

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**MODULACIÓN DE LA NEURODEGENERACIÓN CON NUEVAS
APROXIMACIONES MULTIDIANA: DISEÑO Y SÍNTESIS DE
COMPUESTOS INNOVADORES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Vanesa Nozal García

DIRECTORAS: PROF. ANA MARTÍNEZ GIL

DR. M^ª DEL VALLE PALOMO RUIZ

MADRID 2022

MODULACIÓN DE LA NEURODEGENERACIÓN CON NUEVAS APROXIMACIONES MULTIDIANA: DISEÑO Y SÍNTESIS DE COMPUESTOS INNOVADORES

VANESA NOZAL GARCÍA

Prof. ANA MARTINEZ GIL

Dra. M^a DEL VALLE PALOMO RUIZ

TESIS DOCTORAL

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas y Departamento de Química orgánica.





UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. VANESA NOZAL GARCÍA,
estudiante en el Programa de Doctorado QUÍMICA ORGÁNICA,
de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

MODULACIÓN DE LA NEURODEGENERACIÓN CON NUEVAS APROXIMACIONES
MULTIDIANA: DISEÑO Y SÍNTESIS DE COMPUESTOS INNOVADORES

y dirigida por: PROF. ANA MARTINEZ GIL Y DRA. MARIA DEL VALLE PALOMO RUIZ

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 17 de enero de 2022

NOZAL
GARCIA,
VANESA
Fdo.: (FIRMA)

Digitally signed by
NOZAL GARCIA,
VANESA (FIRMA)
Date: 2022.01.17
11:09:21 +01'00'

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

A Manolín y Jesúsín

Y a la Pepa

AGRADECIMIENTOS

Dice el refrán que es de bien nacidos ser agradecidos y como no puede ser de otra manera durante estos últimos años muchísimas personas han influido en mi vida haciendo que hoy pueda estar aquí dedicándoles unas bonitas palabras. A todos ellos me gustaría agradecerles el haberme acompañado.

En primer lugar quiero agradecer mis directoras de tesis la Prof. Ana Martínez y la Dra. Valle Palomo. Ana para mí ha sido un gran modelo de investigadora. Te agradezco enormemente toda tu dedicación, tu disponibilidad y lo fácil que ha sido trabajar contigo estos años, y por supuesto, te agradezco el haberme ofrecido la posibilidad de hacer esta tesis doctoral y haberme dado el empujón final. Quiero agradecerte especialmente tu comprensión y cariño en los momentos difíciles. Para mí ha sido un tremendo placer poder trabajar a tu lado y aprender no sólo de la ciencia que haces sino de la calidad humana y la pasión que le transmites a todo lo que haces. Valle, tu ejemplo para mí ha sido más directo, cercano y de gran valor. Valoro mucho todos los momentos en los que he podido aprender de ti tanto a nivel profesional como a nivel personal. Así como los momentos fuera del laboratorio en comidas y cenas que han hecho que vea que eres una gran persona que quiero seguir teniendo cerca.

No puedo dejar de mencionar al Dr. Daniel Pérez, quien me acompañó y guió con grandes dosis de humor y cariño en mi primera etapa en el laboratorio. Has sido para mí un tremendo ejemplo y no dejo de acordarme de cómo hacías de “pegamento” en el laboratorio favoreciendo siempre el buen rollo y las risas.

Agradezco a la Dra. Carmen Gil el ejemplo de trabajo y constancia que me ha ofrecido durante todos estos años. Siempre velando por todos los que integramos el grupo de investigación con cariño y muy buen criterio. Siempre me ha resultado un placer entretenerme a charlar contigo sobre todo tipo de temas, en especial nuestra pasión por los idiomas y de tu experiencia y visión como investigadora.

Agradezco a las Dras. Ruth Perez y la Dra. Nuria Campillo, los consejos que me han dado durante mi tesis doctoral. Ruth siempre alegrándonos las mañanas con las divertidas historias de tus hijos. Y por otro lado Nuria, un ejemplo de divulgadora del que he tomado buena nota.

Sin duda todas las mujeres que estáis liderando cada una de vuestras líneas de investigación en el laboratorio sois referentes muy importantes para mí y me habéis hecho ver qué tipo de investigadora quiero ser.

Con mis compañeros de laboratorio tengo que detenerme en profundidad, porque han sido muchos los días, horas, risas y buenos momentos compartidos y no quiero dejarme ni un GRACIAS en el tintero. Necesito hacer una mención especial a aquellos compañeros que estuvieron para lo que necesitaba en los momentos más difíciles.

Los doctores que me han precedido sin duda han marcado mucho mi experiencia en el laboratorio. Alfonso, muchas gracias por tus consejos sintéticos y tus anécdotas, siempre aportando taaaantos buenos trucos para los demás. Eva, muchas gracias por todo tu trabajo y tus consejos sobre biología. Javi García, aunque hayamos coincidido poco tiempo has sido un gran aporte a este laboratorio y ha sido muy agradable compartir cafés y buenos momentos contigo.

Eli, mi compañera del alma. MUCHAS GRACIAS por ser mi pilar fundamental del laboratorio, por ser amiga. Gracias por tu alegría y tu cariño, las largas tardes de cafés o de paseo por Madrid. Por abrirme las puertas de tu casa y ofrecerme un hogar en Andalucía, intentar enseñarme a bailar pese a mi poco arte. Ya sabes que allá donde yo esté podrás contar conmigo.

Loreto, muchas gracias por la alegría vital y la experiencia que aportas al laboratorio. Sabes que a pesar de no haber podido honrarte con mi presencia (y seguro que alguno de mis modelitos) en tu boda ha sido un placer hacer contigo este camino de tesis. Estoy deseando ver que nos espera en la siguiente etapa y poder seguir compartiendo contigo nuestras charlas y conversaciones de moda.

Inés, muchísimas gracias por ser mi librería particular. A pesar de tu segundo trabajo como inspectora de horas de laboratorio y que constantemente nos hayas quitado a todos el título de doctorando del mes no podría haber superado estos años sin tus carcajadas, tus grandes versiones de canciones y los momentos compartidos fuera del laboratorio. Estoy deseando seguir con nuestras tertulias de libros y cañas por Madrid o donde toque.

Carlota, aunque hayamos compartido menos momentos en el laboratorio siempre agradeceré tu buen humor y tus sonrisas. Siento haberte quitado el privilegio de ser la primera doctora de Valle ;) Muchas gracias también por esa disponibilidad siempre para ayudar, alegrar el laboratorio y hacer planes.

Y a los doctores que ya se marcharon del laboratorio y que marcaron la primera etapa de mi tesis: Josefa, Carlos y Víctor. Es un placer recordar las fiestas de primavera, viernes de hamburguesa y sobre todo los grandísimos videos que tantísimas risas nos han hecho pasar. Muchas gracias Josefa por compartir con nosotros tu boda y hacernos partícipes de un momento tan especial y compartido con compañeros tan queridos. Muchas gracias también por ofrecerme un ejemplo tan admirable de superación y de socialización, he aprendido grandes cosas de ti. Y a los más computacionales y casi únicos chicos del laboratorio en esa etapa, Carlos y Víctor, gracias por sacarnos de quicio de vez en cuando y darnos tantísimos momentos de risas entre momentos de trabajo incansable. A Rocío y Andrea por ser una gran parte de los Chemfinders y hacer que las fiestas de la primavera fueran mejores.

Quiero agradecer a los que pasaron por el laboratorio en estancias más cortas pero dejaron una gran huella: Antonio, Eoin, Blanca, Luis y Cris. Hicisteis que el principio de la tesis fuera divertidísimo con las copas, cenas, fiestas de primavera y carreras crazy cross. Gracias a Blanca por seguir visitándonos en Madrid y presumir de investigadora siempre que puede en clase con sus alumnos. Quiero agradecer especialmente a mi amiga Luri y a su hermana Vale. Lo que empezó como una estancia doctoral se convirtió en una gran amistad y me siento muy agradecida de haber podido compartir con vosotras grandes momentos. A los que en algún momento han sido mis “pupilos”: Santi, Sara, Ricardo, he aprendido muchísimo de vosotros y estoy segura de que llegaréis a ser grandísimos científicos.

Y a mis chicos que aún siguen luchando por ser doctores. No puedo más que agradecerles las enormes risas, resacas y buenos momentos que hemos compartido este último año. Muchas gracias también, por soportarme y seguirme en mis locuras y nuestra tourné por España. Habéis hecho que sea posible uno de mis sueños de tesis.

Enrique, empezaste como un “esclavo” aunque siempre he dicho que era al revés. Admiro mucho tu inteligencia y capacidad de trabajo, tu cariño y tu interés por tus amigos y que me enseñes tantas cosas de gente joven. Espero que a pesar de todos los disgustos que te doy con mis motes sigas queriendo compartir tantos buenos momentos conmigo.

Marcos, has hecho que mi último año de tesis fuera muchísimo mejor. Gracias por tus anécdotas, tus locuras, ser el mejor amigo de tus amigos y estar siempre ahí para escuchar y ofrecer el consejo adecuado, que muchas veces es el más loco. Gracias también por abrirnos las puertas de tu casa con tanta generosidad y compartir con nosotros momentos importantes.

Elena, no puedo explicar el gran placer que me produce el haber sido tu primera mentora. Muchas gracias por tu alegría y por compartir tus experiencias conmigo, de las que he aprendido enormemente. Gracias además por tu disponibilidad y tu buen hacer siempre que hace falta y gracias siempre por aguantar mis historietas de abuela científica.

A duras penas podría haber sido más afortunada con el grupo de investigación en el que he trabajado estos años.

En mis estancias predoctorales he tenido la grandísima suerte de cruzarme con enormes personas que me han acompañado y enseñado no solo conocimientos científicos sino como sentirme en casa en un país extranjero. Grazie mille Barbara, Paola, Irene, Marina(s). It's been my pleasure to share with you great experiences in the beautiful Trieste, inside and outside the laboratory. Quiero agradecer al Prof. Juan Hermoso y a todo su grupo del IQFR por acogerme con tantísimo cariño: Iván, Vega, Juanlu, Mayte, Martín, Siseth, Miguel. Creo que no puedo agradecer lo suficiente lo arropada que me sentí en vuestro laboratorio, así como la oportunidad que me dieron Iván y Pablo de convertirme en Dolores y divulgar la vida de Rosalind Franklin. Seguiremos viviendo momentos geniales, empezando este verano...

Al Dr. Daniel Lietha y la Dra. Pilar Navajas, por enseñarme y acompañarme con el proyecto de TTBK1, sin vuestro gran conocimiento no hubiera conseguido mis cristales.

De la Universidad Complutense de Madrid tengo que agradecer a la Dra. Silvia Ortega como tutora de mi tesis doctoral y de las prácticas de laboratorio. Ha sido un gran placer aprender de cerca de una grandísima investigadora. Y por supuesto a la Dra. Henar Vázquez que también me ha enseñado como ser una gran docente cercana y amable.

También tengo que agradecer al Ministerio de Educación por el contrato FPU que ha permitido financiar esta tesis doctoral y la estancia internacional. Además, gracias a la SEQT y la RANF por los premios que han otorgado al trabajo que he realizado durante mi tesis doctoral.

Puedo recordar perfectamente aquellas clases de química del instituto que mi profesora Mariajo me daba, haciendo que empezara a dudar sobre mi decisión de estudiar Magisterio. Gracias a tu cariño, cercanía y a tus lecciones hoy estoy escribiendo estas palabras. Mi profesor de Química Orgánica Jose Maria Andrés, hizo que confirmara mi amor a la Química y además descubriera mi pasión por la investigación y la química orgánica. Muchísimas gracias a vosotros y a los demás docentes que me han acompañado a lo largo de estos años.

No pudo olvidar agradecer a Clasesdecostura.com, a Myriam, Natalia, Sara y muy especialmente a Nayra, Ángela, Sergio. Gracias por ofrecerme una vía para dar rienda suelta a mi creatividad, por ayudarme a realizar esos proyectos que se me ocurren y a mejorarlos siempre. Muchas gracias por vuestra alegría y buen hacer cada día en clase.

Gracias a mi amigo Javier Domínguez, por acordarse de mí en su encargo de exposición de mujeres investigadoras y por las preciosas fotos que hiciste.

Muchísimas gracias a Pablo, gracias por apoyarme y cuidarme en los momentos más duros de la tesis. Has llegado como un viento fresco, agradable e inesperado que hace que mejoren mis días. Estoy deseando ver que nos depara el futuro.

Muchas gracias a mis vecinas favoritas y divulgadoras excelentes Andrea y Carmela. Habéis hecho que mis días sean muchísimo mejores, con cervezas, cenas y quedadas vecinales, incluso con toque de queda. Y gracias por vuestro programa de éxito ;).

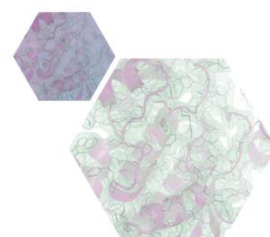
Gracias a Ali y a Lore, por los momentazos compartidos y por no dudar de presumir de amiga investigadora. Habéis sido un gran apoyo. Gracias a mi amigo Víctor por todos los momentos compartidos desde el instituto y las risas y por acordarse de mí cuando veía investigadoras apasionadas.

Muchas gracias a mi amiga Clara, quién nos iba a decir que el bádminton sería la semilla de esta amistad. Gracias por tu apoyo constante y tu admiración, que es mutua. Haces que mis días en Madrid, Valladolid o cualquier sitio sean más bonitos. Gracias a mis amigas del Erasmus: Gema, Claudia, Paloma y Luisa, no puedo más que agradecer los preciosísimos momentos que he compartido con vosotras en tantísimos viajes y estoy deseando continuar nuestro álbum de recuerdos. Gracias a mis cordobesas favoritas, por acogerme y hacer que me sintiera una más, aun siendo de sitios tan distintos. Este año tenemos mucho que celebrar.

Y muchísimas gracias a mi familia: a Cris, a mamá y María, y por supuesto a Julia y a Tomás. Gracias por cuidarme y acompañarme todos estos años, presumiendo de hermana, hija o prima. Gracias a mi hermana Cris porque me ofrece cariño y comprensión siempre que lo necesito y me apoya y me sigue allá donde vaya. Gracias a mi madre por sus cuidados silenciosos pero cariñosos. Y gracias a mi queridísima prima María, por cuidarme tanto estos años, por ayudarme a decidir mi carrera y por los dos grandísimos hijos que tiene que me alegran los días. Gracias a Guille y a Olivia por presumir de tía científica favorita de Madrid.

Por último y más importante, gracias a mi padre, mi tío Jesús y mi abuela, por hacer de ángeles de la guarda. No tengo palabras suficientes para agradecer el ejemplo de superación y alegría que me ofrecía mi padre. Además de la satisfacción y orgullo que siempre demostraba. Muchísimas gracias a mi tío Jesús, por darme el honor de ser su “sobrina y ahijada”, por su ejemplo constante de trabajo y sacrificio y su grandísimo cariño y apoyo. Gracias a mi abuela Josefa, por hacerme sentir tan querida y cuidada y por obligarme a mandarle las notas año tras año para poder presumir de ellas ante los vecinos. Allá donde estés te mandaré una copia de esta tesis doctoral para que sigas sintiéndote orgullosa. Me faltáis cada día.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.



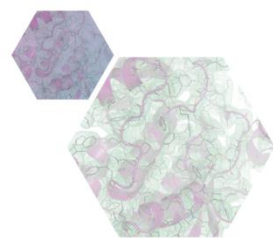
ABREVIATURAS	1
RESUMEN ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	13
1 Enfermedades neurodegenerativas.....	15
2 Mecanismos moleculares de las enfermedades neurodegenerativas.....	19
2.1 Estrés oxidativo.....	19
2.2 Excitotoxicidad	20
2.3 Neuroinflamación y activación de la microglía	20
2.4 Deterioro del transporte axonal.....	21
2.5 Agregación de proteínas	21
3 Tratamientos de las enfermedades neurodegenerativas	23
4 Nuevas aproximaciones para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas	25
4.1 Modulación de una proteína implicada en diversos mecanismos patológicos.....	26
4.2 Compuestos multidia para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.....	27
OBJETIVOS	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
CAPÍTULO 1. MODULACIÓN DE UNA PROTEÍNA IMPLICADA EN DIVERSOS MECANISMOS PATOLÓGICOS.....	35
1 Introducción.....	37
1.1 La proteína TDP-43.....	37
1.1.1 Estructura y función de TDP-43.....	37
1.1.2 Proteinopatías de TDP-43.....	40
1.2 Proteínas quinasa como diana terapéutica.....	43
1.2.1 Inhibidores de quinasas relacionadas con la proteinopatía de TDP-43.....	46
1.3 TTBK1 como nueva diana para la patología de TDP-43.....	50
1.3.1 Expresión, regulación y función de las TTBKs.....	50
1.3.2 Funciones patológicas de las TTBKs	52

1.3.3	Estructura de TTBK1 y TTBK2 e inhibidores descritos	53
2	Resultados y discusión	56
2.1	Diseño y síntesis de nuevos compuestos inhibidores de TTBK1	56
2.1.1	Síntesis de purinas.....	56
2.1.2	Síntesis de quinazolinas y dimetoxiquinazolinas	57
2.1.3	Síntesis de tienopirimidinas.....	58
2.1.4	Síntesis de pirrolopirimidinas.	58
2.1.5	Evaluación enzimática de la inhibición de TTBK1 y TTBK2	60
2.2	Estudio estructural de los compuestos con TTBK1 y TTBK2.....	69
2.2.1	Expresión, purificación y co-cristalización de TTBK1 y TTBK2 con compuestos seleccionados	69
2.2.2	Estudio del modo de unión con métodos computacionales	78
2.3	Evaluación de la selectividad de los compuestos frente a otras quinasas	84
2.4	Predicción del paso de la barrera hematoencefálica.	85
2.5	Evaluación del potencial terapéutico de inhibidores de TTBK1 en modelos celulares representativos.....	88
2.5.1	Evaluación de los inhibidores de TTBK1 en modelos de patología de tau.....	88
2.5.2	Evaluación de los inhibidores de TTBK1 en modelos de patología de TDP-43	90
2.5.3	Evaluación de los inhibidores de TTBK1 en linfoblastos de pacientes de ELA.....	93
2.6	Evaluación de la eficacia de un candidato en modelos transgénicos de ratón	95
2.6.1	Evaluación en un modelo de proteinopatía de TDP-43 con fenotipo motor	96
2.6.2	Evaluación en un modelo de proteinopatía de TDP-43 con fenotipo cognitivo.....	98
CAPÍTULO 2. COMPUESTOS MULTIDIANA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS		101
1	Introducción.....	103
1.1	Compuestos multidiana, una aproximación innovadora	103
1.1.1	Estrategias para el diseño de compuestos multidiana	104

1.2	Una demencia compleja: marcadores patológicos de la enfermedad de Alzheimer	105
1.3	BACE1 como diana terapéutica.....	108
1.4	¿Cómo tratar la enfermedad de Alzheimer con compuestos multidiana?	110
2	Resultados y discusión	112
2.1	Síntesis de prototipos de compuestos multidiana	112
2.2	Estudios biológicos y teóricos de los prototipos multidiana	114
2.2.1	Evaluación enzimática de la capacidad inhibitoria	114
2.2.2	Estudios computacionales del modo de unión de los compuestos con BACE1	115
2.2.3	Estudio de competitividad con el sustrato en BACE1.....	116
2.2.4	Ensayos celulares de reducción del péptido β -amiloide.	117
2.3	Diseño y síntesis de nuevos compuestos multidiana	119
2.4	Evaluación enzimática de los nuevos compuestos multidiana	121
2.5	Estudio computacional del modo de unión de los compuestos en BACE1	122
2.6	Evaluación biológica de los nuevos compuestos multidiana en modelos celulares representativos.....	124
2.6.1	Evaluación en un modelo de la patología del β -amiloide.....	124
2.6.2	Evaluación en un modelo de la patología de tau	126
2.7	Química click <i>in situ</i> utilizando BACE1 como molde de reacción	127
2.8	Predicción del paso de la barrera hematoencefálica de los compuestos multidiana	133
	CONCLUSIONES CONCLUSIONS	137
	PARTE EXPERIMENTAL.....	141
1	Síntesis orgánica	143
1.1	Síntesis de los compuestos del capítulo 1.....	143
1.1.1	Síntesis de los derivados de purina	145
1.1.2	Síntesis de los derivados de quinazolina y dimetoxiquinazolina	147
1.1.3	Síntesis de los derivados de tienopirimidina	149
1.1.4	Síntesis de los derivados de pirrolopirimidina.....	150

1.1.5	Síntesis de azidas.....	176
1.1.6	Síntesis de triazoles	177
1.2	Síntesis de los compuestos del capítulo 2.....	181
2	Procedimientos biológicos.....	198
2.1	Expresión, purificación y cristalización de GSK3 β	198
2.2	Expresión, purificación y cristalización del dominio quinasa de TTBK1 y TTBK2.....	199
2.3	Determinación de la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica	202
2.4	Determinación de la capacidad inhibitoria de los compuestos	205
2.4.1	Ensayo enzimático TTBK1 y TTBK2	205
2.4.2	Ensayo enzimático CK1 δ	205
2.4.3	Ensayo enzimático GSK3 β	206
2.4.4	Ensayo enzimático BACE1	206
2.5	Química click <i>in situ</i> utilizando BACE1 como molde de reacción	207
3	Procedimientos computacionales.....	210
3.1	Estudios de dinámica molecular en TTBK1 y TTBK2	210
3.2	Estudios de acoplamiento molecular en BACE1.....	212
	DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	213

ABREVIATURAS



aa: aminoácido

A β : péptido β -amiloide

AE: ácido etacrínico

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

ALSFRS-R: Escala revisada de Valoración Funcional de la Esclerosis Lateral Amiotrófica

AO: ácido ocadaico

APP: proteína precursora del β -amiloide

ATP: nucleótido adenosín trifosfato

BACE1: β -secretasa

BHE: barrera hematoencefálica

c: cuadruplete

C9ORF72: proteína de marco de lectura abierta 72 del cromosoma 9

CDC7: quinasa del ciclo de división celular 7

CI₅₀: concentración inhibitoria 50

CK1: caseína quinasa 1

COMT: catecol-o-metiltransferasa

COSY: espectroscopía de correlación

d: doblete

dd: doble doblete

ddd: doble doblete de dobletes

DFG: tripéptido de aspártico, fenilalanina y glicina

DFT: demencia frontotemporal

DM: estudios de dinámica molecular

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

DMF: dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DS: desviación estándar

dt: doble triplete

EA: enfermedad de Alzheimer

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EH: enfermedad de Huntington.

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

EMA: Agencia Europea del Medicamento

EN: enfermedad neurodegenerativa

EP: enfermedad de Parkinson

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

ESI: ionización por electrospray

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos

FRET: reacción de transferencia de energía por resonancia

FUS: proteína fusionada en el sarcoma

GSK3 β : glucógeno sintasa quinasa 3 β

HEPES: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico

HMBC: espectroscopía de correlación heteronuclear a múltiples enlaces

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

Hz: hercios

IEC: cromatografía de intercambio iónico

IMAC: cromatografía de afinidad con metales inmovilizados

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

J: constante de acoplamiento

LATE: encefalopatía de predominio límbico asociada a la edad con inclusiones de TDP-43

LC: límite de cuantificación

LS: límite superior

LRRK2: quinasa rica en repeticiones de leucina 2

m: multiplete

MAOB: monoamino oxidasa B

MEK: quinasa quinasa activada por mitógeno

MM-GBSA: energía libre de unión calculada con mecánica molecular

MN: motoneuronas

MS: espectrometría de masas

mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero

MW: microondas

NES: secuencia de exportación nuclear

NLS: secuencia de localización nuclear

NMDAr: receptor del *N*-metil-*D*-aspartato

ns: nanosegundo

PAMPA: ensayo de permeabilidad a través de membranas paralelas artificiales

PBS: tampón fosfato salino

PDB: banco de datos de proteínas

***Pe*:** permeabilidad efectiva

PEG: polietilenglicol

P.f.: punto de fusión

PGRN: progranulina

ppm: partes por millón

PrP: proteína priónica

q: quintuplete

RIPK1: serina/treonina quinasa de interacción con el receptor de proteínas 1

RMN: resonancia magnética nuclear

RMSD: desviación cuadrática media de las posiciones atómicas

RMSF: fluctuación cuadrática media de las posiciones atómicas

ROCK: quinasa asociada a Rho

ROS: especies reactivas de oxígeno

s: singlete

SEC: cromatografía de exclusión molecular

SNC: sistema nervioso central

SOD1: superóxido dismutasa 1

t: triplete

t.a.: temperatura ambiente

TARDBP: gen de la proteína de unión a ADN de respuesta transactiva

TBTA: tris(benciltriazolmetil)amina

TCEP: clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina

td: triple doblete

TDP-43: proteína de unión a ADN de respuesta transactiva de 43 kDa

THF: tetrahidrofurano

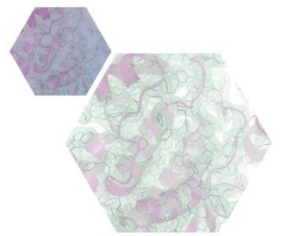
tg: transgénico

TR-FRET: transferencia de energía de resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

TTBK1/2: tau tubulina quinasa isoformas 1 o 2

RESUMEN | ABSTRACT



Las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que sufren millones de personas en el mundo, carecen hoy en día de una terapia que frene la muerte neuronal que en ellas se produce. Las estrategias tradicionales empleadas por la química médica y el descubrimiento de fármacos no han sido capaces hasta ahora de conseguir un tratamiento efectivo y es por ello que en la presente tesis doctoral titulada: *“Modulación de la neurodegeneración con nuevas aproximaciones multidiana: diseño y síntesis de compuestos innovadores”*, se proponen dos nuevas aproximaciones para el tratamiento de estas patologías.

La primera aproximación es la modulación a través de moléculas pequeñas de la patología de TDP-43, proteína descrita como principal componente de los agregados presentes en las motoneuronas de pacientes con ELA. Esta proteína también se ha definido como agente central de diversos mecanismos patológicos en otras enfermedades neurodegenerativas como la EA. Dado que la hiperfosforilación de TDP-43 mediada por proteínas quinasa es un evento patológico crucial para esta agregación, en esta tesis doctoral se han diseñado, sintetizado y validado inhibidores de la quinasa de tau y tubulina 1 (TTBK1), una de las principales enzimas implicadas en el proceso de hiperfosforilación de esta diana. El modo de unión de los inhibidores con la quinasa ha sido estudiado por medio de cristalografía de rayos X, así como con estudios computacionales. Los compuestos obtenidos han conseguido inhibir de manera eficiente esta quinasa y han sido ensayados en modelos celulares, en los cuales se ha demostrado su efectividad en la modulación de la patología de TDP-43, reduciendo la muerte celular. Por último, se ha demostrado que uno de los compuestos es capaz de proteger las motoneuronas de ratones transgénicos con la patología de TDP-43, disminuyendo la hiperfosforilación de esta y posicionando los inhibidores de TTBK1 como una estrategia eficaz para el tratamiento de esta proteinopatía.

La segunda aproximación innovadora descrita en esta tesis doctoral es el diseño y síntesis de compuestos multidiana para el tratamiento de la EA. En concreto, se han diseñado y sintetizado compuestos dirigidos a modular los dos eventos patológicos principales que se producen en esta enfermedad: los ovillos neurofibrilares compuestos por la proteína tau hiperfosforilada y las placas seniles formadas por agregados del péptido β -amiloide. Los compuestos multidiana diseñados presentaron actividad inhibitoria frente a BACE1, la principal proteasa implicada en la digestión de la proteína precursora del β -amiloide así como actividad inhibitoria frente a dos quinasas diferentes implicadas en la hiperfosforilación de tau: CK1 δ , LRRK2, GSK3 β y TTBK1. De las estrategias

habituales para el diseño de este tipo de ligandos, los compuestos multidiana fueron obtenidos partiendo de inhibidores de quinasa conocidos uniéndolos mediante un conector de tipo triazol. Así mismo, se ha puesto a punto una metodología de química click *in situ* utilizando BACE1 como molde de reacción facilitando el descubrimiento de nuevos compuesto multidiana. El modo de unión respecto a la proteasa BACE1 se estudió con métodos computacionales. La evaluación biológica de los inhibidores sintetizados en distintas líneas celulares provocó por un lado, una reducción en la producción de los fragmentos del β -amiloide así como una neuroprotección de las células frente al daño inducido por el ácido ocaidaico y por tanto, por la hiperfosforilación de la proteína tau.

En esta tesis doctoral se describe el diseño, síntesis y validación de nuevos moduladores de proteínas clave en distintos mecanismos patológicos, ofreciendo nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que a día de hoy no tienen cura.

Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) or amyotrophic lateral sclerosis (ALS), which affect millions of people worldwide, lack a therapy able to stop the characteristic neuronal death. Traditional medicinal chemistry and drug discovery strategies have failed to succeed in finding an effective treatment. In this thesis entitled: *"Modulation of the neurodegeneration with new multitarget approaches: design and synthesis of innovative compounds"*, two new approaches for the treatment of these pathologies are proposed.

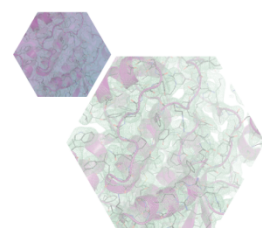
The first approach is the modulation with small molecules of the pathology of TDP-43, a protein described as the main component of the aggregates present in the motor neuron of ALS patients. This protein is at the same time, the central agent of different pathological pathways involved in other neurodegenerative diseases such AD. Taking into consideration that the hyperphosphorylation of TDP-43 caused by kinases is a crucial pathological mechanism which triggers this aggregation, several inhibitors of one of the main kinases involved in this event: the tau and tubulin kinase 1 (TTBK1), have been designed and synthesized. The binding mode of the inhibitors with the kinase domain of TTBK1 has been studied using crystallographic and computational techniques. The synthesized compounds efficiently inhibited the kinase and therefore have been tested in cellular models which have shown the ability of these inhibitors to

modulate the pathology of TDP-43 causing a reduction of the cellular death. Finally, one of the compounds has been tested in a transgenic TDP-43 animal model, confirming that this TTBK1 inhibitor was able to decrease TDP-43 hyperphosphorylation and protect the motor neurons of the animals. These results demonstrate that TTBK1 inhibition is a valuable strategy for the modulation of this pathology in neurodegenerative diseases.

The second innovative approach described here is the design and synthesis of multitarget ligands for the treatment of AD. The compounds were designed to modulate the two main pathological hallmarks of this dementia: neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated protein tau and senile plaques, the main constituent of which is aggregated amyloid- β peptide. The designed multitarget ligands showed inhibitory activity against BACE1, the main protease involved in the processing of amyloid- β precursor protein and inhibitory activity against two different kinases responsible for the hyperphosphorylation of tau: CK1 δ , LRRK2, GSK3 β y TTBK1. Linkage strategy was used to connect diverse fragments originally inhibitors of the before mentioned protein kinases, designed and synthesized in this research group using a triazole ring. Besides, the *in situ* click chemistry methodology has been implemented using BACE1 as protein template which facilitated the discovery of new multitarget compounds efficiently. The binding mode of the compounds with BACE1 was studied using computational methods. Biological evaluation of the synthesized inhibitors in different cellular models resulted in a reduction of the amyloid- β fragment production and a neuroprotection of the cells against the toxic insult of okadaic acid, resulting in a decreased hyperphosphorylation of tau.

In summary, in this thesis the design, synthesis and validation of new modulators of key proteins involved in different pathological mechanism is described, offering new therapeutic strategies for the treatment of neurodegenerative diseases which lack an effective cure.

INTRODUCCIÓN



1 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas (EN), hacen referencia a un grupo de patologías que causan la muerte de determinados tipos de neuronas específicas de cada enfermedad dando lugar a diferentes sintomatologías clínicas. Afectan generalmente a personas de edad avanzada y se cuantifican en millones de pacientes en todo el mundo. Debido a ello, suponen un gasto socioeconómico elevado para los sistemas públicos de salud, los enfermos y sus familias. Además, siendo la edad uno de sus principales factores de riesgo, se prevé que el número de afectados por EN aumente significativamente en los próximos años debido al aumento de la esperanza de vida. Las más comunes son la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

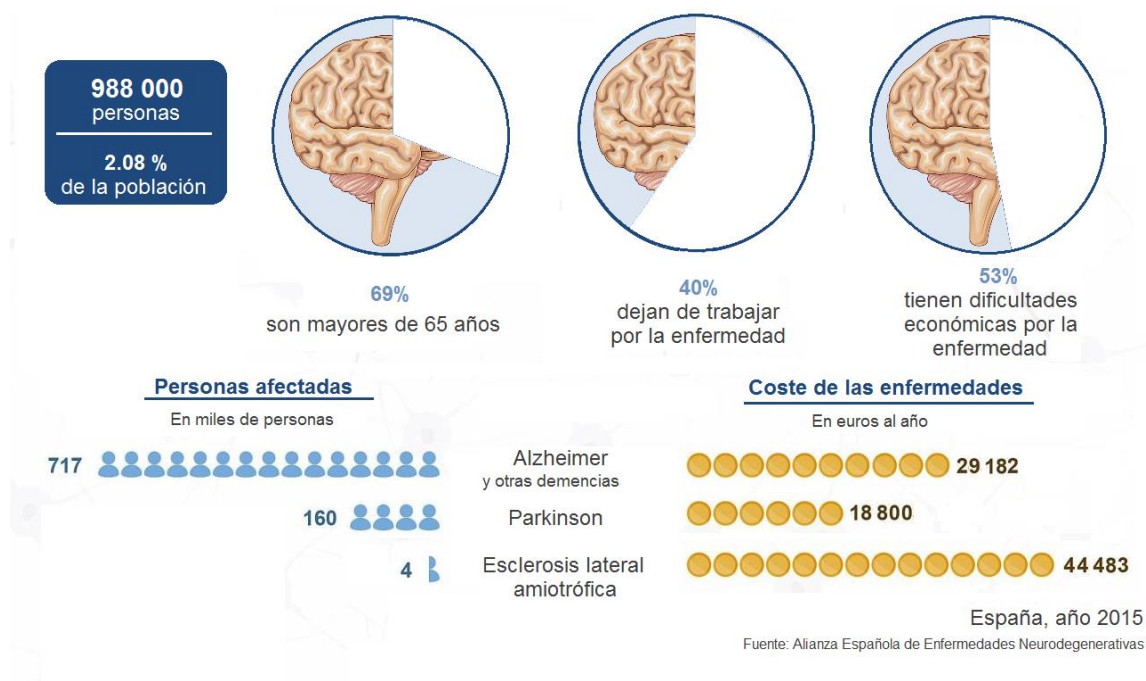


Figura 1. Número de pacientes con enfermedades neurodegenerativas en España y coste de las enfermedades por paciente y año.

Actualmente se estima que hay 50 millones de personas en el mundo viviendo con algún tipo de demencia, de las cuales el 60-70% son pacientes de EA. Se espera que este número se triplique para el año 2050.¹ En el año 2015 el número de enfermos con ELA se estimaba en torno a

¹ W.H.O. Global action plan on the public health response to dementia 2017-2025. 2017. <https://www.who.int/publications/i/item/global-action-plan-on-the-public-health-response-to-dementia-2017---2025> (Consultado 22/09/2021)

223 000 con previsión de incrementarse en un 69% hasta los 377 000 para el año 2040,² mientras que en la EP se estiman más de 6 millones de pacientes que se llegarán a duplicar para ese mismo año.³

Las EN crean incapacidad y dependencia, condicionando no solo el comportamiento de los propios pacientes, que requieren cuidados de tipo personal y farmacológico, sino el de aquellas personas que los rodean, puesto que hay un deterioro de la calidad de vida unido a la carga física y psíquica de los cuidadores de estos pacientes, a menudo familiares directos. En 2015 se estimó que el coste global de la demencia alcanzaba 818 billones de dólares (700 B\$) o lo que es igual, el 1.1% del producto interior bruto mundial.¹ En España, el número de afectados por enfermedades neurodegenerativas está ligeramente por debajo del millón de personas. En cuanto al gasto económico personal que suponen estas enfermedades discapacitantes, la ELA puede llegar a costar hasta 44 483 € al año a cada enfermo, debido a los cuidados de fisioterapia, logopedia o dispositivos de movilidad que a menudo corren a cargo del paciente (Figura 1).⁴ Aunque la causa de estas enfermedades tiene un origen desconocido en un 90% de los casos, varios estudios apuntan a que el riesgo de padecerlas se puede reducir con una dieta saludable, baja en grasas y azúcares, ejercicio moderado y regular tanto del cuerpo como de la mente, consumo de alcohol moderado y abstención de fumar.⁵

En este tipo de enfermedades se observa una muerte progresiva de poblaciones específicas de neuronas, características de cada enfermedad. Algunas de ellas se conocen desde hace mucho tiempo y se han descrito distintos mecanismos patológicos presentes en las mismas, pero la causa que origina estas enfermedades es aún desconocida para la comunidad científica, lo que provoca que los tratamientos farmacológicos que existen en la actualidad sean sintomáticos y no consigan frenar la muerte neuronal. El desarrollo de herramientas de diagnóstico temprano, así como el descubrimiento de biomarcadores que permitan monitorizar el avance de estas enfermedades pueden ayudar a mejorar la calidad de vida de los pacientes y permitir la evaluación de nuevos tratamientos terapéuticos efectivos.

² Arthur, K. C.; Calvo, A.; Price, T. R.; Geiger, J. T.; Chio, A.; Traynor, B. J. Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12408.

³ G.B.D. Neurological Disorders Collaborator Group. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol.* **2017**, *16* (11), 877-897.

⁴ Fundación Francisco Luzón. La ELA: Una realidad ignorada. **2017**. <https://ffluzon.org/wp-content/uploads/2019/12/LaELA-una-realidad-ignorada.pdf> (Consultado 13/12/2021)

⁵ Perneckzy, R. Dementia prevention and reserve against neurodegenerative disease. *Dialogues. Clin. Neurosci.* **2019**, *21* (1), 53-60.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más frecuente entre las personas mayores, en las que causa una pérdida de memoria, especialmente de la memoria reciente, que suele ser el primer signo de la enfermedad. Se ven afectadas las neuronas colinérgicas del hipocampo y la corteza cerebral, regiones responsables de la memoria, el lenguaje, el conocimiento y la personalidad. Cabe destacar que la EA no es una enfermedad mortal, sin embargo aumenta ciertos factores de riesgo que pueden causar la muerte, como una mayor posibilidad de accidentes, pérdida de adherencia a tratamientos médicos de otras enfermedades o desnutrición por fallar los instintos básicos de supervivencia.⁶

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno del movimiento que afecta a los pacientes de manera crónica y progresiva. En esta dolencia son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* las que se ven afectadas. Se caracteriza por cuatro síntomas principales: temblores en manos, cabeza, brazos y piernas; rigidez en las extremidades; lentitud en los movimientos (también llamada bradicinesia) y deterioro del equilibrio. A medida que la enfermedad va avanzando éstos pueden empeorar y aparecer otros síntomas no motores como trastornos del sueño, del olfato y alteraciones cognitivas. Como en el caso de la EA, la EP no es una enfermedad mortal pero sí altamente incapacitante.⁷

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad que afecta a las motoneuronas de los pacientes, encargadas de transmitir el impulso nervioso desde el cerebro hasta los músculos, de manera que la degeneración neuronal provoca atrofia muscular y dificultad para hablar, tragar o respirar. Los pacientes adquieren una discapacidad y dependencia total a medida que avanza la enfermedad y hasta un 80% mueren antes de 5 años tras el diagnóstico de la misma.⁴

Tabla 1. Características de las enfermedades neurodegenerativas más comunes.

	Sintomatología clínica	Incidencia en Europa	Edad media inicio enfermedad
Enfermedad de Alzheimer	Demencia	11 / 1 000	>65 años
Enfermedad de Parkinson	Trastorno motor	11-19/ 100 000	50-60 años
Esclerosis lateral amiotrófica	Debilidad y atrofia muscular	2.2 / 100 000	50-60 años

⁶ Martínez, A., *¿Qué sabemos de... El Alzheimer?* Ed. La Catarata-CSIC, Madrid 2009, ISBN 978-84-00-08818-7

⁷ Gil, C.; Martínez, A., *¿Qué sabemos de... El Parkinson?* Ed. La Catarata-CSIC, Madrid 2015, ISBN 978-84-00-09918-3

Uno de los mayores problemas en el tratamiento de las EN es el seguimiento clínico eficaz, que ante la escasez de herramientas pronósticas fiables y sencillas retrasa el diagnóstico inequívoco de las enfermedades, que a menudo comparten rasgos clínicos y patobiológicos. Cuando los síntomas de la enfermedad se manifiestan a nivel clínico, el deterioro neuronal es avanzado e irreversible. Esto, unido a la falta de biomarcadores que permitan hacer un diagnóstico temprano, monitorizar el avance de la dolencia y evaluar la eficacia de nuevos tratamientos, ha hecho que muchos de los esfuerzos de la comunidad científica por desarrollar nuevas terapias no hayan dado aún su fruto. Además, en el caso de las EN, los modelos animales que deberían ayudar a priorizar los fármacos más efectivos no son capaces de mimetizar estas enfermedades y, con frecuencia, los buenos resultados que se obtienen en estudios con animales no se trasladan a la clínica.⁸

Sin embargo, no son pocos los esfuerzos por desarrollar nuevos fármacos y biomarcadores para estas dolencias. En la base de datos del Instituto Nacional de Salud de los EEUU (NIH) podemos encontrar hasta 588 ensayos clínicos activos o reclutando pacientes para la EA, 533 para la EP y 181 para ELA en todo el mundo (Figura 2). Y no son menos los estudios que se están realizando tanto para la búsqueda o validación de nuevos biomarcadores como para descifrar la importancia de los distintos mecanismos patológicos implicados en cada enfermedad.⁹ Sin duda en las próximas décadas observaremos el fruto de estas investigaciones en la búsqueda de nuevos tratamientos para las enfermedades neurodegenerativas.

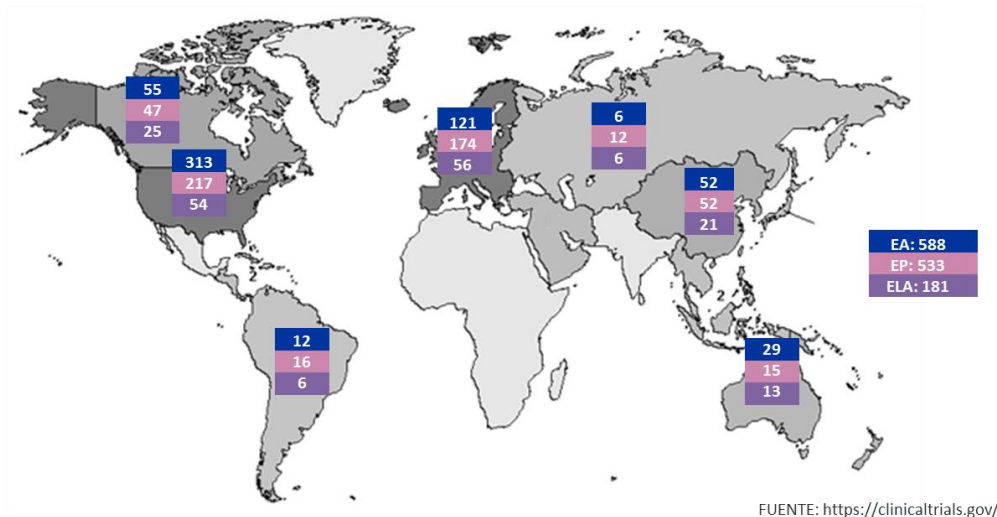


Figura 2. Número de ensayos clínicos activos o en reclutamiento en todo el mundo para las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

⁸ Dawson, T. M.; Golde, T. E.; Lagier-Tourenne, C. Animal models of neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21* (10), 1370-1379.

⁹ Hansson, O. Biomarkers for neurodegenerative diseases. *Nat. Med.* **2021**, *27* (6), 954-963.

2 Mecanismos moleculares de las enfermedades neurodegenerativas

Aunque las EN tienen diferentes manifestaciones clínicas, y se pueden clasificar en base a su origen genético o a marcadores biológicos identificados *post mortem*, existen mecanismos patológicos comunes, como el estrés oxidativo, la neuroinflamación y activación de la microglía, el deterioro del transporte axonal o la agregación de proteínas entre otros (Figura 3).¹⁰ Se sabe que en la degeneración que conlleva a la muerte neuronal cada uno de estos procesos juega un papel fundamental, pero es difícil a día de hoy establecer cuál es causa y cuál consecuencia de la enfermedad.

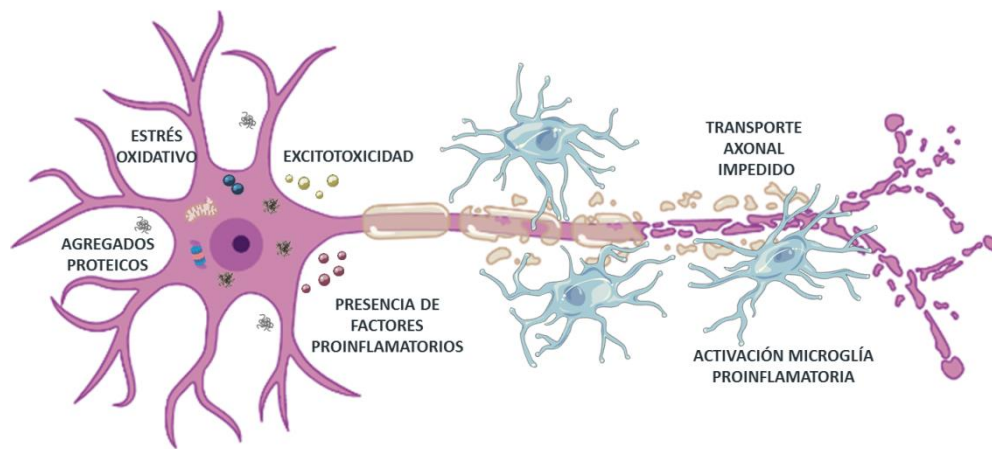


Figura 3. Principales mecanismos patológicos comunes a diferentes enfermedades neurodegenerativas.

2.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo ocurre cuando se produce un exceso de radicales libres, debido a una reacción incompleta del oxígeno en la respiración celular que se da en las mitocondrias o a desregulación de los mecanismos antioxidantes fisiológicos. Puesto que el cerebro es un órgano que consume mucho oxígeno, energía y contiene un alto contenido en lípidos es más susceptible al estrés oxidativo.¹¹ En condiciones normales, el sistema nervioso central (SNC) tiene mecanismos compensatorios que son capaces de reducir estas especies reactivas de oxígeno (ROS) y mantener la homeostasis celular, pero en las EN se genera un desequilibrio que resulta tóxico para las células

¹⁰ Jellinger, K. A. Basic mechanisms of neurodegeneration: A critical update. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14* (3), 457-487.

¹¹ Casetta, I.; Govoni, V.; Granieri, E. Oxidative stress, antioxidants and neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11* (16), 2033-2052.

provocando cambios en el ADN, los lípidos y las proteínas. Además, en estas enfermedades se han relacionado los niveles elevados de metales como el hierro con el estrés oxidativo.¹²

2.2 Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es el proceso por el cual el equilibrio del glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio del SNC, se rompe causando una liberación excesiva al espacio sináptico, lo que contribuye a la muerte neuronal.¹³ Dado que el sistema glutamatérgico es una pieza clave interconectada con otras cascadas de neurotransmisores, los niveles de glutamato están finamente regulados en las neuronas. Así, ante un aumento de este neurotransmisor en la sinapsis, se produce una sobreactivación de los receptores de *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) en la neurona post-sináptica, lo que desencadena una entrada masiva de calcio a través de estos receptores, estrés en el retículo endoplasmático y sobrecarga mitocondrial que conducen a la neurodegeneración.

2.3 Neuroinflamación y activación de la microglía

La microglía es un conjunto de células inmunes que forman parte del SNC y actúan en él como respuesta a diferentes insultos patológicos, activándose para producir protección neuronal. Sin embargo, en diferentes EN esta neuroinflamación se vuelve excesiva y contribuye al empeoramiento de las patologías.¹⁴ De esta manera, la inflamación crónica y la activación de la microglía son dos marcadores consistentes de este tipo de enfermedades, así como la infiltración de células T y la disfunción de la barrera hematoencefálica. Esta activación de la microglía se da en dos direcciones, la activación “clásica” o M1 de la microglía está asociada a la producción de citoquinas proinflamatorias como el factor TNF α , IL1 β , óxido nítrico (NO) o las especies reactivas de oxígeno (ROS). Sin embargo, la microglía M2 está relacionada con genes que promueven la reducción de la inflamación, la reparación del tejido y la reconstrucción de la matriz extracelular,

¹² Altamura, S.; Muckenthaler, M. U. Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis. *J. Alzheimers. Dis.* **2009**, *16* (4), 879-895.

¹³ Binignat, O.; Olloquequi, J. Excitotoxicity as a target against neurodegenerative processes. *Curr. Pharm. Des.* **2020**, *26* (12), 1251-1262.

¹⁴ Wake, H.; Moorhouse, A. J.; Nabekura, J. Functions of microglia in the central nervous system-beyond the immune response. *Neuron. Glia. Biol.* **2011**, *7* (1), 47-53.

como Arg1, TGF β o TREM2.¹⁵ Por lo tanto, los cambios dinámicos entre los fenotipos M1/M2 están críticamente asociados a la correcta respuesta de la microglía a las EN.

2.4 Deterioro del transporte axonal

Existen múltiples evidencias de un deficiente transporte intracelular neuronal y axonal como consecuencia de una disfunción en los axones en diferentes EN.¹⁶ El transporte intracelular a través de los axones es un proceso crucial para el mantenimiento y funcionamiento de las neuronas, tanto el anterógrado que proporciona proteínas, lípidos y mitocondrias sintetizados en el soma de las neuronas hasta la sinapsis; como el retrógrado que lleva moléculas captadas en el espacio extracelular, como factores tróficos o endosomas que contienen señales para el núcleo celular, desde la sinapsis hasta el soma. El deterioro en el transporte axonal es un rasgo patológico que se ha observado en las EN y puede deberse a varios mecanismos, como los defectos en la organización del citoesqueleto, la desestabilización de las proteínas motoras que transportan los cargos, la alteración en la actividad de las quinasas o por defectos en la producción de energía por parte de las mitocondrias.

2.5 Agregación de proteínas

En las EN se encuentran agregados patológicos en el SNC de los pacientes que hacen que estas también se puedan clasificar en base a la composición de las inclusiones proteicas que presentan tanto en el medio intra- como extracelular, llamándose entonces proteinopatías.

La agregación de las proteínas está regulada por un equilibrio muy delicado entre diferentes procesos celulares mediados por el sistema de ubiquitina-proteosoma, la autofagia y las chaperonas moleculares. Así, cambios en las interacciones proteína-proteína, fallos en la degradación y dinámica de las proteínas, modificaciones postraduccionales excesivas o anormales, expresión o *splicing* deficiente o baja actividad de las chaperonas que ayudan a facilitar el correcto plegamiento son los eventos que desencadenan la formación de inclusiones proteicas (Figura 4).⁹ Actualmente no hay un consenso global sobre si esta agregación proteica supone una pérdida de función o una ganancia de toxicidad, aunque en la mayoría de las enfermedades se cree que es una combinación de ambos factores.

¹⁵ Tang, Y.; Le, W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53* (2), 1181-1194.

¹⁶ Millecamps, S.; Julien, J. P. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14* (3), 161-176.

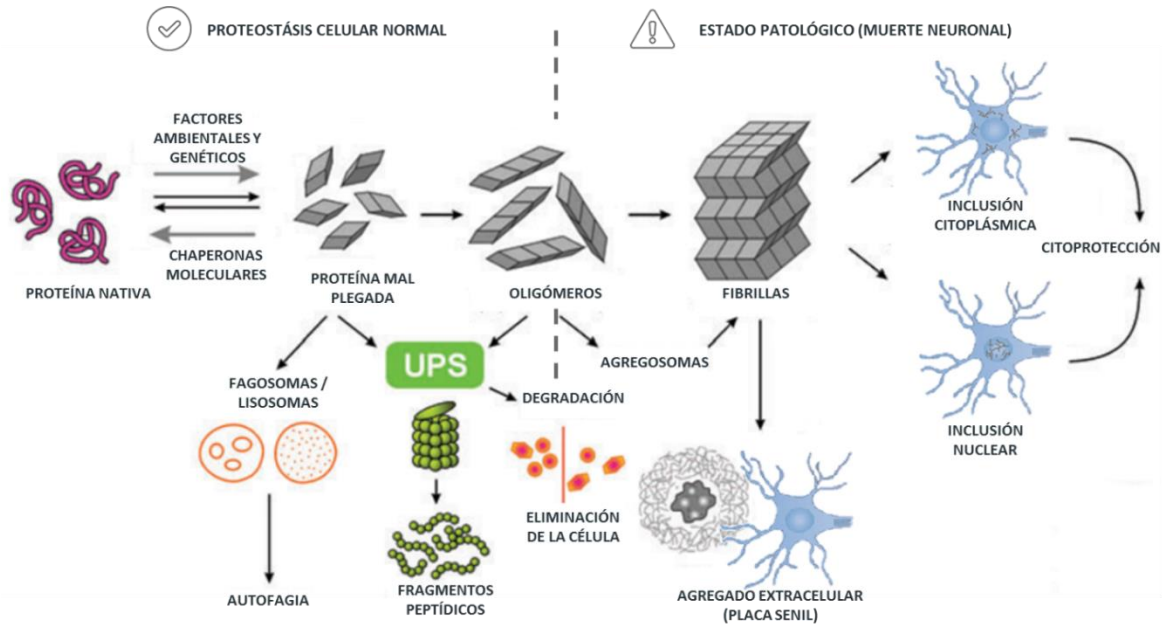


Figura 4. Mecanismos de proteostasis celular normal y alteración de la dinámica de proteínas en una enfermedad neurodegenerativa.

Según la composición de los agregados proteicos las EN más comunes se pueden dividir en grandes grupos:¹⁷

- ◆ Tauopatías, aquellas en las que encontramos agregados de la proteína tau, que se une a los microtúbulos y les aporta estabilidad. Enfermedad de Alzheimer, parálisis progresiva supranuclear, demencia frontotemporal (DFT-TAU).
- ◆ Sinucleopatías, se caracterizan por la presencia de agregados fibrilares de la proteína α -sinucleína, que regula el transporte vesicular y el tráfico de neurotransmisores. Enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica.
- ◆ Proteinopatías de TDP-43, están caracterizadas por la presencia agregados de la proteína transactiva de unión al ADN de 43 KDa (TDP-43), con funciones en la regulación del ARN. Esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal (DFT-TDP), encefalopatía de predominio límbico asociada a la edad con inclusiones de TDP-43 (LATE).

¹⁷ Kovacs, G. G. Molecular pathological classification of neurodegenerative diseases: Turning towards precision medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (2), 189.

Tabla 1b (continuación). Regiones cerebrales y neuronas afectadas en las principales EN y tipos de proteínas presentes en los agregados de las neuronas.

	Región cerebral afectada	Población neuronal afectada	Tipo de proteína en los agregados
Enfermedad de Alzheimer	Hipocampo y corteza cerebral	Neuronas colinérgicas	Tau + β -amiloide
Enfermedad de Parkinson	Sustancia negra <i>pars compacta</i>	Neuronas dopaminérgicas	α -sinucleína
Esclerosis lateral amiotrófica	Corteza cerebral, tronco del encéfalo y médula espinal	Neuronas motoras	TDP-43

Cabe destacar que todos estos mecanismos no suponen eventos únicos que contribuyen a la neurodegeneración, sino que están interrelacionados de manera compleja, de manera que el abordaje de varios eventos patológicos con un mismo tratamiento terapéutico podría tener más efecto en la reducción de la muerte neuronal.

3 Tratamientos de las enfermedades neurodegenerativas

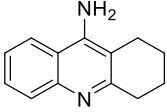
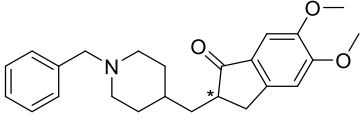
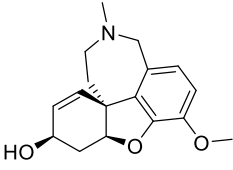
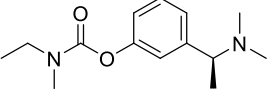
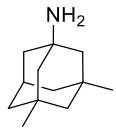
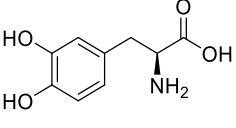
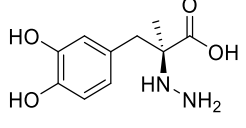
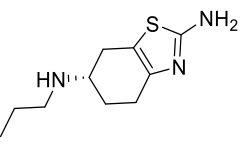
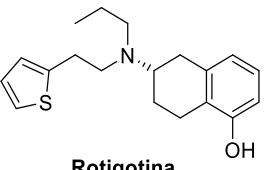
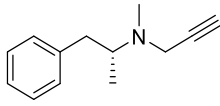
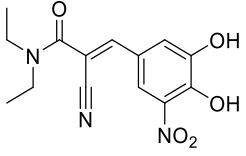
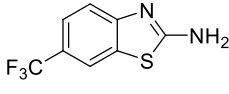
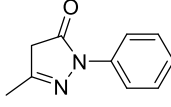
En la actualidad ninguno de los tratamientos disponibles en el mercado es capaz de frenar la muerte neuronal que se produce en estas enfermedades, así, los fármacos descubiertos hasta el momento intervienen únicamente en la sintomatología clínica de los pacientes, retardando o aliviando los síntomas.

Para la EA los fármacos disponibles intervienen principalmente en dos vías: inhibidores de la acetilcolinesterasa, que aumentan la disponibilidad del neurotransmisor acetilcolina en el espacio presináptico: tacrina, donepezilo, galantamina y rivastigmina y los antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR), diseñados para reducir la excitotoxicidad: memantina.¹⁸ En el año 2021, la agencia estadounidense del medicamento (FDA) aprobó el primer fármaco biológico para el tratamiento de la EA: el anticuerpo monoclonal Aducanumab. Esta aprobación está condicionada a la realización de una fase 4 ya que el fármaco no parece frenar el deterioro cognitivo de los pacientes aunque sí que reduzca los depósitos de β -amiloide, uno de los principales marcadores patológicos de la EA.¹⁹

¹⁸ Yiannopoulou, K. G.; Papageorgiou, S. G. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* **2020**, *12*, 1-12.

¹⁹ Schneider, L. A resurrection of aducanumab for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **2020**, *19* (2), 111-112.

Tabla 1c (continuación). Estructura química y mecanismo de acción de los fármacos aprobados para el tratamiento de la EA, EP y ELA.

Tratamiento		
Enfermedad de Alzheimer	<p><u>INHIBIDORES DE AChE</u></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Tacrina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Donepezilo</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Galantamina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Rivastigmina</p> </div> </div>	<p><u>ANTAGONISTA DE NMDAr</u></p> <div style="text-align: center;">  <p>Memantina</p> </div>
	<p><u>PRECURSORES DOPAMINA</u></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Levodopa</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Carbidopa</p> </div> </div> <hr/> <p><u>AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS</u></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Pramipexol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Rotigotina</p> </div> </div>	<p><u>INHIBIDORES DEGRADACIÓN DOPAMINA</u></p> <div style="text-align: center;">  <p>Selegilina</p> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>Entacapona</p> </div>
Esclerosis lateral amiotrófica	<p><u>ANTAGONISTA DE NMDAr</u></p> <div style="text-align: center;">  <p>Riluzol</p> </div>	<p><u>ANTIOXIDANTE</u></p> <div style="text-align: center;">  <p>Edaravona</p> </div>

En el caso de la EP los tratamientos se centran en aumentar los niveles de dopamina en el cerebro mediante tres aproximaciones: la administración de precursores de dopamina como la levodopa o carbidopa; los inhibidores de la monoamino-oxidasa B (MAOB) y la catecol-o-metiltransferasa (COMT), enzimas encargadas de metabolizar la dopamina del cerebro, como selegilina (MAOB) y entacapona (COMT); y los agonistas dopaminérgicos, que activan los receptores de dopamina, como el pramipexol y la rotigotina. Además, en aquellos pacientes con EP avanzado

que presentan respuesta reducida o inestable a los tratamientos de levodopa se utiliza la estimulación cerebral profunda, que consiste en la implantación de unos electrodos que envían impulsos eléctricos al cerebro con el fin de reducir los síntomas motores.²⁰

El único fármaco aprobado hasta el momento por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para el tratamiento de la ELA es el riluzol, comercializado como Rilutek® desde 1995. El mecanismo de acción de este derivado de benzotiazol se basa en la reducción de la excitotoxicidad por glutamato como antagonista de los receptores de NMDA y el bloqueo de los canales de sodio, regulando al mismo tiempo los niveles de calcio intraneuronal.²¹ Este fármaco permite extender la vida de algunos pacientes entre 3 y 6 meses. En la actualidad se otro medicamento denominado edaravona, se encuentra en fase clínica III en Europa al haber demostrado su poder antioxidante reduciendo las especies reactivas de oxígeno.²² El fármaco está aprobado en Estados Unidos y Japón ya que permite alargar la supervivencia de los pacientes de manera significativa.²³

4 Nuevas aproximaciones para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas

A día de hoy no existen tratamientos capaces de frenar la muerte neuronal que se produce en las enfermedades neurodegenerativas y es por ello que se buscan nuevas estrategias terapéuticas que permitan modular los diferentes mecanismos patológicos implicados. La estrategia tradicional de “una molécula, una diana” parece no ser efectiva en el tratamiento de las EN que muestran una alta complejidad de cascadas patológicas interconectadas. Para la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas en esta tesis doctoral nos hemos centrado en dos estrategias novedosas:

- ◆ Modulación de una proteína implicada en diversos mecanismos patológicos
- ◆ Diseño de compuestos multidiana que ejerzan su acción en más de una cascada patológica

Estas dos estrategias se discutirán a continuación y constituyen el eje central de esta tesis doctoral.

²⁰ Church, F. C. Treatment options for motor and non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Biomolecules* **2021**, *11*.

²¹ Jaiswal, M. K. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39*(2), 733-748.

²² Okada, M.; Yamashita, S.; Ueyama, H.; Ishizaki, M.; Maeda, Y.; Ando, Y. Long-term effects of edaravone on survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *eNeurologicalSci* **2018**, *11*, 11-14.

²³ Brooks, B. R.; Ciepielewska, M.; Zhang, J.; Liu, Y.; Zambrano, G.; Hagan, M. Continued intravenous edaravone treatment of ALS patients increases overall survival compared with no IV edaravone treatment in a US administrative claims database. *En libro de Abstracts de European Network to Cure ALS (ENCALS) meeting.* **2021**, virtual.

4.1 Modulación de una proteína implicada en diversos mecanismos patológicos

Una estrategia innovadora puede ser la utilización de un solo fármaco para la modulación de una proteína que tenga diferentes funciones fisiológicas y patológicas. Este es el caso de la proteína transactiva de unión al ADN de 43 kDa (TDP-43). La implicación de TDP-43 en las EN se conoce desde el año 2006, tras descubrirse como el principal componente de los agregados proteicos presentes en la mayoría de los pacientes de ELA y en algunos de DFT.²⁴ Desde entonces diferentes estudios han indicado la importancia de esta proteína en otras EN como en la recientemente descubierta encefalopatía de predominio límbico asociada a la edad con inclusiones de TDP-43 (LATE)²⁵, la EA o la enfermedad de Huntington.²⁶ Esta proteína, cuya función está asociada al metabolismo, la transcripción, el *splicing* y el transporte del ARN, tiene una localización preminentemente nuclear y en condiciones patológicas se trasloca al citoplasma donde sufre diferentes modificaciones postraslacionales (fragmentación, ubiquitinación e hiperfosforilación) que provocan su agregación (Figura 5).²⁷

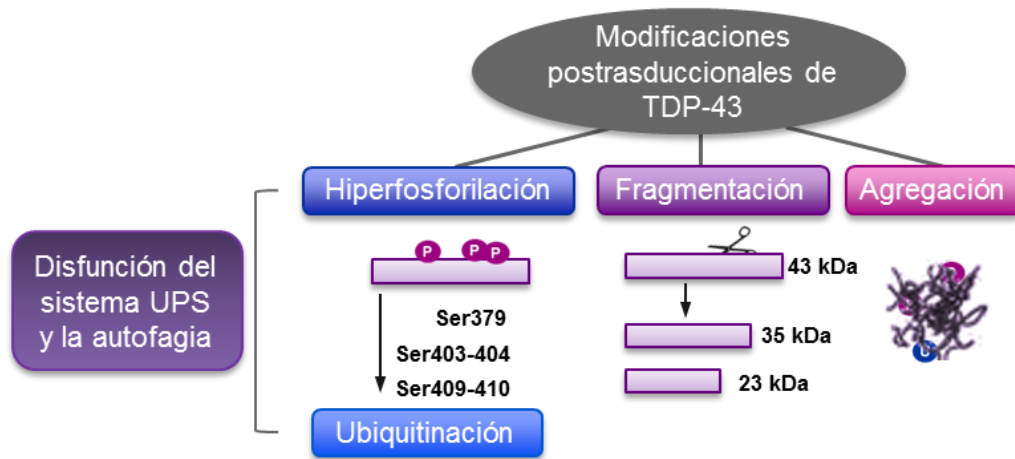


Figura 5. Modificaciones postraslacionales que sufre la proteína TDP-43.

²⁴ Neumann, M.; Sampathu, D. M.; Kwong, L. K.; Truax, A. C.; Micsenyi, M. C.; Chou, T. T.; Bruce, J.; Schuck, T.; Grossman, M.; Clark, C. M.; McCluskey, L. F.; Miller, B. L.; Masliah, E.; Mackenzie, I. R.; Feldman, H.; Feiden, W.; Kretschmar, H. A.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **2006**, *314* (5796), 130-133.

²⁵ Nelson, P. T.; Dickson, D. W.; Trojanowski, J. Q.; Jack, C. R.; Boyle, P. A.; Arfanakis, K.; Rademakers, R.; Alafuzoff, I.; Attems, J.; Brayne, C.; Coyle-Gilchrist, I. T. S.; Chui, H. C.; Fardo, D. W.; Flanagan, M. E.; Halliday, G.; Hokkanen, S. R. K.; Hunter, S.; Jicha, G. A.; Katsumata, Y.; Kawas, C. H.; Keene, C. D.; Kovacs, G. G.; Kukull, W. A.; Levey, A. I.; Makkinejad, N.; Montine, T. J.; Murayama, S.; Murray, M. E.; Nag, S.; Rissman, R. A.; Seeley, W. W.; Sperling, R. A.; White, C. L., 3rd; Yu, L.; Schneider, J. A. Limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy (LATE): consensus working group report. *Brain* **2019**, *142* (6), 1503-1527.

²⁶ Gao, J.; Wang, L.; Huntley, M. L.; Perry, G.; Wang, X. Pathomechanisms of TDP-43 in neurodegeneration. *J. Neurochem.* **2018**, *146*, 7-20.

²⁷ Neumann, M.; Kwong, L. K.; Lee, E. B.; Kremmer, E.; Flatley, A.; Xu, Y.; Forman, M. S.; Troost, D.; Kretschmar, H. A.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta Neuropathol.* **2009**, *117* (2), 137-149.

Esta proteinopatía de TDP-43 se ha relacionado con diferentes mecanismos patológicos observados en las EN como la disfunción mitocondrial, el transporte axonal anormal o alteraciones en el procesamiento de otras proteínas, lo que indican un papel central de TDP-43 en la neurodegeneración. Es por ello que la modulación de la patología de TDP-43 podría ser una estrategia terapéutica eficaz no sólo en la ELA y la DFT sino en otras EN.

En la última década se han descrito diferentes quinasas (GSK3, CK1 o CDC7)^{28,29,30} involucradas en la fosforilación de TDP-43 *in vivo*, y dado que la hiperfosforilación es una de las modificaciones post-traslacionales más relevantes en las patologías neurodegenerativas y en la ELA,²⁷ los inhibidores de estas quinasas han demostrado ser buenos moduladores de TDP-43, recuperando su función fisiológica y homeostasis.³¹ Así mismo, recientemente se ha descubierto que la quinasa de tau y tubulina (TTBK) en sus dos isoformas 1 y 2, además de fosforilar la proteína tau, también lo hace en TDP-43.³² Existen pocos inhibidores descritos para esta quinasa y además, ninguno de ellos ha sido probado en la patología de TDP-43. Por ello, los inhibidores de TTBK1 pueden ser unos buenos agentes terapéuticos en tauopatías y TDP-43-patías.³³

4.2 Compuestos multidiana para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

Tradicionalmente la estrategia “una enfermedad, una diana, un fármaco” se ha considerado más segura en términos de efectos adversos indeseados y ha dado lugar a numerosas moléculas con perfiles de selectividad y potencia exquisitos. Sin embargo, al principio de la década de los 2000 el gasto de las empresas farmacéuticas en I+D+i crecía exponencialmente sin venir acompañado de una mayor productividad.³⁴ Esto ha motivado un cambio de paradigma en el diseño de los

²⁸ Moujalled, D.; James, J. L.; Parker, S. J.; Lidgerwood, G. E.; Duncan, C.; Meyerowitz, J.; Nonaka, T.; Hasegawa, M.; Kanninen, K. M.; Grubman, A.; Liddell, J. R.; Crouch, P. J.; White, A. R. Kinase inhibitor screening identifies cyclin-dependent kinases and glycogen synthase kinase 3 as potential modulators of TDP-43 cytosolic accumulation during cell stress. *PLoS One* **2013**, *8* (6), e67433.

²⁹ Kametani, F.; Nonaka, T.; Suzuki, T.; Arai, T.; Dohmae, N.; Akiyama, H.; Hasegawa, M. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *382* (2), 405-409.

³⁰ Liachko, N. F.; McMillan, P. J.; Guthrie, C. R.; Bird, T. D.; Leverenz, J. B.; Kraemer, B. C. CDC7 inhibition blocks pathological TDP-43 phosphorylation and neurodegeneration. *Ann. Neurol.* **2013**, *74* (1), 39-52.

³¹ Palomo, V.; Nozal, V.; Rojas-Prats, E.; Gil, C.; Martinez, A. Protein kinase inhibitors for amyotrophic lateral sclerosis therapy. *Br. J. Pharmacol.* **2021**, *178* (6), 1316-1335.

³² Liachko, N. F.; McMillan, P. J.; Strovos, T. J.; Loomis, E.; Greenup, L.; Murrell, J. R.; Ghetti, B.; Raskind, M. A.; Montine, T. J.; Bird, T. D.; Leverenz, J. B.; Kraemer, B. C. The tau tubulin kinases TTBK1/2 promote accumulation of pathological TDP-43. *PLoS Genet.* **2014**, *10* (12), e1004803.

³³ Nozal, V.; Martinez, A. Tau tubulin kinase 1 (TTBK1), a new player in the fight against neurodegenerative diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *161*, 39.

³⁴ Pammolli, F.; Magazzini, L.; Riccaboni, M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 428-438.

proyectos de investigación³⁵ fomentando la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas como por ejemplo los fármacos multidiana, para enfermedades complejas como las EN.³⁶ Aunque la modulación de más de un mecanismo patológico al mismo tiempo también se puede lograr con la polifarmacología, es decir, la administración de más de un fármaco a la vez, esta estrategia puede producir interacciones indeseadas entre fármacos, que reduzcan las concentraciones de los mismos o provocar efectos tóxicos. Por otro lado, en pacientes de avanzada edad y polimedcados disminuye la adherencia a los tratamientos (Figura 6).

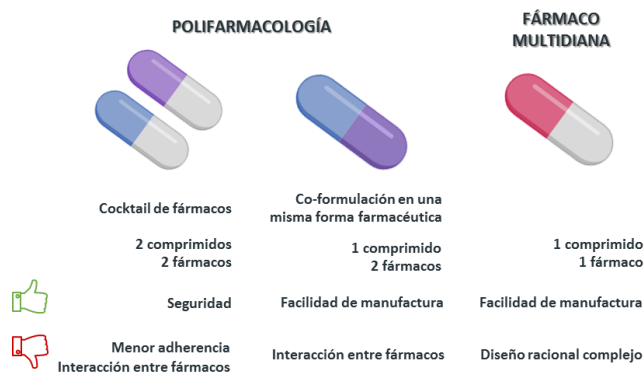


Figura 6. Ventajas e inconvenientes de distintas estrategias terapéuticas para modular más de una diana terapéutica.

Los fármacos multidiana son moléculas con actividad en más de una diana terapéutica, diseñadas racionalmente para conseguir tal efecto. Estos fármacos ofrecen ventajas como la simplicidad de evaluar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de una sola entidad química y la sencillez en la preparación industrial y la formulación. Además, la modulación de varios mecanismos patológicos al mismo tiempo podría producir una respuesta potente y efectiva contra la enfermedad. Sin embargo, el diseño de las moléculas multidiana no es trivial al tener que conseguir la mejor inhibición de varias dianas, así como la optimización del perfil farmacocinético en moléculas que suelen ser más grandes. Todo esto no ha evitado que desde que se acuñó el término “compuesto multidiana” o “ligando múltiple” a principios de los 2000³⁷ varios fármacos con estos mecanismos de acción hayan llegado al mercado y esta nueva estrategia vaya cobrando cada vez más protagonismo en los programas de descubrimiento de fármacos.³⁸

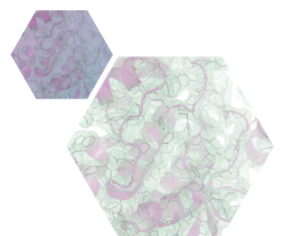
³⁵ Pammolli, F.; Righetto, L.; Abrignani, S.; Pani, L.; Pelicci, P. G.; Rabosio, E. The endless frontier? The recent increase of R&D productivity in pharmaceuticals. *J. Transl. Med.* **2020**, *18*, 162.

³⁶ Zhou, J.; Jiang, X.; He, S.; Jiang, H.; Feng, F.; Liu, W.; Qu, W.; Sun, H. Rational design of multitarget-directed ligands: Strategies and emerging paradigms. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8881-8914.

³⁷ Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (21), 6523-6543.

³⁸ Ramsay, R. R.; Popovic-Nikolic, M. R.; Nikolic, K.; Uliassi, E.; Bolognesi, M. L. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin. Transl. Med.* **2018**, *7* (1), 3.

OBJETIVOS



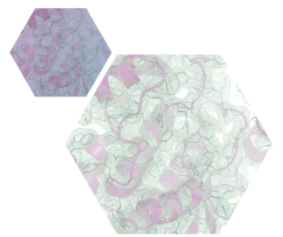
El principal objetivo de esta tesis doctoral es el descubrimiento y síntesis de moléculas orgánicas que permitan una nueva aproximación al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, mediante la modulación de proteínas implicadas en más de un mecanismo patológico o el desarrollo de compuestos multidiana.

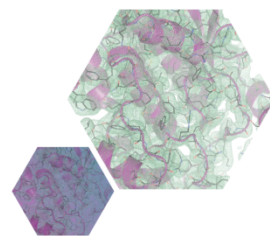
Para ello se tratarán los siguientes objetivos específicos:

1. Descubrimiento de nuevos inhibidores selectivos de la quinasa TTBK1.
 - a. Diseño, síntesis orgánica y elucidación estructural de nuevos compuestos. Evaluación biológica de las moléculas sintetizadas y determinación de su permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica.
 - b. Estudios del modo de unión de los inhibidores de TTBK1 mediante cristalografía de rayos X y métodos computacionales
 - c. Estudio de la eficacia de los mejores candidatos obtenidos en la modulación de TDP-43 en modelos celulares y animales representativos.

2. Descubrimiento de moléculas multidiana con actividad en tres dianas farmacológicas implicadas en la enfermedad de Alzheimer.
 - a. Diseño, síntesis orgánica y evaluación biológica de las moléculas sintetizadas.
 - b. Estudio computacional del modo de unión de los compuestos en BACE1.
 - c. Desarrollo de la metodología de química click *in situ* utilizando BACE1 como molde de reacción.
 - d. Validación del potencial de los compuestos multidiana en diferentes modelos celulares representativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN





CAPÍTULO 1

MODULACIÓN DE UNA PROTEÍNA IMPLICADA EN DIVERSOS MECANISMOS PATOLÓGICOS

1 Introducción

1.1 La proteína TDP-43

Debido a que la implicación de TDP-43 en diferentes procesos neurodegenerativos es clave en distintas EN y puesto que la hiperfosforilación de esta proteína es su principal modificación postraduccional patológica, la modulación de este evento con inhibidores de quinasas puede ser una aproximación terapéutica innovadora y exitosa para el tratamiento de la ELA así como de otras proteinopatías de TDP-43.³⁹ Por lo tanto, este es uno de los objetivos principales de la presente tesis doctoral.

1.1.1 Estructura y función de TDP-43

La proteína transactiva de unión al ADN (TDP-43) es una proteína mayoritariamente nuclear que consta de 414 aminoácidos, tiene un peso de 43 KDa y está codificada por el gen TARDBP.⁴⁰ Aunque se expresa de manera ubicua en el cuerpo humano, existen mayores niveles de TDP-43 en el cerebro y el riñón. En su extremo N-terminal se incluyen dos dominios de reconocimiento del ARN (RRM1 y RRM2), un dominio de localización nuclear (NLS) y otro de exportación nuclear (NES), encargados de mantener el equilibrio de TDP-43 entre el núcleo y el citoplasma. Normalmente TDP-43 se encuentra localizada en el núcleo y sólo en un 5-20 % se encuentra en el citoplasma.⁴¹ En el extremo C-terminal, encontramos una región rica en glicina y dominios cuyas funciones están relacionadas con la expresión y la unión del ADN, y es aquí donde se concentran la mayoría de las mutaciones y modificaciones patológicas descritas para esta proteína. Además, es en el extremo C-terminal donde existen dominios de reconocimiento de otras proteínas y dominios de tipo priónico que modulan las transiciones de fase y promueven formas de la proteína que agregan (Figura 7).⁴¹

³⁹ Palomo, V.; Tosat-Bitrian, C.; Nozal, V.; Nagaraj, S.; Martin-Requero, A.; Martinez, A. TDP-43: A key therapeutic target beyond amyotrophic lateral sclerosis. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10* (3), 1183-1196.

⁴⁰ Buratti, E.; Baralle, F. E. Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (39), 36337-36343.

⁴¹ Woo, J. A.; Liu, T.; Trotter, C.; Fang, C. C.; De Narvaez, E.; LePochat, P.; Maslar, D.; Bukhari, A.; Zhao, X.; Deonarine, A.; Westerheide, S. D.; Kang, D. E. Loss of function CHCHD10 mutations in cytoplasmic TDP-43 accumulation and synaptic integrity. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15558.

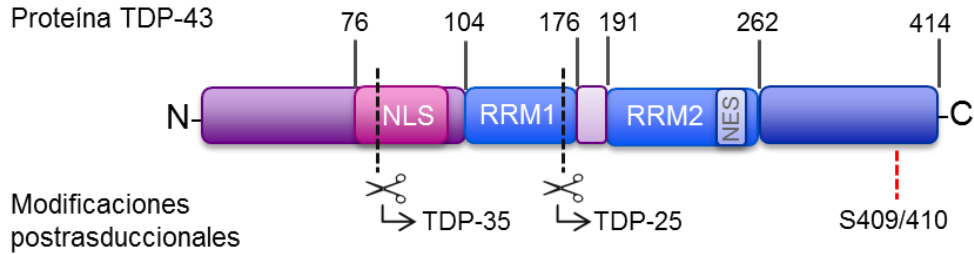


Figura 7. Esquema de los dominios de la proteína transactiva de unión al ADN de 43kDa, TDP-43.

Aunque las funciones fisiológicas de TDP-43 aún no se conocen por completo, esta proteína está implicada en numerosos mecanismos celulares, tanto en el citoplasma como en el núcleo, donde ejerce sus funciones principales. En el núcleo desempeña diferentes funciones relacionadas con el ARN como son el metabolismo, la transcripción, el *splicing* y el transporte de este (Figura 8).⁴² Además, participa en la biogénesis del micro ARNs (miRNAs), una molécula importante que regula la expresión de otros genes.⁴³

Dado las múltiples funciones que TDP-43 adquiere en la célula, su expresión está finamente autorregulada tanto a nivel transcripcional como a nivel celular. TDP-43 se une al extremo 3'-UTR de su ARN mensajero (ARNm) controlando así los niveles celulares.⁴⁴ Además, distintas mutaciones descubiertas en la ELA (*p62/SQSTM1*, *VCP*, *UBQL* y *OPT*)⁴⁵ e implicadas en la degradación proteica mediante autofagia⁴⁶ parecen apuntar a que la alteración del delicado equilibrio de proteostasis motiva la formación de inclusiones de TDP-43.

En pacientes de ELA se ha descubierto co-localización de las inclusiones de TDP-43 y los gránulos de estrés. Estos orgánulos cumplen una función importante en las células en condiciones de estrés, agrupando y clasificando el ARN mensajero, y secuestrando algunos fragmentos que no

⁴² Ratti, A.; Buratti, E. Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *J. Neurochem.* **2016**, *138 Suppl 1*, 95-111.

⁴³ Kawahara, Y.; Mieda-Sato, A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109* (9), 3347-3352.

⁴⁴ Ayala, Y. M.; De Conti, L.; Avendano-Vazquez, S. E.; Dhir, A.; Romano, M.; D'Ambrogio, A.; Tollervey, J.; Ule, J.; Baralle, M.; Buratti, E.; Baralle, F. E. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J.* **2011**, *30* (2), 277-288.

⁴⁵ Scotter, E. L.; Chen, H. J.; Shaw, C. E. TDP-43 proteinopathy and ALS: Insights into disease mechanisms and therapeutic targets. *Neurotherapeutics* **2015**, *12* (2), 352-363.

⁴⁶ Xia, Q.; Wang, H.; