

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 514**

51 Int. Cl.:

**C07D 213/75** (2006.01)

**A01N 43/40** (2006.01)

**A01P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09718177 .0**

96 Fecha de presentación: **03.03.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2247576**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2010**

54 Título: **Inhibidores de la señalización de los brasinoesteroides**

30 Prioridad:

**03.03.2008 EP 08450027**

45 Fecha de publicación de la mención BOP:

**11.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**11.12.2012**

73 Titular/es:

**GMI - GREGOR-MENDEL-INSTITUT FÜR  
MOLEKULARE PFLANZENBIOLOGIE GMBH  
(100.0%)**

**Dr. Bohr-Gasse 3  
1030 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**JONAK, CLAUDIA y  
ROZHON, WILFRIED**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 392 514 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la señalización de los brasinoesteroides

La presente invención se refiere a inhibidores de la señalización de los brasinoesteroides.

Los brasinoesteroides son hormonas esteroideas de las plantas implicadas en muchos procesos, entre ellos la expansión y división celulares, el crecimiento del tubo polínico, el desarrollo del tejido vascular, la senescencia y la modulación de las respuestas al estrés. Los brasinoesteroides se forman a partir de precursores esteróicos. Muchas enzimas de la biosíntesis de los brasinoesteroides se identificaron mediante el análisis de mutantes de *Arabidopsis thaliana* tales como *dwf1*, *cbb1*, *dwf4*, *cpd*, *def2* y *ste1/dwf7*. Recientemente, el análisis de la mutación *dx* del tomate condujo a identificar una enzima de la última etapa de la biosíntesis de los brasinoesteroides, la conversión de la castasterona en brasinólido, el brasinoesteroide más activo. Se pudieron identificar dos homólogos en *Arabidopsis thaliana* con una estrategia de genes candidatos. Estas enzimas y DWF4 y CPD pertenecen a la familia de las monooxigenasas con citocromo P450.

El brasinólido es percibido por la cinasa receptora BRI1 y su correceptor BAK1 que, a diferencia de los receptores de esteroides de los animales, se localizan en la membrana celular. La señal se transduce al núcleo por mecanismos aún desconocidos y regula las cinasas de tipo GSK-3/Shaggy implicadas en la señalización de los brasinoesteroides: BIN2/UCU1, ASK $\tau$ , ASK $\zeta$  y ASK $\theta$  (Vert y Chory, 2006). Estas cinasas fosforilan factores de transcripción que pertenecen a la familia BES1/BZR1 en un motivo conservado que consiste en ocho repeticiones adyacentes de la secuencia SXXXS. De esta manera se bloquea la actividad de estos factores de transcripción, ya que sólo sus variantes desfosforiladas se unen al ADN y regulan la expresión génica. La desfosforilación está favorecida por BSU1, la fosfatasa nuclear de proteínas, y sus homólogos BSL1 a 3. Además, las proteínas 14-3-3 pueden fijarse a las BZR1 y BES1 fosforiladas, lo que podría favorecer su relocalización en el citoplasma.

Aunque se conocen una serie de enzimas de la síntesis y señalización de los brasinoesteroides, están disponibles muy pocos inhibidores. El primer inhibidor selectivo conocido de la síntesis de los brasinoesteroides fue KM-01 (Kim et al. 1998). Dado que era poco potente, su aplicación era muy escasa. Las observaciones de que el uniconazol, inhibidor de la biosíntesis del ácido giberélico, tenía un ligero efecto inhibidor sobre la biosíntesis de los brasinoesteroides condujo al desarrollo del brasinazol (Min et al. 1999) y del Brz2001 (Sekimata et al. 2001). De igual forma se identificó otro inhibidor de los brasinoesteroides mediante la modificación del propiconazol (Sekimata et al. 2002). La diana de la acción del brasinazol es el hierro hemo del citocromo P450 de la monooxigenasa DWF4. El brasinazol se ha utilizado ampliamente para estudiar la síntesis y los efectos de los brasinoesteroides. Además, el brasinazol se empleó para escrutinios genéticos con los que aislar mutantes que no responden a este compuesto. Esto condujo a la identificación del factor de transcripción BZR1.

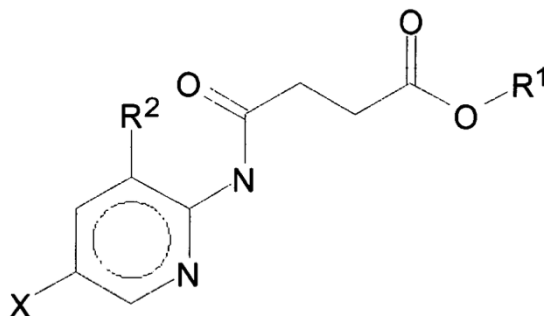
El ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico es una monoamida del ácido succínico con 2-amino-5-bromopiridina. Se comprobó que para su actividad eran características importantes el bromo de la posición 5 del anillo de piridina y el grupo de ácido carboxílico. Recientemente, el ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico se identificó que era un inhibidor de la señalización de los brasinoesteroides mediante una estrategia de genética química. El ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico es un compuesto no esteroideo que induce respuestas constitutivas a los brasinoesteroides en las plantas mediante la inhibición de la mayoría de las cinasas de tipo GSK-3/Shaggy. *A. thaliana* posee 10 ASK (cinasas de tipo GSK-4/Shaggy de *A. thaliana*) que se pueden subdividir en 4 grupos. Las cinasas del grupo I (ASK $\alpha$ , ASK $\gamma$  y ASK $\epsilon$ ) y las cinasas del grupo II (BIN2, ASK $\zeta$  y ASK $\tau$ ) son las más sensibles al ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico. La cinasa del grupo III ASK $\theta$  se inhibe moderadamente mientras que no se inhibe la segunda cinasa del grupo III, ASK $\beta$ . ASK $\delta$ , una cinasa del grupo IV, también es sensible al ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico. Se desconoce el motivo de esta especificidad.

El butanoato de 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxometilo tiene un n.º de registro CAS 697231-46-2. Burdulene et al. (*Pharm. Chem. J.*, 30 (1996): 680-682) describen, entre otras cosas, la reacción de la 2-amino-5-bromopiridina con el anhídrido succínico para producir bikinina. La patente de Gran Bretaña GB 1 162 727 describe ácidos ácidos N-sustituídos que estimulan el crecimiento de las plantas.

Asami et al. (Capítulo 19 en «Pesticide Chemistry», (2007), WILEY-VCH) describen el conocimiento general sobre moléculas pequeñas en la ciencia de los plaguicidas. Ostaszewski et al. (*J. Molec. Struct.*, (1999) 474: 197-206) describen estudios sobre la conformación molecular de los amidoésteres de piridina mono- y disustituídos. Roma et al. (*Bio. Med. Chem.*, 8 (2000): 751-768) describen pirimidin-4-onas sustituidas. La patente internacional WO 2008/049729 A1 describe imitadores no esteroideos de los brasinoesteroides.

Un objeto de la presente invención es dar a conocer más inhibidores de la señalización de los brasinoesteroides, parecidos al ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico. Preferentemente, la actividad inhibidora *in vivo* de los nuevos inhibidores debería ser más alta que la actividad inhibidora del ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico.

Por consiguiente, la presente invención da a conocer el uso de un compuesto de la fórmula (I)



en donde X es F, Cl, Br o I;

R¹ es CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³, C₂H₃R³R⁴, C₃H₇, C₃H₆R³ o C₃H₅R³R⁴;

5 R² es H, CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³ o C₂H₃R³R⁴; y

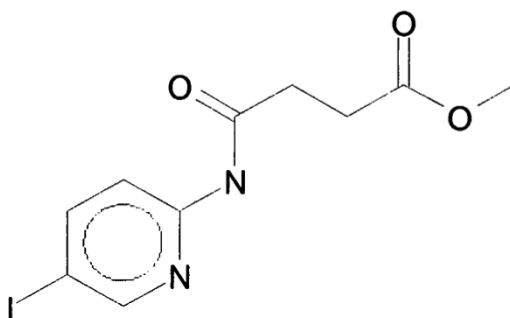
R³ y R⁴ son, independientemente el uno del otro, X, OH o NH₂,

para el tratamiento de las plantas, en particular para la mejora del crecimiento de las plantas, la mejora del rendimiento del cultivo y/o proporcionar resistencia al estrés.

10 En los compuestos en los que R¹ es un resto propilo (a saber, en donde el compuesto es un éster de propilo), C₃H₇, C₃H₆R³ o C₃H₅R³R⁴ se puede unir sobre el átomo O al carbonilo a través de los átomos de C externos (n-propilo) o a través del átomo de C central (i-propilo).

La presente invención da a conocer variantes de esterificación del ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-5-oxobutanoico, con alcoholes alifáticos pequeños, opcionalmente sustituidos con un halógeno, OH o NH₂. Los miembros de estas variantes por esterificación del ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico (R¹ = H) de acuerdo con la presente invención tienen mejores propiedades fisicoquímicas para la administración a las plantas (manejo y captación *in vivo* por plantas o por células vegetales). Se pudo demostrar con la presente invención que al menos algunos miembros de este grupo han mostrado sorprendentemente que exhiben una mejor actividad inhibidora *in vivo* (a saber, en el transcurso de la administración a las plantas o a las células vegetales) de las cinasas implicadas en la señalización de los brasinoesteroides en comparación con el ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico.

