el medio endógeno y exógeno. Los activadores directos de los receptores TRPV-1 conocidos hasta
25 ahora son endovainilloides (anandamida, ácido araquidónico o productos de la lipooxigenasa), pH ácido o básico, temperaturas dañinas (>42°C) y voltaje (8, 9), además de ligandos químicos exógenos como capsaicina. Sin embargo los receptores TRPV-1 pueden ser activados indirectamente o sensibilizados por cambios en el estado de fosforilación-defosforilación llevado a cabo por
30 quinasas, las cuales son activadas por vías secundarias resultado de la activación de receptores, tales como los receptores de bradiquinina, serotonina,

histamina, somatostatina, prostaglandina, interleukina o los receptores de tirosinasa, de esta forma la activación de estos receptores culmina con la activación de los receptores TRPV-1 (3).

Los receptores relacionados con la activación indirecta de los receptores TRPV-1 son activados por moléculas proinflamatorias liberados en el sitio de inflamación tisular presente en patologías asociadas con un mecanismo inflamatorio, tales como cáncer, osteoporosis, artritis, diabetes, síndrome de color irritable, cistitis y otras enfermedades (10, 11). Algunas de estas moléculas proinflamatorias, además pueden activar directamente los receptores TRPV-1, tales como anandamida, ácido araquidónico, N-araquidonoil dopamina, N-acildopamina, ácido 12-(S)-hidroxiperoxieicosatetraenoico, ácido 15-(S)-hidroxiperoxieicosatetraenoico y leucotrieno B4, los cuales han mostrado activar los receptores TRPV-1 con eficacia (12). Por lo tanto, los receptores TRPV-1 están involucrados directamente con la percepción y transducción del dolor.

La construcción de ratones knockout de TRPV-1 ha permitido confirmar la principal función de la activación del receptor en los procesos de nocicepción y su aplicación en el tratamiento de enfermedades con dolor crónico. Estos ratones carentes del receptor TRPV-1 presentan un comportamiento dañino de las respuestas fisiológicas a compuestos vainilloides, además los cultivos neuronales del ganglio de raíz dorsal (GRD) extraídos de los ratones knockout no responden a activadores comunes del receptor, tales como capsaicina, calor dañino y protones, además estos ratones se caracterizan por no desarrollar hiperalgesia térmica y alodinia mecánica, ambos síntomas recurrentes en pacientes con dolor crónico (13, 14, 15).

Además de la inhibición de los receptores TRPV-1 aplicada para el tratamiento de las sensaciones de dolor, la modulación de la activación de los receptores TRPV-1 puede ser usada para el tratamiento de patologías, tales como la incontinencia urinaria, sobreactividad de la vejiga, asma, tos crónica, hipertensión renal, neuroprotección isquémica, pancreatitis u obesidad debido a que la expresión de los receptores TRPV-1 abarca además células no

sensoriales, tales como queratinocitos, células β del páncreas, células dendríticas, entre otros fenotipos celulares (11), permitiendo ampliar la farmacología relacionada con estos receptores.

El primer ligando conocido para los receptores TRPV-1 fue capsaicina un compuesto pungente presente en el ají, capsaicina actúa como agonista de los receptores TRPV-1 y su potencial terapéutico está relacionado con la propiedad de sensibilizar las neuronas sensoriales del GRD y causar un efecto desensibilizador de estas neuronas después de la exposición de capsaicina. La respuesta exhibida por las neuronas del GRD se caracteriza por una desensibilización aguda o taquifilaxis, según el tiempo de exposición o dosis repetidas de capsaicina, respectivamente y ambos mecanismos de desensibilización son dependientes del calcio extracelular (16). De este modo el efecto producido por capsaicina altera la transducción de las señales nociceptivas y esta acción es la base del efecto analgésico mediado por ella en aplicaciones tópicas en pacientes con dolor crónico (17, 18).

Un grupo de compuestos naturales conocidos como vainilloides se caracterizan por presentar actividad agonista sobre los receptores TRPV-1, por ejemplo resineferatoxina, poligodial, isovaleral, escutigeral, neogrifolin, gingerol, eugenol, y derivados de piperina. Estos compuestos son análogos estructurales de capsaicina y su síntesis es de interés para el desarrollo de drogas debido a que capsaicina actúa específicamente en los receptores TRPV-1 y causa desensibilización específica en las fibras C y A δ del GRD (19, 20). La actividad agonista de los compuestos vainilloides puede ser modificada a través de halogenación en los carbonos 5 y 6 del grupo vainillilo, cambiando el efecto a una actividad antagonista, así los átomos de cloro y bromo en estas posiciones reducen la actividad agonista, mientras que el átomo de yodo ejerce una reversión completa de actividad, de este modo 5/6-yodononivamida y 5-yodoresineferatoxina se caracterizan por actuar como antagonistas completos del receptor TRPV-1 con mitad de concentración máxima inhibitoria (IC₅₀) de 10; 126,2 y 0,4 nM, respectivamente, de estos resineferatoxina un diterpeno dafnano aislado de *Euphorbia resinifera*, además es un agonista 10 veces más potente que capsaicina y su yodación no afecta esta potencia, sin

embargo su desarrollo farmacológico está limitado debido a la baja disponibilidad de este compuesto y alta toxicidad. El efecto antagonista ejercido por el átomo de yodo es también observado en otros análogos vainilloides yodados (21, 22, 23).

- 5 El desarrollo de compuestos con actividad antagonista en receptores TRPV-1 referente tanto a análogos de capsaicina y otras clases estructurales de antagonistas con actividad específica es un área de investigación farmacéutica emergente tanto para el tratamiento del dolor crónico y otras enfermedades, en las cuales la actividad de los receptores esta aumentada. Esto debido
10 principalmente a que la aplicación terapéutica basada en agonistas presenta desventajas como neurotoxicidad asociada al incremento del calcio intracelular, además capsaicina si bien es eficaz en pacientes con dolor crónico su aplicación tópica en humanos induce dolor inicial, eritema e hiperalgesia y debe ser aplicada repetidamente para alcanzar el efecto analgésico debido a las
15 bajas concentraciones de capsaicina presente en las formulaciones con el fin de reducir sus efectos secundarios, esto además de evitar su uso prolongado induce el abandono de las terapias tópicas basadas en capsaicina por los pacientes. Por otra parte la pungencia y los efectos laterales sistémicos mostrado por análogos vainilloides impide el desarrollo de compuestos
20 agonistas con biodisponibilidad oral, además de la relación existente entre mayor potencia agonista y la presencia del grupo hidroxilo (3, 18).

Los principales compuestos antagonistas competitivos desarrollados hasta la fecha se caracterizan por actuar en el sitio ortostérico del receptor TRPV-1 localizado entre el tercer y cuarto segmento transmembrana, en el cual los
25 residuos de treonina 550 y tirosina 510 son determinantes tanto en la sensibilidad del receptor a compuestos agonistas y antagonistas (25-28). Este sitio de unión identifica dos requerimientos importantes para el reconocimiento del receptor correspondientes a la lipofilicidad para alcanzar el sitio de unión y el establecimiento de enlaces hidrógeno para interactuar con los residuos
30 identificados, estas características son consistentes con las modificaciones químicas realizadas en compuestos con actividad en el receptor TRPV-1, las cuales identifican tres regiones farmacofóricas importantes para la actividad

correspondientes a una región donante-aceptora de enlaces hidrógeno, una región con alta polaridad y una región hidrofóbica, estas tres regiones se encuentran separadas por grupos espaciadores, los cuales regulan la conformación de los ligandos y por tanto su actividad agonista y antagonista sobre el receptor. De este modo los compuestos agonistas, adquieren una conformación doblada, entre la región donante-aceptora de enlaces hidrógeno y la región hidrofóbica, en la cual el grupo amida de capsaicina, por ejemplo adquiere una orientación trans- y la cadena alifática una conformación extendida (29). Mientras que los compuestos antagonistas adoptan una conformación coplanar entre la región hidrofóbica y la región donante-aceptora de enlaces hidrógeno (30).

Basado en estos criterios estructurales y conformacionales los compuestos antagonistas con mayor potencia, tales como derivados de cinamidas, pirimidinas, quinazolininas entre varios otros (31-37), se caracterizan por mantener estas características y además por presentar alta restricción conformacional impuesta entre la región polar e hidrofóbica, lo cual favorece el rearreglo coplanar entre la región hidrofóbica y la región donante-aceptora de enlaces hidrógeno, mejorando la potencia antagonista. De esta manera, el compuesto N-(4-tert-butilfenil)-4-(3-cloropiridin-2-il)piperazina-1-carboxamida conocido como BCTC se caracteriza por ser un derivado de urea restringido conformacionalmente con potente actividad antagonista del receptor TRPV-1 con mitad de concentración máxima inhibitoria (IC_{50}) de 2-6nM, según el tipo de especie (rata, ratón o humano) del receptor TRPV-1, sin embargo aunque muestra eficacia en modelos animales de dolor crónico presenta pobre estabilidad metabólica, corta vida media, pobre solubilidad acuosa y moderada biodisponibilidad oral (31, 32, 33). Del mismo modo el derivado de cinamida (E)-3-(4-tert butilfenil)-N-(2, 3-dihidrobenczo (b)-1, 4-dioxin-6-il) acrilamida presenta actividad antagonista con IC_{50} 79nm, el reemplazo del doble enlace en este compuesto por un grupo 4-aminopiridina permitió obtener un derivado con actividad antagonista aumentada mostrando un IC_{50} de 2nM (34). De forma similar, la síntesis de derivados de oxazoles fue desarrollada a partir de derivados de ureas como ABT-102, el reemplazo isostérico del grupo urea dio

como resultado compuestos con potente actividad antagonistas y la obtención de compuestos con propiedades farmacocinéticas mejoradas y buena penetración en el SNC (41). Así grupos isostéricos, tales como imidazol, tiazolpirimidina, piridopirimidinas, piridopirazinas o tiazol carboxamidas han permitido la obtención de una amplia diversidad de antagonistas competitivos restringidos conformacionalmente con potente actividad sobre receptores TRPV-1 (31-44).

Además de antagonistas competitivos se han caracterizado antagonistas no competitivos para el receptor TRPV-1, tales como rojo de rutenio con actividad antagonista IC_{50} : 0.17 μ M y Lantano el cual exhibe actividad a una concentración mayor o igual a 100 μ M, los cuales actúan como bloqueadores del canal iónico uniéndose a un sitio compuesto por residuos cargados negativamente, así también se han desarrollado hexapéptidos ricos en arginina, sin embargo estos compuestos junto con rojo de rutenio y lantano carecen de selectividad para el receptor, lo cual resulta en efectos laterales y toxicidad impidiendo su desarrollo farmacológico (45, 46).

Referencias

- 1.- Michael J. Caterina, Mark A. Schumacher, Makoto Tominaga, Tobias A. Rosen, Jon D. Levine and David Julius. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **1997**, 389, 816-824.
- 2.- Kendall Mitchell, Brian D Bates, Jason M Keller, Matthew Lopez, Lindsey Scholl, Julia Navarro, Nicholas Madian, Gal Haspel, Michael I Nemenov and Michael Jladarola. Ablation of rat TRPV1-expressing Adelta/C-fibers with resiniferatoxin: analysis of withdrawal behaviors, recovery of function and molecular correlates. *Molecular Pain*, **2010**, 6, 1-13.
- 3.- Marcello Trevisani, and Arpad Szallasi. Targeting TRPV1: Challenges and Issues in Pain Management. *The Open Drug Discovery Journal*, **2010**, 2, 37-49.
- 4.- Andrés Jara-Oseguera, Sidney A. Simon, and Tamara Rosenbaum. TRPV 1: on the road to pain relief. *Curr Mol Pharmacol*. **2008**, 1, 255-269.
- 5.- Louise A. Roberts and Mark Connor. TRPV1 Antagonists as a Potential Treatment for Hyperalgesia. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, **2006**, 1, 65-76.
- 6.- Gilbert Y. Wonga, Narender R. Gavva. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Research Reviews*, **2009**, 60, 267-277.

- 7.-Enza Palazzo, Livio Luongo, Vito de Novellis, Liberato Berrino, Francesco Rossi and Sabatino Maione. Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. *Molecular Pain*. **2010**, 6, 1-11
- 8.-Ramon Latorre, Cristián Zaelzer and Sebastian Brauchi. Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **2009**, 42, 201–246.
- 9.- Andrés Jara-Oseguera, Andrés Nieto-Posadas, Arpad Szallasi, León D. Islas and Tamara Rosenbaum. Molecular Mechanisms of TRPV1 Channel Activation. *The Open Pain Journal*, **2010**, 3, 68-81
- 10.- Bernd Nilius, Grzegorz Owsianik, Thomas Voets, and John a. Peters. Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. *Physiology Review*, **2007**, 87, 165-217.
- 11.- Khadija Alawi and Julie Keeble. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, **2010**, 125, 181 –195.
- 12.- Mario van der Stelt and Vincenzo Di Marzo. Endovanilloids Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271,1827–1834.
- 13.- M. J. Caterina, A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, et ál. Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science*. **2000**, 288, 306-313
- 14.- Lu Yu¹, Fei Yang¹, Hao Luo¹, Feng-Yu Liu¹, Ji-Sheng Han^{1,2,3}, Guo-Gang Xing^{*1,2} and You Wan. The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant. *Molecular Pain*, **2008**, 4, 1-10.
- 15.- Jurgen Sandkuhler. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. *Physiology Review*. **2009**, 89, 707-758.
- 16.- Patricia A. Koplas, Robert L. Rosenberg, and Gerry S. Oxford. The Role of Calcium in the Desensitization of Capsaicin Responses in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *The Journal of Neuroscience*, **1997**, 173, 525–3537.
- 17.-Gilbert Y. Wonga,¹ Narender R. Gavva. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Research Reviews*, **2009**, 60, 267-277
- 18.-Lorna Mason, R. Andrew Moore, Sheena Derry, Jayne E. Edwards, Henry J. McQuay. Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. *BMJ*, **2004**, 328, 991-994.
- 19.- Rosa Planells-Cases, Carolina Garcia-Martínez¹, Miriam Royo, Enrique Pérez-Payá, Cristina Carreño, Fernando Albericio, Angel Messeguer, and Antonio Ferrer-Montiel. Small molecules targeting the vanilloid receptor complex as drugs for inflammatory pain. *Drugs of the Future*, **2003**, 28, 1-28.
- 20.-Holzer, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews*, **1991**, 43, 143-201.
- 21.- Dong Wook Kang , Yong Soo Kim , Kwang Su Lim , Myeong Seop Kim , Larry V. Pearce, et ál. Halogenation of 4-hydroxy/amino-3-methoxyphenyl acetamide TRPV1 agonists showed enhanced antagonism to capsaicin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2010**, 18, 8092–8105.
- 22.- Kwang Su Lim, Dong Wook Kang , Yong Soo Kim , Myeong Seop Kim , Seul-Gi Park , Sun Choi, Larry V. Pearce , Peter M. Blumberg , Jeewoo Lee. Receptor activity and conformational analysis of 5-halogenatedresiniferatoxin analogs as TRPV1 ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2011**, 21, 299–302.

- 23.- Giovanni Appendino, Nives Daddario, Alberto Minassi, Aniello, Schiano Moriello, Luciano De Petrocellis, and Vincenzo Di Marzo. The Taming of Capsaicin. Reversal of the Vanilloid Activity of N-Acylvanillamines by Aromatic Iodination. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2005**, *48*, 4663-4669.
- 24.- Derek S. Reubish, Daniel E. Emerling, Jeff DeFalco, Daniel Steiger, Cheryl L. Victoria, and Fabien Vincent. Functional assessment of temperature-gated ion-channel activity using a real-time PCR machine. *Short Technical Reports*, **2009**, *47*, 3-9.
- 25.- Sven-Eric Jordt and David Julius. Molecular Basis for Species-Specific Sensitivity to "Hot" Chili Peppers. *Cell*, **2002**, *108*, 421-430.
- 26.- Narender R. Gavva, Lana Klionsky, Yusheng Qu, Licheng Shi, Rami Tamir, Steve Edenson, T. J. Zhang, Vellarkad N. Viswanadhan, Attila Toth, Larry V. Pearce, Todd W. Vanderah, Frank Porreca, Peter M. Blumberg, Jack Lile, Yax Sun, Ken Wild, Jean-Claude Louis, and James J. S. Treanor. Molecular Determinants of Vanilloid Sensitivity in TRPV1. *The journal of biological chemistry*, **2004**, *279*, 20283-20295.
- 27.- Margaret Z. Chou, Tecla Mtui, Ying-Duo Gao, Martin Kohler and Richard E. Middleton. Resiniferatoxin Binds to the Capsaicin Receptor (TRPV1) near the Extracellular Side of the S4 Transmembrane Domain. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 2501-2511.
- 28.- Jin Hee Lee, Yoonji Lee, HyungChul Ryu, Dong Wook Kang, Jeewoo Lee, Jozsef Lazar, Larry V. Pearce, Vladimir A. Pavlyukovets, Peter M. Blumberg, Sun Choi. Structural insights into transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) from homology modeling, flexible docking and mutational studies. *J Comput Aided Mol Des*. **2011**, *25*, 317-327.
- 29.- Margit Winkler, Thomas Moraux, Hesham A. Khairy, et al. Synthesis and Vanilloid Receptor (TRPV-1) Activity of the Enantiomers of a-Fluorinated Capsaicin. *ChemBioChem*, **10**, **2009**, 823-828.
- 30.- Brian S. Brown, Ryan Keddy, Guo Zhu Zheng, Robert G. Schmidt, et al. Tetrahydropyridine-4-carboxamides as novel, potent transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**, **2008**, 8516-8525.
- 31.- Craig C. Corrella, P. Tara Phelps, John C. Anthesa, Shelby Umlandb, Scott Greenfeder. Cloning and pharmacological characterization of mouse TRPV1. *Neuroscience Letters* **370**, **2004**, 55-60.
- 32.- Qun Sun, Laykea Tafesse, Khondaker Islam. 4-(2-Pyridyl)piperazine-1-carboxamides: Potent Vanilloid Receptor 1 Antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **13**, **2003**, 3611-3616.
- 33.- Vassil I. Ognyanov, Chenera Balan, Anthony W. Bannon. Design of Potent, Orally Available Antagonists of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1. Structure-Activity Relationships of 2-Piperazin-1-yl-1H-benzimidazoles. *Journal Medicinal Chemistry*, **2006**, *49*, 3719-3742.
- 34.- Mark H. Norman, Jiawang Zhu, Christopher Fotsch, Yunxin Bo, Ning Chen, Partha Chakrabarti, Elizabeth M. Doherty et al. Novel vanilloid receptor-1 antagonists: 1. Conformationally restricted analogues of trans-cinnamides. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2007**, *50*, 3497-3514.
- 35.- Elizabeth M. Doherty, Christopher Fotsch, Yunxin Bo, Partha P. et al. Discovery of Potent, Orally Available Vanilloid Receptor-1 Antagonists. Structure-Activity Relationship of N-Aryl Cinnamides. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, *48*, 71-90.
- 36.- Nuria Tamayo, Hongyu Liao, Markian M. Stec, Xianghong Wang, et al. Design and Synthesis of Peripherally Restricted Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV 1) Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, *51*, 2744-2757.

- 37.- Michele C. Jetter, James J. McNally, Mark A. Youngman, Mark E. McDonnell, et ál. N -Pyridin-3-yl- and N -quinolin-3-yl-benzamides: Modulators of Human Vanilloid Receptor 1 (TRPV1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18, 2730–2734.
- 38.- Bin Shao, Jincheng Huang, Qun Sun, Kenneth J. Valenzano, Lori Schmid and Scott Nolan. 4-(2-Pyridyl) piperazine-1-benzimidazoles as potent TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2005**, 15, 719–723.
- 39.- Irene Drizin, Arthur Gomtsyan, Erol K. Bayburt, Robert G. Schmidt, Guo Zhu Zheng, et ál. Structure–activity studies of a novel series of 5, 6-fused heteroaromatic ureas as TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, 14, 4740–4749.
- 40.- Ronald Palin, Lynn Abernethy, Nasrin Ansari, Kenneth Cameron, Tom Clarkson, Maureen Dempster, et ál. Structure–activity studies of a novel series of isoxazole-3-carboxamide derivatives as TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 21, 892–898.
- 41.- Richard J. Perner, John R. Koenig, Stanley DiDomenico, Arthur Gomtsyan, et ál. Synthesis and biological evaluation of 5-substituted and 4, 5-disubstituted-2-aryl amino oxazole TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, 18, 4821–4829.
- 42.- Ning Xi, Yunxin Bo, Elizabeth M. Doherty, Christopher Fotsch, et ál. Synthesis and evaluation of thiazole carboxamides as vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2005**, 15, 5211–5217.
- 43.- Kevin J. Hodgetts, Charles A. Blum, Timothy Caldwell, Rajagopal Bakthavatchalam, Xiaozhang Zheng, et al. Pyrido[2,3-b]pyrazines, discovery of TRPV1 antagonists with reduced potential for the formation of reactive metabolites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, 20, 4359–4363.
- 44.- Natalie A. Hawryluk, Jeffrey E. Merit, Alec D. Lebsack, Bryan J. Branstetter, Michael D. Hack, et ál. Discovery and synthesis of 6, 7, 8, 9-tetrahydro-5H-pyrimido-[4,5-d]azepines as novel TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, 20, 7137–7141.
- 45.- Angel Messeguer, Rosa Planells-Cases and Antonio Ferrer-Montiel. Physiology and Pharmacology of the Vanilloid Receptor. *Current Neuropharmacology*. **2006**, 4, 1-15.
- 46.- Joris Vriens, Giovanni Appendino and Bernd Nilius. Pharmacology of Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels. *Molecular Pharmacology* 75, **2009**, 1262-1279.
- 47.- Christopher S. J. Walpole, Stuart Bevan, Graham Bloomfield, Robin Breckenridge, Ian F. James, Timothy Ritchie, Arpad Szallazi, Janet Winter and Roger Wrigglesworth. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 2. The amide bond "B-region". *Journal of Medicinal Chemistry*, **1993**, 36, 2373-2380.
- 48.- Jeewoo Lee, Mi-Kyoung Jin, Sang-Uk Kang and et ál. Analysis of structure–activity relationships for the 'A-region' of N-(4-t-butylbenzyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as TRPV1 antagonists. *Journal Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2005**, 15, 4136-4142.
- 49.- Young-Ger Suh, Yong-Sil Lee, Kyung-Hoon Min, Ok-Hui Park, Jin-Kwan Kim, Ho-Sun Seung, Seung-Yong Seo, Bo-Young Lee, Yeon-Hee Nam and et Al, Novel Potent Antagonists of Transient Receptor Potential Channel, Vanilloid Subfamily Member 1: Structure–Activity Relationship of 1,3-Diarylalkyl Thioureas Possessing New Vanilloid Equivalents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, 48, 18, 5823-5836.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1, derivados vainilloides de 1, 3, 4 tiadiazol alquilamidas.

Figura 2 y Figura 3, derivados de chalconas o derivados carbonilo alfa, beta insaturados.

5 **Figura 4**, ruta de síntesis utilizada para la yodación del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído o vainillina.

Figura 5, ruta de síntesis utilizada para la obtención de los derivados de 1, 3, 4-tiadiazol-2-amino.

10 **Figura 6**, ruta de síntesis utilizada para la obtención de los derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas.

Figura 7, ruta de síntesis utilizada para la obtención de los derivados de chalconas o derivados carbonilo alfa, beta insaturados.

15 **Figura 8**, espectro de Resonancia magnética Nuclear de ^1H (DMSO, 400 MHz) obtenido para el compuesto N-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-nonamida [b]

Figura 9, espectro de Resonancia magnética Nuclear de ^{13}C (DMSO, 100 MHz) obtenido para el compuesto N-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il]-nonamida [b].

20 **Figura 10**, espectro de Resonancia Magnética ^1H (DMSO, 400 MHz) obtenido para el compuesto N-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-heptanamida [e].

Figura 11, espectro de Resonancia magnética Nuclear de ^{13}C (DMSO, 100 MHz) obtenido para el compuesto N-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il]-heptanamida [e].

25 **Figura 12**, espectro de Resonancia Magnética ^1H (DMSO, 400 MHz) obtenido para el compuesto (2E)-1-(4-bromodifenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona [l].

30 **Figura 13**, espectro de Resonancia magnética Nuclear de ^{13}C (DMSO, 100 MHz) obtenido para el compuesto (2E)-1-(4-bromodifenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona [l].

- Figura 14**, gráfico del ensayo de activación del receptor TRPV-1 por Capsaicina para los derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas evaluados a una concentración 1 μ M.
- 5 **Figura 15**, gráfico del ensayo de activación del receptor TRPV-1 por Capsaicina para los derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamida (representación sin capsaicina).
- Figura 16**, gráfico del ensayo de activación del receptor TRPV-1 por Capsaicina para los derivados de chalconas.
- 10 **Figura 17**, gráfico del ensayo de activación del receptor TRPV-1 por Capsaicina para los derivados de chalconas (representación sin capsaicina).
- Figura 18**, Respuesta del receptor TRPV-1 de rata a los incrementos de temperatura.
- Figura 19**, gráfico del ensayo de activación del receptor TRPV-1 por temperatura para los derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas.
- 15 **Figura 20**, gráfico del ensayo de activación del receptor TRPV-1 por temperatura para los derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas, (representación sin capsaicina).
- Figura 21**, gráfico del ensayo de activación del receptor TRPV-1 por temperatura para los derivados de chalconas.
- 20 **Figura 22**, gráfico del ensayo de activación del receptor TRPV-1 por temperatura para los derivados de chalconas (representación sin capsaicina).
- Figura 23**, curvas dosis respuesta para los derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamida en células HEK-293T que sobreexpresan el receptor TRPV-1.
- 25 **Figura 24**, curvas dosis respuesta para los derivados de chalconas en células HEK-293T que sobreexpresan el receptor TRPV-1.

DIVULGACION DE LA INVENCION

En esta invención se describen compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol
alquilamidas y derivados de chalconas con capacidad de inhibir la activación
5 del receptor TRPV-1 por capsaicina y temperatura.

El primer aspecto de la invención se relaciona con los derivados vainilloides de
1, 3, 4 tiadiazol alquilamidas descritos en la **Figura 1**.

Donde R, corresponde a una cadena alquílica saturada definida por cadenas
lineales saturadas de 6 a 8 carbonos y X es definido como un átomo de H o un
10 átomo de yodo.

El método de síntesis aplicado para la síntesis de estos derivados se inicia con
la protección del grupo 4-hidroxilo por acilación con anhídrido acético del
material de partida correspondiente a 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído o
vainillina. Los derivados yodados en el carbono 5 del grupo vainillilo son
15 obtenidos mediante una reacción de yodación con yoduro de potasio e
hipoclorito de sodio comercial mostrado en la **Figura 4**, posteriormente el grupo
hidroxilo de este producto correspondiente a 4-hidroxi-3-yodo-5-
metoxibenzaldehído o 5-yodovainillina fue protegido con anhídrido acético. El
heterociclo 1, 3, 4-tiadiazol fue obtenido utilizando el método de ciclación
20 oxidativa de tiosemicarbazonas, mostrado en la **Figura 5**, por lo cual el
aldehído de los respectivos compuestos de vainillina y 5- yodovainillina
protegidos fueron condensados con tiosemicarbazida para obtener los
derivados de tiosemicarbazonas, los cuales mediante ciclación oxidativa con
cloruro férrico en medio acuoso se obtuvieron los derivados de 1, 3, 4-
25 tiadiazol-2 amino con el grupo hidroxilo desprotegido en la misma etapa de
reacción. Posteriormente estos productos de 1, 3, 4-tiadiazol -2-amino fueron
acilados, según la ruta mostrada en la **Figura 6** con derivados de cloruros de
acilo correspondiente a cloruro de ácidos con cadenas hidrocarbonadas
lineales de 6-9 carbonos, esta reacción de acilación dio como resultado
30 productos acilados tanto en los grupos hidroxilo y amino, por lo tanto la última
etapa de síntesis consistió en la hidrólisis básica del éster formado para

obtener los respectivos compuestos descritos en la **Figura 1** con el grupo hidroxilo libre, obteniendo de este modo los siguientes compuestos:

- [a] N-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-nonamida,
- [b] N-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-nonamida,
- 5 [c] N-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-octanamida,
- [d] N-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-octanamida,
- [e] N-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-heptanamida,
- [f] N-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-heptanamida,
- [g] N-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-hexanamida, y
- 10 [h] N-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-hexanamida.

El segundo aspecto de esta invención se relaciona con derivados de chalconas o derivados carbonilo alfa, beta insaturados descritos en las **Figura 2 y 3**,

- 15 Donde los distintos R corresponden a diferentes grupos sustituyentes:

R1 corresponde a un hidrógeno, un grupo metoxilo o un grupo hidroxilo;

R2 es un hidrógeno o un grupo metoxilo;

R3 es un hidrógeno o un grupo cloro;

R4 es un hidrógeno o un grupo bromo; y

- 20 R5 es un hidrógeno, un grupo metoxilo o un grupo hidroxilo.

- El método de síntesis para los compuestos descritos en las **Figura 2 y 3** consistió en la aplicación de la condensación de Claisen-Schmidt entre diferentes benzaldehídos y acetofenonas. Las reacciones de condensación se
- 25 llevaron a cabo tanto en condiciones catalíticas básicas y ácidas a temperatura ambiente y condiciones de reflujo, respectivamente como es mostrado en la **Figura 7**. La combinación de estos distintos sustituyentes da lugar a los siguientes compuestos con nombre:

- [i] (2E)-1-(4-bromodifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona,
[j] (2E)-1-(4-bromodifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona,
[k] (2E)-1-(4-bromodifenil)-3-(4-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona,
[l] (2E)-1-(4-bromodifenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona,
5 [m] (1E, 4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona,
[n] (1E, 4E)-1,5-(4-hidroxidifenil)penta-1,4-dien-3-ona,
[o] (1E, 4E)-1,5-(4-metoxidifenil)penta-1,4-dien-3-ona,
[p] (2E)-2cloro-3-(4-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona,
[q] (2E)-2 cloro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona.

10

Estos compuestos se presentan como una alternativa al tratamiento de enfermedades involucradas con la sobreactivación de los receptores TRPV-1. Los ensayos in vitro realizados en cultivos de células HEK-293T sobreexpresadas con el receptor TRPV-1 de rata, basados en mediciones fluorométricas del influjo de calcio inducido, tras la activación del receptor TRPV-1 por capsaicina, indicaron que los compuestos [a-h] y [i-q] inhiben el influjo de calcio observado por una disminución en la fluorescencia celular, exhibiendo una potente actividad antagonista para el modo de activación del receptor TRPV-1 por capsaicina (**Figuras 14-17**). Además, estos compuestos [a-h] y [i-q], exhiben actividad antagonista sobre el modo de activación del receptor TRPV-1 por temperatura (**Figuras 19-21**) la actividad es representada como el promedio de fluorescencia relativa para dos ensayos independientes obtenida a 54°C, temperatura a la cual el receptor TRPV-1 presenta su máxima activación.

25

Desde de las respectivas curvas dosis-respuesta para los compuestos con actividad antagonista presentadas en las **Figuras 22 y 23**, se determinó la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC₅₀) presentadas en las **Tablas 7 y 8**, estos valores indican una actividad antagonista en el orden nanomolar, con rangos de IC₅₀ entre 0.4-1.2 nM, lo que revela que estos compuestos son potentes antagonistas del receptor TRPV-1, la cual es superior a la actividad mostrada por muchos antagonistas competitivos y por antagonistas derivados de compuestos vainilloides, lo cual está asociado a un modo distinto de unión

30

en el sitio ortostérico del receptor TRPV-1 y el establecimiento de interacciones hidrofóbicas en un sitio de unión no descrito y que contribuye en el aumento de actividad antagonista, basado en el análisis estructura-actividad y aspectos conformacionales de los compuestos sintetizados relacionados con la planaridad y restricción conformacional impuesta por el heterociclo 1, 3, 4-tiadiazol y el sistema carbonílico alfa, beta insaturado, presente en los compuestos [a-h] y [i-q], respectivamente.

Los compuestos descritos aquí, se caracterizan principalmente por exhibir actividad antagonista en receptores TRPV-1 con alta restricción conformacional, lo cual contribuye al incremento de la energía de unión ligando-receptor e influye en la mayor actividad antagonista y además por adquirir entre las regiones farmacofóricas una conformación diferente a la asociada con la actividad antagonista descrita hasta ahora. De este modo en los derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas, la restricción conformacional es regulada a través del reemplazo isostérico del grupo amida presente en análogos de capsaicina por el heterociclo 1, 3, 4-tiadiazol, lo cual permite que los compuestos sintetizados adquieran una conformación coplanar entre la región donante-aceptora de enlaces hidrógeno conformada por el grupo vainillilo y la región polar conformada por el grupo 1, 3, 4-tiadiazol, mientras que la incorporación de un grupo amida como espaciador permite una conformación doblada entre la región donante-aceptora de enlaces hidrógeno (grupo vainillilo) y la región hidrofóbica conformada por las cadenas alifáticas lineales. Esto permite la obtención tanto de análogos vainilloides yodados y no yodados con potente actividad antagonista, siendo el efecto de estos últimos contrario al efecto mostrado por compuestos vainilloides con grupo vainillilo no yodado, los cuales comúnmente presentan actividad agonista, con excepción de capsazepina, el cual es un derivado vainilloide no yodado y primer antagonista competitivo de capsaicina identificado, sin embargo presenta baja potencia (IC_{50} : 56.2 nM), inestabilidad metabólica y baja selectividad para el receptor TRPV-1 (23,45). A diferencia de los derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas, los cuales presentan alta restricción conformacional, favoreciendo su selectividad en receptores TRPV-1. De esta manera la restricción

conformacional impuesta por el heterociclo 1, 3, 4-tiadiazol y el grupo amida permiten estabilizar el estado conformacional del receptor TRPV-1 responsable de su inactivación, explicando el antagonismo exhibido tanto por derivados no yodados y yodados en el grupo vainillilo y que se asocian a un modo de unión distinto al adoptado por compuestos vainilloides antagonistas en el sitio de unión ortostérico del receptor.

