

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 909**

21 Número de solicitud: 201730399

51 Int. Cl.:

C07D 473/30 (2006.01)

C07D 473/38 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.03.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.10.2018

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2018/070215

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, nº 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**MARTINEZ GIL, Ana;
PEREZ, Daniel I.;
GIL AYUSO-GONTÁN, Carmen;
MARTIN-REQUERO, Angeles;
ROJAS PRATS, Elisa;
MARTINEZ-GONZALEZ, Loreto y
PEREZ, Concepción**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **COMPUESTOS INHIBIDORES DE CDC-7 Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE
PATOLOGÍAS NEUROLÓGICAS**

57 Resumen:

Compuestos inhibidores de CDC-7 y su uso para el tratamiento de patologías neurológicas.

La presente invención se refiere a una serie de derivados de purina sustituidas que son capaces de inhibir la actividad de la quinasa CDC7, por lo que resultan útiles para el tratamiento de enfermedades neurológicas tales como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica o la demencia frontotemporal, entre otras, donde se produce una hiperfosforilación de TDP-43 y posterior formación de aglomerados inducida por la CDC7.

ES 2 686 909 A1

**Compuestos inhibidores de CDC-7 y su uso para el tratamiento de patologías
neuroológicas**

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a una serie de derivados de purina sustituidas que son capaces de inhibir la actividad de la quinasa CDC7, por lo que resultan útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neuroológicas tales como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer o la demencia frontotemporal, donde se produce una hiperfosforilación de TDP-43 y posterior formación de aglomerados inducida por la CDC7.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

La hiperactividad de quinasas se produce en muchos tipos de enfermedades y particularmente en enfermedades neurodegenerativas y cáncer. La hiperfosforilación de la proteína TDP-43 induce la formación de agregados que se han detectado en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica o con degeneración lobular frontotemporal. Se ha detectado que la quinasa CDC7 es responsable de la hiperfosforilación dual de la TDP-43 en las serinas 409/410 en ciertos modelos, por lo que la inhibición de esta CDC7 sería una estrategia interesante para desarrollar fármacos para enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o con degeneración lobular frontotemporal (Lianchko, N. F. et al., *Ann Neurol.* 2013 74(1): 39-52). Existen otras enfermedades neuroológicas mediadas también por TDP-43, como la encefalopatía traumática crónica y el deterioro cognitivo asociado a la edad (Iverson GL, et al., *Neurosci Biobehav Rev.* 2015 Sep; 56: 276-293; Nag S, et al., *Neurology.* 2017 Feb 14; 88(7): 653-660; Wilson RS, et al., *JAMA Neurol.* 2013 Nov; 70(11): 1418-1424).

20

25

30

El documento US2013/0072506A1 describe derivados de purinas 6,8-disustituidas que son útiles para una serie de usos terapéuticos y cosméticos. Entre los posibles usos terapéuticos, se menciona el del tratamiento de la esclerosis múltiple o como fármacos antineurodegenerativos.

35

El documento WO2007/124288A1 describe una serie de compuestos con un núcleo estructural de indazol que tienen la habilidad de inhibir la CDC-7 y que son útiles para

el tratamiento de una enfermedad en la que esta quinasa está implicada, como por ejemplo el cáncer.

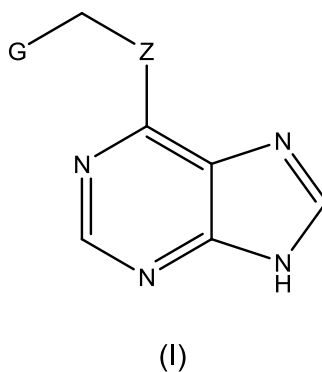
En *ACS Med. Chem. Lett.* 2013, 4, 211–215, Penning et al. describen un estudio sobre la interacción de compuestos derivados de azaindol con la CDC-7 y la posibilidad de usar estos compuestos en terapia contra el cáncer.

El documento US2011/015172A1 describe una familia de pirrolpirazinas que son inhibidores de quinasas como la CDC-7 y su uso para el tratamiento de enfermedades asociadas a esta quinasa como el cáncer.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una serie de compuestos derivados de purina que son inhibidores de CDC-7 y útiles como potenciales fármacos para enfermedades mediadas por proteinopatías de TDP-43, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y demencia frontotemporal.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I)



donde:

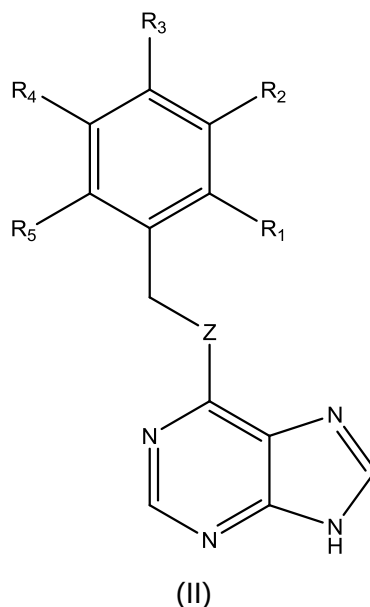
G representa un grupo que se selecciona de entre arilo, heteroarilo o alquilo C₁-C₁₀, cualquiera de ellos opcionalmente sustituido por al menos un sustituyente seleccionado de entre CF₃, alquilo C₁-C₆, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆, u

opcionalmente sustituido por dos sustituyentes formado un ciclo condensado al grupo G cuando es un arilo o un heteroarilo y

Z se selecciona de entre O ó S;

5 o cualquiera de sus sales, solvatos o isómeros farmacéuticamente aceptables para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de patologías relacionadas con la proteína TDP-43, en particular con modificaciones post-traslacionales de TDP-43. Estos compuestos son inhibidores de CDC7 en la fosforilación de TDP-43.

10 En una realización preferida G es un grupo arilo, más preferiblemente el grupo arilo es un fenilo que puede estar opcionalmente sustituido y el compuesto de fórmula (I) sería el compuesto de fórmula (II):



15 donde:

R₁ a R₅ se seleccionan independientemente cada uno de entre H, CF₃, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, alquilo C₁-C₆, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆ o dos de los radicales R₁ a R₅ forman un ciclo condensado al fenilo; y

20 Z se selecciona de entre O ó S.

El término “arilo”, se refiere, en la presente invención, a anillos aromáticos, sencillos o múltiples, que tienen entre 5 a 18 átomos de carbono en la parte del anillo, tales como pero sin limitarse a, fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo, fluorenilo o antracilo.

25 Preferiblemente el grupo arilo tiene de 5 a 7 átomos de carbono y más preferiblemente

el grupo arilo es un fenilo. Los grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos en cualquiera de sus posiciones por uno o más sustituyentes o por dos sustituyentes formando un ciclo condensado al arilo y se seleccionan independientemente entre tales como CF₃, alquilo C₁-C₆, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂,
 5 COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆, y más preferiblemente entre CF₃, alquilo C₁-C₆, halógeno, CN y NO₂.

El término "heteroarilo" se refiere a un arilo, como se ha definido anteriormente, que contiene al menos un átomo distinto de carbono, tales como S, N, ó O, formando parte
 10 del anillo aromático. Los grupos heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos en cualquiera de sus posiciones por uno o más sustituyentes o por dos sustituyentes formando un ciclo condensado al heteroarilo y se seleccionan independientemente entre tales como CF₃, alquilo C₁-C₆, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆, y más
 15 preferiblemente entre CF₃, alquilo C₁-C₆, halógeno, CN y NO₂.

El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-
 20 hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 6 átomos de carbono y más el grupo alquilo tiene entre 1 y 3 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como CF₃, alquilo C₁-C₆, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆, y más preferiblemente entre CF₃, halógeno, CN
 25 y NO₂.

Por "halógeno" se entiende en la presente invención a un átomo de bromo, cloro, yodo o flúor, preferiblemente bromo, cloro o yodo.

30 En una realización preferida de los compuestos de fórmula (II), R₁ a R₅ se seleccionan independientemente de entre H, CF₃, halógeno, alquilo C₁-C₆, CN, NO₂ o dos de los radicales R₁ a R₅ forman un ciclo condensado al fenilo.

Más preferiblemente R₅ es H y aún más preferiblemente al menos uno de R₁, R₂, R₃ o
 35 R₄ es Cl, Br, I, metilo, CF₃, CN o NO₂, más preferiblemente al menos uno de R₁, R₂, R₃ o R₄ es Cl, Br, I, CF₃, CN o NO₂.

Más preferiblemente R_5 es H y aún más preferiblemente dos de los radicales R_1 a R_4 forman un ciclo condensado al fenilo, más preferiblemente R_1 y R_2 forman un ciclo condensado al fenilo, aún más preferiblemente formando un naftilo.

5

En otra realización preferida, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son H.

En una realización más preferida el compuesto de fórmula (I) o (II) se selecciona de entre:

- 10 - 6-(benciltio)-9*H*-purina (1)
 - 6-((Naftalen-1-ilmetil)tio)-9*H*-purina (2)
 - 6-((3-(cianobencil)tio)-9*H*-purina (3)
 - 6-((2-(trifluorometil)bencil)tio)-9*H*-purina (4)
 - 6-((4-clorobencil)tio)-9*H*-purina (5)
 15 - 6-((3-clorobencil)oxi)-9*H*-purina (6)
 - 6-((3-(trifluorometil)bencil)tio)-9*H*-purina (7)
 - 6-((3-clorobencil)tio)-9*H*-purina (8)
 - 6-((3-iodobencil)tio)-9*H*-purina (9)
 - 6-((3-nitrobencil)tio)-9*H*-purina (10)
 20 - 6-((3-bromobencil)tio)-9*H*-purina (11)
 - 6-((4-bromobencil)tio)-9*H*-purina (12) y
 - 6-((2-bromobencil)tio)-9*H*-purina (13).

25 Preferiblemente la enfermedad relacionada con la proteína TDP-43 es una enfermedad neurológica o neurodegenerativa y se puede seleccionar fundamentalmente de entre esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal y enfermedad de Alzheimer, también se puede seleccionar entre la encefalopatía traumática crónica y el deterioro cognitivo asociado a la edad. Preferiblemente la enfermedad se selecciona entre esclerosis lateral amiotrófica, demencia
 30 frontotemporal, enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo asociado a la edad, aún más preferiblemente la enfermedad es esclerosis lateral amiotrófica.

Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto, a partir de ahora compuesto del segundo aspecto de la invención, que se selecciona de entre:

- 35 - 6-((Naftalen-1-ilmetil)tio)-9*H*-purina (2)
 - 6-((3-(cianobencil)tio)-9*H*-purina (3)

- 6-((4-clorobencil)tio)-9*H*-purina (5)
- 6-((3-clorobencil)oxi)-9*H*-purina (6)
- 6-((3-(trifluorometil)bencil)tio)-9*H*-purina (7)
- 6-((3-clorobencil)tio)-9*H*-purina (8)
- 5 - 6-((3-iodobencil)tio)-9*H*-purina (9)
- 6-((3-nitrobencil)tio)-9*H*-purina (10) y
- 6-((2-bromobencil)tio)-9*H*-purina (13).

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto del segundo aspecto de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente puede comprender otro principio activo.

15 Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de un compuesto del segundo aspecto de la invención para la fabricación de un medicamento.

20 Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I), (II) o por los compuestos del segundo aspecto de la invención, pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas

25 proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

30 Todos compuestos descritos en la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando

35 sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un

hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

5 Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), (II) o los compuestos del segundo aspecto de la presente invención, sus sales, solvatos o isómeros, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación
10 normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superior al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), (II) o los compuestos del segundo aspecto de la presente invención, o de sus sales, solvatos o isómeros.

15

En otro aspecto, la presente invención se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la invención, o un isómero, una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado del mismo, junto con un transportador o “carrier” farmacéuticamente aceptable, un excipiente o un vehículo, para la
20 administración a un paciente.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además otro principio activo.

25

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

30

Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, que comprende la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I), preferiblemente de fórmula (II), o de una composición farmacéutica que lo comprende, donde la enfermedad neurológica o neurodegenerativa es una enfermedad relacionada con la proteína TDP-
35 43 que se puede seleccionar fundamentalmente de entre esclerosis lateral amiotrófica,

demencia frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo asociado a la edad y encefalopatía traumática crónica.

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

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales o solvatos, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de
15 combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), preferiblemente un compuesto de fórmula (II), o una sal o solvato del mismo.

20 En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En
25 una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.).

30 En una realización preferida de la presente invención, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes agregantes (p.e. sirope, acacia, gelatina, sorbitol,
35 tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz,

fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinil pirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio.

5 Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

10 Las composiciones farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

15 Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

20 La administración de los compuestos o composiciones de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, intraperitoneal o intravenosa. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

25 La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0,1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

30 Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

35

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Muestra la correlación lineal entre la permeabilidad descrita y la experimental
15 de 10 compuestos comerciales empleando la metodología PAMPA.

