

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 743**

21 Número de solicitud: 201830914

51 Int. Cl.:

A61K 31/52 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

C07D 473/38 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

21.09.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.03.2020

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

04.11.2020

Fecha de concesión:

03.12.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

14.12.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ GIL, Ana;
GIL AYUSO-GONTAN, Carmen;
MARTÍN REQUERO, Angeles;
ROJAS PRATS, Elisa y
MARTINEZ-GONZALEZ, Loreto**

74 Agente/Representante:

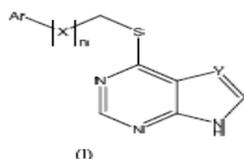
PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **DERIVADOS DE PURINA INHIBIDORES DE CDC7 Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS NEUROLÓGICAS**

57 Resumen:

Derivados de Purina inhibidores de CDC7 y su uso para el tratamiento de patologías neurológicas.

La presente invención se refiere al uso de una serie de derivados de purina que presentan la siguiente fórmula general:



Y 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.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 749 743 B2

DESCRIPCIÓN

**DERIVADOS DE PURINA INHIBIDORES DE CDC7 Y SU USO PARA EL
TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS NEUROLÓGICAS**

5

La presente invención se refiere al uso de una serie de derivados de purina que son capaces de inhibir la actividad de la quinasa CDC7, por lo que resultan útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas 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 neurológicas 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
5 sobre la interacción de compuestos derivados de azaindol con la CDC-7 y la posibilidad de usar estos compuestos en terapia contra el cáncer.

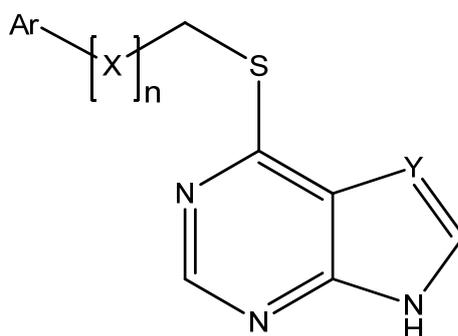
El documento US2011/015172A1 describe una familia de pirrolpirazinas que son
10 inhibidores de quinasa como la CDC-7 y su uso para el tratamiento de enfermedades asociadas a esta quinasa como el cáncer.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una serie de compuestos derivados de purina que
15 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. En particular, en patologías con modificaciones post-traslacionales de TDP-43. Estos compuestos son inhibidores de CDC7 en la fosforilación de TDP-43.

20

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



(I)

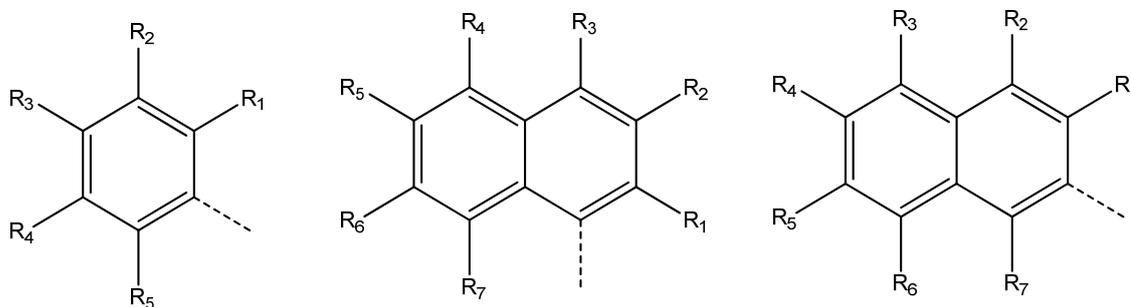
25 donde:

X se selecciona de entre CH₂, CO;

n tiene un valor de 0 o 1;

Y se selecciona de entre N, CH;

Ar se selecciona de entre los siguientes grupos:



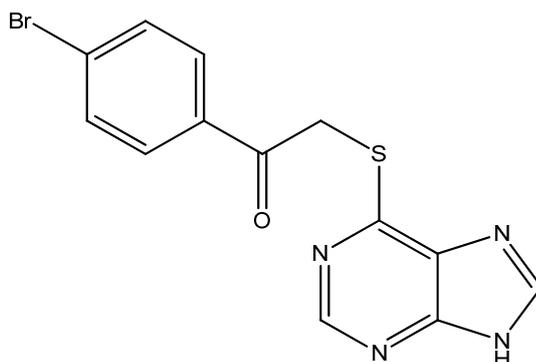
5

donde R₁ a R₇ se seleccionan independientemente de entre H, NH₂, -O(alquilo C₁-C₄), NH(alquilo C₁-C₄) o halógeno y ----- representa el punto de unión al resto de la molécula;

10 o cualquiera de sus sales, solvatos o isómeros farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento y/o la prevención de patologías relacionadas con la proteína TDP-43;

con la condición de que el compuesto de fórmula (I) no es el siguiente compuesto:

15



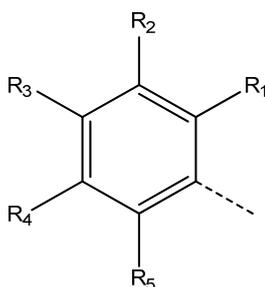
El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 4 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,

20

COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆, y más preferiblemente entre CF₃, halógeno, CN y NO₂.

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

En una realización preferida de este primer aspecto, en el compuesto para uso según se ha descrito, Ar es el siguiente grupo:



10 En una realización más preferida, en el compuesto para uso según se ha descrito, X es CO e Y es N.

En otra realización más preferida, en el compuesto para uso según se ha descrito, X es CH₂ e Y es N.

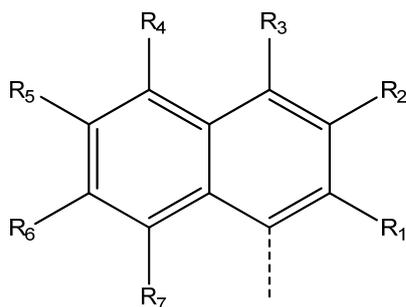
15

En otra realización más preferida, en el compuesto para uso según se ha descrito, n es 0 e Y es CH.

20 En otra realización más preferida, en el compuesto para uso según se ha descrito, al menos uno de R₁ a R₅ es -O(alquilo C₁ C₄), preferiblemente O-metilo.

En otra realización más preferida, en el compuesto para uso según se ha descrito, al menos uno de R₁ a R₅ es halógeno.

25 En otra realización preferida, en el compuesto para uso según se ha descrito, Ar es el siguiente grupo:



En una realización más preferida, en el compuesto para uso según se ha descrito, X es CO e Y es N.

- 5 En otra realización más preferida, en el compuesto para uso según se ha descrito, al menos uno de R₁ a R₇ es -O(alquilo C₁ C₄), preferiblemente es -O-metilo.

En otra realización preferida, en el compuesto para uso según descrito anteriormente, al menos uno de R₁ a R₇ es halógeno.

10

En otra realización preferida, el compuesto para uso según se ha descrito, se selecciona de la siguiente lista:

- 1-(4-metoxifenil)-2-((9H-purin-6-il)tio)-etan-1-ona (2)
- 1-(naftalen-2-il)-2-((9H-purin-6-il)tio)-etan-1-ona (3)
- 15 • 1-(3-metoxifenil)-2-((9H-purin-6-il)tio)-etan-1-ona (4)
- 1-(4-iodofenil)-2-((9H-purin-6-il)tio)-etan-1-ona (5)
- 6-((4-clorofenil)tio)-9H-purina (6)
- 6-((3-clorofenil)tio)-9H-purina (7)
- 6-((2-clorofenil)tio)-9H-purina (8)
- 20 • 6-((4-fluorofenil)tio)-9H-purina (9)
- 4-(benciltio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (10)

En otra realización preferida, la enfermedad relacionada con la proteína TDP-43 es una enfermedad neurológica. En una realización más preferida, la enfermedad
 25 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. En una realización aún más preferida, la enfermedad relacionada con la proteína TDP-43 se selecciona de entre esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal y
 30 enfermedad de Alzheimer.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un compuesto que se selecciona de entre:

- 6-((4-Clorofenil)tio)-9*H*-purina (6)
- 5 • 6-((3-Clorofenil)tio)-9*H*-purina (7)
- 6-((2-Clorofenil)tio)-9*H*-purina (8)
- 6-((4-Fluorofenil)tio)-9*H*-purina (9)

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que
10 comprende un compuesto del segundo aspecto de la invención mencionado anteriormente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, esta composición puede contener otro principio activo.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) o por los
15 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
20 también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

25 Todos los 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) o de los compuestos del segundo aspecto que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos
30 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 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
35 la materia.

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I) 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 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.

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 administración a un paciente.

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.

Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento de una enfermedad neurológica o neurodegenerativa, que comprende la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I), de un compuesto del segundo aspecto de la invención o de una composición farmacéutica que los comprende, donde la enfermedad neurológica o neurodegenerativa es una enfermedad relacionada con la proteína TDP-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.

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 administración.

5

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 combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma
10 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), o una sal o solvato del mismo.

15 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
20 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.).

25 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, tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz,
30 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.

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.

- 5 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.
- 10 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.

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.

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.

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.

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.

35

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 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 de 10 compuestos comerciales empleando la metodología PAMPA.

FIG. 2. Muestra el efecto neuroprotector del inhibidor de CDC7 (compuesto 3) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas previamente con ácido etacrínico (AE, 20 μ M) durante 12 horas en presencia o ausencia del inhibidor a 10 μ M y de dos compuestos de referencia (inhibidores de GSK-3). Los datos representan la media de cuatro experimentos diferentes \pm SEM (* p < 0.05).

EJEMPLOS

20

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

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

25

6-((4-Clorofenil)tio)-9H-purina (6):

Se disuelven 6-mercaptopurina monohidrato (300.0 mg, 1.76 mmoles) y K_2CO_3 (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 4-clorofenilo (387.0 mg, 1.76 mmoles) y se mantiene en agitación durante 2 h y 30 min 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 Mg_2SO_4 anhidro, se filtra y se concentra hasta sequedad. El crudo se purifica mediante columna cromatográfica empleando $CH_2Cl_2/MeOH$ (10:1) como eluyente. De esta forma se obtiene el **producto 6** en forma de sólido blanco (315.4 mg, 62 %). **1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6):** δ 13.51 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.44 (s, 1H),

30
35

7.40 – 7.29 (m, 4H), 3.59 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158.2 (1C), 151.5 (1C), 149.6 (1C), 143.3 (1C), 139.1 (1C), 131.0 (1C), 130.5 (2C), 130.0 (1C), 128.3 (2C), 34.4 (1C), 29.0 (1C). P.f. 190 – 192 °C. **Análisis elemental (C₁₃H₁₁ClN₄S)** Calculado: C 53.70%, H 3.81%, N 19.27%, S 11.03%. Hallado: C 53.27%, H 3.79%, N 19.03%, S 10.85%.

6-((3-Clorofenil)tio)-9H-purina (7):

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-clorofenilo (387.0 mg, 1.76 mmoles) y se mantiene en agitación durante 3 h y 30 min 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 (20:1) como eluyente. De esta forma se obtiene el **producto 7** en forma de sólido blanco (402.2 mg, 78 %). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.51 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.39 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.37 – 7.24 (m, 3H), 3.62 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.04 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158.5 (1C), 151.5 (1C), 149.2 (1C), 142.9 (1C), 142.6 (1C), 133.0 (1C), 130.4 (1C), 130.2 (1C), 128.5 (1C), 127.4 (1C), 126.4 (1C), 34.7 (1C), 28.8 (1C). P.f. 143 – 145 °C. **Análisis elemental (C₁₃H₁₁ClN₄S)** Calculado: C 53.70%, H 3.81%, N 19.27%, S 11.03%. Hallado: C 53.34%, H 3.80%, N 19.09%, S 11.00%.

6-((2-Clorofenil)tio)-9H-purina (8):

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 2-clorofenilo (387.0 mg, 1.76 mmoles) y se mantiene en agitación durante 5 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. 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 (250.4 mg, 49 %). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.49 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.44 (dd, $J = 6.9, 2.5$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 6.9, 2.4$ Hz, 1H), 7.33 – 7.22 (m, 2H), 3.62

(dd, $J = 8.3, 6.6$ Hz, 2H), 3.17 (dd, $J = 8.2, 6.7$ Hz, 2H). **^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6):** δ 157.6 (1C), 151.4 (1C), 150.3 (1C), 143.3 (1C), 137.3 (1C), 133.1 (1C), 131.1 (1C), 129.2 (2C), 128.4 (1C), 127.2 (1C), 32.7 (1C), 27.6 (1C). **P.f.** 154 – 156 °C. **Análisis elemental (C₁₃H₁₁CIN₄S)** Calculado: C 53.70%, H 3.81%, N 19.27%, S 11.03%.
5 Hallado: C 53.60%, H 3.86%, N 19.14%, S 10.85%.

6-((4-Fluorofenil)tio)-9H-purina (9):

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-fluorofenilo (358.0 mg, 1.76 mmoles) y se mantiene en agitación durante 5 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. El crudo se
15 purifica mediante columna cromatográfica empleando CH₂Cl₂/MeOH (10:1) como eluyente. De esta forma se obtiene el **producto 9** en forma de sólido blanco (285.0 mg, 59 %). **^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6):** δ 13.51 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.45 – 7.26 (m, 2H), 7.22 – 6.94 (m, 2H), 3.59 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H). **^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6):** δ 160.9 (d, $J = 241.7$ Hz, 1C), 158.6 (1C), 151.5
20 (1C), 149.2 (1C), 142.9 (1C), 136.3 (d, $J = 2.7$ Hz, 1C), 130.4 (d, $J = 7.9$ Hz, 2C), 130.4 (1C), 115.0 (d, $J = 21.0$ Hz, 2C), 34.3 (1C), 29.2 (1C). **HPLC:** Pureza > 99%, t.r. = 6.99 min. **MS (ES):** m/z 275 [M+1]. **P.f.** 184 – 186 °C. **Análisis elemental (C₁₃H₁₁FN₄S)** Calculado: C 56.82%, H 4.04%, N 20.42%, S 11.69%. Hallado: C 56.38%, H 4.01%, N 20.04%, S 11.43%.

25

Ejemplo 2: Medida de la inhibición de CDC7

El ensayo de inhibición de quinasas LanthaScreen Eu utiliza un marcador de Alexa Fluor™ que se une a una quinasa y se detecta mediante la adición de un anticuerpo marcado con Eu. La unión del marcador y el anticuerpo a la quinasa da como
30 resultado un alto grado de FRET, mientras que el desplazamiento del marcador por un inhibidor resulta en una pérdida de FRET. A diferencia de otros muchos ensayos de actividad quinasa, este es un ensayo de simple mezcla y lectura, sin etapas de desarrollo. Este método de ensayo ha sido desarrollado por “Life Technologies” e identifican inhibidores de quinasa ATP competitivos, haciéndolos adecuados para la
35 detección de cualquier compuesto que se una al sitio del ATP.

Los compuestos se evalúan en 1% DMSO (final) en el pocillo. Se ha utilizado una mezcla de CDC7/DBF4 recombinante humana (0,5 nM), anticuerpo Eu-antiGST (2 nM) y marcador AlexaFluor (1nM) en un buffer de 50 mM HEPES pH 7,5, 0,01% BRIJ-35, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA. En placas blancas de 384 pocillos, de bajo volumen, codificadas (Greiner cat. #784207), se añaden 160 nL (100 x compuesto en 100% DMSO), 3,84 µL (buffer con CDC7/DBF4), 8,0 µL (anticuerpo), 4,0 µL (marcador). Se agita 30 s y se incuba a temperatura ambiente durante 60 min. A continuación, se mide la fluorescencia en el lector de placas y se analizan los datos (Tabla 1).

10

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

15

Comp.	R ₁ a R ₅	X	Z	Y	CDC7 CI ₅₀ (µM)
1*	4-Br	CO	S	N	2,120
2	4-OMe	CO	S	N	1,080
3	2,3-[(CH) ₄]	CO	S	N	0,698
4	3-OMe	CO	S	N	1,710
5	4-I	CO	S	N	0,380
6	4-Cl	CH ₂	S	N	0,142
7	3-Cl	CH ₂	S	N	0,305
8	2-Cl	CH ₂	S	N	0,191
9	4-F	CH ₂	S	N	0,397
10	H	-	S	CH	0,234
11	3-Br	-	S	CH	0,396

20

25

*Comp. (1): 1-(4-Bromofenil)-2-((9H-purin-6-il)tio)-etan-1-ona, incluido como comparativa.