En los derivados de chalconas o derivados carbonilo alfa, beta insaturados, la restricción conformacional es regulada a través del doble enlace insaturado y la eliminación de los grupos espaciadores comúnmente presentes en compuestos con actividad en receptores TRPV-1, tales como grupos amino, oxo o metileno y los cuales han mostrado influir en la actividad agonista y antagonista, así se ha mostrado que en agonistas análogos de capsaicina, la sustitución del grupo metileno entre el grupo vainillilo (región donante-aceptora de enlaces hidrógeno) y amida (región polar) por un grupo etileno o un grupo carbonilo reduce notablemente la actividad agonista de los compuestos (47) , mientras que la ausencia de esta región espaciadora en análogos de capsaicina y análogos de tiourea elimina la actividad tanto agonista y antagonista, respectivamente (47,48,49). De esta manera los cambios estructurales obtenidos a través de la síntesis de derivados de chalconas permitieron la obtención de potentes antagonistas del receptor TRPV-1 con actividad nanomolar, lo cual además de estar asociado con la mayor restricción conformacional se relaciona con la conformación anticoplanar entre la región donante-aceptora de enlaces hidrógeno y la región hidrofóbica conformadas por los grupos arilos. Además de la obtención de moléculas de bajo peso molecular, lo cual facilita el desarrollo farmacológico de antagonistas del receptor TRPV-1 para ser administrados por vía oral, para aumentar su biodisponibilidad.

EJEMPLOS DE APLICACIÓN

EJEMPLO N°1: Síntesis de los compuestos

5 Procedimientos generales.

Las reacciones de síntesis para cada uno de los compuestos propuestos se llevaron a cabo en solventes sin tratamiento previo, excepto para la reacciones de acilación, en la cual el catalizador piridina, utilizado estuvo previamente secado con KOH sólido. El transcurso de las reacciones fueron evaluadas mediante cromatografía en capa fina en placas de sílice gel, utilizando como fase móvil 60% acetato de etilo/bencina. Las placas fueron reveladas mediante luz ultravioleta y soluciones de vainillina/ácido sulfúrico /metanol, 30% ácido sulfúrico/metanol y reactivo de Folin. Los productos fueron purificados mediante cristalización o cromatografía en columna y los respectivos análisis de caracterización espectroscópica fueron realizados en un espectrómetro infrarrojo y un espectrómetro de resonancia magnética nuclear para los análisis de RMN-¹H y RMN-¹³C.

Se presentan los 7 primeros compuestos que corresponde a los intermediarios de reacción descritos en las **Figura 4 y 5**.

Acetato de 4-formil-2-metoxifenilo (1).

En un matraz Erlenmeyer de 100ml se adicionan 10 gr (0,066 moles) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído y 40 ml de anhídrido acético, bajo agitación se adicionan 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla de reacción se deja bajo agitación a temperatura ambiente por 4 horas y posteriormente se adicionan al medio de reacción 40 ml de agua destilada, el sólido formado es filtrado y cristalizado en metanol, obteniendo 9,13 gr (0,047 moles) de cristales color rosado-naranja claro en un rendimiento de 71,27%.

30

Acetato de 4-(carbamotioilhidrazinilideno) metil-2-metoxifenilo (2).

En un balón fondo redondo de 250 ml, se agregan 8 g (0,041 moles) de acetato de 4-formil-2-metoxifenilo y 3,73 g (0,041 moles) de tiosemicarbazida en 50 ml de metanol, el medio de reacción se acidifica con ácido acético glacial hasta
5 obtener un pH 4-5 y la mezcla de reacción se refluxe por 6 horas bajo agitación. Posteriormente se deja enfriar en un baño de agua-hielo, formándose un precipitado color amarillo-blanco, el cual es filtrado y cristalizado en metanol, obteniendo 9,37 g (0,036 moles) de los cristales en un rendimiento de 89,2%.

10

2-amino-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)- 1, 3, 4 tiadiazol (3).

En un balón fondo redondo de 250 ml se agregan 5g (0,0195 moles) de tiosemicarbazona, 20 ml (9,48 g; 0,059 moles) de una solución acuosa de cloruro férrico y 30 ml de metanol. La mezcla de reacción se refluxe bajo
15 agitación por el periodo de 1-2 horas. Posteriormente la mezcla de reacción en caliente es filtrada sobre carbón activado y posteriormente se adicionan al filtrado 30 ml de una solución acuosa de ácido cítrico (11,52 g; 0,06 moles) y citrato de sodio (6,42 g; 0,03 moles) y se refluxe por 1 hora bajo agitación. La mezcla de reacción es neutralizada con 10% de amoníaco a pH 4-5 y luego se
20 deja enfriar en un baño de agua hielo, formándose un precipitado amarillo, el cual es cristalizado varias veces en una mezcla de etanol/metanol, obteniendo 2,61 g (0,0116 moles) del producto como un polvo color amarillo en un rendimiento de 60%.

4-hidroxi-5-metoxi-3-yodobenzaldehído (4).

En un matraz Erlenmeyer se disuelven 10g (0,065 moles) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído y 9,73 g (0,065 moles) de KI en 20 ml de metanol. La solución se enfría en un baño de agua-hielo por 15 minutos. A través de un embudo de adición y bajo agitación en un baño de agua-hielo, se agrega a la
30 mezcla de reacción, gota-gota 74 ml de NaOCl (0,065 moles) comercial (4,7% v/v). Terminado de agregar todo el NaOCl, la reacción se agita por 60 minutos adicionales en el baño agua-hielo. Posteriormente se adicionan 20 ml de una

solución de tiosulfato de sodio 10% (%p/p) y se agita por 15 minutos a temperatura ambiente, luego se acidifica la mezcla de reacción con HCl 37% hasta pH 3-4 y el precipitado formado se filtra y se lava con agua enfriada en hielo. El sólido se deja secar y se cristaliza en alcohol isopropílico, obteniendo
5 13,54g (0,048 moles) del producto como cristales color amarillo claro, en un rendimiento de 75,22%.

Acetato de 4-formil-6-metoxi-2-yodofenilo (5).

En un matraz Erlenmeyer, se colocan 4g (0,0144 moles) de 4-hidroxi- 5-metoxi-
10 3-yodo benzaldehído y 20 ml de anhídrido acético. En agitación son agregados 3 gotas de H₂SO₄ (c). La mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente por 6 horas, luego se agregan 30 ml de agua destilada formando un precipitado, el cual es filtrado y lavado varias veces con agua destilada. Posteriormente el sólido es cristalizado en metanol, obteniendo
15 g (0,0142 moles) del producto como cristales color café claro en un 99,13% de rendimiento.

Acetato de 4-(carbamoilhidrazinilideno) metil-6-metoxi-2-yodofenilo (6).

En un matraz fondo redondo, se agregan 4g (0,012 moles) de acetato de 4-
20 formil-6-metoxi-2-yodofenilo, 1,09g (0,012 moles) de tiosemicarbazida en 50 ml de metanol, el medio de reacción se acidifica con ácido acético glacial hasta obtener un pH 4-5 y la mezcla de reacción se refluxe por 6 horas bajo agitación. Posteriormente se deja enfriar en un baño de agua-hielo, formándose un precipitado color amarillo-blanco, el cual es filtrado y cristalizado en
25 metanol, obteniendo 4,03 g (0,01moles) de cristales color amarillo-blanco en un rendimiento de 85,38%.

2-amino-5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4-tiadiazol (7).

En un matraz fondo redondo, se agregan 4g (0,0106 moles) de
30 tiosemicarbazona, 5.2g (0,032 moles) de FeCl₃ disuelto en 10 ml de agua destilada y 20 ml de metanol. La mezcla de reacción se refluxe por 2 horas, posteriormente se adicionan 20 ml de una solución de ácido cítrico (6,15 g;

0,032 moles) y citrato de sodio (3,43g; 0,016 moles) y se agita bajo reflujo por 1 hora. Luego la mezcla de reacción se calienta en carbón activado y se filtra en caliente. El filtrado se concentra hasta la mitad y se deja enfriar en un baño de agua-hielo, formándose un sólido café claro, el cual se cristaliza varias veces con agua y metanol, obteniendo 1,66g (0,0047 moles) con un 44,86% de rendimiento.

A continuación se presentan las síntesis de los compuestos [a-h] y [i-q], descritos en las Figura 6 y 7:

10

***N*-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il] nonanamida (a).**

En un matraz fondo redondo secado previamente, se adicionan 2 ml (0,011 moles) de ácido nonanoico y 0,6 ml (0,0083 moles) de cloruro de tionilo, la mezcla se agita y refluye por 16 horas a 80°C. Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente y bajo agitación vigorosa se adicionan rápidamente 0,2 g (0,000895 moles) de 2- amino-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4 tiadiazol seguido de 2 ml de piridina. La mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente por 2 horas, obteniendo el producto diacilado y posteriormente en un matraz fondo redondo secado previamente, se adicionan 0,3 g (0,0006 moles) de éste, seguido de 2ml de una solución de NaOH (30%) en 10ml de metanol por 3 horas a reflujo y bajo agitación. Una vez que la reacción alcanza la temperatura ambiente se acidifica hasta pH 4 con HCl 37%. Obteniendo un sólido color blanco que es purificado por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil 20% acetato de etilo/hexano, finalmente el producto obtenido es cristalizado en metanol agua, obteniendo 0,185g de un sólido blanco en un rendimiento de 84,86%.

25

***N*-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il] nonanamida (b).**

En un matraz fondo redondo secado previamente, se adicionan 1 ml (0,011 moles) de ácido nonanoico y 0,6 ml (0,0083 moles) de cloruro de tionilo, la mezcla se agita y refluye por 16 horas a 80°C. Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente y bajo agitación vigorosa se adicionan rápidamente 0,2 g

30

(0,000573 moles) de 5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1,3,4 tiadiazol-2- amino seguido de 2 ml de piridina. La mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente por 2 horas y posteriormente la reacción se particiona entre una solución acuosa ácida y diclorometano, la fase orgánica se extrae y se lava con una solución de NaCl saturado, la fase orgánica se concentra y el residuo obtenido se hidroliza en una solución de NaOH (30%) en metanol por 3 horas a reflujo y bajo agitación. Una vez que la reacción alcanza la temperatura ambiente se acidifica hasta pH 4 con HCl 37%. Obteniendo un sólido color café que es purificado por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil 20% acetato de etilo/hexano, finalmente el producto obtenido es cristalizado en metanol agua, obteniendo 0,064g de un sólido café en un rendimiento de 22,85%.

***N*-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il] octanamida (c).**

En un matraz fondo redondo secado previamente, se adicionan 1 ml (0,013 moles) de ácido octanoico y 0,8 ml (0,011 moles) de cloruro de tionilo, la mezcla se agita y refluye por 16 horas a 80°C. Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente y bajo agitación vigorosa se adicionan rápidamente 0,2 g (0,000895 moles) de 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4 tiadiazol-2- amino seguido de 2 ml de piridina. La mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente por 2 horas y posteriormente la reacción se particiona entre una solución acuosa ácida y diclorometano, la fase orgánica se extrae y se lava con una solución de NaCl saturado, la fase orgánica se concentra y el residuo obtenido se hidroliza en una solución de NaOH (30%) en metanol por 3 horas a reflujo y bajo agitación. Una vez que la reacción alcanza la temperatura ambiente se acidifica hasta pH 4 con HCl 37%. Obteniendo un sólido color blanco que es purificado por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil 20% acetato de etilo/hexano, finalmente el producto obtenido es cristalizado en metanol agua, obteniendo 0,173g de un sólido blanco en un rendimiento de 55,27%.

***N*-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il] octanamida (d).**

En un matraz fondo redondo secado previamente, se adicionan 1 ml (0,013 moles) de ácido octanoico y 0,8 ml (0,011 moles) de cloruro de tionilo, la mezcla se agita y refluje por 16 horas a 80°C. Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente y bajo agitación vigorosa se adicionan rápidamente 0,2 g (0,000573 moles) de 5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4 tiadiazol-2-amino seguido de 2 ml de piridina. La mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente por 2 horas y posteriormente la reacción se particiona entre una solución acuosa ácida y diclorometano, la fase orgánica se extrae y se lava con una solución de NaCl saturado, la fase orgánica se concentra y el residuo obtenido se hidroliza en una solución de NaOH (30%) en metanol por 3 horas a reflujo y bajo agitación. Una vez que la reacción alcanza la temperatura ambiente se acidifica hasta pH 4 con HCl 37%. Obteniendo un sólido color café que es purificado por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil 20% acetato de etilo/hexano, finalmente el producto obtenido es cristalizado en metanol agua, obteniendo 0,091g de un sólido café en un rendimiento de 33,46%.

***N*-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il] heptanamida (e).**

En un matraz fondo redondo secado previamente, se adicionan 1 ml (0,014 moles) de ácido heptanoico y 0,9 ml (0,012 moles) de cloruro de tionilo, la mezcla se agita y refluje por 16 horas a 80°C. Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente y bajo agitación vigorosa se adicionan rápidamente 0,2 g (0,000895 moles) de 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,3,4 tiadiazol-2-amino seguido de 2 ml de piridina. La mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente por 2 horas y posteriormente la reacción se particiona entre una solución acuosa ácida y diclorometano, la fase orgánica se extrae y se lava con una solución de NaCl saturado, la fase orgánica se concentra y el residuo obtenido se hidroliza en una solución de NaOH (30%) en metanol por 3 horas a reflujo y bajo agitación. Una vez que la reacción alcanza la temperatura ambiente se acidifica hasta pH 4 con HCl 37%. Obteniendo un sólido color blanco que es purificado por cromatografía en columna, utilizando como fase

móvil 20% acetato de etilo/hexano, finalmente el producto obtenido es cristalizado en metanol agua, obteniendo 0,167g de un sólido blanco en un rendimiento de 55,48%.

5 ***N*-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il] heptanamida (f).**

En un matraz fondo redondo secado previamente, se adicionan 1 ml (0,014 moles) de ácido heptanoico y 0,9 ml (0,012 moles) de cloruro de tionilo, la mezcla se agita y refluye por 16 horas a 80°C. Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente y bajo agitación vigorosa se adicionan rápidamente 0,2 g
10 (0,000573 moles) de 2- amino-5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4 tiadiazol seguido de 2 ml de piridina. La mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente por 2 horas y posteriormente la reacción se particiona entre una solución acuosa ácida y diclorometano, la fase orgánica se extrae y se lava con una solución de NaCl saturado, la fase orgánica se
15 concentra y el residuo obtenido se hidroliza en una solución de NaOH (30%) en metanol por 3 horas a reflujo y bajo agitación. Una vez que la reacción alcanza la temperatura ambiente se acidifica hasta pH 4 con HCl 37%. Obteniendo un sólido color café que es purificado por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil 20% acetato de etilo/hexano, finalmente el producto obtenido
20 es cristalizado en metanol agua, obteniendo 0,078g de un sólido café en un rendimiento de 29,55%.

***N*-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il] hexanamida (g).**

En un matraz fondo redondo secado previamente, se adicionan 1 ml (0,016
25 moles) de ácido hexanoico y 0,9 ml (0,012 moles) de cloruro de tionilo, la mezcla se agita y refluye por 16 horas a 80°C. Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente y bajo agitación vigorosa se adicionan rápidamente 0,2 g (0,000895 moles) de 2- amino-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4 tiadiazol seguido de 2 ml de piridina. La mezcla de reacción se deja en agitación a
30 temperatura ambiente por 2 horas y posteriormente la reacción se particiona entre una solución acuosa ácida y diclorometano, la fase orgánica se extrae y se lava con una solución de NaCl saturado, la fase orgánica se concentra y el

residuo obtenido se hidroliza en una solución de NaOH (30%) en metanol por 3 horas a reflujo y bajo agitación. Una vez que la reacción alcanza la temperatura ambiente se acidifica hasta pH 4 con HCl 37%. Obteniendo un sólido color blanco que es purificado por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil 20% acetato de etilo/hexano, finalmente el producto obtenido es cristalizado en metanol agua, obteniendo 0,118g de un sólido blanco en un rendimiento de 41,11%.

***N*-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4-tiadiazol-2-il] hexanamida (h).**

En un matraz fondo redondo secado previamente, se adicionan 1 ml (0,016 moles) de ácido hexanoico y 0,9 ml (0,012 moles) de cloruro de tionilo, la mezcla se agita y refluje por 16 horas a 80°C. Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente y bajo agitación vigorosa se adicionan rápidamente 0,2 g (0,000573 moles) de 2- amino-5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4 tiadiazol seguido de 2 ml de piridina. La mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente por 2 horas y posteriormente la reacción se particiona entre una solución acuosa ácida y diclorometano, la fase orgánica se extrae y se lava con una solución de NaCl saturado, la fase orgánica se concentra y el residuo obtenido se hidroliza en una solución de NaOH (30%) en metanol por 3 horas a reflujo y bajo agitación. Una vez que la reacción alcanza la temperatura ambiente se acidifica hasta pH 4 con HCl 37%. Obteniendo un sólido color café que es purificado por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil 20% acetato de etilo/hexano, finalmente el producto obtenido es cristalizado en metanol agua, obteniendo 0,058g de un sólido café en un rendimiento de 22,66%.

***(2E)*-1-(4-bromofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (i)**

En un matraz Erlenmeyer, se disuelven 2g (0,01 moles) de 4-bromo acetofenona y 1,02 ml (1,06 g; 0,01moles) de benzaldehído en 30 ml de metanol. Bajo agitación en una placa agitadora se agregan gota a gota 2 ml de una solución acuosa de KOH 50% y la mezcla de reacción se agita por 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se neutraliza a pH 7 con HCl

37% y se deja enfriar en un baño de hielo por 24 horas, formándose un precipitado amarillo claro, el cual se filtra y lava con abundante agua destilada. El sólido se recristaliza en metanol, obteniendo 2,42 g del producto en un 84,32% de rendimiento.

5

(2E)-1-(4-bromofenil)-3-(4-metoxifenil) prop-2-en-1-ona (j)

En un matraz Erlenmeyer, se disuelven 2g (0,01 moles) de 4-bromo acetofenona y 1.22 ml (1,36 g; 0,01moles) de anisaldehído. Bajo agitación en una placa agitadora se agregan gota a gota 2 ml de una solución acuosa de
10 KOH 50% y la mezcla de reacción se agita por 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se neutraliza a pH 7 con HCl 37% y se deja enfriar en un baño de hielo por 24 horas, formándose un precipitado amarillo claro, el cual se filtra y lava con abundante agua destilada. El sólido se recristaliza en metanol, obteniendo 2,48 g (0,007 moles) del producto en un 78,2% de
15 rendimiento.

(2E)-1-(4-Bromofenil)-3-(4-hidroxifenil) prop-2-en-1-ona (k)

En un matraz fondo redondo, se disuelven 2g (0,01 moles) de 4-bromo acetofenona y 1,22 g (0,01moles) de 4-hidroxibenzaldehído en 20 ml de etanol
20 absoluto. Se adicionan 1 ml de H₂SO₄ (c) y bajo agitación se refluxe la mezcla de reacción a 60°C por 18 horas. Posteriormente se neutraliza a pH 7 con NaOH (c) y la fase orgánica es extraída con diclorometano y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil 30% acetato de etilo/hexano, obteniendo 0,875 g (0,003moles) del producto
25 puro como sólido amarillo en un 28,9% de rendimiento.

(2E)-1-(4-bromofenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) prop-2-en-1-ona (l)

En un matraz fondo redondo, se disuelven 2,58g (0,01 moles) de 4-bromo acetofenona y 2 g (0,01moles) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído en 20 ml de
30 etanol absoluto. Se adicionan 1 ml de H₂SO₄ (c) y bajo agitación se refluxe la mezcla de reacción a 60°C por 18 horas. Posteriormente se neutraliza a pH 7 con NaOH (c) y la fase orgánica es extraída con diclorometano y concentra. El

residuo se purifica por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil 30% acetato de etilo/hexano, obteniendo 0,789 g (0,002 moles) del producto puro como un sólido naranja, en un 18,2% de rendimiento.

5 **(1E, 4E)-1,5-difenil penta-1,4-dien-3-ona (m)**

En un matraz Erlenmeyer, se disuelven 2g (0,019 moles) de benzaldehído y 0,69 ml (0,55 g; 0,0095 moles) de acetona en 10 ml de metanol. Bajo agitación y gota a gota se adicionan 2 ml de una solución de KOH 40%, la cual terminada de agregar se deja la mezcla de reacción en agitación por 30 minutos adicionales a temperatura ambiente. Se forma un precipitado amarillo, el cual se filtra y cristaliza en metanol. Se obtienen 4,23g (0,018 moles) de cristales amarillo en un 95,05 % de rendimiento.

15 **(1E, 4E)-1,5-(4-hidroxifenil) penta-1,4-dien-3-ona (n)**

En un matraz Erlenmeyer, se disuelven 2g (0,016 moles) de 4-hidroxibenzaldehído y 0,58 ml (0,46 g, 0,008 moles) de acetona en 10 ml de metanol. Bajo agitación y gota a gota se adicionan 2 ml de una solución de KOH 40%, la cual terminada de agregar se deja la mezcla de reacción en agitación por 30 minutos adicionales a temperatura ambiente. La reacción resultante se acidifica a pH 4 con HCl 37% y la fase orgánica se extrae con diclorometano y concentra. El residuo se cristaliza en metanol/agua tres veces, obteniendo 0,324g (0,001 moles) de producto como cristales naranja claro en un 7,6% de rendimiento.

25 **(1E, 4E)-1,5-(4-metoxifenil) penta-1,4-dien-3-ona (o)**

En un matraz Erlenmeyer, se disuelven 2g (0,015 moles) de 4-metoxibenzaldehído y 0,53 ml (0,42 g; 0,0073 moles) de acetona en 10 ml de metanol. Bajo agitación y gota a gota se adicionan 2 ml de una solución de KOH 40%, la cual terminada de agregar se deja la mezcla de reacción en agitación por 30 minutos adicionales a temperatura ambiente. Se forma un precipitado amarillo, el cual se filtra y cristaliza en metanol, obteniendo 2,52g (0,00086 moles) de cristales amarillo en un 58,74% de rendimiento.

(2E)-cloro-3-(4-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona. (p)

En un matraz fondo redondo, se disuelven 2g (0,01 moles) de cloruro de fenacilo y 1,22 g (0,01moles) de 4-hidroxibenzaldehído en 20 ml de etanol absoluto. Se adicionan 1 ml de H₂SO₄ (c) y bajo agitación se refluxe la mezcla de reacción a 60°C por 18 horas. Posteriormente se neutraliza a pH 7 con NaOH (c) y la fase orgánica es extraída con diclorometano y concentrada. El residuo se purifica por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil 30% acetato de etilo/hexano, obteniendo 0,834 g (0,004 moles) del producto como sólido naranja claro, en un 37,23% de rendimiento.

10

(2E)-cloro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-fenil prop-2-en-1-ona (q).

En un matraz fondo redondo, se disuelven 1,95g (0,01 moles) de cloruro de fenacilo y 2 g (0,01moles) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído en 20 ml de etanol absoluto. Se adicionan 1 ml de H₂SO₄ (c) y bajo agitación se refluxe la mezcla de reacción a 60°C por 18 horas. Posteriormente se neutraliza a pH 7 con NaOH (c) y la fase orgánica es extraída con diclorometano y concentra. El residuo se purifica por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil 30% acetato de etilo/hexano, obteniendo 0,796g (0,003moles) del producto como un sólido naranja, en un 31,33% de rendimiento.

20

EJEMPLO N° 2: Caracterización de los compuestos**Factor de Retención:**

25

Se determina el factor de retención de los compuestos derivados vainilloides y chalconas purificados por cromatografía en columna o por cristalización, los respectivos valores se presentan en la **Tabla 1 y 2,**

30 **Tabla 1:** Factor de Retención (Rf) de derivados 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas:

Fase móvil	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)
60% acetato de etilo /bencina	0,3	0,3	0,27	0,29	0,26	0,3	0,2	0,2

Tabla 2: Factor de Retención (Rf) de derivados de chalconas:

Fase móvil	(i)	(j)	(k)	(l)	(m)	(n)	(o)	(p)	(q)
30% acetato de etilo /hexano	0,86	0,74	0,50	0,44	0,8	0,33	0,36	0,48	0,51

Espectros infrarrojos:

5

La caracterización mediante espectroscopia infrarroja (IR) se realizó mediante la identificación de las respectivas frecuencias de absorción para cada grupo funcional. En la **Tabla 3** se presenta la caracterización, mediante espectroscopia IR de los compuestos derivados vainilloides de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas.

10

Tabla 3: Frecuencias de absorción (KBr) ν cm^{-1} :

	N-H amida	O-H	C-H sp^3	C-H sp^2 aromático	C=O	C=C aromático
(a)	3538,2	3398	2920,21- 2730,72	3155,60	1680,21	1573, 98;1533,04; 1466,44
(b)	3536,22	3334,22	2924,58- 2853,71	3161,33	1694,22	1560,03; 1502,41; 1463,92
(c)	3308,01	3308,01	2946,86- 2861,81	3154,41	1672,79	1563,81; 1522,28;1456,18
(d)	3386,16	3386,16	2929,56- 2864,87	3158,92	1695,60	1560,42;1503,70;1463,51
(e)	3536,01	3212,54	2930,79- 2775,56	3091,83	1676,99	1565,76; 1519,69;1460
(f)	3400,52	3400,52	2929,09- 2863,98	3163,52	1696,07	1559,19; 1498,60;1461,47
(g)	3402,67	3402,67	2997,19- 2742,07	3162,49	1679,61	1566,99; 1523,72;1457,78
(h)	3404,63	3404,63	2927,67- 2735,99	3164,74	1699,04	1562,54;1497,57;1462,09

En la **Tabla 4** se presentan las frecuencias de absorción de los compuestos derivados de chalconas o derivados carbonilo alfa, beta insaturados [i-q].

5 **Tabla 4:** Frecuencias de absorción (KBr) ν cm^{-1} :

	O-H	C-H sp^3	C=O	C=C aromático	C=C	C-O-C asimétrico	C-O-C simétrico
(i)			1657,24	1578,96 1440,16	1602,33		
(j)			1654,24	1508,28 1457,82	1591,49	1254,60	1030,35
(k)	3264,75		1644,90	1511,87	1579,33		
(l)	3362,78		1647,20	1514,85	1578,01	1274,81	1031,25
(m)			1628,82	1510,96,1433,32	1597,69		
(o)		2959,76 2854,39	1628,05	1508,11 1416,72	1597,48	1244,03	1028,35
(n)	3423,31		1649,02	1492,82,1445,75	1593,06		
(p)	3298,05		1642,99	1505,81 1445,37	1570,60		
(q)	3336,48		1632,47	1510,32 1463,60	1568,06	1251,18	1028,47

Resonancia magnética nuclear

10

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , de los compuestos fueron caracterizados, los desplazamientos químicos (ppm) de los grupos funcionales característicos para la estructura de los compuestos son mostrados en las **Tablas 5 y 6**, y en las **Figuras 8 a 13** se muestran los espectros de resonancia de ^1H y ^{13}C para los compuestos [b], [e] y [l] con los respectivos desplazamientos químicos asignados para cada hidrógeno y carbono de la molécula.

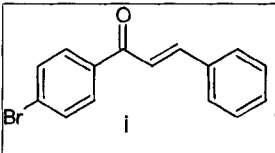
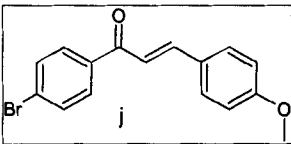
15

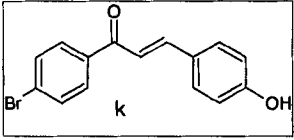
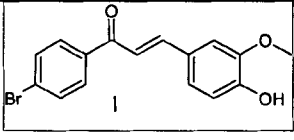
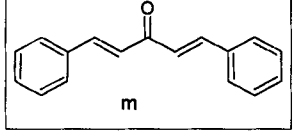
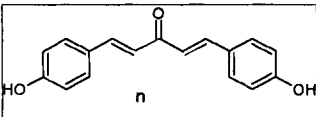
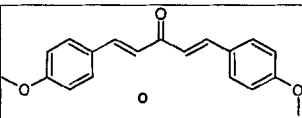
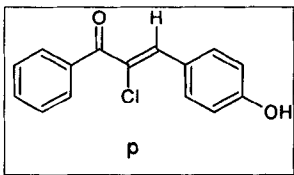
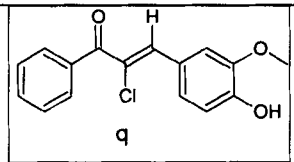
Tabla 5: Desplazamientos químicos determinados para los derivados de 1, 3, 4- tiadiazol alquilamidas.

Compuesto	RMN- ¹ H (ppm)	RMN- ¹³ C (ppm)
R- (CH ₂) ₇ CH ₃ - R ¹ -H (a)	<u>H-Alifático:</u> 0.82-0.86 ppm (t, J= 6.9 Hz, 3H), 1.50-1.24 (m, 10H), 1.87-1.79 (m, 2H), <u>2.77-2.81</u> (t, 7.7 Hz, 2H). <u>H- Amida:</u> 12.56 (s, NH).	<u>C-Amida:</u> 172.39 <u>C-Heterociclo:</u> 163.34, 159.87. <u>C-Alifático:</u> 36.87, 32.20, 29.74, 29.66, 29.57, 25.87, 23.05, 14.46.
R- (CH ₂) ₇ CH ₃ - R ¹ -I (b)	<u>H-Alifático:</u> 0.85-0.82 (t, J= 6.6 Hz, 3H), 1.35-1.24 (m, 8H), 1.42-1.46 (m, 2H), 1.80-1.84 (m, 2H), <u>2.78-2.74</u> (t, 6.6 Hz, 2H). <u>H-Hidroxilo:</u> 9.77 (s) <u>H- Amida:</u> 12.77 (s, NH).	<u>C-Amida:</u> 172.47 <u>C-Heterociclo:</u> 161.75, 160.29 <u>C-Alifático:</u> 36.91, 32.26, 29.78, 29.71, 29.62, 25.86, 23.11, 14.53.
R-(CH ₂) ₆ CH ₃ R ¹ -H (c)	<u>H-Alifático:</u> 0.78-0.82 (t, J=6.7 Hz, 3H), 1.20-1.22 (m, 8H), 1.53-1.57 (m, 2H), <u>2.41-2.45</u> (t, J= 7.4 Hz, 2H) <u>H-Hidroxilo:</u> 9.7 (s) <u>H- Amida:</u> 12.48 (s, NH).	<u>C-Amida:</u> 171.49 <u>C-Heterociclo:</u> 162.00, 157.46 <u>C- Alifático:</u> 34.87, 31.13, 28.49, 28.39, 24.65, 22.08, 13.96
R-(CH ₂) ₆ CH ₃ R ¹ I (d)	<u>H-Alifático:</u> 0.87-0.84 (t, J= 6.9 Hz, 3H), 1.27-1.25 (m, 8H), 1.63-1.59 (m, 2H), <u>2.20-2.16</u> (t, J= 7.4Hz, 2H) <u>H-Hidroxilo:</u> 10.04 (s) <u>H- Amida:</u> 12.57 (s, NH).	<u>C-Amida:</u> 172.54 <u>C-Heterociclo:</u> 163.85, 158.44 <u>C- Alifático:</u> 32.75, 31.13, 28.45, 28.35, 24.62, 22.06, 13.97
R-(CH ₂) ₅ CH ₃ R ¹ -H (e)	<u>H-Alifático:</u> 0.31-0.35 (t, J= 6.5 Hz, 3H), 0.74 (m, 6H), 1.05-1.10 (m, 2H), <u>1.98-1.95</u> (t, J=7.4 Hz, 2H) <u>H- Amida:</u> 12.02 (s, NH).	<u>C-Amida:</u> 171.51 <u>C-Heterociclo:</u> 162.05, 157.49 <u>C- Alifático:</u> 34.91, 30.99, 28.23, 24.64, 22.01, 13.96

R-(CH ₂) ₅ CH ₃ R ¹ -I (f)	<u>H-Alifático</u> : 0.77-0.81(t, J=6.6Hz, 3H), 1.20 (m, 6H), 1.50-1.56 (m, 2H), <u>2.40-2.43</u> (t, J=7.5Hz, 2H). <u>H-Hidroxilo</u> : 10.13 (s) <u>H-Amida</u> : 12.51 (s, NH).	<u>C-Amida</u> : 171.56 <u>C-Heterociclo</u> : 160.48, 157.91 <u>C-Alifático</u> : 34.89, 30.95, 28.19, 24.60, 21.97, 13.95
R-(CH ₂) ₄ CH ₃ R ¹ -H (g)	<u>H-Alifático</u> : 0.82-0.86 (t, J=6.8 Hz, 3H), 1.24-1.26 (m, 4H), 1.55-1.62 (m, 2H), <u>2.43-2.47</u> (t, J=7.5 Hz, 2H) <u>H-Hidroxilo</u> : 9.66 (s) <u>H-Amida</u> : 12.49 (s, NH).	<u>C-Amida</u> : 171.46 <u>C-Heterociclo</u> : 161.98, 157.47 <u>C-Alifático</u> : 34.83, 30.72, 24.32, 21.83, 13.83
R-(CH ₂) ₄ CH ₃ R ¹ -I (h)	<u>H-Alifático</u> : 0.72-0.74 (t, J= 6.8Hz, 3H), 1.15-1.18 (m, 4H), 1.47-1.52 (m, 2H), <u>2.34-2.37</u> (t, J=7.4Hz, 2H) <u>H-Hidroxilo</u> : 10.07 (s) <u>H-Amida</u> : 12.45 (s, NH).	<u>C-Amida</u> : 171.54 <u>C-Heterociclo</u> :160.47, 157.74 <u>C-Alifático</u> : 34.86, 30.74, 24.34, 21.86, 13.85

Tabla 6: Desplazamientos químicos determinados para los derivados de chalconas.

Compuesto	RMN ¹ H (ppm)	RMN ¹³ C (ppm)
	H _β : 7.80-7.84 (d, J=15.7 Hz) H _α : 7.46-7.50 (d, J=15.7 Hz)	C=O: 186.21 C _β : 145.60 C _α : 121.63
	H _β : 7.7-7.81 (d, 15.7Hz) H _α : 7.37-7.33 (d, J=15.6Hz)	C=O: 189.56 C _β : 145.44 C _α : 119.28

	H β : 7.65-7.70 (d, J= 20 Hz) H α : 7.64-7.69 (d, J= 20 Hz)	C=O: 188.09 C β : 145.09 C α : 118.13
	H β : 7.73-7.77 (d, J=15.6Hz) H α : 7.29-7.33 (d, J=15.6Hz)	C=O: 189.62 C β : 145.96 C α : 119.22
	H β : 7.77-7.73 (d, J=16 Hz) H α : 7.08-7.12 (d, J= 16Hz)	C=O 189.04 C β : 143.44 C α : 125.53
	H β : 7.43-7.48 (d, J= 16Hz) H α : 6.51-6.55 (d, J= 16Hz)	C=O 197.78 C β : 143.56 C α : 124.09
	H β : 7.67-7.71 (d, J= 16 Hz) H α : 6.92-6.96 (d, J=16Hz)	C=O 188.80 C β : 142.65 C α : 123.46
	H β : 7.45	C=O: 192.45 C β : 141.30 C α : 125.86
	H β : 7.47	C=O: 191.86 C β : 141.05 C α : 126.94

Ejemplo N° 3: Caracterización Fisiológica

5 Ensayos Biológicos

Los compuestos sintetizados fueron evaluados en cultivos de células HEK-293T transfectadas con el cDNA del receptor TRPV-1 de rata. La actividad de

los compuestos estuvo basada en el mecanismo de activación del receptor TRPV-1 por capsaicina y temperatura, los cuales aumentan los niveles de calcio intracelular como consecuencia de la apertura del canal iónico del receptor, el influjo de calcio fue medido con una sonda fluorescente Fluo 4-AM, así en presencia de un antagonista el influjo de calcio es bloqueado por inactivación del receptor TRPV-1 y la fluorescencia celular disminuye.

Cultivo celular.

Células HEK-293T fueron cultivadas en un medio DMEM suplementado con 5% of suero bovino fetal, 50U/ml penicilina, 50mg/ml estreptomicina y 2mM L-glutamina. Los cultivos se mantuvieron a 37°, en un ambiente de 5% CO₂ y 80% de humedad relativa.

Transfección DNA

Las células HEK-293T fueron transfectadas con pcDNA3 TRPV-1 de rata, en un tubo de reacción fueron agregados 97µL de optimem y 3µL de lipofectamina 2000, y en un segundo tubo fue adicionado 1µg de DNA y un volumen de optimen, tal de completar 100µL. Ambos tubos fueron incubados por 10 minutos, tras lo cual fueron mezclados e incubados por 15 minutos adicionales.

Soluciones de los compuestos ensayados.

Los compuestos destinados para los ensayos de tamizaje sobre receptores TRPV-1 fueron preparados en una solución madre de 10.000X en DMSO, etanol o isopropanol y posteriormente para el ensayo fueron diluidos en medio Ringer hasta una concentración de 1µM.

Como controles se utilizaron soluciones de capsaicina, BCTC, Lantano, Rojo de Rutenio a concentraciones finales de 0,031 µM, 1 µM, 100 µM y 10 µM, respectivamente.

Tratamiento con FLUO-4AM

Después de 48 horas de transfección las células fueron tratadas con 200 µL de tripsina, se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, luego las

células fueron suavemente pipeteadas y transpasadas a un tubo de 15mL. Se centrifugo a una velocidad de 6000 rpm por 10 min. y se resuspendieron en 1 ml de medio Ringer, luego se agregó 1 μ l Fluo-4AM 1000X y se incubó por media hora a 37°C. Posteriormente, se centrifugó y se lavó con PBS 1X, pH 7,34 para eliminar el exceso de la sonda. Finalmente el pellet de células se resuspendió en 1,5 ml de medio Ringer.

Ensayo de activación del receptor TRPV-1 por capsaicina.

En placas de 48 pocillos las células HEK 293T transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata y cargadas con Fluo-4 AM, fueron plaqueadas a una densidad celular de 50,000 células por pocillo, con un porcentaje de transfección 40-50%. Seguido de la adición de 2 μ L/pocillo de cada compuesto a ensayar y 2 μ l/pocillo de una solución de capsaicina 0,031 μ M en 0,1% de etanol. Por un periodo de 2-5 minutos a temperatura ambiente se dejaron incubar las células para posteriormente hacer las mediciones de fluorescencia, las cuales se efectuaron antes de la adición de capsaicina y después de adicionar capsaicina. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un equipo de PCR en tiempo real, donde las mediciones de fluorescencia a 25°C se realizaron en 13 ciclos, cada 10 segundos. Los datos normalizados fueron expresados como cambios de fluorescencia en respuesta a la capsaicina en el tiempo, lo que se muestra en las **Figuras 14 a 17**. Se grafican los valores promedio \pm la desviación estándar, que resultaron de la realización de dos experimentos independientes.

25

Ensayo de activación del receptor TRPV-1 por temperatura

En placas de 48 pocillos, las células HEK 293T transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata y cargadas con Fluo-4AM, fueron plaqueadas a una densidad celular de 50,000 células por pocillo, con un porcentaje de transfección 40-50%. Seguido de la adición de 2 μ L/pocillo de cada compuesto a ensayar y por un periodo de 5-10 minutos a temperatura ambiente se dejaron incubar las células antes de la realización del experimento por temperatura. Posteriormente se procedió a hacer lectura de las medidas de fluorescencia en

un equipo de PCR en tiempo real, el cual permite incrementar 1°C cada 35 segundos desde 36°C hasta 55°C para los compuestos y desde 22-56 °C para las células transfectadas en ausencia de los compuestos. La lectura de las medidas de fluorescencia se realizó, utilizando el filtro FAM (483-533nM). Los datos de fluorescencia obtenidos para cada temperatura y cada compuesto, se presentan corregidos restando el fondo celular y la línea base correspondiente a la fluorescencia al inicio de la rampa (22 o 36°C) para cada muestra. Posteriormente los valores se normalizaron expresando los datos como fluorescencia relativa, que corresponde a la razón entre el cambio de fluorescencia y la línea base. Los resultados se graficaron en las **Figuras 18 a 21** como el promedio \pm desviación estándar, obtenidos en dos experimentos independientes a una temperatura de 54° C.

15 **Curva Dosis Respuesta.**

Se realiza un ensayo de activación del receptor TRPV-1 por temperatura, incubando las células HEK-293T transfectadas y cargadas con Fluo-4AM, en presencia de diferentes concentraciones de cada compuesto a ensayar correspondientes a 1 μ M; 0,1 μ M; 0,01 μ M; 0,003 μ M; 0,001 μ M; 0,0003 μ M, 0,0001 μ M y 0,00001 μ M. Posteriormente los datos de fluorescencia relativa obtenidos a 50°C fueron utilizados para calcular la razón de fluorescencia, la cual se presenta normalizada con respecto a la fluorescencia relativa a la concentración inicial. De este modo la razón de fluorescencia obtenida para dos experimentos independientes fue promediada y expresada junto a la respectiva desviación estándar.

En las **Figuras 22 y 23** se presentan las curvas dosis respuesta, en las cuales la razón de fluorescencia versus logaritmo molar de concentración se ajustaron a una curva sigmoidea de inhibición de 4 parámetros, determinando los respectivos valores correspondientes a la mitad de la máxima concentración

inhibitoria (IC_{50}) para cada uno de los compuestos evaluados. Estos valores son mostrados en las **Tabla 7 y 8** de los dos grupos de compuestos.

Tabla 7: Valores IC_{50} , de los compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol
5 alquilamidas y el antagonista control BCTC.

Compuesto	$IC_{50}(nM)$
a	$0,046 \pm 0,004$
b	$0,145 \pm 0,051$
d	$1,092 \pm 0,497$
e	$1,263 \pm 0,009$
h	$0,298 \pm 0,026$
BCTC	$2,120 \pm 0,354$

Tabla 8: Valores IC_{50} , de los compuestos derivados de chalconas, o derivados
10 alfa, beta carbonilo insaturados y el antagonista control BCTC.

Compuesto	$IC_{50}(nM)$
j	$3,892 \pm 0,225$
l	$1,016 \pm 0,206$
m	$7,551 \pm 1,898$
n	$0,184 \pm 0,023$
q	$0,257 \pm 0,016$
BCTC	$2,120 \pm 0,354$

REIVINDICACIONES

- 1.- Compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas CARACTERIZADOS por que inhiben la activación del receptor TRPV-1.
- 5
- 2.- Compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas, según reivindicación 1, CARACTERIZADOS por que inhiben la activación del receptor TRPV-1 por capsaicina y temperatura.
- 10 3.- Compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas, según reivindicación 1, CARACTERIZADOS por que en su estructura R, corresponde a una cadena alquílica saturada definida por cadenas lineales saturadas de 6 a 8 carbonos y X es definido como un átomo de H o un átomo de yodo.
- 15 4.- Compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas, según reivindicación 1, CARACTERIZADOS por que son obtenidos mediante reacción de O-acilación, condensación de aminas, ciclación oxidativa de tiosemicarbazonas, reacción de N- acilación e hidrólisis alcalina.
- 20 5.- Compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas, según reivindicación 1, CARACTERIZADOS por que corresponden específicamente a los siguientes compuestos:
- a) N-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-nonamida,
 - b) N-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-nonamida,
 - 25 c) N-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-octanamida,
 - d) N-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-octanamida,
 - e) N-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-heptanamida,
 - f) N-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-heptanamida,
 - g) N-[5-(4-hidroxi-5-metoxi-3-yodofenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-hexanamida, y
 - 30 h) N-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 3, 4- tiadiazol-2-il]-hexanamida.

- 6.- Compuestos derivados de chalconas CARACTERIZADOS por que inhiben la activación del receptor TRPV-1.
- 5 7.- Compuestos derivados de chalconas, según reivindicación 6, CARACTERIZADOS por que inhiben la activación del receptor TRPV-1 por capsaicina y temperatura.
- 8.- Compuestos derivados de chalconas, según reivindicación 6,
10 CARACTERIZADOS por que en su estructura R puede corresponder a diferentes grupos sustituyentes, tales como
- R1: hidrógeno, un grupo metoxilo o un grupo hidroxilo;
R2: hidrógeno o un grupo metoxilo;
R3: hidrógeno o un grupo cloro;
15 R4: hidrógeno o un grupo bromo; y
R5: hidrógeno, un grupo metoxilo o un grupo hidroxilo.
- 9.- Compuestos derivados de chalconas, según reivindicación 6, CARACTERIZADOS por que el método para su síntesis consistió en la
20 aplicación de la condensación de Claisen-Schmidt entre diferentes benzaldehídos y acetofenonas.
- 10.- Compuestos derivados de chalconas, según reivindicación 6, CARACTERIZADOS por que corresponden específicamente a los siguientes
25 compuestos:
- (2E)-1-(4-bromodifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona,
 - (2E)-1-(4-bromodifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona,
 - (2E)-1-(4-bromodifenil)-3-(4-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona,

- d) (2E)-1-(4-bromodifenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona,
- e) (1E, 4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona,
- f) (1E, 4E)-1,5-(4-hidroxidifenil)penta-1,4-dien-3-ona,
- g) (1E, 4E)-1,5-(4-metoxidifenil)penta-1,4-dien-3-ona,
- 5 h) (2E)-2cloro-3-(4-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona,
- i) (2E)-2 cloro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona.

11.- Compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas y chalconas, según reivindicaciones 1 y 6, CARACTERIZADOS por que presentan una potente actividad antagonista para el modo de activación del receptor TRPV-1 por capsaicina y por temperatura.

12.- Compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas y chalconas, según reivindicaciones 1 y 6, CARACTERIZADOS por que presentan una actividad antagonista en el orden nanomolar, con rangos de IC₅₀ entre 0.04-1.2 nM,

13.- Compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas y chalconas, según reivindicaciones 1 y 6, CARACTERIZADOS por que presentan un modo distinto de unión en el sitio ortostérico del receptor TRPV-1, que contribuye en el aumento de la actividad antagonista.

14.- Compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas y chalconas, según reivindicaciones 1 y 6, CARACTERIZADOS por que exhiben actividad antagonista en receptores TRPV-1 con alta restricción conformacional, que es regulada a través del reemplazo isostérico del grupo amida presente en análogos de capsaicina por el heterociclo 1, 3, 4-tiadiazol, y a través del doble enlace insaturado y la eliminación de los grupos espaciadores, en las chalconas.

15.- Compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas y chalconas, según reivindicaciones 1 y 6, CARACTERIZADOS por que la restricción

conformacional impuesta permite estabilizar el estado conformacional del receptor TRPV-1 responsable de su inactivación.

- 5 16.- Uso de compuestos derivados de 1, 3, 4-tiadiazol alquilamidas y chalconas, según reivindicaciones 1 y 6, CARACTERIZADOS por que se utilizan para la elaboración de un medicamento para tratar enfermedades en las que el receptor TRPV-1 se encuentre sobreactivado, como por ejemplo el dolor crónico.

FIGURAS

Fig. 1

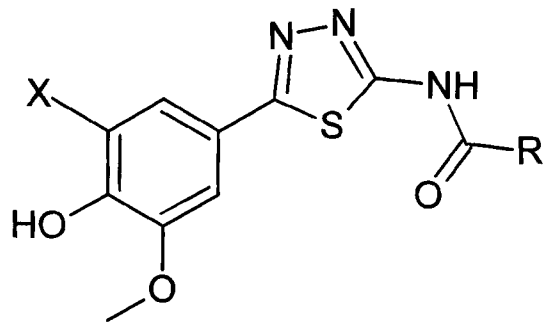


Fig. 2

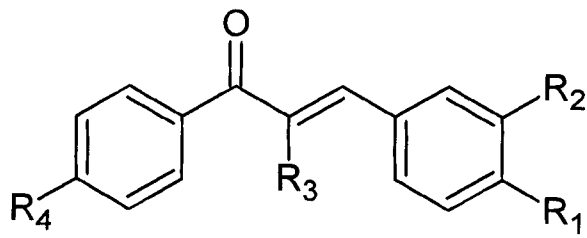
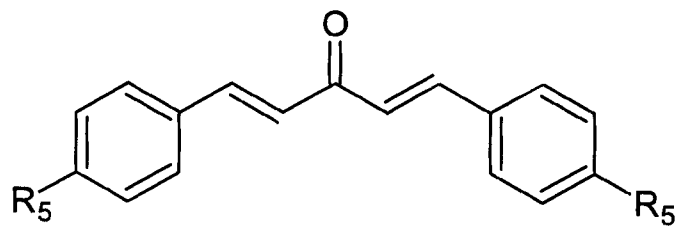


Fig. 3



2/13

Fig. 4

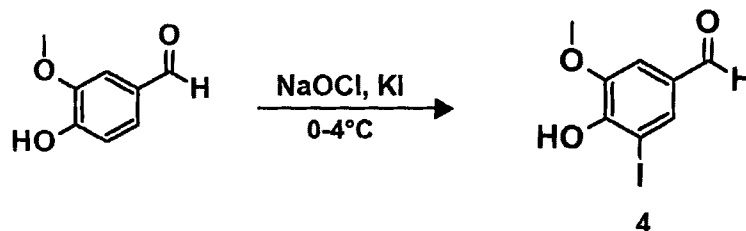
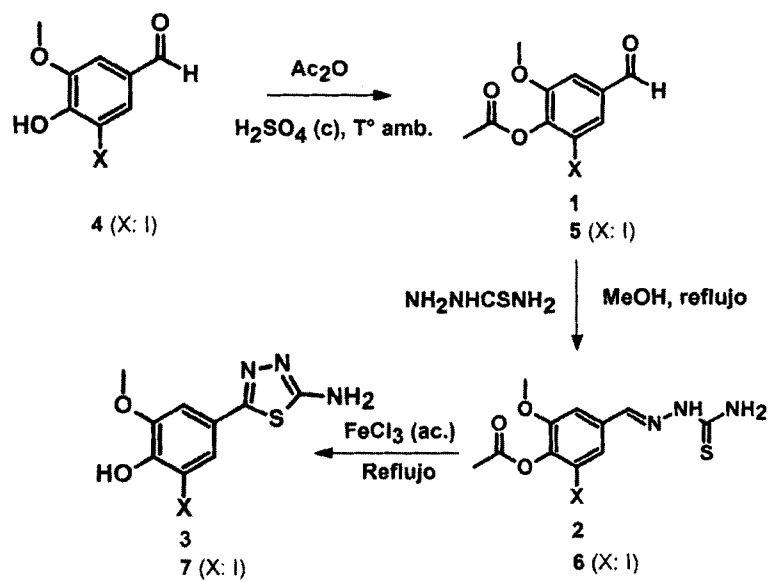
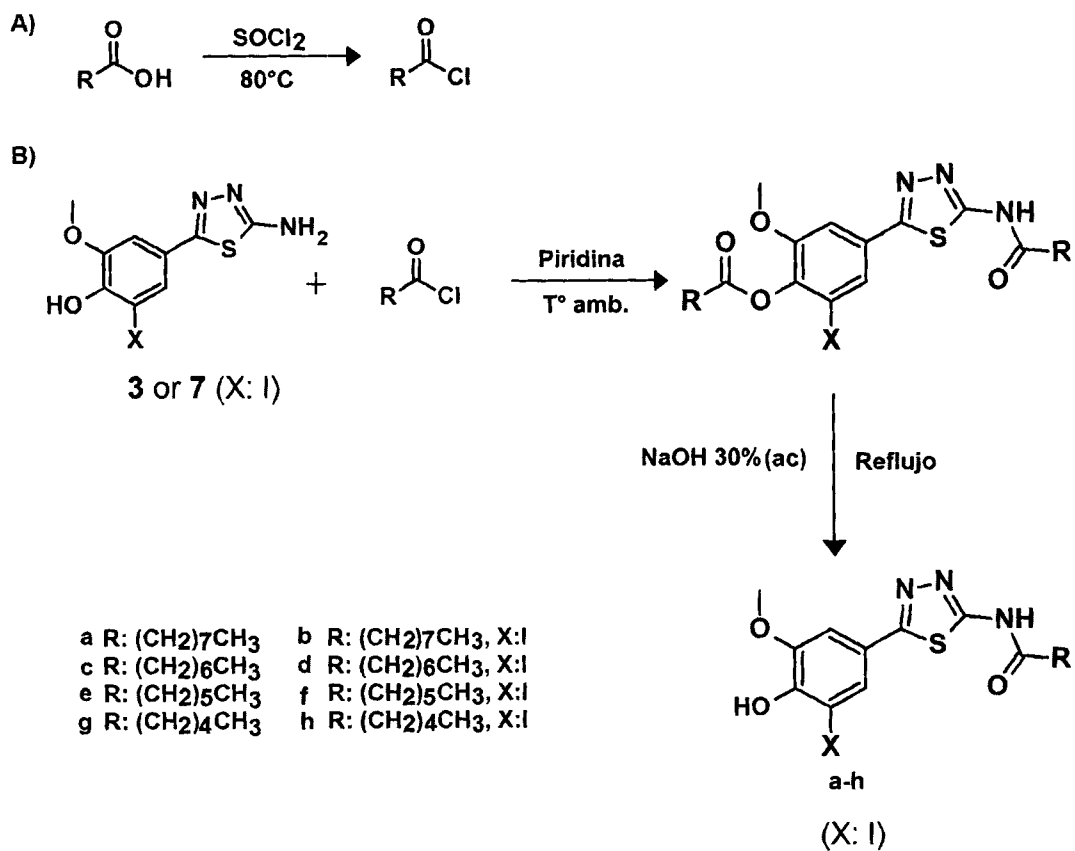


Fig. 5



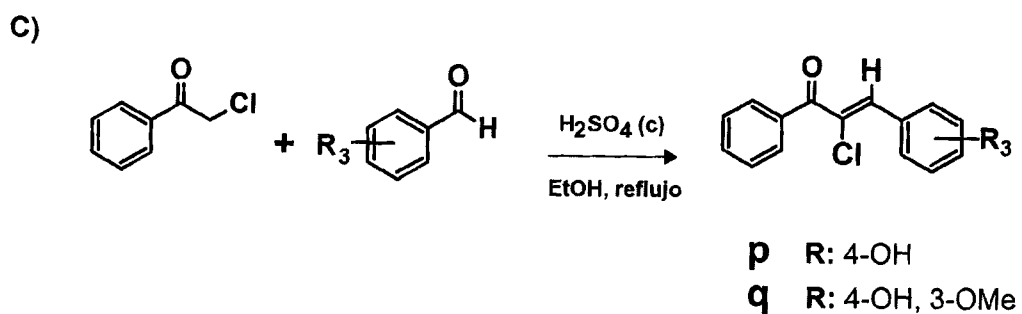
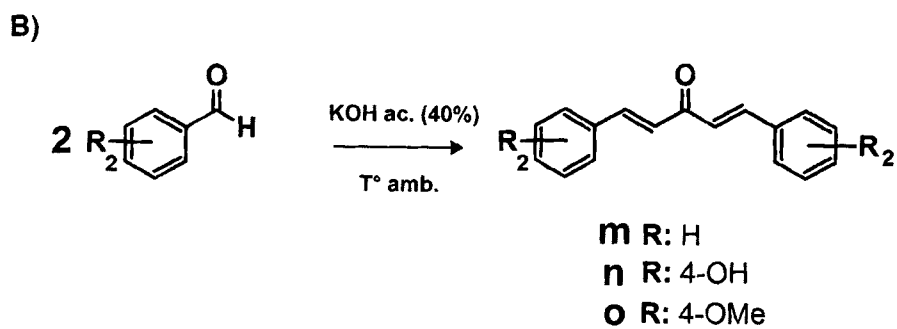
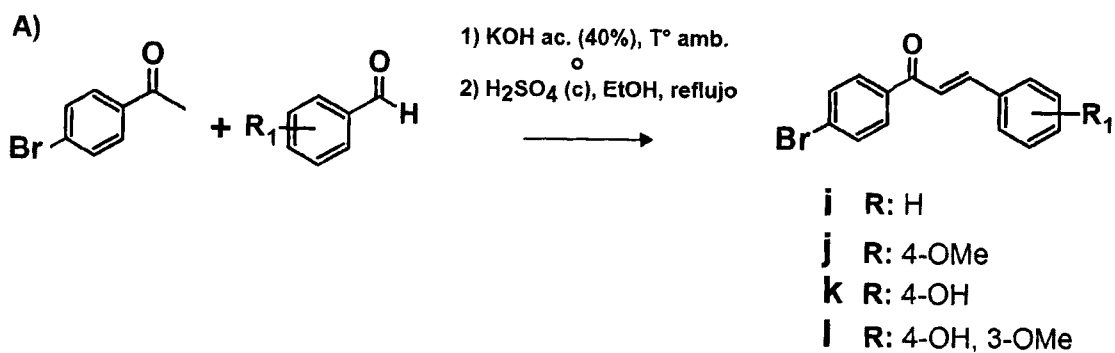
3/13

Fig. 6



4/13

Fig. 7



5/13

Fig. 8

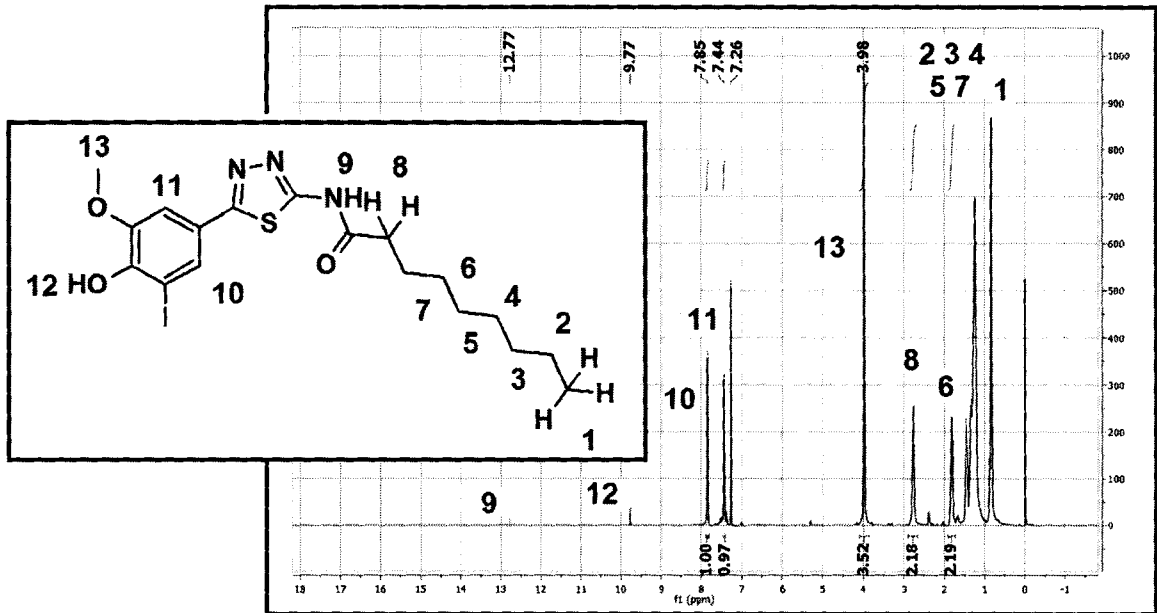
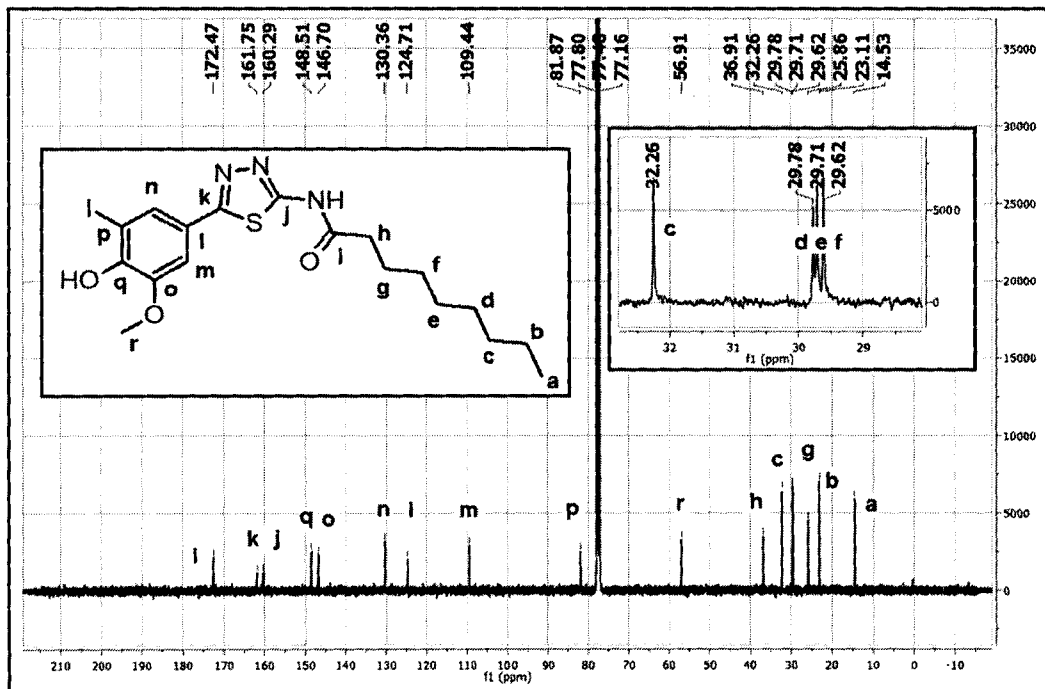


Fig. 9



6/13
Fig. 10

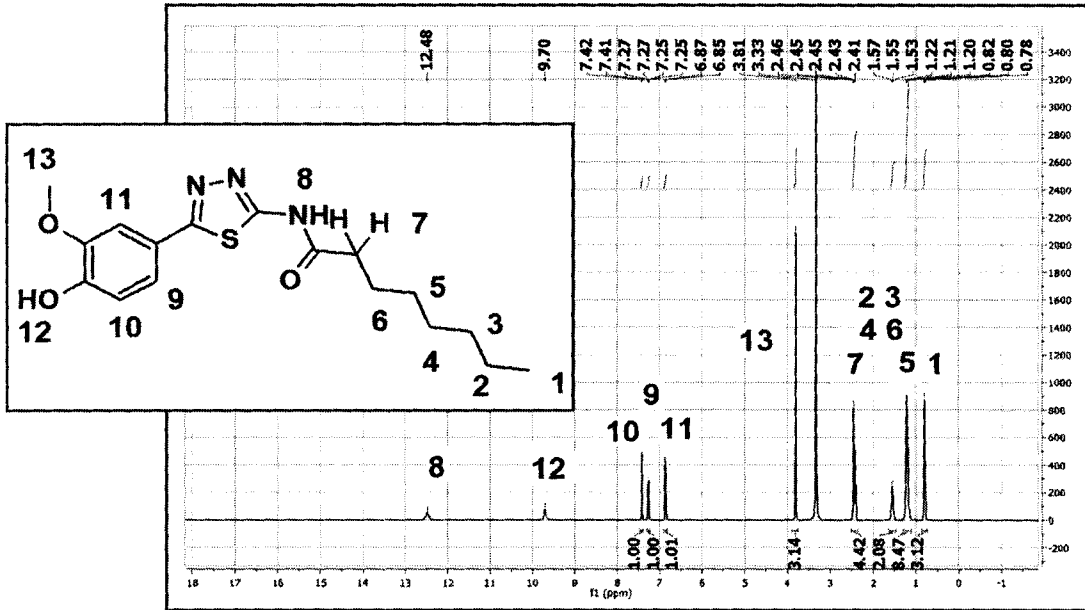
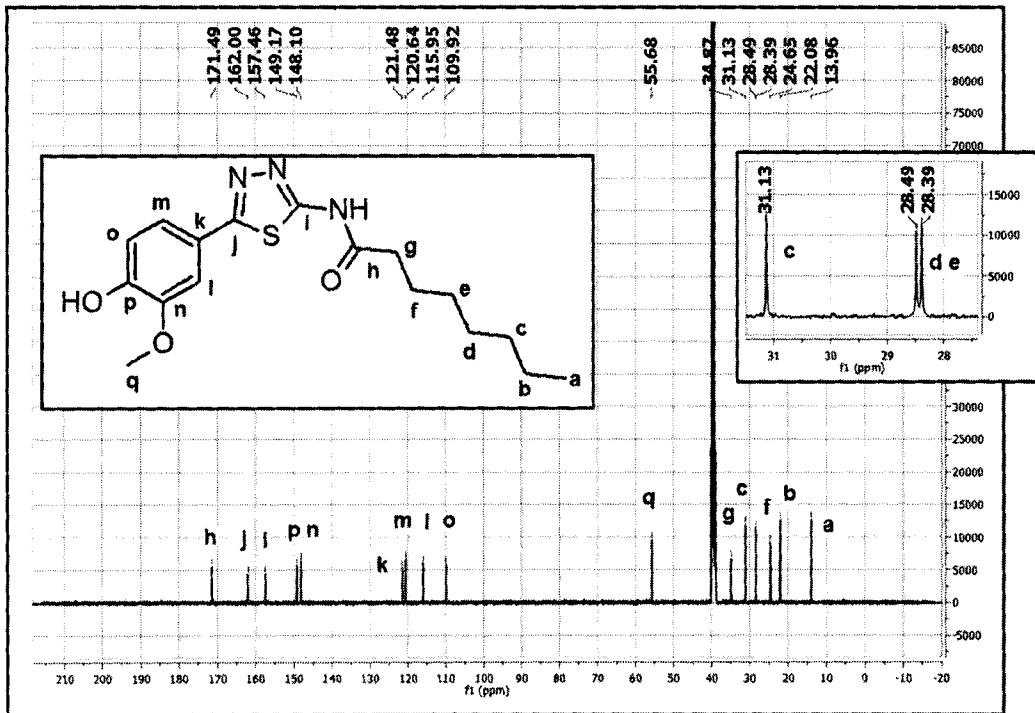


Fig. 11



7/13
Fig. 12

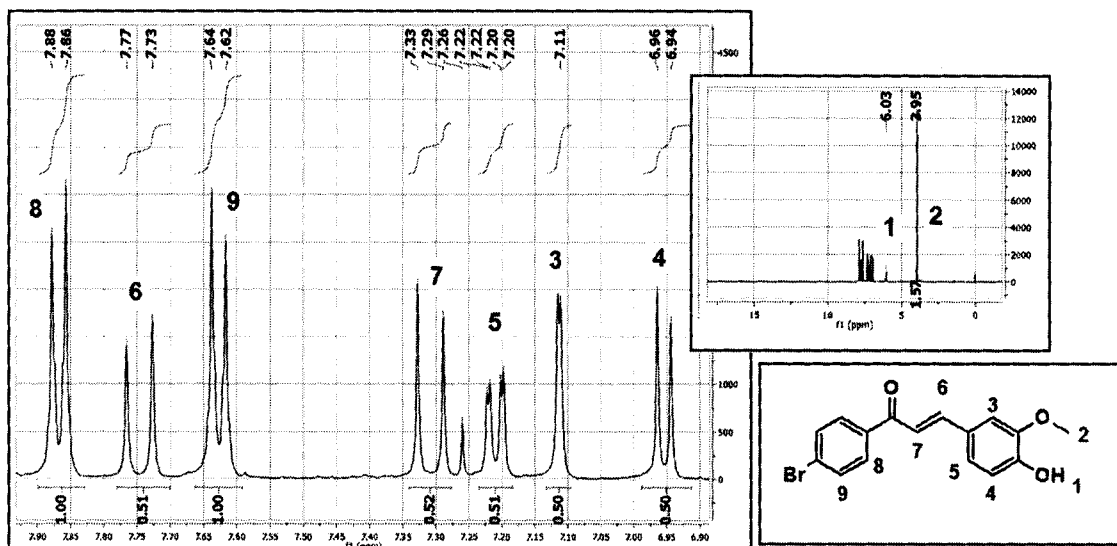
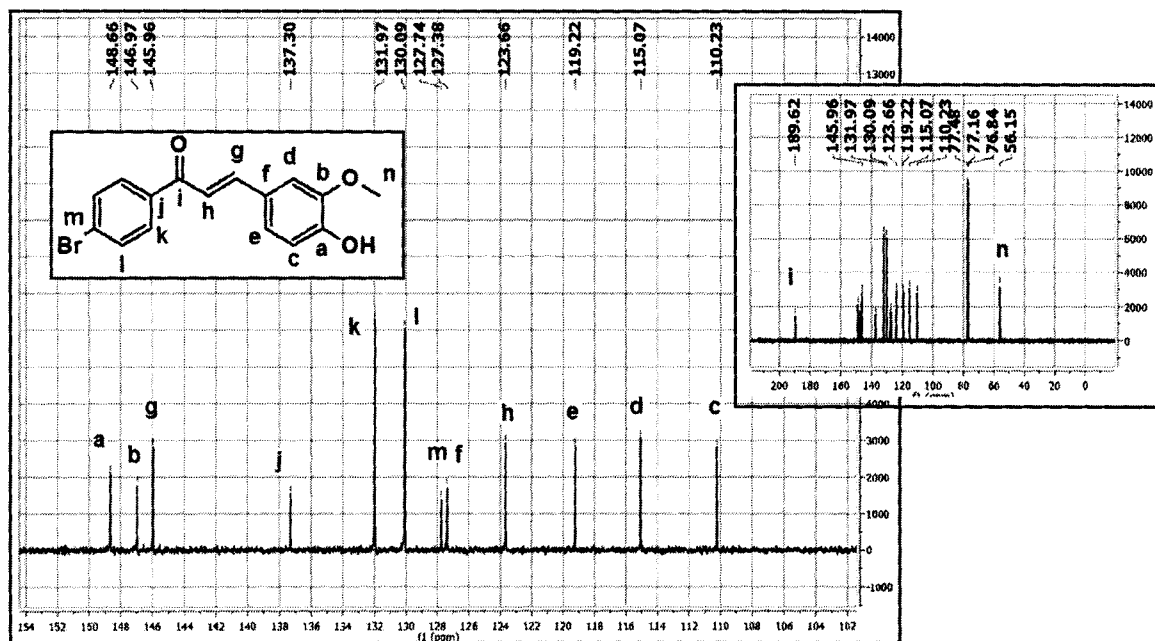