FIG. 2. Muestra el efecto neuroprotector de los inhibidores de CDC7 (compuestos 1 y 8) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas previamente con ácido etacrínico (20 μ M) durante 12 horas en presencia o ausencia de los inhibidores a 10
20 μ M. Los datos representan la media de 4 experimentos diferentes $\pm$ SEM (* p <0.05)

FIG. 3. Muestra del efecto de los inhibidores de CDC7 (compuestos 1 y 8) en la fosforilación de TDP-43. Cuantificación y representación de los niveles de TDP-43 fosforilada mediante *western blot*.
25

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.
30

Ejemplo 1: síntesis de los nuevos compuestos de la invención.

Compuesto 1: 6-(benciltio)-9H-purina

Este compuesto está descrito en Pathak A.K. et al, *Journal of Medical Chemistry*,
35 2004, 47(1): 273-276.

Compuesto 2: 6-((Naftalen-1-ilmetil)tio)-9H-purina

Se disuelven 6-mercaptapurina monohidrato (300,0 mg, 1,76 mmoles) y K₂CO₃ (243,7 mg, 1,76 mmoles) en DMF (25 mL). Se mantiene la mezcla de reacción en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Se adiciona 1-(clorometil)naftaleno (311,4 mg, 1,76 mmoles) y se mantiene en agitación durante una noche a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente a presión reducida y se añade AcOEt (100 mL). La fase orgánica se lava con agua destilada (3 x 100 mL) añadiendo un poco de NaCl. Se seca sobre Mg₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. El crudo se purifica mediante columna cromatográfica empleando CH₂Cl₂/MeOH (10:1) como eluyente. De esta forma se obtiene el producto 2 en forma de sólido blanco (218,0 mg, 42 %). **¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 13,55 (s, 1H), 8,81 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,19 (dd, *J* = 8,3, 1,4 Hz, 1H), 7,96 (dd, *J* = 7,9, 1,5 Hz, 1H), 7,87 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,72 (dd, *J* = 7,1, 1,3 Hz, 1H), 7,63 – 7,52 (m, 2H), 7,45 (dd, *J* = 8,2, 7,0 Hz, 1H), 5,16 (s, 2H). **¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 158,2 (1C), 151,2 (1C), 149,4 (1C), 143,0 (1C), 133,5 (1C), 133,0 (1C), 131,1 (1C), 130,1 (1C), 128,7 (1C), 128,2 (1C), 127,7 (1C), 126,4 (1C), 126,0 (1C), 125,5 (1C), 123,7 (1C), 29,5 (1C). **HPLC**: Pureza > 99%, t.r. = 4,33 min. **MS (ES)**: *m/z* 293 [M+1]. **P.f.** 221 – 222 °C. **Análisis elemental (C₁₆H₁₂N₄S)** Calculado: C 65,73%, H 4,14%, N 19,16%, S 10,97%. Hallado: C 65,41%, H 4,07%, N 19,11%, S 10,99%.

Compuesto 3: 6-((3-(cianobencil)tio)-9H-purina

Se disuelven 6-mercaptapurina monohidrato (300,0 mg, 1,76 mmoles) y K₂CO₃ (243,7 mg, 1,76 mmoles) en DMF (25 mL). Se mantiene la mezcla de reacción en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Se adiciona 3-(bromometil)benzonitrilo (345,6 mg, 1,76 mmoles) y se mantiene en agitación durante una noche a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente a presión reducida y se añade AcOEt (100 mL). La fase orgánica se lava con agua destilada (3 x 100 mL) añadiendo un poco de NaCl. Se seca sobre Mg₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. No es necesario purificar mediante columna cromatográfica. De esta forma se obtiene el producto 3 en forma de sólido blanco (438,7 mg, 93 %). **¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 13,57 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,93 (t, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,85 – 7,79 (m, 1H), 7,71 (dt, *J* = 7,8, 1,4 Hz, 1H), 7,52 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,70 (s, 2H). **¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 156,9 (1C), 151,4 (1C), 150,2 (1C), 143,5 (1C), 140,1 (1C), 134,0 (1C), 132,4 (1C), 130,9 (1C), 129,7 (2C), 118,6 (1C), 111,3 (1C), 30,7 (1C). **MS (ES)**: *m/z* 268 [M+1].

P.f. 189 – 191 °C. **Análisis elemental (C₁₃H₉N₅S)** Calculado: C 58,41%, H 3,39%, N 26,20%, S 12,00%. Hallado: C 58,46%, H 3,47%, N 26,03%, S 11,84%.

Compuesto 4: 6-((2-(trifluorometil)bencil)tio)-9H-purina

5 Este compuesto está descrito en Kamper C. et al., *Mol Diversity*, 2012, 16(3):541-551.

Compuesto 5: 6-((4-clorobencil)tio)-9H-purina

Se disuelven 6-mercaptapurina monohidrato (300,0 mg, 1,76 mmoles) y K₂CO₃ (243,7 mg, 1,76 mmoles) en DMF (25 mL). Se mantiene la mezcla de reacción en agitación
10 durante 1 h a temperatura ambiente. Se adiciona bromuro de 4-clorobenceno (362,3 mg, 1,76 mmoles) y se mantiene en agitación durante una noche a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente a presión reducida y se añade AcOEt (100 mL). La fase orgánica se lava con agua destilada (3 x 100 mL) añadiendo un poco de NaCl. Se seca sobre Mg₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. El crudo se
15 purifica mediante columna cromatográfica empleando CH₂Cl₂/MeOH (10:1) como eluyente. De esta forma se obtiene el producto 5 en forma de sólido blanco (387,2 mg, 79 %). **¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆):** δ 13,55 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,55 – 7,43 (m, 2H), 7,42 – 7,29 (m, 2H), 4,65 (s, 2H). **¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆):** δ 157,8 (1C), 151,4 (1C), 149,4 (1C), 143,2 (1C), 137,2 (1C), 131,7 (1C), 130,8 (2C),
20 130,0 (1C), 128,4 (2C), 30,8 (1C). **MS (ES):** m/z 279 [M+3], 277 [M+1]. **P.f.** 198 – 200 °C. **Análisis elemental (C₁₂H₉ClN₄S)** Calculado: C 52,08%, H 3,28%, N 20,24%, S 11,59%. Hallado: C 52,19%, H 3,28%, N 20,27%, S 11,59%.

Compuesto 6: 6-((3-clorobencil)oxi)-9H-purina

25 Se disuelve 3-clorobencil alcohol (2766,2 mg, 19,40 mmoles) en NaOH (155,2 mg, 3,88 mmoles) y se calienta hasta la disolución del NaOH. Se enfría la disolución, se añade 6-cloro-9H-purina (300,0 mg, 1,94 mmoles) y se calienta a reflujo (100 °C) durante 1 día. Se añade Et₂O (120 mL) y se extrae 2 veces con una disolución acuosa de NaOH 1% (70 mL). Se juntan las fases acuosas, se lava con tolueno y, después de
30 eliminar el tolueno, se neutraliza con HCl 37% hasta pH 6-8. Se enfría la disolución en un baño de hielo y el precipitado obtenido se recoge por filtración. El crudo se purifica mediante columna cromatográfica empleando CH₂Cl₂/MeOH (10:1) como eluyente. De esta forma se obtiene el producto 6 en forma de sólido blanco (153,7 mg, 30 %). **¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆):** δ 13,48 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 7,60 (s, 1H),
35 7,53 – 7,45 (m, 1H), 7,45 – 7,38 (m, 2H), 5,62 (s, 2H). **¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆):** δ 158,4 (1C), 155,4 (1C), 151,2 (1C), 143,0 (1C), 139,0 (1C), 133,1 (1C), 130,4 (1C),

128,0 (1C), 127,9 (1C), 126,7 (1C), 118,0 (1C), 66,7 (1C). **P.f.** 197 – 199 °C. **Análisis elemental (C₁₂H₉ClN₄O)** Calculado: C 55,29%, H 3,48%, N 21,49%. Hallado: C 55,12%, H 3,51%, N 21,34%.

5 **Compuesto 7: 6-((3-(trifluorometil)bencil)tio)-9H-purina**

Se disuelven 6-mercaptapurina monohidrato (300,0 mg, 1,76 mmoles) y K₂CO₃ (243,7 mg, 1,76 mmoles) en DMF (25 mL). Se mantiene la mezcla de reacción en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Se adiciona bromuro de 3-(trifluorometil)bencilo (421,4 mg, 1,76 mmoles) y se mantiene en agitación durante una noche a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente a presión reducida y se añade AcOEt (100 mL). La fase orgánica se lava con agua destilada (3 x 100 mL) añadiendo un poco de NaCl. Se seca sobre Mg₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. El crudo se purifica mediante columna cromatográfica empleando CH₂Cl₂/MeOH (10:1) como eluyente. De esta forma se obtiene el producto 7 en forma de sólido blanco (283,3 mg, 52 %). **¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 13,57 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,86 (s, 1H), 7,79 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,65 – 7,49 (m, 2H), 4,74 (s, 2H). **¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 157,2 (1C), 151,4 (1C), 150,2 (1C), 143,5 (1C), 139,8 (1C), 133,1 (1C), 129,5 (2C), 129,1 (c, *J* = 31,4 Hz, 1C), 125,5 (c, *J* = 3,9 Hz, 1C), 124,1 (m, 1C), 123,8 (c, *J* = 3,9 Hz, 1C), 30,9 (1C). **MS (ES)**: *m/z* 311 [M+1]. **P.f.** 180 – 182 °C. **Análisis elemental (C₁₃H₉F₃N₄S)** Calculado: C 50,32%, H 2,92%, N 18,06%, S 10,33%. Hallado: C 50,49%, H 3,03%, N 18,03%, S 10,32%.

Compuesto 8: 6-((3-Clorobencil)tio)-9H-purina

Se disuelven 6-mercaptapurina monohidrato (300,0 mg, 1,76 mmoles) y K₂CO₃ (243,7 mg, 1,76 mmoles) en DMF (25 mL). Se mantiene la mezcla de reacción en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Se adiciona bromuro de 3-clorobencilo (362,3 mg, 1,76 mmoles) y se mantiene en agitación durante una noche a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente a presión reducida y se añade AcOEt (100 mL). La fase orgánica se lava con agua destilada (3 x 100 mL) añadiendo un poco de NaCl. Se seca sobre Mg₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. El crudo se purifica mediante columna cromatográfica empleando CH₂Cl₂/MeOH (10:1) como eluyente. De esta forma se obtiene el producto 8 en forma de sólido blanco (233,1 mg, 48 %). **¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 13,56 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,54 (t, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,47 – 7,40 (m, 1H), 7,39 – 7,27 (m, 2H), 4,66 (s, 2H). **¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 157,3 (1C), 151,4 (1C), 149,5 (1C), 143,4 (1C), 140,8 (1C), 132,9 (1C), 130,3 (2C), 128,8 (1C), 127,7 (1C), 127,1 (1C), 30,9 (1C). **MS (ES)**: *m/z* 279

[M+3], 277 [M+1]. **P.f.** 167 – 169 °C. **Análisis elemental (C₁₂H₉ClN₄S)** Calculado: C 52,08%, H 3,28%, N 20,24%, S 11,59%. Hallado: C 51,98%, H 3,28%, N 20,21%, S 11,58%.

5 **Compuesto 9: 6-((3-iodobencil)tio)-9H-purina**

Se disuelven 6-mercaptapurina monohidrato (300,0 mg, 1,76 mmoles) y K₂CO₃ (243,7 mg, 1,76 mmoles) en DMF (25 mL). Se mantiene la mezcla de reacción en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Se adiciona bromuro de 3-iodobencilo (523,5 mg, 1,76 mmoles) y se mantiene en agitación durante 4 h a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente a presión reducida y se añade AcOEt (100 mL). La fase orgánica se lava con agua destilada (3 x 100 mL) añadiendo un poco de NaCl. Se seca sobre Mg₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. No es necesario purificar mediante columna cromatográfica. De esta forma se obtiene el producto 9 en forma de sólido amarillo pálido (379,6 mg, 58 %). **¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 13,56 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,85 (t, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,60 (dt, *J* = 7,6, 1,4 Hz, 1H), 7,48 (dt, *J* = 7,6, 1,4 Hz, 1H), 7,11 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,61 (s, 2H). **¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 157,3 (1C), 151,4 (1C), 149,8 (1C), 143,4 (1C), 140,8 (1C), 137,4 (1C), 135,8 (1C), 130,6 (1C), 129,8 (1C), 128,4 (1C), 94,7 (1C), 30,7 (1C). **P.f.** 185 – 187 °C. **Análisis elemental (C₁₂H₉IN₄S)** Calculado: C 39,14%, H 2,46%, N 15,22%, S 8,71%. Hallado: C 39,26%, H 2,53%, N 15,05%, S 8,58%.

