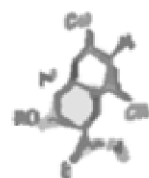
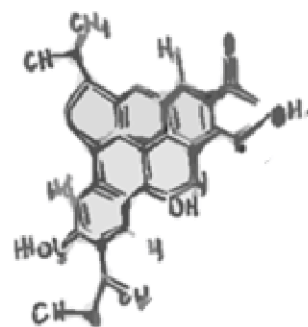
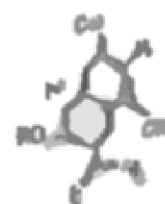


Hacia nuevos tratamientos para el Alzheimer: Estudio sintético y biológico de derivados 2-amidobenzotiazol

Towards new treatments for Alzheimer's disease: Synthetic and biological study of 2-amidobenzothiazole derivatives

Manuel Novás
González



Curso académico
2024-2025

Somos nuestra memoria,
somos ese quimérico museo de formas inconstantes,
ese montón de espejos rotos.

Elogio de la sombra (1969), Jorge Luis Borges

Tabla de contenido

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: PATOGÉNESIS Y TRATAMIENTOS ACTUALES	9
BASES DEL DISEÑO DE NUEVOS FÁRMACOS	12
<i>Interés del esqueleto benzotiazólico en el diseño de nuevos fármacos</i>	13
<i>Benzotiazoles en investigación frente a la enfermedad de Alzheimer</i>	15
<i>Interés de los sustituyentes trifluorometil y trifluorometoxi en el diseño de fármacos</i>	17
<i>Interés de las amidas en el diseño de fármacos</i>	18
MODELOS DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS.....	22
<i>Uso de la línea celular SH-SY5Y diferenciada como modelo de Alzheimer para HTS</i>	24
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS	29
<i>Procedimiento general de síntesis a partir de los cloruros de acilo comerciales: Reacción de Schotten-Baumann</i>	30
<i>Procedimiento de síntesis a partir de los ácidos carboxílicos comerciales: Reacción two-step para la obtención de 5-bromo-N-(6-(trifluorometoxi)benzo[d]tiazol-2-il)nicotinamida</i>	30
<i>Procedimiento de síntesis a partir de los ácidos carboxílicos comerciales: Reacción one-pot para la obtención de N-(benzo[d]tiazol-2-il)benzamida</i>	31
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS Y DETERMINACIÓN DE LA PUREZA	32
<i>Resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C</i>	32
<i>Espectrometría de masas y puntos de fusión</i>	32
<i>Determinación del grado de pureza por HPLC</i>	33
EVALUACIÓN BIOLÓGICA: MODELO FENOTÍPICO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	33
<i>Línea celular SH-SY5Y</i>	33
<i>Mantenimiento de la línea celular y sembrado</i>	34
<i>Diferenciación celular</i>	34
<i>Transfección química</i>	35
<i>Adición de los compuestos</i>	35
<i>Ensayo de calcio intracelular</i>	35
<i>Análisis de resultados</i>	37
PREDICCIÓN DE PROPIEDADES ADME.....	38

FIGURAS, GRÁFICAS Y ESQUEMAS	38
RESULTADOS	39
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS 2-AMIDOBENZOTIAZOL	39
CRIBADO BIOLÓGICO DE LOS FÁRMACOS SINTETIZADOS.	56
PREDICCIÓN DE PROPIEDADES ADME.....	61
DISCUSIÓN.....	63
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS	63
PREDICCIÓN DE PROPIEDADES ADME.....	68
ENSAYO DE FLUJO DE ENTRADA DE CALCIO EN MODELO FENOTÍPICO DE ALZHEIMER	69
CONCLUSIONES	73
AGRADECIMIENTOS	75
BIBLIOGRAFÍA.....	77

Resumen

El Alzheimer es la forma más frecuente de demencia, siendo el coste asociado a estas enfermedades una carga creciente para las economías mundiales. Su tratamiento actual es meramente sintomático por lo que la búsqueda de nuevos fármacos capaces de alterar el curso de la enfermedad resulta de gran interés. Fármacos en la terapéutica actual para otras enfermedades neurodegenerativas como el riluzol cuentan con un esqueleto común de 2-aminobenzotiazol que les confieren de interesantes propiedades neuroprotectoras mediante captación de ROS o antagonismo NMDA. Se llevó a cabo la síntesis y caracterización de una familia de 14 compuestos con estructura de 2-amidobenzotiazol mediante la reacción de Schotten-Baumann y diferentes metodologías en una o dos etapas de formación de amidas, y se evaluaron 51 compuestos en un modelo fenotípico de células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico y péptido similar al glucagón tipo 1 y transfectadas con las mutaciones MAPT P301L y APP V717I para comprobar su actividad protectora frente al daño inducido por la agregación de β -amiloide y tau hiperfosforilada mediante cribado de alto rendimiento. Se estudió la actividad de dichos compuestos en un ensayo de excitabilidad neuronal tras despolarización con KCl mediante la medida de los niveles de calcio intracelular. La formación de amidas vía cloruro de acilo constituyó un método eficaz de síntesis obteniéndose productos con rendimientos superiores al 30% y grados de pureza superiores al 95%. Dos compuestos de los 51 evaluados fueron capaces ejercer un efecto neuroprotector frente al daño inducido preservando la capacidad de excitabilidad celular.

Palabras clave: Benzotiazol, neuroprotección, Alzheimer, cribado de alto rendimiento, Schotenn-Baumann, células SH-SY5Y

Abstract

Alzheimer's disease is the most common cause of dementia, and the cost associated to these diseases represents a staggering weight for world economies. Its current treatment is merely symptomatic, thus making the search for new drugs capable of altering the course of the disease of great interest. Drugs currently in therapeutics for other neurodegenerative diseases such as riluzole share a common scaffold of 2-aminobenzothiazole that confers them interesting neuroprotective properties through ROS scavenging or NMDA antagonism. The synthesis and chemical characterization of a family of 14 compounds with 2-amidobenzothiazole structure was carried out using the Schotten-Baumann reaction and one-pot/two-step amide formation methodologies and 51 compounds were evaluated in a phenotypic model of SH- SY5Y cells differentiated with retinoic acid and glucagon-like peptide 1 and transfected with MAPT P301L and APP V717I mutations to test their protective activity against β -amyloid and hyperphosphorylated tau aggregation-induced damage by high-throughput screening. The activity of these compounds was studied in a neuronal excitability assay after depolarization with KCl by measuring intracellular calcium levels. The formation of amides via acyl chloride constituted an efficient method of synthesis obtaining products with yields higher than 30% and purities higher than 95%. Two compounds out of the 51 evaluated were able to exert a neuroprotective effect against the induced damage by preserving the cellular excitability capacity.

Keywords: Benzothiazole, neuroprotection, Alzheimer's disease, high-throughput screening, Schotten-Baumann, SH-SY5Y cells.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Alzheimer: Patogénesis y tratamientos actuales

La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia, representando entre el 60% y el 70% de todos los casos de demencia a nivel mundial. Las diferentes formas de demencia suponen un coste para las economías mundiales de alrededor de 1,3 trillones de dólares anuales [1]. Sus causas principales son la acumulación extracelular de placas de β -amiloide ($A\beta$) y la formación de ovillos neurofibrilares (ON) intracelulares formados por tau hiperfosforilada con una pérdida progresiva de neuronas y gliosis (Figura 1).

La proteína precursora de amiloide (APP) es una proteína transmembrana presente en varios tipos celulares, entre ellos las neuronas y que se procesa mediante dos vías, la amiloidogénica que lleva a la formación de placas de $A\beta$ y la antiamiloidogénica. En la vía amiloidogénica, APP se escinde por la β -secretasa y posteriormente por la γ -secretasa dando lugar a varios péptidos $A\beta$, principalmente $A\beta_{42}$ y $A\beta_{40}$. $A\beta_{42}$ es más propenso a agregarse y formar placas neurotóxicas debido a su baja solubilidad. Las unidades catalíticas de la γ -secretasa son las presenilinas (PSEN1 y PSEN2) y mutaciones en ellas pueden aumentar la producción de péptidos $A\beta$ por la vía amiloidogénica. En la vía antiamiloidogénica primero actúa la α -secretasa y posteriormente la γ -secretasa no produciéndose $A\beta_{42}$ ni $A\beta_{40}$ [2].

Tau es el principal componente de los ON. Se trata de una proteína que regula la estabilidad de los microtúbulos y el tráfico vesicular normal dentro de la neurona. El gen MAPT codifica para tau y su *splicing* alternativo da lugar a 6 isoformas que sufren modificaciones postraduccionales (fosforilación, ubiquitinación, acetilación, metilación y glucosilación). La hiperfosforilación en los residuos S199, S202, S205, T231, y S262 se asocia con una mayor carga de la enfermedad por formación de ON ya que produce su traslocación al compartimento somatodendrítico donde, debido a su baja solubilidad, se agrega y forma ON impidiendo que pueda estabilizar los microtúbulos [2].

Se ha demostrado también que en la enfermedad de Alzheimer se produce una desregulación de la función mitocondrial debido, entre otros, a la edad. El estrés oxidativo es un desequilibrio entre moléculas prooxidantes y antioxidantes debido a una alteración en reacciones redox que lleva a daño de macromoléculas [3]. Algunas especies prooxidantes son las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (NOS) entre las que se

encuentran el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH\cdot$), óxido nitroso (NO) y peroxinitrito ($ONOO\cdot$). Químicamente se consideran radicales libres a átomos, moléculas o iones que presentan un electrón desapareado en su capa de valencia por lo que no todas las ROS o NOS son radicales libres, aunque si son capaces de dar lugar a ellos mediante reacciones catalizadas generalmente por iones metálicos como la reacción de Fenton que produce $OH\cdot$ a partir de H_2O_2 y un catalizador de Fe, generalmente Fe^{2+} [4]. Otros metales involucrados en este tipo de reacciones y que se acumulan en neuronas afectadas por Alzheimer son el Zn, Mn y el Cu [3]. Existen enzimas como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasas que eliminan ROS transformándolos en especies menos reactivas. En la enfermedad de Alzheimer se produce un desbalance entre la producción y eliminación de ROS y NOS, llevando a la acumulación de estas especies altamente reactivas que producen la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daños en el DNA [4].

Por último, se producen alteraciones a nivel de la sinapsis. El Ca^{2+} juega un papel fundamental en la mediación de la transmisión sináptica. La entrada de Ca^{2+} en la neurona a través de canales dependientes de voltaje lleva a la liberación de vesículas con neurotransmisores al espacio sináptico. La acumulación de $A\beta$, tau hiperfosforilada y ROS produce alteraciones en los receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA) de glutamato, receptores ionotrópicos asociados a un canal de Ca^{2+} y activados por el glutamato [3]. Los péptidos $A\beta$ son capaces de activar estos receptores llevando a una entrada masiva de Ca^{2+} en la neurona que desregula la homeostasis de este ion produciendo muerte neuronal por excitotoxicidad. Otra vía neuronal afectada es el sistema colinérgico, sobre todo las células colinérgicas del prosencéfalo basal que proyectan al cortex y el hipocampo, implicadas en la memoria, atención y emociones [5].

Existen dos tipos de enfermedad de Alzheimer, la familiar o también conocida como de inicio temprano y la esporádica o de inicio tardío. El Alzheimer familiar es el más raro y afecta entre un 1-5% de los pacientes. Se manifiesta entre los 35-50 años y se debe a mutaciones que alteran principalmente la agregación de proteínas [6]. La mutación APP V717I es la mutación de APP más común y supone el cambio de una valina por una isoleucina en el sitio 717 de la proteína, cerca del lugar de corte de la γ -secretasa lo que lleva a un aumento de la ratio de $A\beta_{42/40}$ [7]. El Alzheimer esporádico afecta a pacientes a partir de los 65 años y no presenta un patrón hereditario claro. Existen factores de riesgo como la presencia de una copia del gen ApoE $\epsilon 4$ que aumenta hasta 3 veces la posibilidad de desarrollar Alzheimer, subiendo a 8-12 veces si se

presentan las dos copias de este gen. No obstante, la existencia de estas formas de ApoE no asegura el desarrollo de Alzheimer en un futuro [8].

Existen un total de 6 fármacos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Figura 1):

Los anticuerpos monoclonales lecanemab-irmb y donanemab-azbt son capaces de alterar la progresión de la enfermedad por su unión a las protofibrillas de A β solubles evitando su agregación lo que previene la formación de placas [9]. Estos tratamientos anti-amiloideos pueden tener efectos adversos como reacciones alérgicas o anomalías de imagen relacionadas con amiloide y su eficacia observada en los ensayos clínicos tiene baja relevancia clínica [10]. Estos son los únicos dos fármacos destinados a evitar el avance de la enfermedad de Alzheimer aprobados por la FDA. Sin embargo, esta es un área de constante investigación lo que se refleja en la existencia de 156 ensayos clínicos en enero de 2023 que buscan terapias modificadoras de la enfermedad [11].

El resto de los fármacos aprobados (donepezilo, rivastigmina, galantamina, y memantina) solo tratan los síntomas de la enfermedad, pero no son capaces de evitar su progresión. Donepezilo, rivastigmina y galantamina son inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) y en el caso de la rivastigmina también de la butirilcolinesterasa (BuChE). Según la hipótesis colinérgica de la enfermedad, el Alzheimer se produce por una disminución de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina por lo que el bloqueo las enzimas que lo degradan, las colinesterasas, constituye una estrategia que permite mejorar la función cognitiva y neuronal. Algunos de sus efectos adversos son de tipo colinérgico como náuseas, hipotensión, bradicardia, sialorrea o incontinencia urinaria [12]. La memantina es un antagonista no competitivo del receptor NMDA y un agonista dopaminérgico que solo se encuentra aprobado para pacientes con Alzheimer moderado a severo (valores de *mini-mental state examination* MMSE>15) como monoterapia o en combinación con donepezilo. La memantina es capaz de evitar el declive neuronal al proteger a las neuronas del efecto sobreexcitatorio del glutamato sobre el receptor NMDA [12].

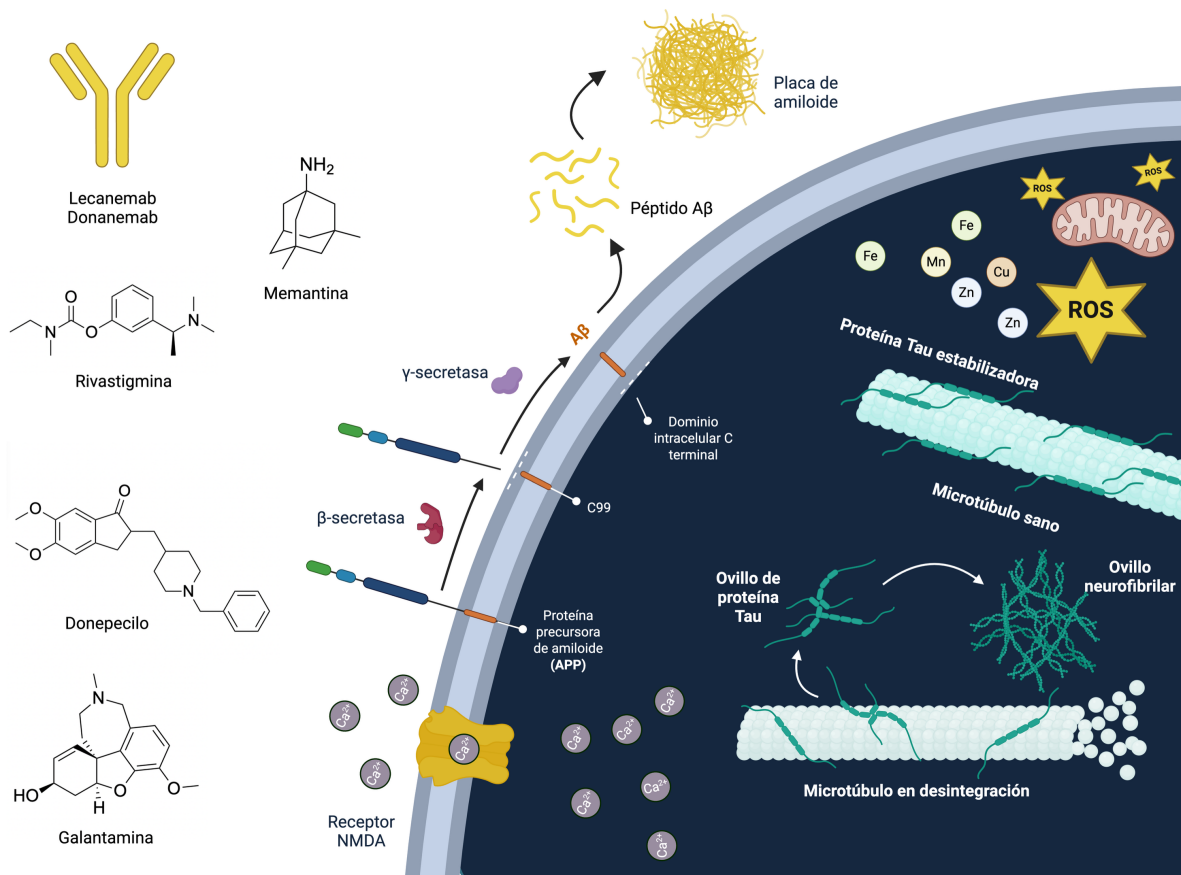


Figura 1. Mecanismos y tratamientos de la enfermedad de Alzheimer.

Bases del diseño de nuevos fármacos

El diseño de fármacos es una etapa esencial en el descubrimiento temprano de nuevas terapias. Entre las estrategias más empleadas destaca el diseño racional que consiste en partir del conocimiento de la estructura de la diana terapéutica para diseñar moléculas capaces de interactuar con ella de manera específica y selectiva. Otra estrategia es el cribado de alto rendimiento (HTS) que consiste en la evaluación de miles de compuestos mediante ensayos automatizados para identificar posibles *hits* sin necesidad de conocer *a priori* la estructura de la diana. El diseño basado en ligandos es otra estrategia que no depende del conocimiento de una diana, sino que se basa en analizar compuestos bioactivos ya conocidos para diseñar y sintetizar nuevas moléculas activas mediante estudios de relación estructura-actividad o la identificación de farmacóforos. Por último, la hibridación molecular consiste en combinar fragmentos de diferentes fármacos o moléculas activas en una sola entidad química para obtener una nueva

molécula más potente o capaz de actuar sobre varias dianas simultáneamente. A menudo en el proceso de diseño de fármacos conviven una combinación de varias técnicas (Figura 2) incluyendo técnicas de química asistida por ordenador [13].

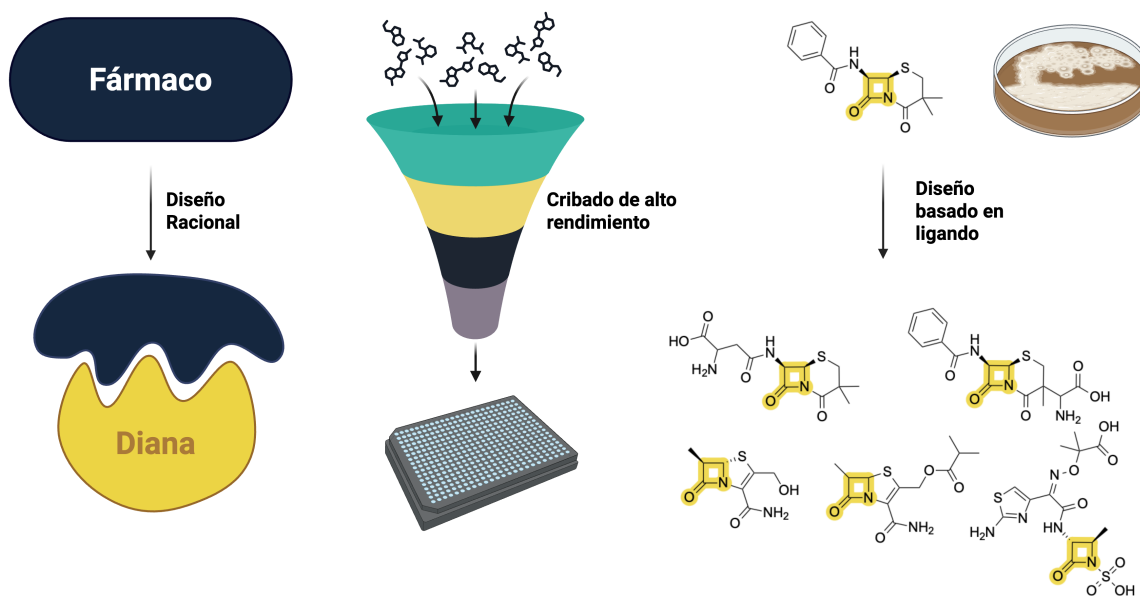


Figura 2. Técnicas de diseño de fármacos más empleadas en química farmacéutica.

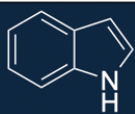
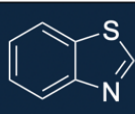
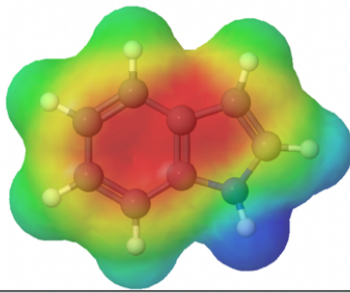
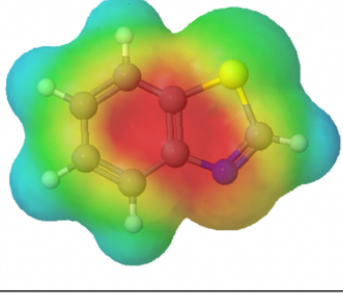
Interés del esqueleto benzotiazólico en el diseño de nuevos fármacos

El benzotiazol es un biciclo formado por un anillo aromático de 6 miembros fusionado con un anillo de 5 miembros heteroaromático que cuenta con un átomo de azufre y un átomo de nitrógeno en posiciones 1 y 3 respectivamente (benzo[*d*][1,3]tiazol).

Las estructuras bicíclicas se encuentran de manera muy habitual en compuestos tanto de origen natural como sintéticos con interés biológico, siendo el indol el anillo más común. El indol está presente en neurotransmisores como la serotonina o melatonina que derivan del triptófano y en un gran número de alcaloides. Sin embargo, la alta nucleofilia del anillo indólico (energía HOMO elevada, sistema π excedente) hace que tenga una gran inestabilidad metabólica, interferencia en ensayos (compuestos PAINS) y en algunos casos el dador de enlaces de hidrógeno NH puede ser innecesario en función de las necesidades de la unión con la diana. Por ello habitualmente se recurre a isosterías de anillo en las que el indol se intercambia por un anillo equivalente siendo el 1,3-benzotiazol una de las alternativas menos exploradas. El 1,3-

benzotiazol presenta una mayor electrofilia (energía LUMO más baja, sistema π deficiente) (Tabla 1) por lo que tiene una mayor unión a proteínas plasmáticas y estabilidad metabólica que el indol lo que aumenta, generalmente, los tiempos de vida media de los fármacos que lo contienen [14].

Tabla 1. Características químicas de los heterociclos indol y 1,3-benzotiazol. Mapas de potencial electrostático en el rango -0.1 a 0.1 obtenidos con *MolCalc*[®], siendo los colores cálidos mayor y azul menor densidad electrónica.

	 Indol	 1,3-benzotiazol
Mapa de potencial electrostático		
Dadores de enlaces de hidrógeno	1	-
Aceptores de enlaces de hidrógeno	-	1
Estabilidad metabólica	Menor	Mayor

Realizando una búsqueda en la base de datos *DrugBank* se encuentran un total de 3 fármacos aprobados en el mercado europeo (riluzol, flutemetazol y lurasidona) (Figura 3) y 10 en el mercado estadounidense que contienen este heterociclo en su estructura. Existen también un total de 53 compuestos en investigación o de uso experimental con este esqueleto, muchos de ellos para enfermedades neurodegenerativas como Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), Alzheimer y Párkinson.

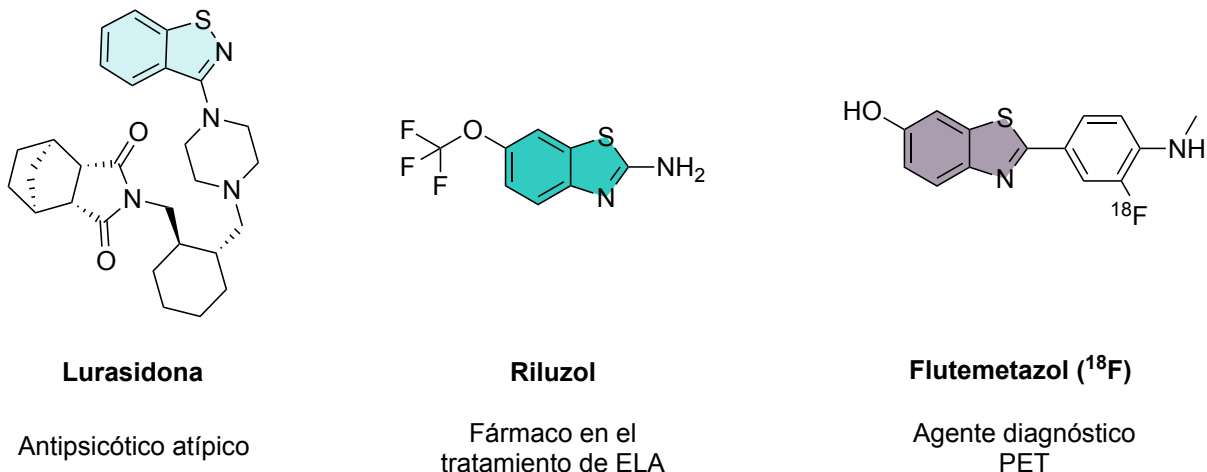


Figura 3. Estructura de los fármacos aprobados por la EMA que presentan un heterociclo benzotiazólico. Fuente: *DrugBank*

El riluzol y la edaravona son los únicos fármacos aprobados para el tratamiento de la ELA en Europa. El primero se considera un neuroprotector no específico con un mecanismo de acción desconocido. Se hipotetiza que actúa inhibiendo canales de sodio dependientes de voltaje, reduciendo la liberación de neurotransmisores como antagonista no competitivo del receptor NMDA, inhibiendo la liberación de glutamato y aumentando la reabsorción de glutamato por los astrocitos [15]. Este fármaco es capaz de alargar la vida de los pacientes unos meses y retrasar el uso de terapias de soporte invasivas como traqueotomías o ventilaciones mecánicas, pero tiene una baja eficacia en el aumento de la fuerza muscular [16].

Benzotiazoles en investigación frente a la enfermedad de Alzheimer

Una de las características más destacadas de los benzotiazoles como agentes terapéuticos en investigación para la enfermedad de Alzheimer es su habilidad de interactuar con las placas de A β . De hecho, la tioflavina-T (Figura 4) es un conocido marcador neurohistológico para A β y presenta una estructura de 2-arylbenzotiazol [17]. Cuando la tioflavina-T se une a las placas de A β es capaz de aumentar su fluorescencia sirviendo así de marcador *in vitro* de la agregación. No obstante, la selectividad de la tioflavina-T no es muy elevada pudiéndose unir a otros péptidos amiloidogénicos distintos de A β como α -sinucleína o proteínas priónicas [18]. Realizando cambios estructurales se ha conseguido aumentar su selectividad lo que ha permitido elaborar algunos radiotrazadores de A β con interesantes aplicaciones *in vivo* [19–21]. Esta capacidad de los benzotiazoles de interactuar con A β ha demostrado ser efectiva a nivel terapéutico en modelos *in vitro* [22]. En otro estudio, Asgarshamsi *et al.* sintetizaron compuestos híbridos

benzotiazol-resveratrol que eran capaces de reducir la agregación de A β a concentraciones de 50 μ M [23].

En la actualidad se están buscando compuestos que no solo sean capaces de reducir la agregación de A β , sino que también sean capaces de quelar los iones de cobre, hierro y zinc que promueven la agregación de A β , así como la formación de ROS, es lo que se denominan quelantes bifuncionales. Sharma *et al.* han desarrollado compuestos de estructura benzotiazólica (Figura 4) capaces de actuar con una afinidad moderada como quelantes de Cu $^{2+}$ y Zn $^{2+}$ así como de controlar la formación de placas y oligómeros neurotóxicos de A β 42 [24].

Otros compuestos bifuncionales en investigación son los inhibidores de AChE combinados con el esqueleto de benzotiazol para conseguir un efecto antiagregante de A β . Por ejemplo, en un trabajo de Telpoukhovskaia *et al.* se incluyó un sustituyente con el grupo funcional carbamato (presente en inhibidores de la AChE como rivastigmina) con este objetivo (Figura 2). Además, la rotura del carbamato liberaría un anillo fenólico con grupos hidroxilo libres, el 2-(2-hidroxifenil)-benzotiazol, que ha demostrado ser capaz de quelar iones de Zn $^{2+}$ y Cu $^{2+}$. Por tanto, estos compuestos tendrían una triple funcionalidad, inhibir la agregación de A β 42 por ser arilbenzotiazoles, inhibir la AChE por el carbamato y quelar metales. Sin embargo, los resultados de estas moléculas no fueron excepcionales, pudiendo solo ejercer un efecto sinérgico positivo leve [25].

En un trabajo de Zaldivar-Diez *et al.* se llevó a cabo la síntesis de derivados de 2-amidobenzotiazol con una cola de fenilmorfolina como inhibidores de la kinasa LRRK2 (Figura 4). La inhibición de LRRK2 de estos compuestos resultó en un aumento de la neurogénesis. Algunos compuestos demostraron además aumentar la oligodendrogénesis en ensayos posteriores [26].