Fig. 13



8/13

Fig. 14

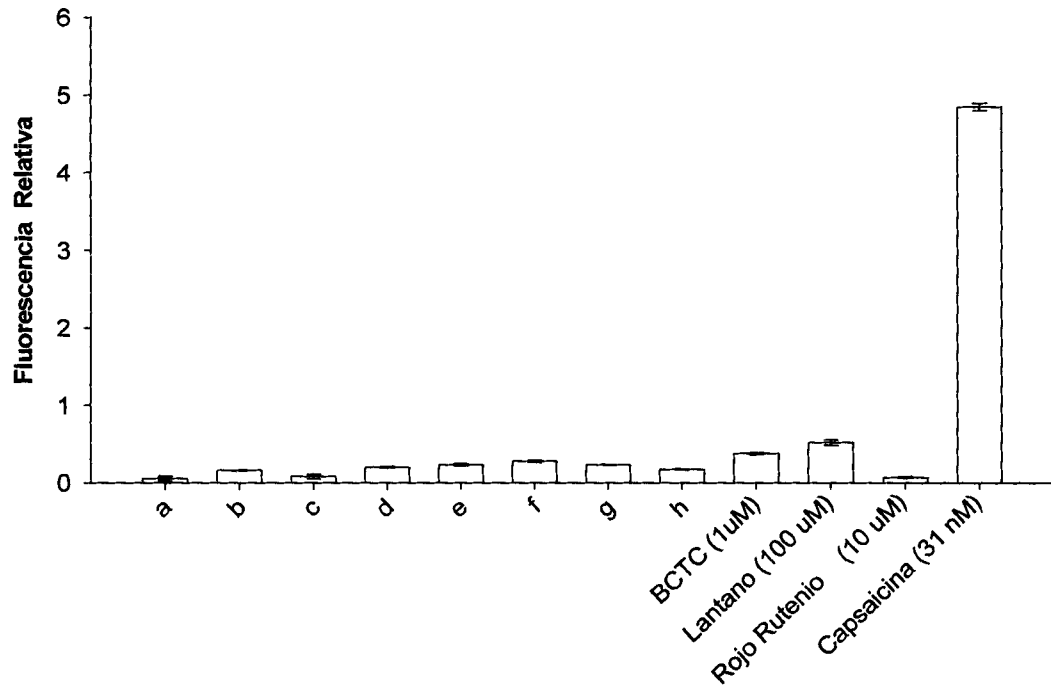
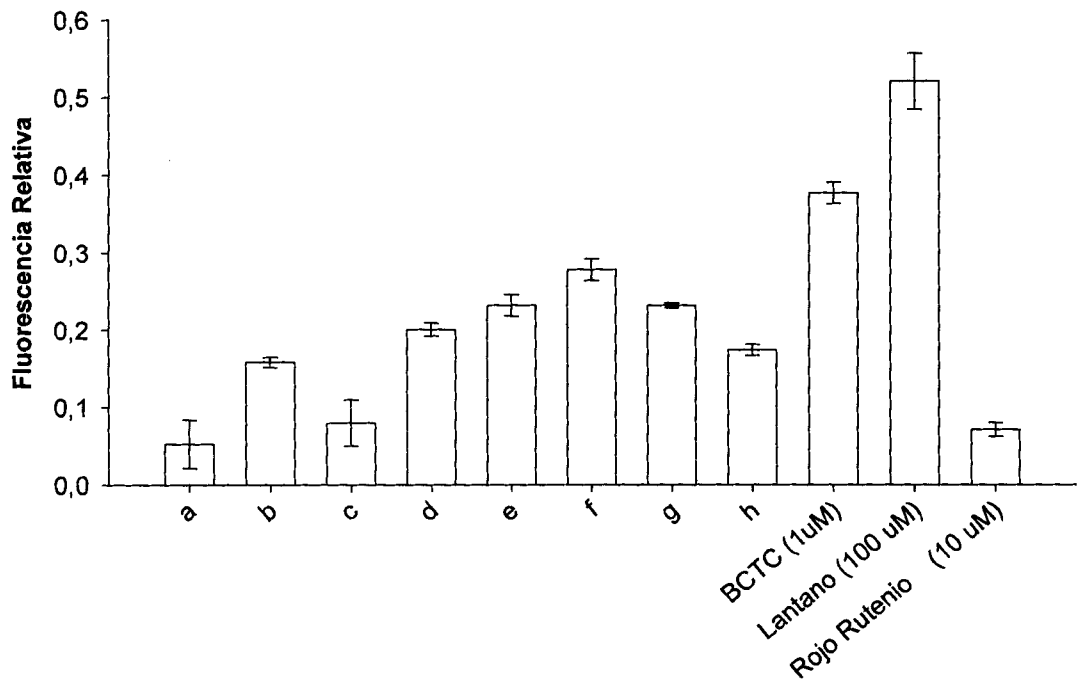


Fig. 15



9/13

Fig. 16

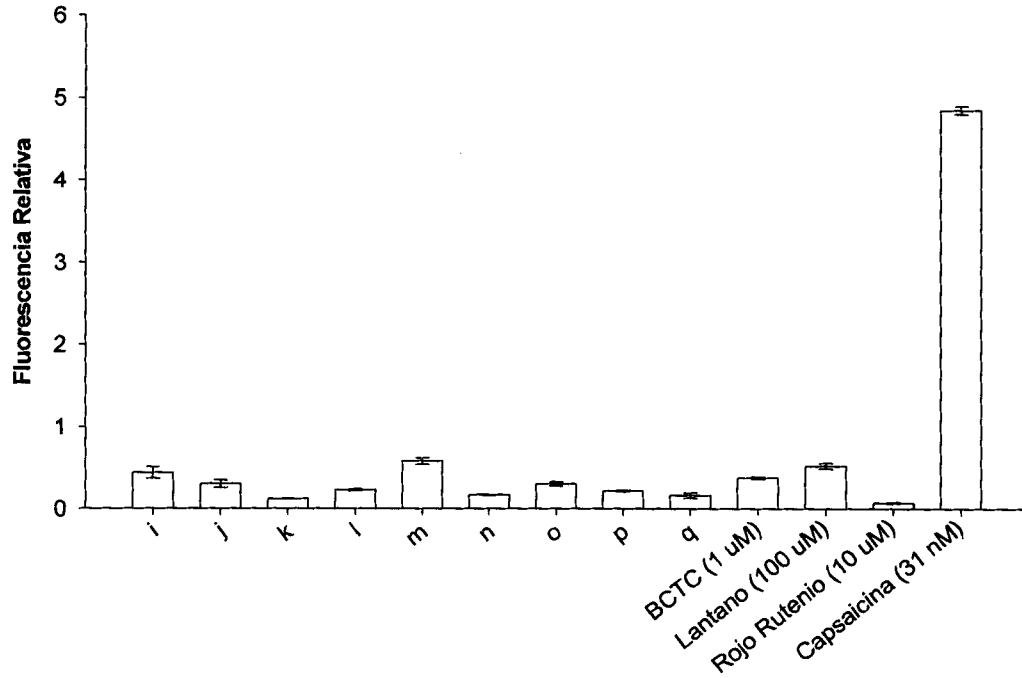
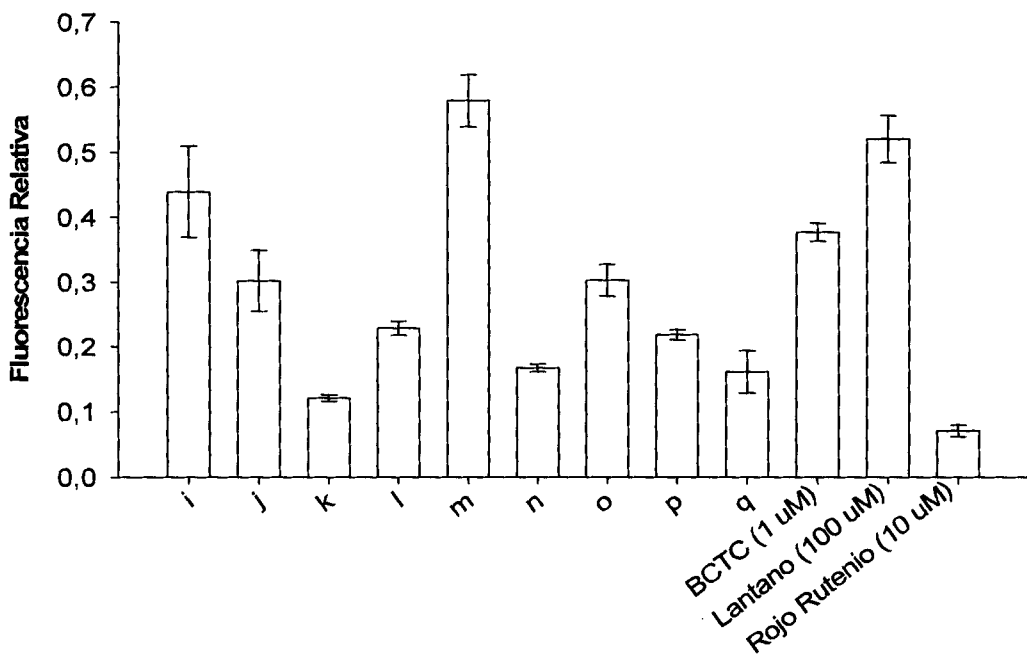


Fig. 17



10/13

Fig. 18

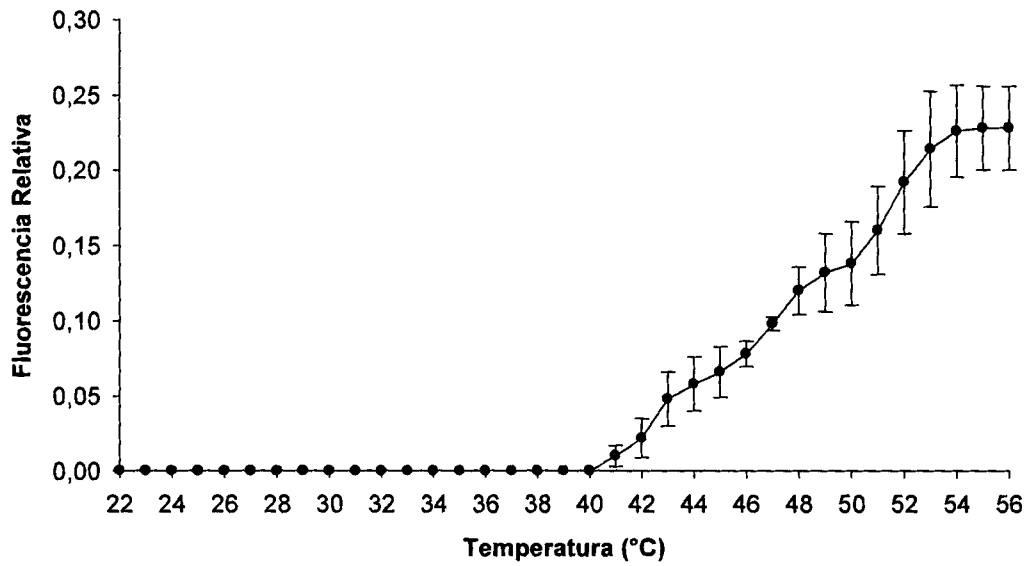
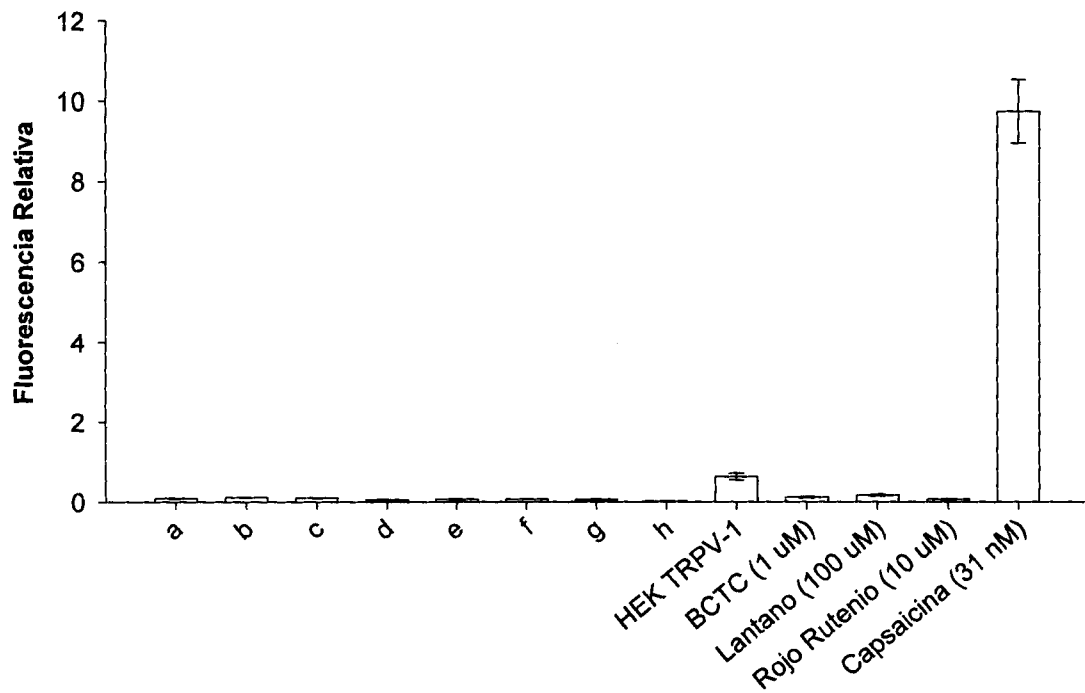