30

Ejemplo 3: Predicción del paso de barrera hematoencefálica

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 una

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.

10 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
15 permite establecer los límites para predecir si un compuesto puede 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,
20 hidrocortisona, ofloxacino, piroxicam y testosterona, 12 mg de promazina y 25 mg de 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.

25 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).

30 De los compuestos 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 estas
35 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.

5 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
10 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
15 de fórmula (I) como se describen también en la tabla 1:

Comp.	R ₁ a R ₅	X	Z	Y	Pe (10 ⁻⁶ cm s ⁻¹)	PAMPA predicción
2	4-OMe	CO	S	N	2.5 ± 0.1	SNC+/- 20
3	2,3- [(CH) ₄]	CO	S	N	9.6 ± 0.8	SNC+
4	3-OMe	CO	S	N	2.4 ± 1	SNC+/-
5	4-I	CO	S	N	10.5 ± 1.2	SNC+
6	4-Cl	CH ₂	S	N	25.1 ± 1.3	²⁵ SNC+
7	3-Cl	CH ₂	S	N	10.6 ± 0.5	SNC+
8	2-Cl	CH ₂	S	N	11.6 ± 0.5	SNC+
9	4-F	CH ₂	S	N	10.2 ± 0.5	SNC+ 30
10	H	-	S	CH	4.5 ± 1.2	SNC+
11	3-Br	-	S	CH	No soluble	-

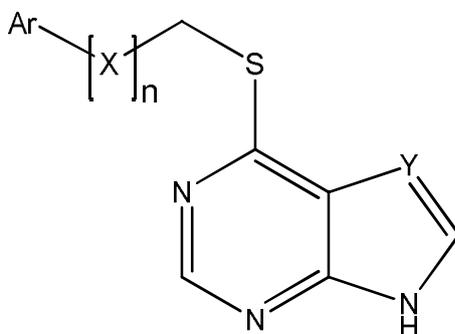
Ejemplo 4: Efecto neuroprotector de los inhibidores de CDC7 frente al ácido etacrínico

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 el inhibidor de CDC7 (compuesto 3) a diferentes concentraciones durante 1,30 horas *post*-adición del agente causante de la fosforilación de TPD-43; ácido etacrínico (20 µM) (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). La figura 2 muestra cómo las células tienen un 40% de mortalidad por el exceso de fosforilación de TDP-43 (ácido etacrínico) y cómo es revertida esta muerte con la adición de los estándares de referencia, así como con el inhibidor de CDC7.

15

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)



(I)

5

donde:

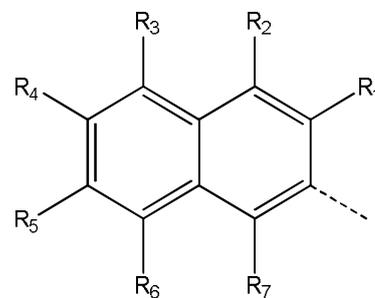
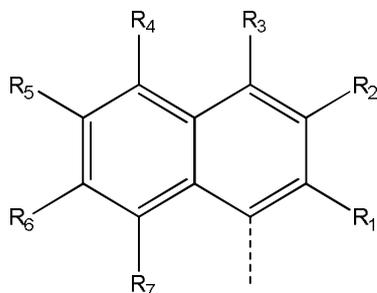
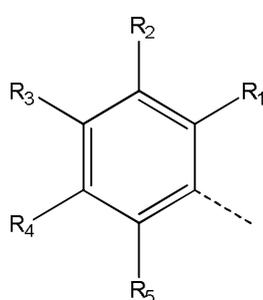
X se selecciona de entre CH₂, CO;

n es 1;

Y se selecciona de entre N, CH;

10

Ar se selecciona de entre los siguientes grupos:



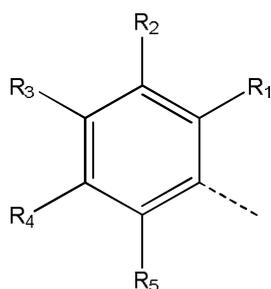
donde R₁ a R₇ se seleccionan independientemente de entre H, NH₂, -O(alquilo C₁-C₄), NH(alquilo C₁-C₄) o halógeno y ----- representa el punto de unión al resto de la molécula;

15

o donde n es 0;

Y es CH; y

Ar es el siguiente grupo:



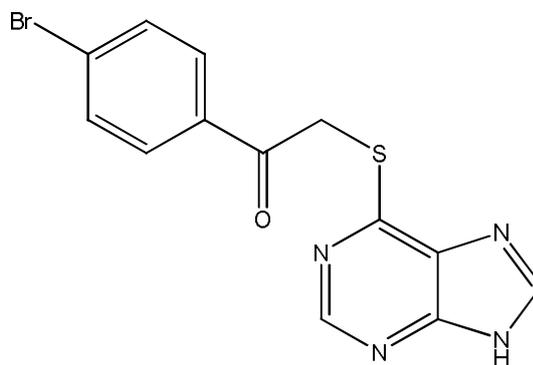
donde R_1 a R_5 se seleccionan independientemente de entre H, NH_2 , $-O$ (alquilo C_1 - C_4), NH (alquilo C_1 - C_4) o halógeno y ----- representa el punto de unión al resto de la molécula;

5

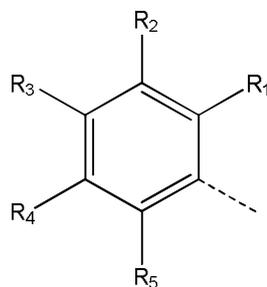
o cualquiera de sus sales, solvatos o isómeros farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento y/o la prevención de patologías relacionadas con la proteína TDP-43;

10

con la condición de que el compuesto de fórmula (I) no es el siguiente compuesto:



2. Compuesto para uso según la reivindicación 1 donde Ar es el siguiente grupo:



15

3. Compuesto para uso según la reivindicación 2 donde n es 1.

4. Compuesto para uso según la reivindicación 3 donde X es CO e Y es N.

5. Compuesto para uso según la reivindicación 3 donde X es CH₂ e Y es N.

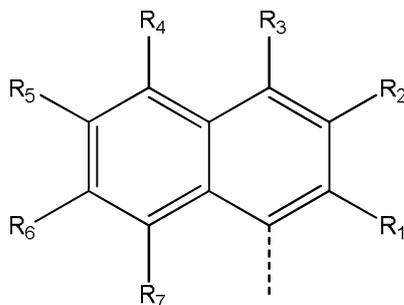
5 6. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 donde al menos uno de R₁ a R₅ es -O(alquilo C₁-C₄).

7. Compuesto para uso según la reivindicación 6 donde al menos uno de R₁ a R₅ es -O-metilo.

10

8. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 donde al menos uno de R₁ a R₅ es halógeno.

9. Compuesto para uso según la reivindicación 1 donde Ar es el siguiente grupo:



15

10. Compuesto para uso según la reivindicación 9 donde X es CO e Y es N.

11. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 donde R₁ a R₇ es H.

20

12. Compuesto para uso según la reivindicación 1 que se selecciona de la siguiente lista:

25

- 1-(4-metoxifenil)-2-((9H-purin-6-il)tio)-etan-1-ona
- 1-(naftalen-2-il)-2-((9H-purin-6-il)tio)-etan-1-ona
- 1-(3-metoxifenil)-2-((9H-purin-6-il)tio)-etan-1-ona
- 1-(4-iodofenil)-2-((9H-purin-6-il)tio)-etan-1-ona
- 6-((4-clorofenil)tio)-9H-purina
- 6-((3-clorofenil)tio)-9H-purina
- 6-((2-clorofenil)tio)-9H-purina
- 6-((4-fluorofenil)tio)-9H-purina
- 4-(benciltio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina

30

13. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la enfermedad relacionada con la proteína TDP-43 es una enfermedad neurológica.
- 5 14. Compuesto para uso según la reivindicación 13, 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.
- 10 15. Compuesto para uso según la reivindicación 14, donde la enfermedad relacionada con la proteína TDP-43 se selecciona de entre esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal y enfermedad de Alzheimer.