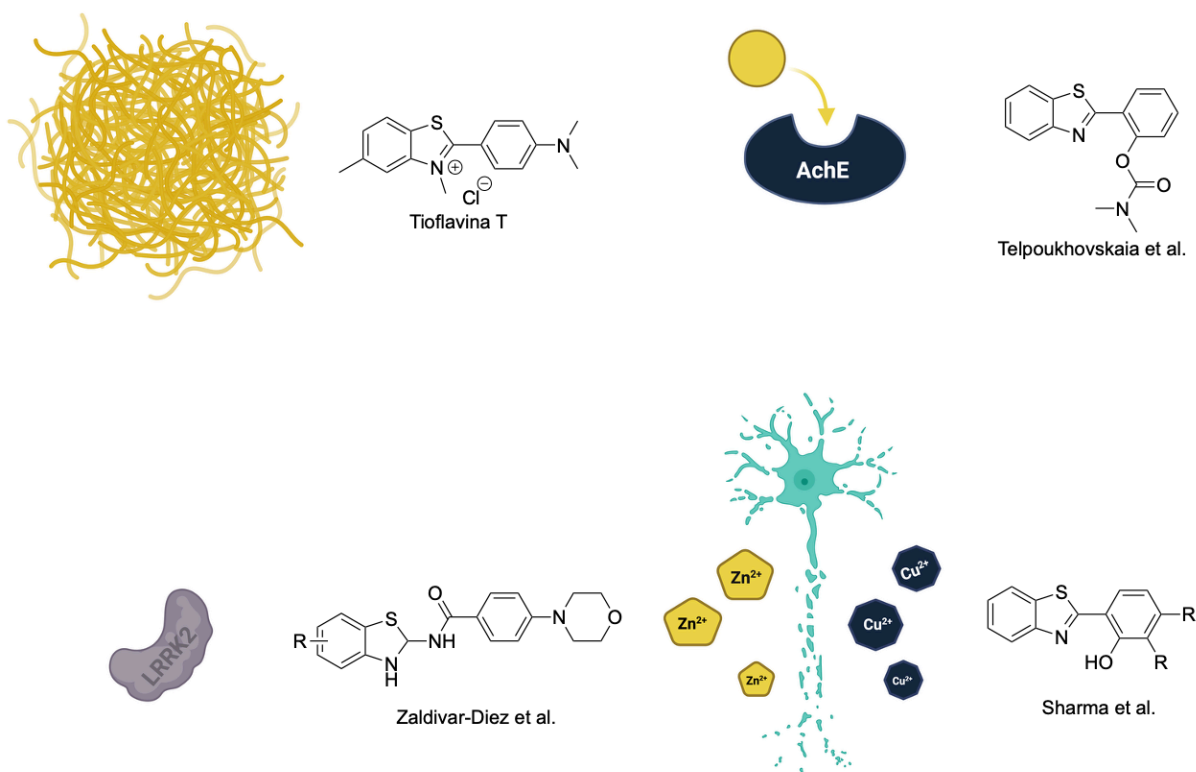


Figura 4. Algunas moléculas en investigación para el tratamiento de Alzheimer basadas en el anillo de benzotiazol.

Interés de los sustituyentes trifluorometil y trifluorometoxi en el diseño de fármacos

El átomo de flúor suscita un gran interés en química farmacéutica por ser un sustituyente pequeño (1,47 Å) capaz de remplazar al hidrógeno (1,20 Å) en enlaces C-H debido a su semejanza estérica. Su elevada lipofilia unida a su elevada electronegatividad (4.0 en la escala de Pauling) que le permite actuar como un potente atractor de electrones son parte de la explicación de su gran uso en el diseño de nuevos fármacos. En la actualidad, alrededor de un 10% de los fármacos comercializados contienen flúor [27]. En este trabajo se han realizado sustituciones con dos grupos que contienen flúor, el grupo trifluorometil (CF₃) y el grupo trifluorometoxi (OCF₃) debido a su interés químico y biológico.

Actualmente existen un total de 5 fármacos con el grupo OCF₃ en su estructura, el riluzol (para ELA), el sonidegib (para cáncer), el delamanid y el pretomanid (para tuberculosis) y el celikalim (para hipertensión arterial). Además, está presente en compuestos agroquímicos como pesticidas, herbicidas y fungicidas [28]. Este sustituyente presenta grandes ventajas

metabólicas frente al grupo metoxilo pues su elevado impedimento estérico dificulta que enzimas como el CYP450 puedan acceder y oxidar el enlace O-C reduciendo las posibilidades de que se produzca una desmetilación oxidativa. Además, el efecto electroatractor de los átomos de flúor reduce la densidad electrónica del átomo de oxígeno reduciendo su susceptibilidad a ser oxidado. Este efecto reduce así mismo, la capacidad del oxígeno de ser aceptor de enlaces de hidrógeno lo que reduce su interacción con enzimas metabólicas [29]. Tiene un gran interés por ser uno de los sustituyentes más lipófilos con un parámetro π de Hansch de +1,04 [30].

El grupo CF_3 es de los grupos con flúor más utilizado en fármacos. Su adición aumenta la lipofilia de las moléculas, aunque en una menor medida que el grupo OCF_3 , con valores de $\pi = +0,88$ [30]. De nuevo, el enlace C-F es uno de los más fuertes debido a su alta polaridad, con valores de energía de enlace de 485,3 KJ/mol frente a 414,2 KJ/mol del enlace C-H lo que explica la elevada resistencia metabólica de este sustituyente. El grupo CF_3 se emplea habitualmente como bioisostero de átomos de cloro debido a su semejanza estérica, 1,30 Å y 0,99 Å respectivamente [30]. La adición de este grupo ha permitido mejorar la solubilidad, lipofilia, perfil farmacocinético y selectividad de la unión de moléculas en múltiples ocasiones [31].

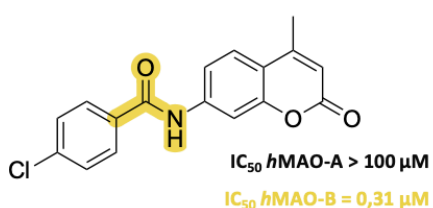
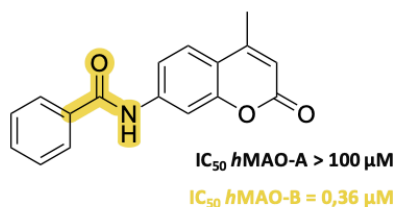
Interés de las amidas en el diseño de fármacos

Las amidas son un grupo funcional que presenta un gran interés en la química farmacéutica pues se encuentran en un número elevado de moléculas con actividad biológica, entre las que destacan péptidos y proteínas, así como fármacos en investigación y comercializados. Algunos de estos fármacos son la lidocaína, el paracetamol, la atorvastatina, las penicilinas, el captoprilo y el metotrexato. Se considera un grupo farmacofórico en un gran número de fármacos como por ejemplo los anticonvulsivantes [32].

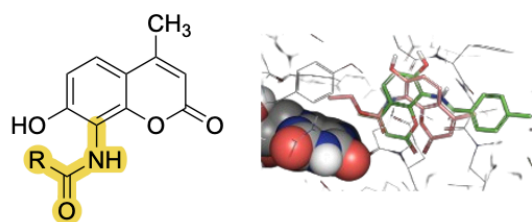
Las amidas cuentan con dos formas tautoméricas (ceto-imidol) siendo la predominante el tautómero ceto que contiene dos lugares de formación de enlaces de hidrógeno, la amina que actúa como dador y el carbonilo que actúa como aceptor. El par de electrones libres de la amina no puede actuar como aceptor de enlaces de hidrógeno pues se encuentra en resonancia con el grupo carbonilo.

En trabajos previos del grupo la inclusión del grupo amida al esqueleto cumarínico dio lugar a una familia de potentes y selectivos inhibidores de la monoaminoxidasa A (MAO-A) [33] así como inhibidores de la AChE y MAO-B [34].

Inhibidores selectivos de la MAO-B

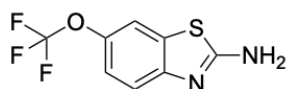


Inhibidores selectivos de la MAO-A



R	$IC_{50} \text{ hMAO-A}$ (nM)	Índice de selectividad hMAO-A
OCH_2CH_3	22.0	> 4,545.45
	15.0	> 6,666.67

Riluzol



Nuevas moléculas

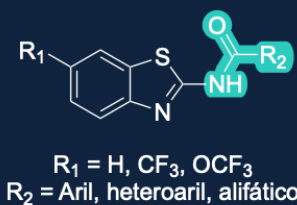
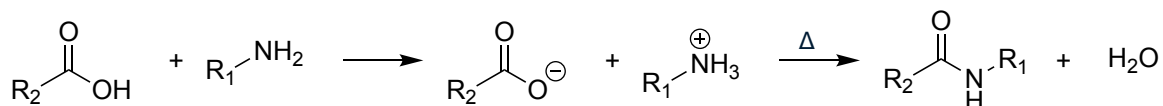


Figura 5. Antecedentes del grupo GI-1606 I+D de Fármacos en el diseño de fármacos para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central y nuevas perspectivas.

Reacciones de formación de amidas

La formación de amidas a partir de una amina primaria o secundaria y un ácido carboxílico resulta complicada pues la reacción que es termodinámicamente más favorecida es la reacción ácido/base en la que se produce la formación de un carboxilato y una sal de amonio (Esquema 1). Para que la formación de la amida ocurriese, el O^- del carboxilato debería actuar como grupo saliente formando O^{2-} que no es un buen grupo saliente. La única manera de formar una amida a partir de un ácido carboxílico es calentando la mezcla a temperaturas mayores de 100°C mediante una reacción de pirólisis que permite la transferencia protónica de la sal de amonio al carboxilato dando lugar a la liberación de un equivalente de agua y la formación de la amida (Esquema 1) [35].

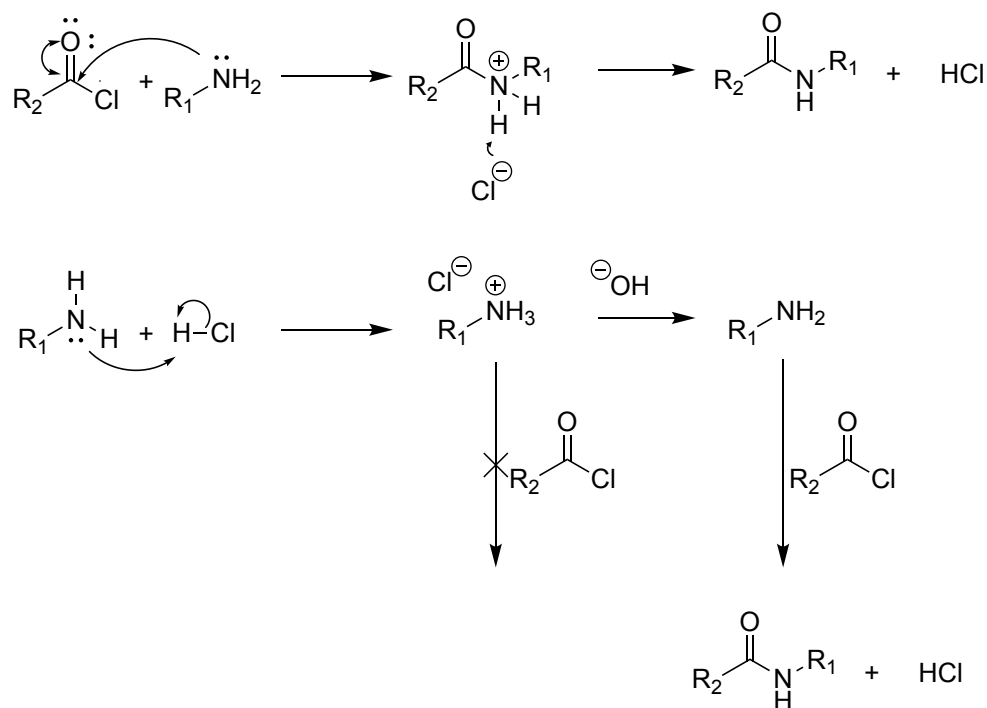


Esquema 1. Reacción de pirólisis para la formación de amidas a partir de aminas y ácidos carboxílicos.

Esta reacción resulta muy poco eficiente ya que calentar a temperaturas extremas puede suponer la degradación de algunos de los reactivos. Es por ello por lo que existen las alternativas que se presentan a continuación.

Uso de cloruros de acilo: Reacción de Schotten-Baumann

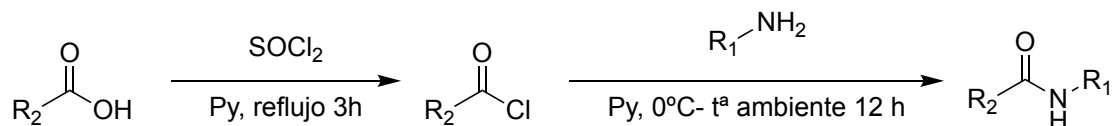
En esta reacción se emplean disolventes apróticos, una base adecuada, un cloruro de acilo y una amina primaria o secundaria. Las bases más empleadas son las aminas terciarias como la trietilamina o la piridina. La base permite desplazar el equilibrio hacia la formación de la amida debido a que, como consecuencia de la reacción, se forma HCl que puede reaccionar con la amina que aún no ha reaccionado y formar una sal de amonio, menos nucleofílica que la amina inicial y por tanto menos reactiva lo que reduciría los rendimientos (Esquema 2). La reacción transcurre a través de un mecanismo de sustitución nucleofílica acílica en la que se produce el ataque de la amina, que actúa como nucleófilo, y la eliminación del ion cloruro, que actúa como grupo saliente. La electronegatividad de los halógenos de los haluros de acilo hace que sean muy buenos grupos salientes y por tanto el derivado de ácido carboxílico más reactivo. Además, su elevada electronegatividad aumenta la electrofilia del carbono carbonílico, aumentando su reactividad. Sin embargo, esta elevada reactividad supone un problema en su manejo en el laboratorio pues se hidrolizan con facilidad en presencia de humedad ambiental dando el ácido carboxílico correspondiente [36]. Es por ello por lo que es importante trabajar en condiciones anhidras empleando, por ejemplo, montajes en atmósfera inerte (nitrógeno o argón) [37].



Esquema 2. Mecanismo de reacción simplificado de la reacción de Schotten-Baumann. Importancia de la adición de una base para el avance de la reacción.

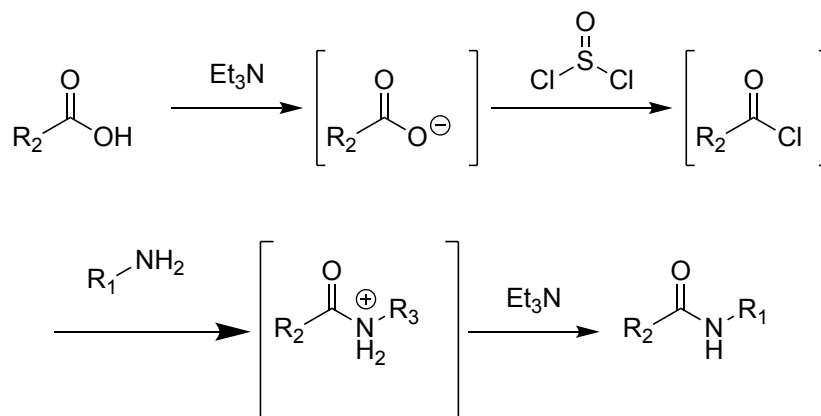
Formación de cloruro de ácido empleando cloruro de tionilo: Estrategia one-pot y two-step

Aunque los haluros de acilo se pueden obtener comercialmente, estos también se pueden sintetizar a partir de sus correspondientes ácidos carboxílicos y un agente halogenante. La formación de amidas a partir de ácidos carboxílicos a través de la formación de haluros de acilo (generalmente cloruros de acilo) se lleva a cabo habitualmente en dos etapas (*two-step*). En una primera reacción se convierte el ácido en el haluro de acilo haciéndolo reaccionar en una segunda reacción tipo Schotten-Baumann con la amina correspondiente para formar la amida. Para formar los cloruros de acilo se usan agentes clorinantes como cloruro de pivaloilo, cloruro de oxalilo o cloruro de tionilo (SOCl₂) [38,39]. El más usado es el SOCl₂ ya que es volátil por lo que se puede eliminar fácilmente por destilación y es coste-efectivo. Para la formación del cloruro de acilo se añade además piridina (Py) para acelerar la reacción y se calienta a reflujo hasta obtener el cloruro de acilo (Esquema 3).



Esquema 3. Formación de amidas empleando cloruro de tionilo como agente halogenante en dos etapas.

Sin embargo, se ha descrito que además de actuar como agente clorinante, el SOCl_2 es capaz de actuar como agente acoplante activando *in situ* el grupo carboxílico del ácido haciendo que aminas presentes en el medio puedan reaccionar con este intermedio reactivo generando la amida correspondiente. Esto permite que la reacción ocurra en una sola etapa de manera *one-pot* (Esquema 4) [37]. Inicialmente se forma el carboxilato que reacciona rápidamente con el SOCl_2 para dar el cloruro de acilo que, a su vez, reacciona rápidamente para dar la amida correspondiente. Se ha descrito que esta reacción transcurre a temperatura ambiente consiguiendo rendimientos cercanos al 100% con tiempos de reacción inferiores a 30 minutos [37].



Esquema 4. Formación de amidas a partir de ácidos carboxílicos usando cloruro de tionilo como agente acoplante en una sola etapa.

Modelos de enfermedad de Alzheimer en el descubrimiento de fármacos

En la evaluación preclínica de fármacos contra el Alzheimer, es esencial el uso de modelos que reproduzcan de forma fiel los procesos patológicos de esta enfermedad tan compleja. Se distinguen dos grandes grupos: modelos *in vitro* e *in vivo*, cada uno con ventajas e inconvenientes (Figura 6).

Los modelos *in vitro*, relevantes para este estudio, contribuyen a la regla de las tres R propuesta por Russel y Burch en 1960 que promueven reemplazar, reducir y refinar el uso de animales [40]. Entre ellos se encuentran las líneas celulares inmortalizadas, las células madre pluripotentes inducidas (iPS) y los cultivos en 3D.

Las **líneas celulares inmortalizadas** pueden dividirse indefinidamente, a diferencia de las normales. Proceden de tumores, como la SH-SY5Y, o son modificadas artificialmente mediante la inducción de algunos genes. Las más usadas en Alzheimer son SH-SY5Y (neuroblastoma humano), PC12 (feocromocitoma de rata) y LUHMES (mesencéfalo humano). Se emplean ampliamente en HTS por ser accesibles, coste-efectivas y reproducibles. Muchas son de origen humano y pueden diferenciarse en células tipo neuronal (*neuron-like cells*), lo que da mayor valor traslacional a los resultados. Sin embargo, no alcanzan las propiedades de las neuronas adultas, como la conectividad funcional, y su origen tumoral puede limitar su representatividad genética y fenotípica [41].

Las **iPS** son células pluripotentes, es decir, con capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales del embrión (endodermo, mesodermo y ectodermo) que surgen de la conversión de células somáticas diferenciadas mediante técnicas de reprogramación genética, como los factores de Yamanaka [42]. Existen modelos derivados de iPS humanas para ELA, Párkinson y Alzheimer [43–45]. Sin embargo, la reprogramación puede alterar factores epigenéticos como la metilación del DNA. En el caso del Alzheimer, podría restaurarse el epigenoma a un estado juvenil, perdiendo fenotipos clave del envejecimiento, como alteraciones mitocondriales o acortamiento de telómeros, fundamentales para modelar la enfermedad [46]. Además, la gran variabilidad genética que existe entre poblaciones humanas puede tener un cierto impacto en la variabilidad de los resultados obtenidos en ensayos con este tipo de células en función del paciente del que se hayan obtenido [42].

Los **cultivos en 3D** surgen ya que en los cultivos 2D se pierde muchas veces la formación de agregados proteicos aberrantes en el espacio extracelular debido, sencillamente, a la ausencia de un espacio intersticial. Además, algunos metabolitos de interés difunden en el medio de cultivo de los modelos 2D, ejerciendo efectos difusos. Se desarrollan incorporando células iPS o inmortalizadas en hidrogeles o *Matrigel* generando cultivos con andamiajes [47,48] o autoensamblados como organoides [49,50]. Sin embargo, su complejidad impide su uso en

cribado masivo. La heterogeneidad en su formación y la distribución desigual de fármacos a través del organoide [51] o matriz [52] afecta a la reproducibilidad y traslacionalidad.

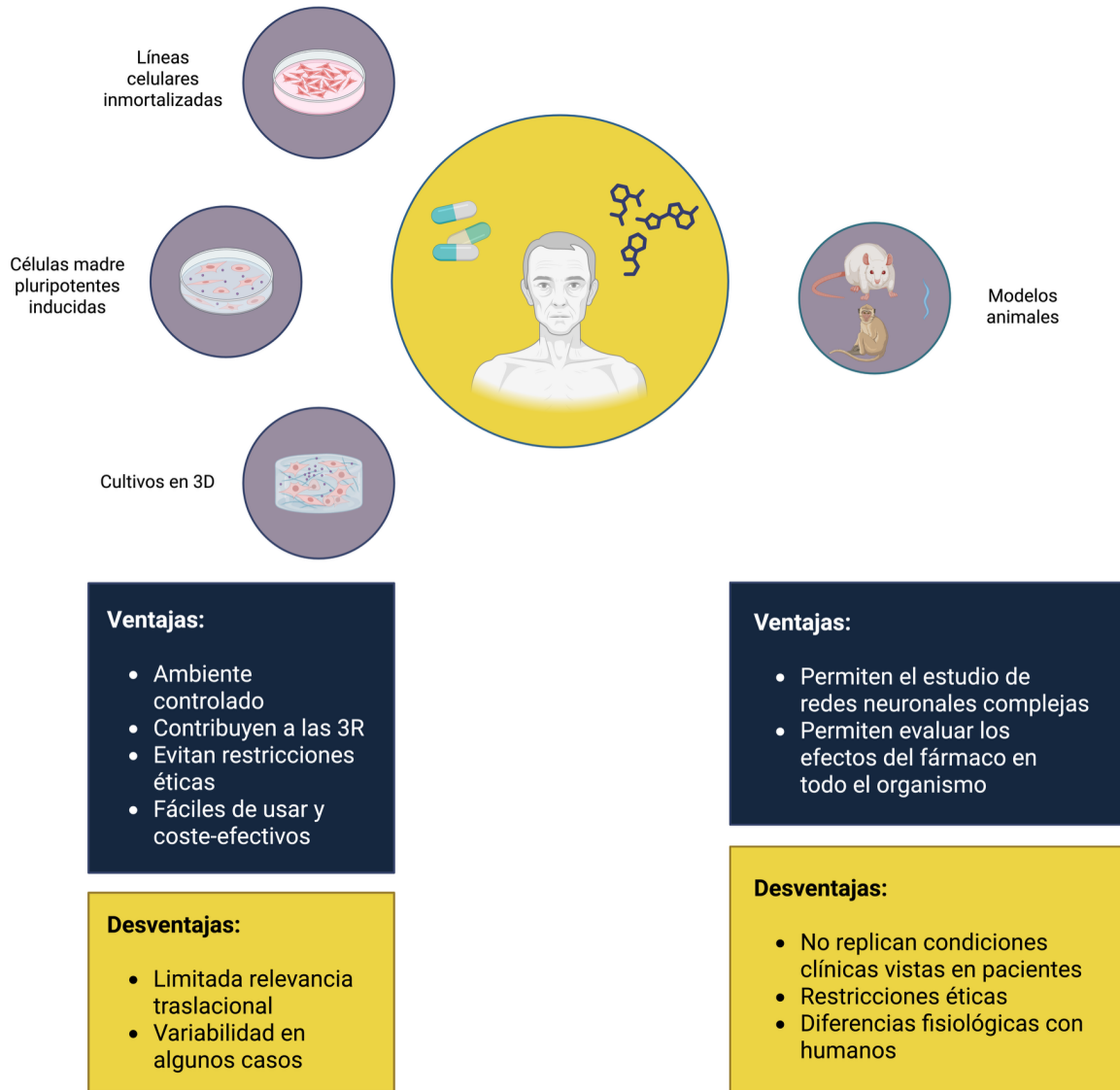


Figura 6. Ventajas y desventajas de los modelos *in vitro* e *in vivo* en el descubrimiento de nuevos fármacos.

Uso de la línea celular SH-SY5Y diferenciada como modelo de Alzheimer para HTS

Una de las líneas celulares inmortalizadas más empleadas en investigación es la línea SH-SY5Y obtenida por subclonación de la línea padre SK-N-SH. Está formada por células tipo neuroblasto, similares a neuronas catecolaminérgicas con pequeñas neuritas incipientes y que

expresan algunos marcadores neuronales tempranos, y células epiteliales. Aunque expresan algunos marcadores neuronales, son diferentes de las neuronas adultas afectadas en el Alzheimer. Por ello, se suelen diferenciar con tratamientos como ácido retinoico (RA), el péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1), ésteres de forbol o BDNF [53–55].

El RA estimula el crecimiento de neuritas, inhibe la proliferación de las células epiteliales, incrementa la supervivencia celular de las neuronas e incrementa las características de neuronas dopaminérgicas incluyendo la expresión de genes relacionados con la dopamina y su transportador DAT [55]. El GLP-1, hormona incretina promotora de la secreción de insulina, tiene un efecto neurotrófico vía PI3K-AKT, favoreciendo la diferenciación glutamatérgica y aumentando la expresión de receptores AMPA, NMDA y de dopamina [54].

Tras la diferenciación con RA y/o GLP-1 obtenemos cultivos celulares que representan de manera más fiel neuronas sanas humanas que las células SH-SY5Y sin diferenciar. Con el objetivo de inducir un proceso patológico que imite el Alzheimer en estas células existen dos métodos principales:

- **Métodos químicos:** Empleo de compuestos neurotóxicos como el ácido okadaico que induce la hiperfosforilación de tau [56], la colchicina que induce la muerte neuronal y disrupción del transporte axonal por alteración del ensamblaje de los microtúbulos [57] o péptido A β sintético (por ejemplo, A β 1-42) que se agrega y forma placas neurotóxicas [58].
- **Métodos biológicos:** Inducción de la expresión de proteínas mutadas mediante transfección, técnica que introduce de DNA o RNA foráneo en células eucariotas. En células SH-SY5Y debe realizarse por un método suave como la transfección química con liposomas (ej. lipofectamina), electroporación o vectores virales como lentivirus (transducción) [59]. La transfección puede ser estable (integración del DNA) o transitoria (expresión temporal).

En el presente trabajo se ha optado por una transfección transitoria química con dos vectores de DNA con las mutaciones APP V717 y MAPT P301L respectivamente (Figura 7). La mutación del gen que codifica para la APP V717 favorece el proceso amiloidogénico. La mutación del gen que codifica para la proteína Tau asociada a los microtúbulos (MAPT) P301L aumenta la fosforilación en Ser262, favoreciendo la agregación y formación de ON, pérdida de proyecciones neuronales y estrés oxidativo [60]. Ambas mutaciones fueron escogidas por dar lugar a isoformas de los

péptidos más comunes en enfermedad de Alzheimer y ser ampliamente usados en *modelos in vitro* [61].

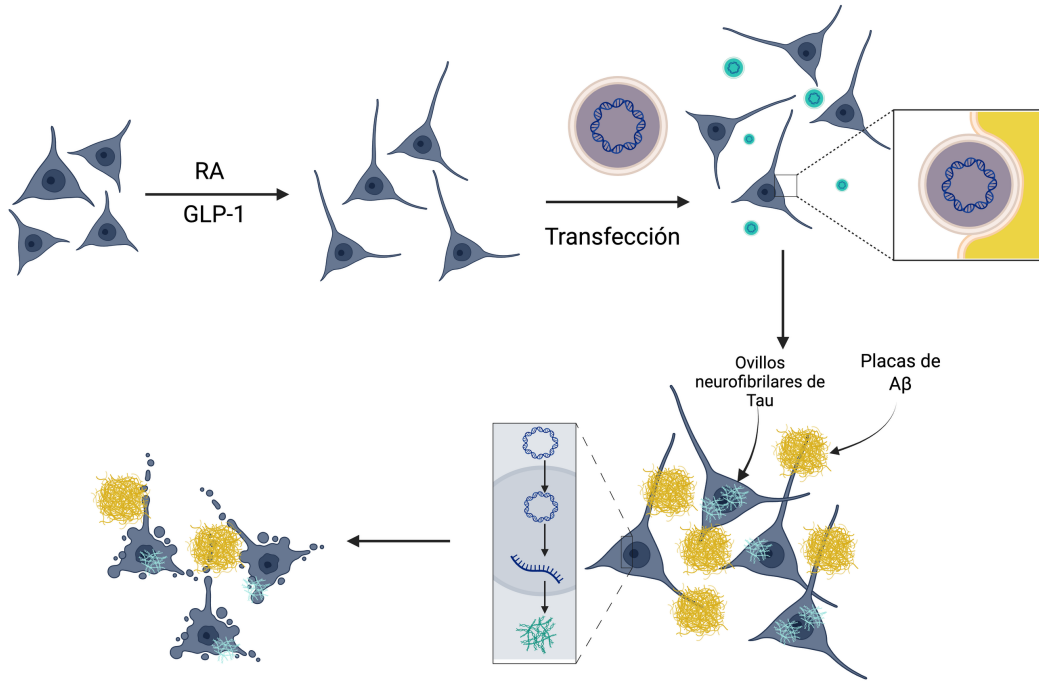


Figura 7. Protocolo de diferenciación y transfección de células SH-SY5Y utilizado para generar el modelo de enfermedad de Alzheimer para el cribado de los compuestos sintetizados.

