

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 927**

21 Número de solicitud: 201400229

51 Int. Cl.:

C07D 473/30 (2006.01)

C07D 473/34 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

21.03.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.10.2015

Fecha de la concesión:

04.08.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

11.08.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070203

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (83.4%)
Hospital Real. Avda. del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES y
UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF
EDINBURGH (16.6%)

72 Inventor/es:

MOLINA PINEDA DE LAS INFANTAS , Ignacio ;
TORRES RUSILLO , Sara ;
FERNÁNDEZ RUBIO , Pablo ;
PINEDA DE LAS INFANTAS Y VILLATORO , María
José ;
DÍAZ MOCHÓN , Juan José y
UNICITI BROCETA , Asier

54 Título: **Derivados de purina como inhibidores de Dapk-1**

57 Resumen:

Derivados de purina como inhibidores de DAPK-1.
La presente invención describe una nueva familia de
derivados de purina que actúan como inhibidores
selectivos de DAPK1. Se describe también el proceso
para la obtención de los compuestos farmacéuticos y
su uso como medicamento para el tratamiento o la
profilaxis de enfermedades que precisan la inhibición
de DAPK1, especialmente para el tratamiento del
cáncer.

ES 2 548 927 B1

DESCRIPCIÓN

DERIVADOS DE PURINA COMO INHIBIDORES DE DAPK-1**CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a una nueva familia de derivados de purina. Estos
5 compuestos son inhibidores selectivos de DAPK1. Por lo tanto la presente invención,
también se relaciona con el proceso para la obtención de los compuestos farmacéuticos y su
uso como medicamentos para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades que precisan la
inhibición de DAPK1, especialmente para el tratamiento del cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION10 Cinasas en cáncer

En todo el mundo, se están aunando esfuerzos para comprender las bases moleculares del
cáncer, con el fin de mejorar las estrategias terapéuticas para el tratamiento del mismo
[Weinberg, R. A. - *Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of
multistepcarcinogenesis*. Cancer Res. 1989, 49, 3713-3721] [Vaccaro, V.; Gelibter, A.; Bria, E.;
15 Iapicca, P.; Cappello, P.; Di, M. F.; Pino, M. S.; Nuzzo, C.; Cognetti, F.; Novelli, F.; Nistico, P.;
Milella, M. - *Molecular and genetic bases of pancreatic cancer*. Curr. Drug Targets. 2012, 13,
731-743.]. En este campo en particular, las proteínas cinasas, pueden ser consideradas la base o
piedra angular de la mayoría de estos mecanismos moleculares. Las proteínas cinasas controlan
las vías y redes de señalización y comunicación intercelular, por lo que juegan un papel
20 fundamental en la regulación de las funciones celulares básicas y coordinación de las acciones
de las células. Como consecuencia, las cinasas están directamente involucradas en
enfermedades progresivas, incluyendo el cáncer. Por tanto, la inhibición de cinasas por
moléculas de pequeño tamaño es una forma muy atractiva para el desarrollo de nuevos fármacos
antitumorales y para dilucidar nuevas vías moleculares implicadas en el cáncer [Xi, L.; Zhang,
25 J. Q.; Liu, Z. C.; Zhang, J. H.; Yan, J. F.; Jin, Y.; Lin, J. - *Novel 5-anilinoquinazoline-8-nitro
derivatives as inhibitors of VEGFR-2 tyrosinekinase: synthesis, biological evaluation and
molecular docking*. Org. Biomol. Chem. 2013, 11, 4367-4378]. De hecho diez moléculas
pequeñas que actúan como inhibidores de cinasas han sido aprobadas por la FDA durante los
últimos cinco años, para su uso como fármacos antitumorales en humanos.

30 Se han caracterizado hasta la fecha un total de 518 proteínas cinasas que forman parte del
llamado cinoma humano [Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S.
– *The protein kinase complement of the human genome*. Science 2002, 298, 1912-1934.]. Esto

significa que hay un amplio campo en el que investigar para conocer las dianas farmacológicas y las rutas biológicas relacionadas con el cáncer que por el momento son desconocidas. Para hacer frente a este reto, deben prepararse nuevas colecciones de pequeñas moléculas y ensayarlas para modular la actividad de las cinasas en sistemas celulares y bioquímicos. Como

5 la mayoría de las pequeñas moléculas inhibidoras de cinasas que poseen un resto que se une al sitio de unión del ATP. Las colecciones de purinas poseen diferentes sustituyentes para tener mayor probabilidad de obtener compuestos bioactivos como inhibidores de cinasas [Huang, H.; Ma, J.; Shi, J.; Meng, L.; Jiang, H.; Ding, J.; Liu, H. - *Discovery of novel purine derivatives with potent and selective inhibitory activity against c-Src tyrosine kinase*. *Bioorg. Med. Chem.* 2010,

10 18, 4615-4624.] y, por tanto, los compuestos derivados de purinas han sido objeto de un amplio estudio en la química médica.

Hasta la fecha, la forma clásica para analizar estas colecciones es testar los compuestos frente a dianas identificadas previamente y después ensayar la selectividad frente a otras cinasas. Sin embargo, y gracias a los avances tecnológicos, se ha hecho más fácil ensayar

15 compuestos frente a distintas fracciones del cinoma humano. Este concepto fue estudiado por el grupo de Petterson en el año 2011, con sus ensayos de actividad catalítica cinasa para mostrar la selectividad del inhibidor [Anastassiadis, T.; Deacon, S. W.; Devarajan, K.; Ma, H.; Peterson, J. R. - *Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity*. *Nat. Biotechnol.* 2011, 29, 1039-1045]. En este estudio, se ensayaron 178

20 moléculas pequeñas inhibidoras de cinasas frente a 300 proteínas cinasas recombinantes. Los resultados mostraron algunas interacciones inesperadas lo cual demostraba posibles interacciones con otras cinasas no seleccionadas. Este estudio pone de manifiesto que hay que considerar que puede haber una potencial desviación de los resultados de los ensayos de estas pequeñas moléculas sobre las cinasas seleccionadas.

25

Función de DAPK1 orientado hacia células tumorales.

DAPK1 (Proteína cinasa asociada a muerte celular 1) es un mediador positivo de gamma interferón que induce muerte celular programada o apoptosis mediada por esta citocina [Deiss, L. P.; Feinstein, E.; Berissi, H.; Cohen, O.; Kimchi, A. - *Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death*. *Genes Dev.* 1995, 9, 15-30. Cohen, O.; Feinstein, E.; Kimchi, -

30 *A. DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity*. *EMBO J.* 1997, 16, 998-

1008. Cohen, O.; Inbal, B.; Kissil, J. L.; Raveh, T.; Berissi, H.; Spivak-Kroizaman, T.; Feinstein, E.; Kimchi, A. *-DAP-kinase participates in TNF- α -and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain.* J. Cell Biol. 1999, 146, 141-148.]

5 La eliminación por recombinación homóloga del gen DAPK-1 en un modelo de ratón confirió protección neuronal frente al daño cerebral producido por la isquemia, debido a la interrupción de la interacción con el receptor NMDA [Tu, W.; Xu, X.; Peng, L.; Zhong, X.; Zhang, W.; Soundarapandian, M. M.; Balel, C.; Wang, M.; Jia, N.; Zhang, W.; Lew, F.; Chan, S. L.; Chen, Y.; Lu, Y. - *DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates*
10 *brain damage in stroke.* Cell 2010, 140, 222-234.] lo que sugiere posibles aplicaciones clínicas de la diana DAPK-1. Este estudio demuestra por primera vez que la inhibición selectiva de DAPK-1 puede tener incidencia en la biología de las células tumorales.

El papel relevante de DAPK-1 en las vías proapoptóticas es destacado por el hecho de que
15 muchas células de leucemia linfocítica crónica regulan negativamente la expresión de la proteína y favorecen la progresión tumoral [Kissil, J. L.; Feinstein, E.; Cohen, O.; Jones, P. A.; Tsai, Y. C.; Knowles, M. A.; Eydmann, M. E.; Kimchi, A. *DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene.* Oncogene 1997, 15, 403-407. Raval, A.; Tanner, S. M.; Byrd, J. C.;
20 Angerman, E. B.; Perko, J. D.; Chen, S. S.; Hackanson, B.; Grever, M. R.; Lucas, D. M.; Matkovic, J. J.; Lin, T. S.; Kipps, T. J.; Murray, F.; Weisenburger, D.; Sanger, W.; Lynch, J.; Watson, P.; Jansen, M.; Yoshinaga, Y.; Rosenquist, R.; de Jong, P. J.; Coggill, P.; Beck, S.; Lynch, H.; de la, C. A.; Plass, C. - *Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia.* Cell 2007, 129, 879-890].

25

La función de esta enzima está sujeta a un mecanismo complejo. La actividad proapoptótica de la enzima necesita la integridad del “Dominio de Muerte” [Cohen O, Inbal B, Kissil JL, Raveh T, Berissi H, Spivak-Kroizaman T, Feinstein E, Kimchi A. *DAP-kinase participates in TNF- α - and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain.* J. Cell
30 Biol. 1999, 146, 141-148], pero los datos indican que las modificaciones post-transcripcionales pueden dar lugar a funciones opuestas en la proteína. Por ejemplo, la autofosforilación frena la actividad apoptótica de los miembros de la familia DAPK [Shani, G.; Henis-Korenblit, S.; Jona, G.; Gileadi, O.; Eisenstein, M.; Ziv, T.; Admon, A.; Kimchi, A. - *Autophosphorylation restrains the apoptotic activity of DRP-1 kinase by controlling*

dimerization and calmodulin binding. EMBO J. 2001, 20, 1099-1113.] y la interrupción de la interacción de catepsina B-DAPK-1 rompe un complejo multiproteico, cuyo daño sensibiliza a las células a la apoptosis [Lin, Y.; Stevens, C.; Hupp, T. - *Identification of a dominant negative functional domain on DAPK-1 that degrades DAPK-1 protein and stimulates TNFR-1-mediated apoptosis*. J. Biol. Chem. 2007, 282, 16792-16802].

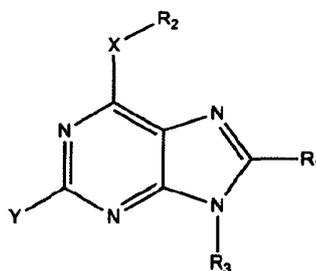
Síntesis de purinas poli-sustituidas

Hace una década algunos de los autores de la presente invención [Baraldi, P. G., Broceta, A. U., Pineda de las Infantas, M. J. Mochon, J. J. D. , Espinosa, A., and Romagnoli, R. *An efficient one-pot synthesis of 6-alkoxy-8,9-dialkylpurines via reaction of 5-amino-4-chloro-6-alkylaminopyrimidines with N,N-dimethylalkaneamides and alkoxide ions*. Tetrahedron 2002, 58, 7607-7611] describieron una síntesis en un solo paso de purinas poli-sustituidas a partir de 4-alquilamino-5-amino-6-cloropirimidinas, alcóxidos primarios y N,N-dimetilformamida o N,N-dimetilacetamida. Propusimos que las especies reactivas que conducen a los análogos de purina poli-sustituida con H o metilo en el C-8 (dependiendo de la amida empleada), se generaban *in situ* por reacción entre la amida y los alcóxidos. La sustitución nucleofílica aromática del átomo de cloro en el C-6 por varios alcóxidos y el radical R₃ de la pirimidina se usaron para aumentar la diversidad estructural que conduce a una gran variedad de derivados de purina.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El primer aspecto de la presente invención se refiere a una familia de derivados de purina de fórmula I:



(I)

25

donde:

R₁ puede ser H, cadenas alquílicas de 1 a 6 átomos de carbono, lineales o ramificadas o radicales aromáticos sustituidos o no.

R₂ puede ser H, cadenas alquílicas de 1 a 6 átomos de carbono, lineales o ramificadas, radicales aromáticos sustituidos o no o radicales arilalquilo sustituidos o no.

