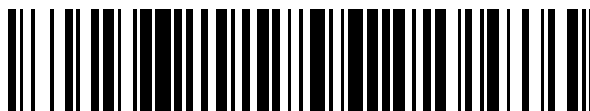


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 845**

51 Int. Cl.:

C07D 473/16 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2008 E 08718980 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2139893**

54 Título: **Derivados de purina 2,6,9-sustituidos que tienen propiedades antiproliferativas**

30 Prioridad:

04.04.2007 GB 0706632

04.04.2007 US 921897 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.11.2013

73 Titular/es:

CYCLACEL LIMITED (50.0%)

**411 Tower Bridge Business Centre, 46-48 East
Smithfield**

London E1W 1AW, GB y

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED
(50.0%)**

72 Inventor/es:

SHELDRAKE, PETER WILLIAM;

ATRASH, BUTRUS;

GREEN, SIMON;

MCDONALD, EDWARD y

FRAME, SHEELAGH

74 Agente/Representante:

ES 2 427 845 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

Derivados de purina 2,6,9-sustituidos que tienen propiedades antiproliferativas

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos derivados de purina 2,6,9-sustituidos y a sus aplicaciones biológicas. En particular, la invención se refiere a derivados de purina que tienen propiedades antiproliferativas que son útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos tales como cáncer, leucemia, psoriasis y similares.

10

Antecedentes

El inicio, la progresión y la finalización del ciclo celular de los mamíferos están regulados por diversos complejos de cinasas dependientes de ciclina (CDK), que son críticos para el crecimiento celular. Estos complejos comprenden al menos una subunidad catalítica (la propia CDK) y una reguladora (ciclina). Algunos de los complejos más importantes para la regulación del ciclo celular incluyen ciclina A (CDK1 – también conocida como cdc2, y CDK2), ciclina B1-B3 (CDK1), ciclina D1-D3 (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6), ciclina E (CDK2). Cada uno de estos complejos está implicado en una fase particular del ciclo celular. Sin embargo, no todos los miembros de la familia de CDK están implicados exclusivamente en el control del ciclo celular. Por ejemplo, CDK 7, 8 y 9 están implicadas en la regulación de la transcripción, mientras que la CDK5 desempeña un papel en la función de células neuronales y secretoras.

15

20

La actividad de las CDK está regulada de manera postraduccional mediante asociaciones transitorias con otras proteínas y mediante alteraciones de su localización intracelular. El desarrollo tumoral está estrechamente asociado con la alteración y desregulación genética de CDK y sus reguladores, lo que sugiere que los inhibidores de CDK pueden ser agentes terapéuticos anticancerígenos útiles. De hecho, los resultados iniciales sugieren que las células transformadas y normales difieren en sus requerimientos de, por ejemplo, ciclina A/CDK2 y que puede ser posible desarrollar agentes antineoplásicos novedosos que carezcan de la toxicidad para el huésped general observada con fármacos citotóxicos y citostáticos convencionales. Aunque la inhibición de las CDK relacionadas con el ciclo celular es claramente relevante, por ejemplo, en aplicaciones oncológicas, esto puede no ser el caso para la inhibición de CDK que regulan la ARN polimerasa. Por otro lado, la inhibición de la función de CDK9/ciclina T se ha vinculado recientemente con la prevención de la replicación del VIH y, por tanto, el descubrimiento de una nueva biología de CDK continúa abriendo nuevas indicaciones terapéuticas para los inhibidores de CDK (Sausville, E.A. Trends Molec. Med. 2002, 8, S32-S37).

25

30

La función de las CDK es fosforilar y, por tanto, activar o desactivar determinadas proteínas, incluyendo por ejemplo proteínas del retinoblastoma, láminas, histona H1 y componentes del huso mitótico. La etapa catalítica mediada por CDK implica una reacción de fosfotransferencia de ATP al sustrato enzimático macromolecular. Se ha hallado que varios grupos de compuestos (revisados, por ejemplo, en Fischer, P.M. Curr. Opin. Drug Discovery Dev. 2001, 4, 623-634) presentan propiedades antiproliferativas en virtud del antagonismo de ATP específico de CDK.

35

El documento WO 98/05335 (CV Therapeutics Inc) da a conocer derivados de purina 2,6,9-trisustituidos que son inhibidores selectivos de cinasas del ciclo celular. Tales compuestos son útiles en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios, por ejemplo artritis reumatoide, lupus, diabetes tipo I, esclerosis múltiple; el tratamiento de cáncer, enfermedad cardiovascular, tal como reestenosis, enfermedad de injerto contra huésped, gota, enfermedad renal poliquística y otras enfermedades proliferativas cuya patogenia implica una proliferación celular anómala.

40

El documento WO 99/07705 (The Regents of the University of California) da a conocer análogos de purina que inhiben entre otros proteína cinasas, proteínas G y polimerasas. Más específicamente, la invención se refiere a métodos de uso de tales análogos de purina para tratar trastornos proliferativos celulares y enfermedades neurodegenerativas.

45

El documento WO 97/20842 (CNRS) también da a conocer derivados de purina que presentan propiedades antiproliferativas que son útiles en el tratamiento de cáncer, psoriasis y trastornos neurodegenerativos. Se describen derivados de purina adicionales en los documentos WO 03/002565, WO 04/016613 y WO 04/016612.

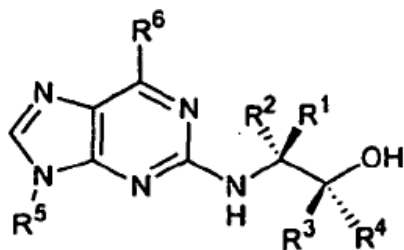
50

La presente invención busca proporcionar nuevos derivados de purina 2,6,9-sustituidos, particularmente los que tienen propiedades antiproliferativas.

55

Exposición de la invención

Un primer aspecto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



(I)

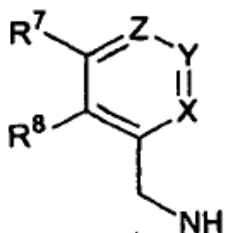
en la que:

R^1 y R^2 son cada uno independientemente H, alquilo C_{1-6} o haloalquilo C_{1-6} ;

uno de R^3 y R^4 es H y el otro es alquilo C_{1-6} o haloalquilo C_{1-6} ;

- 5 R^5 es alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{3-12} o cicloalquil C_{3-12} -alquilo C_{1-6} , cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente con uno o más grupos OH;

R^6 es



en la que Y es N y X y Z son CR^9 ;

- 10 R^7 , R^8 y cada R^9 son independientemente H, alquilo C_{1-6} o haloalquilo C_{1-6} , en los que al menos uno de R^7 , R^8 y cada R^9 es distinto de H.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 15 Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de la invención en la preparación de un medicamento para tratar uno o más de los siguientes trastornos:

- un trastorno proliferativo;
- un trastorno viral;
- un accidente cerebrovascular;
- alopecia;
- 20 un trastorno del SNC;
- un trastorno neurodegenerativo; y
- diabetes.

- 25 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un compuesto de la invención para su uso en medicina, en particular, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa, un trastorno viral, un trastorno neurodegenerativo, un trastorno del SNC, diabetes, alopecia y accidente cerebrovascular.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de la invención en un ensayo para identificar compuestos candidatos adicionales que influyen en la actividad de una o más enzimas CDK, una aurora cinasa, una GSK y una enzima PLK.

Descripción detallada

5 Tal como se mencionó anteriormente, un primer aspecto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente en el presente documento.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo" incluye grupos alquilo tanto de cadena lineal como ramificados saturados. Preferiblemente, el grupo alquilo es un grupo alquilo C₁₋₆, más preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₃. Los grupos alquilo particularmente preferidos incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo y hexilo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un grupo alquilo cíclico. Preferiblemente, el grupo cicloalquilo es un grupo cicloalquilo C₃₋₁₂.

Tal como se usa en el presente documento, el término "cicloalquil-alquilo" se refiere a un grupo que tiene funcionalidades tanto cicloalquilo como alquilo.

15 Preferiblemente, uno de R¹ y R² es H y el otro es alquilo C₁₋₆.

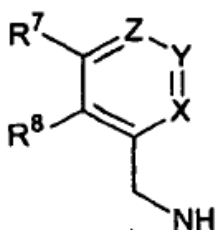
Más preferiblemente, uno de R¹ y R² es H y el otro es metilo, etilo o isopropilo.

En una realización preferida, R¹ es etilo y R² es H.

En una realización preferida, R³ es H y R⁴ es alquilo C₁₋₆ o haloalquilo C₁₋₆.

Más preferiblemente, R³ es H y R⁴ es metilo.

20 En una realización preferida de la invención, R⁶ es



en la que X es CH, Z es C-alquilo, R⁷ es H y R⁸ es alquilo C₁₋₆. Más preferiblemente, para esta realización, X es CH, Z es C-Me y R⁷ es H y R⁸ es Me. En una realización preferida alternativa, X es CH, Z es C-Me y R⁷ y R⁸ son ambos H. Aún en otra realización preferida alternativa, X es CH, Z es C-CF₃ y R⁷ y R⁸ son ambos H.

25 En otra realización preferida de la invención, R⁵ es isopropilo.

En una realización altamente preferida, el compuesto de la invención se selecciona de los siguientes:

[1]	(2R,3S-3-(6-((4,6-dimetilpiridin-3-ilmetilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[2]	2R,3S-3-(9-isopropil-6-((6-metilpiridin-3-il)metilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[11]	2R,3S-3-(9-isopropil-6-((6-(trifluorometil)piridin-3-il)metilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[17]	1,1,1-trifluoro-3-(9-isopropil-6-((6-(trifluorometil)piridin-3-il)metilamino)-9H-2-ilamino)pentan-2-ol

En una realización especialmente preferida de la invención, el compuesto se selecciona de: [1] u [11].

Preferiblemente, el compuesto de la invención muestra al menos un aumento de 3 veces en la potencia en comparación con seliciclib, más preferiblemente al menos un aumento de 4 veces o 5 veces en la potencia, incluso más preferiblemente todavía, al menos un aumento de 8 veces o 10 veces en la potencia.

En una realización especialmente preferida de la invención, el compuesto es (2R,3S-3-(6-((4,6-dimetilpiridin-3-ilmetilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol [1], o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

Ventajosamente, el compuesto [1] presenta una potencia sorprendentemente alta en estudios de toxicidad celular en una gama de diferentes líneas celulares en comparación con compuestos estructuralmente relacionados conocidos en la técnica. Detalles adicionales de estos estudios se exponen en los ejemplos adjuntos (véase en particular, la tabla 8).

Además, los experimentos han mostrado que al contrario que los compuestos estructuralmente relacionados conocidos en la técnica, el compuesto [1] no inhibe significativamente CYP3A4. De nuevo, estos estudios se describen en más detalle en los ejemplos adjuntos (véase en particular, la tabla 5). En efecto, el compuesto [1] no parece inhibir CYP3A4 hasta concentraciones mayores de 20 μM , que son ~ 60 veces su Cl_{50} celular. Puesto que el valor de Cl_{50} para la inhibición de CYP3A4 para la inhibición del compuesto [1] está significativamente por encima de su Cl_{50} celular (véase la tabla 8), esto indica que a concentraciones citotóxicas no debería haber un efecto sobre la actividad de CYP3A4. Esto es significativo debido a que CYP3A4 está implicado en el metabolismo de un gran número de medicamentos. Si CYP3A4 se inhibe por un fármaco, esto puede conducir a toxicidad inesperada debido al metabolismo reducido de sustratos de CYP3A4, dando como resultado de ese modo niveles aumentados aparentes de esos agentes.

De la misma manera, experimentos adicionales han mostrado que al contrario que sus análogos estructuralmente relacionados, el compuesto [1] no es un sustrato para las seis isoformas de CYP sometidas a prueba (véase en particular, la tabla 6). Esta diferencia corresponde bien a la diferencia observada en la inhibición de CYP tratada anteriormente. Un mecanismo común que conduce a la inhibición de CYP es que el compuesto sea también un sustrato de ese CYP.

Por consiguiente, el compuesto [1] no es ni un sustrato de, ni un inhibidor de, CYP3A4, lo que le confiere una propiedad beneficiosa inesperada, significativa con respecto a sus análogos estructuralmente relacionados.

Composiciones farmacéuticas

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención mezclado con un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, o una mezcla de los mismos. Incluso aunque los compuestos de la presente invención (incluyendo sus sales, ésteres farmacéuticamente aceptables y solvatos farmacéuticamente aceptables) pueden administrarse solos, generalmente se administrarán mezclados con un portador, excipiente o diluyente farmacéutico, particularmente para la terapia humana. Estas composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria.

Pueden encontrarse ejemplos de tales excipientes adecuados para las diversas formas diferentes de composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento en "Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª Edición, (1994), editado por A Wade y PJ Weller.

En la técnica farmacéutica, se conocen bien portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

Los ejemplos de portadores adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

La elección del portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración pretendida y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, el portador, excipiente o diluyente cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento, agente(s) de solubilización adecuado(s).

Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa fluida, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol.

Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares.

5 Pueden proporcionarse conservantes, estabilizadores, colorantes e incluso agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. También pueden usarse antioxidantes y agentes de suspensión.

Sales/ésteres

Los compuestos de la presente invención pueden estar presentes como sales o ésteres, en particular sales o ésteres farmacéuticamente aceptables.

10 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen sales de adición de ácidos o de bases adecuadas de los mismos. Puede encontrarse una revisión de sales farmacéuticas aceptables en Berge *et al*, J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977). Se forman sales, por ejemplo con ácidos inorgánicos fuertes tales como ácidos minerales, por ejemplo ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácidos hidrácidos halogenados; con ácidos carboxílicos orgánicos fuertes, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 4

15 átomos de carbono que están no sustituidos o sustituidos (por ejemplo, con halógeno), tales como ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos alquil C₁-C₄ o arilsulfónicos que están no sustituidos o

20 sustituidos (por ejemplo, con un halógeno) tales como ácido metano o p-toluenosulfónico. Los ésteres se forman usando o bien ácidos orgánicos o bien alcoholes/hidróxidos, dependiendo del grupo funcional que esté esterificándose. Los ácidos orgánicos incluyen ácidos carboxílicos, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 12 átomos de carbono que están no sustituidos o sustituidos (por ejemplo, con halógeno), tales como ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo oxálico, malónico, succínico, maleico,

25 fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos alquil C₁-C₄ o arilsulfónicos que están no sustituidos o sustituidos (por ejemplo, con un halógeno) tales como ácido metano o p-toluenosulfónico. Los hidróxidos adecuados incluyen hidróxidos inorgánicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio. Los alcoholes incluyen alcanolcoholes de 1-12 átomos de carbono que pueden

30 estar no sustituidos o sustituidos, por ejemplo con un halógeno).

Enantiómeros/tautómeros

En todos los aspectos de la presente invención tratados anteriormente, la invención incluye, cuando sea apropiado, todos los enantiómeros y tautómeros de los compuestos de la invención. El experto en la técnica

35 reconocerá compuestos que presentan propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono quirales) o características tautoméricas. Los enantiómeros y/o tautómeros correspondientes pueden aislarse/prepararse mediante métodos conocidos en la técnica.

Estereoisómeros e isómeros geométricos

Algunos de los compuestos de la invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, por ejemplo pueden presentar uno o más centros asimétricos y/o geométricos y así pueden existir en dos o

40 más formas estereoisoméricas y/o geométricas. La presente invención contempla el uso de todos los estereoisómeros e isómeros geométricos individuales de estos agentes inhibidores, y mezclas de los mismos. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas, siempre que dichas formas conserven la actividad funcional apropiada (aunque no necesariamente en el mismo grado).

45 La presente invención también incluye todas las variaciones isotópicas adecuadas del agente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se define como una en la que al menos un átomo está sustituido por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la masa atómica encontrada habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en el

50 agente y sales farmacéuticamente aceptables del mismo incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro tales como ²H, ³H, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁷O, ¹⁸O, ³¹P, ³²P, ³⁵S, ¹⁸F y ³⁶Cl, respectivamente. Determinadas variaciones isotópicas del agente y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, por ejemplo, aquéllas en las que se incorpora un isótopo radiactivo tal como ³H o ¹⁴C, son útiles en estudios de distribución tisular de sustratos y/o fármacos. Los isótopos tritados, es decir, ³H, y de carbono-14, es decir, ¹⁴C, se prefieren particularmente por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos tales como deuterio, es decir, ²H, puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, aumento de la semivida *in vivo* o reducción de los requerimientos de dosificación y, por tanto, pueden preferirse en algunas circunstancias. Las variaciones isotópicas del agente de la presente invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo

60 de esta invención pueden prepararse generalmente mediante procedimientos convencionales usando variaciones isotópicas apropiadas de reactivos adecuados.

Solvatos

La presente invención también incluye formas de solvato de los compuestos de la presente invención. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas.

Polimorfos

5 La invención se refiere además a compuestos de la presente invención en sus diversas formas cristalinas, formas polimórficas y formas anhidras/hidratadas. Dentro de la industria farmacéutica está bien establecido que los compuestos químicos pueden aislarse en cualquiera de tales formas variando ligeramente el método de purificación y/o forma de aislamiento de los disolventes usados en la preparación sintética de tales compuestos.

10 Administración

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden adaptarse para las vías de administración oral, rectal, vaginal, parenteral, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intratecal, intrabronquial, subcutánea, intradérmica, intravenosa, nasal, bucal o sublingual.

15 Para la administración oral, se hace uso particular de comprimidos fabricados por compresión, pastillas, comprimidos, cápsulas de gel, gotas y cápsulas. Preferiblemente, estas composiciones contienen desde 1 hasta 250 mg y más preferiblemente desde 10-100 mg, de principio activo por dosis.

20 Otras formas de administración comprenden disoluciones o emulsiones que pueden inyectarse por vía intravenosa, por vía intrarterial, por vía intratecal, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía intraperitoneal o por vía intramuscular, y que se preparan a partir de disoluciones estériles o esterilizables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden estar en forma de supositorios, óvulos vaginales, suspensiones, emulsiones, lociones, pomadas, cremas, geles, pulverizaciones, disoluciones o polvos secantes.

25 Un medio alternativo de administración transdérmica es mediante el uso de un parche dérmico. Por ejemplo, el principio activo puede incorporarse en una crema que consiste en una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida. El principio activo también puede incorporarse, a una concentración de entre el 1 y 10% en peso, en una pomada que consiste en una base de cera blanca o parafina blanda blanca junto con tales estabilizadores y conservantes, según pueda requerirse.

Las formas inyectables pueden contener entre 10 - 1000 mg, preferiblemente entre 10 - 250 mg, de principio activo por dosis.

30 Las composiciones pueden formularse en forma farmacéutica unitaria, es decir, en forma de porciones diferenciadas que contienen una dosis unitaria, o un múltiplo o subunidad de una dosis unitaria.

Dosificación

35 Un experto habitual en la técnica puede determinar fácilmente una dosis apropiada de una de las presentes composiciones para la administración a un sujeto sin experimentación excesiva. Normalmente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un paciente individual y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y momento de administración, la velocidad de excreción, la combinación farmacológica, la gravedad del estado particular y la terapia individual a la que se somete. Las dosificaciones dadas a conocer en el presente documento son a modo de ejemplo del caso promedio. Por supuesto, puede haber ejemplos individuales en los que se necesiten intervalos de dosificación más altos o más bajos, y tales ejemplos están dentro del alcance de esta invención.

45 Dependiendo de la necesidad, el agente puede administrarse a una dosis de desde 0,01 hasta 30 mg/kg de peso corporal, tal como desde 0,1 hasta 10 mg/kg, más preferiblemente desde 0,1 hasta 1 mg/kg de peso corporal.

En una realización a modo de ejemplo, se administrarán al paciente una o más dosis de 10 a 150 mg/día para el tratamiento de tumor maligno.

Uso terapéutico

50 Se ha encontrado que los compuestos de la presente invención presentan actividad antiproliferativa y, por tanto, se cree que son útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos, tales como cánceres, leucemias u otros trastornos asociados con una proliferación celular no controlada, tales como psoriasis y reestenosis.

Tal como se define en el presente documento, puede demostrarse un efecto antiproliferativo dentro del alcance de la presente invención mediante la capacidad para inhibir la proliferación celular en un

ensayo de células completas *in vitro*, por ejemplo usando cualquiera de las líneas celulares A549, HeLa, HT-29, MCF7, Saos-2, CCRF-CEM, H460, HL-60 y K-562, o mostrando la inhibición de cinasas en un ensayo apropiado. Esos ensayos, incluyendo los métodos para su realización, se describen en más detalle en los ejemplos adjuntos. Usando tales ensayos, puede determinarse si un compuesto es antiproliferativo en el contexto de la presente invención.

Por tanto, una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de uno o más compuestos de la invención en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno proliferativo.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "preparación de un medicamento" incluye el uso de un compuesto de la invención directamente como medicamento además de su uso en un programa de selección para agentes terapéuticos adicionales o en cualquier fase de la fabricación de un medicamento de este tipo.

El término "trastorno proliferativo" se usa en el presente documento en un sentido amplio para incluir cualquier trastorno que requiera el control del ciclo celular, por ejemplo trastornos cardiovasculares tales como reestenosis y cardiomiopatía, trastornos autoinmunitarios tales como glomerulonefritis y artritis reumatoide, trastornos dermatológicos tales como psoriasis, trastornos antiinflamatorios, antifúngicos, antiparasitarios tales como malaria, enfisema y alopecia. En estos trastornos, los compuestos de la presente invención pueden inducir apoptosis o mantener la estasis dentro de las células deseadas según se requiera. Preferiblemente, el trastorno proliferativo es un cáncer o leucemia.

En otra realización preferida, el trastorno proliferativo es psoriasis.

Los compuestos de la invención pueden inhibir cualquiera de las etapas o fases en el ciclo celular, por ejemplo, la formación de la envuelta nuclear, la salida de la fase inactiva del ciclo celular (G0), el avance de G1, la descondensación cromosómica, la descomposición de la envuelta nuclear, START, la iniciación de la replicación del ADN, el avance de la replicación de ADN, la terminación de la replicación de ADN, la duplicación del centrosoma, el avance de G2, la activación de las funciones mitóticas o meióticas, la condensación cromosómica, la separación del centrosoma, la nucleación de los microtúbulos, la formación y función del huso, las interacciones con proteínas motoras de los microtúbulos, la separación y segregación de las cromátidas, la inactivación de funciones mitóticas, la formación del anillo contráctil y funciones de citocinesis. En particular, los compuestos de la invención pueden influir en determinadas funciones genéticas tales como la unión de la cromatina, la formación de complejos de replicación, la autorización de la replicación, la fosforilación u otra actividad de modificación secundaria, la degradación proteolítica, la unión a microtúbulos, la unión a actina, la unión a septina, la actividad de nucleación del centro organizador de los microtúbulos y la unión a componentes de rutas de señalización del ciclo celular.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad proliferativa, comprendiendo dicho método administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención.

En una realización preferida de este aspecto, el trastorno proliferativo es cáncer o leucemia.

En una realización incluso más preferida de este aspecto, el compuesto se administra en una cantidad suficiente para inhibir al menos una enzima CDK.

Preferiblemente, el compuesto de la invención se administra en una cantidad suficiente para inhibir al menos una de CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6, CDK7, CDK8 y/o CDK9.

Más preferiblemente, el compuesto de la invención se administra en una cantidad suficiente para inhibir al menos una de CDK2 y/o CDK4.

Incluso más preferiblemente, la enzima CDK es CDK2.

En una realización preferida de este aspecto, el compuesto se administra por vía oral.

Aún otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de la invención para tratar un trastorno neurodegenerativo.

Preferiblemente, el trastorno neurodegenerativo es apoptosis neuronal.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de la invención como agente antiviral.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de la invención en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno viral, tal como citomegalovirus humano (CMVH), virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1), virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y virus zóster de la varicela (VZV).

5 En una realización más preferida de la invención, el compuesto de la invención se administra en una cantidad suficiente para inhibir uno o más de las CDK de células huésped implicada en la replicación viral, es decir CDK2, CDK7, CDK8 y CDK9 [Wang D, De la Fuente C, Deng L, Wang L, Zilberman I, Eadie C, Healey M, Stein D, Denny T, Harrison LE, Meijer L, Kashanchi F. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription by chemical cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Virol.* 2001; 75: 7266-7279].

10 Tal como se define en el presente documento, un efecto antiviral dentro del alcance de la presente invención puede demostrarse mediante la capacidad para inhibir CDK2, CDK7, CDK8 o CDK9.

15 En una realización particularmente preferida, la invención se refiere al uso de uno o más compuestos de la invención en el tratamiento de un trastorno viral que depende de o es sensible a CDK. Los trastornos dependientes de CDK se asocian con un nivel de actividad por encima de lo normal de una o más enzimas CDK. Tales trastornos se asociaron preferiblemente con un nivel de actividad anómalo de CDK2, CDK7, CDK8 y/o CDK9. Un trastorno sensible a CDK es un trastorno en el que una aberración en el nivel de CDK no es la causa primaria, sino que es posterior a la aberración metabólica primaria. En tales situaciones, puede decirse que CDK2, CDK7, CDK8 y/o CDK9 son parte de la ruta metabólica sensible y, por tanto, los inhibidores de CDK pueden ser activos en el tratamiento de tales trastornos.