Específicamente el compuesto que tiene la fórmula (II)



25 denominado 4-[(5-yodopirid-2-il)amino]-4-oxobutanoato de metilo, ha mostrado un efecto *in vivo* significativamente mejor que el ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico. De igual forma, se prefieren específicamente las variantes de la fórmula (II) con Br y Cl. Otro compuesto preferente es la forma etilato de fórmula (I), a saber, el compuesto en el que R¹ es C₂H₅ y R² es H. En esta forma etilato se prefiere el compuesto con I, Br y Cl.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención son imitadores de los brasinoesteroides que se pueden utilizar en la fitotecnología, p. ej., para mejorar en las plantas su crecimiento, la resistencia al estrés biótico y/o abiótico o el rendimiento del cultivo. Con la presente invención se pueden incrementar los rendimientos de biomasa.

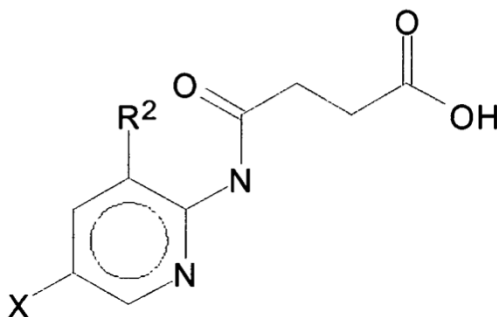
30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición para la mejora del crecimiento de la planta y/o del rendimiento del cultivo que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o (II). La «cantidad eficaz» la puede ajustar fácilmente un experto en la técnica al aplicar el procedimiento de ajuste de la

escala de laboratorio al tratamiento de campo. El compuesto de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a una concentración eficaz como sea oportuno según las circunstancias en el campo respectivo. La concentración adecuada puede estar en el margen de  $\mu\text{mol/l}$  de bajo a medio, p. ej., de 1 a 500  $\mu\text{mol/l}$ , preferentemente de 5 a 100  $\mu\text{mol/l}$ . Los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden disolver en solventes orgánicos adecuados y permitidos en la tecnología vegetal y en la agricultura, preferentemente DMSO o etanol, y diluidos a la concentración deseada con agua o soluciones acuosas de tampones y/o compuestos que estimulan el crecimiento de las plantas y/o protectores de las plantas.

De acuerdo con la presente invención, la composición de acuerdo con la presente invención se aplica para el tratamiento de las plantas. De acuerdo con una realización específicamente preferente, los compuestos de acuerdo con la fórmula (I) o (II) se utilizan como herbicidas. Mientras que el uso para la estimulación del crecimiento de la planta se logra habitualmente en el margen de concentración de 1 a 10  $\mu\text{M}$  o incluso más bajo, el uso como herbicida se realiza preferentemente a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  o más, p. ej., entre 50 y 500  $\mu\text{M}$ .

La presente invención también se refiere a un método para la preparación de un compuesto de acuerdo con la fórmula (II) en el que una 2-amino-5-yodopiridina se hace reaccionar con un halogenuro de succinato de metilo, preferentemente cloruro de succinato de metilo. La 2-amino-5-yodopiridina se disuelve en un solvente adecuado, preferentemente tetrahidrofurano, que también contiene una amina terciaria, preferentemente trietilamina (preferentemente en un exceso molar (en particular del 10 al 40%) en comparación con la 2-amino-5-yodopiridina). A continuación se añade un halogenuro de succinato de metilo (preferentemente en el mismo solvente que la 2-amino-5-yodopiridina) (preferentemente en un ligero exceso molar (en particular del 2 al 10%)) de modo que la temperatura no se incremente por encima de los 50 °C, preferentemente no por encima de los 45 °C, en particular no por encima de los 40 °C. Luego se puede agitar adicionalmente la reacción durante 5 a 60 min a una temperatura entre 20 y 40 °C, en particular a la temperatura ambiente (25 °C). Después se añade agua y se reduce el pH (preferentemente con la adición de ácido clorhídrico) a un pH por debajo de 6,5, en particular aproximadamente 6. A continuación, el producto se puede extraer con un solvente de extracción adecuado, p. ej., dietiléter, y después se lava (p. ej., con un ácido débil diluido, tal como ácido acético al 1%). Se puede retirar el agua residual con el uso de sustancias higroscópicas, tal como sulfato de sodio anhidro, antes de la evaporación del éter a baja presión. Se puede realizar la retrocristalización, p. ej., desde etanol o tolueno al 95%, para dar un producto casi blanco.

La presente invención también se refiere a un método para preparar un compuesto de acuerdo con la fórmula (III)



y su posterior esterificación o alquilación para obtener un compuesto de acuerdo con la fórmula (II) (X es I y R² es H). Este método de acuerdo con la presente invención se caracteriza por el hecho que la 2-amino-5-yodopiridina se hace reaccionar con el anhídrido succínico para obtener un compuesto que tiene la fórmula (III). El grupo carboxilo de este compuesto se puede esterificar o alquilar posteriormente para obtener un compuesto que tiene la fórmula (II).

Con más detalle, para preparar un compuesto de acuerdo con la fórmula (III), la 2-amino-5-yodopiridina se disuelve en un solvente adecuado, preferentemente tetrahidrofurano. Entonces se añade el anhídrido succínico (preferentemente en el mismo solvente que la 2-amino-5-yodopiridina) (preferentemente en exceso molar (en particular un exceso del 10 al 40%) en comparación con la 2-amino-5-yodopiridina) y la mezcla se mantiene con reflujo durante un tiempo conveniente para permitir que la reacción se lleve a cabo en el nivel deseado, preferentemente de 30 min a 5 h, más preferentemente de 1 a 4 h, en particular 2 h. El producto bruto se puede obtener mediante el enfriamiento de la reacción, p. ej., a 4 °C durante varias horas (p. ej., 1 a 10 horas). El producto bruto se puede retrocristalizar, p. ej., desde etanol al 95%.

El ácido libre de acuerdo con la fórmula (III) se puede alquilar posteriormente con un halogenuro de metilo, sulfato de dimetilo o diazometano, o esterificar con  $\text{CH}_3\text{-OH}$  para obtener una sustancia de acuerdo con la fórmula (II).

En la realización preferente de la presente invención, la 2-amino-5-yodopiridina se hace reaccionar con cloruro de succinato de metilo.

La invención además se ilustra mediante los ejemplos y las figuras siguientes.

Figura 1: Varios derivados piridilamínicos inhiben las ASK *in vitro*. Las proteínas de fusión GST-ASK se incubaron con la MBP como sustrato y  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP como cosustrato en ausencia (-) o presencia de diferentes derivados (los números corresponden a la tabla 1). Los compuestos 1 a 9 (panel izquierdo) difieren en la cadena lateral alifática. Se comprobó la influencia de la posición del nitrógeno heterocíclico con los compuestos 3 y 11 (panel central; la estructura molecular mostrada representa el compuesto 11). El panel derecho muestra el efecto de la sustitución con halógeno en el anillo de piridina. Los compuestos se utilizaron a una concentración de 10  $\mu$ M. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y el fosfato radiactivo incorporado se detectó con una pantalla Phosphor Imager de almacenamiento.

Figura 2: El compuesto 15 es el más potente. Se incubó GST-BIN2 con la MBP y el  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP en ausencia o presencia de los compuestos 3, 14 y 15 a una concentración de 10  $\mu$ M. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y la fosforilación de la MBP se cuantificó con una pantalla Phosphor Imager. La actividad residual se expresa en % del control. Las medias y las desviaciones estándares se calcularon a partir de 4 ensayos independientes.

Figura 3: Efectos sobre el fenotipo de los mutantes de los brasinoesteroides. Las plántulas de 7 días de edad del mutante *cpd* en la síntesis de los brasinoesteroides y del mutante *bril-1* en la señalización se transfirieron a medio MS 1/2 que contenía epi-brasinólido a 1  $\mu$ M (Epi-BL) o los compuestos 10 y 15 a una concentración de 30  $\mu$ M y se incubaron durante 7 días en condiciones de días largos. Todas las imágenes se tomaron con los mismos aumentos. La barra representa 1 mm.

Figura 4: Los compuestos 10 y 15 son inhibidores potentes *in vivo*. Los protoplastos de *A. thaliana* se cotransformaron con las construcciones de expresión BZR1-CFP y ASK $\zeta$  etiquetada con Myc, y se trataron con concentraciones crecientes de los compuestos 10 y 15. Las BES1-CFP y ASK $\zeta$ -Myc se detectaron mediante análisis de inmunotransferencia con anticuerpos anti-GFP policlonales y anticuerpos anti-Myc monoclonales, respectivamente. Como un control de carga se muestra una tinción con Coomassie R250. Según la actividad cinasa de ASK $\zeta$ , BZR1-CFP se puede observar en forma fosforilada o desfosforilada (indicada con flechas). La proporción entre las dos bandas de ASK $\zeta$ -Myc, que es indicativa de la modificación postraduccional de esta proteína, no se veía afectada por la aplicación del inhibidor.

Figura 5: Los compuestos esterificados se hidrolizan rápidamente en la planta. Las plántulas de *A. thaliana* se infiltraron con medio MS 1/2 que contenía el compuesto 10 a 50  $\mu$ M. Se tomaron muestras de control antes de la infiltración (A) y se analizaron por HPLC. Se pudo observar un producto de biotransformación (marcado con P) del compuesto 10 al cabo de 15 min (B). Para la comparación (C) se muestra un cromatograma de una mezcla de los compuestos 10, 15 y 17 (marcados con C10, C15 y C17, respectivamente). Las cajas pequeñas insertadas en los cromatogramas muestran los espectros UV de los picos en el margen de 220 a 360 nm. mUA: miliunidades de absorción a 250 nm.

Figura 6: La metilación incrementa la permeabilidad del tejido. Se incubaron las plántulas de *A. thaliana* en soluciones a 50  $\mu$ M de los compuestos 10 y 15 en medio MS 1/2. Se tomaron las muestras después del tiempo indicado y se analizó por HPLC la concentración *in situ* del compuesto 15. La línea continua representa los resultados de las plantas incubadas con el compuesto 10 y la línea discontinua los resultados para el compuesto 15. Se calcularon la media y la desviación estándar a partir de 3 ensayos independientes.

## Ejemplos

La importancia de la longitud y la configuración estérica de la cadena lateral alifática así como la posición del nitrógeno heterocíclico se dilucidó mediante la síntesis de una serie de derivados con una estructura similar al ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico y haciendo variar la longitud de la cadena lateral alifática desde 2 átomos de carbono a 6. Además, se modificó su estructura estérica con la introducción de un doble enlace. Para obtener un inhibidor más activo se prepararon derivados con sustituciones de flúor, cloro, bromo y yodo en la posición 5 del anillo de piridina. Los compuestos sintetizados se ensayaron *in vitro* e *in vivo*. Además se determinó la permeabilidad celular de los compuestos elegidos.

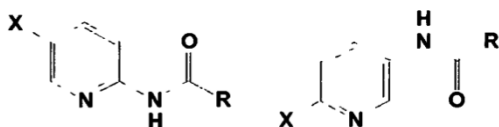
### Materiales y métodos

#### Sustancias químicas

Las sustancias químicas para la síntesis de los compuestos se compraron a Fluka (Buchs, Suiza) o a Aldrich (Steinheim, Alemania). Los solventes para HPLC y TLC eran de Roth (Karlsruhe, Alemania).

#### Síntesis

Los compuestos de reacción y el rendimiento de los productos están recogidos en la tabla 1.

**Tabla 1:** Compuestos sintetizados a los que se analizó la actividad biológica

Compuestos 1-10, 12,17

Compuesto 11

N.º	Compuestos de la reacción	Método	X	R	Rendimiento	t <sub>R</sub> <sup>a</sup>	λ <sub>1</sub> :λ <sub>2</sub> <sup>b</sup>	pK <sub>a</sub> <sup>c</sup>
1	2-Amino-5-cloropiridina, cloruro de oxalato de metilo	D	Cl		39%	5,6	254; 291	
2	2-Amino-5-cloropiridina, cloruro de malonato de metilo	D	Cl		30%	5,9	245; 287	
3	2-Amino-5-cloropiridina, anhídrido succínico	A	Cl		54%	8,6	245; 287	5,4
4	2-Amino-5-cloropiridina, anhídrido glutárico	A	Cl		71%	9,9	245; 288	
5	2-Amino-5-cloropiridina, cloruro de adipato de metilo	D	Cl		20%	11,5	245; 288	
6	2-Amino-5-cloropiridina, anhídrido maleico	A	Cl		22%	7,5	222; 298	
7	2-Amino-5-cloropiridina, anhídrido ftálico	A	Cl		63%	9,1	249; 289	
8	2-Amino-5-cloropiridina, cloruro de malonato de metilo	C	Cl		41%	14,6	245; 287	
9	2-Amino-5-cloropiridina, cloruro de succinato de metilo	C	Cl		33%	15,7	245; 288	
10 <sup>d</sup>	2-Amino-5-yodopiridina, cloruro de succinato de metilo	C	I		30%	17,8	252; 293	
11	5-Amino-2-cloropiridina, anhídrido succínico	A	Cl		69%	6,7	248; 284	
12	2-Aminopiridina, anhídrido succínico	A	H		74%	4,2	235; 276	4,9
13	2-Amino-5-fluoropiridina, anhídrido succínico	A	F		68%	5,7	235; 283	
14 <sup>d</sup>	2-Amino-5-bromopiridina, anhídrido succínico	A	Br		65%	9,6	247; 289	5,6
15 <sup>d</sup>	2-Amino-5-yodopiridina, anhídrido succínico	A	I		35%	10,7	252; 292	5,8
16	2-Amino-5-nitropiridina, anhídrido succínico	B	NO <sub>2</sub>		29%	9,1	221; 350	
17	2-Amino-5-yodopiridina, anhídrido succínico	D	I		28%	17,9	253; 293	

<sup>a</sup> Tiempo de retención en minutos.

<sup>b</sup> Máximos de absorción en nm (a pH 4,8)

<sup>c</sup> El pK (logaritmo decimal negativo de la constante de disociación) del grupo de ácido carboxílico se determinó en metanol al 50% (v/v).

- 5 <sup>d</sup> Los compuestos 10, 14 y 15 también se denominan 4-[(5-yodopirid-2-il)amino]-4-oxobutanoato de metilo, ácido 4-[(5-bromopirid-2-il)amino]-4-oxobutanoico y ácido 4-[(5-yodopirid-2-il)amino]-4-oxobutanoico, respectivamente.

10 Método A: una solución de anhídrido de ácido dicarboxílico a 25 mM disuelto en 15 ml de tetrahidrofurano (10 ml para el anhídrido ftálico) se colocó en un matraz de fondo redondeado con un condensador por reflujo, y se añadió la amina a 20 mM disuelta en 10 ml de tetrahidrofurano. La mezcla se mantuvo con reflujo durante 2 horas. El producto comenzó a cristalizar al final de la reacción. La cristalización se completó al enfriar a 4 °C durante varias horas. El producto bruto se filtró con succión y se retrocristalizó desde etanol al 95% excepto el derivado del ácido ftálico, que se retrocristalizó desde acetonitrilo al 80%.

15 Método B: una solución de 2-amino-5-nitropiridina a 20 mM disuelta en 30 ml de tetrahidrofurano se colocó en un matraz de fondo redondeado y se le añadió anhídrido succínico sólido a 25 mM. Se ajustó un condensador por reflujo al matraz y la mezcla se calentó hirviéndola suavemente durante 2 h. Posteriormente, la mezcla de reacción se enfrió a -20 °C durante varios días. El producto bruto se filtró con succión y se retrocristalizó desde agua caliente.

20 Método C: se disolvió la amina a 20 mM en una mezcla de 40 ml de tetrahidrofurano y 3,5 ml de trietilamina (25 mM), y se colocó en un matraz de fondo redondeado con tres cuellos equipado con un condensador por reflujo, un embudo de goteo y un termómetro. La mezcla de reacción se mezcló mediante agitación magnética. Una solución de ácido clorhídrico a 21 mM disuelta en 10 ml de tetrahidrofurano se añadió lentamente a través del embudo de goteo a una velocidad tal que la temperatura no se incrementase por encima de 40 °C. Después de añadir todo el cloruro, se agitó la reacción durante 15 min más a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió la mezcla a 200 ml de agua fría y el pH se ajustó a 6 con ácido clorhídrico diluido. Se extrajo el producto tres veces con 50 ml de dietiléter cada vez y se combinó lo extraído en el éter y se lavó con 50 ml de ácido acético al 1%. El agua residual se retiró con sulfato de sodio anhidro antes de la evaporación del éter con baja presión. El residuo amarillento se retrocristalizó desde una solución al 95% de etanol (derivados clorados) o de tolueno (derivado yodados) para dar un producto casi blanco.

30 Método D: Se disolvió ácido clorhídrico a 21 mM en 10 ml de tetrahidrofurano y se añadió a una mezcla de 2-amino-5-cloropiridina a 20 mM, 3,5 ml de trietilamina (25 mM) y 40 ml de tetrahidrofurano como se describe en el método C. La mezcla se agitó durante 15 min antes de filtrarla para retirar el hidrocloreto de trietilamina. El sólido se lavó con 10 ml de tetrahidrofurano y los filtrados combinados se evaporaron a baja presión. En el caso del derivado oxalílico, el residuo se disolvió en 90 ml de etanol caliente al 95% y la solución se filtró mientras todavía estaba caliente. La mezcla se agitó y se le añadió KOH a 40 mM disuelto en 10 ml de agua a una velocidad tal que la temperatura no se incrementase por encima de 40 °C. Se completó la reacción con 10 min más de agitación. El producto se separó como una sal de potasio blanca que se recogió mediante succión. El precipitado se disolvió en 100 ml de agua caliente (derivado yodado: 250 ml) y se filtró. Se añadió ácido clorhídrico al filtrado caliente hasta alcanzar pH 2. El producto se separó como ácido libre durante la incubación a 4 °C durante una noche. El producto se purificó adicionalmente mediante retrocristalización desde etanol al 95%.

40 En el caso de los derivados del malonilo y del adipoilo, el residuo se disolvió en 200 ml de MeOH y se filtró. La solución se colocó en un matraz de fondo redondeado con tres cuellos equipado con un condensador por reflujo, un embudo de goteo y un termómetro, y se calentó a 50 °C. Mientras se agitaba la mezcla, se añadió el KOH a 40 mM disuelto en 40 ml de agua rápidamente a través del embudo de goteo y la temperatura se mantuvo a 50 °C. Se completó la reacción mediante agitación a la misma temperatura durante 10 minutos más. El excedente de KOH se neutralizó con la adición de NH<sub>4</sub>Cl a 40 mM disuelto en 10 ml de agua. Se retiró la mayor parte del solvente a baja presión y el residuo se disolvió en agua (unos 200 ml) y se filtró. Se añadió ácido fórmico al filtrado transparente hasta alcanzar pH 3. El producto se separó como cristales blancos durante la incubación a 4 °C durante una noche. Los derivados de malonilo y de adipoilo se purificaron mediante retrocristalización desde etanol al 95% o al 50%, respectivamente.

Análisis de la pureza de los compuestos sintetizados

50 Cromatografía en capa fina (TLC, por su nombre en inglés): los compuestos se disolvieron en etanol y se depositaron como un punto sobre láminas recubiertas con gel de sílice 60 F254 (Merck, Darmstadt, Alemania). Las placas se cromatografiaron en una mezcla de acetato de etilo/petroleína/ácido acético/agua = 100/60/1/1. Se observó una extinción de la fluorescencia mediante la exposición de la placa a la luz UV de onda corta (254 nm). Algunos compuestos mostraban autofluorescencia, lo que se observó con la luz UV de onda media (302 nm).

55 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por su nombre en inglés): el sistema de HPLC comprendía una

bomba Dionex P680, un inyector automático ASI-100 y un detector de matrices de fotodiodos PDA-100. El sistema estaba equipado con una columna Nucleosil 100-5 C18 de 250 mm x 4 mm de Macherey-Nagel precedida de un filtro Valco en línea de 2  $\mu\text{m}$ . Se mantuvo una velocidad de flujo constante de 1 ml/min con un gradiente de solvente A (ácido acético a 20 mM ajustado a pH 4,8 con NaOH en acetonitrilo a 15%) y solvente B (ácido acético a 20 mM ajustado a pH 4,8 con NaOH en acetonitrilo al 60%). La elución comenzó con un flujo isocrático de solvente A durante 1 min. A continuación, la concentración del solvente B se incrementó de forma lineal hasta el 100% en 19 min y se mantuvo isocrático durante otros 2 min antes de reducirlo al 0% en 1 min. La columna se equilibró durante 5 min con el solvente A antes de la inyección de otra muestra. Los espectros UV se registraron desde 220 a 400 nm con intervalos de 1 nm. Para la cuantificación se utilizó la absorbancia a 250 nm con un ancho de banda de 10 nm.

#### 10 Determinación de los valores de $\text{pK}_a$

Se pesaron de 50 a 100 mg del compuesto y se disolvieron en 50 ml de metanol al 50% (v/v). Se tomó nota de una curva de titulación con NaOH a 50 mM como solución estándar con un pH-metro GPHR 1400A de Greisinger Electronics. Se determinó el punto de equivalencia mediante el método del cociente de la diferencia ( $\Delta\text{pH}/\Delta V_{\text{NaOH}}$ ) y se leyó el  $\text{pK}_a$  a partir de la curva de titulación a una neutralización del 50%.

#### 15 Ensayos de la actividad cinasa *in vitro* e *in vivo*

Las ASK se expresaron como proteínas de fusión con GST en *E. coli* BL21. Se realizaron ensayos de la actividad cinasa *in vitro* mediante la incubación de 50 ng de la proteína de fusión con GST, 10  $\mu\text{g}$  de la proteína básica mielina (MBP, por su nombre en inglés; Sigma, San Luís, MO) como sustrato y 0,15 MBq de  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP como cosustrato a 25 °C durante 30 min. El tampón de reacción consistía en HEPES a 20 mM, pH 7,4,  $\text{MgCl}_2$  a 15 mM, EGTA a 5 mM y DTT a 1 mM. Para los experimentos iniciales se incluyó ATP frío a concentraciones de hasta 3  $\mu\text{M}$ . Los productos de reacción se separaron por SDS-PAGE y la cantidad de radiactividad incorporada en la MBP se cuantificó con una pantalla Phosphor Imager de almacenamiento de Amersham y un Molecular Imager FX de BioRad. Se detectó la actividad cinasa *in vivo* mediante ensayos de cambio de movilidad por fosforilación utilizando BZR1-CFP de sustrato.

#### Pruebas fisiológicas

- 25 Se hicieron crecer plántulas Col0 o bri1-1 de *Arabidopsis thaliana in vitro* en placas de MS 1/2 que contenían sacarosa al 1% en una cámara de crecimiento en condiciones de días largos (16 h de luz con 50  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 8 h de oscuridad) durante 7 días. Posteriormente se transfirieron a placas complementadas con inhibidores a diferentes concentraciones y se observaron los efectos sobre el fenotipo 7 días después.

#### Análisis por HPLC de los extractos vegetales

- 30 Las plántulas Col0 de *A. thaliana* de 2 semanas de edad se infiltraron al vacío con MS 1/2 o con MS 1/2 que contenía el compuesto 10 a 100  $\mu\text{M}$  tal y como se ha descrito previamente (Rozhon et al. 2005). Se tomaron las muestras al cabo de 15 min y de 48 h, se enjuagaron con agua y se molieron en nitrógeno líquido hasta reducir las a un polvo fino. Se pesaron 100 mg de polvo en un tubo de reacción y se añadió 1 ml de tampón de extracción (TRIS/HCl a 20 mM, pH 6,8 disuelto en acetonitrilo al 20%). Después de la incubación durante 30 min en un agitador ajustado a 800 rpm, se centrifugó la mezcla y el sobrenadante se filtró por un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Se analizaron los extractos por HPLC con los mismos ajustes que se mencionaron más arriba.

#### Ensayo de permeabilidad celular

- 40 Las plántulas Col0 de *A. thaliana* de 2 semanas de edad se transfirieron al medio MS 1/2 que contenía el inhibidor a 50  $\mu\text{M}$ . Se retiraron las muestras en los momentos indicados, se enjuagaron con agua, se secaron con papel de filtro y se congelaron en nitrógeno líquido. Para el análisis, el material vegetal se molió hasta obtener un polvo fino en un mortero enfriado previamente con nitrógeno líquido. Se pesaron aproximadamente 100 mg del polvo en tubos de reacción de 1,5 ml y se añadió 1 ml de TRIS/HCl a 20 mM, pH 9,0. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de una solución madre del compuesto 4 a 200  $\mu\text{M}$  a modo de estándar interno. Se realizó la extracción a 80 °C durante 30 min en un Thermomixer de Eppendorf ajustado a 800 rpm. Se centrifugó el extracto durante 5 min a 15 000 g y se recogió el sobrenadante transparente. Se acidificó la solución transparente con la adición de 25  $\mu\text{l}$  de ácido fosfórico a 4 M y se centrifugó durante 2 min a 15 000 g. El sobrenadante se cargó inmediatamente en un cartucho de extracción en fase sólida PH de 100 mg (Varian, Lake Forest, CA) acondicionado con 1 ml de acetonitrilo y dos veces 1 ml de ácido fosfórico a 100 mM. Se lavaron las columnas con 1 ml de ácido fosfórico a 100 mM y se secaron aplicando vacío durante 1 min. Posteriormente se realizó la elución con 1 ml de TRIS/HCl a 100 mM, pH 9,0 que contenía acetonitrilo al 5%. Se acidificó el eluido con la adición de 15  $\mu\text{l}$  de ácido fosfórico a 4 M y se utilizó para la HPLC como está descrito más arriba.

#### Resultados

#### Síntesis

El ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico y otros derivados se prepararon mediante la formación de



amidas a partir de aminopiridinas sustituidas y anhídridos de ácidos carboxílicos cíclicos o cloruros de ésteres monometílicos de ácidos dicarboxílicos (tabla 1). En el último caso, el grupo metilo se retiró posteriormente por hidrólisis alcalina, si era necesario. Se verificó la pureza mediante TLC y HPLC. Sólo se pudo observar una mancha en las placas de TLC reveladas y el pico del compuesto deseado representaba al menos el 95% del área total de los picos del cromatograma de la HPLC.

#### Inhibición de las ASK *in vitro*

El ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico es un potente inhibidor de las ASK del grupo I y del grupo II. ASK $\theta$ , una ASK del grupo III, se inhibe moderadamente. La segunda cinasa de esta clase, ASK $\beta$ , y la cinasa del grupo IV ASK $\delta$  no se ven inhibidas. Los representantes de todos los grupos se expresaron como proteínas de fusión recombinantes con GST en *E. coli*. La potencia de los compuestos sintetizados sobre las ASK elegidas se analizó mediante ensayos de la actividad cinasa *in vitro* con la MBP (proteína básica de la mielina) como sustrato y el  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP como cosustrato (figura 1).

Los compuestos 1 a 5 se sintetizaron para investigar el efecto de la variación de la longitud de la cadena lateral alifática. El compuesto más activo, el n.º 3, tenía una cadena que consistía en 4 carbonos (figura 1). Los derivados del glutarilo (n.º 4; 5 carbonos) y del adipóilo (n.º 5; 4 carbonos) tenían una potencia significativamente más baja, mientras que los derivados más cortos (n.º 1 y 2; 2 o 3 carbonos, respectivamente) casi no tuvieron ningún efecto. La introducción de un doble enlace en una cadena lateral de longitud óptima abolió la potencia completamente (figura 1, compuesto 6). Esto indica que la configuración espacial es muy importante. Para comprobar si el grupo carboxilo de la cadena alifática es crucial para la actividad o si basta un grupo oxo, se incluyeron los compuestos 9 y 10, que son variantes metiladas de los compuestos 3 y 15, respectivamente. Además, se ensayó el compuesto 8, que es un isómero estructural del compuesto 3. Tal y como se muestra en la figura 1, las variantes metiladas mostraron una reducción considerable del efecto inhibidor, lo que confirmó que resulta esencial que haya un grupo carboxilo terminal.

Al haber identificado la cadena lateral óptima, se investigó el anillo heterocíclico con más detalle. Los compuestos 3 y 11 tienen una cadena lateral de amidosuccinilo, pero difieren en la posición del nitrógeno heterocíclico. Los ensayos de la actividad cinasa *in vitro* revelaron que el compuesto 3 es más potente (figura 1), lo que demuestra que el nitrógeno heterocíclico debe estar próximo a la posición que lleva el sustituyente de ácido amidosuccínico. Los datos previos indicaban que un sustituyente con bromo en la posición 5 del anillo de piridina es crítico para la actividad biológica del ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico. Para comprobar el efecto de otros sustituyentes, se sintetizaron los compuestos 12 a 16. Como se indica en la figura 1, los derivados con cloro, bromo y, en particular con yodo, son muy activos. Este orden de potencia se pudo confirmar mediante la cuantificación de la actividad cinasa residual de BIN2 (figura 2). En cambio, el compuesto fluorado mostró una potencia muy baja y los derivados con nitro y sin sustituir fueron inactivos.

Todos los compuestos analizados tuvieron una especificidad similar por las ASK. Los derivados activos inhibían fuertemente a ASK $\alpha$ , BIN2 y ASK $\zeta$ , mientras que sólo inhibían moderadamente a ASK $\theta$ . El efecto de las sustancias analizadas sobre ASK $\beta$  y ASK $\delta$  fue insignificante.

#### Inhibición de las ASK *in vivo*

La disminución de la actividad de ASK es crucial en la señalización de los brasinoesteroides. Las ASK son constitutivamente activas en los mutantes *cpd* y *bri1-1*, que son defectuosos en la biosíntesis o señalización de los brasinoesteroides, respectivamente. Esto conduce a plantas gravemente enanas con unas hojas verde oscuro rizadas hacia abajo y con acortamiento de los hipocótilos. La aplicación del epi-brasinólido, un brasinoesteroide sintético, rescata a *cpd*, pero no a *bri1-1*, mientras que el ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico rescata a ambos mutantes. Para escrutar la potencia *in vivo*, los mutantes *cpd* y *bri1-1* se transfirieron al medio que contenía derivados del ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico a una concentración de 30  $\mu\text{M}$ . Las plántulas tratadas con los compuestos activos mostraban la expansión de las hojas, incremento de la longitud de los hipocótilos y eran de color verde claro. La potencia para rescatar el fenotipo se correlacionó con los resultados del ensayo *in vitro*. Sin embargo, resulta interesante señalar que el compuesto 10 era muy activo *in vivo*, pero mostraba poca potencia *in vitro* (figura 3).

Debido a este resultado inesperado, el efecto de la inhibición de la actividad de ASK *in vivo* se analizó mediante un método directo. Se ha mostrado que varias ASK fosforilan los factores de transcripción BZR1, BES1 y BEH2 *in vivo*. Esto conduce a un cambio de la movilidad electroforética de estos factores de transcripción, lo que permite la detección de la actividad cinasa *in vivo*. Los protoplastos de *A. thaliana* se cotransformaron con las construcciones de BZR1 etiquetado con CFP y de ASK $\zeta$  etiquetado con Myc. Se eligieron estas dos proteínas porque se expresaban bien en el sistema de protoplastos. Los protoplastos transformados se incubaron con concentraciones diferentes de los compuestos 10 y 15 y BZR1-CFP y ASK $\zeta$ -Myc, y posteriormente se analizaron mediante inmunotransferencia. De acuerdo con las pruebas fenotípicas, el compuesto 10 esterificado era muy activo, al igual que el ácido libre de su contrapartida 15 (figura 4). Se obtuvieron también resultados similares para la pareja 3 y 9.

Para investigar estos resultados conflictivos, se comprobó el destino del compuesto 10 *in vivo*. Las plántulas se infiltraron con el compuesto 10 y los extractos vegetales se analizaron posteriormente por HPLC. Sólo se pudo observar una cantidad insignificante del compuesto 10, pero apareció un nuevo pico, denominado P (figuras 5A y 5B). Este pico se pudo identificar por su tiempo de retención, que era de 10,7 min, y por su espectro UV, con máximos de absorción a 252 y 292 nm, como el compuesto 15 (figuras 5B y 5C). Por lo tanto, el compuesto 10 no es estable *in vivo*, sino que se convierte rápidamente en el compuesto 15 muy activo, lo que explica que la potencia del compuesto 10 *in vitro* e *in vivo* sea distinta. Se obtuvieron unos resultados similares con la pareja 3 y 9.

#### Permeabilidad del tejido

La permeabilidad celular de una sustancia es una característica importante que influye en su potencia *in vivo*. La captación de los compuestos 10 y 15 por las plantas se determinó mediante el tratamiento de las plántulas con soluciones de estos compuestos y la posterior cuantificación de la concentración del inhibidor interiorizado (figura 6). Dado que el compuesto 10 se convierte rápidamente en 15, sólo se midió la concentración *in situ* de 15. La concentración *in situ* de ambos compuestos se incrementó en las primeras 3 h y luego alcanzó un valor meseta. Es importante observar que la concentración dentro de la planta superaba la del medio. Mientras que en el medio se encontraba presente a 50 µM, se llegaron a medir concentraciones *in situ* de unos 90 µM en el caso del compuesto 15 y de hasta 190 µM en el caso de aplicación del compuesto 10. Por lo tanto, el compuesto metilado mostró una mayor permeabilidad de tejido y alcanzó una concentración más alta en las plantas.

En los últimos años se ha progresado tremendamente en el conocimiento de la señalización de los brasinoesteroides en *Arabidopsis thaliana* mediante el análisis de los mutantes. En la actualidad se conocen tres receptores y un correceptor de brasinoesteroides. Al menos cuatro ASK parecen intervenir en la fosforilación de seis factores de transcripción de tipo BES1/BZR-1 y cuatro fosfatases son competentes para devolverlos a su forma desfosforilada. Todas estas proteínas son posibles dianas para los inhibidores. Una ventaja notable para los inhibidores en comparación con los mutantes es su capacidad de aplicación inmediata a diferentes acervos genéticos y especies. Además, los mutantes simples a menudo no muestran fenotipos, o los muestran débilmente, debido a la redundancia funcional. Dado que las proteínas homólogas están a menudo dirigidas por los mismos compuestos, la redundancia funcional puede vencerse mediante los estudios de los inhibidores.

Se encuentran disponibles una serie de inhibidores para GSK-3α y GSK-3β, los homólogos humanos de las ASK. No obstante, los intentos de utilizar estos compuestos para las cinasas de tipo GSK-3/Shaggy de las plantas no concluyeron con éxito. En un escrutinio genético químico reciente, el ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico se identificó que era la primera sustancia que interfiere específicamente con la señalización de los brasinoesteroides. Las estrategias genéticas y bioquímicas revelaron que el ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico actúa en la señalización de los brasinoesteroides mediante la inhibición de las ASK. Las cinasas de tipo GSK3/Shaggy son reguladores clave de la señalización hormonal y modulan la tolerancia al estrés, de manera que es muy deseable un mejor conocimiento de la acción del ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico.

Para abordar esta cuestión e identificar los inhibidores con una mejor potencia, se sintetizaron una serie de compuestos con estructuras similares al ácido 4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico y se investigó su potencia inhibidora en las cinasas de tipo GSK-3/Shaggy *in vitro* e *in vivo*. Además, se estudió la reacción fenotípica de las plantas a estos compuestos. Primero se analizó el efecto de la longitud de la cadena lateral alifática que contenía el grupo carboxílico. Ya que los resultados preliminares han mostrado que el derivado con cloro podría ser en cierto modo más potente que el derivado con bromo, se utilizó la 2-amino-5-cloropiridina para sintetizar una serie de compuestos que diferían solo en la longitud de la cadena lateral alifática. Los ensayos de la actividad cinasa *in vitro* revelaron que la potencia inhibidora de estos compuestos era más elevada con una cadena lateral de 4 átomos de carbono. Además, la configuración espacial era crucial. La introducción de un doble enlace *cis* en una cadena lateral que consiste en 4 átomos de carbono, que es el número óptimo, dio lugar a un compuesto inactivo (n.º 6). Un doble enlace en *cis* provoca un acodamiento de la cadena alifática, lo que conduce a que el grupo carboxilo del extremo esté en otra posición. Esto y los resultados de los compuestos con cadenas laterales de diferente longitud indican que el grupo carboxilo debe tener una configuración geométrica exacta respecto al anillo heterocíclico para que interactúe con las ASK.

La prueba de la importancia del grupo carboxilo terminal vino originalmente de un derivado con una cadena lateral sin sustituir. Sin embargo, esto no descarta que podría ser suficiente un grupo carboxilo esterificado, pues podría todavía participar en las interacciones del hidrógeno. Por consiguiente, se incluyeron los compuestos 8, 9 y 10, que son variantes metiladas de los compuestos 2, 3 y 15, respectivamente. Las tres sustancias mostraron poca o ninguna actividad *in vitro* con las ASK ensayadas, lo que confirma que en el extremo de la cadena alifática debe estar presente un grupo carboxilo. Los compuestos 9 y 10 eran activos *in vivo* porque se escindía rápidamente el grupo metilo, probablemente mediante esterasas, gracias a lo que se reconstituía el grupo carboxilo. Como el grupo carboxilo de la cadena alifática está cargado al pH intracelular, podría intervenir en las interacciones iónicas con las ASK, p, ej., con un resto de lisina o de arginina. Alternativamente, podría intervenir en un puente de hidrógeno. De igual forma, el nitrógeno del anillo de piridina podría también intervenir en un puente de hidrógeno o en una interacción iónica con la proteína. Se ha demostrado que el reemplazo del anillo de piridina por un anillo de benceno

reduce considerablemente la potencia inhibidora. Para investigar la importancia del anillo heterocíclico con más detalle, se sintetizó el compuesto 11, que difiere del muy activo compuesto 3 sólo en la posición del nitrógeno heterocíclico. Los ensayos *in vitro* revelaron que el 11 es inactivo, lo que indicaba que el nitrógeno heterocíclico debía estar localizado cerca de la cadena lateral de amidosuccinilo para obtener un inhibidor potente. Es interesante señalar que los resultados de la presente invención indicasen que la actividad de los compuestos se incrementaba con el número atómico del halógeno sustituyente en la posición 5 del anillo de piridina, aunque los datos preliminares habían sugerido el efecto opuesto. El derivado con yodo (n.º 15) tenía la actividad más alta, mientras que el derivado con flúor (n.º 13) era menos potente. Debido a su hidrofobia, esta parte estructural del inhibidor podría estar implicada en las interacciones de van der Waals con la cinasa. Para las atracciones de van der Waals, la distancia entre los átomos que interaccionan es crucial. Disminuyen rápidamente a medida que crece la distancia y son eficaces solo cuando los átomos están bastante cercanos unos a otros. El radio de van der Waals, que describe la distancia óptima de una interacción, va subiendo con el periodo dentro de un grupo de la tabla periódica de elementos. Por ejemplo, el radio de van der Waals es de 0,22 nm para el yodo y de 0,14 para los átomos de flúor. Además de esto, el enlace covalente entre el carbono del anillo de piridina y el yodo es también más largo que con los otros halógenos. La estructura del derivado con yodo podría, por lo tanto, tener propiedades ideales para fijarse al bolsillo hidrófobo de las ASK. Además, la hidrofobia de los compuestos se incrementa con el número atómico del halógeno sustituyente como indica el incremento del tiempo de retención en la RP-HPLC (tabla 1), lo que podría además facilitar las interacciones hidrófobas.

Los ensayos de permeabilidad del tejido revelaron que la captación de los compuestos, en particular los esterificados, era rápida. Es interesante señalar que la concentración *in situ* superaba en varias veces la del medio circundante. Esto puede explicarse por los valores  $pK_a$  de los compuestos (tabla 1). Por ejemplo, el derivado 15 tiene un valor de  $pK_a$  de 5,8, lo que significa que, a pH 5,8, el pH del medio utilizado, el 50% del compuesto está disociado y, por lo tanto, está cargado negativamente, mientras que el 50% está sin disociar. Al pH intracelular de 7,4, menos del 3% del compuesto está sin disociar. Dado que sólo la forma lipófila sin disociar es capaz de atravesar las biomembranas con eficacia, los compuestos quedan atrapados en la célula y se acumulan a una concentración que supera la del medio circundante. Esta captación dependiente del pH se parece a la de la hormona vegetal auxina, donde la difusión debida al pH contribuye a transportarla al interior de la célula. Los compuestos esterificados, p. ej. n.º 10, son, independientemente del pH, muy lipófilos y pueden atravesar las membranas. En la célula se hidrolizan con rapidez en los correspondientes ácidos que se desprotonan en el anión hidrófilo. Es interesante observar que la velocidad de captación del compuesto 10 era aproximadamente el doble que la del compuesto 15, lo que se correlaciona con las porciones capaces de difundir a través de la membrana. Mientras que el 100% del compuesto 10 es lipófilo, sólo el 50% del compuesto 15 está sin disociar y, por lo tanto, es suficientemente lipófilo. Esto podría explicar las diferentes velocidades de captación. El conjunto, el compuesto 15, también denominado ácido yodo-4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico, era el compuesto más potente *in vitro* y mostró una actividad inhibidora alta *in vivo*. Su variante metilada, el ácido metilyodo-4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico (compuesto 10), mostró una captación muy rápida y, por lo tanto, es el inhibidor de ASK de elección para los estudios *in vivo*. Se sabe que varias cinasas de tipo GSK3/Shaggy se activan rápidamente en respuesta al estrés. Debido a su excelente y rápida permeabilidad celular, el ácido metilyodo-4-[(5-bromo-2-piridinil)amino]-4-oxobutanoico y los compuestos relacionados serán valiosos para investigar la función de esta familia de cinasas en las primeras etapas de la señalización del estrés.

#### Bibliografía:

Kim et al. *Bioorg Med Chem* 6 (1998), 1975-1982.

Min et al. *Bioorg Med Chem Lett* 9 (1999), 425-430.

Rozhon et al. *Anal Bioanal Chem* 382 (2005), 1620-1627.

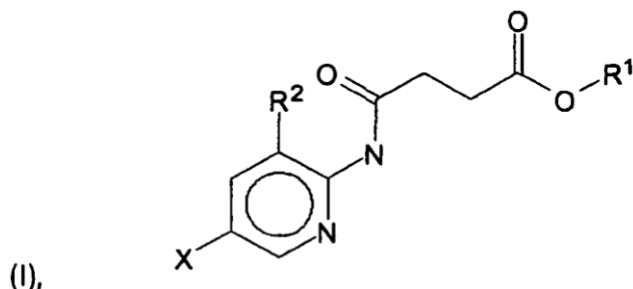
Sekimata et al. *J Agric Food Chem* 50 (2002), 3486-3490.

Sekimata et al. *Planta* 213 (2001), 716-721.

Vert et al. *Nature* 441 (2006), 96-100.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un compuesto que tiene la fórmula (I)



en donde X es F, Cl, Br o I;

- 5 R¹ es CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³, C₂H₃R³R⁴, C₃H₇, C₃H₆R³ o C₃H₅R³R⁴;

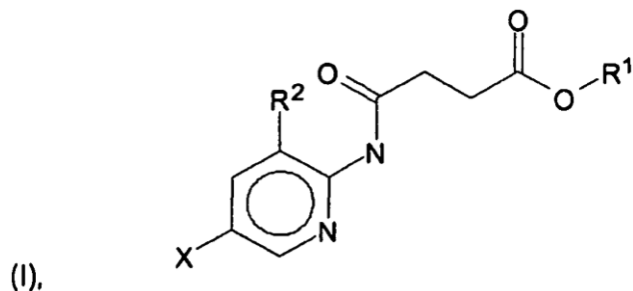
R² es H, CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³ o C₂H₃R³R⁴; y

R³ y R⁴ son, independientemente el uno del otro, X, OH o NH₂,

para el tratamiento de plantas, en particular para la mejora del crecimiento de las plantas, la mejora del rendimiento del cultivo y/o proporcionar resistencia al estrés.

- 10 2. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que R¹ es CH₃, R² es H y X es I.