R₃ puede ser H, cadenas alquílicas de 1 a 6 átomos de carbono, lineales o ramificadas o radicales aromáticos sustituidos o no o radicales arilalquilo sustituidos o no.

5 X puede ser -O-, -NH-, -S-, -CH₂-

Y puede ser -H-, -OH-, -NH₂-, -SH, halógeno, nitro, alquiltio, alquiloxi, alquilamino, ariltio, ariloxi o arilamino.

Y cualquiera de los tautómeros, estereoisómeros, sales, solvatos, hidratos o profármacos de los mismos.

10 Un segundo aspecto de la invención es un compuesto de Fórmula I, como ya se definió antes para su uso como medicamento.

Un tercer aspecto de la invención es un compuesto de Fórmula I, como se definió antes para su uso como medicamento para enfermedades o afecciones mediadas por DAPK-1.

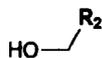
15 Un aspecto adicional de la invención es el uso del compuesto de Fórmula I, como se definió antes en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por DAPK-1.

Otro aspecto es una composición farmacéutica que contenga una cantidad terapéutica efectiva de al menos un compuesto de Fórmula I o cualquiera de sus tautómeros, estereoisómeros, sales, solvatos, hidratos o profármacos de los mismos como hemos definido

20 antes y al menos un vehículo o coadyuvante aceptable farmacológicamente.

Un aspecto adicional es un proceso para preparar un compuesto de Fórmula I como se definió anteriormente que comprenda las siguientes etapas:

a) proporcionar un alcohol de fórmula:

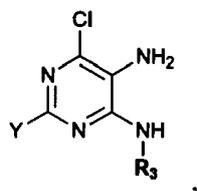


25 b) adicionar hidruro sódico

c) adicionar dimetilamida de fórmula:



d) adicionar 6-cloro-4,5-diaminopirimidina de fórmula:



e) obtención de un crudo que contiene el compuesto de Fórmula (I);

En la que en las etapas anteriores a) hasta d) se puede calentar y usar disolventes orgánicos tales como dioxano y tetrahidrofurano y R1, R2, R3 e Y tienen los significados indicados sobre los compuestos de Fórmula I.

Otro aspecto más, es un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un humano, en el que se necesite inhibir a DAPK-1, que comprendería la administración al individuo afectado de una dosis terapéuticamente activa de un compuesto como se define en las reivindicaciones 1 a 11.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra el efecto antiproliferativo de los compuestos sintetizados sobre células Jurkat, que fueron tratadas durante 48 horas con los compuestos indicados y dosis 50 μ M (barras grises) y 100 μ M (barras oscuras). La proliferación se evaluó por el método colorimétrico rápido del MTT y los resultados se expresan como porcentajes de inhibición frente a los resultados obtenidos con células no tratadas. Las células fueron también incubadas con la cantidad equivalente de DMSO usado como vehículo para cada una de las dosis para excluir una inhibición del crecimiento no específico.

Figura 2. Efecto de los compuestos sobre el ciclo celular de células Jurkat. Las células Jurkat, se incubaron durante 24 horas, en presencia de los compuestos indicados y dosis o sus cantidades equivalentes de DMSO usado como vehículo. Los ciclos celulares se estudiaron por Citometría de Flujo después de permeabilización de las células y tinción con yoduro de propidio. El porcentaje de células en fase sub-G1, se indica en la figura.

Figura 3. La activación del ciclo celular de las caspasas después del tratamiento de las células con el compuesto 6a. Los estudios de Western-blot de lisados celulares de células

Jurkat tratadas durante los tiempos indicados con el compuesto 6a (200 μ M) o la cantidad equivalente de su vehículo DMSO. Las membranas se sensibilizaron con anticuerpos frente a las caspasas iniciadoras 8 0 9 y se usó actina como control. Las células tratadas con Etopósido se incluyeron como control positivo. Las flechas indican los productos de escisión que indican la activación de las caspasas.

Figura 4. Efecto de 6c sobre el ciclo celular de las células Jurkat. Las células Jurkat se trataron durante 24 horas con 6c a las concentraciones indicadas o sus cantidades equivalentes de DMSO usado como vehículo. Los números indican el porcentaje de células contenidas en la región sub-G1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

15

"Alquilo C1-C6" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada, dicha cadena consta de 1 a 6 átomos de carbono y también de átomos de hidrógeno, preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono, aún más preferible de 1 a 3 átomos de carbono que no presenta insaturaciones y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, n-pentilo etc. Los radicales alquilo, pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxycarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

25

"Ariil", se refiere a un sistema con anillo aromático. De acuerdo con su forma de preparación los grupos ariil pueden tener de 6 a 14 átomos de carbono, más particularmente de 6 a 10, incluso más particularmente 6 átomos de carbono. De acuerdo con su preparación ariil puede ser radicales fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo o antracilo. Dicho radical ariil puede estar opcionalmente sustituido por sustituyentes tales como hidroxilo, mercapto, halógeno, alquilo, fenilo, alcoxilo, haloalquilo, nitro, ciano, dialquilamino, aminoalquilo, acilo y alcoxycarbonilo tal como se define aquí. Preferiblemente el sustituyente será metoxilo.

30

El término "arilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un ariil. El arilalquilo puede estar además sustituido. Preferiblemente el arilalquilo es un bencilo, el cual puede

estar sustituido preferentemente por metoxilo.

El término "halo" se refiere a bromo, cloro, yodo y flúor.

- 5 Las referencias en este documento a grupos sustituidos, en los compuestos de la presente invención, se refiere al resto específico que puede estar sustituido en una o más posiciones disponibles por uno o más de los siguientes grupos: por ejemplo, halógenos tales como flúor, cloro, bromo o yodo; ciano, hidroxilo, nitro, azido, alcanilo tales como grupos alcanilo de 1 a 6 átomos de carbono, grupos tales como acilo o similares; carboxamido; grupos alquilo, 10 incluyendo aquellos que tienen de 1 a 12 átomos de carbono o de 1 a 6 átomos de carbono y más preferiblemente de 1 a 3 átomos de carbono; grupos alqueno y alquino incluyendo grupos que tienen uno o más enlaces insaturados y de 2 a 12 átomos de carbono o de 2 a 6 átomos de carbono; grupos alcoxilo que tienen uno o más enlaces de oxígeno y de 1 a 12 átomos de carbono o de 1 a 6 átomos de carbono; arilo tales como fenilo; grupos alquilo 15 incluyendo aquellos restos que tienen uno o más enlaces éter y de 1 hasta aproximadamente 12 átomos de carbono o de 1 hasta 6 átomos de carbono; grupos alquilsulfinil incluyendo aquellos restos que tienen uno o más enlaces sulfinilo y de 1 a 12 átomos de carbono o de 1 a 6 átomos de carbono; grupos aminoalquilo tales como grupos que tienen uno o más átomos de N y de 1 hasta 12 átomos de carbono o aproximadamente 20 átomos de carbono; arilo carbocíclico que tiene 6 o más átomos de carbono, especialmente fenilo o naftilo y aralquilo tales como bencilo. Si no se indica lo contrario, un grupo que pueda ser sustituido puede tener sustituyentes en cada posición sustituible del grupo y cada posición es independiente de la otra.
- 25 "Enfermedad mediada por DAPK-1", se refiere a cualquier enfermedad o afección en las que la modulación de la expresión o de la actividad de DAPK-1 puede ser beneficiosa para los pacientes que sufran dicha enfermedad o afección. Esto incluye, pero no se limita a aquellas enfermedades o afecciones que implican una alteración en la expresión o actividad de DAPK-1 o que se benefician de una inhibición de DAPK-1. Preferiblemente tal enfermedad 30 o afección es el cáncer, más preferentemente la leucemia.

El término "transportador, coadyuvante y/o vehículo se refiere a las entidades moleculares o sustancias con las que se administran el principio activo. Tales vehículos, transportadores o coadyuvantes farmacéuticos, pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites,

incluyendo éstos los de petróleo o de origen vegetal, animal o sintético tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y excipientes similares, disgregantes, agentes humectantes o diluyentes. Los transportadores, coadyuvantes y vehículos farmacéuticos se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W.
5 Martin.

El término "profármaco", incluye cualquiera de los compuestos que se convierte en el compuesto de Fórmula I, cuando se administra a un paciente, por ejemplo en el proceso metabólico del profármaco. Ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan solo a
10 ellos, acetato, formiato, benzoato, carboximetoxi, carboxietoxi y derivados de grupos funcionales (tales como alcohol, ácido carboxílico, éter, éster o grupos amino) en los compuestos de Fórmula I.

El término "solvato" se refiere al compuesto formado por la interacción de un disolvente y de un compuesto. Los solvatos adecuados, son solvatos aceptables farmacéuticamente, tales
15 como solvatos, hidratos incluyendo monosolvatos, hidratos y hemisolvatos hidratos. El término "hidrato" se refiere a monosolvatos, hidratos, disolvatos, hidratos y trisolvatos, hidratos.

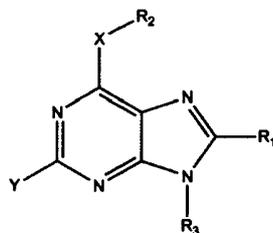
El término "sal" se refiere a una sal de un compuesto que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Tales sales incluyen, pero no se limitan sólo a ellos:

20 (1) Sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formadas por ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido
25 succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil) benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido bencensulfónico, ácido p-toluensulfónico y similares; o

30 (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original es reemplazado por un ión metálico, por ejemplo un ión de un metal alcalino, un metal alcalinotérreo o un ión de aluminio; o se coordina con una base orgánica tales como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina, dicitlohexilamina y similares. Algunas formas de sales pueden encontrarse como hidratos, de tal forma que el término sal se define generalmente

para incluir las formas hidratadas y no hidratadas de la sal.

Como se indicó anteriormente, en un primer aspecto de la invención se refiere a la fórmula general (I):



(I)

5

donde:

R₁ puede ser H, cadenas alquílicas de 1 a 6 átomos de carbono, lineales o ramificadas o radicales aromáticos sustituidos o no.

10 R₂ puede ser H, cadenas alquílicas de 1 a 6 átomos de carbono, lineales o ramificadas o radicales aromáticos sustituidos o no y radicales arilalquilo sustituidos o no.

R₃ puede ser H, cadenas alquílicas de 1 a 6 átomos de carbono, lineales o ramificadas o radicales aromáticos sustituidos o no y radicales arilalquilo sustituidos o no.

X puede ser -O-, -NH-, -S-, -CH₂-

15 Y puede ser -H-, -OH-, -NH₂-, -SH-, halógeno, nitro, alquiltio, alquiloxi, alquilamino, ariltio, ariloxi, arilamino.

Y cualquiera de los tautómeros, estereoisómeros, sales, solvatos, hidratos o profármacos de los mismos.

20 Preferentemente R₁ puede ser hidrógeno, sustituyentes alquílicos de 1 a 3 átomos de carbono lineales o ramificados, fenilo sustituido o no y bencilo sustituido o no. Probablemente R₁ puede ser desde hidrógeno, metilo, etilo, fenilo, metoxifenilo e isopropilo.

25 Preferentemente R₂ puede ser cadenas alquílicas lineales o ramificadas de 1 a 4 átomos de carbono y bencilos sustituidos o no.

Preferentemente R₂ es etilo, propilo lineal o ramificado, butilo lineal o ramificado, bencilo y metoxibencilo.

Preferentemente R_3 puede ser cadenas alquílicas lineales o ramificadas de 1 a 4 átomos de carbono y bencilos sustituidos o no.