OBJETIVOS

- Diseño de nuevas moléculas basadas en el esqueleto de 2-aminobenzotiazol presente en fármacos comercializados en España como el riluzol para obtener compuestos con actividad frente a la enfermedad de Alzheimer.
- Optimización de rutas sintéticas para la obtención de amidas derivadas del esqueleto 2-aminobenzotiazol: Schotten-Baumann, *one-pot* y *two-step*.
- Caracterización de los compuestos sintetizados mediante técnicas de rutina ^1H RMN, ^{13}C RMN, HPLC-UV, punto de fusión y ESI-MS.
- Evaluación teórica de propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) mediante herramientas computacionales.
- Puesta a punto de un modelo fenotípico de células inmortalizadas SH-SY5Y de enfermedad de Alzheimer que permita el cribado de las moléculas sintetizadas para la identificación de *hits*.
- Análisis e interpretación de los resultados biológicos para establecer una relación estructura-actividad (REA) preliminar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis de los compuestos

Todas las síntesis se realizaron bajo atmósfera inerte de N_2 y en condición anhidras. Para ello el material de vidrio se secó en estufa a $125\text{ }^\circ\text{C}$ durante al menos 24 horas antes de utilizarlo. Posteriormente se purgó el material con $N_2(g)$. Los materiales de partida y reactivos se obtuvieron de proveedores comerciales (*Sigma-Aldrich*, *Merck*) y fueron empleados sin purificación adicional. La piridina empleada fue previamente destilada y secada sobre tamices moleculares 4 \AA . Todos los productos sólidos puros obtenidos se secaron en línea de vacío conectada a una trampa de disolvente con nitrógeno líquido hasta eliminación completa del disolvente, previo a la caracterización (Figura 8).

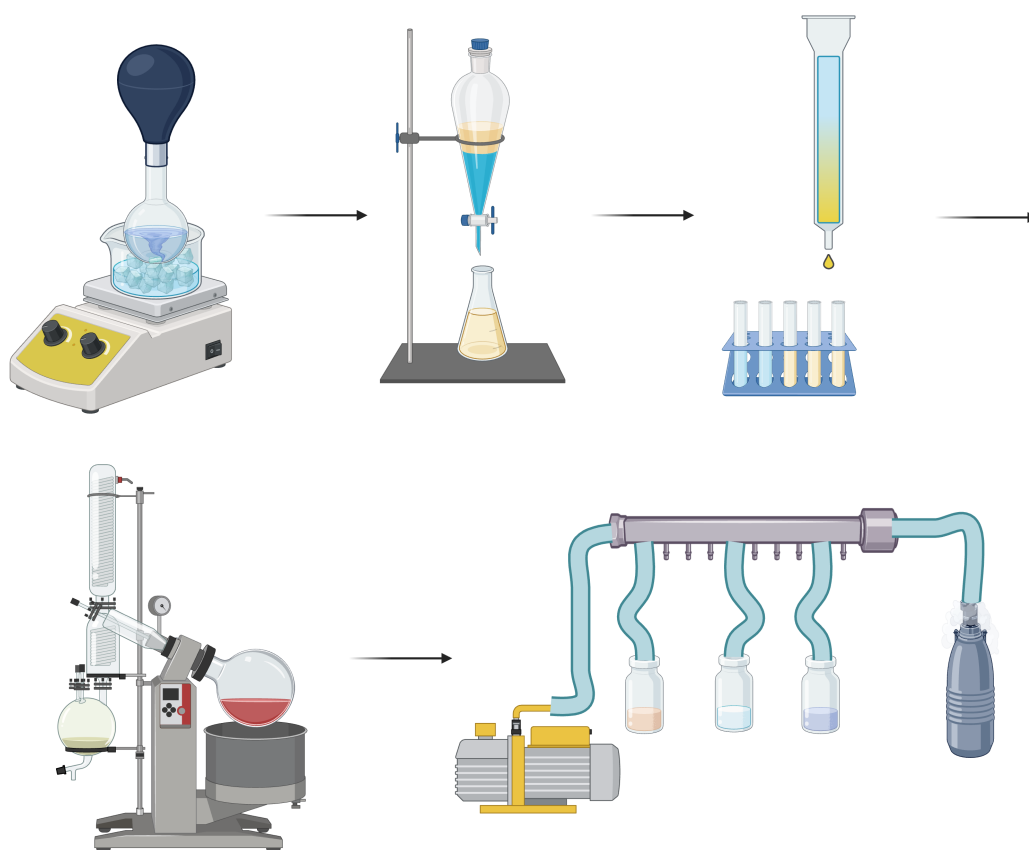


Figura 8. Procedimiento sintético de los compuestos (simplificado).

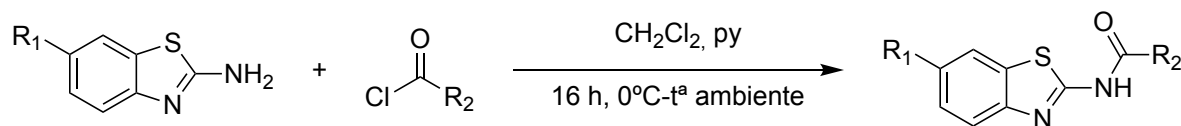
Procedimiento general de síntesis a partir de los cloruros de acilo comerciales:

Reacción de Schotten-Baumann

En un matraz de fondo redondo provisto de agitador magnético se disuelven 150 mg de la amina correspondiente (benzo[*d*]tiazol-2-amina, 6-trifluorometoxibenzo[*d*]tiazol-2-amina, 6-trifluorometilbenzo[*d*]tiazol-2-amina) en 2 mL de CH₂Cl₂. Se añade 1,1 equivalentes de piridina y la mezcla se enfría a 0 °C en un baño de hielo (Esquema 5). Tras la completa disolución, se añade en frío y lentamente por goteo 1,1 equivalentes del cloruro de acilo correspondiente. La mezcla se agita toda la noche. El progreso se evalúa por cromatografía en capa fina (TLC), empleando placas de gel de sílice (*Merck* 60 F254) y mezclas de isohexano:acetato de etilo (7:3 o 8:2).

Finalizada la reacción, se extrae con 3x20 mL de CH₂Cl₂ y 20ml de disolución saturada al 10% (p/v) de NaHCO₃. Se lava con 20 mL de agua destilada, y se seca sobre Na₂SO₄ anhidro. La fase orgánica se filtra y se concentra mediante el uso de un evaporador rotatorio (*AdvionInterchim puriFlash® R-Vap*) a presión reducida (200-400 mmHg) y a 40°C.

El producto crudo se purifica por cromatografía *flash* en columna con 40 g de gel de sílice (*Merck* 60, 230-400) como fase estacionaria, y mezcla 9:1 de isohexano:acetato de etilo como fase móvil.



R₁= -H, -OCF₃, -CF₃

R₂= aril, heteroaril

Esquema 5. Condiciones de reacción para la síntesis de derivados de 2-aminobenzotiazol mediante reacción de Schotten- Baumann.

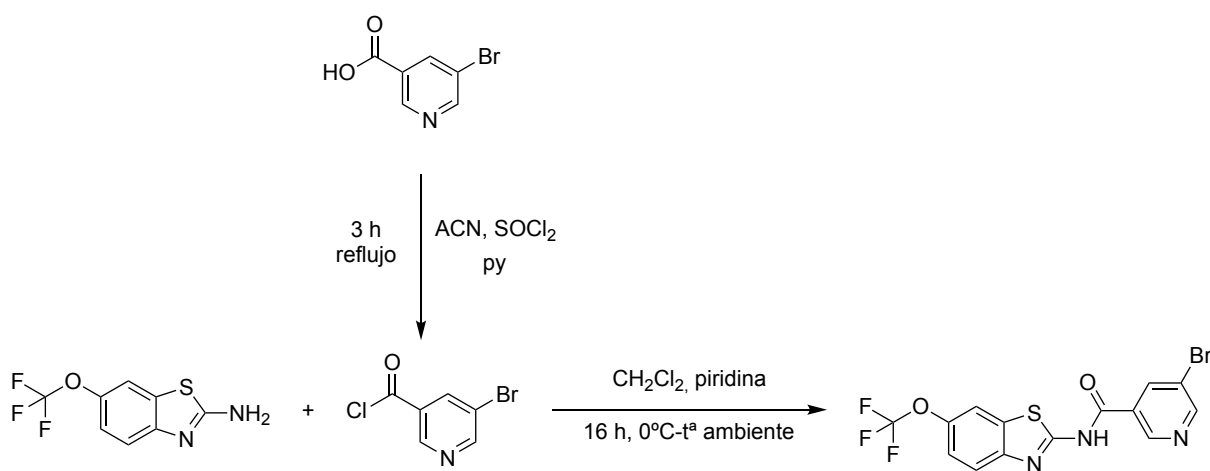
Procedimiento de síntesis a partir de los ácidos carboxílicos comerciales: Reacción two-step para la obtención de 5-bromo-N-(6-(trifluorometoxi)benzo[*d*]tiazol-2-il)nicotinamida

En un matraz de fondo redondo provisto de agitador magnético se disuelven 1 equivalente del ácido carboxílico correspondiente (ácido 2-bromonicotínico) en 0,5 mL de acetonitrilo

(Esquema 6). Se añade 1 equivalente de piridina y 1 equivalente de SOCl_2 . La mezcla se calienta a reflujo $82\text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 horas (Esquema 6). El producto obtenido se evapora a vacío en evaporador rotatorio (*AdvionInterchim puriFlash*[®] R-Vap) y se emplea sin purificación intermedia (producto muy inestable).

En un matraz de fondo redondo provisto de agitador magnético se disuelven 150 mg de 6-trifluorometoxibenzo[d]tiazol-2-amina en 2 mL de CH_2Cl_2 . A continuación, se añade 1,1 equivalentes de piridina y la mezcla se enfría en un baño de hielo hasta los $0\text{ }^\circ\text{C}$ (Esquema 6). Una vez alcanzada la completa disolución de los reactivos se añade, en frío y lentamente el cloruro de 5-bromonicotinoilo sintetizado en el paso anterior (Esquema 6). La reacción se deja toda la noche en agitación. El progreso de la reacción se monitoreó al día siguiente mediante TLC, empleando placas de sílice gel pre-recubiertas (*Merck 60 F254*) y mezclas de isohexano:acetato de etilo 1:1 como fase móvil.

Se procede con una extracción líquido-líquido y purificación en columna *flash* de la misma manera que la descrita en el apartado anterior.



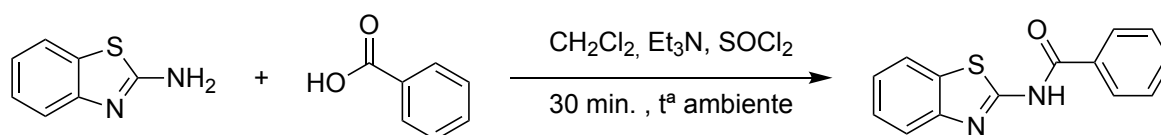
Esquema 6. Condiciones de reacción para la síntesis de derivados de 2-aminobenzotiazol mediante reacción en dos etapas.

Procedimiento de síntesis a partir de los ácidos carboxílicos comerciales: Reacción one-pot para la obtención de N-(benzo[d]tiazol-2-il)benzamida

En un matraz de fondo redondo provisto de agitador magnético se disolvieron 150 mg de benzo[d]tiazol-2-amina en 2 ml de CH_2Cl_2 . A continuación, se añade 3 equivalentes de trietilamina. Una vez alcanzada la completa disolución de los reactivos se añade 1 equivalente

de ácido benzoico (Esquema 7). Añadimos, por último, 1 equivalente de SOCl_2 muy lentamente (por goteo) observándose un cambio de color (de blanco a marrón oscuro). La reacción se deja 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitorea mediante TLC, empleando placas de sílice gel pre-recubiertas (*Merck* 60 F254) y mezclas de isohexano:acetato de etilo 7:3 como fase móvil.

Se procede con una extracción líquido-líquido y purificación en columna *flash* de la misma manera que la descrita en el apartado anterior. Tras columna, el producto obtenido mostró una pureza inferior al 95% por lo que se realizó purificación mediante recristalización con etanol absoluto.



Esquema 7. Condiciones de reacción para la síntesis de derivados de 2-aminobenzotiazol mediante reacción en una etapa (*one-pot*).

Caracterización estructural de los compuestos y determinación de la pureza

Resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C

Los espectros de RMN ^1H (500 MHz) y RMN ^{13}C (126 MHz) se obtuvieron con un espectrómetro *Bruker* AVIII-500 con software de control: *TopSpin* 3.5 bajo sistema operativo *Linux CENTOS*; sonda para RMN en disolución PA-BBO (^1H - ^{19}F / X) con un sistema de sintonía y *matching* automáticos y gradientes PFG en eje z usando $\text{DMSO-}d_6$ como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Las constantes de acoplamiento J se expresan en hercios (Hz). Las multiplicidades de espín se dan como s (singlete), d (doblete), t (triplete) y m (multiplete).

Espectrometría de masas y puntos de fusión

La espectrometría de masas se realizó con un espectrómetro *Bruker MicroTOF*, con ionización por electrospray (ESI-MS), en modo positivo. Se refleja el valor del pseudoion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$. Los puntos de fusión no están corregidos y fueron determinados mediante un aparato *Gallenkamp*.

Determinación del grado de pureza por HPLC

La determinación del grado de pureza de los compuestos sintetizados se realizó mediante HPLC-UV con un equipo *Agilent* 1100/1200 dotado de una bomba cuaternaria acoplado a una columna en fase reversa *Eclipse XDB-C18* (5 μ m, 4.6 x 150 mm) como fase estacionaria y una mezcla de disolventes agua (A) y metanol (B) en gradiente de concentraciones siguiendo los valores de la (Tabla 2). La longitud de onda de medida fue 230 nm con un ancho de banda de 4 nm.

Tabla 2. Gradiente y flujo de disolventes agua (A) y metanol (B) empleado para la determinación de la pureza mediante HPLC-UV.

Tiempo (minutos)	B (%)	Flujo de la columna (mL/min)	Presión (bar)
0	50	0,7	400
5	50	0,7	400
30	100	0,7	400
35	100	0,7	400

Evaluación biológica: Modelo fenotípico de enfermedad de Alzheimer

Línea celular SH-SY5Y

Se empleó la línea celular humana inmortalizada SH-SY5Y obtenida de *Innoprot*. El procedimiento se resume en la Figura 9 [62].

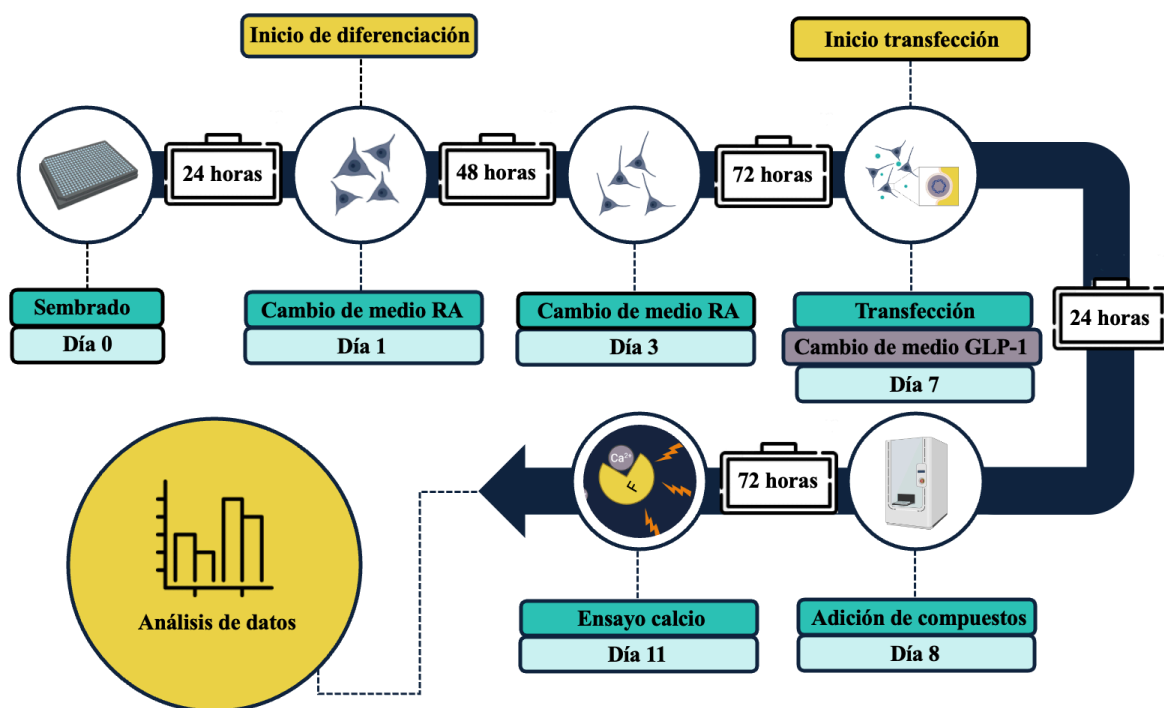


Figura 9. Resumen del protocolo para el cribado de la familia de compuestos en el modelo fenotípico de Alzheimer.

Mantenimiento de la línea celular y sembrado

Se mantuvieron a 37 °C con un 5% de CO₂ y humedad a saturación en frascos de cultivo de 75 cm² (T75; *Corning*) usando medio RPMI 1640 con GlutaMAX™ (*Gibco*) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS; *Sigma-Aldrich*), 1% Penicilina-Streptomicina (*Milipore*) y 50 µg/mL de gentamicina (*Sigma-Aldrich*) usando pases <18. Para el ensayo de calcio las células se sembraron en placas de 384 pocillos negras con fondo plano transparente (*Greiner*) pretratadas 2 horas con laminina 2 µg/mL (*Sigma-Aldrich*). Tras lavar con PBS y secar, se sembraron 2500 células/pocillo en 50 µL, ajustadas con un contador automático (*Vi-Cell CR, Beckman-Coulter*).

Diferenciación celular

A las 24 horas (día 1) se cambió el medio de diferenciación 1 (MD1), igual que el medio de crecimiento, pero con 2% FBS y 10 µM RA (*Sigma-Aldrich*). Se cambia el medio el día 3 manteniendo las células un total de 6 días en MD1. El día 7 se cambió al Medio de diferenciación 2 (MD2), sin FBS, con suero B27 1:50 y GLP-1 a 100 nM hasta el día 10. El stock de RA (5 mM en DMSO) se almacenó 2 semanas a -20 °C, realizando los pesajes y almacenaje del sólido en atmósfera inerte de N₂. El GLP-1 se diluyó a 100 µM en DMSO para stock.

Transfección química

El día 7 se realizó una transfección química antes del cambio al MD2. Se utilizó Lipofectamine LTX™ (*Thermo-Fisher*) como agente de transfección. En un tubo Eppendorf® se mezclaron 2,5 µg de los plásmidos codificantes de las mutaciones MAPT P301L y APP V717I con 125 µL de OPTI-MEM (*Gibco*) y 5 µL de Plus Reagent® (*PortoMedica*). En otro tubo, se añadieron 10 µL de lipofectamina y 125 µL de OPTI-MEM. Tras 5 minutos de incubación, se combinó el primer tubo en el segundo y se incubaron otros 20 minutos. Esta mezcla se diluyó en 2,5 mL de OPTI-MEM y se añadieron 20 µL a cada pocillo. Pasadas 5-6 horas, se sustituyó por el MD2.

Adición de los compuestos

En el día 8 se añadieron los compuestos a ensayar, previamente disueltos en DMSO a una concentración madre de 10 mM y almacenados en placas de 384 pocillos a -20 °C. Se realizó un nuevo cambio de medio con 50 µL de MD2 por pocillo. La dispensación se efectuó mediante el dispensador acústico Echo 525 (*Labcyte inc.*) para alcanzar concentraciones finales de 1 µM y 10 µM y se equilibraron los volúmenes de DMSO. Los compuestos se incubaron durante al menos 72 horas con las células.

Ensayo de calcio intracelular

Para la evaluación el efecto neuroprotector de los compuestos sobre el modelo se empleó el ensayo de calcio intracelular. Este ensayo consiste en el empleo de una disolución de KCl que lleva a la excitación de las células de tipo neuronal y una posterior medición de los niveles de Ca²⁺ intracelulares (Figura 10). Es un ensayo extensamente empleado en el cribado de fármacos debido a la facilidad que tiene de ser adaptado a HTS [63,64].

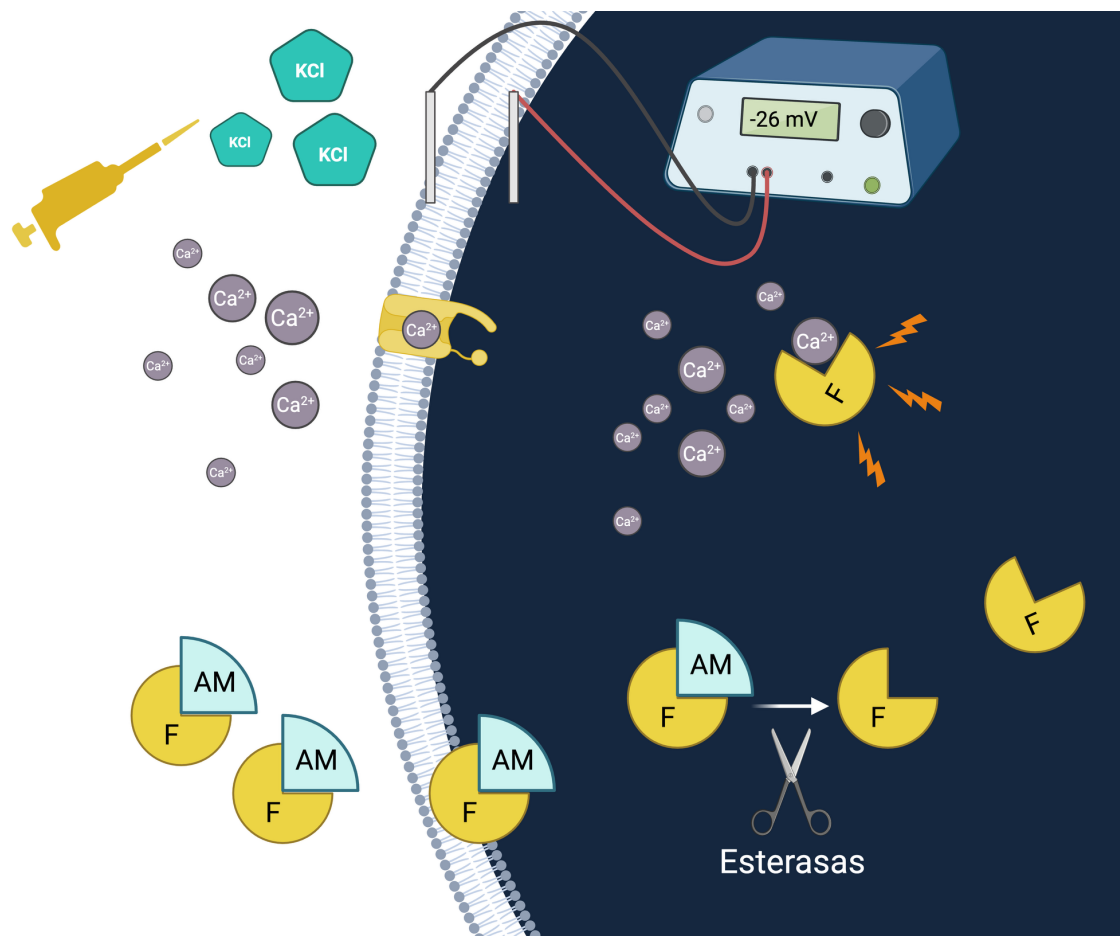


Figura 10. Funcionamiento de un kit para la determinación de concentraciones de calcio intracelulares.

En detalle, el día 11 se realizó el ensayo de calcio utilizando el kit FLIPR® Calcium-6®. Se reemplazó el medio de cada pocillo por 25 μ L de RPMI sin aditivos y se añadió 25 μ L de la sonda reconstituida en 10 ml de buffer HBSS + 20 mM HEPES (*Sigma-Aldrich*). Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente y oscuridad se emplea una solución 330 mM de KCl en 3ml de agua y 15 ml de buffer HBSS + 20 mM de HEPES para la estimulación. Se añaden 25 μ L de esta disolución a una placa intermedia de compuestos de 384 pocillos. La disolución de KCl se añade de manera automática a las células por el lector de placas cinético FDSS 7000EX® (*Hamamatsu Photonics*) hasta alcanzar una concentración final en cada pocillo de 30 mM. Las medidas de fluorescencia se realizan con el mismo aparato empleando el software FDSS v3.4 con excitación $\lambda=470-495$ nm y emisión $\lambda=515-575$ nm. Los datos fueron procesados empleando el software *FDSS7000EX/ μ cell*® en unidades relativas de fluorescencia (rfu). La respuesta de calcio se expresa como la media de rfu durante los 10 segundos inmediatamente posteriores tras la adición de KCl (lo que se corresponde con el pico de entrada de calcio) con respecto a la línea de

base (Figura 11). La fluorescencia de base se definió como la señal media durante los 60 segundos anteriores a la adición de KCl. Las señales se normalizaron respecto a la línea base ($F/F_0 = 1$).

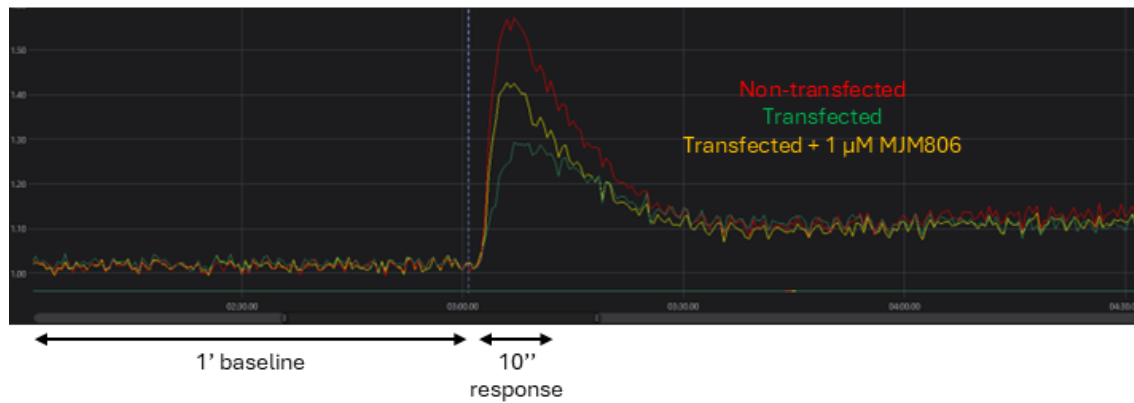


Figura 11. Gráficas de medida de fluorescencia obtenidas en FDSS7000EX. Las gráficas representan la respuesta intracelular de calcio tras exposición a una disolución 30 mM de KCl en células SH-SY5Y diferenciadas no transfectadas (rojo), transfectadas expuestas a vehículo (verde) y transfectadas expuestas a un compuesto ensayado (amarillo). El tiempo de adición de KCl se representa con una línea punteada azul.

Análisis de resultados

Para cada experimento los datos se normalizaron con la respuesta observada en células transfectadas con los plásmidos MAPT P301L y APP V717I tratadas con vehículo, DMSO (50 nL) a la que se le asignó el valor de 100%. El resto de los resultados se expresan como % con respecto a esa línea de base. La normalización se realizó de forma independiente para cada réplica experimental con el fin de controlar la variabilidad entre ensayos.

El análisis estadístico se llevó a cabo con GraphPad Prism (versión 10.5.0). Los resultados del ensayo de calcio se representan como la media \pm la desviación estándar de la media de 3 experimentos independientes, cada uno de ellos por duplicado. Las comparaciones se evaluaron usando un análisis de varianza de dos factores (*two-way ANOVA*), seguido de un test post hoc de Dunnett. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0,05$.

Predicción de propiedades ADME

Se empleó la plataforma online ADMET-AI seleccionando como referencia todos los fármacos de la base de datos (*all*) (2579 moléculas) y el código ATC N06D (69 moléculas) correspondiente con los psicoanalépticos para analizar los 51 compuestos incluidos en el cribado biológico.

Figuras, gráficas y esquemas

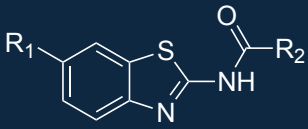
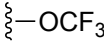
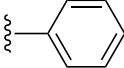

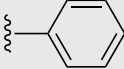

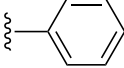
Los esquemas de reacción y estructuras moleculares fueron elaborados con ChemDraw 23.1.2 de *Reivity Signals*®. Para el procesamiento de los FID y generar las figuras de RMN se empleó el programa informático MestReNova 14.2.2 de *Mestrelab Research*®. Las figuras fueron elaboradas con *BioRender*®. Los datos de HPLC fueron tratados con el software ChemStation de *Agilent*®. Las propiedades moleculares calculadas computacionalmente fueron obtenidas usando Molinspiration Cheminformatics® y MolCalc®. Otro software específico para el manejo de los equipos se especifica en cada caso.

Resultados

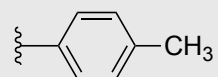
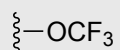
Síntesis y caracterización de derivados 2-amidobenzotiazol

Se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron un total de 14 nuevas moléculas con la estructura general mostrada en la Tabla 3. Se partió del esqueleto 2-aminobenzotiazol sustituido en posición 6 con un grupo OCF_3 , CF_3 o no sustituido, y se formaron amidas en posición 2 con ciclos aromáticos o heteroaromáticos mediante las reacciones de Schotten-Baumann (**MJM779**, **MJM785**, **MJM786**, **MJM787**, **MJM788**, **MJM789**, **MJM792**, **MJM793**, **MJM833**, **MJM834**, **MJM835**, **MJM817**, **MJM810**), *one-pot* (**MJM810**) o *two-step* (**MJM783**). Para todos ellos se llevó a cabo una determinación inicial de la pureza mediante HPLC-UV estableciendo como punto de corte un 95% de pureza. Además, se confirmó la obtención del producto deseado mediante la interpretación de los espectros de RMN de ^1H (500 MHz) y RMN ^{13}C (126 MHz) y obtención del valor del pseudoión molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ en ESI-MS. También se determinaron los puntos de fusión y factores de retención (R_f) en TLC.

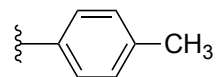
Tabla 3. Compuestos derivados del 2-amidobenzotiazol sintetizados y sus sustituyentes.

		
	R_1	R_2
MJM779		
MJM785		
MJM810		

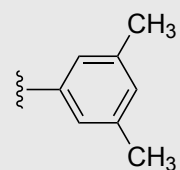
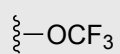
MJM786



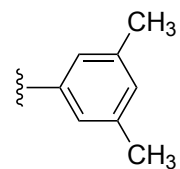
MJM787



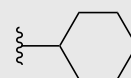
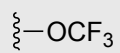
MJM788



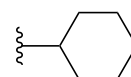
MJM789



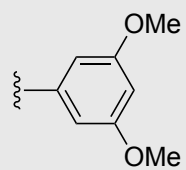
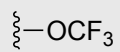
MJM792



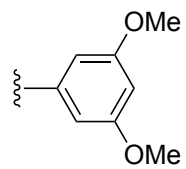
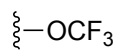
MJM793



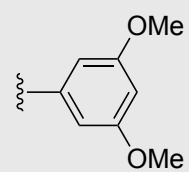
MJM833



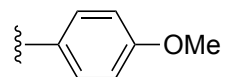
MJM834



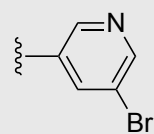
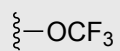
MJM835



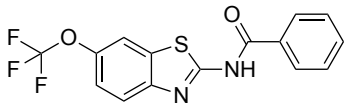
MJM817



MJM783



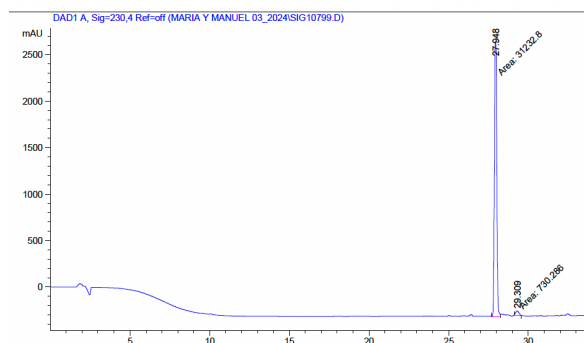
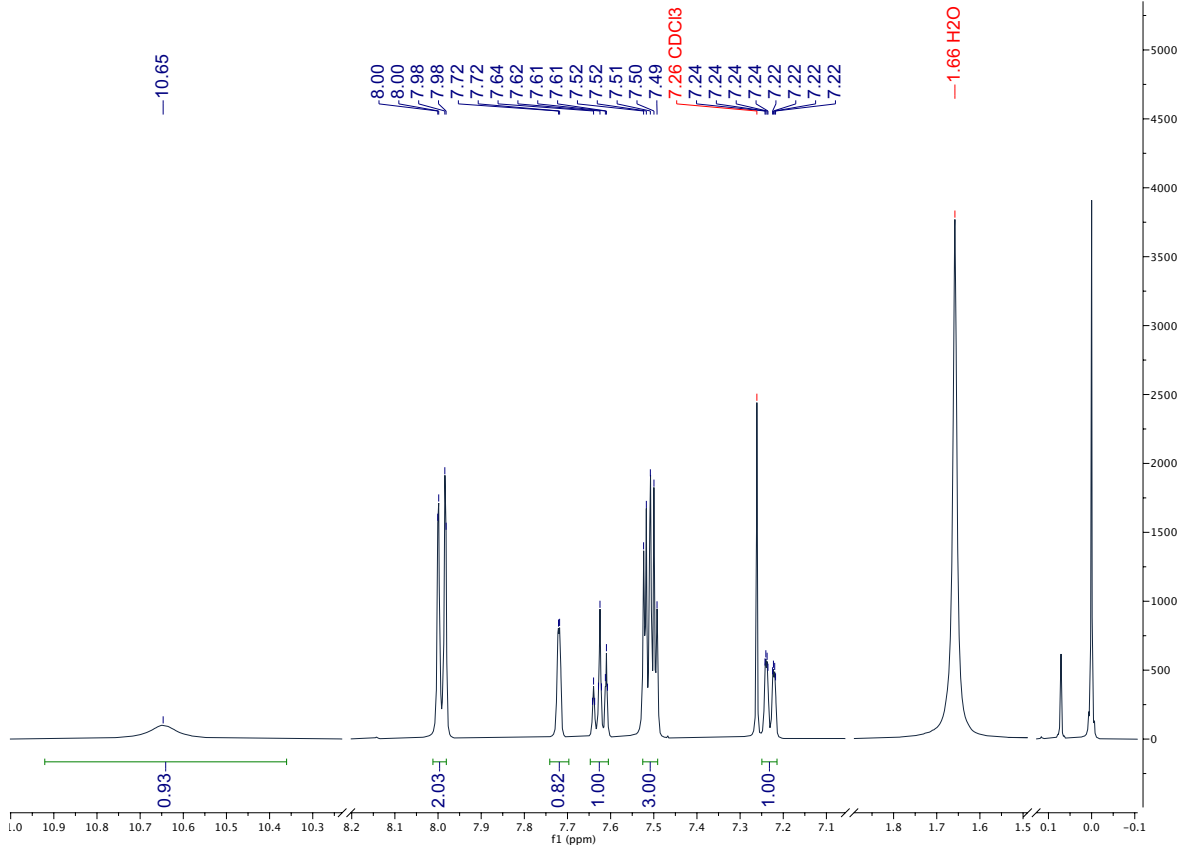
A continuación, se presentan los resultados del proceso sintético y de caracterización.



Chemical Formula: C₁₅H₉F₃N₂O₂S
Molecular Weight: 338,30

MJM779

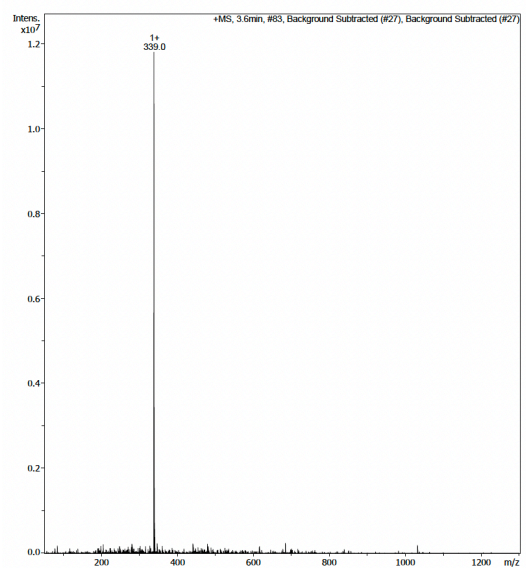
RENDIMIENTO: 30 %. **PUREZA (HPLC):** 97,7 % (Rt = 27,948 min). **Rf (Hexano/AcOEt 8:2):** 0,375. **P.F.:** 162-164 °C. **¹H RMN (500 mHz, CDCl₃) δ (ppm) J (Hz):** 10.65 (s, 1H, NH), 7.99 (dd, J = 8.4, 1.3, 2H, H-2', H-6'), 7.72 (dd, J = 2.3, 1.1, 1H, H-7), 7.64-7.61 (m, 1H, H-4), 7.52-7.49 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'), 7.23 (dd, J = 8.8, 2.3, 1H, H-5). **¹³C RMN (126 mHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):** 165.8, 160.1, 147.2, 145.9, 133.8, 133.4, 132.0, 129.6, 128.1, 122.0, 120.5, 119.9, 114.6. **MS m/z (ESI):** [M+H]⁺ 339.0.

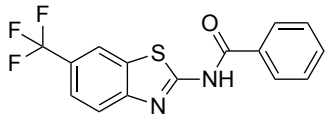


Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	27.948	MM	0.1757	3.12328e4	2961.90479	97.7152
2	29.309	MM	0.2490	730.28558	48.87336	2.2848

Totals : 3.19631e4 3010.77814

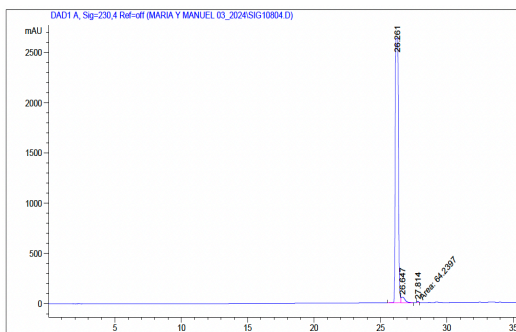
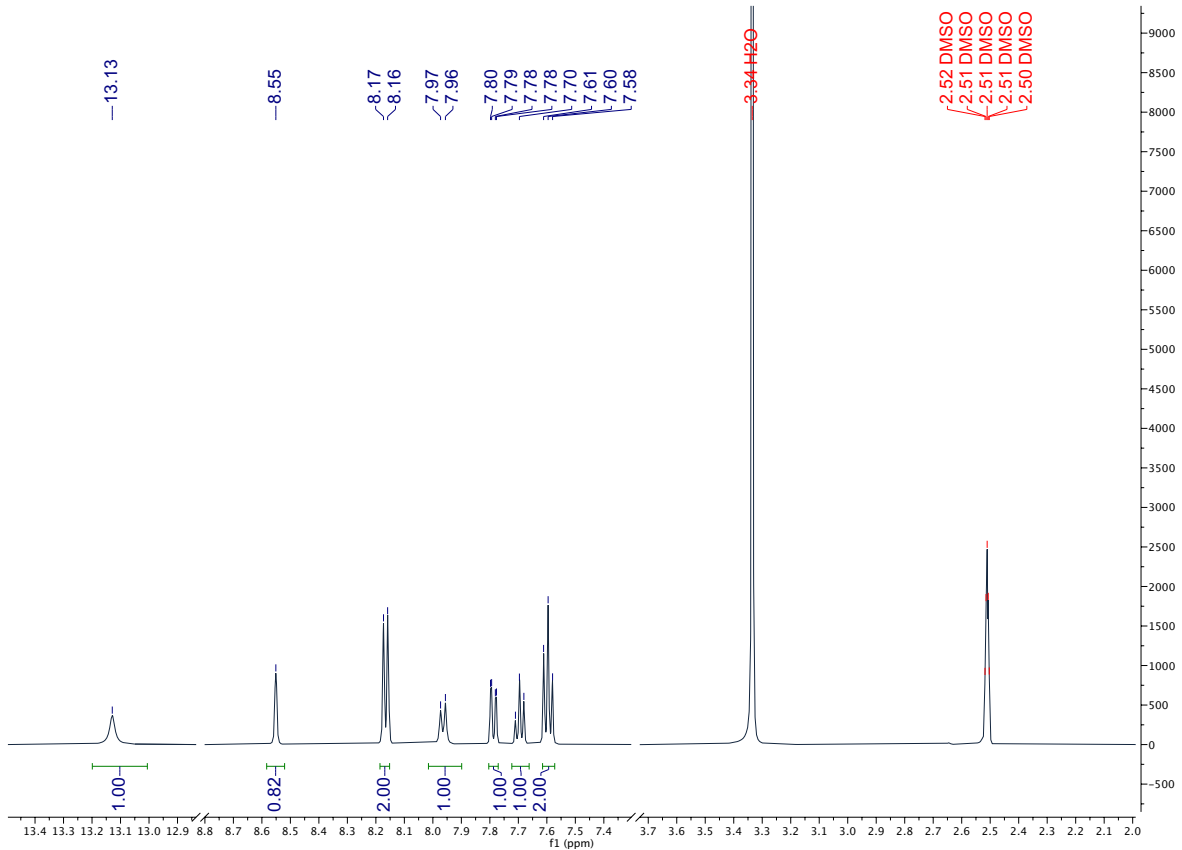




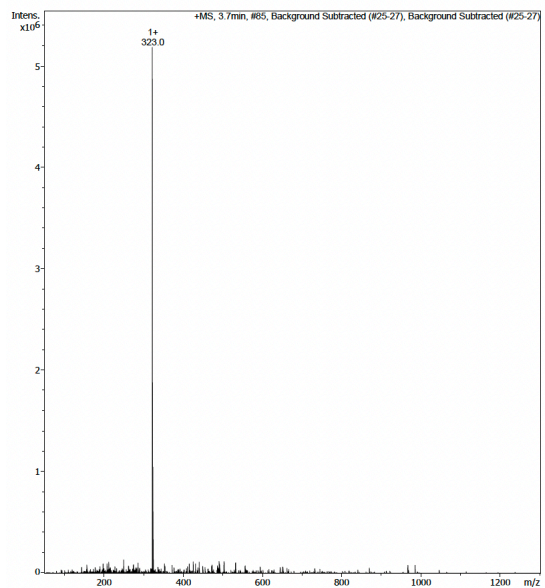
Chemical Formula: C₁₅H₉F₃N₂OS
Molecular Weight: 322,31

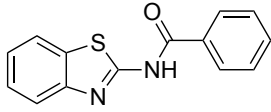
MJM785

RENDIMIENTO: 45 %. **PUREZA (HPLC):** 97.4 % (Rt = 26,261 min). **Rf (Hexano/AcOEt 7:3):** 0,625. **P.F.:** 214-216 °C. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-_d6) δ (ppm) J (Hz):** 13.13 (s, 1H, NH), 8.55 (s, 1H, H-7), 8.17 (d, J = 7.9, 2H, H-2', H-6'), 7.96 (d, J = 8.5, 1H, H-4), 7.79 (dd, J = 8.5, 1.9, 1H, H-5), 7.70 (t, J = 7.9, 1H, H-4'), 7.60 (t, J = 7.9, 2H, H-3', H-5'). **¹³C RMN (126 MHz, DMSO-_d6) δ (ppm):** 167.1, 162.9, 152.2, 134.0, 133.0, 132.4, 129.6, 129.3, 124.9, 124.6, 123.9, 121.8, 120.8. **MS m/z (ESI):** [M+H]⁺ 323.0.



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	26.261	BV	0.2227	4.34631e4	2631.17432	97.3597
2	26.647	VB	0.3043	1114.45581	56.44607	2.4964
3	27.814	PM	0.1258	64.23970	8.51347	0.1439
Totals :				4.46418e4	2696.13385	

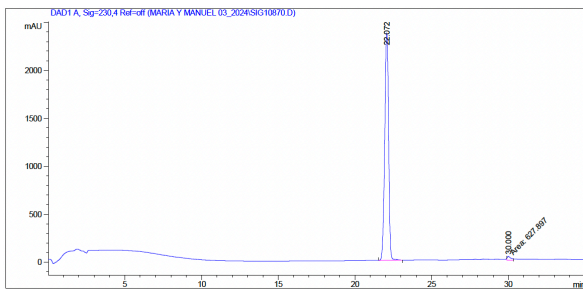
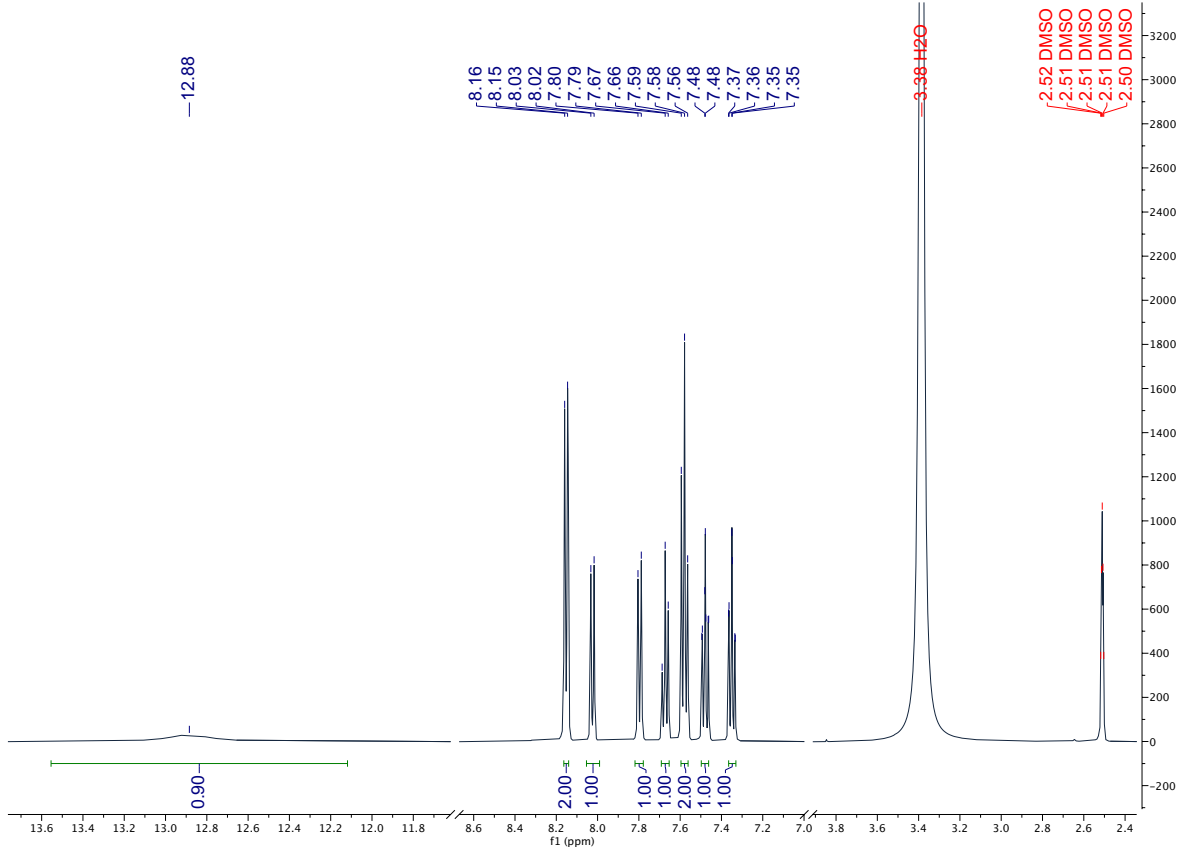




Chemical Formula: C₁₄H₁₀N₂OS
Molecular Weight: 254,31

MJM810

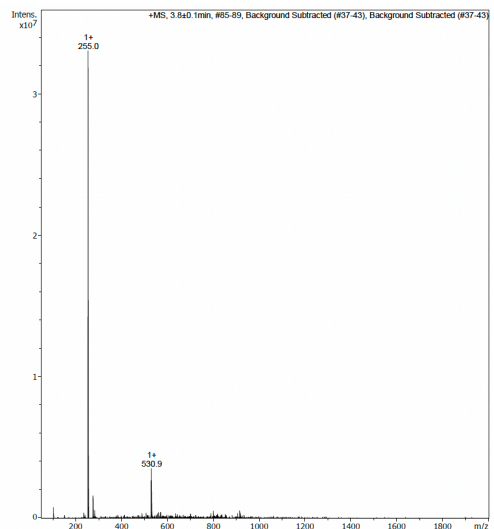
RENDIMIENTO: 47 % (SB), 9 % (OP). **PUREZA (HPLC):** 98,5 % (Rt = 22,072 min). **Rf (Hexano/AcOEt 7:3):** 0,536. **P.F.:** 178-179°C. **¹H RMN (500 mHz, DMSO-d₆) δ (ppm) J (Hz):** 12.88 (s, 1H, NH), 8.15 (dd, J = 7.4, 1.4, 2H, H-2', H-6'), 8.02 (dd, J = 7.9, 1.2 1H, H-4), 7.80 (d, J = 7.9, 1H, H-7), 7.67 (tt, J = 7.4, 1.4, 1H, H-4'), 7.58 (td, J = 7.4, 1.4, 2H, H-3', H-5'), 7.48 (td, J = 7.9, 1.2, 1H, H-5), 7.35 (td, J = 7.9, 1.2, 1H, H-6). **¹³C RMN (126 mHz, DMSO-d₆) δ (ppm):** 167.0, 159.8, 149.0, 133.7, 132.9, 132.4, 129.5, 129.2, 127.1, 124.6, 122.6, 121.2. **MS m/z (ESI):** [M+H]⁺ 255.0.

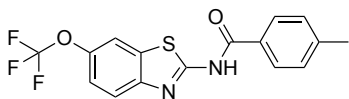


Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	22.072	BB	0.2723	4.14464e4	2367.09814	98.5076
2	30.000	MM	0.2739	627.89709	38.20797	1.4924

Totals : 4.20743e4 2405.30612

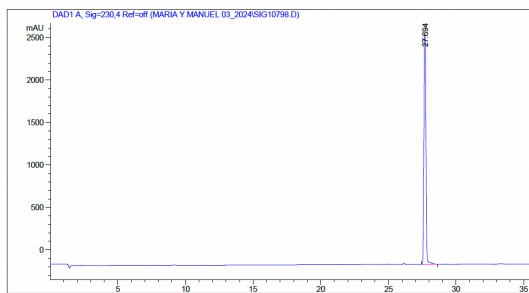
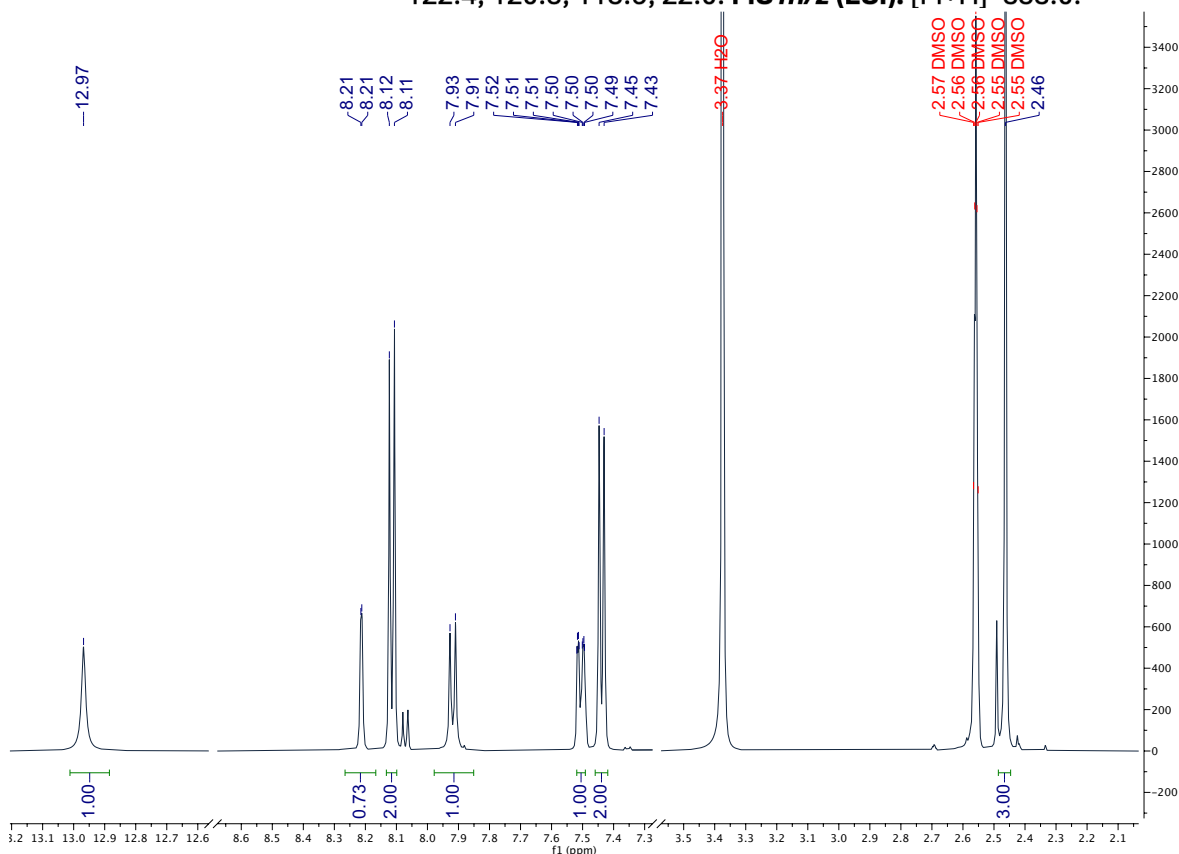




Chemical Formula: $C_{16}H_{11}F_3N_2O_2S$
Molecular Weight: 352,33

MJM786

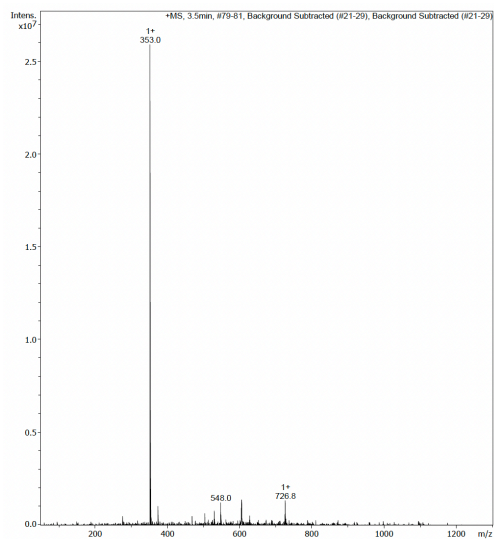
RENDIMIENTO: 34 % PUREZA (HPLC): 100 % (Rt = 27,694 min). **Rf (Hexano/AcOEt 7:3): 0,645. P.F.:** 182-184°C. **1H RMN (500 mHz, DMSO- d_6) δ (ppm) J (Hz):** 12.97 (s, 1H, NH), 8.17 (dd, $J = 2.4, 1.1, 1H, H-7$), 8.07 (d, $J = 8.2, 2H, H-2'$ and $H-6'$), 7.87 (dd, $J = 8.8, 1.1, 1H, H-4$), 7.45 (dd, $J = 8.8, 2.4, 1H, H-5$), 7.39 (d, $J = 8.2, 2H, H-3'$ and $H-5'$), 2.46 (s, 3H, CH_3). **^{13}C RMN (126 mHz, DMSO- d_6) δ (ppm):** 166.7, 161.2, 148.5, 145.0, 144.3, 133.7, 131.3, 130.8, 130.1, 129.3, 122.4, 120.8, 115.9, 22.0. **MS m/z (ESI):** $[M+H]^+$ 353.0.