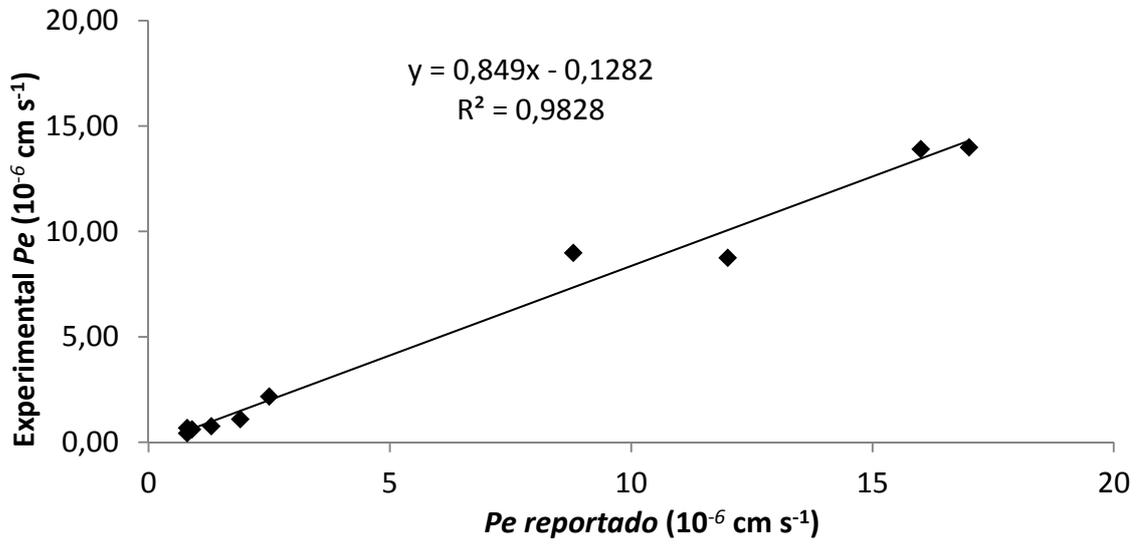


FIG. 1

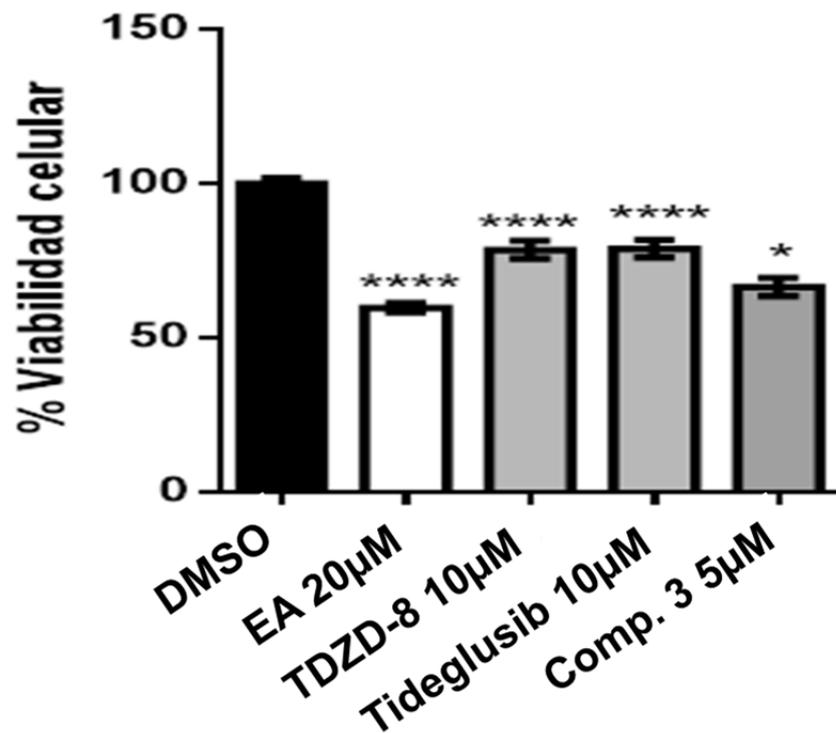


FIG. 2