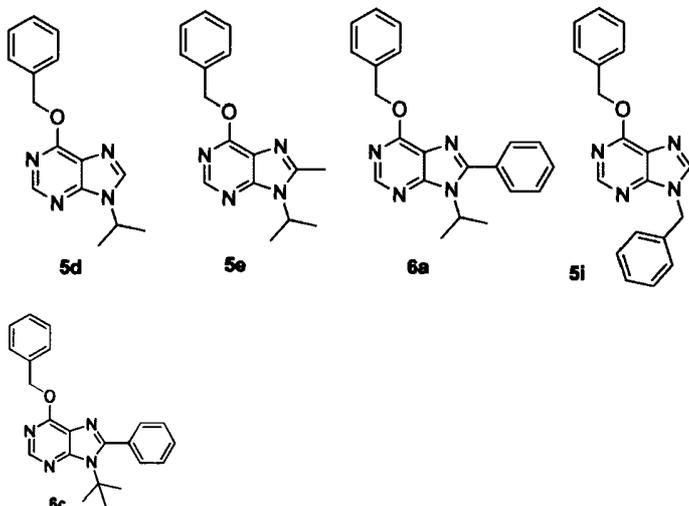
- 5 Preferentemente R_3 es propilo lineal o ramificado, butilo lineal o ramificado y bencilo.a
 Para una realización preferente X puede ser -O-, -NH-, -S-, -CH₂-. Preferentemente X es -O-.
 Para una realización preferente Y es hidrógeno.

- Es evidente para un experto en la materia que los grupos definidos anteriormente para R_1 ,
 10 R_2 , R_3 , X e Y se pueden combinar de forma aleatoria con tantas combinaciones como sea posible, incluidas en el objetivo de la presente invención.

Preferentemente se selecciona el compuesto de Fórmula I con los siguientes grupos:

Compuesto	X	Y	R_1	R_2	R_3
5a	O	H	H	Et	^t Pr
5b	O	H	Et	Et	^t Pr
5c	O	H	Me	Et	^t Pr
5d	O	H	H	Bn	^t Pr
5e	O	H	Me	Bn	^t Pr
5f	O	H	H	Et	Bn
5g	O	H	Me	Et	Bn
5h	O	H	Et	Et	Bn
5i	O	H	H	Bn	Bn
5j	O	H	H	^t Pr	^t Pr
5k	O	H	Me	^t Pr	^t Pr
5l	O	H	H	^t Bu	^t Pr
5m	O	H	H	Me	^t Pr
5n	O	H	H	Et	^t Bu
6a	O	H	Ph	Bn	^t Pr
6b	O	H	Ph	Bn	^t Bu
6c	O	H	3-MeOPh	3-MeOPhCH ₂	^t Pr
6d	O	H	3-MeOPh	3-MeOPhCH ₂	^t Bu
6e	O	H	H	Me	^t Pr
6f	O	H	Me	Et	^t Pr
6g	O	H	Me	Et	^t Pr
6h	O	H	Et	Pr	^t Pr
6i	O	H	^t Pr	^t Bu	^t Pr

Más preferentemente los compuestos seleccionados del grupo son:



5 En otro aspecto el compuesto el compuesto de Fórmula I que hemos definido anteriormente es para uso como medicamento.

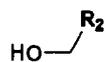
Otro aspecto sobre el compuesto de Fórmula I, definido anteriormente, es su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por DAPK-1. Preferentemente para el tratamiento de tales enfermedades o condiciones que necesiten de la inhibición de la actividad de DAPK-1. Incluso más preferentemente la enfermedad o afección es cáncer. Más preferentemente la enfermedad o afección es leucemia.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que tiene una cantidad terapéutica efectiva de al menos un compuesto de Fórmula I o cualquiera de sus tautómeros, estereoisómeros, sales, solvatos, hidratos o profármacos de los mismos como se definió anteriormente y al menos un transportador, coadyuvante o vehículo aceptable farmacológicamente.

La composición puede también contener otros principios activos, preferentemente compuestos útiles para el tratamiento del cáncer, preferentemente leucemia.

Otro aspecto de la invención es el proceso para preparar un compuesto de Fórmula I, como se definió anteriormente que comprende las siguientes etapas:

20 a) proporcionar un alcohol de fórmula:



b) adicionar hidruro sodico

c) adicionar una dimetilamida de fórmula:



d) adicionar 6-cloro-4,5-diaminopirimidina de fórmula:



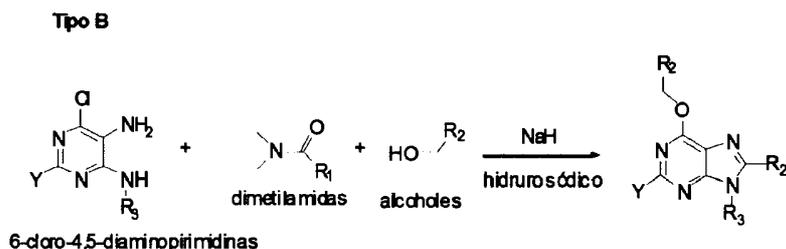
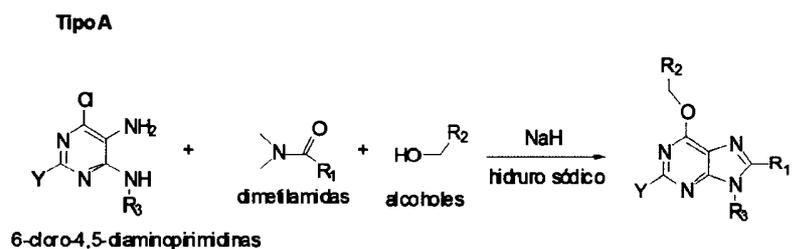
e) obtención de un crudo que contiene el compuesto de Fórmula (I);

- 5 En la que en las etapas anteriores a) hasta d) se puede calentar y usar disolventes orgánicos tales como dioxano y tetrahidrofurano y R_1 , R_2 , R_3 e Y tienen los significados indicados sobre los compuestos de Fórmula I.

Los compuestos tipo A, de Fórmula I, tienen diferentes sustituyentes en las posiciones 6 (R_2) y 8 (R_1) que se obtienen cuando R_1 es un sustituyente de pequeño tamaño tipo $R_1 = H$, $-CH_3$ y $-CH_2-CH_3$.

10

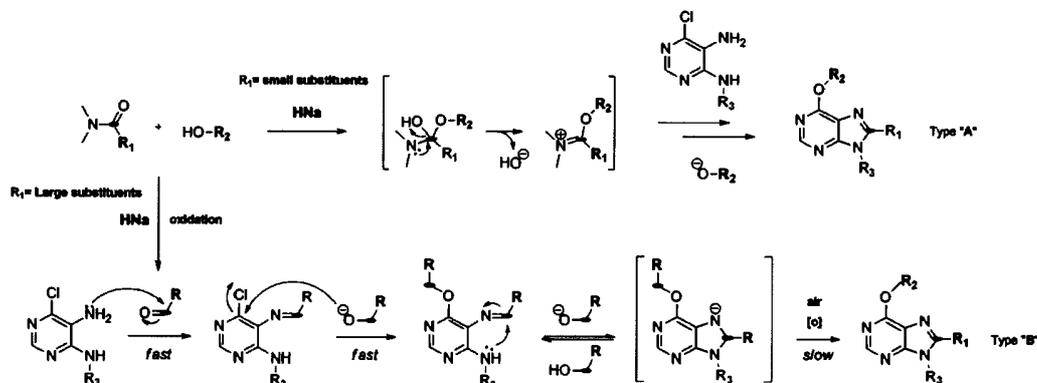
Los compuestos tipo B, de Fórmula I, con iguales sustituyentes R_2 en las posiciones 6 y 8, son obtenidos cuando R_1 es un sustituyente voluminoso, sustituyentes voluminosos del tipo $R_1 = -(CH_2)_n-CH_3$, donde n es mayor que 1, grupos cíclicos alifáticos, aromáticos y grupos alquilaromáticos.



15

Esquema I

Revisamos la metodología anterior descrita por Baraldi y colaboradores [Baraldi, P. G., Broceta, A. U., Pineda de las Infantas, M. J. Mochon, J. J. D., Espinosa, A., and Romagnoli, R. *An efficient one-pot synthesis of 6-alkoxy-8,9-dialkylpurines via reaction of 5-amino-4-chloro-6-alkylaminopyrimidines with N,N-dimethylalkaneamides and alkoxide ions* Tetrahedron 2002, 58, 7607-7611] para sintetizar nuevas colecciones de purinas usando diferentes pirimidinas, N,N-dimetilamidas y alcoholes. Los anillos de purina obtenidos donde el sustituyente del C-8 es un anillo aromático, proceden del carbono primario de los alcoholes (Ruta B) en lugar de proceder de la amida (Ruta A). Amidas más voluminosas, conducen a una ruta sintética desconocida hasta la fecha, en la que se obtienen purinas diferentes pero todas ellas con Fórmula I. La ciclación de la diaminopirimidina tiene lugar a través de la Ruta A o B, dependiendo de los impedimentos estéricos de amidas y alcoholes. Al aumentar el impedimento estérico, no favorece la formación del ión alquiminium y en estos casos transcurre la reacción a través de una oxidación alcalina libre de metales del alcohol primario hasta aldehído.



Esquema 2

En el esquema 2, se muestran los mecanismos de acción propuestos para las rutas A y B.

20 El nuevo mecanismo procede a través de un intermedio imina (Fórmula II) que puede dar lugar, de una manera reversible, a dihidropurinas. El proceso sintético en tándem terminaría tras la oxidación irreversible en purinas.

Por lo tanto, los compuestos de la invención se pueden obtener mediante el control de los tamaños de amida con el fin de conseguir purinas poli - sustituidas estructuralmente
 25 diversas.

La novedad de la invención se basa en una secuencia sintética que es iniciada por una conversión, libre de metal, del alcóxido primario en el correspondiente aldehído, seguido por la formación de la base de Schiff a través de la condensación con el grupo amino de la pirimidina en C5 y subsiguiente ciclación mediante una oxidación alcalina. El papel esencial de la amida para la formación *in situ* del aldehído en presencia de alcóxidos se confirma por los resultados experimentales llevadas a cabo en ausencia de amida. A nuestro entender, este proceso sintético en tándem se describe aquí por primera vez. Este aspecto de la invención por lo tanto se basa en su versatilidad, ya que permite la generación de una gama de diferentes análogos de purinas poli-sustituidas basadas en la elección de materiales de partida fácilmente disponibles.

Un aspecto final de la invención es un método de tratamiento de mamíferos, preferiblemente seres humanos, que necesiten inhibir DAPK1, y que comprende la administración al individuo afectado de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, como se ha definido anteriormente, o cualquiera de los tautómeros, estereoisómeros, sales, solvatos, hidratos o profármacos de los mismos.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina bien como compuestos libres o como solvatos (por ejemplo hidratos) y se pretende que ambas formas se incluyan dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos dentro la técnica.

Cualquier compuesto que es un profármaco de un compuesto de fórmula I está dentro del alcance y espíritu de la invención. El término " profármaco " se utiliza en su sentido más amplio y abarca aquellos derivados que se convierten *in vivo* en los compuestos de la invención. Tales derivados serán evidentes para aquellos expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, compuestos en los que un grupo hidroxilo libre se convierte en un derivado de éster.

Además, los compuestos mencionados en este documento pueden existir como isómeros geométricos (es decir, isómeros *cis* y *trans*), como tautómeros, o como atropoisómeros. Específicamente, el término "tautómero" se refiere a uno o más isómeros estructurales de un compuesto que existen en equilibrio y se convierten fácilmente de una forma isomérica a otra. Pares tautoméricos comunes son amina-imina, amida-imida, ceto-enol, lactama-lactima, etc Además, cualquier compuesto que se refiere el presente documento está destinado a

representar hidratos, solvatos, y polimorfos, y mezclas de los mismos cuando tales formas existan en el medio. Además, los compuestos mencionados en este documento pueden existir en formas marcadas isotópicamente. Todos los isómeros geométricos, tautómeros, atropisómeros, los hidratos, solvatos, polimorfos, y las formas marcadas isotópicamente de los compuestos a que se refiere el presente documento, y mezclas de los mismos, se consideran dentro del alcance de la presente invención.