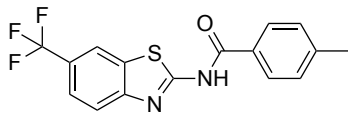


Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	27.694	BB	0.1688	2.84239e4	2700.58179	100.0000

Totals : 2.84239e4 2700.58179

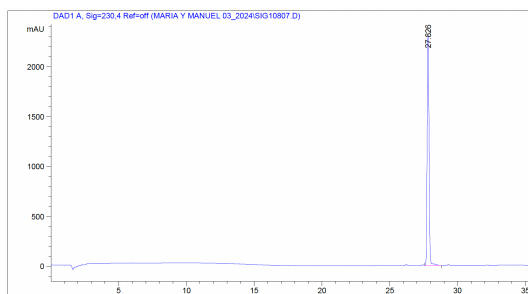
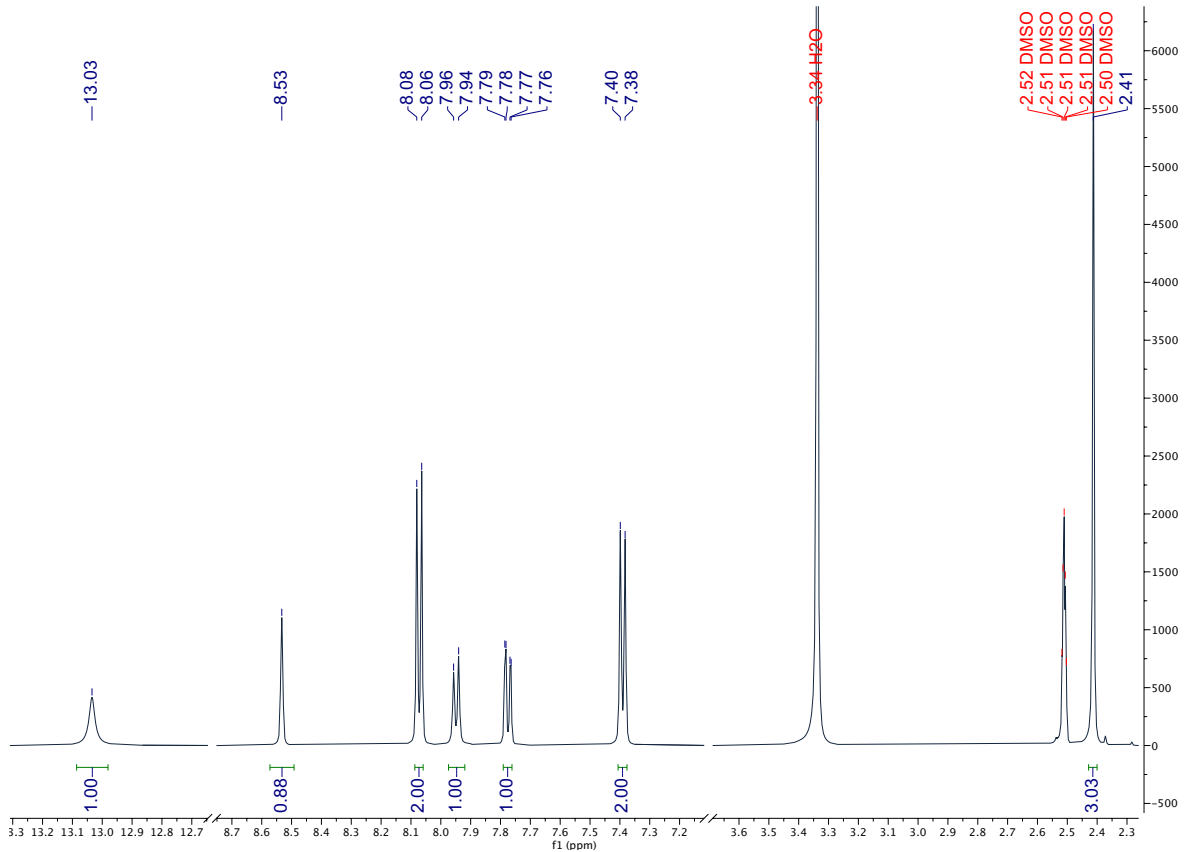




Chemical Formula: C₁₆H₁₁F₃N₂OS
Molecular Weight: 336,33

MJM787

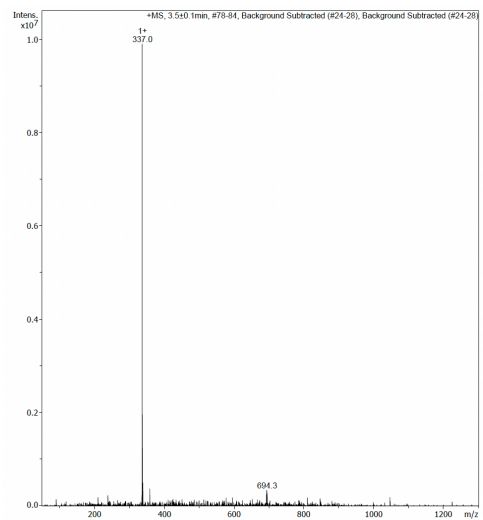
RENDIMIENTO: 46 % **PUREZA (HPLC):** 100 % (Rt = 27,826 min). **Rf (Hexano/AcOEt 7:3):** 0,528. **P.F.:** 216-218°C. **¹H RMN (500 mHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) J (Hz):** 13.03 (s, 1H, NH), 8.53 (s, 1H, H-7), 8.07 (d, J = 8.2, 2H, H-2', H-6'), 7.95 (d, J = 8.5, 1H, H-4), 7.77 (dd, J = 8.5, 2.0, 1H, H-5), 7.39 (d, J = 8.2, 2H, H-3', H-5'), 2.41 (s, 3H, CH₃). **¹³C RMN (126 mHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):** 166.9, 162.9, 152.2, 144.4, 133.0, 130.1, 129.3, 126.6, 124.8, 124.6, 123.8, 121.7, 120.8, 22.0. **MS m/z (ESI):** [M+H]⁺ 337.0.

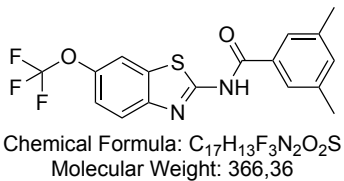


Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	27.826	VB	0.1537	2.23934e4	2298.74243	100.0000

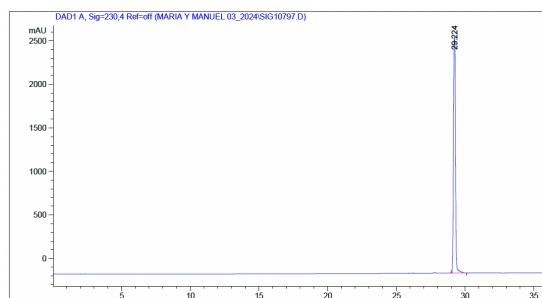
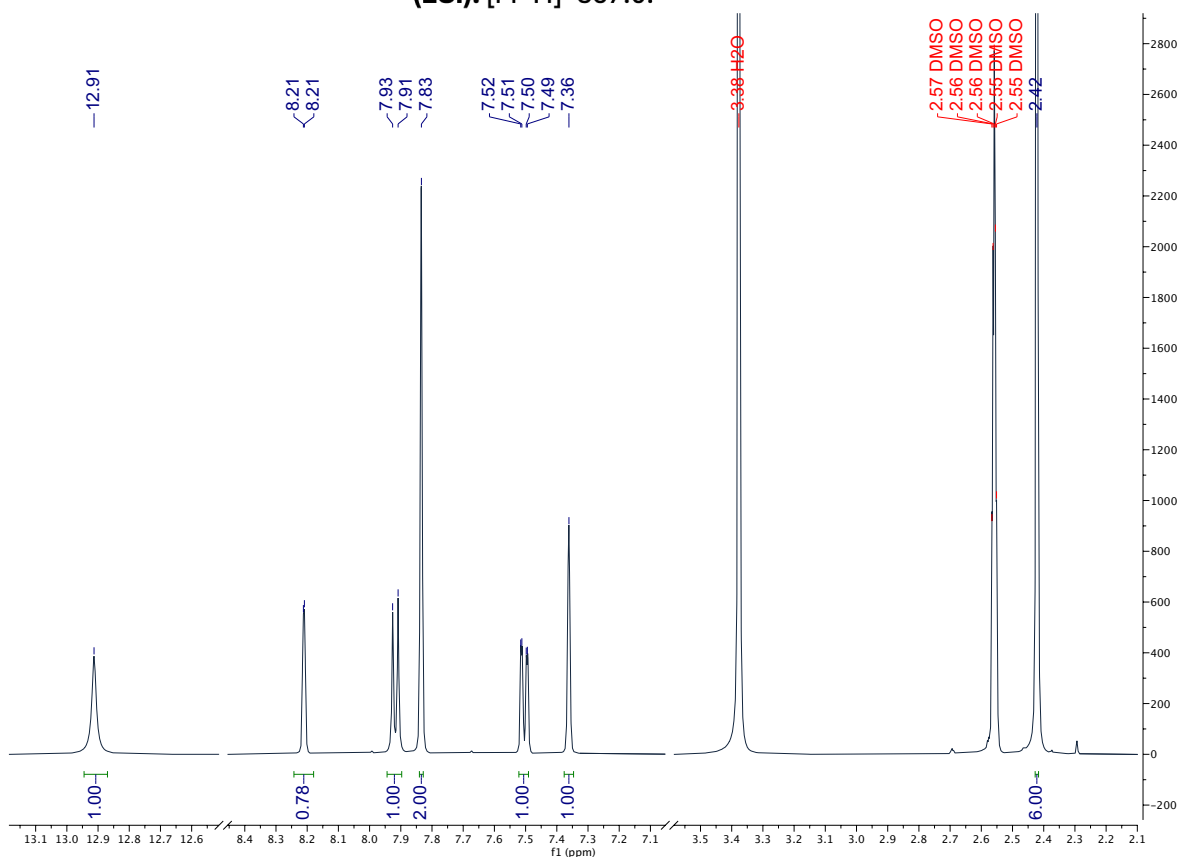
Totals : 2.23934e4 2298.74243





MJM788

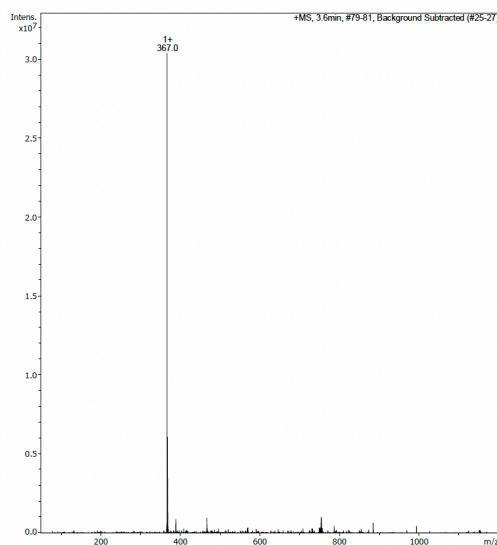
RENDIMIENTO: 31 % **PUREZA (HPLC):** 100 % (Rt = 29,224 min). **Rf (Hexano/AcOEt 7:3):** 0,531. **P.F.:** 190-192°C. **¹H RMN (500 mHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) J (Hz):** 12.91 (s, 1H, NH), 8.21 (dd, J = 2.4, 1.1, 1H, H-7), 7.92 (d, J = 8.8, 1H, H-4), 7.83 (s, 2H, H-2', H-6'), 7.50 (dd, J = 8.8, 2.4, 1H, H-5), 7.36 (s, 1H, H-4'), 2.42 (s, 6H, 2xCH₃). **¹³C RMN (126 mHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):** 167.1, 161.1, 148.5, 145.0, 138.8, 135.2, 133.7, 132.4, 127.0, 122.4, 120.8, 120.1, 115.9, 21.6. **MS m/z (ESI):** [M+H]⁺ 367.0.

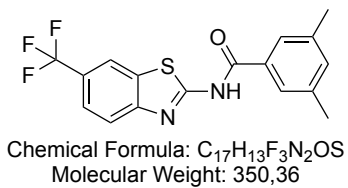


Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	29.224	BB	0.1613	2.72201e4	2706.95923	100.0000

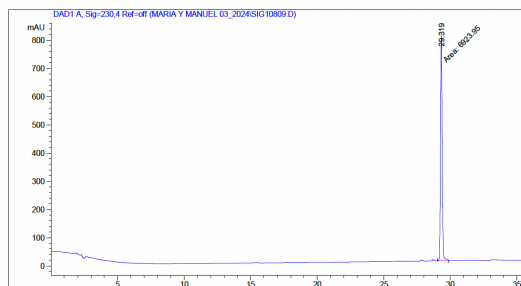
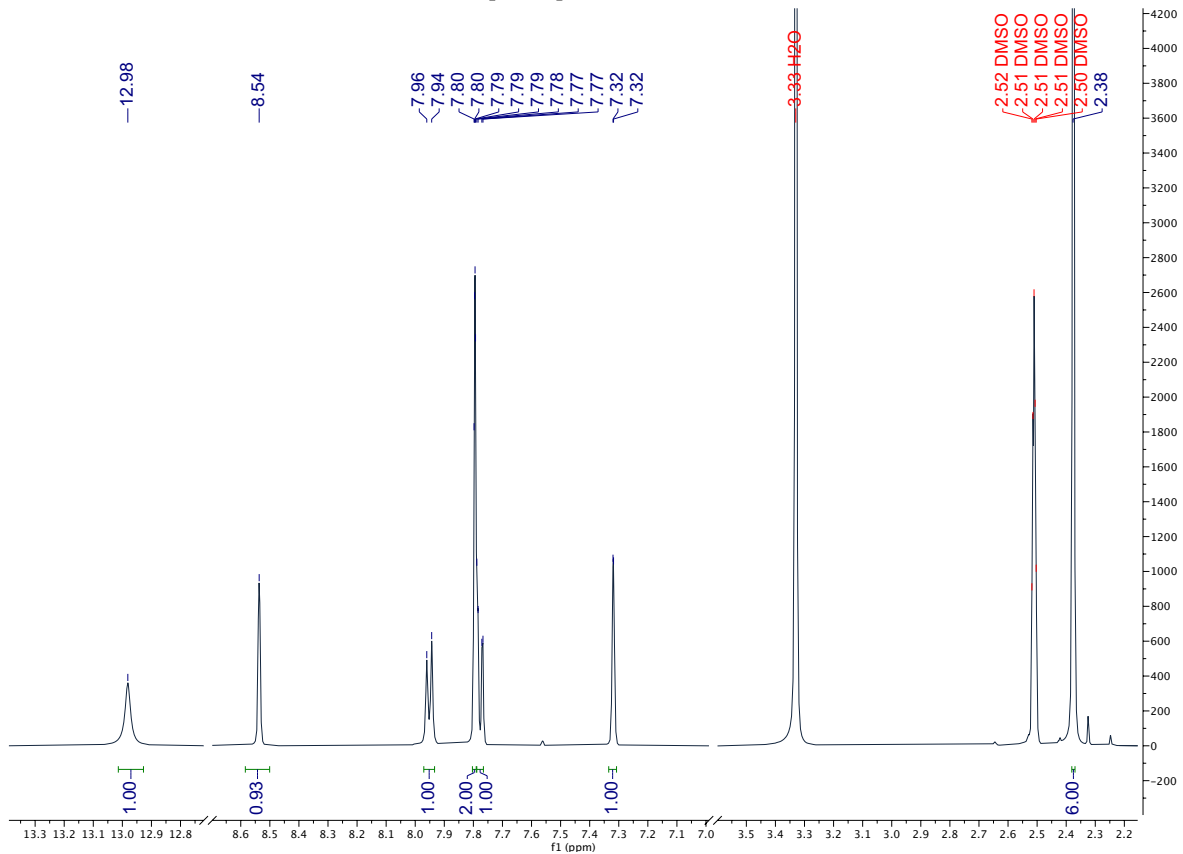
Totals : 2.72201e4 2706.95923





MJM789

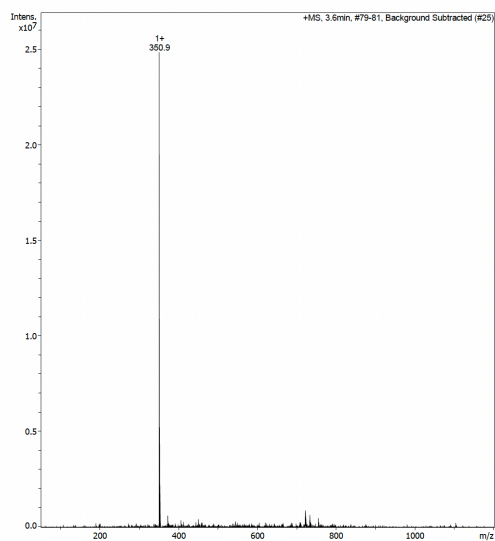
RENDIMIENTO: 48 % **PUREZA(HPLC):** 100 % (Rt = 29,319 min). **Rf (Hexano/AcOEt 7:3):** 0,595. **P.F.:** 232-234°C. **¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) *J* (Hz):** 12.98 (s, 1H, NH), 8.54 (d, *J* = 2.0, 1H, H-7), 7.95 (d, *J* = 8.4, 1H, H-4), 7.80 (d, *J* = 1.7, 2H, H-2', H-6'), 7.78 (dd, *J* = 8.4, 2.0, 1H, H-5), 7.32 (d, *J* = 1.7, 1H, H-4'), 2.38 (s, 6H, 2xCH₃). **¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):** 167.3, 162.8, 152.2, 138.8, 135.3, 132.3, 127.0, 126.6, 124.8, 124.6, 123.8, 121.8, 120.8, 21.7. **MS *m/z* (ESI):** [M+H]⁺ 350.9

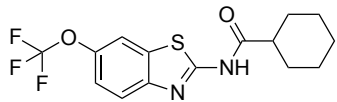


Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	29.319	MM	0.1440	6923.95117	801.29669	100.0000

Totals : 6923.95117 801.29669

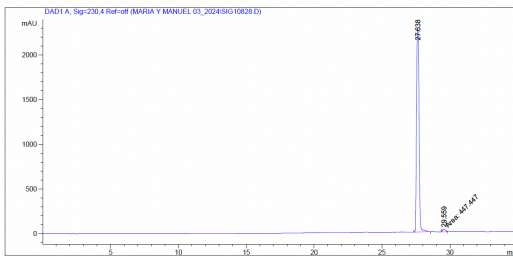
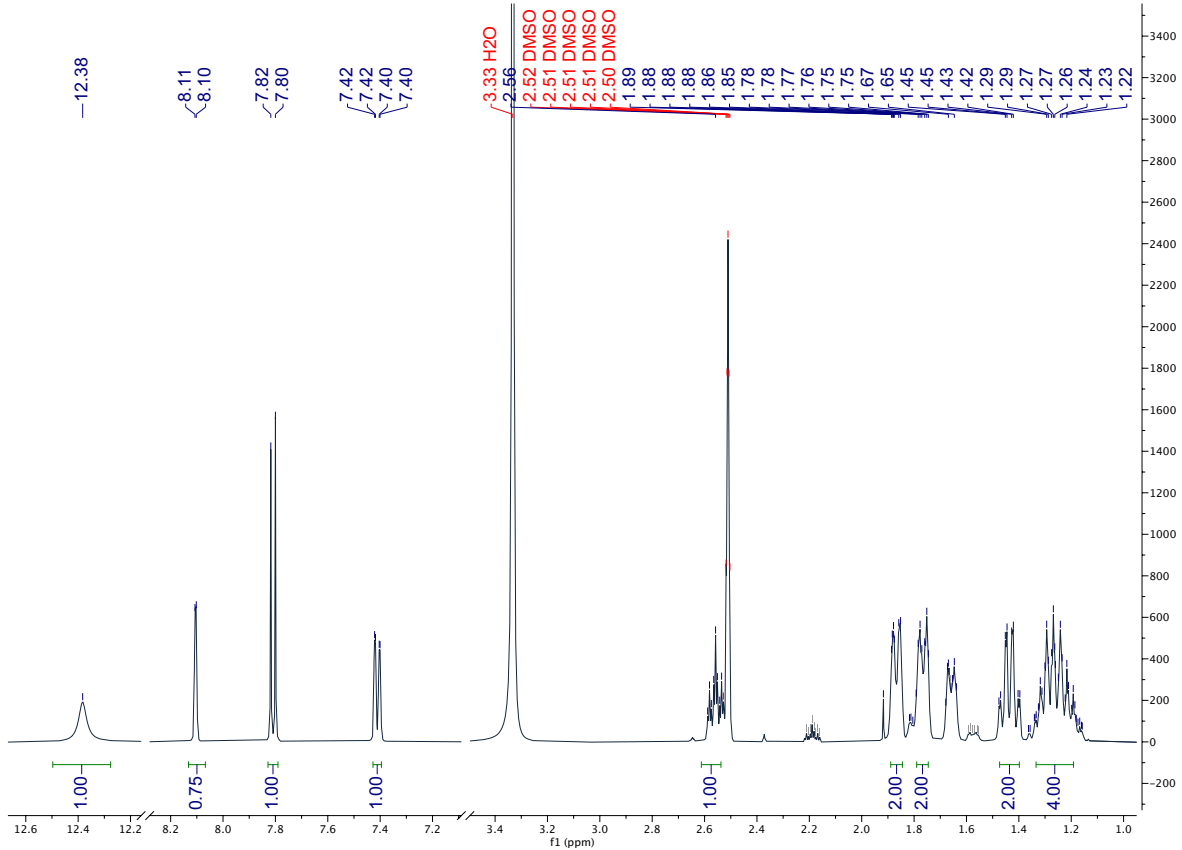




Chemical Formula: $C_{15}H_{15}F_3N_2O_2S$
Molecular Weight: 344,35

MJM792

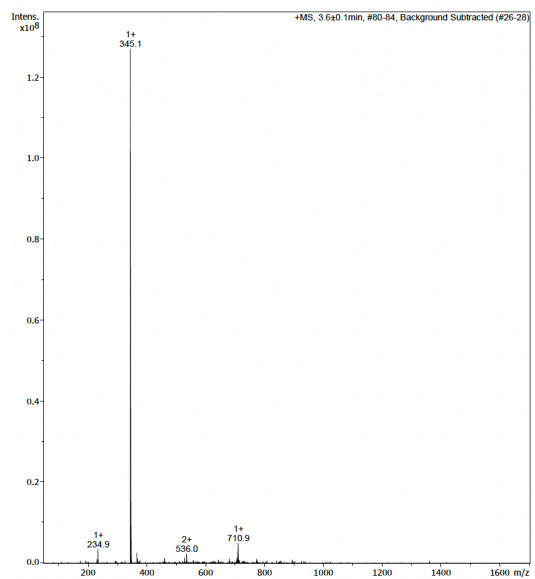
RENDIMIENTO: 52 % **PUREZA (HPLC):** 98,5 % (Rt = 27,638 min).
Rf (Hexano/AcOEt 8:2): 0,438. **P.F.:** 138-140°C. **1H RMN (500 mHz, DMSO- d_6) δ (ppm) J (Hz):** 12.38 (s, 1H, NH), 8.10 (d, J = 2.5, 1H, H-7), 7.81 (d, J = 8.8, 1H, H-4), 7.41 (dd, J = 8.8, 2.5, 1H, H-5), 2.56 (td, J = 8.0, 4.0, 1H, H-1'), 1.93–1.83 (m, 2H, H-2'a, H-6'a), 1.81–1.75 (m, 2H, H-3'a, H-5'a), 1.45–1.42 (m, 2H, H-2'b, H-6'b), 1.34–1.15 (m, 4H, H-4'a, H-4'b, H-3'b, H-5'b). **^{13}C RMN (126 mHz, DMSO- d_6) δ (ppm):** 176.3, 160.4, 148.4, 144.9, 133.6, 122.2, 120.6, 115.8, 44.4, 29.5, 26.1, 25.9. **MS m/z (ESI):** $[M+H]^+$ 345.1.

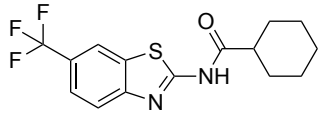


Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	27.638	BB	0.2108	2.92704e4	2264.54004	98.4943
2	29.559	MM	0.2368	447.44720	31.49605	1.5057

Totals : 2.97179e4 2296.03609

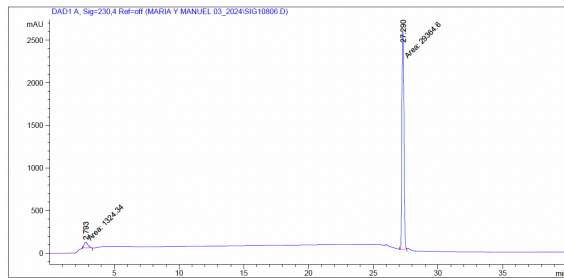
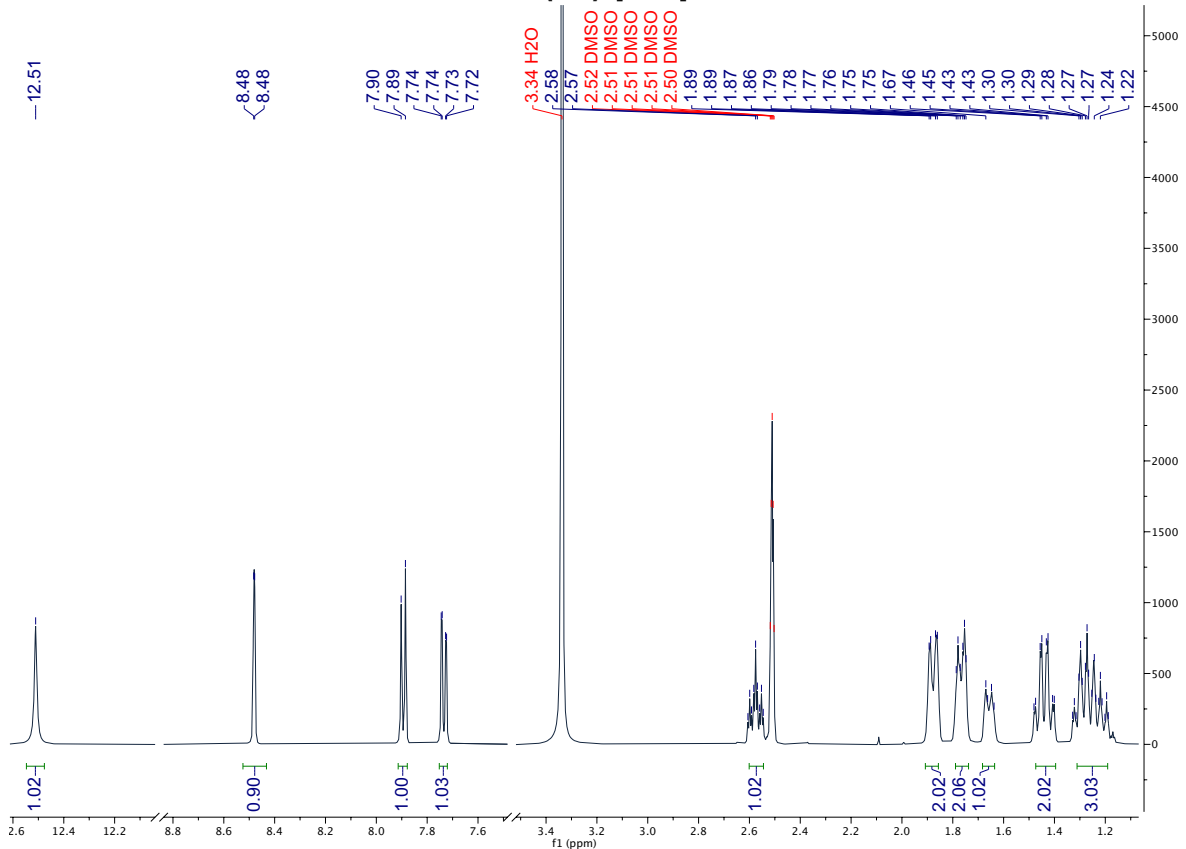




Chemical Formula: $C_{15}H_{15}F_3N_2OS$
Molecular Weight: 328,35

MJM793

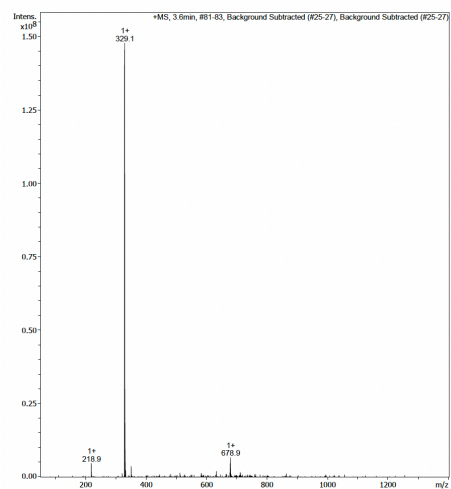
RENDIMIENTO: 52 % **PUREZA (HPLC):** 95,7 % ($R_t = 27,290$ min).
R_f (Hexano/AcOEt 7:3): 0,485. **P.F.:** 171-172°C. **¹H RMN (500 mHz, DMSO-_{d6}) δ (ppm) J (Hz):** 12.51 (s, 1H, NH), 8.48 (dd, $J = 2.0$, 1.1, 1H, H-7), 7.89 (d, $J = 8.5$, 1H, H-4), 7.73 (dd, $J = 8.5$, 2.0, 1H, H-5), 2.57 (tt, $J = 11.5$, 7.1, 3.5, 1H, H-1'), 1.88 (dd, $J = 11.5$, 3.5, 2H, H-2'a, H-6'a), 1.77 (dt, $J = 11.5$, 3.5, 2H, H-3'a, H-5'a), 1.65 (dd, $J = 11.5$, 3.5, 1H, H-4'a), 1.43 (td, $J = 12.5$, 3.2, 2H, H-2'b, H-6'b), 1.30 (tt, $J = 12.5$, 3.2, 2H, H-3'b, H-5'b), 1.22 (tt, $J = 12.5$, 3.2, 1H, H-4'b). **¹³C RMN (126 mHz, DMSO-_{d6}) δ (ppm):** 176.4, 162.1, 152.2, 132.9, 123.8, 123.7, 121.7, 120.7, 120.7, 44.4, 29.5, 26.1, 25.9. **MS m/z (ESI):** $[M+H]^+$ 329.1.