20 Los compuestos de la invención también son útiles en la preparación de medicamentos para el tratamiento de diversos trastornos oftálmicos. Preferiblemente, el trastorno oftálmico es glaucoma, degeneración macular asociada a la edad (DMAE) exudativa o retinopatía diabética proliferativa (RDP).

25 El estado patológico denominado glaucoma se caracteriza por una pérdida permanente de la función visual debido al daño irreversible del nervio óptico. Los varios tipos morfológica o funcionalmente distintos de glaucoma se caracterizan normalmente por una presión intraocular (PIO) elevada, que se considera que está relacionada causalmente con el transcurso patológico de la enfermedad. La hipertensión ocular es un estado en el que la presión intraocular está elevada, pero no se ha producido pérdida aparente de la función visual; se considera que tales pacientes corren un alto riesgo de desarrollo eventual de la pérdida visual asociada con glaucoma. Los inhibidores de GSK-3 son útiles para el tratamiento de enfermedades oculares
30 tales como glaucoma. Se ha mostrado que un componente de la ruta de señalización de Wnt, proteína relacionada Frizzled (FRP), se expresa de manera diferencial en varias líneas celulares de malla trabecular glaucomatosa y pueden perturbar la cascada de señalización normal provocando un aumento en la resistencia al flujo de salida y el desarrollo de PIO elevada. Hellberg M.R *et al* (documento US20040186159) han mostrado que a través de la interacción de GSK-3 con componentes de la ruta de señalización de Wnt, la inhibición
35 de GSK-3 por agentes farmacológicos puede sortear el antagonismo mediado por FRP de la ruta de señalización de Wnt provocado por los niveles elevados de FRP y contrarrestar el aumento en la resistencia al flujo de salida que resulta del aumento en la producción de FRP en individuos con glaucoma.

40 CTGF es una citocina secretada que se sabe que aumenta la producción de matriz extracelular (MEC), principalmente por medio del aumento de la deposición de colágeno I y de fibronectina. La sobreexpresión de CTGF se ha implicado previamente como un factor causal principal en estados tales como esclerodermia, enfermedades fibroproliferativas, cicatrización patológica, etc. en los que existe una sobreacumulación de componentes de la MEC. Una sobreacumulación de materiales de la matriz extracelular en la región de la malla trabecular (MT) también es distintivo de muchas formas de glaucoma; se cree que tales aumentos conducen a un aumento de la resistencia al flujo de salida de humor acuoso y, por tanto, a presiones intraoculares elevadas. Fleenor D L *et al* (documento US20050234075) han mostrado que los inhibidores de GSK-3
45 y los inhibidores de CDK pueden inhibir la expresión de CTGF tanto basal como inducida por TGF.β.2 en células de la MT humanas, por tanto los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento de glaucoma.

50 Los compuestos de la invención también son útiles en el tratamiento de DMAE y RDP. La macular degeneración asociada a la edad (DMAE) exudativa y la retinopatía diabética proliferativa (RDP) son las causas principales de ceguera adquirida en países desarrollados y se caracteriza por una neovascularización patológica del segmento posterior en el ojo. Todavía se desconoce la causa que provoca tanto DMAE exudativa como RDP, sin embargo, la elaboración de diversos factores de crecimiento proangiogénicos parece ser un estímulo común. Se han encontrado factores de crecimiento solubles, tales como el factor de crecimiento
55 endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF-2), el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), angiopoyetinas, etc., en tejidos y líquidos extraídos de pacientes con angiogénesis ocular patológica. La inhibición o el bloqueo de la actividad de estos factores de crecimiento y de otras enzimas intracelulares tales como aurora ci-

nasas, ha mostrado que tiene un efecto antiangiogénico. Por tanto compuestos de la presente invención son útiles para tratar enfermedades oftálmicas caracterizadas por neovascularización.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la preparación de un medicamento para tratar la diabetes.

5 En una realización particularmente preferida, la diabetes es diabetes tipo II.

GSK3 es una de varias proteínas cinasas que fosforilan la glucógeno sintasa (GS). La estimulación de la síntesis de glucógeno mediante la insulina en el músculo esquelético resulta de la desfosforilación y activación de GS. Por tanto, la acción de GSK3 sobre GS da como resultado la desactivación de esta última y, por tanto, la supresión de la conversión de glucosa en glucógeno en los músculos.

10 La diabetes tipo II (diabetes mellitus no insulino dependiente) es una enfermedad multifactorial. La hiperglucemia se debe a la resistencia a la insulina en el hígado, músculos y otros tejidos, junto con la alteración de la secreción de insulina. El músculo esquelético es el lugar principal para la captación de glucosa estimulada por insulina, donde o bien se elimina de la circulación o bien se convierte en glucógeno. La deposición de glucógeno muscular es el determinante principal en la homeostasis de glucosa y los diabéticos tipo
15 II tienen un almacenamiento defectuoso de glucógeno muscular. Existen evidencias de que un aumento en la actividad de GSK3 es importante en la diabetes tipo II [Chen, Y.H.; Hansen, L.; Chen, M.X.; Bjorbaek, C.; Vestergaard, H.; Hansen, T.; Cohen, P.T.; Pedersen, O. Diabetes, 1994, 43, 1234]. Además, se ha demostrado que GSK3 se sobreexpresa en células musculares de diabéticos tipo II y que existe una correlación inversa entre la actividad de GSK3 en el músculo esquelético y la acción de la insulina [Nikoulina, S.E.; Ciaraldi, T.P.; Mudaliar, S.; Mohideen, P.; Carter, L.; Henry, R.R. Diabetes, 2000, 49, 263].
20

Por tanto, la inhibición de GSK3 tiene significación terapéutica en el tratamiento de diabetes, particularmente tipo II, y neuropatía diabética.

Puede señalarse que se sabe que GSK3 fosforila muchos sustratos distintos de GS y, por tanto, está implicada en la regulación de múltiples rutas bioquímicas. Por ejemplo, GSK se expresa altamente en
25 los sistemas nerviosos central y periférico.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno del SNC, por ejemplo trastornos neurodegenerativos.

Preferiblemente, el trastorno del SNC es enfermedad de Alzheimer.

30 Tau es un sustrato de GSK-3 que se ha implicado en la etiología de la enfermedad de Alzheimer. En células nerviosas sanas, Tau se ensambla conjuntamente con tubulina en los microtúbulos. Sin embargo, en la enfermedad de Alzheimer, tau forma grandes ovillos de filamentos, que perturban las estructuras microtubulares en la célula nerviosa, alterando así el transporte de nutrientes así como la transmisión de mensajes neuronales.

35 Sin querer restringirse a la teoría, se cree que los inhibidores de GSK3 pueden impedir y/o revertir la hiperfosforilación anómala de la proteína asociada a microtúbulos tau que es una característica invariable de la enfermedad de Alzheimer y varias enfermedades neurodegenerativas distintas, tales como parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal y enfermedad de Pick. Las mutaciones en el gen tau provocan formas heredadas de demencia frontotemporal, poniendo de relieve además la relevancia de la disfunción de la proteína tau para el proceso neurodegenerativo [Goedert, M. Curr. Opin. Gen. Dev., 2001, 11, 343].
40

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la preparación de un medicamento para tratar el trastorno bipolar.

45 Aún otro aspecto de la invención se refiere al uso de compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la preparación de un medicamento para tratar un accidente cerebrovascular.

50 La reducción de la apoptosis neuronal es un objetivo terapéutico importante en el contexto de traumatismo craneoencefálico, el accidente cerebrovascular, epilepsia y la enfermedad neuronal motora [Mattson, M.P. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2000, 1, 120]. Por tanto, GSK3 como factor proapoptótico en células neuronal hace que esta proteína cinasa sea una diana terapéutica atractiva para el diseño de fármacos inhibidores para tratar estas enfermedades.

Aún otro aspecto de la invención se refiere al uso de compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la preparación de un medicamento para tratar la alopecia.

El crecimiento capilar está controlado por la ruta de señalización de Wnt, en particular de Wnt-3. En sistemas de modelos de cultivos tisulares de la piel, la expresión de mutantes no degradables de β -catenina conduce a un aumento drástico en la población de supuestas células madre, que tienen mayor potencial proliferativo [Zhu, A.J.; Watt, F.M. *Development*, 1999, 126, 2285]. Esta población de células madre expresa un mayor nivel de β -catenina no asociada a cadherina [DasGupta, R.; Fuchs, E. *Development*, 1999, 126, 4557], que puede contribuir a su alto potencial proliferativo. Además, ratones transgénicos que sobreexpresan una β -catenina truncada en la piel experimentan morfogénesis *de novo* de folículos pilosos, que normalmente solo se establece durante la embriogénesis. Por tanto, la aplicación ectópica de inhibidores de GSK3 puede ser terapéuticamente útil en el tratamiento de la calvicie y en la restauración del crecimiento capilar tras alopecia inducida por quimioterapia.

Preferiblemente, el compuesto de la invención, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en una cantidad suficiente para inhibir GSK3 β .

En una realización de la invención, el compuesto de la invención se administra en una cantidad suficiente para inhibir al menos una enzima PLK.

Las cinasas de tipo polo (PLK) constituyen una familia de serina/treonina proteína cinasas. Los mutantes de *Drosophila melanogaster* mitóticos en el locus polo presentan anomalías en el huso [Sunkel *et al.*, *J. Cell Sci.*, 1988, 89, 25] y se encontró que polo codifica para una cinasa mitótica [Llamazares *et al.*, *Genes Dev.*, 1991, 5, 2153]. En seres humanos, existen tres PLK estrechamente relacionadas [Glover *et al.*, *Genes Dev.*, 1998, 12, 3777]. Contienen un dominio de cinasa catalítica amino-terminal altamente homólogo y sus extremos carboxilo-terminal contienen dos o tres regiones conservadas, las cajas polo. La función de las cajas polo sigue entendiéndose de manera incompleta pero están implicadas en el direccionamiento de PLK a compartimentos subcelulares [Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 9301; Leung *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, 2002, 9, 719], la mediación de interacciones con otras proteínas [Kauselmann *et al.*, *EMBO J.*, 1999, 18, 5528], o pueden constituir parte de un dominio autorregulador [Nigg, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, 10, 776]. Además, se requiere la actividad de PLK1 dependiente de la caja polo para la transición metafase/anafase y citocinesis apropiadas [Yuan *et al.*, *Cancer Res.*, 2002, 62, 4186; Seong *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 32282].

Estudios han mostrado que las PLK humanas regulan algunos aspectos fundamentales de la mitosis [Lane *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 1996, 135, 1701; Cogswell *et al.*, *Cell Growth Differ.*, 2000, 11, 615]. En particular, se cree que la actividad de PLK1 es necesaria para la maduración funcional de centrosomas en G2 tardía/profase temprana y el establecimiento posterior de un huso bipolar. La reducción de PLK1 celular a través de la técnica de ARN de interferencia pequeño (ARNip) también ha confirmado que se requiere esta proteína para múltiples procesos mitóticos y finalización de la citocinesis [Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 8672].

En una realización más preferida de la invención, el compuesto de la invención se administra en una cantidad suficiente para inhibir PLK 1.

De las tres PLK humanas, PLK1 es la mejor caracterizada; regula varios efectos del ciclo de división celular, incluyendo el comienzo de la mitosis [Toyoshima-Morimoto *et al.*, *Nature*, 2001, 410, 215; Roshak *et al.*, *Cell. Signalling*, 2000, 12, 405], la activación del punto de control del daño del ADN [Smits *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2000, 2, 672; van Vugt *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 41656], la regulación del complejo promotor de la anafase [Sumara *et al.*, *Mol. Cell*, 2002, 9, 515; Golan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 15552; Kotani *et al.*, *Mol. Cell*, 1998, 1, 371], la fosforilación del proteasoma [Feng *et al.*, *Cell Growth Differ.*, 2001, 12, 29] y la duplicación y maduración del centrosoma [Dai *et al.*, *Oncogene*, 2002, 21, 6195].

Específicamente, la iniciación de la mitosis requiere la activación del factor promotor de la fase M (MPF), el complejo entre la cinasa dependiente de ciclina CDK1 y ciclinas de tipo B [Nurse, *Nature*, 1990, 344, 503]. Estas últimas se acumulan durante las fases S y G2 del ciclo celular y promueven la fosforilación inhibidora del complejo MPF por cinasas WEE1, MIK1 y MYT1. Al final de la fase G2, la desfosforilación correspondiente por la fosfatasa de doble especificidad CDC25C desencadena la activación de MPF [Nigg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001, 2, 21]. En la interfase, la ciclina B se ubica en el citoplasma [Hagting *et al.*, *EMBO J.*, 1998, 17, 4127], entonces se fosforila durante la profase y este acontecimiento provoca la translocación nuclear [Hagting *et al.*, *Curr. Biol.*, 1999, 9, 680; Yang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 3604]. Se cree que la acumulación nuclear de MPF activo durante la profase es importante para iniciar los acontecimientos de la fase M [Takizawa *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000, 12, 658]. Sin embargo, el MPF nuclear se mantiene inactivo mediante WEE1 a menos que se contrarreste mediante CDC25C. La propia fosfatasa CDC25C, ubicada en el citoplasma durante la interfase, se acumula en el núcleo en la profase [Seki *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, 1992, 3, 1373; Heald *et al.*, *Cell*, 1993, 74, 463; Dalal *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 1999, 19, 4465]. La entrada nuclear tan-

to de ciclina B [Toyoshima-Morimoto *et al.*, Nature, 2001, 410, 215] como de CDC25C [Toyoshima-Morimoto *et al.*, EMBO Rep., 2002, 3, 341] se promueven a través de fosforilación por PLK1 [Roshak *et al.*, Cell. Signaling, 2000, 12, 405]. Esta cinasa es un regulador importante de la iniciación de la fase M.

5 En una realización particularmente preferida, los compuestos de la invención son inhibidores de PLK1 antagonistas de ATP.

En el presente contexto, antagonismo de ATP se refiere a la capacidad de un compuesto inhibidor para disminuir o impedir la actividad catalítica de PLK, es decir, la fosfotransferencia de ATP a un sustrato de PLK macromolecular, uniéndose reversible o irreversiblemente en el sitio activo de la enzima de tal manera que afecte a o suprima la unión a ATP.

10 En otra realización preferida, el compuesto de la invención se administra en una cantidad suficiente para inhibir PLK2 y/o PLK3.

15 La PLK2 de mamífero (también conocida como SNK) y PLK3 (también conocida como PRK y FNK) mostraron originariamente que eran productos génicos de expresión precoz. La actividad cinasa de PLK3 parece tener un máximo durante la fase S tardía y la G2. También se activa durante la activación del punto de control del daño del ADN y estrés oxidativo grave. La PLK3 también desempeña un papel importante en la regulación de la dinámica de microtúbulos y la función del centrosoma en la célula y la expresión de PLK3 desregulada da como resultado la detención del ciclo celular y apoptosis [Wang *et al.*, Mol. Cell. Biol., 2002, 22, 3450]. PLK2 es el homólogo que peor se entiende de las tres PLK. Tanto PLK2 como PLK3 pueden tener funciones postmitóticas importantes adicionales [Kauselmann *et al.*, EMBO J., 1999, 18, 5528].

20 Ensayos

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto tal como se definió anteriormente en el presente documento en un ensayo para identificar compuestos candidatos adicionales que influyen en la actividad de una o más de una cinasa dependiente de ciclina, una aurora cinasa, una GSK y/o una enzima PLK.

25 Preferiblemente, el ensayo puede identificar compuestos candidatos que pueden inhibir una o más de una cinasa dependiente de ciclina, una aurora cinasa, una GSK y/o una enzima PLK.

Más preferiblemente, el ensayo es un ensayo de unión competitiva.

Preferiblemente, el compuesto candidato se genera mediante modificación SAR convencional de un compuesto de la invención.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "modificación SAR convencional" se refiere a métodos convencionales conocidos en la técnica para variar un compuesto dado por medio de derivatización química.

35 Por tanto, en un aspecto, el compuesto identificado puede actuar como un modelo (por ejemplo, un molde) para el desarrollo de otros compuestos. Los compuestos empleados en una prueba de este tipo pueden estar libres en disolución, fijados a un soporte sólido, portados sobre una superficie celular o ubicados de manera intracelular. Puede medirse la supresión de la actividad o la formación de complejos de unión entre el compuesto y el agente que está sometándose a prueba.

El ensayo de la presente invención puede ser una selección, mediante la cual se someten a prueba varios agentes. En un aspecto, el método de ensayo de la presente invención es una selección de alto rendimiento.

40 Esta invención también contempla el uso de ensayos de selección de fármacos competitivos en los que anticuerpos neutralizantes que pueden unirse a un compuesto compiten específicamente con un compuesto de prueba por la unión a un compuesto.

45 Otra técnica de selección proporciona la selección de alto rendimiento (HTS, *high throughput screening*) de agentes que tienen afinidad de unión adecuada con las sustancias y se basa en el método descrito en detalle en el documento WO 84/03564.

Se espera que los métodos de ensayo de la presente invención sean adecuados para la selección tanto a pequeña como a gran escala de compuestos de prueba así como en ensayos cuantitativos.

Preferiblemente, el ensayo de unión competitiva comprende poner en contacto un compuesto de la invención con una cinasa dependiente de ciclina, una aurora cinasa, una GSK o una enzima PLK en

presencia de un sustrato conocido de dicha enzima CDK y detectar cualquier cambio en la interacción entre dicha cinasa y dicho sustrato conocido.

5 Un aspecto adicional de la invención proporciona un método de detección de la unión de un ligando a una cinasa dependiente de ciclina, una aurora cinasa, una GSK o una enzima PLK, comprendiendo dicho método las etapas de:

(i) poner en contacto un ligando con una cinasa dependiente de ciclina, una aurora cinasa, una GSK o una enzima PLK en presencia de un sustrato conocido de dicha cinasa;

(ii) detectar cualquier cambio en la interacción entre dicha cinasa y dicho sustrato conocido;

y en el que dicho ligando es un compuesto de la invención.

10 Un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de:

(a) realizar un método de ensayo descrito anteriormente en el presente documento;

(b) identificar uno o más ligandos que pueden unirse a un dominio de unión a ligandos; y

(c) preparar una cantidad de dicho uno o más ligandos.

Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento que comprende las etapas de:

15 (a) realizar un método de ensayo descrito anteriormente en el presente documento;

(b) identificar uno o más ligandos que pueden unirse a un dominio de unión a ligandos; y

(c) preparar una composición farmacéutica que comprende dicho uno o más ligandos.

Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento que comprende las etapas de:

(a) realizar un método de ensayo descrito anteriormente en el presente documento;

20 (b) identificar uno o más ligandos que pueden unirse a un dominio de unión a ligandos;

(c) modificar dicho uno o más ligandos que pueden unirse a un dominio de unión a ligandos;

(d) realizar el método de ensayo descrito anteriormente en el presente documento;

(e) opcionalmente, preparar una composición farmacéutica que comprende dicho uno o más ligandos.

25 Los métodos anteriores pueden usarse para seleccionar un ligando útil como inhibidor de una o más enzimas CDK.

La presente invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos, y con referencia a la siguiente figura, en la que:

30 La figura 1 muestra la regulación por disminución de Mcl-1 por los compuestos de la invención. Se trataron células H460 durante 24 horas con diversas concentraciones de los compuestos y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western para determinar los cambios en el nivel de Mcl-1.

La figura 2 muestra el efecto de algunos de los siguientes compuestos sobre los niveles de Mcl-1 en células H460. Se trataron las células con un intervalo de concentraciones de cada fármaco y se analizaron tras 5 horas.

35 Ejemplos

General

Se adquirieron los productos químicos y disolventes de fuentes comerciales y se usaron tal como se recibieron a menos que se indique lo contrario. Se secaron THF y Et₂O calentando a reflujo con benzofenona de so-

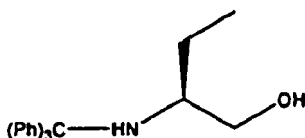
dio bajo N₂ y se recogieron mediante destilación. Se secó el tolueno calentando a reflujo sobre sodio bajo N₂. Se secó CH₂Cl₂ calentando a reflujo sobre CaH₂ bajo N₂. El generador de microondas usado fue un modelo "Discover" de CEM, con un diseño de cavidad monomodal circular, que enfoca la radiación de microondas sobre el tubo de muestra. Se realizó CCF (cromatografía en capa fina) usando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice G60 (0,25 cm). Se secaron al aire las placas desarrolladas y se analizaron bajo una lámpara de UV (254/365 nm). Se usó MgSO₄ como agente de secado convencional para disoluciones orgánicas a menos que se indique lo contrario. Se realizó cromatografía en columna en columna ultrarrápida usando gel de sílice Fluorochem (35-70 μm). Se determinaron los puntos de fusión (p.f.) con un aparato de punto de fusión de capilar Electrothermal 9100 y no están corregidos. La abreviatura (desc.) indica un punto de descomposición. Se registraron los espectros de ¹H-RMN en un espectrómetro Avance 300 (300,1 MHz) de Bruker o un Gemini 2000 (300 MHz) de Varian usando el disolvente deuterado como el de retención y el disolvente residual como la referencia interna en todos los casos. Se registraron los espectros de ¹³C-RMN usando la secuencia PENDANT en un espectrómetro Avance 300 (75,5 MHz) de Bruker. Se registraron todos los demás espectros de ¹³C en un espectrómetro Gemini 2000 (75,5 MHz) de Varian usando desacoplamiento de ¹H de pulsos compuestos. Se indican las constantes de acoplamiento (J) hasta el 0,1 Hz más cercano. Se usan las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, duplete; t, triplete; q, cuartete; qu, quintuplete; m, multiplete y a, ancho. Se realizaron microanálisis elementales por la Sra. S. Williamson, School of Chemistry, Purdie Building, University of St. Andrews, R.U. Los resultados obtenidos estaban dentro del 0,4% de los valores calculados. Se registraron los espectros de masas de ionización por electrospray (ESI) en un espectrómetro de masas Micromass LCT, acoplado a un HPLC 2975 de Waters. Se realizó una RP-HPLC analítica usando un inyector de muestras automatizado ASI-100 de Dionex acoplado a una bomba P580 de Dionex. Se usó una columna Phenomenex (150 x 4,60 mm, Synergi 4 μ hydro-RP 80 Å), mantenida a una temperatura de 25°C con fines analíticos. Se controló la unidad de HPLC usando software Chromeleon. Se realizó una elución en gradiente lineal usando sistemas de H₂O/MeCN (que contenían el 0,1% de CF₃COOH) a velocidades de flujo de 1 ml/min. Se evaluó la pureza mediante la integración de los cromatogramas (λ = 254 nm).

Síntesis

Se preparó (2R,3S)-3-amino-pentan-2-ol mediante una u otra de dos rutas que difieren en el grupo protector usado para la amina.