3. Composición, que comprende un compuesto que tiene la fórmula (I),



en donde X es F, Cl, Br, o I;

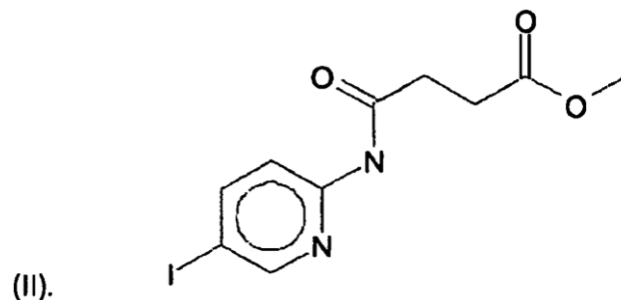
R¹ es CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³, C₂H₃R³R⁴, C₃H₇, C₃H₆R³ o C₃H₅R³R⁴;

- 15 R² es H, CH₃, C₂H₅, C₂H₄R³ o C₂H₃R³R⁴; y

R³ y R⁴ son, independientemente el uno del otro, X, OH o NH₂.

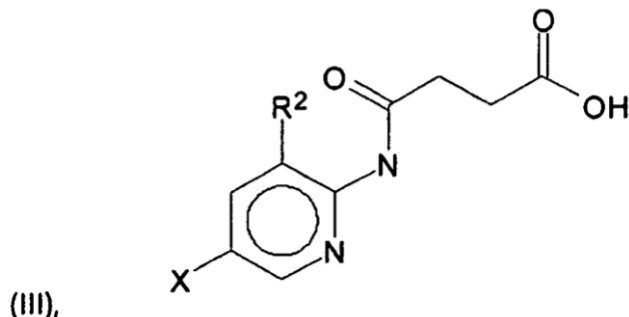
4. Composición de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada por que R¹ es CH₃, R² es H y X es I.

5. Compuesto que tiene la fórmula (II)



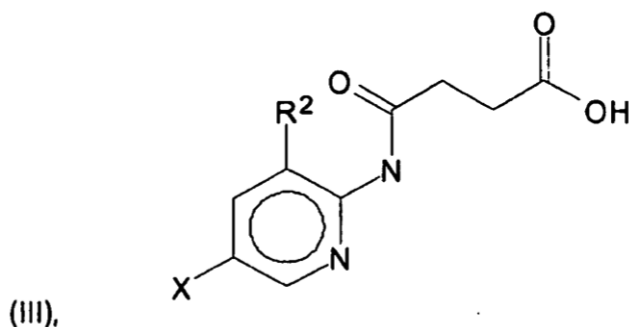
6. Procedimiento para la preparación de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que la 2-amino-5-yodopiridina se hace reaccionar con cloruro de succinato de metilo.

7. Procedimiento para la preparación de un compuesto que tiene la fórmula (III)



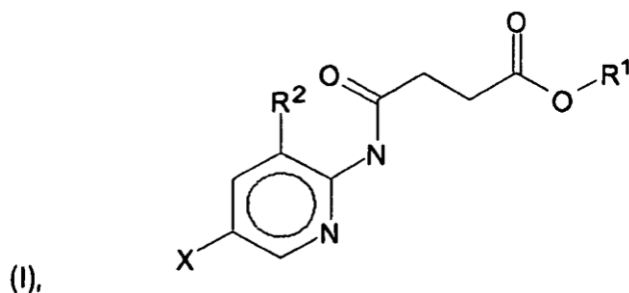
5 en donde X es I, y  $R^2$  es H, caracterizado por que la 2-amino-5-yodopiridina se hace reaccionar con anhídrido succínico.

8. Procedimiento para la preparación de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que un compuesto que tiene la fórmula (III)



10 en donde X es I, y  $R^2$  es H, está alquilado con un halogenuro de metilo, un sulfato de dimetilo o diazometano o está esterificado con  $CH_3OH$ .

9. Utilización de un compuesto que tiene la fórmula (I)



en donde X es F, Cl, Br, o I;

15  $R^1$  es  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ ,  $C_2H_4R^3$ ,  $C_2H_3R^3R^4$ ,  $C_3H_7$ ,  $C_3H_6R^3$  o  $C_3H_5R^3R^4$ ;

$R^2$  es H,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ ,  $C_2H_4R^3$  o  $C_2H_3R^3R^4$ ; y

$R^3$  y  $R^4$  son, independientemente el uno del otro, X, OH o  $NH_2$ ,

como un herbicida.

10. Utilización de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada por que  $R^1$  es  $CH_3$ ,  $R^2$  es H y X es I.