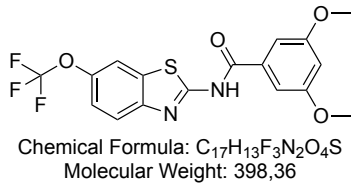


Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.793	MM	0.3306	1324.33862	66.75679	4.3154
2	27.290	MM	0.1910	2.93646e4	2561.87817	95.6846

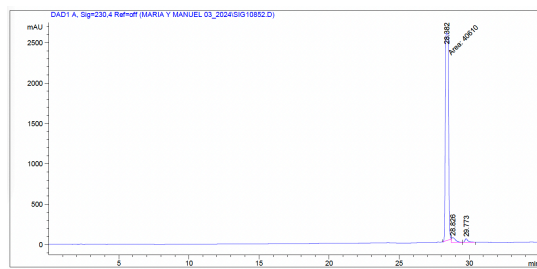
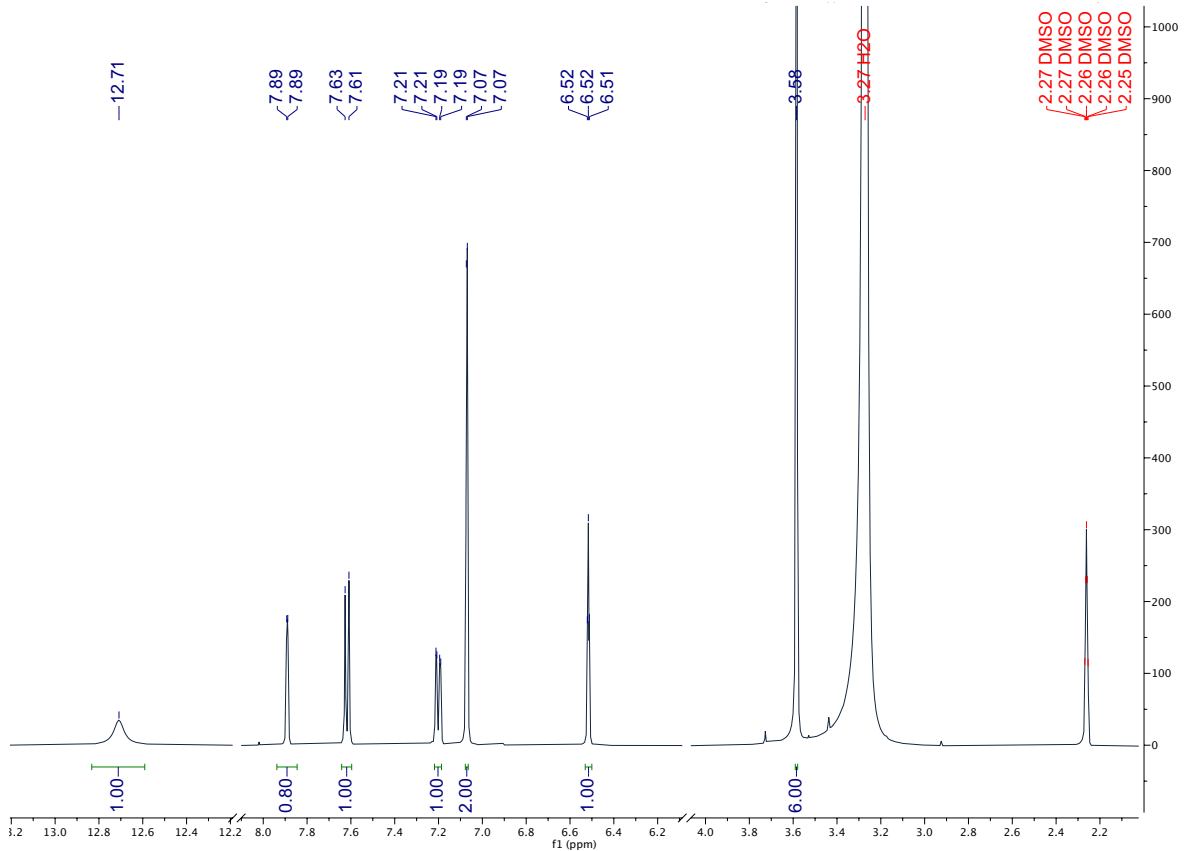
Totals : 3.06889e4 2628.63496



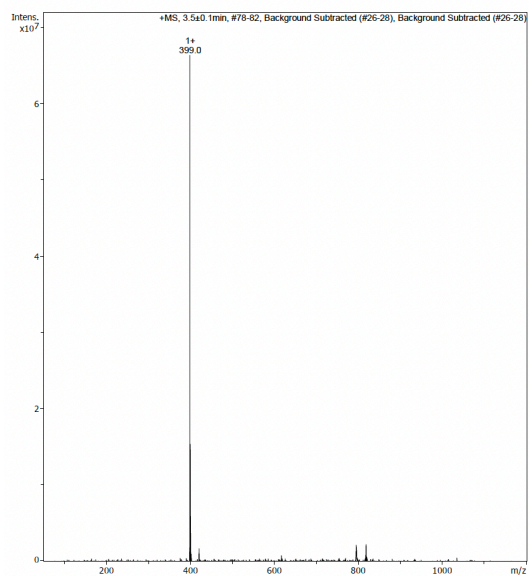


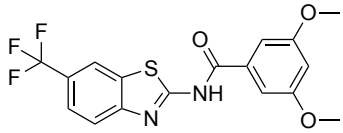
MJM833

RENDIMIENTO: 41 % **PUREZA (HPLC):** 95,3 % (Rt = 28,382 min). **Rf (Hexano/AcOEt 7:3):** 0,438. **P.F.:** 174-175°C. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) J (Hz):** 12.71 (s, 1H, NH), 7.89 (d, J = 2.4, 1H, H-7), 7.62 (d, J = 8.8, 1H, H-4), 7.20 (dd, J = 8.8, 2.4, 1H, H-5), 7.07 (d, J = 2.3, 2H, H-2', H-6'), 6.52 (t, J = 2.3, 1H, H-4'), 3.58 (s, 6H, 2xOCH₃). **¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):** 172.9, 166.5, 161.4, 161.1, 145.1, 134.3, 133.6, 122.4, 122.1, 120.8, 120.1, 115.8, 106.9, 106.2, 56.5. **MS m/z (ESI):** [M+H]⁺ 399.0.



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	28.382	MM T	0.2703	4.06100e4	2567.91235	95.2910
2	28.826	VV	0.3074	1253.13965	60.05331	2.9405
3	29.773	VB	0.2375	753.66370	45.90776	1.7685
Totals :				4.26168e4	2673.87342	

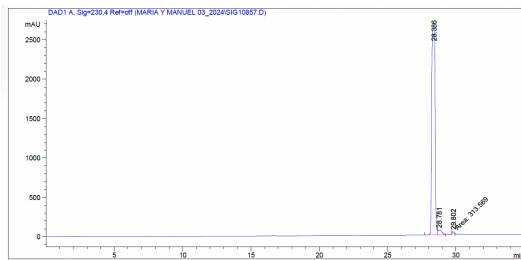
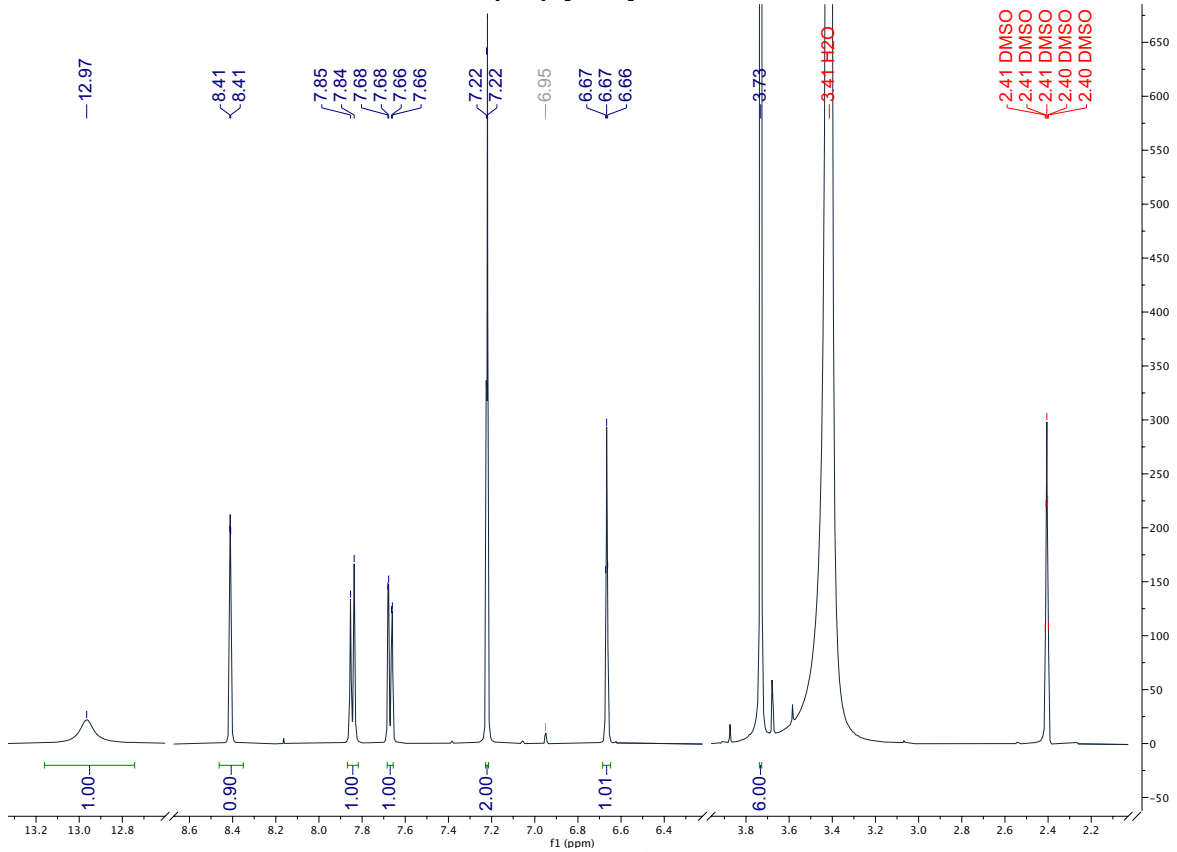




Chemical Formula: $C_{17}H_{13}F_3N_2O_3S$
Molecular Weight: 382,36

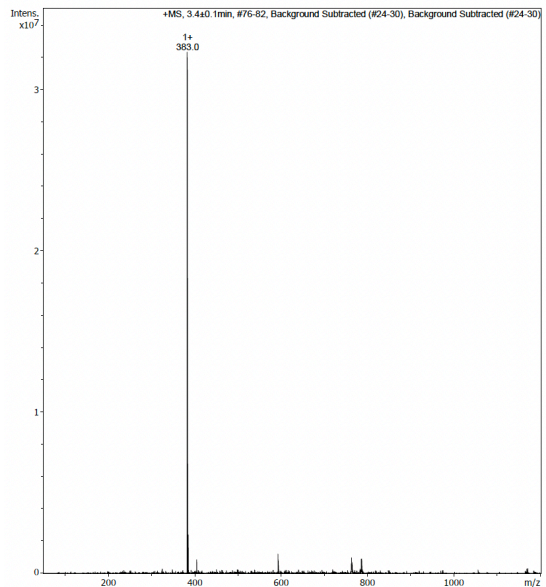
MJM834

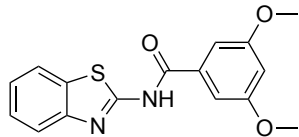
RENDIMIENTO: 29 % **PUREZA (HPLC):** 96,5 % ($R_t = 28,386$ min). **Rf (Hexano/AcOEt 7:3):** 0,591. **P.F.:** 191-192°C. **1H RMN (500 mHz, DMSO- d_6) δ (ppm) J (Hz):** 12.97 (s, 1H, NH), 8.41 (d, $J = 1.9$, 1H, H-7), 7.85 (d, $J = 8.5$, 1H, H-4), 7.67 (dd, $J = 8.5, 1.9$, 1H, H-5), 7.22 (d, $J = 2.3$, 2H, H-2', H-6'), 6.67 (t, $J = 2.3$, 1H, H-4'), 3.73 (s, 6H, 2xOCH₃). **^{13}C RMN (126 mHz, DMSO- d_6) δ (ppm):** 166.7, 162.8, 161.4, 152.1, 134.2, 132.9, 126.5, 124.9, 124.7, 123.9, 120.8, 106.9, 106.3, 56.5. **MS m/z (ESI):** $[M+H]^+$ 383.0.



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	28.386	VV	0.2300	4.40269e4	2594.77686	96.4810
2	28.781	VV	0.3091	1292.26123	62.54124	2.8319
3	29.802	MM T	0.1630	313.56915	32.05301	0.6872

Totals : 4.56327e4 2689.37110

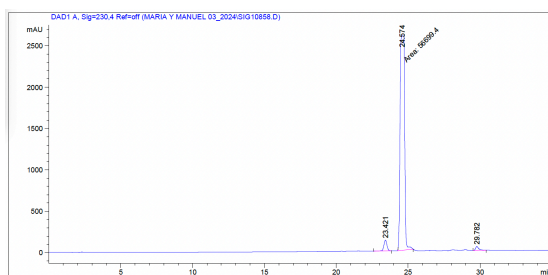
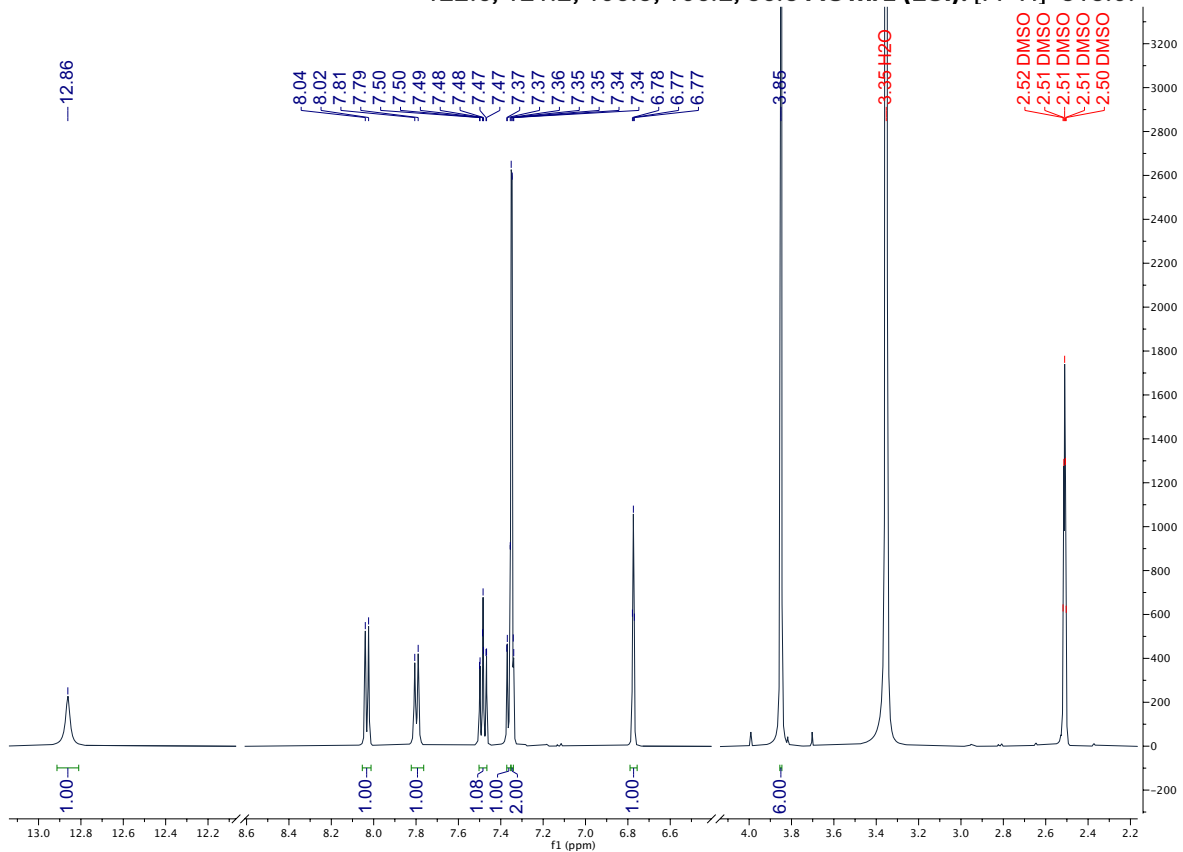




Chemical Formula: C₁₆H₁₄N₂O₃S
Molecular Weight: 314,36

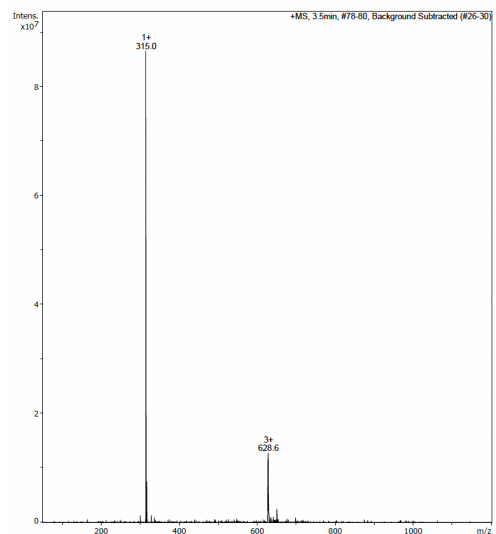
MJM835

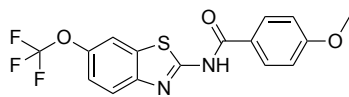
RENDIMIENTO: 47 % **PUREZA (HPLC):** 95,3 % (Rt = 24,574 min). **Rf (Hexano/AcOEt 7:3):** 0,515. **P.F.:** 155-156°C. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) J (Hz):** 12.86 (s, 1H, NH), 8.03 (dd, J = 8.1, 1.3, 1H, H-4), 7.80 (dd, J = 8.1, 1.3, 1H, H-7), 7.48 (td, J = 8.1, 1.3, 1H, H-6), 7.37 (td, J = 8.1, 1.3, 1H, H-5), 7.34 (d, J = 2.3, 2H, H-2', H-6'), 6.77 (t, J = 2.3, 1H, H-4'), 3.85 (s, 6H, 2xOCH₃). **¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):** 166.4, 161.4, 159.7, 149.3, 134.7, 132.4, 131.0, 127.1, 124.6, 122.6, 121.2, 106.8, 106.2, 56.5 **MS m/z (ESI):** [M+H]⁺ 315.0.



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	23.421	BB	0.2324	1914.66382	129.57326	3.2236
2	24.574	MM T	0.3643	5.66994e4	2594.23828	95.4613
3	29.782	VB	0.2396	781.08887	47.56324	1.3151

Totals : 5.93952e4 2771.37478

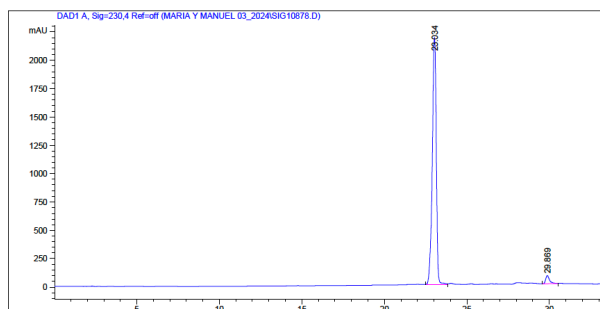
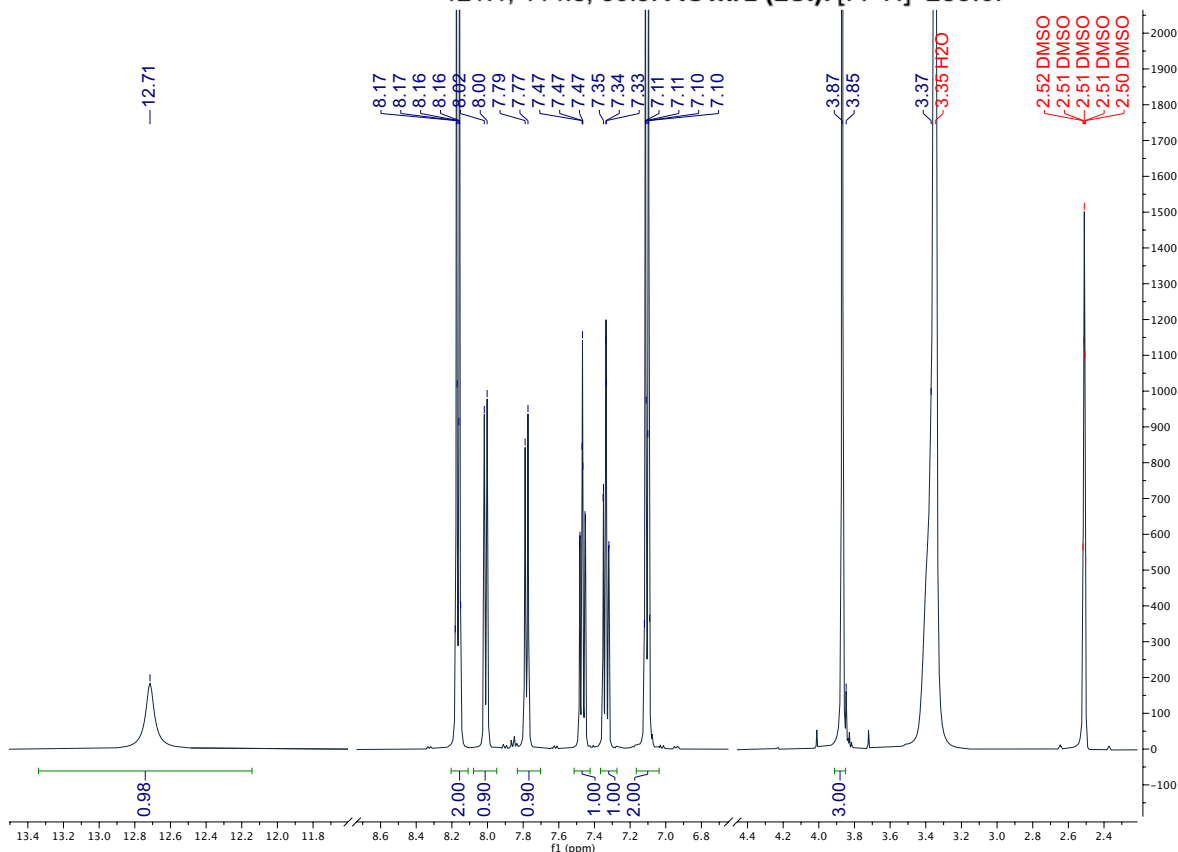




Chemical Formula: C₁₆H₁₁F₃N₂O₃S
Molecular Weight: 368,33

MJM817

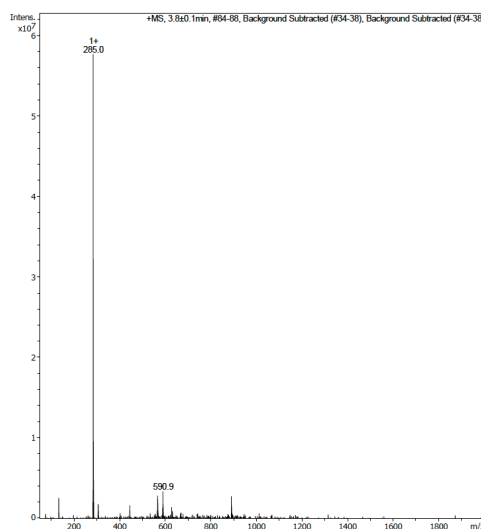
RENDIMIENTO: 35 % PUREZA (HPLC): 96,7 % (Rt = 23,034 min). **Rf (Hexano/AcOEt 7:3): 0,325. P.F.:** 184-185°C. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) J (Hz):** 12.71 (s, 1H, NH), 8.17 (d, J = 9.0, 2H, H-2', H-6'), 8.01 (d, J = 8.0, 1H, H-4), 7.78 (d, J = 8.0, 1H, H-7), 7.47 (td, J = 8.0, 1.3, 1H, H-5), 7.34 (td, J = 8.0, 1.3, 1H, H-6), 7.11 (d, J = 9.0, 2H, H-3', H-5'), 3.87 (s, 3H, OCH₃). **¹³C RMN (126 mHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):** 166.1, 163.8, 159.9, 149.4, 132.4, 131.3, 127.0, 124.8, 124.4, 122.5, 121.1, 114.8, 56.5. **MS m/z (ESI): [M+H]⁺ 285.0.**

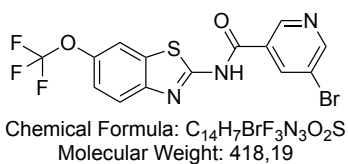


Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	23.034	BV	0.2583	3.66137e4	2175.74414	96.7666
2	29.869	VV	0.2497	1223.41699	72.92001	3.2334

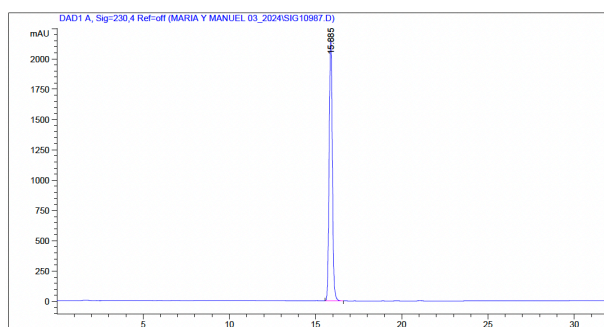
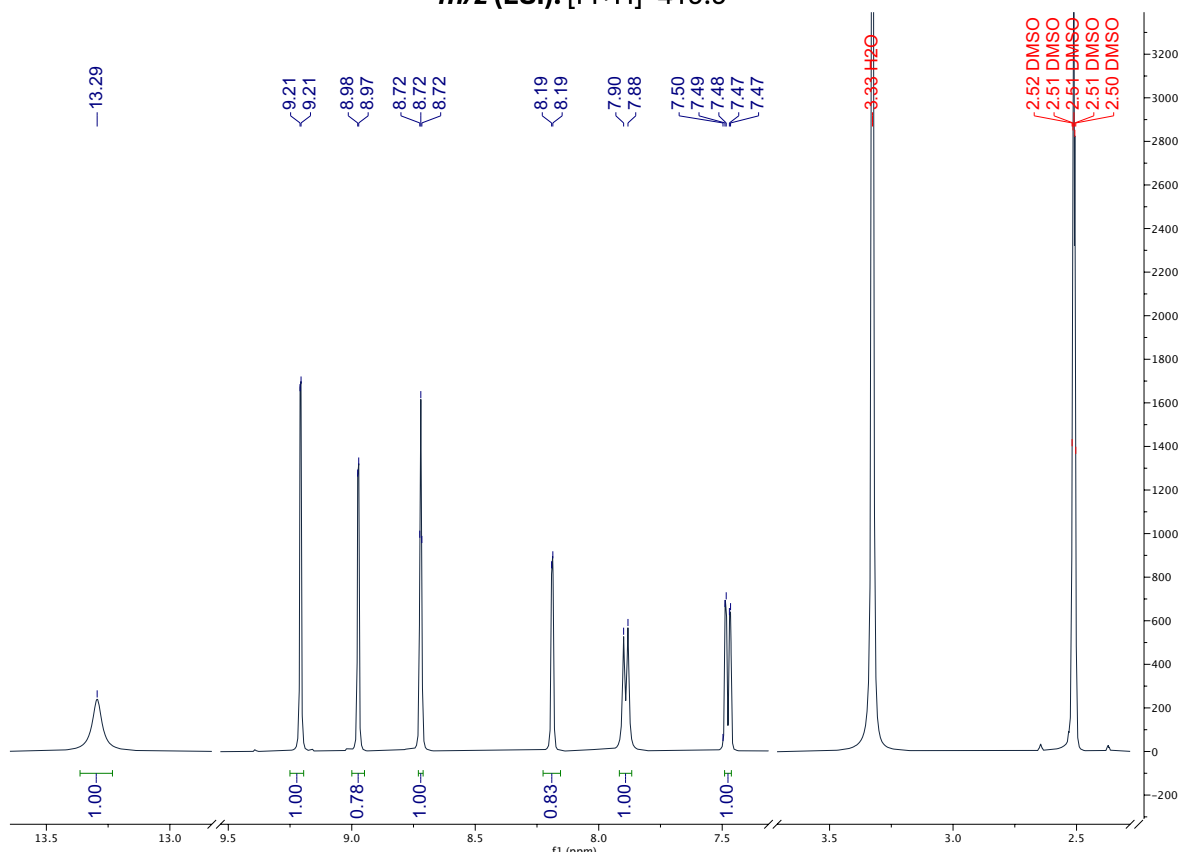
Totals : 3.78371e4 2248.66415





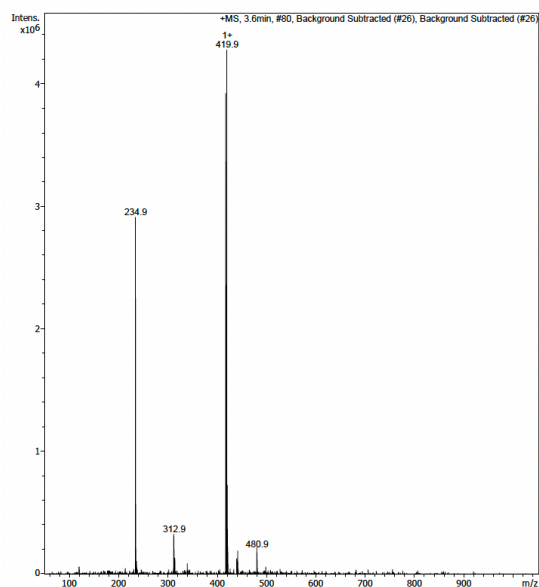
MJM783

RENDIMIENTO: 46 % **PUREZA (HPLC):** 100 % (R_t = 15,885 min). **R_f (Hexano/AcOEt 7:3):** 0,365. **P.F.:** 254-255°C. **¹H RMN (500 mHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) J (Hz):** 13.29 (s, 1H, NH), 9.21 (d, J = 2.1, 1H, H-2'), 8.97 (d, J = 2.1, 1H, H-4'), 8.72 (t, J = 2.1, 1H, H-6'), 8.19 (d, J = 2.5, 1H, H-7), 7.89 (d, J = 8.8, 1H, H-4), 7.48 (dd, J = 8.8, 2.5, 1H, H-5). **¹³C RMN (126 mHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):** 154.6, 148.8, 145.2, 145.2, 145.0, 139.3, 136.2, 124.1, 122.1, 121.0, 120.9, 120.1, 116.0, 115.1. **MS m/z (ESI):** [M+H]⁺ 419.9



Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

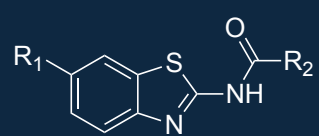
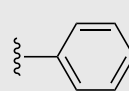
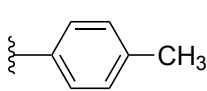
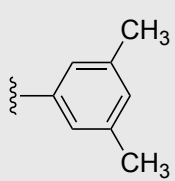
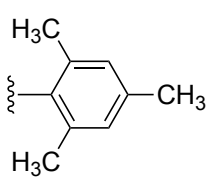
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	15.885	BB	0.2062	2.79915e4	2146.30029	100.0000
Totals :				2.79915e4	2146.30029	

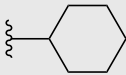
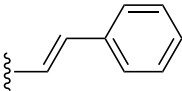
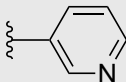
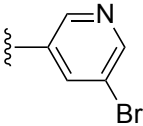
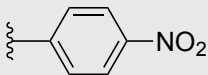
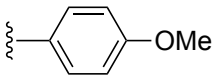
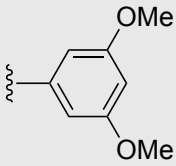
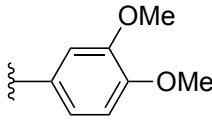


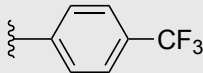
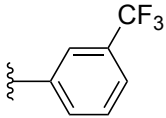
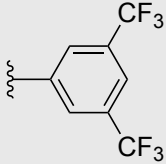
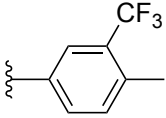
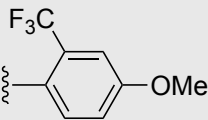
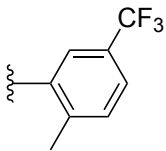
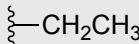

Cribado biológico de los fármacos sintetizados.