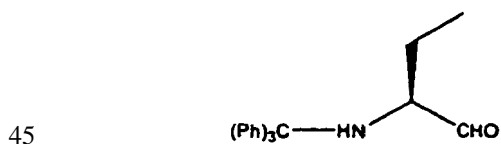
La ruta 1 empleó tritilo como grupo protector

30 (S)-2-(Triilamino)butan-1-ol



A una disolución con agitación de (S)-(+)-2-aminobutan-1-ol (10 g, 112,18 mmol) en diclorometano (DCM, 250 ml) bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente, se le añadió diisopropiletilamina (DIEA, 19,4 ml, 112,18 mmol) seguido por cloruro de tritilo (31,2 g, 112,18 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 48 h, cuando la CCF (hexano:éter:MeOH; 55:40:5) indicó que se había completado la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se llevó el residuo a acetato de etilo. Se lavó la disolución orgánica con agua (2 x), se secó sobre sulfato de sodio. Se eliminó el disolvente proporcionando (S)-2-(tritol-amino)-butan-1-ol como un aceite de color amarillo claro; Rendimiento: 33 g (89%). ¹H-RMN (CDCl₃, 250 MHz): δ 0,72 (3 H, t, J = 7,5 Hz, -NHCH(CH₂CH₃)CH₂OH), 1,15 - 1,10 (m, 2 H, -NHCH(CH₂CH₃)CH₂OH), 2,05 (1 H, s, a, NH), 2,24 (1 H, s, a, OH), 2,62 - 2,54 (m, 1 H, -NHCH(CH₂CH₃)CH₂OH), 3,17 - 3,08 (1 H m, -NHCH(CH₂CH₃)CH₂OH), 3,35 - 3,29 (1 H, m, NHCH(CH₂CH₃)CH₂OH), 7,37 - 7,2 (12 H, m, ArH), 7,65 - 7,58 (3 H, m, ArH); δ_C (250 MHz, CDCl₃) 146,86 (C), 129,43 (6 x CH), 127,90 (6 x CH), 126,48 (3 x CH), 71,27 (C), 62,72 (CH₂), 48,91 (CH), 24,55 (CH₂), 10,47 (CH₃)

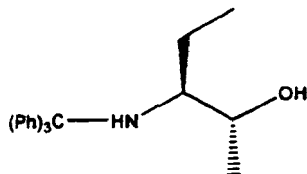
(S)-2-(Tritilamino)butiraldehído



A una disolución con agitación de dimetilsulfóxido seco (2,4 ml, 2,8 eq., 33,82 mmol) en diclorometano seco (30 ml) bajo una atmósfera de argón a -78°C, se le añadió cloruro de oxalilo (disolución 2 M en DCM, 8,45 ml, 1,40 eq., 16,9 mmol), gota a gota. Se agitó la mezcla de reacción a -78°C durante 1 h, tiempo tras el cual se añadió gota a gota una disolución de (S)-2-(tritol-amino)-butan-1-ol (4 g, 1 eq., 12,07 mmol) en DCM (30 ml) con agitación. Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 2 h tras lo

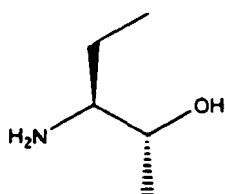
cual se añadió una disolución de trietilamina (TEA, 8,4 ml, 5 eq., 60,27 mmol) en DCM (30 ml), y se dejó calentar la disolución hasta temperatura ambiente a lo largo de 1 h. Se diluyó la mezcla de reacción con más DCM (100 ml) y se lavó con agua (250 ml). Se extrajo la fase acuosa con DCM (3 x 50 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (Na_2SO_4) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía de sílice ultrarrápida (acetato de etilo:hexano 1:4) proporcionando (S)-2-(tritol-amino)-butiraldehído como un aceite de color amarillo claro; Rendimiento: 3,64 g (91%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 250 MHz): δ 0,95 (3 H, t, J = 7,5 Hz, $-\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CHO}$), 1,72 - 1,52 [2 H, m, $\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CHO}$], 2,76 (1 H, s, a, -NH), 3,41 - 3,36 [1 H, m, $\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CHO}$], 7,35 - 7,17 (12 H, m, ArH), 7,67 - 7,51 (3 H, m, ArH), 9,05 (1 H, s, $\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CHO}$). δ_{C} (250 MHz, CDCl_3) 202,95 (CO), 146,23 (C), 129,23 (6 x CH), 127,96 (6 x CH), 126,85 (3 x CH), 71,13 (C), 62,62 (CH), 24,78 (CH_2), 10,48 (CH_3)

(2R, 3S)-3-(Tritilamino)pentan-2-ol



A una suspensión con agitación de $\text{CuBr}\cdot\text{SMe}_2$ (3 g, 14,6 mmol) en éter anhidro (100 ml) bajo una atmósfera de argón a -78°C , se le añadió metil-litio (1,6 M en éter, 16,5 ml, 4,0 eq., 26,5 mmol) gota a gota y se dejó calentar la disolución hasta temperatura ambiente a lo largo de 1 h. Se volvió a enfriar la mezcla hasta -78°C , y se añadió gota a gota una disolución de (S)-2-(tritol-amino)-butiraldehído (2,2 g, 6,62 mmol) en éter (25 ml) con agitación. Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 2 h entonces se dejó calentar hasta temperatura ambiente a lo largo de 1 h. Se añadió una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (50 ml) y se separaron las dos fases. Se lavó la fase orgánica con salmuera (50 ml), se secó (MgSO_4) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice, se eluyó con hexano:acetato de etilo (80:20) proporcionando (2R,3S)-3-(tritol-amino)-pentan-2-ol como un aceite de color amarillo claro; Rendimiento: 1,5 g (66%). (75% de 2R,3S: 25% de 2S,3S). $^1\text{H-RMN}$ (d_6 -DMSO, 250 MHz): δ 0,47+0,55 (2 x t, J = 7,50 + 7,26 Hz - $\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$), 0,99-1,12 (m, 5 H, $-\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$), 2,01 (1 H, m, $-\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$), 3,22-3,43 (m, 1H, $-\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$), 4,41 [1 H, d, J = 3,3, $\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$], 7,14-7,56 (15 H, m, ArH). δ_{C} (250 MHz, CDCl_3) 146,88 (C), 128,97 (6 x CH), 127,83 (6 x CH), 126,43 (3 x CH), 71,03 (C), 68,13 (CH), 58,77 (CH), 23,09 (CH_2), 17,88 (CH_3), 10,47 (CH_3)

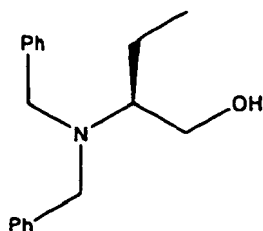
(2R,3S)-3-Amino-pentan-2-ol



A una disolución con agitación de (2R,3S)-3-(tritol-amino)-pentan-2-ol (1,64 g, 4,75 mmol) en diclorometano (20 ml) bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente, se le añadió ácido trifluoroacético (10 ml) gota a gota, y se agitó la disolución a esta temperatura durante 1 h. Se evaporó el disolvente a vacío y se precipitó el residuo en éter (15 ml) con hexano (150 ml) con agitación dando un aceite de color amarillo. Se decantó el disolvente del aceite, y se lavó el aceite con hexano (30 ml) y se secó a vacío proporcionando (2R,3S)-3-amino-pentan-2-ol como un aceite de color amarillo claro; Rendimiento: 0,30 g (98%). (75% de 2R,3S: 25% de 2S,3S). $^1\text{H-RMN}$ (d_6 -DMSO, 250 MHz): δ 0,913 + 0,923 (2 x t, 3 H, J = 7,50 + 7,50 Hz, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$), 1,11 + 1,18 (3 H, 2 x d, J = 6,48 + 6,48 Hz, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$), 1,41-1,65 (2 H, m, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$), 2,76 + 2,93 [2 x 1 H, m, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$], 3,61-3,69 + 3,80-3,90 [2 x 1 H, m, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$], 7,73 (2 H, s, a, NH_2).

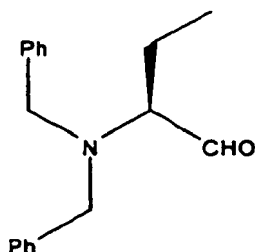
La ruta 2 protegió la amina mediante dibencilación

(S)-2-(Dibencilamino)butan-1-ol



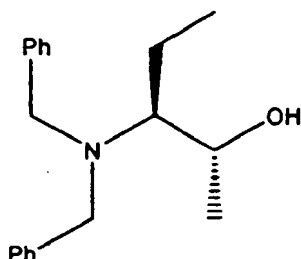
A una disolución con agitación de (S)-(+)-2-aminobutan-1-ol (5 g, 56,18 mmol) en acetonitrilo seco (100 ml) se le añadió carbonato de potasio en polvo seco (31 g, 224,72 mmol) seguido por bromuro de bencilo (19 g, 111,11 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 24 h. Se eliminó el disolvente a vacío y se llevó el residuo a acetato de etilo (100 ml) y agua (100 ml). Se lavó la fase orgánica de nuevo con agua, se secó (Na₂SO₄) y se concentró proporcionando el producto puro como un aceite ligeramente amarillo (14,5 g, 97,3%). δ_{H} (250 MHz, CDCl₃) 0,98 (3 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 1,38 - 1,2 (1 H, m, CHCHHCH₃), 1,94 - 1,78 (1 H, m, CHHCH₃), 2,83 - 2,71 (1 H, m, CHCHHCH₃), 3,22 (1 H, s, a, OH), 3,65 - 3,4 (2 H, m, CH₂OH), 3,47 (2 H, d, J 17,5, 2 x CHHPh), 3,94 (2 H, d, J 17,5, 2 x CHHPh), 7,46 - 7,26 (10 H, m, 2 x C₆H₅); δ_{C} (250 MHz, CDCl₃) 139,42 (2 x C), 129,1 (2 x CH), 128,52 (2 x CH), 127,25 (2 x CH), 61,97 (CH), 60,67 (CH₂), 53,23 (CH₂), 17,92 (CH₂), 11,83 (CH₃); m/z 270,2 (M+H)

(S)-2-(Dibencilamino)butanal



Se enfrió una disolución 2 M de cloruro de oxalilo en diclorometano (3,18 ml, 6,36 mmol) hasta -78 °C y se diluyó con diclorometano seco (20 ml) bajo nitrógeno seco. Se añadió gota a gota una disolución de dimetilsulfóxido (1 g, 12,72 mmol) en diclorometano anhidro a la disolución con agitación enfriada. Se agitó la reacción durante 1 h más tras completarse la adición. Se añadió una disolución de (S)-2-(dibencilamino)butan-1-ol (1,43 g, 5,3 mmol) en diclorometano a lo largo de 5 minutos. Tras 10 minutos, se añadió diisopropiletilamina (2,73 g, 21,2 mmol). Se dejó calentar la reacción hasta temperatura ambiente y se dejó agitar durante 1 h. Se enfrió hasta 0 °C y se añadió acetato de etilo/agua (50 ml:50 ml). Se lavó la fase orgánica con agua (50 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró. Se purificó el producto mediante cromatografía en columna de sílice ultrarrápida (acetato de etilo:hexano 1:4) proporcionando el producto puro (1,28 g, 90,5%). δ_{H} (250 MHz, CDCl₃) 0,88 (3 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 1,77 - 1,54 (2 H, m, CH₂CH₃), 2,99 (1 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 3,74 - 3,57 (4 H, m, 2 x CH₂Ph), 7,31 - 7,11 (10 H, m, 2 x C₆H₅) 9,64 (1 H, s, CHO); δ_{C} (250 MHz, CDCl₃) 203,9 (CO), 139,33 (2 x C), 128,99 (4 x CH), 128,45 (4 x CH), 127,3 (2 x CH), 68,46 (CH), 54,85 (CH₂), 17,44 (CH₂), 11,83 (CH₃); m/z 268,2 (M + H)

(2R,3S)-3-(Dibencilamino)pentan-2-ol



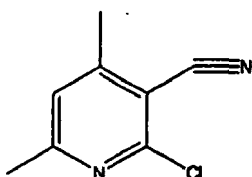
A una suspensión con agitación de CuBr.SMe₂ (1,54 g, 7,5 mmol) en éter anhidro bajo una atmósfera de argón a -78 °C, se le añadió metil-litio (1,6 M en éter, 9,4 ml, 15 mmol) gota a gota. Tras completarse la adición, se dejó calentar la reacción hasta temperatura ambiente. Se volvió a enfriar la reacción hasta -78 °C y se añadió gota a gota una disolución de (S)-2-(dibencilamino)butanal (1 g, 3,75 mmol) en éter (20 ml). Tras la adición, se continuó agitando durante 2 h. Entonces se extinguió la reacción con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (10 ml). Se extrajo la mezcla de reacción con éter (2x 30 ml) y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (20 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante

cromatografía en columna en gradiente ultrarrápida sobre gel de sílice, se eluyó con hexano:acetato de etilo (100:0 → 80:20) proporcionando el producto como un aceite de color amarillo claro (0,95 g, 89%) como el único isómero. δ_H (250 MHz, $CDCl_3$) 1,05 (3 H, t, J 7,5, $CHCH_2CH_3$), 1,25 [3 H, d, J 7,5, $CH(CH_3)OH$], 1,6 - 1,49 (1H, m, $CHHCH_3$), 1,88 - 1,73 (1 H, m, $CHHCH_3$), 2,41 (1 H, s, a, OH), 2,66 - 2,59 (1 H, m, $CHCH_2CH_3$), 3,85 - 3,65 (4 H, m, 2 x CH_2Ph), 4,05 - 3,9 (1 H, m, $CHOH$), 7,41 - 7,25 (10 H, m, ArH) δ_C (250 MHz, $CDCl_3$) 140,05 (2 x C), 128,98 (4 x CH), 128,37 (4 x CH), 127,3 (2 x CH), 66,81 (CH), 63,65 (CH), 55,41 (CH_2), 20,63 (CH_3) 18,44 (CH_2), 12,5 (CH_3)

En los siguientes ejemplos, los marcados con un asterisco (*) se incluyen solo como referencia.

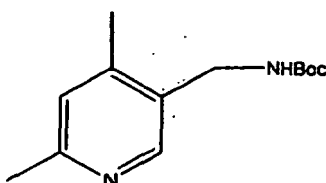
Ejemplo 1

10 2-Cloro-4,6-dimetilnicotinonitrilo



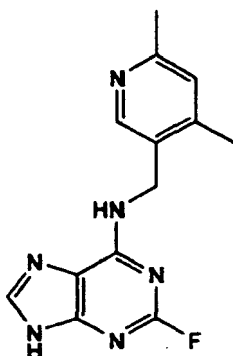
Se añadió 4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-carbonitrilo (5 g, 34 mmol) a oxocloruro de fósforo (20 ml). Se agitó la reacción a reflujo durante 2 h, tras lo cual se observó que se había completado. Se eliminaron los compuestos volátiles y se trituró el residuo con éter de petróleo. Se retiró mediante filtración el sólido resultante y se lavó con hexano, y se secó dando un sólido de color blanco puro (5,1 g, 90%). δ_H (250 MHz, $CDCl_3$) 2,55 (3 H, s, CH_3), 2,57 (3 H, s, CH_3), 7,09 (1 H, s, ArH); δ_C (250 MHz, $CDCl_3$) 162,64 (C), 154,39 (C), 152,26 (C), 123,22 (CH), 114,28 (C), 108,31 (C), 24,5 (CH_3), 20,54 (CH_3); m/z 189 (M + Na)

Éster *t*-butílico del ácido 4,6-dimetilpiridin-3-ilmetilcarbámico



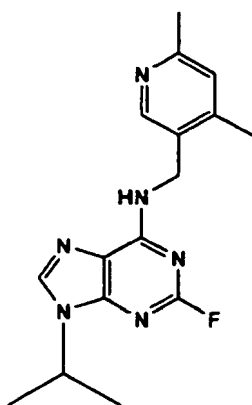
20 Se disolvió 2-cloro-4,6-dimetil-nicotinonitrilo (5 g, 30,1 mmol) en ácido acético al 10%/etanol (30 ml). Se añadió catalizador de paladio al 10% sobre carbón (0,5 g) y se agitó la reacción bajo una atmósfera de hidrógeno durante 24 h a 60°C. Se filtró la mezcla a través de un lecho de Celite. Se eliminaron los compuestos volátiles y se disolvió el producto en bruto en diclorometano (30 ml). A la disolución con agitación se le añadió entonces trietilamina (5 ml) seguido por dicarbonato de di-terc-butilo (6,5 g, 30 mmol). Tras 3 h, se eliminó el disolvente y se disolvió el residuo en acetato de etilo. Se lavó con agua (50 ml), bicarbonato saturado (50 ml), se secó y se evaporó. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano 1:2) proporcionando 1,4 g del compuesto del título puro (rendimiento del 20%). δ_H (250 MHz, $CDCl_3$) 1,43 (9 H, s, 3 x CH_3) 2,19 (3 H, s, CH_3), 2,38 (3 H, s, CH_3), 4,19 (2 H, s, a, $ArCH_2NH$), 6,84 (1 H, s, ArH), 8,15 (1 H, s, ArH); δ_C (250 MHz, $CDCl_3$) 157,41 (CO), 155,63 (C), 148,93 (CH), 145,91 (C), 129,51 (C), 124,76 (CH), 79,44 (C), 46,12 (CH_2), 28,32 (3 x CH_3), 23,74 (CH_3), 18,97 (CH_3); m/z 237,2 (M + H)

(4,6-Dimetilpiridin-3-ilmetil)-(2-fluoro-9H-purin-6-il)-amina



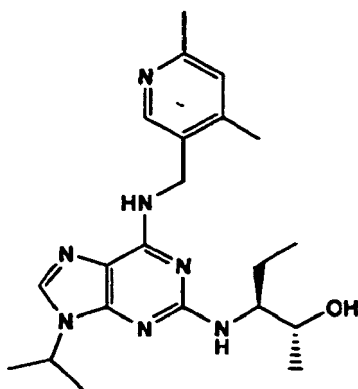
A una disolución con agitación de 6-cloro-2-fluoropurina (0,83 g, 4,9 mmol) en n-BuOH (50 ml) bajo una atmósfera de argón a 0°C, se le añadió DIEA (2,5 ml, 14,7 mmol) seguido por (4,6-dimetilpiridin-3-il)metanamina (1 g, 7,35 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 1 h y entonces se dejó que volviera a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h, todavía se observó que no se había completado, por tanto se calentó la reacción hasta 100°C y se dejó a esa temperatura durante 2 h. Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →90:10), proporcionando el producto como un sólido de color blanco; Rendimiento: 0,86 g (65%); δ_H (250 MHz, CDCl₃) 2,35 (3 H, s, CH₃), 2,39 (3 H, s, CH₃), 4,61 (2 H, s, a, NHCH₂), 7,07 (1 H, s, ArH), 8,13 (1 H, s, ArH), 8,33 (1 H, s, ArH), 8,69 (1 H, s, a, NH); δ_C (250 MHz, CDCl₃) 161,2 (C), 158,57 (C), 156,08 (C), 150 (C), 148,08 (CH), 148,14 (CH), 147,9 (CH), 145,93 (C), 129,92 (C), 129,76 (C), 124,37 (CH), 41,7 (CH₂), 23,17 (CH₃), 18,14 (CH₃); m/z 273,2 (M + H)

(4,6-Dimetilpiridin-3-ilmetil)-(2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-il)-amina



A una disolución con agitación de (4,6-dimetilpiridin-3-ilmetil)-(2-fluoro-9H-purin-6-il)-amina (0,6 g, 1,9 mmol) en DMF (10 ml) bajo una atmósfera de argón, a TA, se le añadió K₂CO₃ (en polvo, anhidro, 1,77 g, 5 eq., 13 mmol) seguido por 2-bromopropano (1,8 ml, 10 eq., 19 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a TA durante 24 h, cuando la CCF (CHCl₃:MeOH; 90:10) indicó que se había completado la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se repartió el residuo entre agua (50 ml) y acetato de etilo (50 ml), se separó la fase acuosa y se extrajo con más EtOAc (2 x 50 ml). Se lavó la fase orgánica a granel con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío, y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →95:5), proporcionando el producto como una película de color amarillo (0,4 g, 59%). δ_H (250 MHz, CDCl₃) 1,52 [6 H, d, J 7,5 CH(CH₃)₂] 2,27 (3 H, s, CH₃), 2,45 (3 H, s, CH₃), 4,73 - 4,62 (3 H, m, NHCH₂ y CH[CH₃]₂), 6,91 (1 H, s, ArH), 7,12 (1 H, NH), 7,47 (1 H, s, ArH), 8,32 (1 H, s, ArH); δ_C (250 MHz, CDCl₃) 160,77 (C), 157,89 (C), 157,43 (C), 156,12 (C), 155,79 (C), 149,14 (CH), 137,7 (CH), 128,7 (C), 129,76 (C), 124,83 (CH), 47,2 (CH), 40,14 (CH₂), 23,9 (CH₃), 22,47 (2 x CH₃), 18,54 (CH₃); m/z 315,3 (M + H)

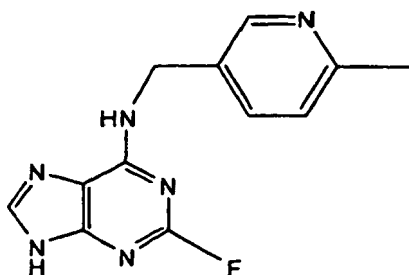
(2R,3S-3-(6-((4,6-Dimetilpiridin-3-ilmetilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol [1]



A una disolución con agitación de (4,6-dimetilpiridin-3-ilmetil)-(2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-il)-amina (300 mg, 0,84 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (1,7 ml, 10 eq., 8,4 mmol) seguido por (2R,3S)-3-amino-pentan-2-ol (0,5 g, 4,8 mmol). Se equipó el matraz con un condensador y se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre acetato de etilo (50 ml) y agua

(50 ml), se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 25 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente ultrarrápida, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →95:5), proporcionando 55 mg del compuesto del título puro (12%). δ_H (250 MHz, CDCl₃) 0,95 (3 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 1,06 (3 H, d, J 7,5, CHCH₃OH) 1,48 [6 H, d, J 7,5 CH(CH₃)₂], 2,24 (3 H, s, CH₃), 2,4 (3 H, s, CH₃), 3,92 - 3,82 (2 H, m, NHCH₂), 4,67 - 4,45 (3 H, m, CH₂CHMeOH), 6,15 (1 H, s, a, NH), 6,87 (1 H, s, ArH), 7,37 (1 H, ArH), 8,31 (1 H, s, ArH); δ_C (250 MHz, CDCl₃) 160,11 (C), 157,68 (C), 154,57 (C), 149,42 (CH), 146,38 (C), 134,54 (CH), 129,24 (C), 124,84 (CH), 71,52 (CH), 59,65(CH), 46,47 (CH), 40,33 (CH₂), 24,94 (CH₂), 23,89 (CH₃), 23,52 (2 x CH₃), 17,37 (CH₃), 12,57 (CH₃); m/z 398,3 (M + H)

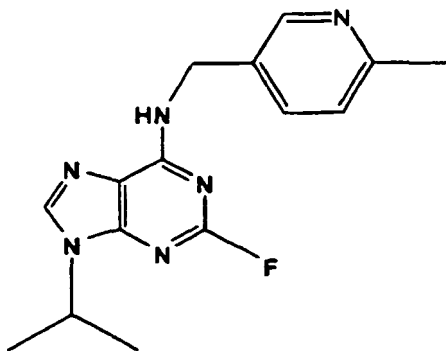
10

Ejemplo 2*2-Fluoro-N-((6-metilpiridin-3-il)metil)-9H-purin-6-amina*

15

A una disolución con agitación de 6-cloro-2-fluoropurina (0,4 g, 2,3 mmol) en n-BuOH (50 ml) bajo una atmósfera de argón a 0°C, se le añadió DIEA (2,5 ml, 14,7 mmol) seguido por (6-metilpiridin-3-il)metanamina (0,36 g, 2,95 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 1 h y entonces se dejó que volviera a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h, todavía se observó que no se había completado, por tanto se calentó la reacción hasta 100°C y se dejó a esta temperatura durante 8 h. Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →90:10), proporcionando el producto como un sólido de color blanco; Rendimiento: 0,38 g (65%) δ_H CDCl₃, 250 MHz) 2,44 (3 H, s, CH₃), 3,66 - 3,57 (2 H, m, NHCH₂), 4,63 (1 H, s, a, NH), 7,25 (1H, d, J 7,5, ArH), 7,71 (1 H, dd, J 2,5, 7,5, ArH), 8,14 (1H, s, ArH), 8,49 (1 H, s, ArH), 9,07 (1 H, s, a, NH); δ_C (CDCl₃, 250 MHz) 159,12 (C), 158,62 (C), 157,61 (C), 155,56 (C), 147,44 (CH), 146,99 (CH), 136,32 (C), 123,05 (2 x CH), 119,42 (C), 41,64 (CH₂), 18,47 (CH₃); m/z 259,2 (M + H)

20

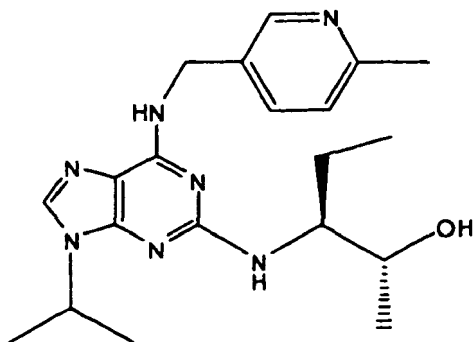
2-Fluoro-9-isopropil-N-((6-metilpiridin-3-il)metil)-9H-purin-6-amina

25

A una disolución con agitación de 2-fluoro-N-((6-metilpiridin-3-il)metil)-9H-purin-6-amina (0,3 g, 1,17 mmol) en dimetilformamida (10 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón, se le añadió K₂CO₃ anhidro, en polvo (0,8 g, 5 eq., 5,85 mmol), seguido por 2-bromopropano (1,15 ml, 11,7 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h, cuando DCM:éter:MeOH (55:40:5), indicó que se había completado la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se repartió el residuo entre EtOAc (100 ml) y agua (100 ml). Se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 50 ml) y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice, se eluyó con CHCl₃:MeOH (98:2) proporcionando el compuesto del título como una película de color ligeramente amarillo (195 mg, 55%). δ_H (CDCl₃, 250 MHz) 1,52 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 2,5 (3 H, s, CH₃), 4,76 - 4,6 (3 H, m, NHCH₂ y CHMe₂), 7,06 (1 H, d, J 2,5, ArH), 7,35 (1 H, s, a, NH), 7,56 (2 H, s, a, ArH), 8,47 (1H, s, a, ArH); δ_C (CDCl₃, 250 MHz) 157,6 (C), 156,32 (C), 156 (C), 148,47 (CH), 137,72 (CH), 136,08 (CH), 130,83 (C), 123,11 (CH), 118,2 (C), 47,38 (CH), 43,2 (CH₂), 23,99 (CH₃), 22,5 (2 x CH₃); m/z 301,2 (M + H)

30

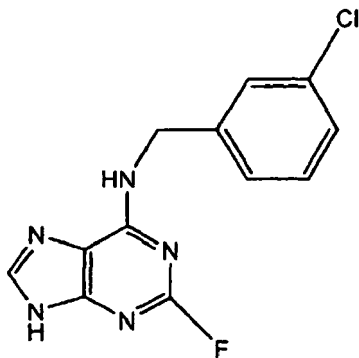
35

2R,3S-3-(9-Isopropil-6-((6-metilpiridin-3-il)metilamino)-9H purin-2-ilamino)pentan-2-ol [2]

5 A una disolución con agitación de 2-fluoro-9-isopropil-N-(6-metilpiridin-3-ilmetil)-9-H-purin-6-
 amina (180 mg, 0,59 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de
 argón se le añadió DIEA (1 ml, 10 eq., 5,6 mmol) seguido por (2R,3S)-3-amino-pentan-2-ol (0,34 g, 6 mmol).
 Se equipó el matraz con un condensador y se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalenta-
 do a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta tempera-
 10 tura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml),
 se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 25 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50
 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ul-
 trarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →95:5), proporcionando el com-
 puesto del título como un aceite de color ligeramente amarillo (40 mg, 19%). δ_H (CDCl₃, 250 MHz) 0,95 (3 H,
 t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 1,14 (3 H, d, J 5, CHCH₃OH), 1,54 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 1,62 - 1,43 (2 H, m,
 CHCH₂CH₃), 2,44 (3 H, s, ArCH₃), 3,93 (1 H, m, CHMe₂), 4,77 - 4,58 (1H, m, CHCH₃OH), 4,8 - 4,6 (2 H, m,
 15 NHCH₂Ar), 5,8 (1 H, s, a, NH), 6,82 (1 H, s, a, NH), 7,09 (1 H, d, J 10, ArH), 7,31 - 7,23 (2 H, m, ArH), 8,49 (1
 H, s, a, ArH); δ_C (CDCl₃, 250 MHz) 157,71 (C), 156,28 (C), 155,95 (C), 148,58 (CH), 137,73 (CH), 129,01 (C),
 128,52 (C), 128,42 (CH), 1231,14 (CH), 68,84 (CH), 50,45 (CH₂), 47,25 (CH), 23,27 (CH₃), 22,53 (2 x CH₃),
 20,9 (CH₂), 19,46 (CH₃), 10,45 (CH₃); m/z 384,3 (M + H)

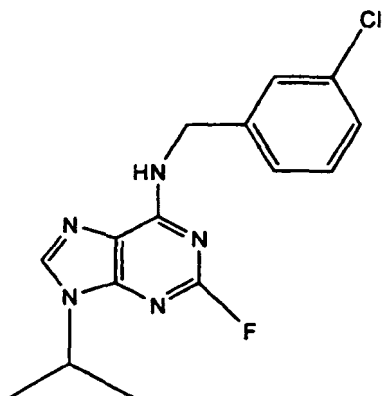
Ejemplo 3*

20 *(3-Clorobencil)-(2-fluoro-9H-purin-6-il)amina*



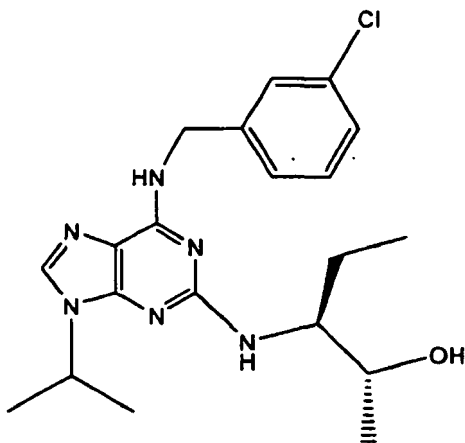
25 A una disolución con agitación de 6-cloro-2-fluoropurina (1 g, 1 eq., 5,9 mmol) en n-BuOH (50
 ml) bajo una atmósfera de argón, se le añadió DIEA (2,6 ml, 2,5 eq., 14,75 mmol) seguido por 3-cloro-
 bencilamina (1,25 g, 1,5 eq., 8,85 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a 100°C durante 3 horas tras lo
 cual se completó la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía
 en columna sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con DCM:éter:MeOH (55:45:0 →55:43:2), propor-
 cionando el compuesto del título como un sólido de color blanco; Rendimiento: 1,15 g (70%). δ_H (250 MHz, d₆-
 DMSO) 4,78 - 4,6 (2 H, m, NHCH₂Ar), 7,41 - 7,28 (4 H, m, ArH), 7,57 (1 H, s, a, ArH), 8,15 (1 H, s, a, NH),
 8,88 (1 H, s, a, NH); δ_C (250 MHz, d₆-DMSO) 142,3 (C), 133,02 (C), 132,92 (C), 130,25 (CH), 130,17 (C),
 30 127,82 (CH), 127,27 (CH), 127,03 (CH), 126,76 (C), 125,92 (CH), 116,4 (C), 115 (C), 42,67 (CH₂); m/z 278 (M
 + H)

(3-Clorobencil)-(2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-il)amina



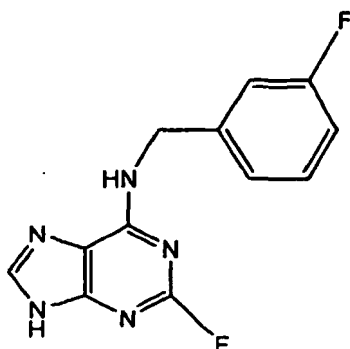
A una disolución con agitación de (3-cloro-bencil)-(2-fluoro-9H-purin-6-il)-amina (0,6 g, 2,16 mmol) en dimetilformamida (10 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón, se le añadió carbonato de potasio en polvo, anhidro (1,47 g, 5 eq., 10,8 mmol), seguido por 2-bromopropano (2,2 ml, 10 eq., 21,6 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h, cuando DCM:éter:MeOH (55:40:5), indicó que se había completado la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se repartió el residuo entre acetato de etilo (50 ml) y agua (50 ml). Se extrajo la fase acuosa con más acetato de etilo (2 x 50 ml) y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice, se eluyó con CHCl₃ proporcionando el compuesto del título como una goma de color ligeramente amarillo; Rendimiento: 0,45 g (65%). δ_H (250 MHz, CDCl₃) 1,57 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 4,81 - 4,63 (3 H, m, NHCH₂Ar y CHMe₂), 5,98 (1 H, s, a, NH), 7,29 - 7,19 (3 H, m, ArH), 7,34 (1 H, s, a, ArH), 7,42 (1H, d, J 7,5, ArH), 7,51 (1H, s, a, NH); δ_C (250 MHz, CDCl₃) 161,93 (C), 156,37 (C), 156,05 (C), 141,33 (C), 140,42 (C), 137,75 (CH), 134,49 (C), 129,92 (CH), 127,69 (CH), 125,81 (CH), 125,64 (CH), 47,43 (CH), 43,82 (CH₂), 22,56 (2 x CH₃); m/z 320,3 (M + H)

2R,3S-3-(6-(3-Chlorobencilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol [3]

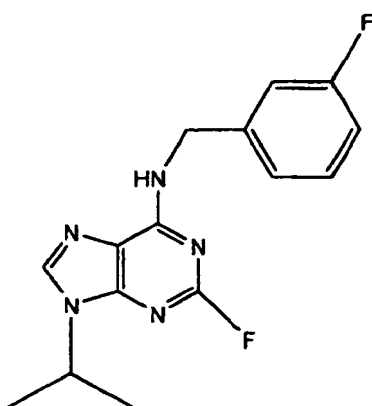


A una disolución con agitación de (3-cloro-bencil)-(2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-il)-amina (0,3 g, 0,93 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (0,6 ml, 10 eq., 10 mmol) seguido por (2R,3S)-3-amino-pentan-2-ol (0,5 g, 4,8 mmol). Se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h, cuando la CCF de cloroformo:metanol (95:5) indicó que se había completado la reacción. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre diclorometano (100 ml) y agua (100 ml), se extrajo la fase acuosa con más diclorometano (3 x 50 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con DCM:éter:MeOH (60:40:0 → 60:40:2) proporcionando el producto del título como una película incolora; Rendimiento: 90 mg (22,5%). δ_H (250 MHz, CDCl₃) 0,97 (3 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 1,08 (3 H, d, J 7,5, CHCH₃OH), 1,45 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 1,6 - 1,35 (2 H, m, CHCH₂CH₃), 3,93 - 3,8 (2 H, m, CH₂ y NH), 4,55 - 4,45 [1 H, m, CH(CH₃)OH], 4,74 - 4,64 (3 H, m, NHCH₂Ar y CHMe₂), 5,5 (1 H, s, a, OH), 6,53 (1 H, s, a, NH), 7,19 - 7,13 (3 H, m, ArH), 7,22 (1 H, s, ArH), 7,32 (1 H, s, ArH); δ_C (250 MHz, CDCl₃) 175,06 (C), 160,17 (C), 154,75 (C), 141,22 (C), 134,57 (CH), 134,29 (C), 129,73 (CH), 127,75 (CH), 127,30 (CH), 125,7 (CH), 114,56 (C), 71,53 (CH), 59,58 (CH), 46,44 (CH), 43,78 (CH₂), 23,96 (2xCH₃), 18,65 (CH₃), 18,32 (CH₃), 12,56 (CH₃); m/z 403,2 (M + H)

Ejemplo 4*

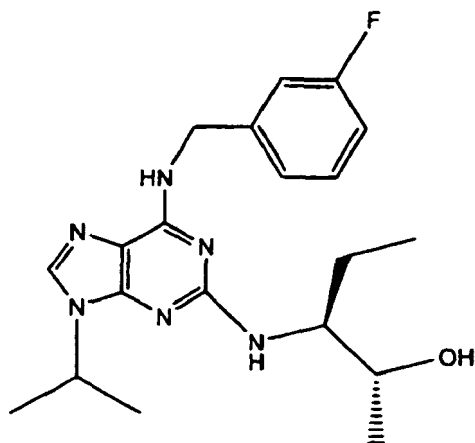
3-Fluorobencil-2-fluoro-9H-purin-6-il)amina

5 A una disolución con agitación de 6-cloro-2-fluoropurina (1 g, 5,9 mmol) en n-BuOH (30 ml) bajo una atmósfera de argón, se le añadió DIEA (2,6 ml, 2,5 eq., 14,75 mmol) seguido por 3-fluoro-bencilamina (1,1 g, 1,5 eq., 8,85 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a 100°C durante 3 horas tras lo cual se completó la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con DCM:éter:MeOH (55:45:0 →55:43:2), proporcionando el compuesto del título como un sólido de color blanco; Rendimiento: 1,1 g (71,7%). δ_H (250 MHz, d_6 -DMSO) 4,79 - 4,66 (2 H, s, a, $NHCH_2Ar$), 7,41 - 7,28 (4 H, m, ArH), 7,57 (1 H, s, a, ArH), 8,15 (1H, s, a, NH), 8,87 (1 H, s, a, NH); δ_C (250 MHz, d_6 -DMSO) 142,5 (C), 133,02 (C), 132,92 (C), 130,24 (CH), 130,17 (C), 128,41 (CH), 127,75 (C), 127,04 (CH), 126,76 (CH), 125,92 (CH), 116,2 (C), 115(C), 42,68 (CH_2); m/z 262,1 (M+H)

3-Fluorobencil-(2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-il)amina

15 A una disolución con agitación de (3-fluoro-bencil)-(2-fluoro-9H-purin-6-il)-amina (0,6 g, 2,24 mmol) en dimetilformamida (10 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón, se le añadió carbonato de potasio en polvo, anhidro (1,52 g, 5 eq., 11,2 mmol), seguido por 2-bromopropano (2,3 ml, 10 eq., 22,4 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h, cuando DCM:éter:MeOH (55:40:5), indicó que se había completado la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se repartió el residuo entre acetato de etilo (100 ml) y agua (100 ml). Se extrajo la fase acuosa con más acetato de etilo (2 x 50 ml) y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice, se eluyó con cloroformo proporcionando el compuesto del título como una goma de color ligeramente amarillo; Rendimiento: 0,37 g (54%). δ_H (250 MHz, $CDCl_3$) 1,55 (6 H, d, J 7,5, $CH[CH_3]_2$), 4,85 - 4,65 (3 H, m, $NHCH_2Ar$ y C_HMe_2), 5,96 (1 H, s, a, NH), 7,31 - 6,94 (4 H, m, ArH), 7,59 (1 H, s, a, ArH); δ_C (250 MHz, $CDCl_3$) 164,93 (C), 161,01 (C), 156,04 (C), 139,77 (C), 137,76 (CH), 130,13 (CH), 129,92 (C), 123,19 (CH), 114,59 (CH), 114,26 (CH), 47,22 (CH), 43,93 (CH_2), 22,56 (2 x CH_3); m/z 304,2 (M + H)

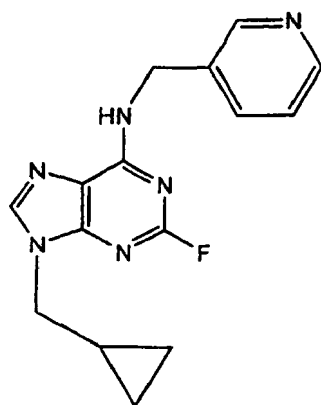
2R,3S-3-[6-(3-Fluorobencilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino]-pentan-2-ol [4]



5 A una disolución con agitación de (3-fluoro-bencil)-(2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-il)-amina (0,3 g, 0,99 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (0,6 ml, 10 eq., 10 mmol) seguido por (2R,3S)-3-amino-pentan-2-ol (0,5 g, 4,8 mmol). Se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h, cuando la CCF de cloroformo:metanol (95:5) indicó que se había completado la reacción. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre diclorometano (100 ml) y agua (200 ml), se extrajo la fase acuosa con más diclorometano (3 x 50 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con DCM:éter:MeOH (60:40:0 →60:40:2) proporcionando el producto del título como una película incolora; Rendimiento: 80 mg (20%). δ_H (250 MHz, CDCl₃) 1,05 (3 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 1,15 (3 H, d, J 7,5, CHCH₃OH), 1,55 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 1,65 - 1,4 (2 H, m, CHCH₂CH₃), 4 - 3,91 (2 H, m, CH₂Et y CHMe₂), 4,66 - 4,55 (1 H, m, CHMeOH), 4,8 (2 H, d, J 5, NHCH₂Ar), 6,41 (1 H, s, a, NH), 7,33 - 6,92 (4 H, m, ArH), 7,46 (1 H, s, a, ArH); δ_C (250 MHz, CDCl₃) 165,2 (C), 164,92 (C), 160,18 (C), 154,77 (C), 141,67 (C), 141,56 (C), 134,59 (CH), 130,08 (CH), 123,14 (CH), 114,71 (CH), 113,95 (CH), 71,61 (CH), 59,65 (CH), 46,48 (CH), 43,94 (CH₂), 25,02 (CH₂), 22,52 (2 x CH₃), 17,24 (CH₃), 10,59 (CH₃); m/z 387,3 (M + H)

Ejemplo 5

(9-Ciclopropilmetil-2-fluoro-9H-purin-6-il)-piridin-3-ilmetil-amina



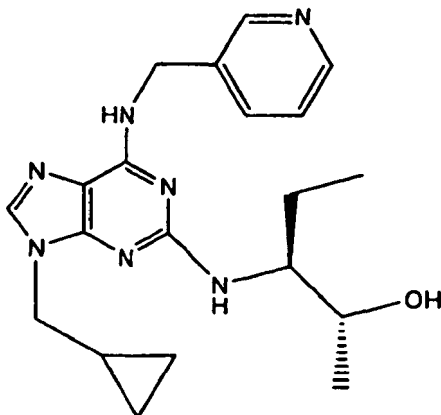
20

25 A una disolución con agitación de 2-fluoro-6-[(piridin-3-ilmetil)-amino]purina (1 g, 4,10 mmol) en DMF (12 ml) bajo una atmósfera de argón, a TA, se le añadió K₂CO₃ (en polvo, anhidro, 2,84 g, 5 eq., 20,52 mmol) seguido por (bromometil)ciclopropano (5,53 g, 10 eq., 41 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a TA durante 24 h, cuando la CCF (CHCl₃:MeOH; 90:10) indicó que se había completado la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se repartió el residuo entre agua (50 ml) y EtOAc (50 ml); se separó la fase acuosa y se extrajo con más EtOAc (2 x 50 ml). Se lavó la fase orgánica a granel con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío, y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →95:5), proporcionando el producto como una goma incolora; Rendimiento: 0,8 g (68%) δ_H (250 MHz, CDCl₃) 0,24 - 0,15 (2 H, m, CHH y CHH de Cp), 0,48 - 0,38 (2 H, m, CHH y CHH de Cp), 1,11 - 0,95 (1 H, m, CH de Cp), 2,56 (1H, s, a, NH), 3,69 (2 H, d, J 7,5, NCH₂Cp), 4,58 (2 H, s, a, NHCH₂Ar), 7,04 - 6,96 (1 H, m, ArH), 7,51 - 7,45 (2 H, m, ArH), 8,26 - 8,24 (1 H, m, ArH), 8,37 (1 H, s, a, ArH); δ_C (250 MHz, CDCl₃) 156,32 (C), 156,01 (C), 149,29 (CH), 148,97 (CH), 139,85

30

(CH), 139,8 (C), 135,54 (CH), 133,81 (C), 123,51 (CH), 117,86 (C), 48,52 (CH₂), 42,09 (CH₂), 11,06 (CH₃), 5,28 (2 x CH₂); m/z 299,2 (M + H)

2*R*,3*S*-3-(9-(Ciclopropilmetil)-6-(piridin-3-ilmetilamino)-9*H*-purin-2-ilamino)pentan-2-ol [5]

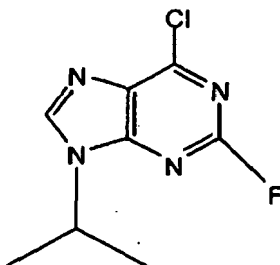


5 A una disolución con agitación de (9-ciclopropilmetil-2-fluoro-9*H*-purin-6-il)-piridin-3-ilmetil-amina (300 mg, 1 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (1,9 ml, 10 eq., 10,5 mmol) seguido por (2*R*,3*S*)-3-amino-pentan-2-ol (500 mg, 4,8 eq., 4,8 mmol). Se equipó el matraz con un condensador y se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre acetato de etilo (50 ml) y agua (50 ml), se extrajo la fase acuosa con más acetato de etilo (2 x 25 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente ultrarrápida, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →95:5), proporcionando el producto como una película incolora. Rendimiento: (85 mg, 22%). δ_H (250 MHz, CDCl₃) 0,45 - 0,35 (2 H, m, CHH y CHH de Cp), 0,7 - 0,6 (2 H, m, CHH y CHH de Cp), 1,02 (3 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 1,16 (3 H, d, J 7,5, CHCH₃OH), 1,35 - 1,2 (1 H, m, CHCHHCH₃), 1,68 - 1,38 (2 H, m, CHCHHCH₃ y CH de Cp), 3,9 - 3,8 (2 H, m, CHOH y CH₂Et), 4,05 (2 H, d, J 7,5, NCH₂Cp), 4,76 (2 H, s, a, NHCH₂Ar), 4,87 (1 H, d, J 5, OH), 5,77 (1H, s, a, NH), 6,67 (1 H, s, a, NH), 7,22 - 7,17 (1H, m, ArH), 7,53 (1H, s, ArH), 7,65 (1H, dd, J 2,5, 7,5, ArH), 8,5 (1H, d, J 5, ArH), 8,61 (1H, s, ArH) 1,11 - 0,95 (1 H, m, CH de Cp), 2,56 (1H, s, a, NH), 3,69 (2 H, d, J 7,5, NCH₂Cp), 4,58 (2 H, s, a, NHCH₂Ar), 7,04 - 6,96 (1 H, m, ArH), 7,51 - 7,45 (2 H, m, ArH), 8,26 - 8,24 (1 H, m, ArH), 8,37 (1 H, s, a, ArH); δ_C (250 MHz, CDCl₃) 160,3 (C), 154,71 (C), 151,05 (C), 151,05 (C), 149,28 (CH), 148,64 (CH), 136,85 (CH), 135,30 (CH), 134,56 (C), 129,2 (C), 123,37 (CH), 122,1 (C), 114,21 (C), 77,27 (CH), 59,5 (CH), 48,02 (CH₂), 41,99 (CH₂), 24,84 (CH₂), 17,4 (CH₃), 11,53 (CH₃), 4,2 (CH₂); m/z 382,3 (M + H)

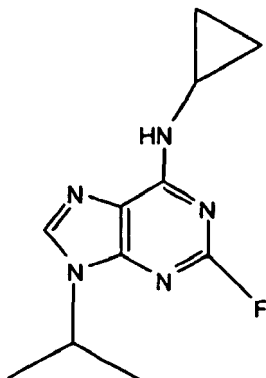
25

Ejemplo 6*

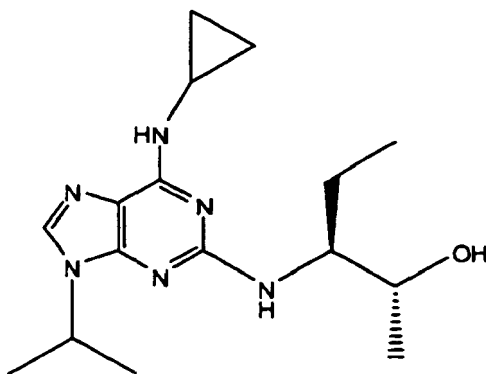
6-Cloro-2-fluoro-9-isopropil-9*H*-purina



30 Se agitaron vigorosamente una mezcla de 2-fluoro,6-cloro-purina (2 g, 11,7 mmol), y carbonato de potasio en polvo (4 g, 28 mmol) en 30 ml de DMF. Se añadió muy lentamente yoduro de isopropilo (6 ml, 60 mmol) a lo largo de 2 h. Se agitó la reacción durante 5 h más. Se eliminó DMF y se llevó el producto en bruto a acetato de etilo, se lavó con agua (50 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (el 30% de acetato de etilo en hexano) proporcionando el producto puro como un sólido de color blanco (1,1 g, 44%). δ_H (CD₃OD, 250 MHz) 1,65 [6 H, d, J 7,5, CH(CH₃)₂], 4,92 [1H, m, CH(CH₃)₂], 8,66 (1 H, s, ArH); δ_C (CD₃OD, 250 MHz) 154,7 (C), 153,88 (C), 152,2 (C), 147,65 (CH), 132,44 (C), 50,66 (CH), 22,72 (2 x CH₃); m/z 215,2 (M + H)

N-Ciclopropil-2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-amina

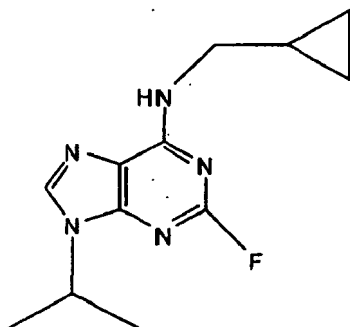
Se agitaron juntos 6-cloro-2-fluoro-9-isopropil-9H-purina (0,3 g, 1,4 mmol), diisopropiletilamina (0,2 g, 1,55 mmol) y ciclopropilamina (0,2 g, 2,66 mmol) en etanol (30 ml) a temperatura ambiente durante 6 h. Se eliminaron los compuestos volátiles y se llevó el residuo a acetato de etilo, se lavó con agua (50 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (acetato de etilo :hexano 3:2) dando el producto puro (232 mg, 70,5%) δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 0,63 - 0,55 (2 H, m, CHHCHH de Cp), 0,85 - 0,78 (2 H, m, CHHCHH de Cp), 1,54 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 2,97 (1 H, s, a, CH de Cp), 4,73 - 4,62 (1 H, m, CHMe₂), 6,72 (1 H, s, a, NH) 7,7 (1H, s, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 159,29 (C), 157,63 (C), 156,8 (C), 156,64 (C), 137,69 (CH), 47,35 (CH), 22,6 (2 x CH₃), 21,06 (CH), 7,28 (2 x CH₂); m/z 236,2 (M + H)

2R,3S-3-(6-Ciclopropilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol [6]

A una disolución con agitación de N-ciclopropil-2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-amina (232 mg, 0,99 mmol) en N-metilpirrolidiona (10 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (0,2 ml, 10,96 eq., 1,14 mmol) seguido por (2R,3S)-3-aminopentan-2-ol (540 mg, 5 eq., 5,25 mmol). Se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 24 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se añadió agua en exceso, con lo cual se retiró el aceite del producto. Se añadió acetato de etilo y se lavó la fase orgánica cuidadosamente con agua (3 x 50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice, se eluyó con acetato de etilo proporcionando el producto del título como un sólido de color marrón pálido (46 mg, 15%). δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 0,58 - 0,49 (2 H, m, CHHCHH de Cp), 0,83 - 0,81 (2H, m, CHHCHH de Cp), 1,03 (3 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 1,13 (3 H, d, J 7,5, CHCH₃OH), 1,55 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 1,57 - 1,45 (2 H, m, CHCH₂CH₃), 2,91 (1H, s, b, CH de Cp), 3,95 (2 H, s, a, CHMe₂ y CH₂OH), 4,6 - 4,57 (1 H, m, CHMeOH), 4,84 (1H, s, a, NH), 6,25 (1 H, s, a, NH), 7,49 (1 H, s, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 160,16 (C), 155,91 (C), 150,24 (C), 134,57 (CH), 114,63 (C), 71,57 (CH), 59,88 (CH), 46,27 (CH), 25,15 (CH₂), 22,59 (CH₃), 17,22 (CH₃), 11,61 (CH₃), 7,34 (CH₂). 47,35 (CH), 22,6 (2 x CH₃), 21,06 (CH), 7,28 (2 x CH₂); m/z 319,3 (M + H)