Compuesto 10: 6-((3-nitrobencil)tio)-9H-purina

Se disuelven 6-mercaptapurina monohidrato (300,0 mg, 1,76 mmoles) y K₂CO₃ (243,7 mg, 1,76 mmoles) en DMF (25 mL). Se mantiene la mezcla de reacción en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Se adiciona bromuro de 3-nitrobencilo (380,9 mg, 1,76 mmoles) y se mantiene en agitación 3 h a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente a presión reducida y se añade AcOEt (100 mL). La fase orgánica se lava con agua destilada (3 x 100 mL) añadiendo un poco de NaCl. Se seca sobre Mg₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. No es necesario purificar mediante columna cromatográfica. De esta forma se obtiene el producto 10 en forma de sólido amarillo pálido (460,6 mg, 91 %). **¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 13,58 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,36 (t, *J* = 2,0 Hz, 1H), 8,09 (ddd, *J* = 8,4, 2,3, 1,1 Hz, 1H), 7,94 (dt, *J* = 7,8, 1,2 Hz, 1H), 7,60 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,79 (s, 2H). **¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 156,8 (1C), 151,4 (1C), 150,2 (1C), 147,7 (1C), 143,6 (1C), 140,9 (1C), 135,7 (1C), 129,9 (2C), 123,6 (1C), 122,0 (1C), 30,6 (1C). **P.f.** 193 – 195 °C. **Análisis**

elemental (C₁₂H₉N₅O₂S) Calculado: C 50,17%, H 3,16%, N 24,38%, S 11,16%.
Hallado: C 50,07%, H 2,76%, N 24,15%, S 11,05%.

Compuesto 11: 6-((3-bromobencil)tio)-9H-purina

5 Este compuesto está descrito en Kamper C. et al., *Mol Diversity*, 2012, 16(3):541-551.

Compuesto 12: 6-((4-bromobencil)tio)-9H-purina

Este compuesto está descrito en Kamper C. et al., *Mol Diversity*, 2012, 16(3):541-551.

10 **Compuesto 13: 6-((2-bromobencil)tio)-9H-purina**

Se disuelven 6-mercaptapurina monohidrato (300,0 mg, 1,76 mmoles) y K₂CO₃ (243,7 mg, 1,76 mmoles) en DMF (25 mL). Se mantiene la mezcla de reacción en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Se adiciona el bromuro de 2-bromobencilo (440,6 mg, 1,76 mmoles) y se mantiene en agitación durante 4 h a temperatura ambiente. Se
15 evapora el disolvente a presión reducida y se añade AcOEt (100 mL). La fase orgánica se lava con agua destilada (3 x 100 mL) añadiendo un poco de NaCl. Se seca sobre Mg₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. No es necesario purificar mediante columna cromatográfica. De esta forma se obtiene el producto 13 en forma de sólido blanco (438,7 mg, 93 %). **¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆):** δ 13,58
20 (s, 1H), 8,76 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,66 (dt, J = 7,9, 1,8 Hz, 2H), 7,33 (td, J = 7,5, 1,4 Hz, 1H), 7,22 (td, J = 7,6, 1,8 Hz, 1H), 4,74 (s, 2H). **¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆):** δ 157,7 (1C), 151,5 (1C), 149,4 (1C), 143,2 (1C), 136,8 (1C), 132,8 (1C), 131,5 (1C), 130,1 (1C), 129,6 (1C), 128,0 (1C), 124,2 (1C), 32,4 (1C).

P.f. 209 – 211 °C. **Análisis elemental (C₁₂H₉BrN₄S)** Calculado: C 44,87%, H 2,82%,
25 N 17,44%, S 9,98%. Hallado: C 44,96%, H 2,83%, N 17,43%, S 9,97%.

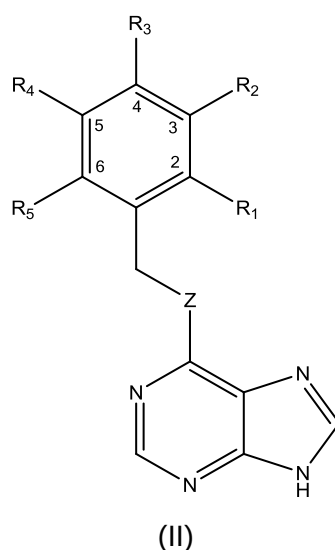
Ejemplo 2: Medida de la inhibición de CDC7

El método utilizado es un ensayo de inhibición enzimática no radiactivo utilizando
30 CDC7 recombinante humana. Éste se basa en la cuantificación luminométrica de la inhibición utilizando el Kit de Quinasa ADP-Glo™. En este ensayo la señal luminiscente se correlaciona positivamente con la cantidad de adenosin difosfato (ADP) y la actividad de la quinasa. Todos los compuestos se evaluaron a una concentración fija de 10 μM. Para aquellos compuestos con un porcentaje de
35 inhibición mayor del 50%, se lleva a cabo un estudio dosis-respuesta determinándose

su valor de CI_{50} (concentración de compuesto capaz de inhibir al 50% la función de CDC7).

Los estudios de inhibición enzimática de CDC7 se llevaron a cabo utilizando el kit de promega: ADP-Glo™ *Kinase Assay* + CDC7/DBF4 *Kinase Enzyme System* (nº de catálogo V5089). El ATP y otros reactivos se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los ensayos fueron realizados en una solución tampón utilizando placas de 96 pocillos. El compuesto a ensayar (5 μ L, 40 μ M disuelto en DMSO 4 %) se añadió a cada pocillo seguido de la enzima (5 μ L, 25 ng/pocillo), ATP (5 μ L, concentración final en el pocillo 10 μ M) y PDKtidE (5 μ L, 4 μ g/pocillo). A continuación, se dejó incubar durante 60 min a temperatura ambiente y se añadió el reactivo ADP-Glo™ (20 μ L) dejándose incubar nuevamente durante 40 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, se añadió el agente de detección de quinasa (40 μ L) y se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, se midió la luminiscencia (tiempo de integración de 0,5 – 1 seg) usando un polarímetro POLARstar *Optima multimode reader*. Las actividades de inhibición se calcularon en función de la actividad máxima, medida en ausencia de inhibidor. Los valores de inhibición determinados para los compuestos preparados se encuentran recogidos en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de inhibición en CDC7 de los compuestos de fórmula (II):