A continuación, la invención se describe adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos, que están destinados a ilustrar la invención reivindicada, pero no para limitarla de ninguna manera.

10 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Actividad antiproliferativa de los compuestos sintetizados.

Para evaluar si los compuestos sintetizados presentan una actividad antiproliferativa sobre las células tumorales se incubó el panel de pequeñas moléculas con dos líneas de células hematopoyéticas: Jurkat (leucemia aguda de células T) y K562 (eritroleucemia crónica). Las células se cultivaron durante 48 h con concentraciones crecientes de cada compuesto: 25 μM , 50 μM , 100 μM (Figura 1) y 200 μM y la proliferación celular se evaluó por el ensayo colorimétrico del MTT para ver la viabilidad y proliferación celular. Los resultados mostrados en la figura 1 se expresan como porcentaje de inhibición de la proliferación celular calculada respecto a los valores obtenidos con las células no tratadas. La proliferación de células T Jurkat fue inhibida de manera eficiente por varios de los compuestos que pertenecen a la colección (Figura 1), mientras que las células eritroleucémicas K562 fueron significativamente más resistentes al efecto antiproliferativo de los compuestos ensayados. Por otra parte, a partir de este conjunto de datos, un subgrupo de compuestos, todos los que tienen un grupo benzoxi en la posición 6 del anillo de purina (5d, 5e, 6a y 5i) fueron elegidos para caracterizar su actividad en mayor detalle ya que, además eran los únicos capaces de inhibir más del 50 % la proliferación de células Jurkat a la dosis de 100 μM , calculada respecto a los valores de las células no tratadas.

Se eligieron los cuatro compuestos que tienen un grupo benzoxi en la posición 6 del anillo y su actividad antiproliferativa se caracterizó en detalle. En primer lugar se determinaron sus valores de CI_{50} frente a las líneas celulares K562 y Jurkat. La Tabla 1 muestra los respectivos valores obtenidos.

Tabla 1. Valores de CI_{50} de los compuestos indicados ensayados por la inhibición de la proliferación celular.

Compuestos	Jurkat (μM)	K562 (μM)
5d	>500	>500
5e	205	>500
6a	63	154
5i	152	>500

Se calcularon los valores de CI_{50} a través de una recta de regresión lineal de la inhibición específica de los valores de proliferación obtenidos por ensayos de MTT después de tratar las células durante 48 h utilizando 11 concentraciones diferentes de compuestos

Ejemplo 2: Determinación del mecanismo responsable de la inhibición de la proliferación celular.

5

Una vez que el efecto antiproliferativo de los compuestos elegidos fue totalmente evaluado, se realizaron estudios sobre el ciclo celular, para determinar si este efecto es la consecuencia de una parada en el ciclo celular, la inducción de la apoptosis o muerte por necrosis. Por lo tanto, las células Jurkat se trataron durante 48 h con las cantidades indicadas de compuestos y se analizaron por citometría de flujo (figura 2).

10

El tratamiento de las células Jurkat con los compuestos seleccionados resultó en una mayor acumulación de células en la región sub-G1 del ciclo celular, lo que es una evidencia de muerte por apoptosis. Las células apoptóticas fueron acotadas dentro de la región sub-G1, y por lo tanto, 5e, 5i y 6a son específicos para inducir la apoptosis en células Jurkat en una forma dosis-dependiente (Figura 2). Es importante señalar que los perfiles de citometría de flujo de células K562 después del tratamiento con las mismas dosis de los compuestos mostraron que estas células son más resistentes a la apoptosis inducida por los compuestos.

15

Para determinar si el tratamiento prolongado en el tiempo daba lugar a unos niveles más altos de apoptosis, las células Jurkat y K562 fueron tratadas durante 24 o 48 horas y sus ciclos celulares analizadas por citometría de flujo. La Tabla 2 muestra que el efecto modesto de 5d en el ciclo celular no se modificó significativamente por el cultivo prolongado. El tiempo de incubación con los otros tres compuestos, sin embargo, sí modificó los porcentajes de células que mapeaban dentro de la región sub-G1 (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de células apoptóticas tras el tratamiento con los compuestos indicados

	Jurkat				K562			
	24h (%)		48h (%)		24h (%)		48h (%)	
Comp.(μ M)	100	200	100	200	100	200	100	200
5d	0	0.3	6.9	12.3	1.1	4.9	0.6	0.6
5e	4.4	28.6	4.6	64.6	2.1	2.3	3.9	3.1
6a	16.9	16.1	79.1	73.2	0.6	0.6	41.0	82.4
5i	37.1	39.0	45.7	61.1	1.6	4.4	3.2	13.1

Porcentajes normalizados de células que se encuentran dentro de la región sub-G1 después del tratamiento de las células Jurkat y K562 con los compuestos 5d, 5e, 6a y 5i para los tiempos y las concentraciones indicadas. Las células Jurkat y K562 se trataron durante 24 o 48 h con concentraciones de compuestos indicadas (μ M) y ciclos celulares analizadas por citometría de flujo después de la tinción con yoduro de propidio. Los resultados se expresan como porcentajes de células dentro de la región sub-G1 después de restar los valores de los controles negativos.

10 A pesar de que las células localizadas en la región sub-G1 se consideran apoptóticas, se abordó si el tratamiento de células Jurkat con los compuestos seleccionados daba lugar a la activación de caspasas. Las caspasas son una serie de cisteín-proteasas que escinden ciertas proteínas mediante la hidrólisis de residuos de ácido aspártico en secuencias específicas[Thornberry, NA;LaZebnik, Y. - *Caspases: enemy within. Science* 1998, 281, 1312-1316.]

15 Las caspasas se encuentran expresadas como proenzimas inactivas, y su activación se

produce como consecuencia de una proteólisis que es mediada por la caspasa que le precede en el orden de activación, en un mecanismo típicamente de cascada [McIlwain, DR; Berger, T.; Mak, TW – *Caspase functions in cell death and disease*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013, 5, a008656]. Las caspasas iniciadoras (8 y 9) activan en última instancia un conjunto de caspasas efectoras (3, 6 y 7), y por lo tanto, la ruptura de las caspasas iniciadoras es un evento temprano de los procesos bioquímicos que conducen a la apoptosis. La aparición de los productos escindidos (indicado con flechas) de las caspasas 8 y 9 indica que estas caspasas se encuentran en forma activa, y por lo tanto, capaces de desencadenar apoptosis en las células tratadas con el compuesto 6a (Figura 3).

10

Ejemplo 3: Ensayos ciegos de cinasas.

Una vez determinado que la actividad antiproliferativa de esta familia de derivados de purina era inducida a través de mecanismos de apoptosis, se seleccionaron un panel de cinasas del cinoma humano que se conoce que están involucradas en los procesos de apoptosis. Por lo tanto, se utilizaron 96 cinasas recombinantes para realizar un ensayo de perfiles de cinasas basado en la utilización de ³³P radiomarcado confrontando a los compuestos 5e, 6a y 5i. El ensayo fue realizado por la Compañía Reaction Biology Corp (Malvern, PA, Estados Unidos). Los compuestos se ensayaron por duplicado en dosis única, utilizando para ello una concentración de 10 µM. Las reacciones se llevaron a cabo usando concentraciones 10 µM de ATP.

En esta primera ronda de selección, se usó el porcentaje de actividad de la enzima, con relación a controles de DMSO, para identificar dianas para estos compuestos. Sorprendentemente, sólo una de las 96 cinasas estudiadas mostró una reducción significativa de su actividad en respuesta a la exposición a los 3 compuestos. Esta cinasa era DAPK-1, cuya actividad se reducía hasta el 50,9% y 44,3% en respuesta a la interacción con los compuestos 5e y 6a, respectivamente, ensayados a la concentración de 10 µM. Los datos de inhibición de DAPK-1 fueron confirmados en un segundo ensayo independiente. Esta selectividad es muy alta y un hecho raro dentro de los compuestos que inhiben cualquier cinasa. Si DAPK-1 fuera una enzima muy promiscua, esta selectividad tendría fácil explicación. Sin embargo, según se puede comprobar en el estudio realizado por el grupo de Peterson [Anastassiadis, T.; Deacon, S. W.; Devarajan, K.; Ma, H.; Peterson, J. R. – *Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity*. Nat. Biotechnol. 2011, 29, 1039-1045] DAPK-1 tiene un 0,03 como puntuación de selectividad (Selective Score SS50), una de las más bajas de los 178 compuestos estudiados por Peterson

$$SS50 = \frac{\# \text{ compuestos que inhiben una cierta quinasa más del 50\%}}{\# \text{ total de compuestos ensayados}}$$

Esto significa que sólo 5 de los 178 compuestos ensayados por Peterson frente a DAPK-1 consiguieron inhibir la actividad de esta cinasa más de 50%, y por lo tanto se puede considerar como una de las cinasas más difíciles de inhibir dentro del cinoma. Por otra parte, estos 5 compuestos inhibían muchas otras cinasas que presentan una puntuación de inhibición (Inhibition Score IS) medio-alto, mientras que las 3 purinas presentan aquí valores IS50 de 0,01. Tanto los ensayos de Peterson como los presentados aquí se hicieron en la misma plataforma y usando las mismas cinasas recombinantes, por lo que los valores de SS50 y IS50 son comparables.

10

$$IS50 = \frac{\# \text{ quinasas inhibidas por un cierto compuesto más del 50\%}}{\# \text{ total de compuestos ensayados}}$$

Por tanto, los datos presentados aquí hacen a estos compuestos muy singulares ya que muestran una muy alta selectividad hacia una cinasa, DAPK-1, que es además una enzima difícil de inhibir.

15

El siguiente paso fue determinar los valores de CI_{50} de estos compuestos frente a DAPK-1. También se añadió DAPK-2 para esta serie de experimentos para confirmar la selectividad de nuestros compuestos. Los compuestos se ensayaron en el modo de CI_{50} con 10 dosis, con diluciones seriadas y muestras duplicadas por cada uno de los puntos de concentración, empezando con 200 μ M. La Tabla 3 muestra los valores de CI_{50} de los compuestos 5e, 6a y 5i. A pesar de que estas nuevas purinas son sólo moderadamente potentes frente a DAPK1, su alta selectividad frente a esta cinasa difícil de inhibir y su actividad fenotípica de estos nuevos compuestos los propone como una nueva estrategia prometedora y específica para abordar el cáncer.

Tabla 3. CI_{50} de los compuestos indicados calculados como la inhibición de DAPK-1 y DAPK-2.

Compuesto	DAPK1 (μ M)	DAPK2 (μ M)
5e	23	>200
6a	ND*	>200

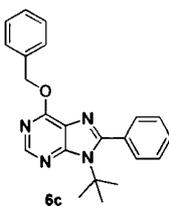
5i 5.9 -

* La curva de CI_{50} para 6a frente a DAPK-1 presenta un perfil de Gauss, lo que sugiere problemas de solubilidad y por lo tanto, nos impide un cálculo preciso de la dosis CI_{50} .

Ejemplo 4: Optimización del compuesto líder. Diseño, síntesis y evaluación biológica de 6c.