Fig. 19



11/13

Fig. 20

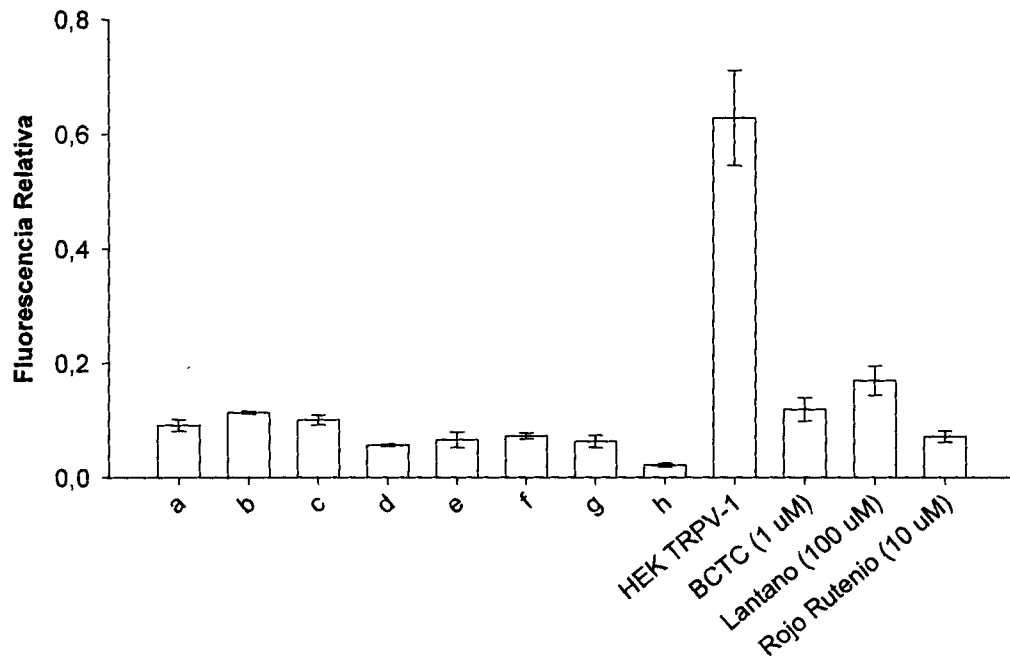
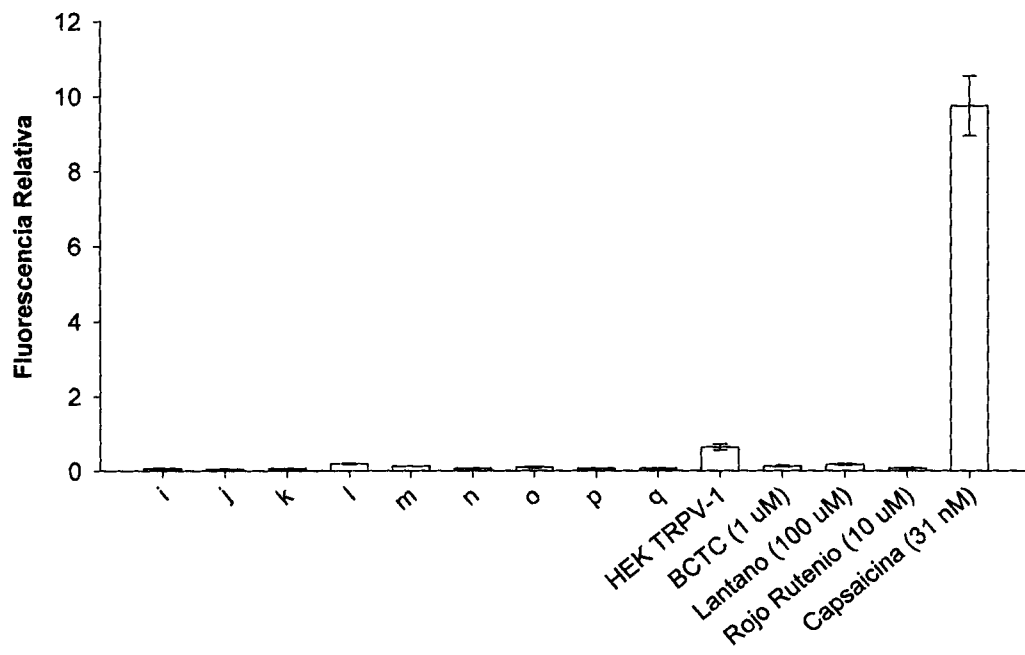


Fig. 21



12/13

Fig. 22

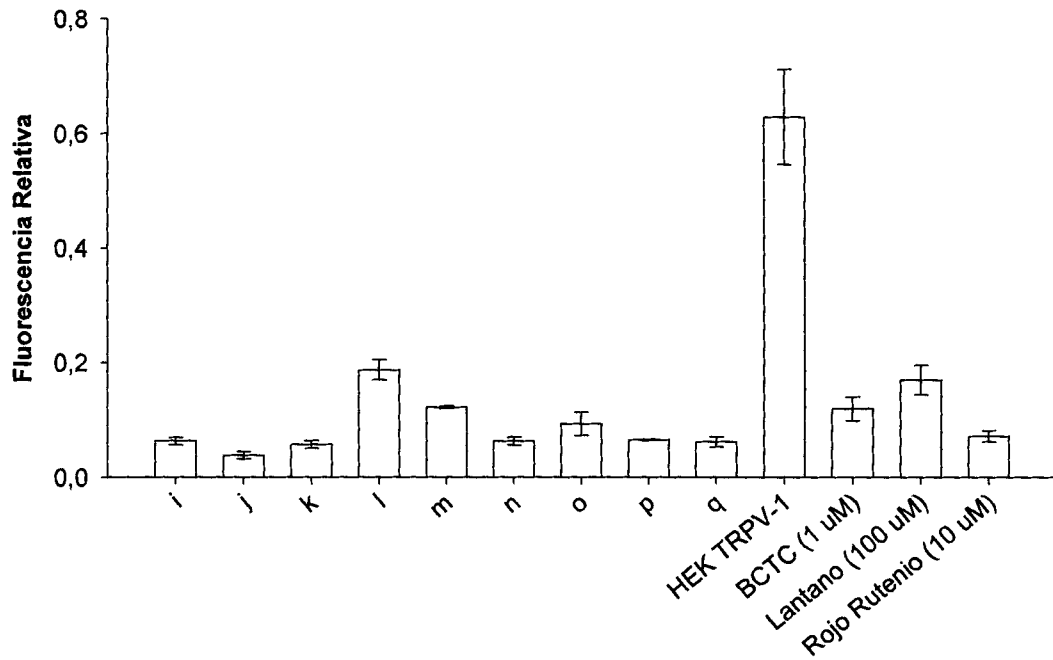
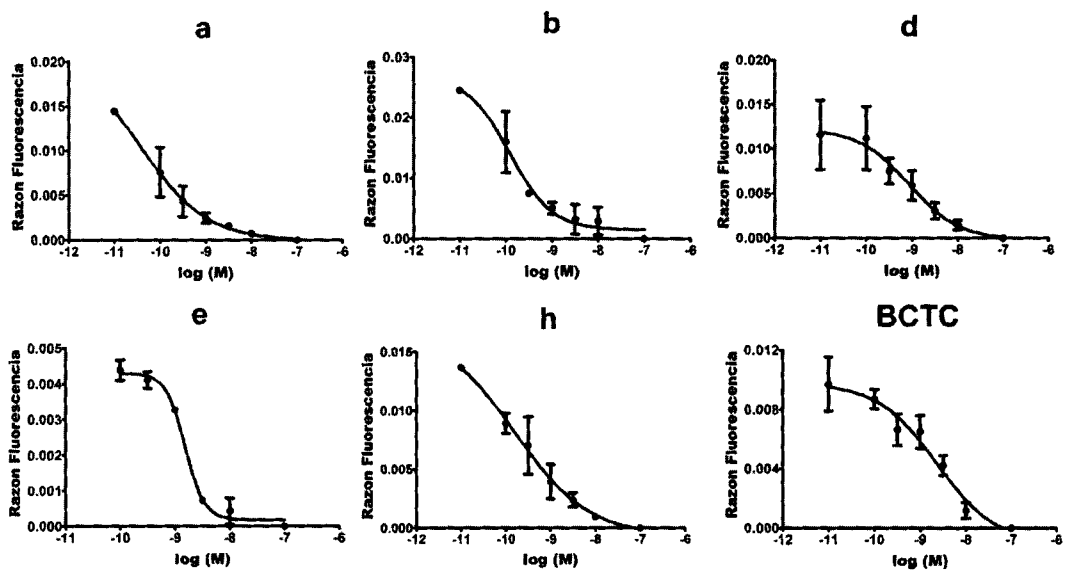
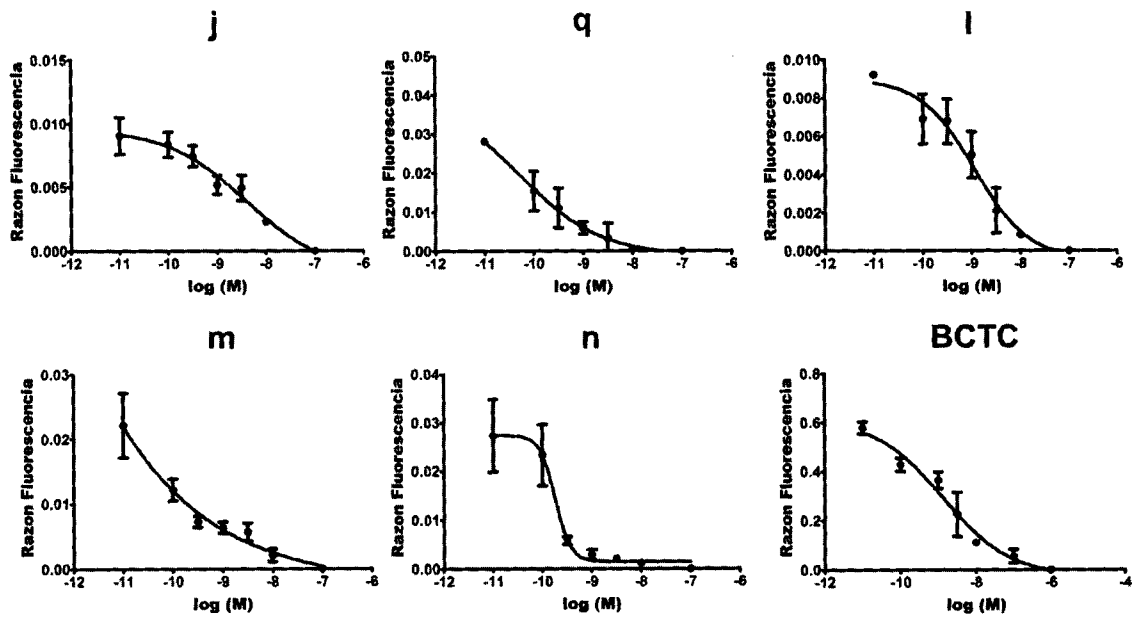


Fig. 23



13/13

Fig. 24



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL2013/000085

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0371438 A2 (WARNER LAMBERT CO) 06/06/1990, page 6	1-5,11-16
A	GOWRAMMA, B et al. Synthesis of 2-[(bis(2-chloroethyl)amino)acetamido]-5-substituted-1,3,4-thiadiazoles as possible alkylating anticancer agents. Asian Journal of Chemistry, 2006; Volumen 18, n° 4. Páginas 2705-2711, ISSN0970-7077, tabla 1, esquema 1.	1-5,11-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13/03/2014

Date of mailing of the international search report
(18/03/2014)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
H. Aylagas Cancio

Telephone No. 91 3498563

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL2013/000085

C (continuation).		
DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	REBOLLEDO C L et al. Design and synthesis of conformationally restricted capsaicin analogues based in the 1, 3, 4-thiadiazole heterocycle reveal a novel family of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonists. European Journal of Medicinal Chemistry 2013 Elsevier Masson SAS fra 00/00/2013 VOL: 66 Pags: 193 - 203 ISSN 0223-5234 (print) ISSN 1768-3254 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.ejmech.2013.05.001, the whole document.	1-5,11-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2013/000085

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-5, 11-16 (partly)**

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

SUPPLEMENTAL SHEET RELATING TO BOX III

The invention relates to compounds derived from 1,3,4-dithiazole alkyl amide and chalcones with activity as inhibitors of TRPV-1 receptor activation.

The international application lacks unity of invention because it comprises two inventions covered by the following claims:

Invention 1: Claims: 1-5 and claims 11-16 (in part). 1,3,4-dithiazole alkyl amide derivatives that inhibit the activation of the TRPV-1 receptor.

Invention 2: Claims: 6-10 and claims 11-16 (in part). Chalcone derivatives that inhibit the activation of the TRPV-1 receptor.

These two inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, and therefore do not meet the requirements of PCT Rule 13.1.

The problem addressed by the present application is that of providing new compounds that inhibit the activation of the TRPV-1 receptor and that are useful in diseases in which the TRPV-1 receptor is overactivated, such as chronic pain.

The first solution to this problem is the use of the compounds defined in figure 1 of the application, which are 1,3,4-dithiazole alkyl amide derivatives.

The second solution is the use of the compounds defined in formulae 2 and 3, which are chalcone derivatives.

Said compounds do not belong to the same family of compounds, that is to say, they do not share a common structure, and therefore each represents a different solution to the technical problem addressed.

Consequently, the requirement in respect of unity of invention is not met, since there is no technical relationship among the above-mentioned groups of claims involving a single general inventive concept (PCT Rule 13.1).

Moreover, there is no other identical or corresponding special technical feature that could substantiate a technical relationship among the above-mentioned inventions within the meaning of PCT Rule 13.2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2013/000085

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP0371438 A2	06.06.1990	GR3017688T T3 US5376670 A US5256680 A US5155122 A PT92451 A PT92451 B CA2004154 A1 CA2004154 C ZA8909073 A PH27025 A NO894742 A NO178623B B KR970004914B B1 JPH02270865 A JP2821208B B2 IE68850 B1 IE893785L L ES2075845T T3 DK599789 A DE68924044T T2 AU4562589 A AU631385B B2 AT127116T T NZ231534 A FI93954B B FI93954C C	31.01.1996 27.12.1994 26.10.1993 13.10.1992 31.05.1990 18.07.1995 29.05.1990 07.10.1997 31.07.1991 01.02.1993 30.05.1990 22.01.1996 08.04.1997 05.11.1990 05.11.1998 29.05.1990 29.05.1990 16.10.1995 30.05.1990 15.02.1996 21.06.1990 26.11.1992 15.09.1995 25.02.1992 15.03.1995 26.06.1995

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2013/000085

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D285/135 (2006.01)

A61K31/433 (2006.01)

A61P29/02 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/CL2013/000085

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C07D, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, XOPESP2, REGISTRY, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	EP 0371438 A2 (WARNER LAMBERT CO) 06/06/1990, página 6	1-5,11-16
A	GOWRAMMA, B et al. Synthesis of 2-[(bis(2-chloroethyl)amino)acetamido]-5-substituted-1,3,4-thiadiazoles as possible alkylating anticancer agents. Asian Journal of Chemistry, 2006; Volumen 18, n° 4. Páginas 2705-2711, ISSN0970-7077, tabla 1, esquema 1.	1-5,11-16

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
13/03/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
18 de marzo de 2014 (18/03/2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
N° de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
H. Aylagas Cancio
N° de teléfono 91 3498563

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/CL2013/000085

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
P,X	<p>REBOLLEDO C L et al. Design and synthesis of conformationally restricted capsaicin analogues based in the 1, 3, 4-thiadiazole heterocycle reveal a novel family of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonists. European Journal of Medicinal Chemistry 2013 Elsevier Masson SAS fra 00/00/2013 VOL: 66 Pags: 193 - 203 ISSN 0223-5234 (print) ISSN 1768-3254 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.ejmech.2013.05.001, todo el documento.</p>	1-5,11-16

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/CL2013/000085

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. Las reivindicaciones n^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Ver hoja adicional

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n^{os}:
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n^{os}: **1-5, 11-16 (en parte)**

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

HOJA ADICIONAL DE REC. III

El objeto de la invención son compuestos derivados de 1, 3, 4 ditiazol alquilamidas y de chalconas con actividad como inhibidores de la activación del receptor TRPV-1.

La solicitud internacional no tiene unidad de invención ya que comprende 2 invenciones cubiertas por la siguientes reivindicaciones:

Invención 1: Reivindicaciones 1-5 y reivindicaciones 11-16 (en parte). Compuestos derivados de 1, 3, 4 ditiazol alquilamidas inhibidores de la activación del receptor TRPV-1.

Invención 2: Reivindicaciones 6-10 y reivindicaciones 11-16 (en parte). Compuestos derivados de chalconas inhibidores la activación del receptor TRPV-1.

Estas dos invenciones no están relacionadas entre sí de forma que se integren en un único concepto inventivo general, incumpliendo por tanto los requisitos establecidos en la regla 13.1 PCT.

El problema que subyace en la presente solicitud es la provisión de nuevos compuestos inhibidores de la activación del receptor TRPV-1 útiles en enfermedades en las que el receptor TRPV-1 se encuentre sobreactivado, tales como el dolor crónico.

La primera solución a dicho problema es la utilización de compuestos definidos en la figura 1 de la solicitud que son derivados de 1, 3, 4 ditiazol alquilamidas.

La segunda solución es la utilización de compuestos definidos en las fórmulas 2 y 3 que son derivados de chalconas.

Los compuestos mencionados no pertenecen a la misma familia de compuestos, esto es, no comparten una estructura común, por lo que cada uno de ellos representa una solución distinta al problema técnico planteado.

Por lo tanto, el requisito de unidad de invención no se cumple, ya que no existe una relación técnica entre los grupos de reivindicaciones antes mencionadas de forma que se integren en un único concepto inventivo general (Regla 13.1 PCT).

Asimismo, no existe otro elemento técnico particular idéntico o correspondiente que pueda servir de base para establecer una relación técnica entre las invenciones arriba mencionadas en el sentido de la Regla 13.2 PCT.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/CL2013/000085

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
EP0371438 A2	06.06.1990	GR3017688T T3 US5376670 A US5256680 A US5155122 A PT92451 A PT92451 B CA2004154 A1 CA2004154 C ZA8909073 A PH27025 A NO894742 A NO178623B B KR970004914B B1 JPH02270865 A JP2821208B B2 IE68850 B1 IE893785L L ES2075845T T3 DK599789 A DE68924044T T2 AU4562589 A AU631385B B2 AT127116T T NZ231534 A FI93954B B FI93954C C	31.01.1996 27.12.1994 26.10.1993 13.10.1992 31.05.1990 18.07.1995 29.05.1990 07.10.1997 31.07.1991 01.02.1993 30.05.1990 22.01.1996 08.04.1997 05.11.1990 05.11.1998 29.05.1990 29.05.1990 16.10.1995 30.05.1990 15.02.1996 21.06.1990 26.11.1992 15.09.1995 25.02.1992 15.03.1995 26.06.1995

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C07D285/135 (2006.01)

A61K31/433 (2006.01)

A61P29/02 (2006.01)