Se llevó a cabo un ensayo de determinación del calcio intracelular en un modelo fenotípico de células SH-SY5Y diferenciadas con RA y GLP-1 y transfectadas con las mutaciones MAPT P301L y APP V717I tratadas con un total de 51 compuestos, incluidos los 14 sintetizados ya comentados que se presentan en la Tabla 4. Este ensayo se realizó por triplicado (3 replicados biológicos) y en cada replicado los compuestos se ensayaron por duplicado (2 replicados técnicos por placa) a dos concentraciones, 10 μ M y 1 μ M.

Tabla 4 Compuestos derivados del 2-amidobenzotiazol empleados en el HTS.

			
R ₂	---OCF_3	R ₁ ---CF_3	---H
	MJM779	MJM785	MJM810
	MJM786	MJM787	MJM806
	MJM788	MJM789	MJM807
	-	-	MJM808

	MJM792	MJM793	MJM809
	MJM780	MJM805	MJM818
	MJM816	MJM804	MJM815
	MJM783	-	-
	MJM778	MJM802	MJM836
	MJM794	MJM795	MJM817
	MJM833	MJM834	MJM835
	MJM796	MJM819	MJM820

	MJM821	MJM827	MJM797
	MJM823	MJM829	MJM799
	MJM825	MJM831	MJM811
	MJM822	MJM828	MJM798
	MJM826	MJM832	MJM800
	-	MJM830	-
	MJM777	-	-
	AC_MJM_1A	-	-



AC_MJM_2A

-

-

De los 51 compuestos probados, **MJM806** y **MJM787** presentan un efecto protector estadísticamente significativo ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente) a concentración $1 \mu\text{M}$ en el ensayo de calcio intracelular. Este efecto protector solo se produce a una concentración de $1 \mu\text{M}$. No se observó efecto protector para ninguno de los dos compuestos a $10 \mu\text{M}$ (Figura 12).

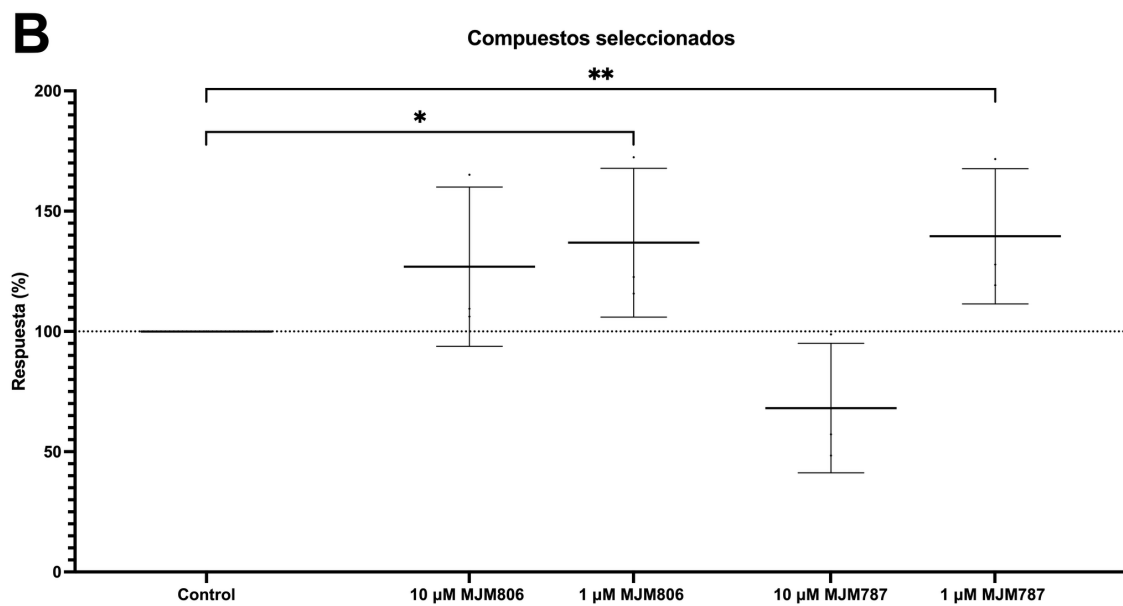
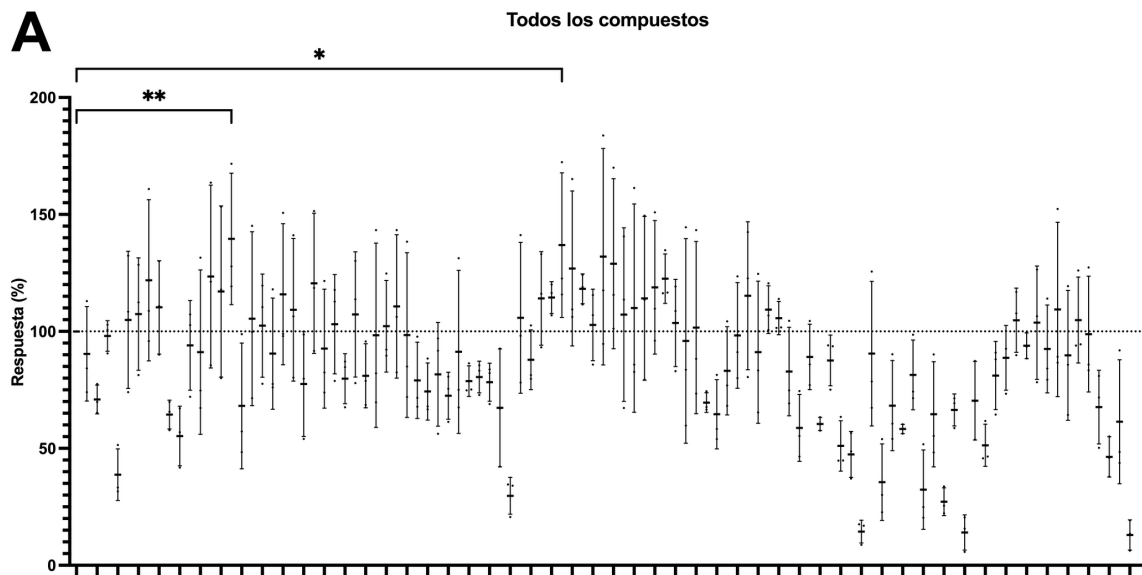


Figura 12. MJM787 y MJM806 ejercen un efecto protector frente a la reducción del flujo de entrada de calcio por despolarización con KCl en células SH-SY5Y transfectadas. Gráficos de barras que muestra el efecto de los 51 compuestos (A) y MJM787 y MJM806 (B) en la entrada de calcio a concentraciones 10 y 1 μ M. Cada punto representa la media de dos replicados técnicos de un ensayo biológico independiente (N=3). Las barras representan la media \pm desviación estándar de los experimentos. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ (two-way ANOVA seguido de test *post hoc* de Dunnett)

Predicción de propiedades ADME

De estos 51 compuestos (Tabla 4) se llevaron a cabo estudios computacionales para predecir su toxicidad y biodisponibilidad por vía oral, así como el paso de la barrera hematoencefálica (BHE) (Figura 13).

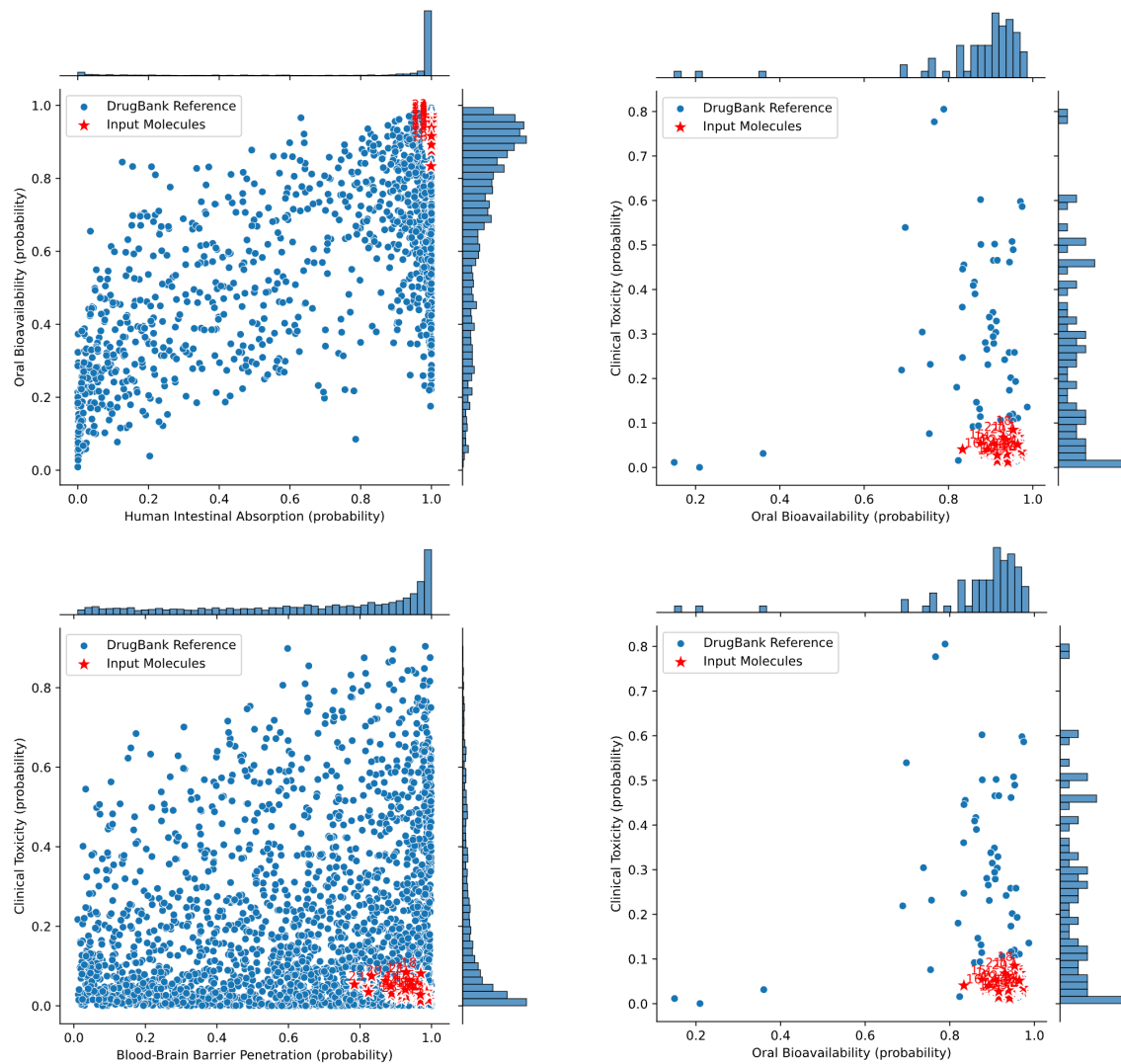


Figura 13. Comparación de propiedades ADME de los compuestos de la Tabla 4 (estrellas en rojo) con los compuestos de la base de datos completa (izquierda) de ADMET-AI (círculos en azul) y con los correspondientes al código ATC N06D (derecha). Valores expresados como probabilidad 0,0-1,0, estimada computacionalmente.

Discusión

Síntesis y caracterización de los compuestos

La reacción de Schotten-Baumann ha demostrado ser una reacción eficiente para la obtención de amidas a partir del cloruro de acilo comercial alcanzando rendimientos moderados (30-52%) y grados de pureza superiores al 95%. La reacción de formación de amidas a partir del ácido carboxílico en dos etapas también resultó efectiva para la síntesis de **MJM783**, obteniéndose un rendimiento del 46% con una pureza del 100%. El factor que más altera el rendimiento final es la presencia de humedad en el matraz de reacción pues lleva a la hidrólisis del cloruro de acilo y a la formación del ácido carboxílico, mucho menos reactivo [36]. Los subproductos más habituales en la mezcla de reacción son el ácido carboxílico/cloruro de acilo y el esqueleto principal (2-aminobenzotiazol o sus derivados). En la Figura 14, el primero muestra un tiempo de retención en HPLC bajo debido a su elevada polaridad y se observa como una banda más ancha.

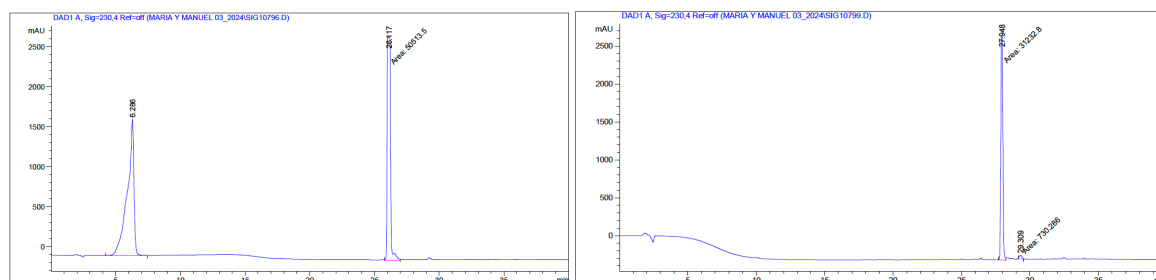
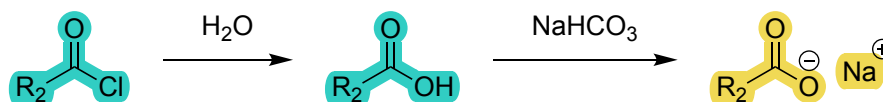


Figura 14. MJM779 antes (izquierda) y después (derecha) de la extracción líquido-líquido básica.

La separación del ácido carboxílico mediante columna cromatográfica resultó compleja como se comprobó durante la puesta a punto de la reacción. Por ello se realizó una extracción líquido-líquido empleando una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 al 10% (p/v) (Esquema 8). Esta permite la hidrólisis del cloruro de acilo al ácido que, por acción de la base se convierte en el carboxilato, soluble en la fase acuosa y muy poco soluble en la orgánica. Obtenemos así una fase orgánica libre de este subproducto. El 2-aminobenzotiazol de partida, por el contrario, se separa exitosamente mediante columna cromatográfica.



Esquema 8. Eliminación de subproductos de reacción (cloruro de acilo y ácido carboxílico) mediante extracción líquido-líquido. En azul los productos mayoritariamente en la fase acuosa y en amarillo mayoritariamente en la fase orgánica.

La reacción *one-pot* empleada en la síntesis de **MJM810** resultó poco efectiva, obteniéndose un rendimiento con las condiciones descritas del 9%, mucho menor que mediante la reacción de Schotten-Baumann, que permitió un rendimiento del 47%. Además, la pureza con la que se obtuvo inicialmente el producto (tras extracción líquido-líquido y columna cromatográfica) fue de un 60%, con una gran cantidad de impurezas (Figura 15). Es por ello por lo que se realizó una recristalización del producto, consiguiendo finalmente una pureza del 98,5%.

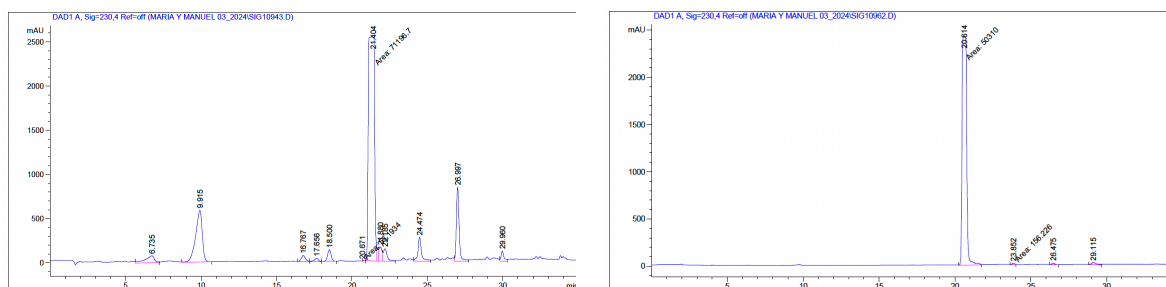
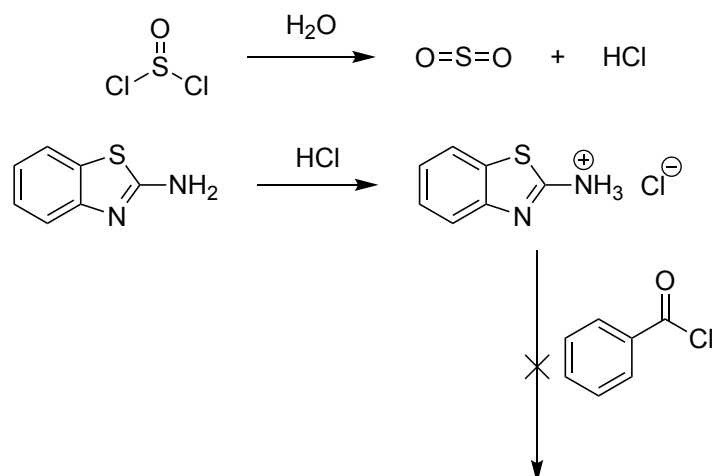


Figura 15. Resultados de la determinación de la pureza de **MJM810** mediante HPLC-UV, sintetizado por el método *one-pot*, antes (izquierda) y después (derecha) de purificación por recristalización.

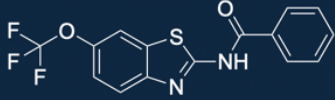
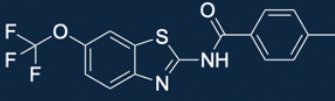
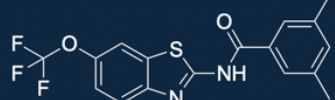
Se hipotetiza que este bajo rendimiento unido a la alta cantidad de impurezas se pueda deber a las condiciones ácidas de reacción. En presencia de la humedad ambiental, el SOCl_2 puede hidrolizarse y dar lugar a HCl y SO_2 [65]. El HCl así formado puede protonar la amina del 2-aminobenzotiazol haciéndolo menos nucleofílico, lo que impide el avance de la reacción como ya se ha descrito (Esquema 9). La bibliografía describe además la hidrólisis del anillo de benzotiazol en condiciones ácidas por rotura del enlace C-S, lo que explicaría la formación de otros subproductos observados en el cromatograma (Figura 15) [66–69]. Por tanto, esta metodología sintética no sería adecuada para nuestro esqueleto químico.



Esquema 9. Hipótesis que explica el bajo rendimiento obtenido en la reacción *one-pot* por hidrólisis del SOCl₂.

Los puntos de fusión son característicos de cada compuesto y permiten una identificación preliminar si se volviesen a sintetizar en un futuro. Además, el rango informa de la pureza del compuesto, siendo mayor cuanto menor sea la pureza. En nuestro caso se obtuvieron con un rango máximo de ± 2 °C. Los valores de temperatura de fusión dependen de la energía de fusión para cada sólido que viene determinada por la intensidad de las fuerzas intermoleculares existentes en cada caso. Si comparamos **MJM779**, **MJM786** y **MJM788** se aprecia que la adición de un grupo metilo aumenta la temperatura de fusión ya que aumenta la formación de enlaces de Van Der Waals por aumento de la superficie molecular lo que incrementa el empaquetamiento molecular dentro del cristal (Tabla 5). Además, la adición de metilos en posición *para* (**MJM786**) aumenta la simetría de empaquetamiento. Estos dos factores aumentan la energía de red cristalina y por tanto la entalpía de fusión lo que se traduce en un aumento de las temperaturas de fusión.

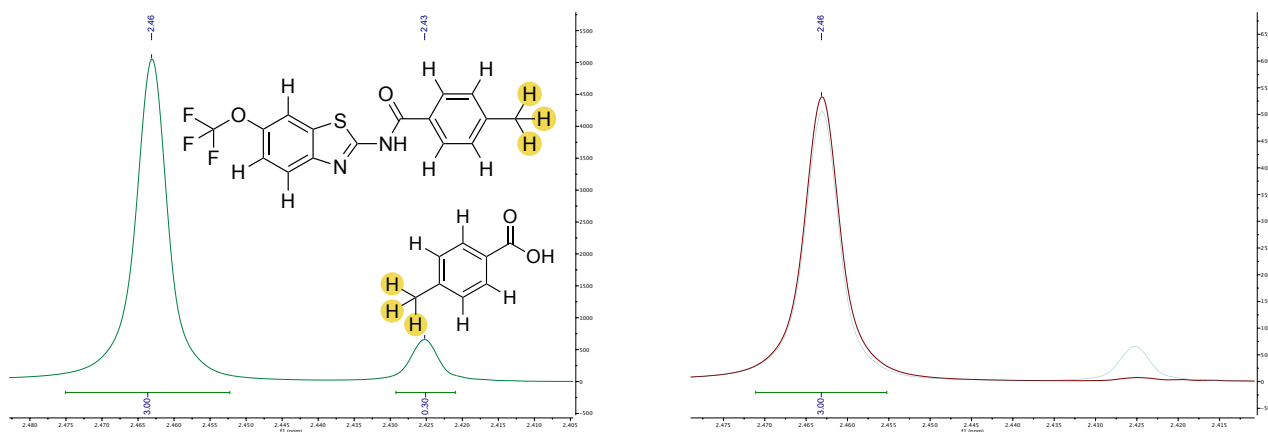
Tabla 5. Comparación de las temperaturas de fusión experimentales de **MJM779**, **MJM786** y **MJM788** en función del número de grupos metilo que presenta la molécula. Volumen molecular predicho computacionalmente usando *Molinspiration*.

Molécula	Temperatura de fusión (°C)	Volumen molecular (Å ³)
 <p>Chemical Formula: C₁₅H₉F₃N₂O₂S Molecular Weight: 338,30</p> <p>MJM779</p>	162-164	257,67
 <p>Chemical Formula: C₁₆H₁₁F₃N₂O₂S Molecular Weight: 352,33</p> <p>MJM786</p>	182-184	274,23
 <p>Chemical Formula: C₁₇H₁₃F₃N₂O₂S Molecular Weight: 366,36</p> <p>MJM788</p>	190-192	290,79

La RMN ¹H nos informa del entorno químico de los protones, número de protones equivalentes, acoplamiento espín-espín y, en general, la estructura molecular. El desplazamiento químico de los protones (δ), medido en ppm nos informa del tipo de protón. Protones cercanos a ambientes más electronegativos se encuentran más desapantallados lo que hace que el campo magnético local efectivo necesario para que entren en resonancia sea menor y por tanto su δ sea mayor en ppm (campo bajo), como se aprecia en **MJM810** en el que el H-5 tiene un valor de 7,48 ppm mientras que H-6 tiene un valor de 7,35 ppm. H-5 está más próximo del N que tiene un valor de electronegatividad de Pauling de 3,04, mayor que la del S de 2,58 al cual se encuentra más próximo el H-6. El protón de la amida es el que presenta mayores desplazamientos químicos (12-13 ppm), al ser el más desapantallado por estar unido a un nitrógeno (electronegatividad 3,04) y no a un carbono (electronegatividad 2,55) como el resto. El área bajo la curva de los picos nos informa del número de protones equivalentes que existen, por ejemplo, el pico correspondiente a los protones de los dos grupos OCH₃ del **MJM834** integra para 6 protones pues son todos ellos equivalentes al tener un mismo ambiente químico. La

multiplicidad de los picos y la constante de acoplamiento (J) nos informan del número de protones vecinos equivalentes con los que un protón interactúa (siguiendo la regla $n+1$) y la fortaleza de la interacción (constante de acoplamiento). Así pues, por ejemplo, el H-4' de **MJM833** da lugar a un triplete pues interactúa con 2 protones equivalentes ($n+1=3$) con una $J = 2,3$ Hz, pues es un acoplamiento a través de dos enlaces. Por el contrario, el H-4 del mismo compuesto da lugar a un doblete por interactuar con un único protón equivalente ($n+1=2$) con una $J = 8,8$ Hz por ser solo a través de un enlace. Teniendo estas consideraciones en cuenta podemos interpretar los resultados y caracterizar con exactitud todos los compuestos sintetizados (Ap. Resultados).

La RMN de ^1H también resultó útil en la determinación de la pureza e identificación de las impurezas de los compuestos. Si comparamos el espectro de RMN de **MJM786** antes y después de la extracción (Figura 14) podemos observar que, en el caso de antes de la extracción se observan picos que no se corresponden con los del producto. Por ejemplo, en la Figura 16 observamos una ampliación de la región correspondiente a los metilos (2,43 ppm y 2,46 ppm). Previa a la extracción se observan dos picos con una relación de integración 1:0,1. Tras la extracción, solo se mantiene el pico a 2,46 ppm correspondiente al CH_3 en posición 4' del compuesto final. El pico a 2,43 ppm se debe por tanto a una impureza que se encuentra en un porcentaje aproximado del 10%. Considerando las impurezas más comunes podemos hipotetizar que se trate de restos del ácido 4-metilbenzoico. En la región cercana al pico correspondiente del H-3' y H-5' del producto, 7,39 ppm (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3', H-5'), también se observa el pico equivalente correspondientes al ácido 4-metilbenzoico 7,36 ppm (d, $J = 7.72$ Hz H-3, H-5), en una proporción 1:0,1.



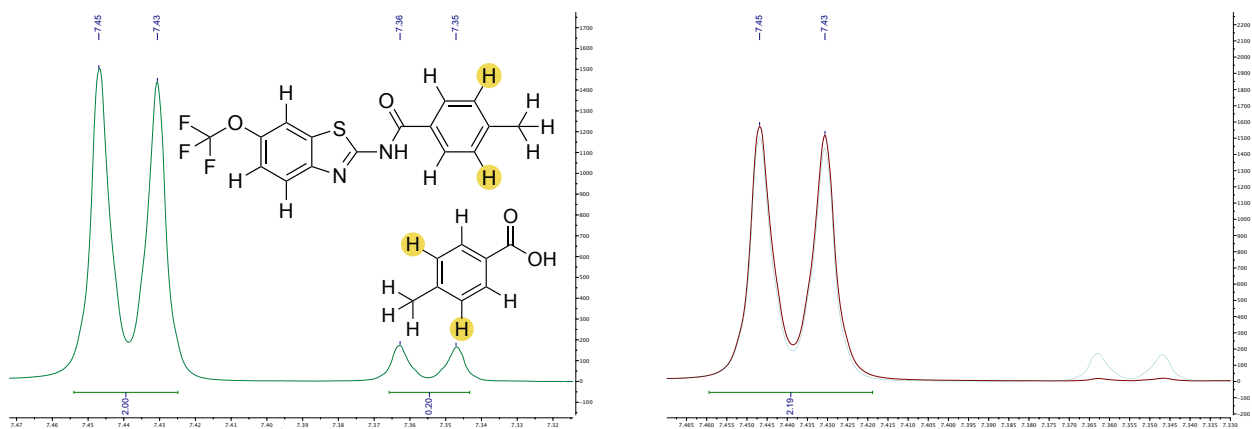


Figura 16. Comparación de espectros de RMN ^1H de **MJM786** antes (verde) y después (rojo) de la extracción líquido-líquido con NaHCO_3 .

La RMN de ^{13}C nos informa del tipo y número de átomos de carbono en la molécula y el entorno químico de cada carbono. Así pues, si nos fijamos en compuestos como el **MJM788** observamos que los carbonos alifáticos de los metilos aparecen a 22 ppm aproximadamente. Los carbonos aromáticos aparecen a 125-150 ppm. Se observa además un pico correspondiente al carbono carbonílico de la amida a 167 ppm aproximadamente y el pico del carbono del grupo OCF_3 a 145 ppm aproximadamente.

El espectro ESI-MS muestra en todos los casos la masa del pseudoion molecular monoprotonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ que se obtiene cuando la molécula forma un aducto con el ión H^+ . La técnica de ESI-MS es una técnica suave que no produce apenas fragmentación de la molécula, a diferencia de otras como la ionización por impacto electrónico, lo que nos permite observar la masa del pseudoion molecular íntegra, sin fragmentaciones. En el caso de **MJM835** se observa además la masa del aducto dimérico con un protón 628,0 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ (PM=314,36). En el caso del **MJM793** ocurre lo mismo, pero con un ion Na^+ en lugar del protón 678,9 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (PM=328,35).