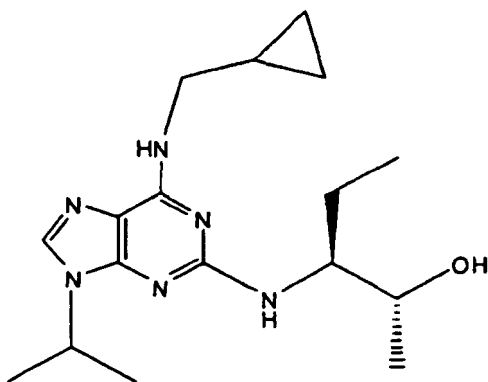
Ejemplo 7*

N-(Ciclopropilmetil)-2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-amina



Se agitaron juntos 6-cloro-2-fluoro-9-isopropil-9H-purina (0,3 g, 1,4 mmol), diisopropiletilamina (0,2 g, 1,55 mmol) y ciclopropilmetilamina (0,24 g, 2,7 mmol) en etanol (30 ml) a temperatura ambiente durante 6 h. Se eliminaron los compuestos volátiles y se llevó el residuo a acetato de etilo, se lavó con agua (50 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano 3:2) dando el producto puro (290 mg, 83%) como una goma incolora. δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 0,29 - 0,27 (2 H, m, CHHCHH de Cp), 0,56 - 0,54 (2 H, m, CHHCHH de Cp), 1,13 (1 H, s, a, CH de Cp), 1,58 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 3,44 (2 H, s, a, NHCH₂Cp) 2,97 (1H, s, a, CH de Cp), 4,74 - 4,72 (1H, m, CHMe₂), 6,22 (1 H, s, a, NH), 7,76 (1 H, s, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 160,09 (C), 156,14 (C), 147,4 (C), 137,38 (CH), 118,26 (C), 47,14 (CH), 45,78 (CH₂), 22,46 (2 x CH₃), 10,06 (CH), 3,5 (2 x CH₂)

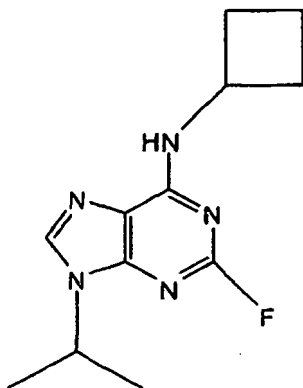
2R,3S-3-(6-(Ciclopropilmetilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol [7]



A una disolución con agitación de N-(ciclopropilmetil)-2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-amina (290 mg, 1,1 mmol) en N-metilpirrolidinona (10 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (1,42 g, 11,1 mmol) seguido por (*2R,3S*)-3-aminopentan-2-ol (566 mg, 5 eq., 5,5 mmol). Se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 24 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se añadió agua en exceso con lo cual se retiró el aceite del producto. Se añadió acetato de etilo y se lavó la fase orgánica cuidadosamente con agua (4 x 50 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice, se eluyó con acetato de etilo proporcionando el producto del título como un sólido de color marrón pálido (120 mg, 31%); δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 0,22 - 0,19 (2 H, m, CHHCHH de Cp), 0,36 - 0,34 (2 H, m, CHHCHH de Cp), 0,8 (3 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 0,89 (3 H, d, J 7,5, CHCH₃OH) 1,13 (1 H, s, a, CH de Cp), 1,33 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 3,24 (2 H, s, a, NHCH₂Cp), 3,7 (2 H, s, a, CH₂Et y CHMe₂), 6,52 (1 H, s, a, NH), 7,26 (1 H, s, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 160,2 (C), 154,89 (C), 134,35 (CH), 71,72 (CH), 59,76 (CH), 46,238 (CH), 25,23 (CH₂), 22,59 (CH₃), 17,15 (CH₃), 11,61 (CH₃), 3,48 (2 x CH₂); m/z 333,3 (M + H)

Ejemplo 8*

N-Ciclobutil-2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-amina

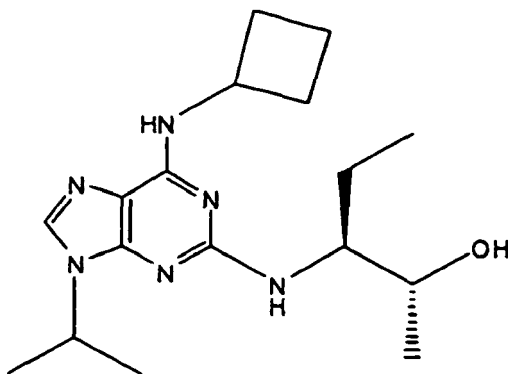


Se agitaron juntos 6-cloro-2-fluoro-9-isopropil-9H-purina (0,3 g, 1,4 mmol), diisopropiletilamina (0,2 g, 1,55 mmol) y ciclobutilamina (0,2 g, 2,8 mmol) en etanol (30 ml) a temperatura ambiente durante 6 h. Se eliminaron los compuestos volátiles y se llevó el residuo a acetato de etilo, se lavó con agua (50 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano 3:2) dando el producto puro (237 mg, 68%)

5 δ_{H} (CDCl₃, 500 MHz) 1,56 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 1,76 - 1,74 (2 H, m, CH₂ de ciclobutilo), 1,98 - 1,94 (2 H, m, CH₂ de ciclobutilo), 2,45 (2 H, s, a, CH₂ de ciclobutilo)) 4,72 - 4,7 (2 H, m, CH de ciclobutilo y CHMe₂), 6,35 (1 H, s, a, NH), 7,75 (1 H, s, ArH); δ_{C} (CDCl₃, 500 MHz) 160,08 (C), 158,43 (C), 155,34 (C), 155,18 (C), 150,09 (C), 137,44 (CH), 47,26 (CH), 31,56 (2 x CH₂), 22,38 (2 x CH₃), 15,09 (CH₂); m/z 250,2 (M + H)

10

2R,3S-3-(6-(Ciclobutilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol [8]



A una disolución con agitación de N-ciclobutil-2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-amina (237 mg, 0,95 mmol) en N-metilpirrolidiona (10 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (1,28 g, 10 mmol) seguido por (*2R,3S*)-3-aminopentan-2-ol (566 mg, 5 eq., 5,5 mmol). Se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 24 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se añadió agua en exceso con lo cual se retiró el aceite del producto. Se añadió acetato de etilo y se lavó la fase orgánica cuidadosamente con agua (4x 50 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice, se eluyó con acetato de etilo proporcionando el producto del título como un sólido de color marrón pálido (120 mg, 31%); δ_{H} (CDCl₃, 500 MHz), 0,97 (3 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 1,07 (3 H, d, J 7,5, CHCH₃OH), 1,47 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 1,53 - 1,42 (2 H, m, CHCH₂CH₃), 1,71 - 1,68 (2 H, m, CH₂ de ciclobutilo), 1,89 - 1,87 (2 H, m, CH₂ de ciclobutilo), 2,39 - 2,37 (2 H, m, CH₂ de ciclobutilo), 3,89 (1 H, d, J 5, NHciclobutilo)), 4,53 - 4,5 (3 H, m, CHMe₂ y CHEt y CH de ciclobutilo), 5,62 (1 H, m, CHMeOH), 6,15 (1 H, s, a, NH), 7,43 (1 H, s, ArH); δ_{C} (CDCl₃, 500 MHz) 161,16 (C), 154,76 (C), 152,2 (C), 134,43 (CH), 114,67 (C), 71,7 (CH), 59,74 (CH), 46,36 (CH), 31,68 (CH₂), 25,25 (2 x CH₂), 22,59 (CH₃), 17,11 (CH₃), 15,04 (CH₂), 11,61 (CH₃); m/z 333,3 (M + H)

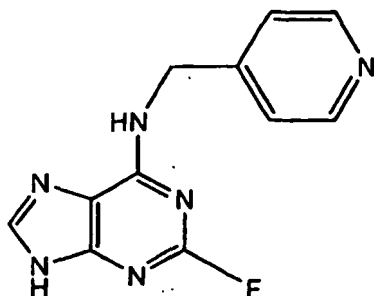
15

20

25

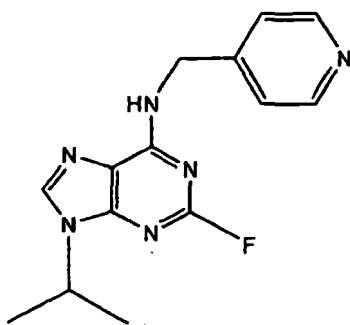
Ejemplo 9*

(2-Fluoro-9H-purin-6-il)-piridin-4-ilmetilamina



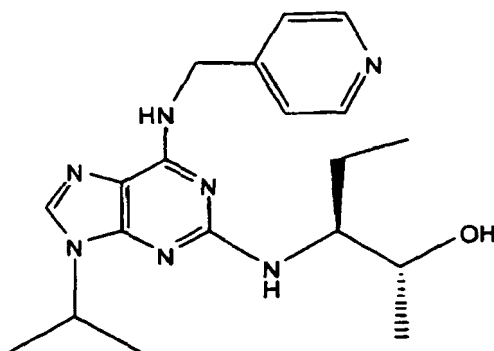
5 A una disolución con agitación de 6-cloro-2-fluoropurina (1 g, 5,8 mmol) en n-BuOH (50 ml) bajo una atmósfera de argón a 0°C, se le añadió diisopropiletilamina (3 ml, 17,4 mmol) seguido por 4-(aminometil)piridina (0,9 ml, 1,5 eq., 8,7 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 1 h y entonces se dejó que volviera a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h, cuando la CCF (CHCl₃:MeOH; 90:10) indicó que se había completado la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →90:10), proporcionando el producto como un sólido de color blanco; Rendimiento: 0,85 g (60%). p.f. 200-202°C. ¹H-RMN (d₆-DMSO, 250 MHz): δ 4,67 (2 H, d, J 5, -HNCH₂-Pyr), 7,34 - 7,28 (2 H, m, Pyr-H), 8,48 - 8,42 (2 H, m, Pyr-H), 8,54 (1 H, s, -N=CH-NH-), 8,84 (1 H, s, a, -HNCH₂-Pyr), 13,13 (1 H, s, b, -N=CH-NH-); m/z 245 ([M+H]⁺)

(2-Fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-il)piridin-4-ilmetilamina



15 A una disolución con agitación de (2-fluoro-9H-purin-6-il)piridin-4-ilmetil-amina (0,6 g, 2,46 mmol) en DMF (10 ml) bajo una atmósfera de argón, a TA, se le añadió K₂CO₃ (en polvo, anhidro, 1,7 g, 5 eq., 12,3 mmol) seguido por 2-bromopropano (2,3 ml, 10 eq., 24,6 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a TA durante 24 h, cuando la CCF (CHCl₃:MeOH; 90:10) indicó que se había completado la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se repartió el residuo entre agua (200 ml) y EtOAc (50 ml). Se separó la fase acuosa y se extrajo con más EtOAc (2 x 50 ml). Se lavó la fase orgánica a granel con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío, y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con cloroformo:metanol (100:0 →95:5), proporcionando el producto como un sólido de color blanco; Rendimiento: 0,40 g (57%). p.f. 170-173°C. ¹H-RMN (d₆-DMSO, 250 MHz): δ 1,49 (6 H, d, J 7,5, -CH(CH₃)₂), 4,63 (3 H, m, -CH(CH₃)₂ + -HNCH₂-Pyr), 7,30, 8,47 (4 H, 2 x m, Pyr-H), 8,28 (s, 1 H, -N=CH-N-), 8,97 (1 H, s, a, -HNCH₂-Pyr). m/z 287 ([M+H]⁺)

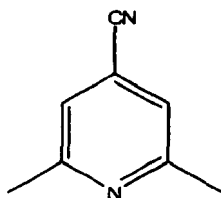
25 2R,3S-3-(9-Isopropil-6-(piridin-4-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol [9]



A una disolución con agitación de (2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-il)-piridin-4-ilmetil-amina (300 mg, 1,05 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (2 ml, 10 eq., 10,5 mmol) seguido por (2R,3S)-3-amino-pentan-2-ol (600 mg, 5,5 eq., 5,8 mmol). Se equipó el matraz con un condensador y se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml), se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 25 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →95:5), proporcionando el producto como una película incolora. Rendimiento: (225 mg, 58%); δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 0,92 (3 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 1,05 (3 H, d, J 7,5, CHCH₂OH), 1,4 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 1,47-1,36 (2 H, m, CHCH₂CH₃), 3,88 - 3,85 (2 H, m, CH₂ y NH), 4,53 - 4,5 (1 H, m, CHCH₂OH), 4,72 (2 H, s, a, NHCH₂Ar), 6,5 (1 H, s, a, NH), 7,2 (2 H, s, a, ArH), 7,45 - 7,42 (1 H, m, ArH), 8,46 - 8,43 (2 H, m, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 154,66 (C), 149,86 (2 x CH), 149,69 (C), 148,26 (C), 134,84 (CH), 122,22 (2 x CH), 71,51 (CH), 59,57 (CH), 46,58 (CH), 43,45 (CH₂), 24,9 (CH₂), 22,59 (2 x CH₃), 17,27 (CH₃), 11,53 (CH₃); m/z 370,2 (M + H)

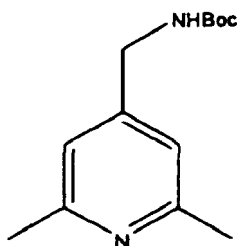
Ejemplo 10*

2,6-Dimetilisonicotinonitrilo



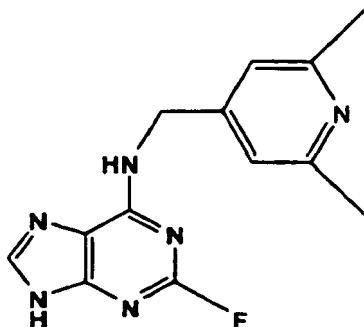
A una cantidad con agitación de 1-óxido de 2,6-lutidina (12,3 g, 100 mmol) se le añadió lentamente sulfato de dimetilo (12,6 g, 100 mmol) a una velocidad tal que la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo a 80°C durante toda la adición. Cuando se completó la adición (aproximadamente una hora) se agitó la disolución a esa temperatura durante 2 h más. La sal cristalizó tras el enfriamiento y se recristalizó en acetona anhídrica dando prismas de color blanco; p.f. 96 - 97°C. Rendimiento: 18 g (73%). A una disolución este metilsulfato de 1-metoxi-2,6-dimetilpiridinio (11,65 g, 50 mmol) disuelto en agua (50 ml), bajo nitrógeno, se le añadió una disolución de cianuro de potasio (10 g, 150 mmol) disuelto en 50 ml de agua. Se dejó en reposo la disolución a temperatura ambiente durante 2 días, tiempo tras el cual el nitrilo, que se había separado de la disolución como largas agujas de color blanco, se eliminó mediante filtración, proporcionando 2,8 g de producto puro (42%) δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 2,44 (6 H, s, 2 x CH₃), 4,2 (2 H, d, J 5, NHCH₂), 6,78 (2 H, s, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 157,83 (2 x C), 122,71 (C), 118,2 (2 x CH), 24,28 (2 x CH₃)

(2,6-Dimetilpiridin-4-il)metilcarbamato de *t*-butilo



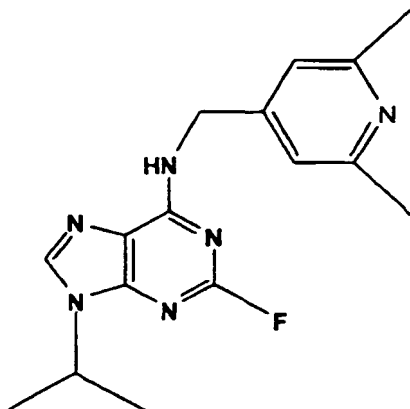
Se disolvió 2,6-dimetilisonicotinonitrilo (2 g, 15,15 mmol) en ácido acético al 10%/etanol (30 ml). Se añadió catalizador de paladio al 10% sobre carbón (0,5 g) y se agitó la reacción bajo una atmósfera de hidrógeno durante 24 h a 60°C. Se filtró la mezcla a través de un lecho de Celite. Se eliminaron los compuestos volátiles y se disolvió el producto en bruto en diclorometano (30 ml). Entonces a la disolución con agitación se le añadió trietilamina (5 ml) seguido por dicarbonato de di-*terc*-butilo (3,3 g, 15,15 mmol). Tras 3 h, se eliminó el disolvente y se disolvió el residuo en acetato de etilo. Se lavó con agua (50 ml), bicarbonato saturado (50 ml), se secó y se evaporó. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (acetato de etilo:hexano 1:2) proporcionando 0,6 g del compuesto del título puro (rendimiento del 17,24%). δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 1,42 (9 H, s, 3 x CH₃), 2,44 (6 H, s, 2 x CH₃), 4,2 (2 H, d, J 5, NHCH₂), 5,25 (1 H, s, b, NH), 6,81 (2 H, s, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 157,83 (C), 156,01 (CO), 148,71 (C), 118,58 (2 x CH), 79,77 (C), 43,41 (CH₂), 28,34 (3 x CH₃), 24,28 (2 x CH₃); m/z 237,2 (M + H)

N-((2,6-Dimetilpiridin-4-il)metil)-2-fluoro-9H-purin-6-amina



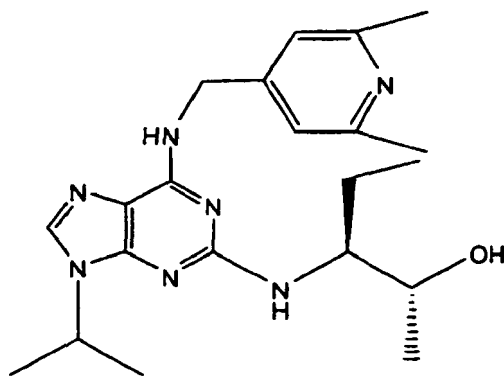
5 A una disolución con agitación de 6-cloro-2-fluoropurina (0,4 g, 2,9 mmol) en n-BuOH (50 ml) bajo una atmósfera de argón a 0°C, se le añadió DIEA (2,5 ml, 14,7 mmol) seguido por (2,6-dimetilpiridin-4-il)metanamina (0,54 g, 4 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 1 h y entonces se dejó que volviera a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h, todavía se observó que no se había completado, por tanto se calentó la reacción hasta 100°C y se dejó a esta temperatura durante 8 h. Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →90:10), proporcionando el producto como un sólido de color blanco; Rendimiento: 0,5 g (63%); δ_H (CDCl₃, 250 MHz) 2,48 (6 H, s, 2 x CH₃), 3,65 - 3,54 (2 H, m, NHCH₂), 4,61 (H, s, a, NH), 7,32 (2 H, s, ArH), 7,84 (1 H, s, ArH), 9,05 (1 H, s, a, NH); δ_C (CDCl₃, 250 MHz) 159,2 (C), 156,62 (C), 156,61 (C), 155,46 (C), 146,92 (CH), 136,3 (C), 122,05 (2 x CH), 119,48 (C), 41,6 (CH₂), 18,06 (2 x CH₃)

N-((2,6-Dimetilpiridin-4-il)metil)-2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-amina



15 A una disolución con agitación de 2-fluoro-N-(2,6-dimetilpiridin-4-il)metil-9H-purin-6-amina (0,4 g, 1,48 mmol) en dimetilformamida (10 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón, se le añadió K₂CO₃ en polvo, anhidro (1 g, 5 eq., 7,4 mmol), seguido por 2-bromopropano (1,2 ml, 12,2 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h, cuando DCM:éter:MeOH (55:40:5), indicó que se había completado la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se repartió el residuo entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml). Se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 50 ml) y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, se eluyó con CHCl₃:MeOH (98:2) proporcionando el compuesto del título como una película incolora (250 mg, 54%). δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 1,46 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 2,38 (3 H, s, Ar-CH₃), 2,39 (3 H, s, ArCH₃), 4,73 - 4,6 (3 H, m, NHCH₂ y CHMe₂), 6,85 (2 H, s, ArH), 7,35 (1 H, s, a, NH), 7,5 (1 H, s, a, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 157,8 (C), 158,6 (C), 154,32 (C), 151 (C), 148,42 (CH), 122,2 (2 x CH), 121,08 (C), 47,52 (CH), 43,6 (CH₂), 23,68 (2 x CH₃), 22,3 (2 x CH₃); m/z 315,2 (M + H)

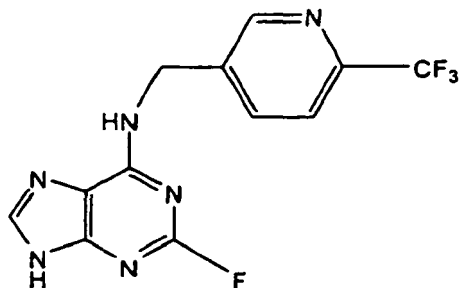
2R,3S-3-(9-Isopropil-6-(2,6-dimetilpiridin-4-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol [10]



A una disolución con agitación de 2-fluoro-9-isopropil-N-(2,6-dimetilpiridin-4-ilmetil)-9H-purin-6-amina (250 mg, 0,8 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (1,4 ml, 10 eq., 8 mmol) seguido por (2R,3S)-3-amino-pentan-2-ol (0,35 g, 3,4 mmol). Se equipó el matraz con un condensador y se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml), se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 25 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →95:5), proporcionando el compuesto del título como un aceite incoloro (56 mg, 18%). δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 0,95 (3 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃), 1,05 (3 H, d, J 5, CHCH₃OH), 1,43 (6 H, d, J 10, CH[CH₃]₂), 1,55 - 1,4 (2 H, m, CHCH₂CH₃), 2,43 (3 H, s, ArCH₃), 2,44 (3 H, s, ArCH₃), 3,9 - 3,8 (2 H, m, CH₂Et y CH₂Me₂), 4,57 - 4,46 (1 H, m, CHCH₃OH), 4,63 - 4,58 (2 H, m, NHCH₂Ar), 6,28 (1 H, s, a, NH), 6,8 (2 H, s, a, ArH), 7,45 (1 H, s, ArH); δ_C (CDCl₃, 250 MHz) 160,08 (C), 157,76 (C), 155,36 (C), 148,97 (C), 135,36 (C), 134,75 (CH), 118,95 (2 x CH), 71,52 (CH), 59,59 (CH), 46,65 (CH), 44,92 (CH₂), 24,91 (CH₂), 24,01 (2 x CH₃), 22,5 (2 x CH₃), 17,27 (CH₃), 11,51 (CH₃); m/z 398,3 (M + H)

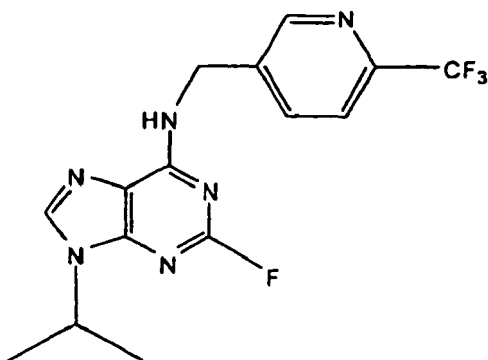
Ejemplo 11

2-Fluoro-N-((6-(trifluorometil)piridin-3-il)metil)-9H-purin-6-amina



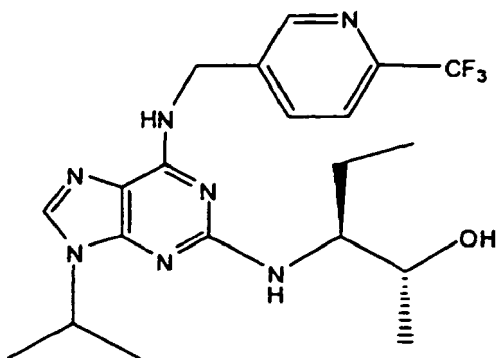
A una disolución con agitación de 6-cloro-2-fluoropurina (344 mg, 2 mmol) y [6-(trifluorometil)piridin-3-il]metanamina (0,4 g, 2,27 mmol) en n-BuOH (50 ml) bajo una atmósfera de argón a 0°C, se le añadió DIEA (2,5 ml, 14,7 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 1 h y entonces se dejó que volviera a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h, todavía se observó que no se había completado, por tanto se calentó la reacción hasta 100°C y se dejó a esta temperatura durante 5 h. Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →90:10), proporcionando el producto como un sólido de color blanco; Rendimiento: 0,46 g (75%) δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 3,62 - 3,57 (2 H, m, NHCH₂), 4,69 (1 H, s, a, NH), 7,2 - 7,1 (2 H, s, a, ArH y NH), 7,69 (1 H, d, J, 7,5, ArH), 8,27 (1 H, s, ArH), 8,71 (1 H, s, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 158,69 (C), 158,18 (C), 157,67 (C), 154,56 (C), 147,48 (CH), 146,99 (CH), 144,32 (C), 133,87 (CH), 121,67 (CH), 118,88 (C), 43,48 (CH₂); m/z 313,1 (M + H)