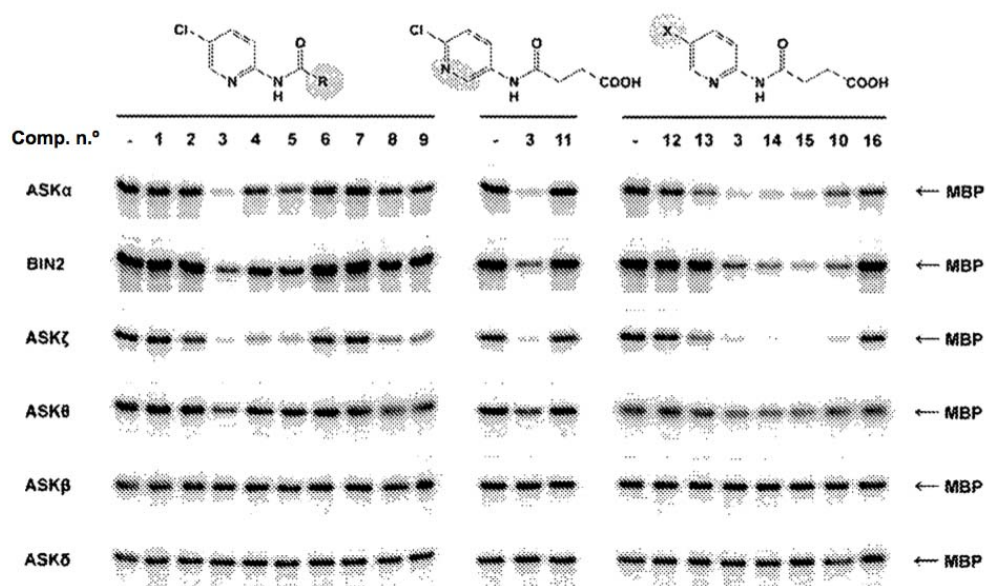


Fig.1

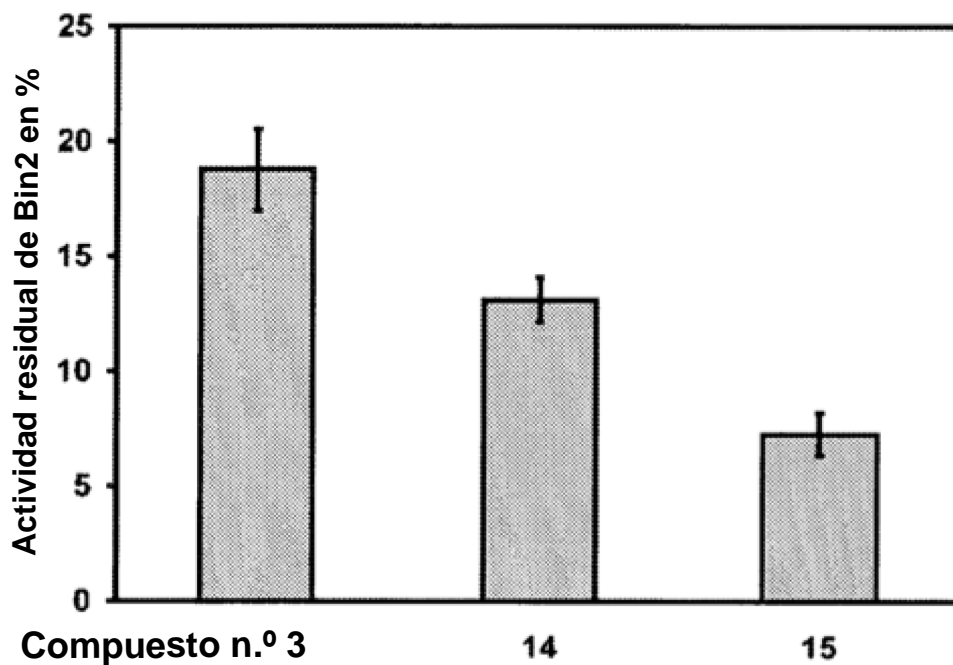


Fig.2

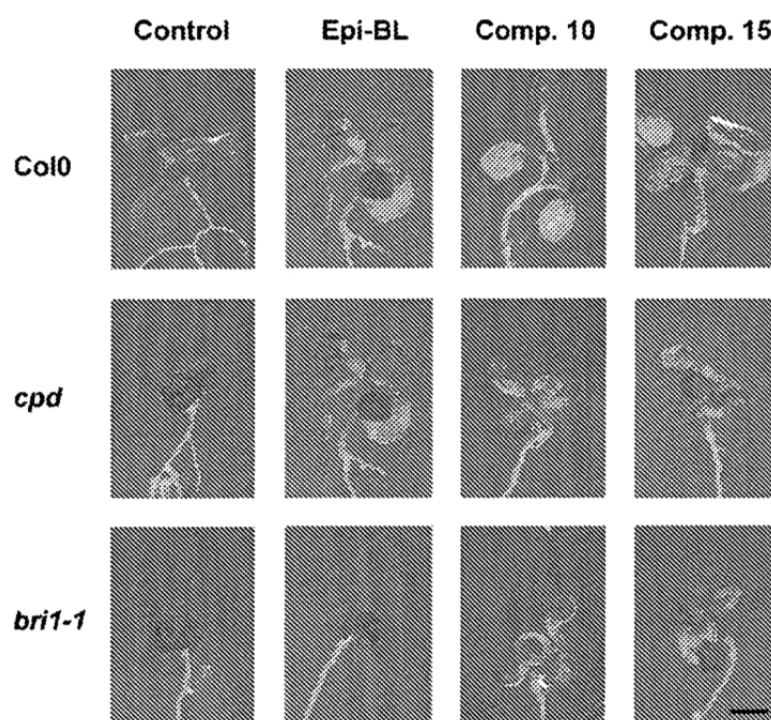


Fig.3

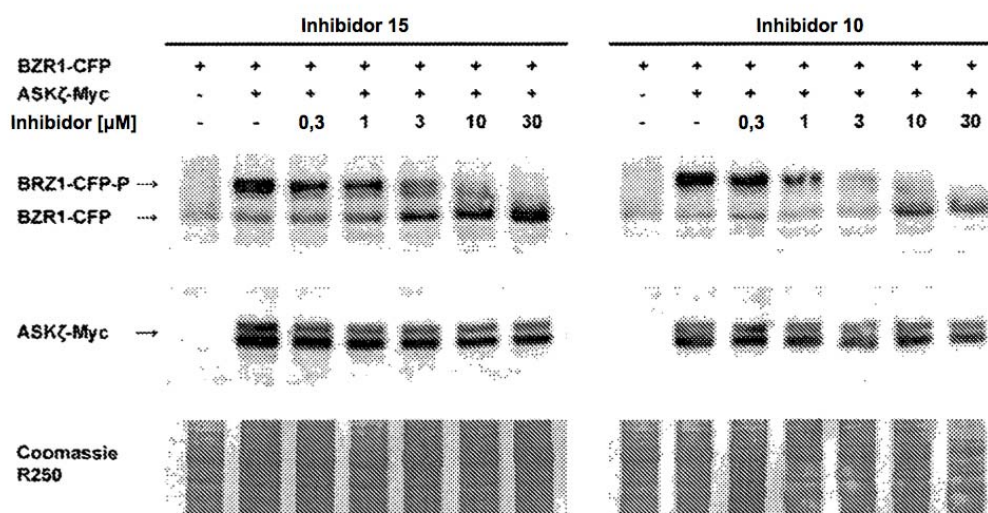


Fig.4

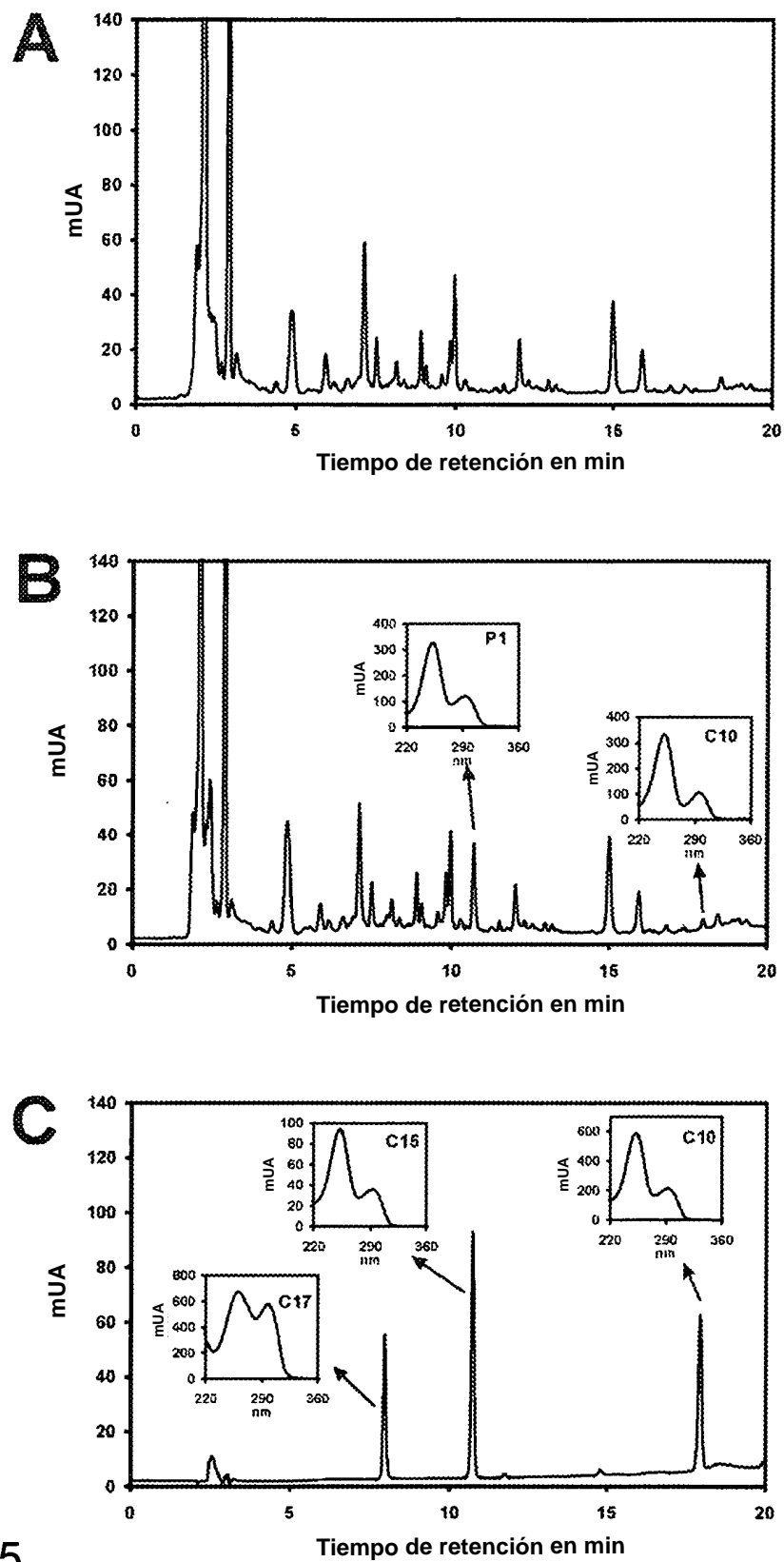


Fig.5



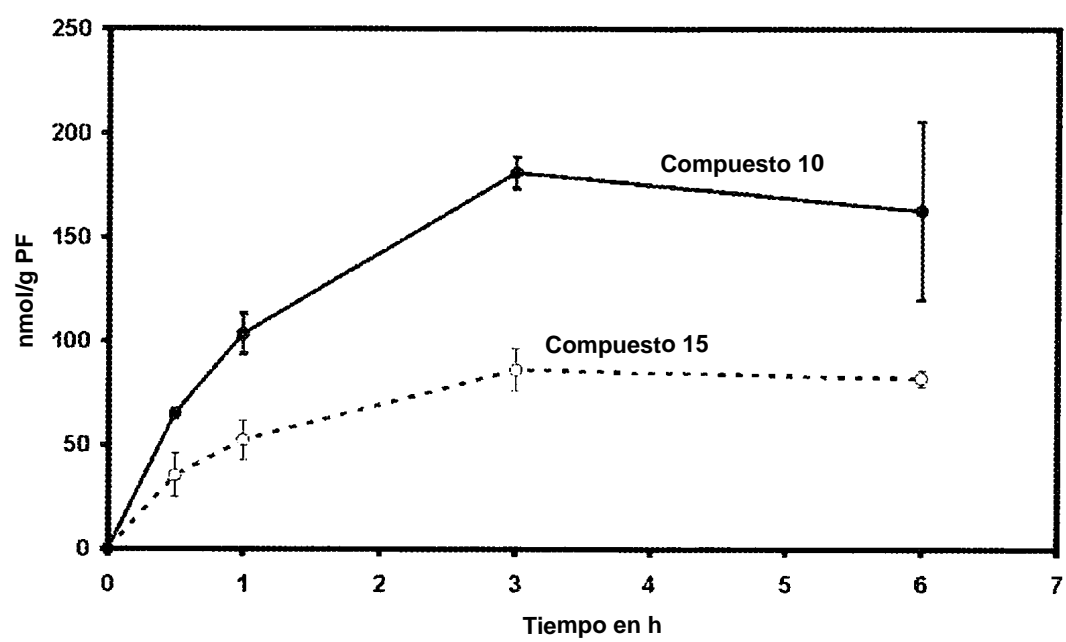


Fig.6