5

10

15

20

Comp.	R ₁ a R ₅	Z	CDC7 Cl ₅₀ (μM)
1	H	S	6,74 ± 0,35
2	2,3-[(CH) ₄]	S	11,22 ± 0,84
3	3-CN	S	8,38 ± 0,27
4	2-CF ₃	S	9,73 ± 1,03
5	4-Cl	S	8,46 ± 1,05
6	3-Cl	O	8,98 ± 0,21
7	3-CF ₃	S	6,90 ± 0,83
8	3-Cl	S	5,21 ± 0,38
9	3-I	S	3,34 ± 0,27
10	3-NO ₂	S	6,54 ± 0,32
11	3-Br	S	5,29 ± 0,71
12	4-Br	S	9,14 ± 0,79
13	2-Br	S	6,24 ± 0,99

Ejemplo 3: Predicción del paso de barrera hematoencefálica

25

30

35

Un requisito imprescindible que deben cumplir los fármacos destinados al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas es la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) ya que, en caso contrario, no podrían actuar sobre la diana de interés. Por tanto, para los compuestos no permeables o situados en la zona de incertidumbre, podría ser necesario que fueran vehiculizados adecuadamente en su formulación farmacéutica mediante métodos conocidos por un experto en la materia como por ejemplo mediante encapsulación. Esta capacidad puede predecirse *in vitro* utilizando un método conocido con las siglas PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) descrito por Di y colaboradores (Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. *Eur. J. Med. Chem.*, 2003, 38 (3), 223-232) y que posteriormente ha sido puesto a punto en nuestro grupo de investigación. Dicho

método permite predecir la permeabilidad efectiva a través de membranas artificiales mediante un proceso de difusión pasiva.

5 En primer lugar, es preciso validar el método, para lo cual se utilizan 10 compuestos comerciales cuya capacidad de penetración en el sistema nervioso central (SNC) es conocida que se especificarán a continuación, obteniéndose en este caso una buena correlación lineal entre los valores de permeabilidad (P_e) experimentales y los descritos (FIG. 1). Esta recta de correlación obtenida siguiendo el patrón descrito en la bibliografía permite establecer los límites para predecir si un compuesto puede
10 atravesar o no la barrera hematoencefálica. Así, se considera que un compuesto es permeable a la BHE (SNC+) si presenta una permeabilidad $> 4,48 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

Para el procedimiento, se tomaron entre 3-5 mg de cafeína, desipramina, enoxacino, hidroclorona, ofloxacino, piroxicam y testosterona, 12 mg de promazina y 25 mg de
15 atenolol y verapamilo, y se disolvieron en EtOH (1000 μL). Se tomaron 100 μL de estas disoluciones y se añadieron EtOH (1400 μL) y tampón fosfato (PBS) pH = 7,4 (3500 μL) con el fin de alcanzar una concentración final de EtOH del 30% v/v en disolución. Por último, se filtraron las disoluciones.

20 Por otro lado, se añadió una disolución de PBS/EtOH (70:30) a cada pocillo de la placa aceptora (180 μL). La placa donadora fue impregnada con una disolución de lípido de cerebro porcino (4 μL) disuelto en dodecano (20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Una vez transcurridos 5 min, se añadió disolución de cada compuesto sobre esta placa (180 μL).

25 De los compuestos 1 a 10 evaluados, se tomaron entre 1-2 mg y se disolvieron en EtOH (1500 μL) y tampón fosfato (PBS) pH = 7,4 (3500 μL), se filtraron y se añadieron a la placa donadora. Con estas disoluciones, se determinan las longitudes de onda a las cuales absorben los compuestos y se miden los niveles de absorbancia inicial a
30 estas longitudes de onda empleando un lector de absorbancia de UV. Cada muestra fue analizada de dos a cinco longitudes de onda, en tres pocillos y en dos experimentos independientes.

35 A continuación, la placa donadora se depositó sobre la aceptora formando una especie de "sándwich" y se dejaron incubar durante 2 h y 30 min a 25 °C. De esta forma, los compuestos irán pasando de la placa donadora a la placa aceptora a través

del lípido de cerebro porcino mediante difusión pasiva. Transcurrido ese tiempo, se retira cuidadosamente la placa donadora y se determinan la concentración y absorbancia final tanto de los compuestos comerciales como de los sintetizados. Los resultados obtenidos se expresan como la media de las medidas [desviación estándar (SD)] de los distintos experimentos realizados y se encuentran recogidos en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de permeabilidad (Pe 10^{-6} cm s $^{-1}$) en el experimento PAMPA-BHE y predicción de la penetración en el sistema nervioso central (SNC) de los compuestos de fórmula (II) como se describen también en la tabla 1:

Comp.	R ₁ a R ₅	Z	Pe (10^{-6} cm s $^{-1}$)	PAMPA predicción
1	H	S	$6,2 \pm 1,1$	SNC+
2	2,3-[(CH) ₄]	S	$13,2 \pm 2,0$	SNC+
3	3-CN	S	$2,3 \pm 0,2$	SNC+/-
4	2-CF ₃	S	$17,5 \pm 0,9$	SNC+
5	4-Cl	S	$12,2 \pm 1,2$	SNC+
6	3-Cl	O	$7,2 \pm 0,6$	SNC+
7	3-CF ₃	S	$16,3 \pm 0,6$	SNC+
8	3-Cl	S	$15,1 \pm 0,6$	SNC+
9	3-I	S	$13,8 \pm 2,5$	SNC+
10	3-NO ₂	S	$3,9 \pm 0,4$	SNC+/-

Ejemplo 4: Efecto neuroprotector de los inhibidores de CDC 7 frente al ácido etacrínico

La línea celular de neuroblastoma humana SH-SY5Y, se cultivó a 37°C con un 5% de CO₂ en medio DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enriquecido con L-glutamina (2mM), 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de Penicilina/Estreptomicina y un 10% de suero fetal bobino. En el estado de semiconfluencia, las células fueron tratadas con los inhibidores de CDC7 (compuestos 1 y 8) a diferentes concentraciones

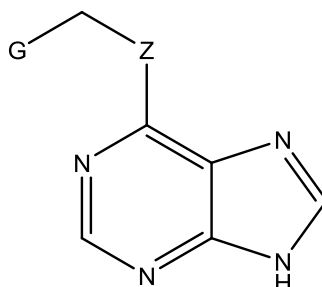
durante 1,30 horas *post*-adición del agente causante de la fosforilación de TDP-43; ácido etacrínico (20 μ M) (Sigma). A las 24 horas se evaluó la viabilidad celular con MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) siguiendo un procedimiento descrito (Denizot F, Lang R. *J Immunol Methods*. 1987; 89:271-7) y los niveles de TDP-43 fosforilada mediante western blot (FIG. 2).