- 5 Como se indicó anteriormente, los valores obtenidos en el ensayo *in vitro* de perfiles de cinasas para calcular la CI_{50} del compuesto 6a frente a DAPK-1 mostraron una recta de regresión inconsistente, lo que sugería que este compuesto presentaba problemas de solubilidad. A pesar de esto, era evidente que la dosis de 10 μ M era capaz de conseguir una inhibición significativa (claramente por encima del 50% de la actividad de DAPK-1). Debido
- 10 a la alta actividad que se suponía para este compuesto, diseñamos y sintetizamos un nuevo compuesto, basándonos en la estructura de 6a. Una estrategia de diseño lógico era modificar 6a con un radical conocido por su capacidad para para mejorar la capacidad inhibidora de cinasas mediada por los inhibidores de cinasas de moléculas pequeñas. Elegimos grupos terc-butilo, ya que se sabe que éstos proporcionan mejores propiedades de inhibición a los
- 15 inhibidores de cinasas y. Por lo tanto, diseñamos una estructura con un grupo terc-butilo en lugar de un grupo isopropilo en la posición N9 del anillo de purina. Los compuestos 6a y 6c presentan valores de $\log P$ teóricos muy similares, pero el comportamiento estérico especial de los grupos terc-butilo puede afectar a la solubilidad de diferentes maneras, una cuestión que resultó ser fundamental para el compuesto 6a. La síntesis de 6c, por lo tanto, fue llevada
- 20 a cabo siguiendo con éxito la novedosa Ruta B descrita arriba.

Estructura del compuesto 6c de nuevo diseño:



(6c)

Para determinar la actividad biológica del nuevo compuesto y comprobar si esta estrategia sintética había dado lugar a un compuesto con una actividad mejorada, se evaluó el nuevo compuesto 6c en un ensayo rápido de proliferación celular colorimétrico de MTT sobre células Jurkat y K562. La dosis CI_{50} del compuesto, tal como se determina en el ensayo de proliferación celular, era 29 μM sobre células Jurkat y 120 μM sobre K562, lo que muestra una clara mejoría de la actividad en relación con la presentada por los compuestos anteriores a la preparación de 6c. Al igual que en los casos anteriores, el compuesto 6c muestra una actividad preferente sobre las células Jurkat en comparación con las K562. La actividad del nuevo compuesto también se ensayó en el ciclo celular de Jurkat (Figura 4) y K562. El tratamiento de las células Jurkat durante 24 horas dio como resultado una potente inducción de la apoptosis como se determina por el porcentaje de células presentes en la región sub-G1 (Figura 4). Al igual que con los otros compuestos descritos aquí, las células K562 fueron más resistentes a la apoptosis mediada por el compuesto 6c.

La capacidad de 6c para inducir la activación de las caspasas se evaluó directamente por Western Blotting. El tratamiento de las células Jurkat con el compuesto 6c durante 5, 6 y 7 horas condujo a resultados similares a los obtenidos con los compuestos anteriores, con la aparición clara de los productos resultantes de la escisión de las caspasas 8 y 9, indicativo de la activación de las mismas, después de 5 h de tratamiento (datos no mostrados). Finalmente, 6c fue probado frente al DAPK-1 recombinante utilizado en el ensayo de cinasas utilizando el ^{33}P radiomarcado. Una vez más, 6c mostró una inhibición selectiva de DAPK-1, tal y como lo hicieron también los compuestos ensayados anteriormente. Es muy relevante que la solubilidad de este nuevo compuesto mejora en gran medida, y por lo tanto, la curva trazada para determinar la dosis de IC_{50} mostró la recta de regresión esperada. La CI_{50} de 6c frente a la actividad cinasa de DAPK-1 recombinante fue de 2,5 μM , la más baja de toda la serie.

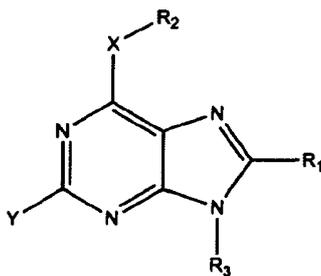
Preparación de los compuestos con Formula (I)

General

Las reacciones y productos se controlaron regularmente por cromatografía en capa fina de gel de sílice Merck 60-200 de malla. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Stuart Scientific SMP3 y están sin corregir. Los espectros de ^1H -RMN se obtuvieron en CDCl_3 , CD_3OD soluciones en un Varian Unity Inova (300 MHz) y Varian de accionamiento directo (400 MHz y 500 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm campo arriba de tetrametilsilano, los espectros de ^{13}C RMN se obtuvieron disueltos en CDCl_3 , CD_3OD en un Varian Direct Drive (125 MHz). Todos los productos descritos mostraron

espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN concordantes con las estructuras asignadas. Los espectros de masas se realizaron mediante la técnica de electrospray (AEE) con un aparato LCT Premier XE Micromass (espectrometría de masas de alta resolución).

- 5 Se sintetizaron los siguientes compuestos que presentan la Fórmula I:



(I)

Compuesto	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃	Amida usada
5a	O	H	H	Et	^t Pr	Formamida
5b	O	H	Et	Et	^t Pr	Propionamida
5c	O	H	Me	Et	^t Pr	Acetamida
5d	O	H	H	Bn	^t Pr	Formamida
5e	O	H	Me	Bn	^t Pr	Acetamida
5f	O	H	H	Et	Bn	Formamida
5g	O	H	Me	Et	Bn	Acetamida
5h	O	H	Et	Et	Bn	propionamida
5i	O	H	H	Bn	Bn	Formamida
5j	O	H	H	^t Pr	^t Pr	Formamida
5k	O	H	Me	^t Pr	^t Pr	Acetamida
5l	O	H	H	^t Bu	^t Pr	Formamida
5m	O	H	H	Me	^t Pr	Formamida
5n	O	H	H	Et	^t Bu	Formamida
6a	O	H	Ph	Bn	^t Pr	propionamida
6b	O	H	Ph	Bn	^t Bu	propionamida
6c	O	H	3-MeOPh	3-MeOPhCH ₂	^t Pr	propionamida
6d	O	H	3-MeOPh	3-MeOPhCH ₂	^t Bu	propionamida
6e	O	H	H	Me	^t Pr	isopropionamida
6f	O	H	Me	Et	^t Pr	isopropionamida
6g	O	H	Me	Et	^t Pr	Benzamida
6h	O	H	Et	Pr	^t Pr	Benzamida
6i	O	H	^t Pr	^t Bu	^t Pr	Benzamida

- 10 Procedimiento general para la preparación de compuestos 4 (a-c):

Al compuesto comercial 4,6-dicloro-5-nitro-pirimidina 1 (10 mmol, 1 equiv.) en THF anhidro (15 mL), se le añadió NaHCO₃ (11 mmoles, 1,1 equiv.). Después, la mezcla se calentó a 55 °C y a esta temperatura se añadió, gota a gota, la amina apropiada (11 mmol, 1,1 equiv.) disuelta en THF. Después de 1 h, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se evaporó para dar un crudo, que se usó directamente para la siguiente reacción sin purificación.

Este crudo (5 mmol, 1 equiv.) se disolvió en EtOH(10 mL) que contenía SnCl₂·2H₂O (25 mmol, 5 equiv.). La mezcla, se calentó a reflujo durante 1 h. Se realizó el seguimiento de la reacción por TLC. Después, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadió NaHCO₃ hasta que se alcanzó un pH de 8.0. Después de dos extracciones con EtOAc(10 mL de cada uno), la fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de NaCl (2x25 mL) y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se evaporó al vacío y se obtuvo un sólido que se purificó por cromatografía en columna, usando como eluyentes mezclas de acetato de etilo y éter de petróleo.

Ejemplo 5: 5-Amino-6-cloro-4-isopropilaminopirimidina (4a).

Sólido blanco, rendimiento 73%; pf: 185-186°C. δ_H(400.58 MHz, CDCl₃): 8.08 (1H, s, NCHN), 4.68 (1H, bs, NH), 4.29 (1H, m, CH(CH₃)₂), 3.33 (2H, bs, NH₂), 1.27 (6H, d, J=8, CH(CH₃)₂).

Ejemplo 6: 5-Amino-4-terc-butilamino-6-cloropirimidina (4b).

Sólido blanco; rendimiento 75%; pf: 135°C. δ_H(499.79 MHz, CDCl₃): 8.03 (1H, s, NCHN), 4.87 (1H, bs, NH), 3.45 (2H, bs, NH₂), 1.47 (9H, s, C(CH₃)₃). ES+HRMS: Calculado M+H = 201.0907. C₈H₁₄N₄Cl. Obtenido: 201.0909.

Ejemplo 7: 5-Amino-4-bencilamino -6-cloropirimidina (4c).

Sólido blanco; rendimiento 65%; pf: 205-206°C. δ_H(499.79 MHz, CD₃OD): 7.78 (1H, s, NCHN), 7.35-7.22 (5H, m, Ph), 4.69 (2H, s, CH₂Ph). δ_C(125.68 MHz, CDCl₃): 150.13, 142.76, 137.79, 132.02, 131.18, 130.72, 127.49, 48.51. ES+HRMS: Calculado M+H = 235.0750. C₁₁H₁₂N₄Cl. Obtenido: 235.0753.

Procedimiento general para la preparación de los compuestos 5 (a-n) (Ruta A):

Una suspensión de NaH (50%) en aceite mineral (3,7 mmol, 10 equiv.) se disolvió en una mezcla enfriada a 0 °C constituida por el alcohol apropiado (3,7 mmol, 10 equiv.) y la amida (18,5 mmoles, 50 equiv.). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y
 5 después a 90 °C durante el mismo tiempo. A 90 °C se añadieron gota a gota, los compuestos 4 (a-c) (0,37 mmol, 1 equiv.), disueltos en la amida apropiada (18,5 mmol, 50 equiv.) y la mezcla se calentó durante 24 h. La mezcla de reacción se llevó hasta pH 7 con una solución saturada acuosa de NH₄Cl y a continuación, se extrajo con CH₂Cl₂ (3x15 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na₂SO₄ y el disolvente se evaporó. El crudo se purificó mediante
 10 cromatografía sobre gel de sílice, utilizando soluciones de acetato de etilo/éter de petróleo.

Ejemplo 8: 6-Etoxi-9-isopropil-9H-purina (5a).

Sólido amarillo pálido; rendimiento 44%. δ_{H} (499.79 MHz, CDCl₃): 8.49 (1H, s, NCHN), 7.96 (1H, s, NHCHN), 4.88 (1H, m, CH(CH₃)₂), 4.64 (2H, q, J=5 Hz, OCH₂CH₃), 1.60 (6H, d, J=5 Hz, NCH(CH₃)₂), 1.49 (3H, t, J=5 Hz, OCH₂CH₃). δ_{C} (125.68 MHz, CDCl₃): 160.81, 151.70, 139.53, 121.83, 62.98, 47.33, 22.60, 14.51. ES+HRMS: Calculado M+H = 207.1246. C₁₀H₁₅N₄O. Obtenido: 207.1245.

 15
Ejemplo 9: 6-Etoxi-8-etil-9-isopropil-9H-purina (5b).

20 Aceite amarillo viscoso; rendimiento 10%. δ_{H} (300.20 MHz, CDCl₃): 8.47 (1H, s, NCHN), 4.72 (1H, m, CH(CH₃)₂), 4.67 (2H, q, J=6 Hz, OCH₂CH₃), 2.96 (2H, q, J=6 Hz, CH₂CH₃), 1.74 (6H, d, J=6 Hz, NCH(CH₃)₂), 1.53 (3H, t, J=6 Hz, OCH₂CH₃), 1.47 (3H, t, J=6 Hz, CH₂CH₃). ES+HRMS: Calculado M+H = 235.1559. C₁₂H₁₉N₄O. Obtenido: 235.1557.

Ejemplo 10: 6-Etoxi-9-isopropil-8-metil-9H-purina (5c).

25 Aceite amarillo viscoso; rendimiento 10%. δ_{H} (499.79 MHz, CDCl₃): 8.44 (1H, s, NCHN), 4.72 (1H, m, CH(CH₃)₂), 4.62 (2H, q, J=10 Hz, OCH₂CH₃), 2.64 (3H, s, CH₃), 1.68 (6H, d, J=5 Hz, NCH(CH₃)₂), 1.50 (3H, t, J=10 Hz, OCH₂CH₃). δ_{C} (125.68 MHz, CDCl₃): 159.74, 153.15, 151.75, 150.53, 120.71, 62.67, 48.31, 21.24, 15.22, 14.58. ES+HRMS: Calculado M+H = 221.1402. C₁₁H₁₇N₄O. Obtenido: 221.1396.