2-Fluoro-9-isopropil-N-((6-(trifluorometil)piridin-3-il)metil)-9H-purin-6-amina



5 A una disolución con agitación de 2-fluoro-N-[(6-(trifluorometil)piridin-3-il)metil-9H-purin-6-amina (0,4 g, 1,27 mmol) en dimetilformamida (10 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón, se le añadió K_2CO_3 en polvo, anhidro (0,86 g, 5 eq., 6,54 mmol), seguido por 2-bromopropano (1 ml, 10,3 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h, cuando DCM:éter:MeOH (55:40:5), indicó que se había completado la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se repartió el residuo entre EtOAc (100 ml) y agua (100 ml). Se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 50 ml) y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice, se eluyó con $CHCl_3$:MeOH (98:2) proporcionando el compuesto del título como una película incolora (350 mg, 77%). δ_H ($CDCl_3$, 500 MHz) 1,5 (6 H, d, J 7,5, $CH[CH_3]_2$), 4,7 - 4,6 (3 H, m, $NHCH_2$ y $CHMe_2$), 7,16 (1 H, d, J 2,5, ArH), 7,25 (H, s, a, NH), 7,66 (2 H, s, a, ArH), 8,67 (H, s, a, ArH); δ_C ($CDCl_3$, 500 MHz) 158,8 (C), 156,72 (C), 156,3 (C), 147,42 (CH), 137,92 (CH), 138,08 (CH), 131,73 (C), 123,31 (CH), 119,25 (C), 48,38 (CH), 44,1 (CH_2), 22,72 (2 x CH_3); m/z 355,1 (M + H)

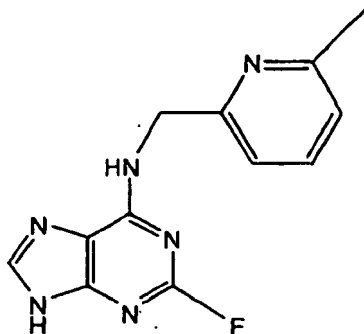
15 **[11]** *2R,3S-3-(9-Isopropil-6-((6-(trifluorometil)piridin-3-il)metilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol*



20 A una disolución con agitación de 2-fluoro-9-isopropil-N-(6-(trifluorometilpiridin-3-ilmetil)-9H-purin-6-amina (200 mg, 0,56 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (1,4 ml, 10 eq., 8 mmol) seguido por (2R,3S)-3-amino-pentan-2-ol (0,25 g, 2,4 mmol). Se equipó el matraz con un condensador y se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml), se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 25 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con $CHCl_3$:MeOH (100:0 → 95:5), proporcionando el compuesto del título como un aceite incoloro (30 mg, 12%). δ_H ($CDCl_3$, 500 MHz) 0,85 (3 H, t, J 7,5, $CHCH_2CH_3$), 1,12 (3 H, d, J 5, $CHCH_3OH$), 1,52 (6 H, d, J 7,5, $CH[CH_3]_2$), 1,61 - 1,41 (2 H, m, $CHCH_2CH_3$), 3,82 (1 H, m, $CHMe_2$), 4,75 - 4,57 (1 H, m, $CHCH_3OH$), 4,82 - 4,64 (2 H, m, $NHCH_2Ar$), 5,8 (1 H, s, a, NH), 6,85 (1 H, s, a, NH), 7 (1 H, d, J 10, ArH), 7,31 - 7,23 (2 H, m, ArH), 8,45 (1 H, s, a, ArH); δ_C ($CDCl_3$, 250 MHz) 158,61 (C), 157,35 (C), 156,97 (C), 147,62 (CH), 137,43 (CH), 129,22 (C), 128,72 (C), 128,92 (CH), 1231,14 (CH), 118,32 (C), 69,64 (CH), 60,91 (CH_2), 57,68 (CH), 23,55 (CH_2), 22,53 (2 x CH_3), 12,12 (CH_3); m/z 438,3 (M + H)

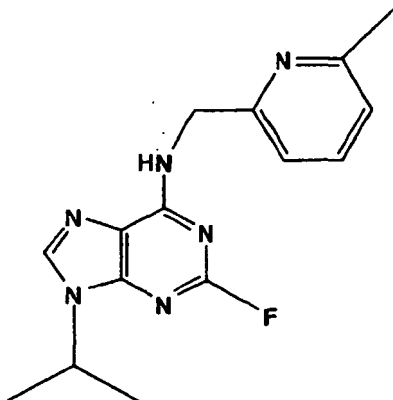
Ejemplo 12*

2-Fluoro-N-((6-metilpiridin-2-il)metil)-9H-purin-6-amina



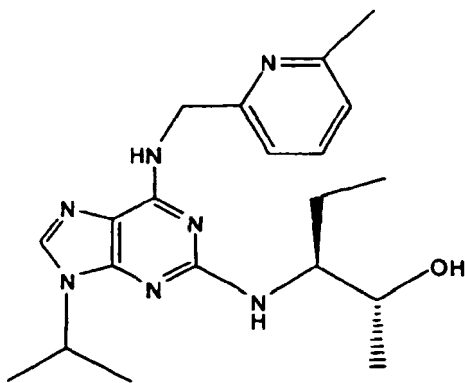
5 A una disolución con agitación de 6-cloro-2-fluoropurina (0,4 g, 2,3 mmol) en n-BuOH (50 ml) bajo una atmósfera de argón a 0°C, se le añadió DIEA (2,5 ml, 14,7 mmol) seguido por (6-metilpiridin-2-il)metanamina (0,36 g, 2,95 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 1 h y entonces se dejó que volviera a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h, todavía se observó que no se había completado, por tanto se calentó la reacción hasta 100°C y se dejó a esta temperatura durante 8 h. Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →90:10), proporcionando el producto como un sólido de color blanco; Rendimiento: 0,35 g (60%). δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 2,44 (3 H, s, CH₃), 4,83 - 4,54 (3 H, m, NH y NHCH₂), 7,1 - 7,05 (2 H, m, ArH), 7,61 - 7,55 (1 H, m, ArH), 8,13 - 8,09 (H, m, ArH), 8,61 (1 H, s, a, NH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 159,41 (C), 158,78 (C), 158,53 (C), 157,19 (C), 155,38 (C), 147,69 (CH), 137,03 (C), 136,93 (CH), 121,34 (CH), 117,76 (CH), 117,31 (C), 46,47 (CH₂), 23,9 (CH₃); m/z 259,2 (M + H)

2-Fluoro-9-isopropil-N-((6-metilpiridin-2-il)metil)-9H-purin-6-amina



15 A una disolución con agitación de 2-fluoro-N-((6-metilpiridin-2-il)metil)-9H-purin-6-amina (0,3 g, 1,17 mmol) en dimetilformamida (10 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón, se le añadió K₂CO₃ en polvo, anhidro (0,8 g, 5 eq., 5,85 mmol), seguido por 2-bromopropano (1,15 ml, 11,7 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h, cuando DCM:éter:MeOH (55:40:5), indicó que se había completado la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se repartió el residuo entre EtOAc (100 ml) y agua (100 ml). Se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 50 ml) y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, se eluyó con CHCl₃:MeOH (98:2) proporcionando el compuesto del título como una película de color ligeramente amarillo (180 mg, 51%). δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 1,6 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 2,54 (3 H, s, CH₃), 4,86 - 4,73 (3 H, m, NHCH₂ y CHMe₂), 7,06 (1 H, d, J 10, ArH), 7,14 (1 H, d, J 10, ArH), 7,53 (1 H, t, J 10, ArH), 7,8 (1 H, s, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 158,42 (C), 158,04 (C), 156,16 (C), 156 (C), 155,49 (C), 150,12 (C), 137,67 (CH), 136,93 (CH), 121,89 (CH), 118,1 (C), 118,53 (CH), 47,15 (CH), 45,52 (CH₂), 24,38 (CH₃), 22,58 (2 x CH₃); m/z 301,2 (M + H); ¹⁹F-RMN δ- 50,22

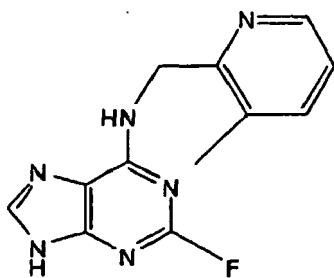
2R,3S-3-(9-Isopropil-6-((6-metilpiridin-2-il)metilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol [12]



A una disolución con agitación de 2-fluoro-9-isopropil-N-(6-metilpiridin-2-ilmetil)-9H-purin-6-amina (180 mg, 0,59 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (1 ml, 10 eq., 5,6 mmol) seguido por (2R,3S)-3-amino-pentan-2-ol (0,34 g, 6 mmol). Se equipó el matraz con un condensador y se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml), se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 25 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →95:5), proporcionando el compuesto del título como un aceite de color ligeramente amarillo (28 mg, 13%) δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 1,05 (3 H, t, J 7,5, CHCH₂CH₃); 1,13 (3 H, d, J 5, CHCH₃OH), 1,43 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 1,6 - 1,4 (2 H, m, CHCH₂CH₃), 1,75 (1 H, s, a, NH), 2,32 (3 H, s, ArCH₃), 3,95 (1 H, s, a, CHMe₂), 4,57 - 4,53 (1 H, m, CHCH₃OH) 4,8 - 4,6 (2 H, m, NHCH₂Ar), 5,8 (1 H, s, a, NH), 6,82 (1 H, s, a, NH), 6,95 (1 H, d, J 5, ArH), 7,05 (1 H, d, J 5, ArH), 7,45 - 7,4 (2 H, m, ArH) ; δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 160,17 (C), 157,9 (C), 156,72 (C), 154,8 (C), 150,12 (C), 136,8 (CH), 134,55 (CH), 121,64 (CH), 118,58 (CH), 114,87(C), 71,59 (CH), 59,66 (CH), 46,41 (CH), 44,79 (CH₂), 24,12 (CH₂), 23,41 (CH₃), 21,59 (CH₃), 16,18 (CH₃), 10,6 (CH₃); m/z 384,3 (M + H)

Ejemplo 13*

2-Fluoro-N-((3-metilpiridin-2-il)metil)-9H-purin-6-amina

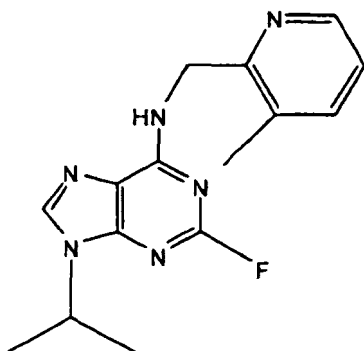


20

A una disolución con agitación de 6-cloro-2-fluoropurina (0,4 g, 2,3 mmol) en n-BuOH (50 ml) bajo una atmósfera de argón a 0°C, se le añadió DIEA (2,5 ml, 14,7 mmol) seguido por (3-metilpiridin-2-il)metanamina (0,36 g, 2,95 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 1 h y entonces se dejó que volviera a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h, todavía se observó que no se había completado, por tanto se calentó la reacción hasta 100°C y se dejó a esta temperatura durante 8 h. Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →90:10), proporcionando el producto como un sólido de color blanco; Rendimiento: 0,3 g (51%). δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 2,35 (3 H, s, CH₃), 4,71 (3 H, m, NH y NHCH₂), 7,24 (1 H, s, a, ArH), 7,63 (1 H, s, a, ArH), 8,28 (1 H, s, a, ArH), 8,38 (1 H, s, a, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 161,03 (C), 158,49 (C), 154,77 (C), 152,16 (C), 144,86 (CH), 137,53 (CH), 137,14 (CH), 130,67 (C), 121,58 (CH), 118,73 (C), 42,87 (CH₂), 18,16 (CH₃); m/z 259,3 (M + H)

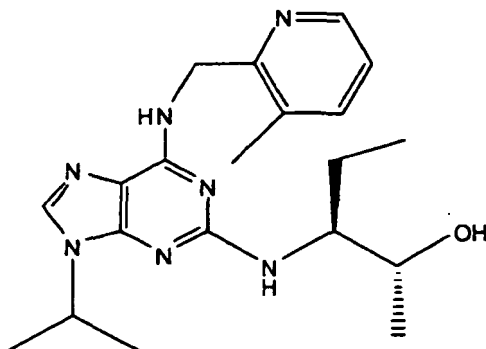
30

2-Fluoro-9-isopropil-N-((3-metilpiridin-2-il)metil)-9H-purin-6-amina



5 A una disolución con agitación de 2-fluoro-N-(3-metilpiridin-2-il)metil-9H-purin-6-amina (0,3 g, 1,17 mmol) en dimetilformamida (10 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón, se le añadió K_2CO_3 en polvo, anhidro (0,8 g, 5 eq., 5,85 mmol), seguido por 2-bromopropano (1,15 ml, 11,7 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h, cuando DCM:éter:MeOH (55:40:5), indicó que se había completado la reacción. Se evaporó el disolvente a vacío y se repartió el residuo entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml). Se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 50 ml) y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, se eluyó con $CHCl_3$:MeOH (98:2) proporcionando el compuesto del título como una película de color ligeramente amarillo (170 mg, 48%). δ_H ($CDCl_3$, 500 MHz) 1,51 (6 H, d, J 7,5, $CH[CH_3]_2$), 2,28 (3 H, s, CH_3), 4,68 - 4,65 (3 H, m, $NHCH_2$ y $CHMe_2$), 7,08 - 7,05 (1 H, m, ArH), 7,4 (1 H, d, J 5, ArH), 7,72 (1 H, s, ArH), 7,93 (1 H, s, a, NH), 8,34 (1 H, d, J 5, ArH); δ_C ($CDCl_3$, 500 MHz) 160,09 (C), 158,43 (C), 155,97 (C), 154,06 (C), 145,85 (CH), 137,73 (CH), 137,54 (CH), 130,67 (C), 122,28 (CH), 118,73 (C), 47,28 (CH), 42,87 (CH_2), 22,43 ($2 \times CH_3$), 17,66 (CH_3); ^{19}F -RMN δ -50,20; m/z 301,2 (M + H)

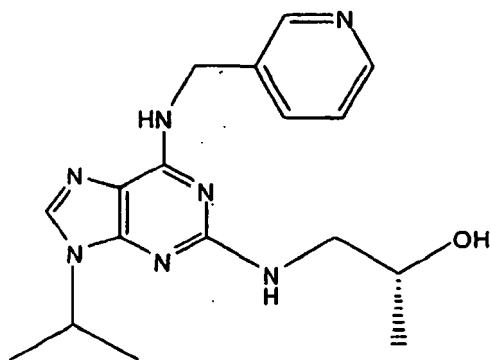
15 *2R,3S*-3-(9-Isopropil-6-((3-metilpiridin-2-il)metilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol [13]



20 A una disolución con agitación de 2-fluoro-9-isopropil-N-(3-metilpiridin-2-ilmetil)-9H-purin-6-amina (170 mg, 0,56 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (1 ml, 10 eq., 5,6 mmol) seguido por (*2R,3S*)-3-amino-pentan-2-ol (0,34 g, 6 mmol). Se equipó el matraz con un condensador y se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml), se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 25 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con $CHCl_3$:MeOH (100:0 \rightarrow 95:5), proporcionando el compuesto del título como un aceite de color ligeramente amarillo (28 mg, 13%) δ_H ($CDCl_3$, 500 MHz) 1 (3 H, t, J 7,5, $CHCH_2CH_3$), 1,1 (3 H, d, J 5, $CHCH_3OH$), 1,44 (6 H, d, J 7,5, $CH[CH_3]_2$), 1,6 - 1,4 (2 H, m, $CHCH_2CH_3$), 1,75 (1 H, s, a, NH), 2,3 (3 H, s, Ar CH_3), 3,92 (1 H, s, a, $CHMe_2$), 4,56 - 4,52 (1 H, m, $CHCH_3OH$), 4,7 (2 H, s, a, $NHCH_2Ar$), 6,1 (1 H, s, a, NH), 7,06 (1 H, dd, J 2,5, 5, ArH), 7,41 (1 H, dd, J 2,5, 5, ArH), 7,47 (1 H, s, ArH), 8,37 (1 H, d, J 5, ArH); δ_C ($CDCl_3$, 500 MHz) 160,21 (C), 154,68 (C), 153,65 (C), 146,07 (CH), 137,53 (CH), 134,53 (CH), 130,59 (C), 122,31 (C), 122,13 (CH), 115,14 (C), 71,73 (CH), 59,93 (CH), 46,43 (CH), 43,11 (CH_2), 25,33 (CH_2), 22,63 (CH_3), 17,61 (CH_3), 17,25 (CH_3), 11,67 (CH_3); m/z 384,3 (M + H)

Ejemplo 14*

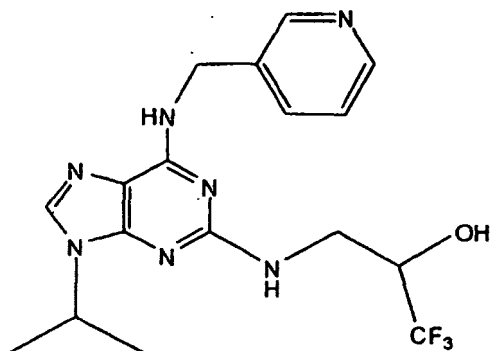
(*R*)-1-(9-Isopropil-6-(piridin-3-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)propan-2-ol [14]



A una disolución con agitación de 2-fluoro-9-isopropil-6-[(piridin-3-ilmetil)-amino]purina (300 mg, 1,05 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (2 ml, 10 eq., 10,5 mmol) seguido por (R)-1-aminopropan-2-ol (395 mg, 5,25 mmol). Se equipó el matraz con un condensador y se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre acetato de etilo (2 x 25 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →95:5), proporcionando el producto puro como un aceite incoloro (38 mg, 10,6%). δ_H (250 MHz, CDCl₃) 1,15 (3 H, d, J 7,5, CHCH₃OH), 1,45 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 3,3 - 3,2 (1 H, m, NHCHHCHMeOH), 3,45 - 3,36 (1 H, m, NHCHHCHMeOH), 3,96 - 3,9 (1 H, m, CHMe₂), 4,58 - 4,47 (1 H, m, CHMeOH), 4,69 (2 H, d, J 5, NHCH₂Ar), 5,23 (1 H, t, J 5, NHCH₂CHMeOH), 6,32 (1 H, s, a, NHCH₂Ar), 7,16 - 7,11 (1 H, m, ArH), 7,4 (1 H, s, ArH), 7,6 (1 H, d, J 7,5, ArH), 8,4 (1 H, d, J 2,5, ArH), 8,55 (1 H, s, ArH); δ_C (250 MHz, CDCl₃) 160,07 (C), 154,95 (C), 154,7 (C), 151,1 (C), 149,27 (CH), 148,54 (CH), 135,3 (CH), 134,73 (CH), 123,39 (CH), 114,61 (C), 68,83 (CH), 50,09 (CH₂), 46,49 (CH), 41,95 (CH₂), 22,49 (2 x CH₃), 20,85 (CH₃).; m/z 342,2 (M + H)

Ejemplo 15*

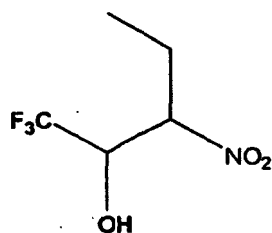
1,1,1-Trifluoro-3-(9-isopropil-6-(piridin-3-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)propan-2-ol [15]



A una disolución con agitación de (2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-il)-piridin-3-ilmetil-amina (300 mg, 1,05 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (1,4 ml, 10 eq., 8 mmol) seguido por 3-amino-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (1 g, 7,8 mmol) [preparado a partir de la reacción de amoníaco con 2-(trifluorometil)oxirano]. Se equipó el matraz con un condensador y se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml), se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 25 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con CHCl₃:MeOH (100:0 →95:5), proporcionando el compuesto del título como un aceite incoloro (62 mg, 15%). δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 1,53 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 3,64 - 3,6 (1 H, m, NHCHHCOH[CF₃][CH₃]), 3,76 - 3,73 (1 H, m, NHCHHCOH[CF₃][CH₃]), 4,18 - 4,16 (1 H, m, CHMe₂), 4,62 - 4,56 (1 H, m, CHOHCF₃), 4,72 (3 H, s, a, NHCH₂Ar y NHCH₂Ar), 7,22 - 7,2 (1 H, m, ArH), 7,52 (1 H, s, ArH), 7,66 (1 H, d, J 10, ArH), 8,47 (1 H, d, J 5, ArH), 8,58 (1 H, s, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 159,77 (C), 154,68 (C), 149,04 (CH), 148,45 (CH), 135,44 (CH), 135,03 (CH), 134,44 (C), 125,91 (C), 123,49 (CH), 114,78 (C), 71,57 (CH), 46,76 (CH), 42,94 (CH₂), 32,2 (CH₂), 22,47 (2 x CH₃).¹⁹F-RMN δ-78,48; m/z 396,2 (M + H)

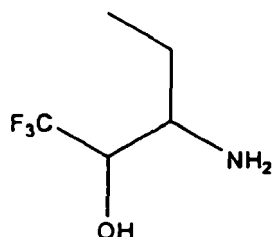
Ejemplo 16*

1,1,1-Trifluoro-3-nitropentan-2-ol



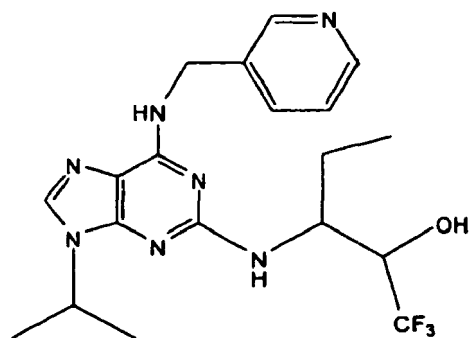
Se mezclaron 1-nitropropano (3,25 g, 36,6 mmol), etil-hemiacetal de trifluoroacetaldehído (5,85 g, 36,6 mmol, pureza del 90%) y K_2CO_3 en polvo (0,34 g, 2,5 mmol) y se agitaron a 60°C durante 3 h y entonces a temperatura ambiente durante 3 días. Se añadieron salmuera (10 ml) y HCl acuoso 1 N (10 ml) y se separó la fase orgánica inferior. Se extrajo la fase acuosa con éter (2 x 30 ml) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con una elución en gradiente de CH_2Cl_2 :hexano (50:50), CH_2Cl_2 :hexano (75:25), CH_2Cl_2 (al 100%) y MeOH: CH_2Cl_2 (5:95) dando el producto como un producto de color blanco ceroso (4,4 g, 64%). δ_H ($CDCl_3$, 500 MHz) 1,04 - 1,00 (3 H, m, $CHCH_2CH_3$), 2,16 - 1,99 (2 H, m, $CHCH_2CH_3$), 4,37 (1 H, s, a, OH), 4,71 - 4,59 (2 H, m, 2xCH); δ_C ($CDCl_3$, 500 MHz) dq (126,79, 126,70; 124,55, 124,46; 122,30, 122,21; 120,06, 119,96, CF_3), dos picos (88,34, 87,60 CH NO_2), ocho picos (71,13, 70,87, 70,81, 70,62, 70,56, 70,36, 70,30, 70,05 CHOH), dos picos (23,57 y 21,98 CH_2), dos picos (9,77 y 9,66 CH_3); 71,5 (CH), 54,03 (CH), 25,5 (CH_2), 11,05 (CH_3). ^{19}F -RMN δ -76,2 y -77,5

3-Amino-1,1,1-trifluoropentan-2-ol



Se disolvió 1,1,1-trifluoro-3-nitropentan-2-ol (3 g, 16 mmol) en metanol (40 ml). Se añadió catalizador de níquel Raney y se agitó vigorosamente la reacción bajo una atmósfera de hidrógeno durante 24 h. Se filtró el catalizador y se concentró el filtrado a vacío dando la amina relativamente pura (2,35 g, 94%). δ_H ($CDCl_3$, 500 MHz) 1,05 (3 H, t, J 5, $CHCH_2CH_3$), 1,55 - 1,45 (1 H, m, $CHCH_2CH_3$), 1,8 - 1,7 (1 H, m, $CHCH_2CH_3$), 2,95 - 2,9 (1 H, m, CH_2), 3,95 - 3,85 (1 H, m, CH_2); δ_C ($CDCl_3$, 500 MHz) 124,5 (C), 71,5 (CH), 54,03 (CH), 25,5 (CH_2), 11,05 (CH_3)

1,1,1-Trifluoro-3-(9-isopropil-6-(piridin-3-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol [16]

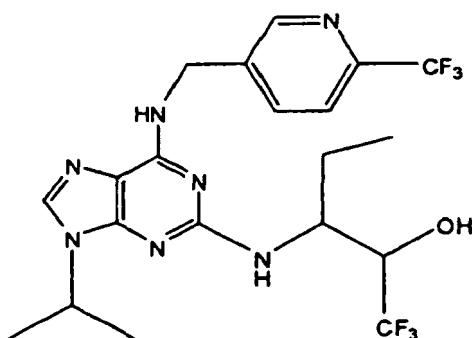


A una disolución con agitación de (2-fluoro-9-isopropil-9H-purin-6-il)-piridin-3-ilmetil-amina (300 mg, 1,05 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (1,4 ml, 10 eq., 8 mmol) seguido por 3-amino-1,1,1-trifluoropentan-2-ol (1 g, 6,4 mmol). Se equipó el matraz con un condensador y se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml), se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 25 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida

sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (100:0 \rightarrow 95:5), proporcionando el compuesto del título como una película incolora (42 mg, 9,4%). δ_{H} (CDCl_3 , 500 MHz) 1,04 (3 H, t, J 7,5, CHCH_2CH_3) 1,56 (6 H, d, J 7,5, $\text{CH}[\text{CH}_3]_2$), 1,8 - 1,73 (2 H, m, CHCH_2CH_3), 4,13 - 4,07 (1 H, m, CHMe_2), 4,22 - 4,2 (1 H, m, CHEt) 4,57 - 4,55 (1 H, m, CHOHCF_3), 4,71 (2 H, s, b, NHCH_2Ar), 5,08 (1 H, s, b, NH), 7,2 (1 H, dd, J 5, 10 ArH), 7,51 (1 H, s, ArH), 7,64 (1 H, d, J 10, ArH), 8,46 (1 H, d, J 5, ArH), 8,55 (1 H, s, ArH); δ_{C} (CDCl_3 , 500 MHz) 159,28 (C), 154,72 (C), 149,07 (CH), 148,47 (CH), 135,44 (CH), 134,83 (C), 134,48 (CH), 124,12 (C), 123,44 (CH), 114,62 (C), 73,1 (CH), 55,88 (CH), 46,70 (CH), 41,78 (CH_2), 23,68 (CH_2) 22,36 (2 x CH_3), 11,55 (CH_3); ^{19}F -RMN δ -74,83; m/z 424,2 (M + H)

Ejemplo 17

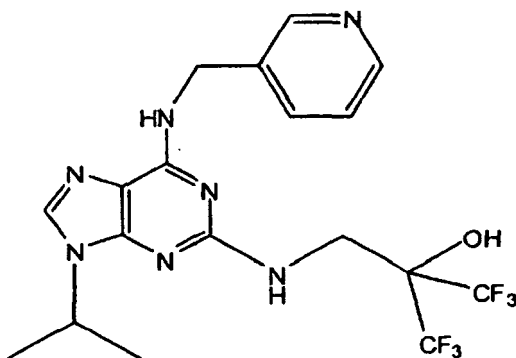
10 *1,1,1-Trifluoro-3-(9-isopropil-6-((6-(trifluorometil)piridin-3-il)metilamino)-9H-2-ilamino)pentan-2-ol*
[17]



A una disolución con agitación de 2-fluoro-9-isopropil-N-(6-(trifluorometilpiridin-3-ilmetil)-9H-purin-6-amina (200 mg, 0,56 mmol) en n-BuOH/DMSO (5 ml, 4:1) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón se le añadió DIEA (1,4 ml, 10 eq., 8 mmol) seguido por 3-amino-1,1,1-trifluoropentan-2-ol (0,377 g, 2,4 mmol). Se equipó el matraz con un condensador y se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 72 h. Tras este tiempo, solo se había producido la reacción en un 30%. Se añadió más aminoalcohol a lo largo de cuatro días más para conseguir la conversión completa. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó el disolvente a vacío. Se repartió el residuo entre EtOAc (50 ml) y agua (50 ml), se extrajo la fase acuosa con más EtOAc (2 x 25 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (50 ml), se secó (MgSO_4) y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente, se eluyó con $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (100:0 \rightarrow 95:5), proporcionando el compuesto del título como un polvo de color marrón (30 mg, 11%). δ_{H} (CDCl_3 , 500 MHz) 0,95 (3 H, t, J 7,5, CHCH_2CH_3), 1,56 (6 H, d, J 7,5, $\text{CH}[\text{CH}_3]_2$), 1,721 - 1,61 (2 H, m, CHCH_2CH_3), 3,22 - 3,05 (1 H, m, CHEt), 3,88 (1 H, m, CHMe_2), 4,75 - 4,57 (1 H, m, CHCF_3OH), 4,92 - 4,76 (2 H, m, NHCH_2Ar), 5,3 (1 H, s, a, NH), 6,83 (1 H, s, a, NH), 7,55 (1 H, d, J 10, ArH), 7,61 - 7,53 (2 H, m, ArH), 8,85 (1 H, s, ArH); δ_{C} (CDCl_3 , 250 MHz) 157,67 (C), 156,65 (C), 156,9 (C), 146,62 (CH), 139,55 (CH), 128,22 (C), 126,84 (C), 125,97 (CH), 123,14 (CH), 120,32 (C), 71,12 (CH), 61,56 (CH_2), 56,43 (CH), 25,74 (CH_2), 22,42 (2x CH_3), 11,56 (CH_3); ^{19}F -RMN δ -67,87, -74,30 ES-EM 492 (M+ 1)

30 Ejemplo 18*

1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-((9-isopropil-6-(piridin-3-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)metil)propan-2-ol [18]



35 A una disolución con agitación de 2-fluoro-9-isopropil-6-[(piridin-3-ilmetil)-amino]purina (50 mg, 0,175 mmol) en n-BuOH/DMSO (2,5 ml), 4:1) a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de argón se le

añadió diisopropiletilamina (135 mg, 1,05 mmol) seguido por 2-(aminometil)-1,1,1,3,3,3-hexafluoropropano-2-ol (preparado a partir de la reacción de hidróxido de amonio al 30% con 2,2-bis[trifluorometil]oxirano). Se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite precalentado a 140°C y se agitó a esta temperatura durante 3 días. Se siguió la reacción mediante CL-EM y solo se había producido en un 30%. Se añadió 2-(aminometil)-1,1,1,3,3,3-hexafluoropropano-2-ol recién preparado adicional y se continuó con la reacción. Se realizó esta adición tres días consecutivos más para conseguir la conversión completa. Tras la eliminación del disolvente, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice dando el compuesto del título como un polvo de color marrón pálido (19 mg, 23%); δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 1,57 (6 H, d, J 7,5, CH[CH₃]₂), 3,48 - 3,44 (1 H, m, NHCH₂COH[CF₃]₂), 3,86 - 3,81 (1 H, m, NHCH₂COH[CF₃]₂), 4,62 - 4,555 (1 H, m, CHMe₂), 4,78 - 4,74 (2 H, m, NHCH₂ArH), 5,35 (1 H, s, a, OH), 6,36 (1 H, s, a, NH), 7,27 - 7,22 (2 H, m, ArH), 7,7 - 7,67 (H, m, ArH), 8,5 (H, d, J 5, ArH), 8,66 (1 H, s, ArH); δ_C (CDCl₃, 500 MHz) 159,99 (C), 154,63 (C), 149,53 (C), 149,05 (C), 148,6 (CH), 137,79 (C), 135,41 (C), 135,38 (CH), 135 (CH), 123,44 (CH), 75,03 (C), 47,62 (CH₂), 46,84 (CH), 42,05 (CH₂), 22,1 (2 x CH₃); m/z 464,2 (M + H)

Ensayos de cinasas

Se evaluó un total de 21 compuestos en ensayos de cinasas recombinantes *in vitro* y en células tumorales y se compararon con seliciclib. Se halló que la mayoría de estos inhibidores de cdk eran más potentes que seliciclib.

Para evaluar la potencia como cinasa *in vitro* de los compuestos, se seleccionaron frente a CDK 2 y CDK9. Se realizaron ensayos de cinasas en placas de 96 pocillos usando CDK/ciclinas recombinantes generadas en Cyclacel. Ltd, Dundee, R.U. Se realizaron ensayos de CDK2 y CDK9 en un volumen total de 25 μ l en tampón de ensayo (b-glicerofosfato 25 mM, MOPS 20 mM, EGTA 5 mM, DTT 1 mM y NaVO₃ 1 mM, pH 7,4), al que se añadieron 2-4 μ g de enzima activa con sustratos apropiados (histona H1 purificada para CDK2/ciclina E, y CDK2/ciclina A, biotilil-Ahx-(YSPTSPS)₄ para CDK9/ciclina T1). Se inició la reacción mediante la adición de mezcla de Mg/ATP (MgCl₂ 15 mM + ATP 100 μ M con 30-50 kBq por pocillo de [³²P]-ATP) y se incubaron las mezclas durante 15 min. (CDK2/ciclina E), 30 min. (CDK2/ciclina A) o 45 min. (CDK9/ciclina T1) según se requirió, a 30°C. Se detuvieron las reacciones de CDK2 mediante la adición de 25 μ l de ácido fosfórico 75 mM, seguido por filtración a través de placas filtrantes P81 (Whatman Polyfritronics, Kent, R.U.). Para CDK9, se detuvo la reacción mediante la adición de 25 μ l de ácido fosfórico 75 mM, entonces se añadieron 5 μ l de avidina 10 mg/ml a cada pocillo y se incubó adicionalmente durante 2 min. seguido por filtración según el ensayo de CDK2. Tras lavar 3 veces con ácido ortofosfórico 75 mM, se secaron las placas, se añadió agente de centelleo y se midió la radiactividad incorporada en un contador de centelleo (TopCount, Packard Instruments, Pangbourne, Berks, R.U.). Se prepararon compuestos para el ensayo de cinasas como disoluciones madre 10 mM en DMSO y se diluyeron con DMSO al 10% en tampón de ensayo. Se analizaron los datos usando software de ajuste de curvas (XLfit versión 4.00, ID Business solutions Ltd, Guildford, Surrey, R.U.) para determinar la CI₅₀ (concentración de compuesto que inhibe la actividad cinasa en un 50%). Puede observarse el promedio de puntos por duplicado en las tablas 2 y 4. Los resultados muestran que muchos de los compuestos son inhibidores más potentes de CDK2 y CDK9 que el compuesto original seliciclib.

Determinación de CI₅₀ en la línea celular tumoral H460 de CPCNP usando el ensayo de citotoxicidad con Alamar Blue

Con el fin de determinar la potencia celular de los compuestos, se determinó la citotoxicidad de cada compuesto frente a la línea celular H460 de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). Se realizaron métodos de citotoxicidad convencionales tal como sigue: se sembraron células H460 en placas de 96 pocillos de manera apropiada para determinar su tiempo de duplicación (3000 células por pocillo) en medios RPMI media que contenían FCS al 10% y se incubaron durante la noche a 37°C, 5% de CO₂. Se eliminaron los medios y se añadieron 100 μ l de medios recién preparados que contenían concentraciones crecientes del compuesto apropiado y se incubaron las células durante 72 horas a 37°C, 5% de CO₂. Se preparó una disolución madre al 10% de Alamar Blue (Roche, Lewes, Reino Unido) en medio y se añadieron 100 μ l a las células que se incubaron durante 2 horas. Se midió la absorbancia en el contador Victor 2 1420 multi-label de Wallac a 544-595 nm. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes en la tabla 3.

Dos compuestos tienen valores de CI₅₀ menores de 1 μ M (compuesto [1] y compuesto [11]).

Comparación del modo de acción de compuestos de la invención y seliciclib

Anteriormente se ha mostrado que el seliciclib induce la apoptosis por medio de sus efectos sobre la transcripción. Por tanto, seliciclib inhibe CDK7 y CDK9 que son responsables de la fosforilación de ARN polimerasa II, lo que se requiere para la iniciación y elongación de transcripción. Como resultado de la inhibición de la transcripción, disminuyen los niveles de varias proteínas con semividas cortas, tales como Mcl-1, desencadenando de ese modo la apoptosis.

Para confirmar que estos compuestos también provocaron la regulación por disminución de Mcl-1 como seliciclib, se sembraron células H460 a 5×10^5 células en placas de 10 cm² en 10 ml de medios RPMI que contenían FCS al 10% y se incubaron durante la noche a 37°C, 5% de CO₂. Entonces se añadió 1 ml de compuesto concentrado 11x a las células que se incubaron durante 5 ó 24 horas. Se eliminaron los medios y se lavaron las células adherentes con 5 ml de PBS. Se lisaron las células en las placas mediante la

adición de 100 µl de tampón de lisis (HEPES 50 mM pH 7, NaCl 20 mM, DTT 1 mM, cóctel de inhibidores de proteasa (1:1000), e inhibidores de fosfatasa (pirofosfato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 10 mM y ortovanadato de sodio 1 mM). Se congelaron los lisados instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Se descongelaron los lisados congelados y se sonicaron con 2 ráfagas x 10 segundos en hielo. Se determinó la concentración de proteínas de cada lisado usando el kit de determinación de proteínas de BCA (Pierce) según las instrucciones de fabricante. Se mezcló el lisado (30 µg) con tampón de carga en gel 1x que contenía β-mercaptoetanol al 10% y se separó en geles de Bis-Tris-poliacrilamida al 4-12% usando condiciones electroforéticas desnaturalizantes (Invitrogen, Glasgow, Reino Unido). Se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) usando transferencia electroforética en húmedo. Se tñieron las membranas con Ponceau S para confirmar la carga igual antes del bloqueo en leche desnatada al 5% en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBSTM) durante 2 horas. Se incubaron las membranas durante la noche a 4°C con anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de conejo contra Mcl-1, Santa Cruz), se diluyeron 1:1000 con PBSTM. Se lavaron las membranas 2 x 5 minutos seguido por 2 x 10 minutos en PBS y Tween 20 al 0,05% (PBST) y se incubaron durante 1 hora en PBSTM que contenía anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa del rábano. Se lavaron las membranas como antes y se incubaron con disolución de quimioluminiscencia potenciada (Amersham) y se expusieron a película de rayos X (Amersham).

Tal como se esperaba, seliciclib solo muestra cambios muy moderados puesto que la concentración máxima usada en este experimento está cerca del valor de CI_{50} de este compuesto. El compuesto [1] parece ser superior a seliciclib en su capacidad para disminuir los niveles de Mcl-1, observándose efectos significativos a 1,5 µM a las 24 h. Esto concuerda con su potencia aumentada.

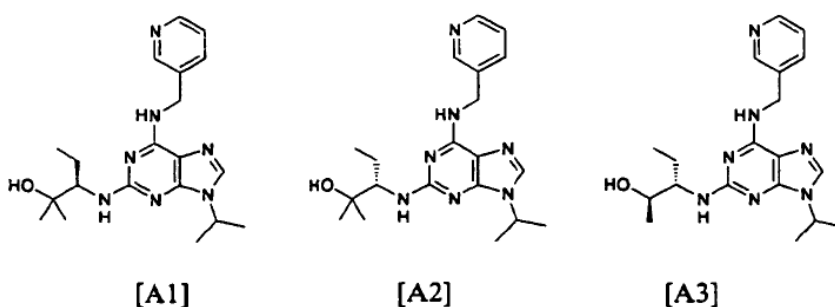
En un segundo experimento, se investigó el efecto de compuestos adicionales sobre los niveles de Mcl-1. En este caso, se trataron células H460 con 0,5, 1,5, 4,5 y 13,5 mM durante 5 h, momento en el que se recogieron las células para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se muestran los resultados en la figura 2.

Los resultados muestran que el compuesto [1] parece ser el compuesto más eficaz de este grupo en la regulación por disminución de los niveles de Mcl-1 y tiene una potencia superior a seliciclib. Sin embargo, queda claro que todos estos compuestos provocan una disminución en Mcl-1 a concentraciones equivalentes a aproximadamente 2-3 veces su vales de CI_{50} .

30 Inhibición de citocromos P450 (determinación de la CI_{50} de 5 isoformas)

Objetivo

Identificar si el compuesto [1] inhibe la actividad de cinco isoformas de CYP mediante el análisis del metabolismo de sustratos específicos de CYP. Se llevaron a cabo estudios comparativos usando los compuestos [A1], [A2] y [A3] de la técnica anterior mostrados a continuación:



35

Procedimiento experimental

Se sintetizaron los compuestos [A1], [A2] y [A3] según los métodos expuestos en el documento WO 2004/016612 (Cyclacel Limited).

40 Inhibición de CYP1A

Se incubaron seis concentraciones de compuesto de prueba (0,05, 0,25, 0,5, 2,5, 5, 25 µM en DMSO; concentración de DMSO final = 0,35%) con microsomas de hígado humano (0,25 mg/ml) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato sonda etoxi-resorufina (0,5 µM) durante 5 min. a 37°C. Se examinó el inhibidor selectivo de CYP1A, alfa-naftoflavona, junto con los compuestos de prueba como control positivo.

45

Inhibición de CYP2C9

Se incubaron seis concentraciones de compuesto de prueba (0,05, 0,25, 0,5, 2,5, 5, 25 µM en DMSO; concentración de DMSO final = 0,25%) con microsomas de hígado humano (1 mg/ml) y NADPH (1 mM) en pre-

sencia del sustrato sonda tolbutamida (120 μM) durante 60 min. a 37 °C. Se examinó el inhibidor selectivo de CYP2C9, sulfafenazol, junto con los compuestos de prueba como control positivo.

Inhibición de CYP2C19

5 Se incubaron seis concentraciones de compuesto de prueba (0,05, 0,25, 0,5, 2,5, 5, 25 μM en DMSO; concentración de DMSO final = 0,25%) con microsomas de hígado humano (0,5 mg/ml) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato sonda mefenitoína (25 μM) durante 60 min. a 37 °C. Se examinó el inhibidor selectivo de CYP2C19, tranilcipromina, junto con los compuestos de prueba como control positivo.

10 Inhibición de CYP2D6

Se incubaron seis concentraciones de compuesto de prueba (0,05, 0,25, 0,5, 2,5, 5, 25 μM en DMSO; concentración de DMSO final = 0,25%) con microsomas de hígado humano (0,5 mg/ml) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato sonda dextrometorfano (5 μM) durante 30 min. a 37 °C. Se examinó el inhibidor selectivo de CYP2D6, quinidina, junto con los compuestos de prueba como control positivo.

15 Inhibición de CYP3A4

Se incubaron seis concentraciones de compuesto de prueba (0,05, 0,25, 0,5, 2,5, 5, 25 μM en DMSO; concentración de DMSO final= 0,26%) con microsomas de hígado humano (0,25 mg/ml) y NADPH (1 mM) en presencia del sustrato sonda midazolam (2,5 μM) durante 5 min. a 37°C. Se examinó el inhibidor selectivo de CYP3A4, ketoconazol, junto con los compuestos de prueba como control positivo.

25 Para las incubaciones de CYP1A, se terminaron las reacciones mediante la adición de metanol, y se monitorizó la formación del metabolito, resorufina, mediante fluorescencia (longitud de onda de excitación = 535 nm, longitud de onda de emisión = 595 nm). Para las incubaciones de CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4, se terminaron las reacciones mediante la adición de metanol que contenía patrón interno. Entonces se centrifugaron las muestras, y se combinaron los sobrenadantes, para el análisis simultáneo de 4-hidroxitolbutamida, 4-hidroximefenitoína, dextrofrano y 1-hidroimidazolam más patrón interno mediante CL-EM/EM usando condiciones de CL-EM/EM genéricas. Se añadió ácido fórmico en agua desionizada (concentración final = 0,1%) a la muestra final antes del análisis. Se usó una disminución en la formación de los metabolitos en comparación con el control de vehículo para calcular un valor de CI_{50} (concentración de compuesto de prueba que produce una inhibición del 50%).

Resultados

Se muestran las CI_{50} (μM) para cada compuesto frente a las cinco isoformas de CYP en la tabla 5.

35 Los datos indican que tres compuestos son inhibidores significativos de CYP3A4 mientras que el compuesto [1] no lo es. Puesto que el valor de CI_{50} del compuesto [1] está significativamente por encima de su CI_{50} celular (véase la tabla 7), esto indica que a concentraciones citotóxicas no debe haber ningún efecto sobre la actividad de CYP3A4. Esto es importante ya que CYP3A4 está implicado en el metabolismo de un gran número de medicamentos. Si se inhibe CYP3A4 mediante un fármaco, esto puede conducir a una toxicidad inesperada debido al metabolismo reducido de los sustratos de CYP3A4, dando como resultado de ese modo un aumento aparente de los niveles de estos agentes.

Identificación del sustrato de citocromo P450

Objetivo

Identificar cuáles de las isoformas principales del citocromo P450 están implicadas en el metabolismo de los cuatro compuestos de prueba.

45 Procedimiento experimental

Se preincubaron preparaciones de enzima CYP450 humana expresada por ADNc coexpresadas con NADPH citocromo P450 reductasa humana (Bactosomes™) que se suministraron por Cypex Ltd. Bactosomes™ (concentración de P450 final CYP1A2 100 pmol/ml, CYP2C8 50 pmol/ml, CYP2C9 25 pmol/ml, CYP2C19 100 pmol/ml, CYP2D6 50 pmol/ml y CYP3A4 25 pmol/ml), tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 y compuesto de prueba (concentración de sustrato final = 5 μM ; concentración de DMSO final = 0,25%) a 37°C antes de la adición de NADPH (concentración final = 1 mM) para iniciar la reacción. También se realizaron incubaciones usando Bactosomes de control (sin enzimas P450 presentes) para revelar cualquier degradación no enzimática. El volumen de incubación final era de 25 μl . Se usaron compuestos que se sabe que se metabolizan específicamente por cada isoforma de CYP450 como compuestos de control.

55 Se incubó cada compuesto individualmente durante 0, 5, 15, 30 y 45 min. con cada isoforma de CYP. Se detuvieron las reacciones mediante la adición de 50 μl de metanol que contenía patrón interno en los puntos de tiempo apropiados. Se centrifugaron las placas de incubación a 2500 rpm durante 20 min. a 4°C para precipitar la proteína. Tras la precipitación de la proteína, se combinaron los sobrenadantes de muestra en casetes de hasta cuatro compuestos y se analizaron usando condiciones de CL-EM/EM genéricas.

Análisis de datos

Se representó gráficamente la razón del ln del área del pico (que se ha corregido para cualquier pérdida en las incubaciones con los Bactosomes de control) frente al tiempo y se determinó el gradiente de la recta.

5 Constante de la velocidad de eliminación (k) = (-gradiente)

$$\text{Semivida } (t_{1/2})(\text{min.}) = \frac{0,693}{k}$$

Resultados

Se muestran las semividas (min.) para cada compuesto en presencia de cada uno de los seis CYP en la tabla 6.

10 Los datos indican que en este sistema de Bactosomes™, el compuesto [1] no es un sustrato para las seis isoformas de CYP sometidas a prueba. Existe una diferencia principal con los otros tres compuestos debido a que todos son sustratos de CYP3A4 y dos también son sustratos de CYP1A2. Esta se corresponde bien con la diferencia en la inhibición de CYP tratada en la tabla 4. Un mecanismo común que conduce a la inhibición de CYP es que el compuesto también sea un sustrato de ese CYP. Tal como puede
15 observarse, el compuesto [1] no es ni un sustrato de ni un inhibidor de CYP3A4 mientras que los otros compuestos sí lo son.

Ensayos de cinasas

Para evaluar la potencia como cinasa *in vitro* de los compuestos, se seleccionaron frente a CDK 2 y CDK9. Se realizaron ensayos de cinasas en placas de 96 pocillos usando CDK/ciclinas recombinantes generadas en Cyclacel. Ltd, Dundee, R.U. Se realizaron ensayos de CDK2 y CDK9 en un volumen total de 25 µl en tampón de ensayo (b-glicerofosfato 25 mM, MOPS 20 mM, EGTA 5 mM, DTT 1 mM y NaVO₃ 1 mM, pH 7,4), al que se añadieron 2-4 µg de enzima activa con sustratos apropiados (histona H1 purificada para CDK2/ciclina E y CDK2/ciclina A, biotinil-Ahx-(YSPTSPS)₄ para CDK9/ciclina T1). Se inició la reacción mediante la adición de mezcla de Mg/ATP (MgCl₂ 15 mM + ATP 100 µM con 30-50 kBq por pocillo de [³²P]-ATP) y se incubaron las
20 mezclas durante 15 min. (CDK2/ciclina E), 30 min. (CDK2/ciclina A) o 45 min. (CDK9/ciclina T1) según se requirió, a 30°C. Se detuvieron las reacciones de CDK2 mediante la adición de 25 µl de ácido fosfórico 75 mM, seguido por filtración a través de placas filtrantes P81 (Whatman Polyfiltronics, Kent, R.U.). Para CDK9, se detuvo la reacción mediante la adición de 25 µl de ácido fosfórico 75 mM, entonces se añadieron 5 µl de avidina 10 mg/ml a cada pocillo y se incubaron adicionalmente durante 2 min. seguido por filtración según el ensayo de CDK2. Tras lavar 3 veces con ácido ortofosfórico 75 mM, se secaron las placas, se añadió agente de centelleo y se midió la radiactividad incorporada en un contador de centelleo (TopCount, Packard Instruments, Pangbourne, Berks, R.U.). Se prepararon compuestos para el ensayo de cinasas como disoluciones madre 10 mM en DMSO y se diluyeron con DMSO al 10% en tampón de ensayo. Se analizaron los datos usando software de ajuste de curvas (XLfit versión 4.00, ID Business solutions Ltd, Guildford, Surrey, R.U.)
30 para determinar la CI₅₀ (concentración de compuesto que inhibe la actividad cinasa en un 50%). Puede observarse el promedio de puntos de duplicado en las tablas 6 y 8.