Predicción de propiedades ADME

La predicción ADME de los compuestos nos permite determinar su potencialidad de convertirse en fármacos. En nuestro caso buscamos compuestos que sean efectivos a nivel del sistema nervioso central por lo que deben atravesar la BHE. La plataforma ADMET-AI emplea una inteligencia artificial generativa para predecir las propiedades ADME de manera *in silico*. Esta plataforma fue entrenada con 41 sets de datos de la base de datos *Therapeutics Data Commons*

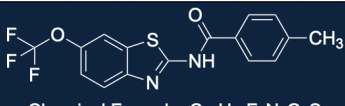
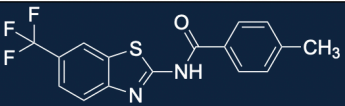
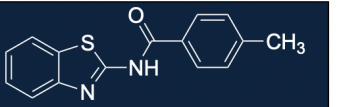
y usa la red neuronal *Chemprop-RDKit*. Los resultados obtenidos para nuestras moléculas se comparan con los de una base de datos de 2579 fármacos aprobados por la FDA obtenidos de DrugBank [70]. Sin embargo, también se compara con fármacos del código anatómico-terapéutico químico (ATC) N06D (piscoanalépticos) debido a las propiedades específicas que buscamos. La probabilidad de paso de BHE de todos los compuestos analizados es 0,784-0,991. El compuesto con la probabilidad más baja de paso de barrera es **MJM826** (P=0,784), seguido de **MJM794** (P=0,823). Ambos tienen en común la presencia de un metoxilo en posición 4' así como un sustituyente trifluorometoxi en posición 6. La presencia de sustituyentes en posición 6 parece afectar al paso de la BHE siendo los compuestos con un H los que presentan mayores probabilidades, por ejemplo, **MJM809** con un H en posición 6 tiene una probabilidad de paso de barrera de 0,991 mientras que si tiene un OCH₃ (**MJM792**) tiene una probabilidad menor, de 0,977. Además, se predice que todos los compuestos tengan una biodisponibilidad oral muy elevada (83%-97%) y baja toxicidad clínica (probabilidad entre 0,012 y 0,085). Esta biodisponibilidad oral no parece estar condicionada por una baja absorción intestinal pues todos ellos presentan probabilidades de absorción intestinal muy elevadas, de 0,9986-1,000.

Ensayo de flujo de entrada de calcio en modelo fenotípico de Alzheimer

En el Alzheimer temprano se produce un estado de hiperexcitabilidad que lleva a que los niveles de calcio intracelulares estén elevados. Sin embargo, en el Alzheimer tardío ocurre lo contrario observándose estados de hipoexcitabilidad en los que los niveles de calcio se encuentran disminuidos debido al elevado daño neuronal inducido por la hiperexcitabilidad prolongada que impide el correcto funcionamiento de los canales de calcio dependientes de voltaje [5]. Nuestro modelo fue capaz de replicar el estadio de hipoexcitabilidad propio del Alzheimer tardío (Figura 11).

El estudio del flujo de entrada de calcio inducido por KCl en células SH-SY5Y transfectadas con las mutaciones MAPT P301L y APP V717I demostró efectos estadísticamente significativos de neuroprotección de los compuestos **MJM806** y **MJM787** (Tabla 7) a concentración 1 μ M pero no a 10 μ M. Ambos fueron capaces de aumentar los niveles de Ca²⁺ intracelular tras despolarización con KCl en células SH-SY5Y transfectadas comparado con las tratadas con vehículo (Figura 12 B).

Tabla 6. Resultados del ensayo de calcio en células SH-SY5Y transfectadas y tratadas con 1 μM de **MJM786**, **MJM787** y **MJM806**. Respuesta (R) expresada como media \pm SD de N=3 con respecto a la respuesta obtenida en células SH-SY5Y transfectadas y diferenciadas tratadas con vehículo DMSO (100%).

	 <p>Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ Molecular Weight: 352,33</p> <p>MJM786</p>	 <p>Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{OS}$ Molecular Weight: 336,33</p> <p>MJM787</p>	 <p>Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$ Molecular Weight: 268,33</p> <p>MJM806</p>
R (%)	114,70% \pm 37,19%	135,79% \pm 25,96%	132,42% \pm 28,57%

Ambos compuestos presentan estructuras muy similares, diferenciándose tan solo en el sustituyente en posición 6, H en el caso de **MJM806** y CF_3 en el caso de **MJM787**. En el caso de **MJM786**, estructura similar, pero con OCF_3 en esta posición, estos efectos neuroprotectores no fueron estadísticamente significativos (Figura 12). Puede ser que la mayor lipofilia del sustituyente OCF_3 ya discutida en el apartado *Introducción* dificulte su entrada a nivel citoplasmático, quedando acumulado a nivel de la bicapa lipídica y ejerciendo un efecto “detergente” que puede llevar a cierta toxicidad celular. También puede ser que dificulte la solubilidad en los medios de cultivo celular llevando a su cristalización y reducción de la biodisponibilidad real en el medio de cultivo.

El grupo metilo, común en ambos, confiere a las moléculas de actividades biológicas interesantes debido a sus propiedades fisicoquímicas, lo que se conoce como el denominado “metilo mágico”. Este grupo permite, entre otros, el desplazamiento de moléculas de agua del lugar de unión de la diana, así como un aumento de las interacciones van der Waals (Tabla 5) con aminoácidos de las dianas. Además, permite regular el metabolismo de las moléculas evitándolo por efecto estérico o promover rutas metabólicas que den lugar a metabolitos suaves y menos tóxicos. Por ejemplo, anillos fenílicos libres como los de **MJM785** pueden oxidarse por CYP450 y generar epóxidos como el óxido de benceno, altamente reactivos. La adición del metilo dirige el metabolismo a esta posición ya que es más sencilla la oxidación de un carbono sp^3 que la epoxidación de un anillo aromático, dando lugar a una oxidación que produce alcohol bencílico y finalmente ácido benzoico, mucho menos tóxico que los epóxidos [71]. Las propiedades fisicoquímicas del metilo vienen representadas en el diagrama de Craig (Figura 17) en el que se compararan los parámetros π de Hansch (relacionado con la lipofilia) y σ de Hammett (relacionado con efectos electrónicos). El cuadrante correspondiente al metilo es el inferior

derecho pues es electrodonador por efecto inductivo (σ de Hammett -) y lipofílico (π de Hansch +) [72]. Podríamos cambiar el metilo por otro sustituyente del mismo cuadrante para dar lugar a bioisosteros que se puedan ensayar en un futuro proyecto dando lugar a un proceso de *hit to lead*.

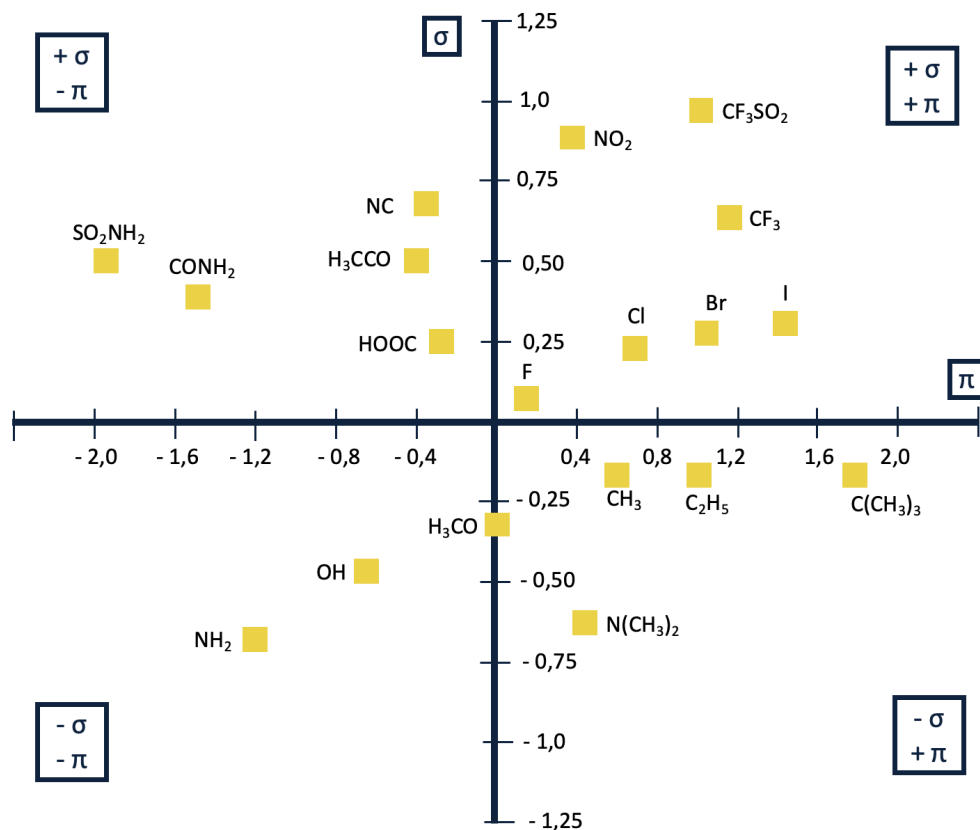


Figura 17. Diagrama de Craig con algunos ejemplos de sustituyentes y sus parámetros π de Hansch (abscisas) y σ de Hammett (ordenadas). Fuente: Adaptado de: [13]

Conclusiones

- La síntesis de amidas mediante la reacción de Schotten-Baumann a partir del cloruro de acilo comercial o mediante estrategia en dos etapas a partir del ácido carboxílico es efectiva para generar amidas derivadas del esqueleto 2-aminobenzotiazol con rendimientos moderadamente elevados del 40%.
- La estrategia de síntesis en una etapa (*one-pot*) no es un método efectivo para la obtención de amidas derivadas de 2-aminobenzotiazol debido a la degradación del anillo benzotiazólico.
- La técnica de extracción líquido-líquido empleando como fase acuosa una disolución al 10% (p/v) de NaHCO₃ seguido de purificación mediante columna cromatográfica es un método efectivo para la purificación de estos compuestos obteniéndose grados de pureza superiores al 95%.
- Los 51 compuestos ensayados presentan propiedades ADME muy favorables para convertirse en fármacos capaces de actuar sobre el sistema nervioso central, comprobado en ensayos *in silico* de Inteligencia Artificial.
- **MJM787** y **MJM806** ejercen un efecto protector frente a la reducción del flujo de entrada de calcio por despolarización con KCl en células SH-SY5Y transfectadas con las mutaciones MAPT P301L y APP V717I siendo por tanto potenciales *hits* para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Agradecimientos

Este trabajo supone el culmen de una de las etapas más importantes de mi vida. No habría sido posible sin el constante apoyo de mi tutora, la Dra. Maria Matos que ha sido mucho más que una mentora para mí. Perseverante y tenaz en lo que se propone, se ha convertido en un ejemplo a seguir durante toda mi estancia en el grupo. No existen suficientes palabras para agradecer toda la ayuda que me ha brindado durante estos años. Tampoco habría sido posible sin la ayuda de mis compañeros de laboratorio, con los que he pasado horas riendo, trabajando y disfrutando de la ciencia juntos. Ana, Víctor, Giulio, Vega, Lorenzo, Sara, Nuria, Italo, Emilia y Vinicius habéis pasado a formar parte de mi pequeña pero incipiente familia científica y espero que siga así muchos años más. Tampoco me querría olvidar de mis mentores de más allá del “charco”, Jasmine y David, que me enseñaron lo que es ser científico a altas horas de la noche encerrados en una sala de cultivo celular escuchando Eminem y Ana Mena. Han sido clave en el desarrollo de este trabajo y no puedo estar más agradecido por su apoyo, la Dra. Mabel Loza y el Dr. Antón L. Martínez quienes me acogieron en su grupo del CiMUS con los brazos abiertos y ayudaron a hacer este proyecto realidad.

Por último, agradecer el apoyo emocional que, aunque no lo parezca, es casi más importante que el científico. A mis padres Suso y Pili, a mis hermanos, Miguel, Alejandro y Pablo y a mis cuñadas Sara y Laura por acompañarme en esta travesía de 5 años que me convierte ahora en farmacéutico. El camino no ha sido fácil, pero con vuestra ayuda todo ha salido bien. A mis amigos, en especial a Clara, Agus y Lucia con los que he compartido momentos en Santiago que jamás olvidaré y a Alba F. por acompañarme todos estos años desde la distancia. Entre salmones y noches en la Conchi/Bio/Torrecedeira, creo que os echaré mucho de menos y espero que nuestras vidas se vuelvan a cruzar en un futuro.

Bibliografía

- [1] World Health Organisation. Dementia. 2025.
- [2] Zheng Q, Wang X. Alzheimer's disease: insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy. *Protein Cell*. 2025;16:83–120. <https://doi.org/10.1093/PROCEL/PWAE026>.
- [3] Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;57:1105–21. <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>.
- [4] Sies H, Mailloux RJ, Jakob U. Fundamentals of redox regulation in biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2024;25:701–19. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00730-2>.
- [5] Verma M, Lizama BN, Chu CT. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. *Transl Neurodegener*. 2022;11:1–14. <https://doi.org/10.1186/S40035-021-00278-7>.
- [6] Andrade-Guerrero J, Santiago-Balmaseda A, Jeronimo-Aguilar P, Vargas-Rodríguez I, Cadena-Suárez AR, Sánchez-Garibay C, et al. Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. *Int J Mol Sci*. 2023;24. <https://doi.org/10.3390/IJMS24043754>.
- [7] Muratore CR, Rice HC, Srikanth P, Callahan DG, Shin T, Benjamin LNP, et al. The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons. *Hum Mol Genet*. 2014;23:3523. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDU064>.
- [8] Silva MVF, Loures CDMG, Alves LCV, De Souza LC, Borges KBG, Carvalho MDG. Alzheimer's disease: Risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci*. 2019;26. <https://doi.org/10.1186/S12929-019-0524-Y>.
- [9] Agencia Europea de Medicamentos. Leqembi [Internet]. Ámsterdam: EMA; [citado 3 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/leqembi>
- [10] van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2023;388:9–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>.

- [11] 2024 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2024;20:3708–821. <https://doi.org/10.1002/ALZ.13809>.
- [12] Breijyeh Z, Karaman R, Muñoz-Torrero D, Dembinski R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020, Vol 25, Page 5789 2020;25:5789. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245789>.
- [13] Davis AM, Ward SE (Simon E. *The Handbook of medicinal chemistry: principles and practice.* 2nd edition. London: Royal Society of Chemistry; 2023.
- [14] Mignani S, Majoral JP, Desaphy JF, Lentini G. From Riluzole to Dextramipexole via Substituted-Benzothiazole Derivatives for Amyotrophic Lateral Sclerosis Disease Treatment: Case Studies. *Molecules.* 2020;25:3320. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25153320>.
- [15] Doble A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology.* 1996;47. https://doi.org/10.1212/WNL.47.6_SUPPL_4.233S.
- [16] Jaiswal MK. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Med Res Rev.* 2019;39:733–48. <https://doi.org/10.1002/MED.21528>.
- [17] Noël S, Cadet S, Gras E, Hureau C. The benzazole scaffold: a SWAT to combat Alzheimer's disease. *Chem Soc Rev.* 2013;42:7747–62. <https://doi.org/10.1039/C3CS60086F>.
- [18] Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804:1405–12. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2010.04.001>.
- [19] Serdons K, Verduyck T, Vanderghinste D, Borghgraef P, Cleynhens J, Van Leuven F, et al. ¹¹C-labelled PIB analogues as potential tracer agents for in vivo imaging of amyloid β in Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2009;44:1415–26. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2008.09.038>.
- [20] Neumaier B, Deisenhofer S, Sommer C, Solbach C, Reske SN, Mottaghy F. Synthesis and evaluation of F-18-fluoroethylated benzothiazole derivatives for in vivo imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Appl Radiat Isot.* 2010;68:1066–72. <https://doi.org/10.1016/J.APRADISO.2009.12.044>.

- [21] Lee BC, Kim JS, Kim BS, Son JY, Hong SK, Park HS, et al. Aromatic radiofluorination and biological evaluation of 2-aryl-6-[¹⁸F]fluorobenzothiazoles as a potential positron emission tomography imaging probe for β -amyloid plaques. *Bioorg Med Chem*. 2011;19:2980–90. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2011.03.029>.
- [22] Alavez S, Vantipalli MC, Zucker DJS, Klang IM, Lithgow GJ. Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan. *Nature*. 2011;472:226–9. <https://doi.org/10.1038/nature09873>.
- [23] Asgarshamsi MH, Dehkordi MM, Beigi HM, Fassihi A, Saghaie L. Synthesis of Some Benzothiazole Derivatives Based on 3-Hydroxypyridine-4-one and Benzaldehyde and Evaluation of Their β -Amyloid Aggregation Inhibition Using both Experimental Methods and Molecular Dynamic Simulation. *Chem Biodivers*. 2023;20:e202301113. <https://doi.org/10.1002/CBDV.202301113>.
- [24] Sharma AK, Kim J, Prior JT, Hawco NJ, Rath NP, Kim J, et al. Small bifunctional chelators that do not disaggregate amyloid β fibrils exhibit reduced cellular toxicity. *Inorg Chem*. 2014;53:11367–76. https://doi.org/10.1021/IC500926C/SUPPL_FILE/IC500926C_SI_002.CIF.
- [25] Telpoukhovskaia MA, Patrick BO, Rodríguez-Rodríguez C, Orvig C. Exploring the multifunctionality of thioflavin- and deferiprone-based molecules as acetylcholinesterase inhibitors for potential application in Alzheimer’s disease. *Mol Biosyst*. 2013;9:792–805. <https://doi.org/10.1039/C3MB25600F>.
- [26] Zaldivar-Diez J, Li L, Garcia AM, Zhao WN, Medina-Menendez C, Haggarty SJ, et al. Benzothiazole-Based LRRK2 Inhibitors as Wnt Enhancers and Promoters of Oligodendrocytic Fate. *J Med Chem*. 2020;63:2638–55. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.9B01752/SUPPL_FILE/JM9B01752_SI_006.PD.
- [27] Liang T, Neumann CN, Ritter T. Introduction of fluorine and fluorine-containing functional groups. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013;52:8214–64. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201206566;WGROU:STRING:PUBLICATION>.

- [28] Liu J, Lin W, Sorochinsky AE, Butler G, Landa A, Han J, et al. Successful trifluoromethoxy-containing pharmaceuticals and agrochemicals. *J Fluor Chem.* 2022;257–258:109978. <https://doi.org/10.1016/J.JFLUCHEM.2022.109978>.
- [29] Abula A, Xu Z, Zhu Z, Peng C, Chen Z, Zhu W, et al. Substitution Effect of the Trifluoromethyl Group on the Bioactivity in Medicinal Chemistry: Statistical Analysis and Energy Calculations. *J Chem Inf Model.* 2020;60:6242–50. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.0C00898/SUPPL_FILE/CI0C00898_SI_002.ZIP.
- [30] Flynn GL. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. *J Pharm Sci.* 1980;69:1109. <https://doi.org/10.1002/jps.2600690938>.
- [31] Zhou Y, Wang J, Gu Z, Wang S, Zhu W, Acenã JL, et al. Next Generation of Fluorine-Containing Pharmaceuticals, Compounds Currently in Phase II-III Clinical Trials of Major Pharmaceutical Companies: New Structural Trends and Therapeutic Areas. *Chem Rev.* 2016;116:422–518. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.5B00392>.
- [32] Kamal M, Jawaid T, Dar UA, Shah SA. Amide as a Potential Pharmacophore for Drug Designing of Novel Anticonvulsant Compounds. *Chemistry of Biologically Potent Natural Products and Synthetic Compounds.* 2021:319–42. <https://doi.org/10.1002/9781119640929.CH11>.
- [33] Matos MJ, Novo P, Mayán L, Torres I, Uriarte E, Yáñez M, et al. 8-Amide and 8-carbamate substitution patterns as modulators of 7-hydroxy-4-methylcoumarin's antidepressant profile: Synthesis, biological evaluation and docking studies. *Eur J Med Chem.* 2023;248:115091. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2023.115091>.
- [34] Rodríguez-Enríquez F, Viña D, Uriarte E, Laguna R, Matos MJ. 7-Amidocoumarins as Multitarget Agents against Neurodegenerative Diseases: Substitution Pattern Modulation. *ChemMedChem.* 2021;16:179–86. <https://doi.org/10.1002/CMDC.202000454;CTYPE:STRING:JOURNAL>.
- [35] Perreux L, Loupy A, Volatron F. Solvent-free preparation of amides from acids and primary amines under microwave irradiation. *Tetrahedron.* 2002;58:2155–62. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00085-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00085-6).

- [36] McMurry J. Organic chemistry. 7th ed. California: Pacific Grove; 2008.
- [37] Leggio A, Belsito EL, De Luca G, Di Gioia ML, Leotta V, Romio E, et al. One-pot synthesis of amides from carboxylic acids activated using thionyl chloride. *RSC Adv.* 2016;6:34468–75. <https://doi.org/10.1039/C5RA24527C>.
- [38] Boriack-Sjodin A, Carcanague DR, Dussault DD, Hull KG, Ioannidis G, Manchester JJ, et al. WO2010038081 Heterocyclic derivatives and methods of use thereof, 2009.
- [39] Zhao P, Liu M, Li Y, Wang L, Duan Z. Reactions of Benzyl Phosphine Oxide/Sulfide with (COCl)₂: Synthesis of Novel Acyl Chloride-Substituted Chlorophosphonium Ylides. *J Org Chem.* 2024;89. <https://doi.org/10.1021/ACS.JOC.4C01720>.
- [40] The Principles of Humane Experimental Technique. *Med J Aust.* 1960;1:500–500. <https://doi.org/10.5694/J.1326-5377.1960.TB73127.X>.
- [41] Solana-Manrique C, Sánchez-Pérez AM, Paricio N, Muñoz-Descalzo S. Two- and Three-Dimensional In Vitro Models of Parkinson's and Alzheimer's Diseases: State-of-the-Art and Applications. *Int J Mol.* 2025;26:620. <https://doi.org/10.3390/IJMS26020620>.
- [42] Mungenast AE, Siegert S, Tsai LH. Modeling Alzheimer's disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells. *Mol Cell Neurosci.* 2016;73:13–31. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2015.11.010>.
- [43] Osaki T, Uzel SGM, Kamm RD. Microphysiological 3D model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from human iPS-derived muscle cells and optogenetic motor neurons. *Sci Adv.* 2018;4. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAT5847>.
- [44] Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Magotani H, Onoe H, Hayashi T, et al. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* 2017;548:592–6. <https://doi.org/10.1038/NATURE23664>.
- [45] Hossini AM, Megges M, Prigione A, Lichtner B, Toliat MR, Wruck W, et al. Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells from a sporadic Alzheimer's disease donor as a model for investigating AD-associated gene regulatory networks. *BMC Genomics.* 2015;16. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1262-5>.

- [46] Miller J, Studer L. Aging in iPS cells. *Aging* (Albany NY). 2014;6:246. <https://doi.org/10.18632/AGING.100653>.
- [47] Ranjan VD, Qiu L, Lee JW, Chen X, Jang SE, Chai C, et al. A microfiber scaffold-based 3D in vitro human neuronal culture model of Alzheimer's disease. *Biomater Sci*. 2020;8:4861–74. <https://doi.org/10.1039/D0BM00833H>.
- [48] Lomoio S, Pandey RS, Rouleau N, Menicacci B, Kim WH, Cantley WL, et al. 3D bioengineered neural tissue generated from patient-derived iPSCs mimics time-dependent phenotypes and transcriptional features of Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2023;28:5390–401. <https://doi.org/10.1038/S41380-023-02147-3>.
- [49] Karmirian K, Holubiec M, Goto-Silva L, Fernandez Bessone I, Vitória G, Mello B, et al. Modeling Alzheimer's Disease Using Human Brain Organoids. *Methods Mol Biol*. 2023;2561:135–58. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2655-9_7.
- [50] Choi SH, Kim YH, Hebisch M, Sliwinski C, Lee S, D'Avanzo C, et al. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2014;515:274–8. <https://doi.org/10.1038/nature13800>.
- [51] Galgoczy R, Pastor I, Colom A, Giménez A, Mas F, Alcaraz J. A spectrophotometer-based diffusivity assay reveals that diffusion hindrance of small molecules in extracellular matrix gels used in 3D cultures is dominated by viscous effects. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;120:200–7. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2014.05.017>.
- [52] Lee HK, Velazquez Sanchez C, Chen M, Morin PJ, Wells JM, Hanlon EB, et al. Three dimensional human neuro-spheroid model of Alzheimer's disease based on differentiated induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2016;11. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0163072>.
- [53] de Medeiros LM, De Bastiani MA, Rico EP, Schonhofen P, Pfaffenseller B, Wollenhaupt-Aguiar B, et al. Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In vitro Model for Alzheimer's Disease Studies. *Mol Neurobiol*. 2019;56:7355–67. <https://doi.org/10.1007/S12035-019-1605-3>.

- [54] Yang JL, Lin YT, Chen WY, Yang YR, Sun SF, Chen S Der. The Neurotrophic Function of Glucagon-Like Peptide-1 Promotes Human Neuroblastoma Differentiation via the PI3K-AKT Axis. *Biology (Basel)*. 2020;9:1–16. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY9110348>.
- [55] Lopes FM, da Motta LL, De Bastiani MA, Pfaffenseller B, Aguiar BW, de Souza LF, et al. RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. *Neurotox Res*. 2017;31:545–59. <https://doi.org/10.1007/S12640-016-9699-0>.
- [56] Cardoso S, Carvalho C, Correia SC, Moreira PI. Protective effects of 2,4-dinitrophenol in okadaic acid-induced cellular model of Alzheimer’s disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2024;1870. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2024.167222>.
- [57] Chen ZY, Zhang Y. Animal models of Alzheimer’s disease: Applications, evaluation, and perspectives. *Zool Res*. 2022;43:1026. <https://doi.org/10.24272/J.ISSN.2095-8137.2022.289>.
- [58] Frozza RL, Horn AP, Hoppe JB, Simão F, Gerhardt D, Comiran RA, et al. A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Res*. 2009;34:295–303. <https://doi.org/10.1007/S11064-008-9776-8>.
- [59] Karra D, Dahm R. Transfection techniques for neuronal cells. *J Neurosci*. 2010;30:6171–7. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0183-10.2010>.
- [60] Wang KW, Zhang G, Kuo MH. Frontotemporal Dementia P301L Mutation Potentiates but Is Not Sufficient to Cause the Formation of Cytotoxic Fibrils of Tau. *Int J Mol Sci*. 2023;24. <https://doi.org/10.3390/IJMS241914996>.
- [61] Fontana IC, Zimmer AR, Rocha AS, Gosmann G, Souza DO, Lourenco M V., et al. Amyloid- β oligomers in cellular models of Alzheimer’s disease. *J Neurochem*. 2020;155:348–69. <https://doi.org/10.1111/JNC.15030>.
- [62] Barro-Fernández M. Development of a novel in vitro model of Alzheimer’s disease and its application to high-throughput screening assays [Tesis doctoral]. Santiago de

Compostela: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico; 2025. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10347/41595>

- [63] Belardetti F, Tringham E, Eduljee C, Jiang X, Dong H, Hendricson A, et al. A Fluorescence-based high-throughput screening assay for the identification of T-type calcium channel blockers. *Assay Drug Dev Technol.* 2009;7:266–80. <https://doi.org/10.1089/ADT.2009.191>.
- [64] Vetter I. Development and optimization of FLIPR high throughput calcium assays for ion channels and GPCRs. *Adv Exp Med Biol.* 2012;740:45–82. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_3.
- [65] Zasovskaya MA, Ignatov SK. Molecular pathways of SOCl₂ hydrolysis within mono- and diaqua complexes. A quantum chemical study. *Comput Theor Chem.* 2015;1069:56–65. <https://doi.org/10.1016/J.COMPTC.2015.06.019>.
- [66] Choudhary S, Shrivastav V. Synthesis and Characterization of Substituted 2-Aminobenzothiols. *IJCRT.* 2016;4:2320–882. 10.1080/15257770.2014.955194.
- [67] Gáplovský A, Chabreček P, Sutoris V. Benzothiazole compounds XXX. Hydrolysis of 2-styrylbenzothiazolium salts substituted at the position 3 a. *Chem Papers.* 1986;41:671–4.
- [68] Jackson PF, Morgan KJ, Turner AM. Studies in heterocyclic chemistry. Part IV. Kinetics and mechanisms for the hydrolysis of benzoxazoles. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 1972:1582–7. <https://doi.org/10.1039/P29720001582>.
- [69] Wang YT, Kyoung JJ, Myers LR, Glover SA, Novak M. Hydrolysis and photolysis of 4-acetoxy-4-(benzothiazol-2-yl)-2,5-cyclohexadien-1-one, a model anti-tumor quinol ester. *J Org Chem.* 2009;74:4463–71. https://doi.org/10.1021/JO9008436/SUPPL_FILE/JO9008436_SI_001.PDF.
- [70] Swanson K, Walther P, Leitz J, Mukherjee S, Wu JC, Shivnaraine R V., et al. ADMET-AI: a machine learning ADMET platform for evaluation of large-scale chemical libraries. *Bioinformatics* 2024;40. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTAE416>.
- [71] Pinheiro P de SM, Franco LS, Fraga CAM. The Magic Methyl and Its Tricks in Drug Discovery and Development. *Pharmaceuticals* 2023;16:1157. <https://doi.org/10.3390/PH16081157>.

- [72] Ertl P. Craig plot 2.0: An interactive navigation in the substituent bioisosteric space. *J Cheminform.* 2020;12:1–6. <https://doi.org/10.1186/S13321-020-0412-1/TABLES/1>.