 30
Ejemplo 11: 6-(Benciloxi)-9-isopropil-9H-purina (5d).

Sólido blanco; rendimiento 38%; pf: 167-169°C. δ_{H} (499.79 MHz, CDCl₃): 8.56 (1H, s,

NCHN), 8.00 (1H, s, *NHCHN*), 7.56-7.30 (5H, m, *Ph*), 5.69 (2H, s, *OCH₂Ph*), 4.91 (1H, m, *CH(CH₃)₂*), 1.64 (6H, d, *J*=10 Hz, *NCH(CH₃)₂*). δ_{C} (125.68 MHz, *CDCl₃*): 160.53, 151.63, 139.77, 136.27, 130.03, 128.41, 128.29, 128.05, 68.29, 47.43, 22.63. ES+HRMS: Calculado M+H = 269.1402. *C₁₅H₁₇N₄O*. Obtenido: 269.1402.

5

Ejemplo 12: 6-(Benciloxi)-9-isopropil-8-metil-9H-purina (5e).

Sólido blanco; rendimiento 16%. δ_{H} (499.79 MHz, *CDCl₃*): 8.47 (1H, s, *NCHN*), 7.54-7.30 (5H, m, *Ph*), 5.65 (2H, s, *OCH₂Ph*), 4.75 (1H, m, *CH(CH₃)₂*), 2.65 (3H, s, *CH₃*), 1.69 (6H, d, *J*=10 Hz, *NCH(CH₃)₂*). δ_{C} (125.68 MHz, *CDCl₃*): 159.41, 153.57, 150.69, 150.41, 136.42,
10 128.43 128.35, 127.98, 120.73, 68.06, 48.35, 21.23, 15.22. ES+HRMS: Calculado M+H = 283.1559. *C₁₆H₁₉N₄O*. Obtenido: 283.1558.

Ejemplo 13: 9-Bencil-6-etoxi-9H-purina (5f).

Sólido blanco; rendimiento 62%; mp 133-135°. δ_{H} (499.79 MHz, *CDCl₃*): 8.55 (1H, s, *NCHN*), 7.88 (1H, s, *NHCHN*), 7.34-7.28 (5H, m, *Ph*), 5.41 (2H, s, *CH₂Ph*), 4.66 (2H, q, *J*=10 Hz, *OCH₂CH₃*), 1.51 (3H, t, *J*=10 Hz, *OCH₂CH₃*). δ_{C} (125.68 MHz, *CDCl₃*): 160.93, 152.33, 141.81, 135.34, 129.08, 128.27, 127.75, 121.39, 63.16, 47.42, 14.53. ES+HRMS: Calculado M+H = 255.1246 *C₁₄H₁₅N₄O*. Obtenido: 255.1252.

20 Ejemplo 14: 9-Bencil-6-etoxi-8-metil-9H-purina (5g).

Sólido blanco; rendimiento 41%; pf: 56-58°. δ_{H} (499.79 MHz, *CDCl₃*): 8.50 (1H, s, *NCHN*), 7.32-7.13 (5H, m, *Ph*), 5.40 (2H, s, *CH₂Ph*), 4.65 (2H, q, *J*=10 Hz, *OCH₂CH₃*), 2.51(3H, s, *CH₃*), 1.51 (3H, t, *J*=10 Hz, *OCH₂CH₃*). δ_{C} (125.68 MHz, *CDCl₃*): 159.83, 153.55, 151.51, 151.42, 135.49, 128.98, 128.10, 126.92, 120.33, 62.95, 46.08, 14.58, 14.39. ES+HRMS:
25 Calculado M+H = 269.1402 *C₁₅H₁₇N₄O*. Obtenido: 269.1396.

Ejemplo 15: 9-Bencil-6-etoxi-8-etil-9H-purina (5h).

Aceite blanco viscoso; rendimiento 2%. δ_{H} (499.79 MHz, *CDCl₃*): 8.50 (1H, s, *NCHN*), 7.31-7.12 (5H, m, *Ph*), 5.43 (2H, s, *CH₂Ph*), 4.68 (2H, q, *J*=10 Hz, *OCH₂CH₃*), 2.80 (2H, q, *J*=10 Hz, *CH₂CH₃*), 1.53 (3H, t, *J*=10 Hz, *OCH₂CH₃*), 1.27 (3H, t, *J*=10 Hz, *CH₂CH₃*). ES+HRMS: Calculado M+H = 283.1559 *C₁₆H₁₉N₄O*. Obtenido: 283.1560.

Ejemplo 16: 9-Bencil-6-(benciloxi)-9H-purina (5i).

Sólido blanco; rendimiento 30%. δ_{H} (499.79 MHz, CDCl_3): 8.59 (1H, s, *NCHN*), 7.90 (1H, s, *NHCHN*), 7.57-7.28 (10H, m, *Ph*), 5.70 (2H, s, *OCH₂Ph*), 5.43 (2H, s, *CH₂Ph*). δ_{C} (125.68 MHz, CDCl_3): 161.51, 153.09, 142.91, 137.06, 136.17, 129.98, 129.72, 129.40, 129.31, 129.23, 128.99, 128.65, 127.84, 122.32, 69.31, 48.35. ES+HRMS: Calculado M+H = 317.1402. $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}$. Obtenido: 317.1407.

Ejemplo 17: 6-isopropoxi-9-isopropil-9H-purina (5j).

Aceite amarillo viscoso; rendimiento 10%. δ_{H} (300.20 MHz, CDCl_3): 8.54 (1H, s, *NCHN*), 7.99 (1H, s, *NHCHN*), 5.70 (1H, m, *OCH(CH₃)₂*), 4.91 (1H, m, *NCH(CH₃)₂*), 1.66 (6H, d, *J*=6 Hz, *OCH(CH₃)₂*), 1.51 (6H, d, *J*=6 Hz, *NCH(CH₃)₂*). δ_{C} (125.68 MHz, CDCl_3): 160.84, 151.87, 150.40, 139.60, 121.83, 70.68, 47.55, 22.89, 22.05. ES+HRMS: Calculado M+H = 221.1402. $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}$. Obtenido: 221.1402.

Ejemplo 18: 6-isopropoxi-9-isopropil-8-metil-9H-purina (5k).

Aceite amarillo viscoso; rendimiento 12%. δ_{H} (300.20 MHz, CDCl_3): 7.99 (1H, s, *NCHN*), 5.70 (1H, m, *OCH(CH₃)₂*), 4.91 (1H, m, *NCH(CH₃)₂*), 2.07 (3H, s, *CH₃*), 1.71 (6H, d, *J*=6 Hz, *OCH(CH₃)₂*), 1.49 (6H, d, *J*=6 Hz, *NCH(CH₃)₂*). ES+HRMS: Calculado M+H = 235.1559. $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}$. Obtenido: 235.1553.

20

Ejemplo 19: 6-Terc-butoxi-9-isopropil-9H-purina (5l).

Aceiteamarilloviscoso; rendimiento 15%. δ_{H} (300.20 MHz, CDCl_3): 8.51 (1H, s, *NCHN*), 7.95 (1H, s, *NHCHN*), 4.90 (1H, m, *NCH(CH₃)₂*), 1.78 (9H, s, *C(CH₃)₃*), 1.65 (6H, d, *J*=6 Hz, *OCH(CH₃)₂*). ES+HRMS: Calculado M+H = 235.1559. $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}$. Obtenido: 235.1563.

25

Ejemplo 20: 9-Isopropil-8-metoxi-9H-purina (5m).

Aceite blanco viscoso; rendimiento 10%. δ_{H} (400.57 MHz, CDCl_3): 8.53 (1H, s, *NCHN*), 7.98 (1H, s, *NHCHN*), 4.89 (1H, m, *CH(CH₃)₂*), 4.18 (3H, s, *OCH₃*), 1.63 (6H, d, *J*=4 Hz, *NCH(CH₃)₂*). δ_{C} (125.68 MHz, CDCl_3): 161.19, 152.25, 151.86, 139.89, 122.07, 54.26, 47.63, 22.78. ES+HRMS: Calculado M+H: 193.1089. $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}$. Obtenido: 193.1087.

30

Ejemplo 21: 9-Terc-butil -6-etoxi-9H-purina (5n).

Sólido blanco; rendimiento 57%. δ_{H} (300.20 MHz, CDCl_3): 8.49 (1H, s, *NCHN*), 7.97 (1H,

s, $NHCHN$), 4.64 (2H, q, OCH_2CH_3), 1.80 (9H, s, $NC(CH_3)_3$), 1.50 (3H, t, OCH_2CH_3). δ_C (75.49 MHz, $CDCl_3$): 161.22, 151.20, 139.87, 123.16, 63.10, 29.30, 14.80. ES+HRMS: Calculado M+H = 221.1402. $C_{11}H_{17}N_4O$. Obtenido: 221.1400.

5

Procedimiento general para la preparación de los compuestos 6 a-i (Ruta B):

Una suspensión de NaH (50%) en aceite mineral (3,7 mmol, 10 equiv.) se disolvió en una mezcla enfriada a 0°C, constituida tanto por el alcohol apropiado (3,7 mmol, 10 equiv) y la adecuada N,N-dimetilamida correspondiente (18,5 mmoles, 50 equiv.), cuando la amida es líquida, o la mezcla se disuelve en dioxano, cuando la amida es sólida. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después a 90°C durante el mismo tiempo. A 90°C, se añade el compuesto 4 (a-b) (0,37 mmol, 1 equiv.), disuelto en la amida (18,5 mmoles, 50 equiv.) o en dioxano, y la mezcla se calentó durante 24 h. La mezcla de reacción se llevó hasta pH 7 con una solución saturada acuosa de NH_4Cl y a continuación, se extrajo con CH_2Cl_2 (3x15 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4 y el disolvente se evaporó. El crudo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice utilizando soluciones de acetato de etilo/éter de petróleo.

Ejemplo 22: 6-Benciloxi-9-isopropil-8-fenil-9H-purina (6a):

Sólido blanco; rendimiento 24%. δ_H (300.20 MHz, $CDCl_3$): 8.57 (1H, s, $NCHN$), 7.70-7.38 (10H, m, Ph , CH_2Ph), 5.72 (2H, s, OCH_2Ph), 4.80 (1H, m, $CH(CH_3)_2$), 1.76 (6H, d, J=6 Hz, $NCH(CH_3)_2$). δ_C (125.68 MHz, $CDCl_3$): 160.54, 153.14, 151.01, 136.66, 130.40, 129.80, 128.95, 128.76, 128.61, 128.27, 128.05, 122.14, 68.42, 50.04, 21.51. ES+HRMS: Calculado M+H= 345.1715. $C_{21}H_{21}N_4O$. Obtenido: 345.1716.

25

Ejemplo 23: 9-Terc-butil-6-(benciloxi)-8-fenil-9H-purina (6b):

Sólido blanco; rendimiento 45%. δ_H (300.20 MHz, $CDCl_3$): 8.59 (1H, s, $NCHN$), 7.58-7.34 (10H, m, Ph , CH_2Ph), 5.69 (2H, s, OCH_2Ph), 1.70 (9H, s, $NC(CH_3)_3$). δ_C (125.68 MHz, $CDCl_3$): 160.62, 154.52, 153.37, 150.46, 136.58, 134.97, 130.11, 129.72, 128.85, 128.59, 128.27, 128.09, 121.76, 68.43, 61.06, 31.15. ES+HRMS: Calculado M+H= 359.1872. $C_{22}H_{23}N_4O$. Obtenido: 359.1880.

30

Ejemplo 24: 6-(3-metoxibenciloxi)-9-isopropil-8-(3-metoxifenil)-9H-purina (6c):

Sólido blanco; rendimiento 45%. δ_{H} (499.79 MHz, CDCl_3): 8.53 (1H, s, NCHN), 7.44-6.85 (8H, m, Ph , CH_2Ph), 5.66 (2H, s, OCH_2Ph), 4.79 (1H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.87 (3H, s, $\text{OCH}_2\text{PhOCH}_3$), 3.80 (3H, s, PhOCH_3), 1.72 (6H, d, $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$). δ_{C} (125.68 MHz, CDCl_3): 160.27, 159.64, 153.59, 152.75, 150.76, 137.94, 131.25, 129.41, 121.63, 120.78, 116.25, 114.92, 113.88, 113.70, 68.03, 55.45, 55.26, 49.81, 21.26. ES+HRMS: Calculado $\text{M}+\text{H}^+$ = 405.1927. $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3$. Obtenido: 405.1930.

10 Ejemplo 25: 6-(3-metoxibenciloxi)-9-terc-butil-8-(3-metoxifenil)-9H-purina (6d):

Sólido blanco; rendimiento 45%. δ_{H} (400.57 MHz, CDCl_3): 8.55 (1H, s, NCHN), 7.48-6.83 (8H, m, Ph , CH_2Ph), 5.63 (2H, s, OCH_2Ph), 3.83 (3H, s, $\text{OCH}_2\text{PhOCH}_3$), 3.79 (3H, s, PhOCH_3), 1.68 (9H, s, $\text{NC}(\text{CH}_3)_3$). δ_{C} (125.68 MHz, CDCl_3): 160.29, 159.61, 159.02, 154.21, 152.87, 150.23, 137.83, 129.38, 128.92, 122.49, 120.86, 119.08, 115.41, 113.91, 113.29, 112.24, 68.06, 55.40, 55.27, 30.76. ES+HRMS: Calculado $\text{M}+\text{H}^+$ = 419.2083. $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3$. Obtenido: 419.2086.

Ejemplo 26: 9-Isopropil-6-metoxi-9H-purina (6e):

20 Aceite viscoso blanco; rendimiento 10%. δ_{H} (400.57 MHz, CDCl_3): 8.53 (1H, s, NCHN), 7.98 (1H, s, NHCHN^iPr), 4.89 (1H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.18 (3H, s, OCH_3), 1.63 (6H, d, $\text{J}=8$ Hz, $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$). δ_{C} (125.68 MHz, CDCl_3): 161.19, 152.25, 151.86, 139.89, 122.07, 54.26, 47.63, 22.78. ES+HRMS: Calculado $\text{M}+\text{H}^+$ = 193.1089. $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}$. Obtenido: 193.1087.

Ejemplo 27: 6-Etoxi-9-isopropil-8-metil-9H-purina (con N,N-dimetilisopropionamida) (6f):

25 Aceite amarillo viscoso; rendimiento 10%. δ_{H} (499.79 MHz, CDCl_3): 8.44 (1H, s, NCHN), 4.73 (1H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.62 (2H, q, $\text{J}=10$ Hz, OCH_2CH_3), 2.64 (3H, s, CH_3), 1.68 (6H, d, $\text{J}=5$ Hz, $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$), 1.50 (3H, t, $\text{J}=10$ Hz, OCH_2CH_3). δ_{C} (125.68 MHz, CDCl_3): 159.74, 152.88, 151.75, 150.53, 120.71, 62.67, 48.31, 21.24, 15.22, 14.58. ES+HRMS: Calculado $\text{M}+\text{H}^+$ = 221.1402. $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}$. Obtenido: 221.1401.

Ejemplo 28: 6-Etoxi-9-isopropil-8-metil-9H-purina (con N,N-dimetilbenzamida) (6g):

Aceite amarillo viscoso; rendimiento 20%. δ_H (499.79 MHz, $CDCl_3$): 8.44 (1H, s, $NCHN$), 4.73 (1H, m, $CH(CH_3)_2$), 4.62 (2H, q, $J=10$ Hz, OCH_2CH_3), 2.64 (3H, s, CH_3), 1.68 (6H, d, $J=5$ Hz, $NCH(CH_3)_2$), 1.51 (3H, t, $J=10$ Hz, OCH_2CH_3). δ_C (125.68 MHz, $CDCl_3$): 159.74, 152.88, 151.75, 150.53, 120.71, 62.67, 48.31, 21.24, 15.22, 14.58. ES+HRMS: Calculado M+H = 221.1402. $C_{11}H_{17}N_4O$. Obtenido: 221.1396.

Ejemplo 29: 8-Etil-9-isopropil-6-propoxi-9H-purina (6h):

10 Aceite amarillo viscoso; rendimiento 20%. δ_H (300.20 MHz, $CDCl_3$): 8.43 (1H, s, $NCHN$), 4.69 (1H, m, $CH(CH_3)_2$), 4.52 (2H, t, $J=9$ Hz, $OCH_2CH_2CH_3$), 2.94 (2H, q, $J=6$ Hz, CH_2CH_3), 1.92 (2H, m, $OCH_2CH_2CH_3$), 1.70 (6H, d, $J=10$ Hz, $NCH(CH_3)_2$), 1.43 (3H, t, $J=6$ Hz, CH_2CH_3), 1.05 (3H, t, $J=9$ Hz, $OCH_2CH_2CH_3$). δ_C (125.68 MHz, $CDCl_3$): 160.28, 155.28, 150.65, 150.31, 124.41, 68.65, 48.57, 21.24, 23.13, 22.49, 21.51, 12.49, 10.66. ES+HRMS: Calculado M+H = 249.1715. $C_{13}H_{21}N_4O$. Obtenido: 249.1721.

Ejemplo 30: 6-Isobutoxi-8,9-diisopropil-9H-purina (6i):

Sólido blanco; rendimiento 22%. δ_H (300.20 MHz, $CDCl_3$): 8.44 (1H, s, $NCHN$), 4.74 (1H, m, $NCH(CH_3)_2$), 4.36 (2H, d, OCH_2Pr^i , $J=9$ Hz), 3.28 (1H, m, $CCH(CH_3)_2$), 2.29 (1H, m, $CH_2CH(CH_3)_2$), 1.72 (6H, d, $J=9$ Hz, $NCH(CH_3)_2$), 1.47 (6H, d, $J=9$ Hz, $CCH(CH_3)_2$), 1.06 (6H, d, $J=9$ Hz, $CH_2CH(CH_3)_2$). ES+HRMS: Calculado M+H = 277.2028. $C_{15}H_{25}N_4O$. Obtenido: 277.2036.

Materiales y métodos relacionados con la caracterización funcional de los compuestos.**25 Células y cultivos celulares**

Las líneas celulares Jurkat (leucemia aguda de células T) y K562 (eritroleucemia crónica) se cultivaron en medio RPMI 1640 (BioWhittaker, Verviers, Bélgica) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Gibco, Auckland, Nueva Zelanda) y un 1 % de Glutamax y penicilina-estreptomomicina (BioWhittaker).

30

Ensayo de proliferación celular.

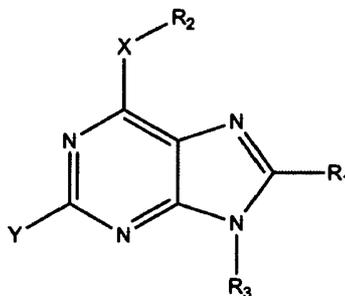
Las células se cultivaron en placas de microtitulación de 96 pocillos (50.000 células/pocillo) y se trataron durante 48 h con las colecciones de compuestos a concentraciones crecientes (25, 50, 100 y 200 μ M). La proliferación se midió con el MTT (Bromuro de 3-[4-5 dimetiltiazol-2-7P]-2,5-difenil tetrazolium]: azul de tiazolilo)(Sigma) mediante ensayo colorimétrico, y los resultados se expresan como porcentajes de inhibición calculados sobre los valores obtenidos con las células no tratadas corregidos para tal efecto.

10 Análisis del ciclo celular y estudios de Western Blots.

Para el análisis del ciclo celular, se cultivaron 250.000 células en placas de 24 pocillos y se incubaron con los compuestos a las dosis indicadas durante 24 h como se describe en [Ruiz-Ruiz, C.;Srivastava, GK; Carranza, D.; Mata, JA; Llamas, I.; Santamaría, M.; Quesada, E.; Molina, IJ *Anexo polysaccharide produced by the novel halophilic bacterium Halomonasstenophilastrain B100 selectively induces apoptosis in human T leukaemicells.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011, 89, 345-355]. Después del tratamiento con los compuestos, se recogieron las células, se fijaron con etanol frío al 70% durante 5 min a 4 ° C y después se incubaron con tampón de extracción de ADN (0,2 M de Na₂HPO₄ y 0,004 M de ácido cítrico) a 37 ° C durante 10 minutos. Finalmente las células fueron resuspendidas en PBS que contenía 100 mg/mL de RNasa y 40 mg/mL de yoduro de propidio y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en la oscuridad. El análisis cuantitativo de las células con contenido de ADN en la región sub-G1 se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACS usando el software CellQuest(BD Biosciences). Para el análisis de la activación de caspasa, las células fueron tratadas con los compuestos a 200 μ M y se lisaron en NaCl 150 mM, 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 % de NP-40 e inhibidores de proteasa durante 30 min. Los lisados se resolvieron por SDS-PAGE como se ha descrito, se transfirieron a membranas de PVDF, bloqueados durante 1 h y se hibridaron durante la noche con concentraciones óptimas predeterminadas de anticuerpos monoclonales contra caspasa-9 humana (R & D Systems; Minneapolis, MN) y la caspasa-8 (Alexis Bioquímicos, San Diego, CA). Las membranas se lavaron e incubaron durante 1 hora con un anticuerpo de cabra marcado con HRP frente a Inmunoglobulinas de ratón y se revelaron por quimioluminiscencia (ECL Avance Western BlottingDetection Kit,Amersham, GE Healthcare UK). La emisión de luz se detectó con un sistema de imagen digital (FujifilmImageAnalyzer LAS- 4000, Tokio, Japón) y se analizaron con el software multi Gauge.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



(I)

5

donde

- R_1 se selecciona del grupo formado por H, cadenas alquílicas de 1 a 6 átomos de carbono, lineales o ramificadas y radicales aromáticos sustituidos o no;
- R_2 se selecciona del grupo formado por H, cadenas alquílicas de 1 a 6 átomos de carbono, lineales o ramificadas, radicales aromáticos sustituidos o no y radicales arilalquilo sustituidos o no.
- R_3 puede ser H, cadenas alquílicas de 1 a 6 átomos de carbono, lineales o ramificadas o radicales aromáticos sustituidos o no y radicales arilalquilo sustituidos o no.
- X se selecciona del grupo formado por -O-, -NH-, -S- y -CH₂-e
- Y se selecciona del grupo formado por -H-, -OH-, -NH₂-, -SH, halógeno, nitro, alquiltio, alquiloxi, alquilamino, ariltio, ariloxi y arilamino;
- y cualquiera de los tautómeros, estereoisómeros, sales, solvatos, hidratos o profármacos de los mismos, pudiendo ser R_1 y R_2 iguales o no.
2. Un compuesto, según la reivindicación anterior, donde R_1 se selecciona del grupo formado por H, cadenas alquílicas de 1 a 3 carbonos, lineales o ramificadas, fenilos sustituidos o no y bencilos sustituidos o no
3. Un compuesto según la reivindicación 2, donde R_1 se selecciona del grupo formado por H, metilo, etilo, fenilo, metoxifenilo e isopropilo
4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R_2 se selecciona del

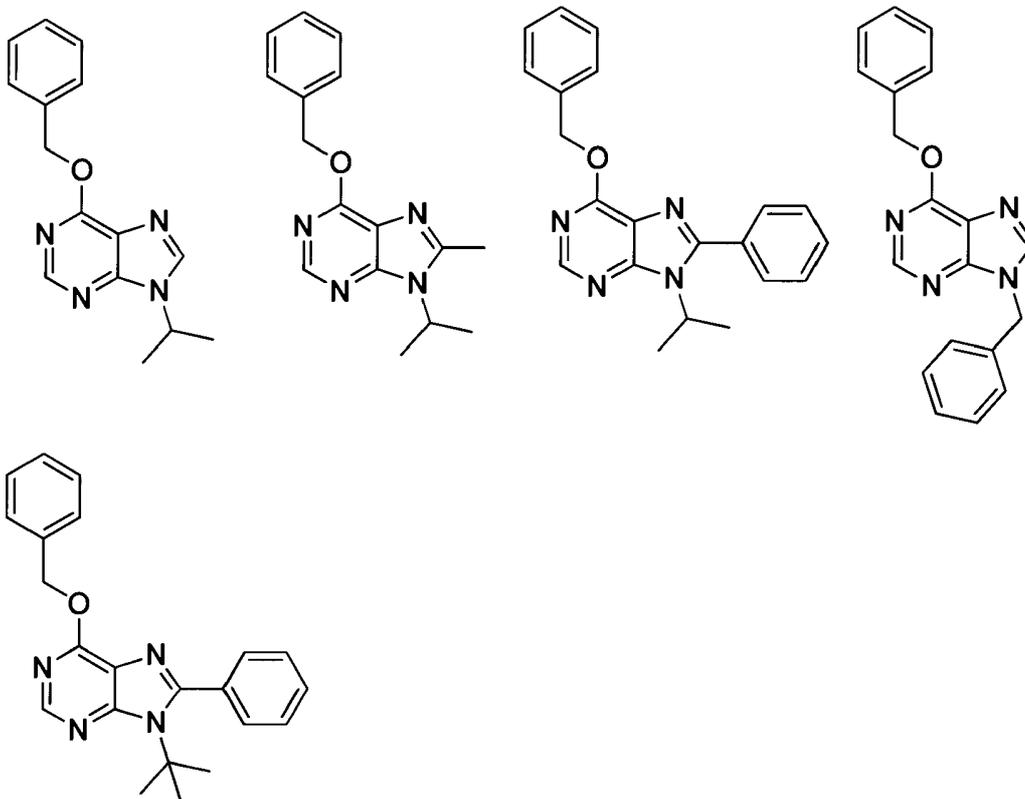
grupo formado por cadenas alquílicas de 1 a 4 átomos de carbono lineales o ramificadas y sustituidas o no.

5. Un compuesto según la reivindicación 4, donde R₂ puede ser etilo, propilo lineal o ramificado, butilo lineal o ramificado, bencilo y metoxibencilo.
6. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R₃ puede ser cadenas alquílicas de 1 a 4 átomos de carbono lineales o ramificadas y sustituidas o no.
7. Un compuesto según la reivindicación 6, donde R₃ puede ser propilo, lineal o ramificado, butilo, lineal o ramificado y bencilo.
8. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde X puede ser: -O-, -NH-, -S-, -CH₂-y preferentemente, X = -O-.
9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde Y=H.
10. Un compuesto según la reivindicación 1 seleccionado del grupo de Fórmula general I donde X, Y, R₁, R₂ y R₃ pueden ser los siguientes grupos:

X	Y	R ₁	R ₂	R ₃
O	H	H	Et	ⁱ Pr
O	H	Et	Et	ⁱ Pr
O	H	Me	Et	ⁱ Pr
O	H	H	Bn	ⁱ Pr
O	H	Me	Bn	ⁱ Pr
O	H	H	Et	Bn
O	H	Me	Et	Bn
O	H	Et	Et	Bn
O	H	H	Bn	Bn
O	H	H	ⁱ Pr	ⁱ Pr
O	H	Me	ⁱ Pr	ⁱ Pr
O	H	H	^t Bu	ⁱ Pr
O	H	H	Me	ⁱ Pr
O	H	H	Et	^t Bu
O	H	Ph	Bn	ⁱ Pr

	O	H	Ph	Bn	^t Bu
	O	H	3-MeOPh	3-MeOPhCH ₂	ⁱ Pr
	O	H	3-MeOPh	3-MeOPhCH ₂	^t Bu
	O	H	H	Me	ⁱ Pr
	O	H	Me	Et	ⁱ Pr
	O	H	Me	Et	ⁱ Pr
	O	H	Et	Pr	ⁱ Pr
	O	H	ⁱ Pr	ⁱ Bu	ⁱ Pr

11. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1, del tipo



5

12. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso como medicamento.
13. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por DAPK1.
- 10 14. Un compuesto, según la reivindicación anterior, donde la enfermedad o afección sea cáncer y preferentemente leucemia.

15. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente aceptable de al menos uno de los compuestos de Fórmula general (I) o cualquiera de sus tautómeros, estereoisómeros, sales, solvatos, hidratos o profármacos según reivindicaciones 1 a 11 y al menos un transportador, coadyuvante o vehículo aceptable farmacológicamente.

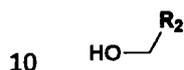
5

16. Un procedimiento para sintetizar un compuesto de Fórmula (I), como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprenda las siguientes etapas:

a) Proporcione una dimetilamida de fórmula:

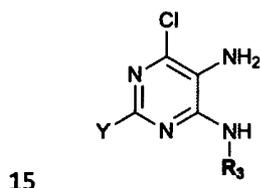


b) Añadir un alcohol de fórmula



c) adicionar hidruro sódico

d) adicionar 6-cloro-4,5-diaminopirimidina de fórmula:



e) obtención de un crudo de Fórmula (I);

En el que en las etapas anteriores a) hasta d) se pueda calentar y usar disolventes orgánicos tales como dioxano y tetrahidrofurano y R₁, R₂, R₃ e Y tienen los significados indicados sobre los compuestos de Fórmula I.

20

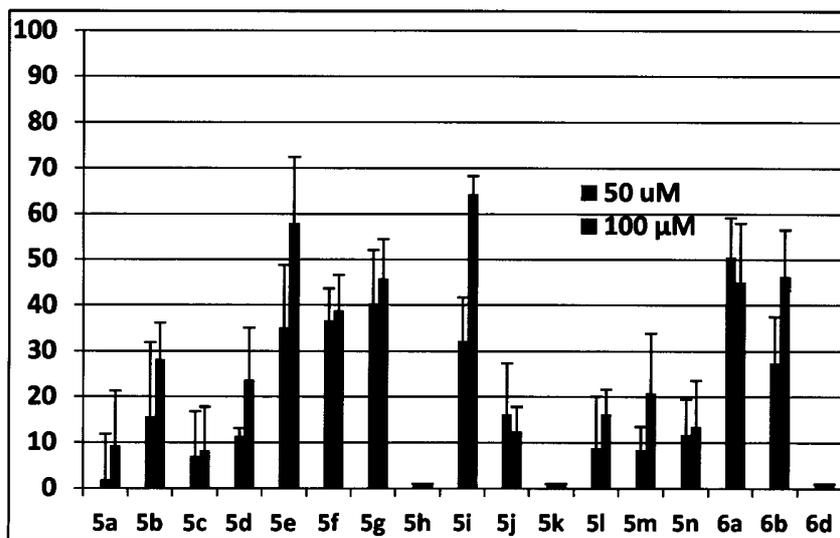


Figura 1

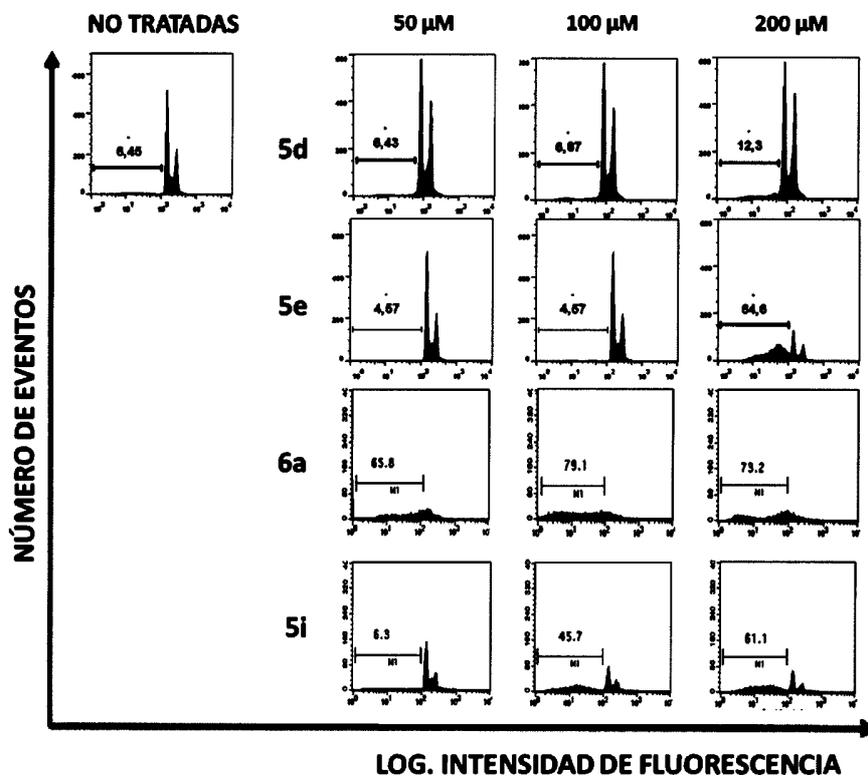


Figura 2

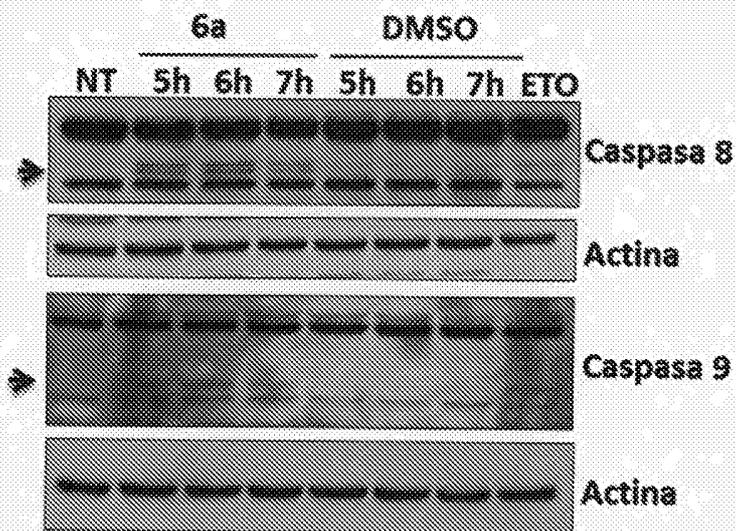


Figura 3

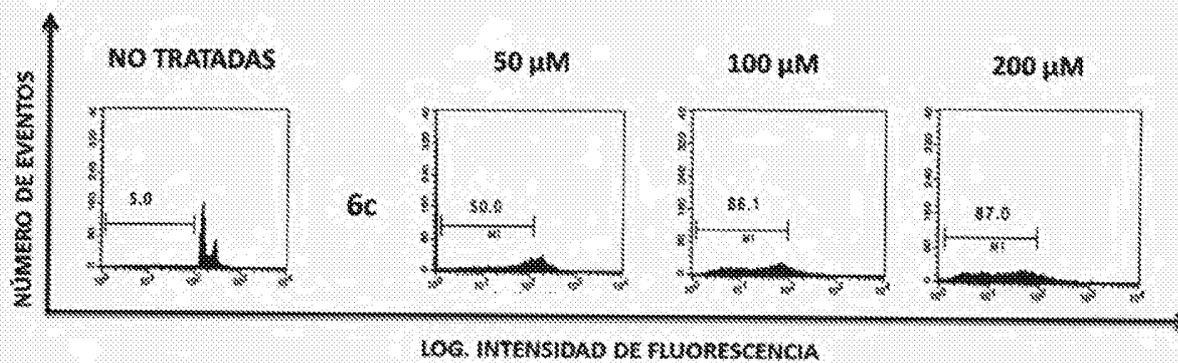


Figura 4