Resultados

40 Los resultados en la tabla 7 muestran que el compuesto [A3] de la técnica anterior y el compuesto [1] son los inhibidores de cinasa más potentes.

Determinación de CI₅₀ en líneas celulares tumorales usando el ensayo de citotoxicidad con azul de Alamar

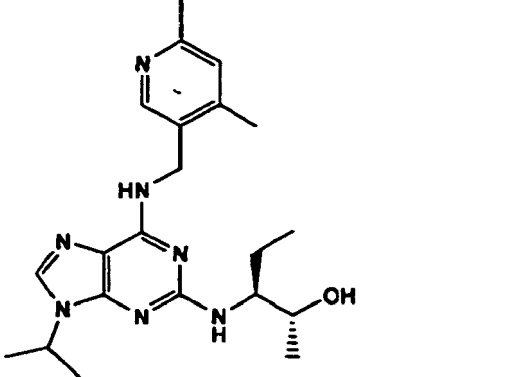
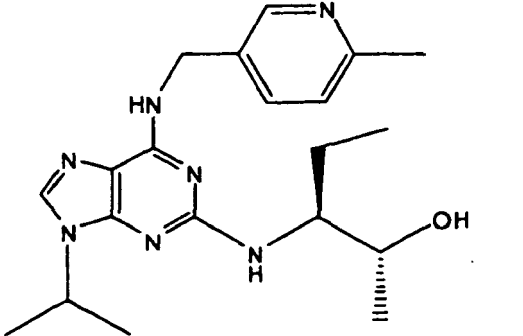
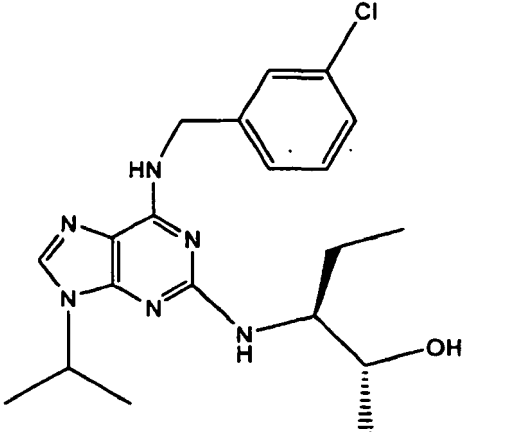
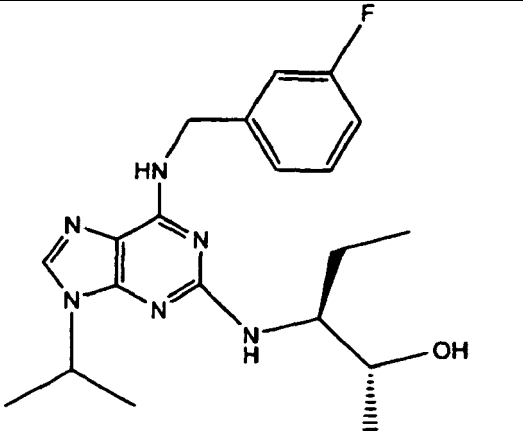
Con el fin de determinar la potencia celular de los compuestos, se determinó la citotoxicidad de cada compuesto frente a una gama de líneas celulares. Se realizaron métodos de citotoxicidad convencionales, tal como sigue: se sembraron células en placas de 96 pocillos de manera apropiada para determinar su tiempo de
45 duplicación (2-5000 células por pocillo) en medios RPMI o DMEM que contenían FCS al 10% y se incubaron durante la noche a 37°C, 5% de CO₂. Se eliminaron los medios y se añadieron 100 µl de medios recién preparados que contenían concentraciones crecientes del compuesto apropiado y se incubaron las células durante 72 horas a 37°C, 5% de CO₂. Se preparó una disolución madre al 10% de azul de Alamar (Roche, Lewes, Reino Unido) en medio y se añadieron 100 µl a las células que se incubaron durante 2 horas. Se midió la absorbancia en el contador Victor 2 1420 multi-label de Wallac a 544-595 nm.
50

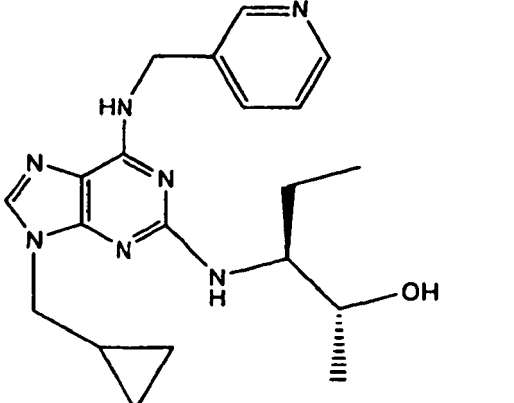
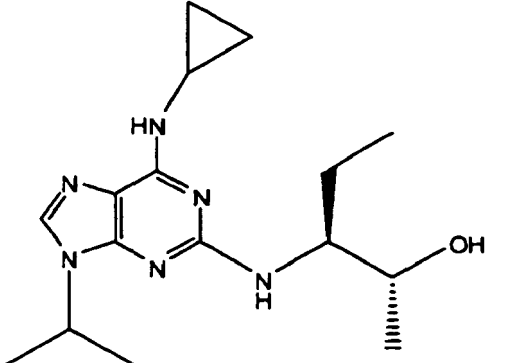
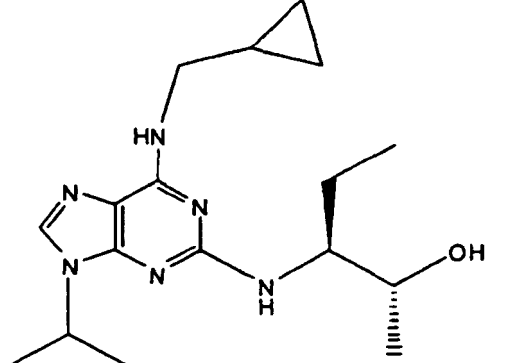
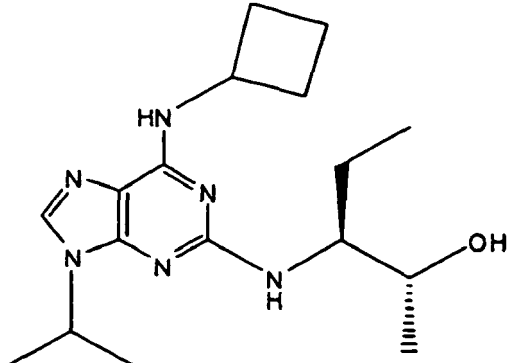
Resultados

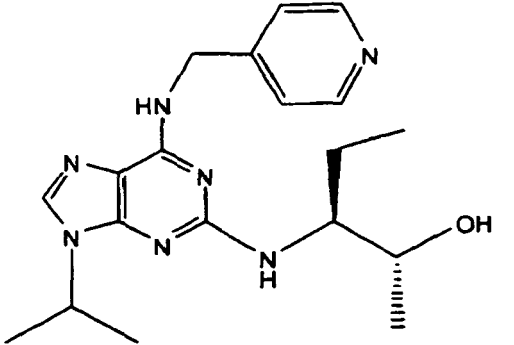
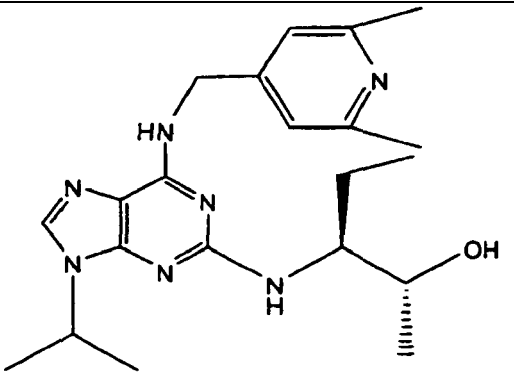
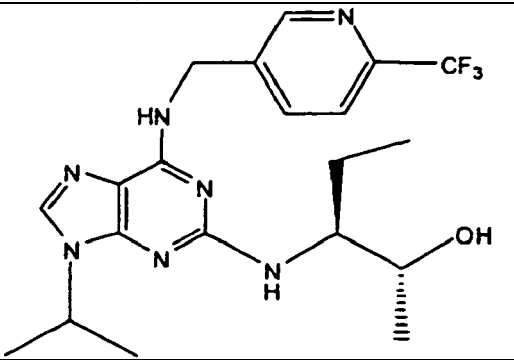
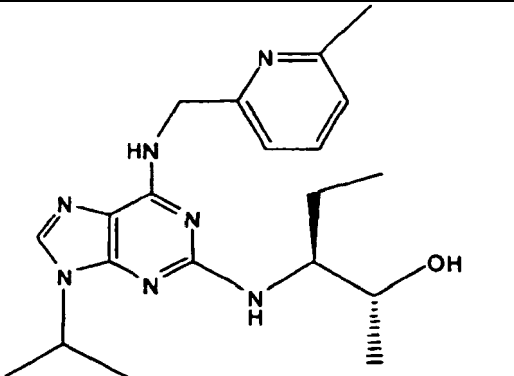
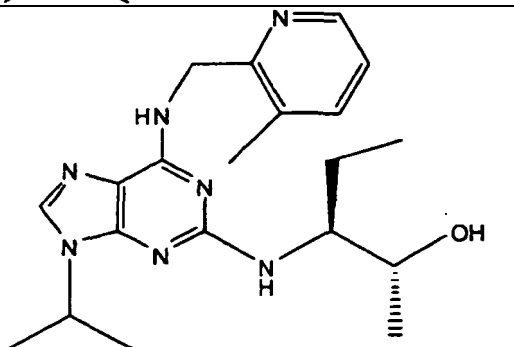
Se muestran los resultados para el análisis de citotoxicidad celular frente a 21 líneas celulares en la tabla 8. El compuesto [1] es significativamente más potente que los compuestos [A1], [A2] o [A3] de la técnica anterior.
55

En las siguientes tablas los compuestos marcados con un asterisco (*) se incluyen solo como referencia.

Tabla 1

Compuesto	Estructura	Nombre
[1]		(2R,3S)-3-(6-((4,6-Dimetilpiridin-3-il)metilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[2]		2R,3S)-3-(9-isopropil-6-((6-metilpiridin-3-il)metilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[3]*		2R,3S)-3-(6-(3-Clorobencilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[4]*		2R,3S)-3-[6-(3-Fluorobencilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino]pentan-2-ol

[5]*		2R,3S-3-(9-(Ciclopropilmetil)-6-(piridin-3-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[6]*		2R,3S-3-(6-Ciclopropilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[7]*		2R,3S-3-(6-(Ciclopropilmetilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[8]*		2R,3S-3-(6-(Ciclobutilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol

[9]*		2R,3S-3-(9-Isopropil-6-(piridin-4-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[10]*		2R,3S-3-(9-Isopropil-6-(2,6-dimetilpiridin-4-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[11]		2R,3S-3-(9-Isopropil-6-((6-(trifluorometil)piridin-3-il)metilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[12]*		2R,3S-3-(9-Isopropil-6-((6-metilpiridin-2-il)metilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[13]*		2R,3S-3-(9-Isopropil-6-((3-metilpiridin-2-il)metilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol

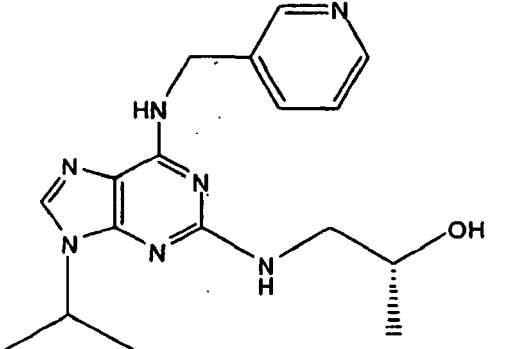
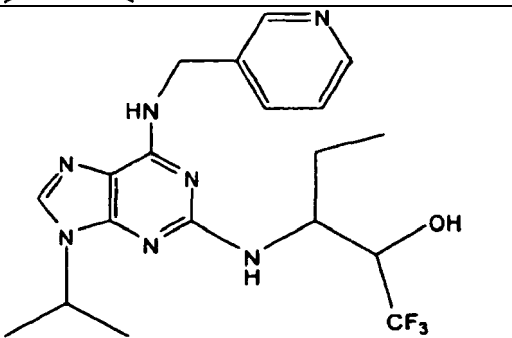
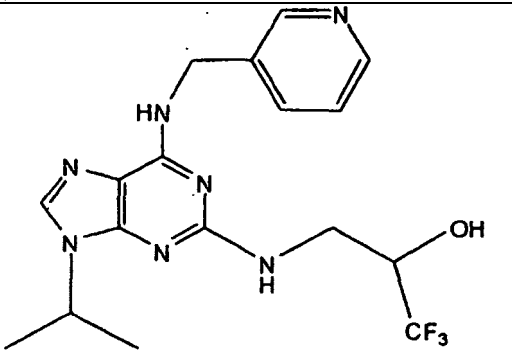
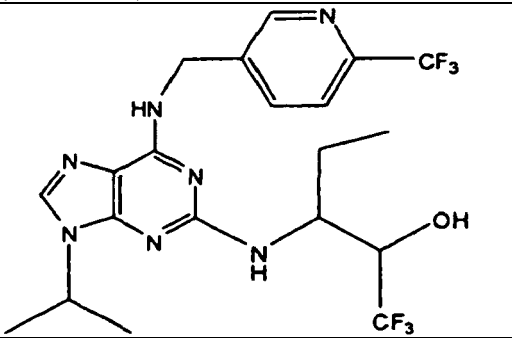
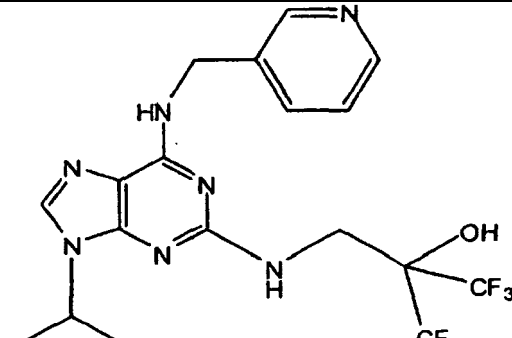
[14]*		(R)-1-(9-Isopropil-6-(piridin-3-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)propan-2-ol
[15]*		1,1,1-Trifluoro-3-(9-isopropil-6-(piridin-3-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)propan-2-ol
[16]*		1,1,1-Trifluoro-3-(9-isopropil-6-(piridin-3-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[17]		1,1,1-Trifluoro-3-(9-isopropil-6-(6-(trifluorometil)piridin-3-il)metilamino)-9H-2-ilamino)pentan-2-ol
[18]*		1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-((9-isopropil-6-(piridin-3-ilmetilamino)-9H-purin-2-ilamino)metil)propan-2-ol

Tabla 2: Resumen de la selección del ensayo de cinasas *in vitro* en los compuestos de segunda generación y seliciclib. Los valores de CI_{50} se expresan en μM . Se analizaron los compuestos en 2 lotes y

en ambos casos se ejecutó seliciclib como control en el ensayo, dando lugar a seliciclib 1 y 2, que proporcionaron resultados similares.

Compuesto	CDK2/ciclina E		CDK2/ciclina A		CDK9/ciclina T1	
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
Seliciclib 1	0,42	0,08	1,50	0,11	2,03	0,35
[1]	0,02	0,001	0,09	0,00	0,10	0,02
[2]	0,52	0,15	3,25	1,03	3,63	0,76
[3]*	0,01	0,004	0,10	0,004	0,06	0,00
[4]*	0,02	0,01	0,12	0,01	0,08	0,02
Seliciclib 2	0,28	0,03	ND	ND	2,35	0,61
[5]*	0,83	0,22	ND	ND	7,89	NA
[6]*	0,05	0,003	ND	ND	0,27	0,03
[7]*	0,04	0,01	ND	ND	0,38	0,01
[8]*	0,16	0,05	ND	ND	0,50	0,25
[9]*	0,04	0,01	ND	ND	0,61	0,01
[10]*	0,05	0,02	ND	ND	1,04	0,30
[11]	0,04	0,01	ND	ND	0,25	0,10
[12]*	0,05	0,01	ND	ND	2,04	0,44
[13]*	0,77	0,06	ND	ND	5,84	1,21
[14]*	0,29	0,14	ND	ND	6,53	2,74
[15]*	0,57	0,04	ND	ND	7,40	2,81
[16]*	0,09	0,01	ND	ND	2,14	0,50

5 **Tabla 3:** Tabla resumen de valores de CI_{50} celulares para los compuestos tal como se determinaron en las células H460. La última columna ilustra cuanto más potentes son muchos de estos compuestos en comparación con seliciclib.

Compuesto	CI_{50} promedio (μM)	D.E.	Veces de aumento en la potencia
[1]	0,5	0,0	24,0
[2]	35	5,5	0,3
[3]*	1,5	0,1	8,0
[4]*	1,5	0,1	8,0
[5]*	34,4	3,2	0,3
[6]*	1,7	0,2	7,1
[7]*	2,4	0,7	5,0
[8]*	2,9	0,6	4,1
[9]*	2,3	0,3	5,2
[10]*	2,4	0,1	5,0
[11]	0,9	0,2	13,3
[12]*	7,2	0,1	1,7
[13]*	19,4	5,3	0,6
[14]*	16,7	2,3	0,7
[15]*	20,3	5,2	0,6
[16]*	4,1	0,6	2,9
Seliciclib	12,0	2,2	NA

Tabla 4: Resumen de la selección del ensayo de cinasas *in vitro* en los compuestos [17] y [18] (μM)

Comp.	CDK2E				CDK2A				CDK1B			
	Serie 1	Serie 2	Media	D.E.	Serie 1	Serie 2	Media	D.E.	Serie 1	Serie 2	Media	D.E.
[17]	0,318	0,307	0,313	0,008	0,305	0,431	0,368	0,0089	6,121	11,235	8,678	3,616
[18]	0,336	0,279	0,308	0,040	0,704	1,194	0,949	0,347	5,882	6,725	6,303	0,596
Comp.	CDK4D1				CDK7H				CDK9T1			
	Serie 1	Serie 2	Media	D.E.	Serie 1	Serie 2	Media	D.E.	Serie 1	Serie 2	Media	D.E.
[17]	>10	>10	>10		1,851	1,777	1,814	0,053	2,046	5,426	3,736	2,390
[18]	>10	>10	>10		5,045	6,009	5,527	0,682	3,954	3,210	3,582	0,526

Tabla 5: Cl_{50} (μ M) de los compuestos [A1], [A2] y [A3] de la técnica anterior y el compuesto [1] de la invención frente a las cinco isoformas de CYP

	CYP1A	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
[A1]	>25	19,9	>25	>25	1,63
[A2]	>25	>25	>25	>25	0,48
[A3]	>25	>25	>25	>25	1,88
[1]	>25	>25	23,8	>25	22

5 **Tabla 6:** La semivida (min.) de los compuestos [A1], [A2] y [A3] de la técnica anterior y el compuesto [1] de la invención en presencia de cada uno de los seis CYP

	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C8	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
[A1]	29,2	58,3	>45	>45	>45	28,3
[A2]	49,5	>45	>45	>45	>45	32,6
[A3]	>45	>45	>45	>45	>45	18,0
[1]	>45	>45	>45	>45	>45	>45

Tabla 7: Actividad inhibidora de cinasas (Cl_{50} , μ M) de los compuestos [A1], [A2] y [A3] de la técnica anterior y el compuesto [1] de la invención

Cinasa	[A1]	[A2]	[A2]	[1]
CDK2A	0,37	0,20	0,11	0,04
CDK2E	0,13	0,07	0,01	0,02
CDK9T1	0,34	0,28	0,09	0,10

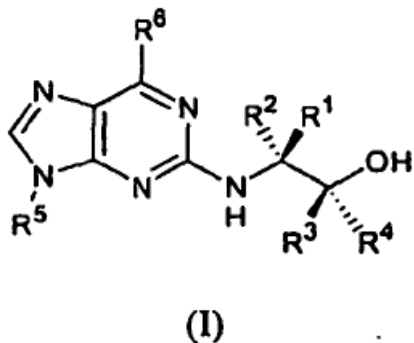
10

Tabla 8: Los resultados para el análisis de citotoxicidad celular para los compuestos [A1], [A2] y [A3] de la técnica anterior y el compuesto [1] de la invención frente a diversas líneas celulares

	[A1]	[A2]	[A3]	[1]
H1650	6,49	3,65	1,22	0,46
B16	7,77	2,59	0,66	
HeLa	6,64	3,30		
MDA-MB-436	6,6	3,38	0,97	0,44
H2052	5,16	2,36	0,94	0,29
LoVo	4,50	2,20	0,82	0,70
Saos-2	5,31	2,48	1,40	
CT26.WT	6,69	4,88	1,63	
H292	6,56	2,34	0,91	0,37
Colo205	4,48	2,31	0,82	0,31
HT-29	4,15	1,70	1,17	
NCI-H460	2,80	2,21	0,70	0,50
LP-1		1,64	0,47	
A549	2,95	1,60	0,47	0,16
MESSA	3,62	1,59	0,50	0,16
MESSA-Dx5	14,69	8,52	3,87	1,21
HCT 116		1,57	0,44	
MCF7	3,65	1,64	0,45	0,26
NCI-H929	5,16	2,35	0,79	0,35
A2780	2,60	1,10	0,38	0,41
H358	2,69	0,84	0,33	0,18
Prom.	4,88	2,29	0,79	0,35

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



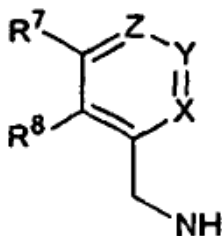
- 5 en la que:

R^1 y R^2 son cada uno independientemente H, alquilo C_{1-6} o haloalquilo C_{1-6} ;

uno de R^3 y R^4 es H y el otro es alquilo C_{1-6} o haloalquilo C_{1-6} ;

R^5 es alquilo C_{1-6} o cicloalquilo C_{3-12} o cicloalquil C_{3-12} -alquilo C_{1-6} , cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente con uno o más grupos OH;

- 10 R^6 es



en la que Y es N y X y Z son CR^9 ;

R^7 , R^8 y cada R^9 son independientemente H, alquilo C_{1-6} o haloalquilo C_{1-6} , en los que al menos uno de R^7 , R^8 y cada R^9 es distinto de H.

- 15 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que uno de R^1 y R^2 es H y el otro es alquilo C_{1-6} , preferiblemente metilo, etilo o isopropilo.
3. Compuesto según cualquier reivindicación anterior, en el que X es CH, Z es C-Me y R^7 es H y R^8 es Me.
4. Compuesto según cualquier reivindicación anterior, en el que X es CH, Z es C-Me y R^7 y R^8 son ambos H.
- 20

ES 2 427 845 T3

5. Compuesto según cualquier reivindicación anterior, en el que X es CH, Z es C-CF₃ y R⁷ y R⁸ son ambos H.
6. Compuesto según cualquier reivindicación anterior, en el que R⁵ es isopropilo.
7. Compuesto seleccionado de los siguientes:

[1]	(2R,3S-3-(6-((4,6-dimetilpiridin-3-ilmetilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[2]	2R,3S-3-(9-isopropil-6-((6-metilpiridin-3-il)metilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[11]	2R,3S-3-(9-isopropil-6-((6-(trifluorometil)piridin-3-il)metilamino)-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol
[17]	1,1,1-trifluoro-3-(9-isopropil-6-((6-(trifluorometil)piridin-3-il)metilamino)-9H-2-ilamino)pentan-2-ol

5

8. Compuesto según la reivindicación 1, que es (2R,3S-3-(6-((4,6-dimetilpiridin-3-ilmetilamino)-9-isopropil-9H-purin-2-ilamino)pentan-2-ol, o sal o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.
9. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, mezclada con un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, o una mezcla de los mismos.
10. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno seleccionado de un trastorno proliferativo, un trastorno viral, un trastorno neurodegenerativo, un trastorno del SNC, diabetes, alopecia y un accidente cerebrovascular.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que dicho trastorno proliferativo es cáncer o leucemia.
- 15 12. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en un ensayo para identificar compuestos candidatos adicionales que pueden inhibir una o más de una cinasa dependiente de ciclina, una aurora cinasa, una GSK y una enzima PLK.
13. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en medicina.
14. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento de un
- 20 trastorno seleccionado de un trastorno proliferativo, un trastorno viral, un trastorno neurodegenerativo, un trastorno del SNC, diabetes, alopecia y un accidente cerebrovascular. .