Ejemplo 5: Efecto de los inhibidores de CDC 7 en la fosforilación de TDP-43

Para evaluar los niveles de TDP-43 fosforilada en presencia de los inhibidores de CDC7 (compuestos 1 y 8), las células tras 24 h de incubación con el ácido etacrínico, fueron lavadas con PBS y posteriormente lisadas en frío con tampón de lisis (50mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% Nonidet P-40 y Proteasa e inhibidores de fosfatasa (Roche)). Los extractos celulares recogidos se centrifugaron durante 10 minutos a 4.000 rpm. La cuantificación de proteínas se realizó con el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific). 10 μ g de proteína se cargaron en el gel de poliacrilamida con SDS y posteriormente se transfirieron a una membrana de fluoruro de poli-vinilideno (PVDF) (Millipore). La membrana fue bloqueada con albumina de suero bovino al 5% (Sigma), e incubada durante 12 horas con las siguientes concentraciones de anticuerpos primarios (anti-fosfo(S409/410)-TDP-43 humana (1:500) (22309-1AP, Proteintech); α -tubulina (1:1.000) (sc-23948, Santa Cruz Biotechnologies). La amplificación de la señal se llevó a cabo con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano, correspondientes a la especie utilizada en el anticuerpo primario (Bio-Rad). La densidad de las bandas se cuantificó con el programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). La FIG. 3 muestra que el tratamiento de las células con los inhibidores de CDC7 (compuestos de la invención 1 y 8) permitió reducir la fosforilación de TDP-43.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I)



(I)

donde:

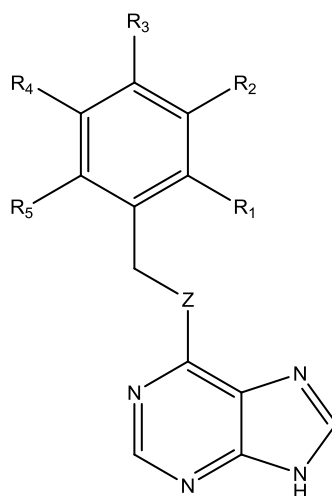
G representa un grupo que se selecciona de entre arilo, heteroarilo o alquilo C₁-C₁₀, cualquiera de ellos opcionalmente sustituido por al menos un sustituyente seleccionado de entre CF₃, alquilo C₁-C₆, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆, u opcionalmente sustituido por dos sustituyentes formando un ciclo condensado al grupo G cuando es un arilo o heteroarilo, y

Z se selecciona de entre O o S;

o cualquiera de sus sales, solvatos o isómeros farmacéuticamente aceptables para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de patologías relacionadas con la proteína TDP-43.

2. Uso según la reivindicación 1, donde G es un grupo arilo, opcionalmente sustituido por al menos un sustituyente seleccionado de entre CF₃, alquilo C₁-C₆, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆, u opcionalmente sustituido por dos sustituyentes formando un ciclo condensado al arilo.

3. Uso según la cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde G es un grupo fenilo y el compuesto es de fórmula (II):



(II)

5 donde R₁ a R₅ se seleccionan independientemente de entre H, CF₃, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, alquilo C₁-C₆, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆, o dos de los radicales R₁ a R₅ forman un ciclo condensado al fenilo; y
Z se describe en la reivindicación 1.

10 4. Uso según la reivindicación 3, donde R₁ a R₅ se seleccionan independientemente de entre H, CF₃, halógeno, alquilo C₁-C₆, CN y NO₂ o dos de los radicales R₁ a R₅ forman un ciclo condensado al fenilo.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, donde R₅ es H.

15 6. Uso según la reivindicación 4, donde al menos uno de R₁, R₂, R₃ o R₄ es Cl, Br o I y R₅ es H.

7. Uso según la reivindicación 4, donde al menos uno de R₁, R₂, R₃ o R₄ es metilo, CF₃, CN o NO₂ y R₅ es H.

20 8. Uso según la reivindicación 4, donde dos de los radicales R₁ a R₄ forman un ciclo condensado al fenilo y R₅ es H.

9. Uso según la reivindicación 8, donde R₁ y R₂ forman un ciclo condensado al fenilo.

25 10. Uso según la reivindicación 4, donde R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ son H.

11. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona de entre:

- 6-(benciltio)-9*H*-purina
- 6-((naftalen-1-ilmetil)tio)-9*H*-purina
- 6-((3-(cianobencil)tio)-9*H*-purina
- 6-((2-(trifluorometil)bencil)tio)-9*H*-purina
- 5 - 6-((4-clorobencil)tio)-9*H*-purina
- 6-((3-clorobencil)oxi)-9*H*-purina
- 6-((3-(trifluorometil)bencil)tio)-9*H*-purina
- 6-((3-clorobencil)tio)-9*H*-purina
- 6-((3-iodobencil)tio)-9*H*-purina
- 10 - 6-((3-nitrobencil)tio)-9*H*-purina
- 6-((3-bromobencil)tio)-9*H*-purina
- 6-((4-bromobencil)tio)-9*H*-purina y
- 6-((2-bromobencil)tio)-9*H*-purina.

- 15 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la enfermedad relacionada con la proteína TDP-43 es una enfermedad neurológica.

- 20 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la enfermedad relacionada con la proteína TDP-43 es una enfermedad neurológica que se selecciona de entre esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo asociado a la edad y encefalopatía traumática crónica.

- 25 14. Uso según la reivindicación 13, donde la enfermedad se selecciona de entre esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal y enfermedad de Alzheimer.

- 30 15. Compuesto que se selecciona de entre:
 - 6-((Naftalen-1-ilmetil)tio)-9*H*-purina
 - 6-((3-(cianobencil)tio)-9*H*-purina
 - 6-((4-clorobencil)tio)-9*H*-purina
 - 6-((3-clorobencil)oxi)-9*H*-purina
 - 6-((3-(trifluorometil)bencil)tio)-9*H*-purina
 - 6-((3-clorobencil)tio)-9*H*-purina
 - 35 - 6-((3-iodobencil)tio)-9*H*-purina
 - 6-((3-nitrobencil)tio)-9*H*-purina y

- 6-((2-bromobencil)tio)-9*H*-purina .

16. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según se describe en la reivindicación 15 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

17. Uso de un compuesto según se describe en la reivindicación 15 para la fabricación de un medicamento.

10

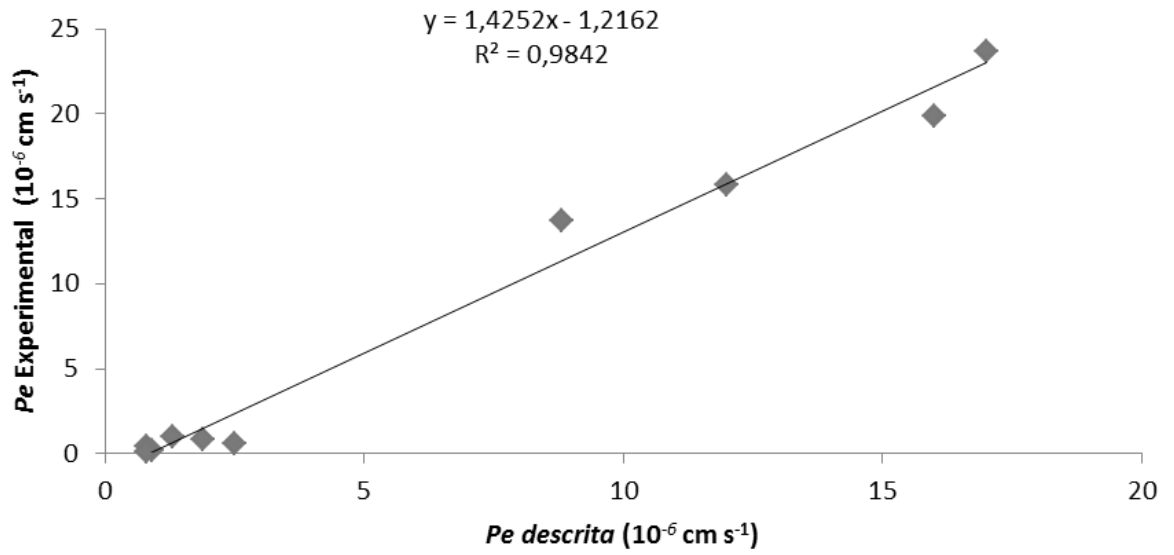


FIG. 1

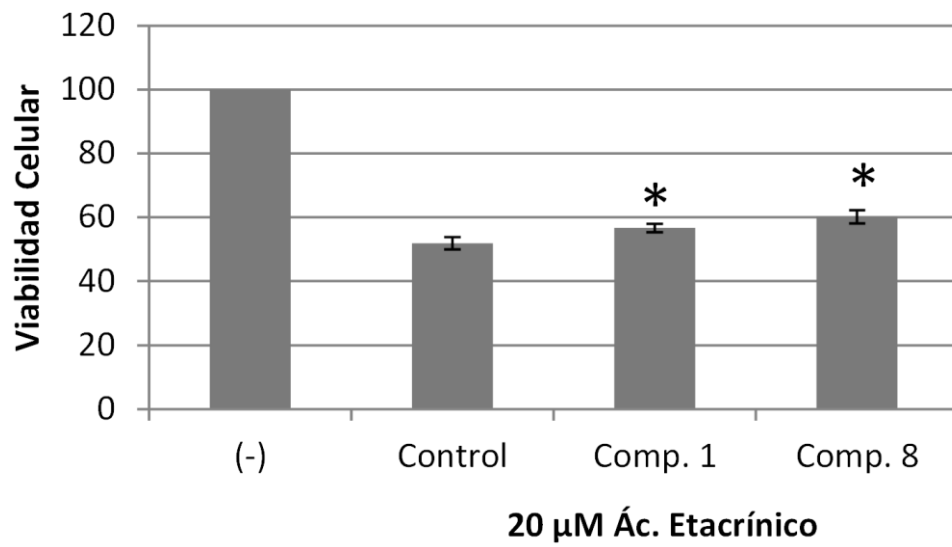


FIG. 2

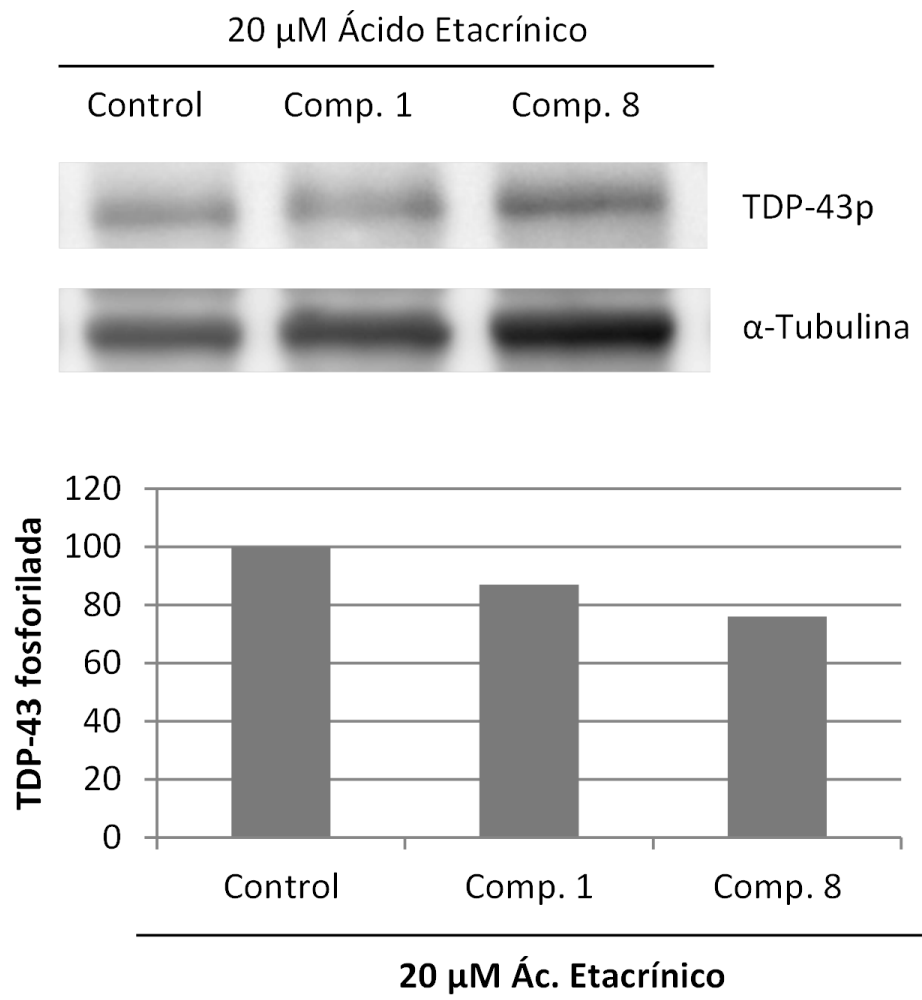


FIG. 3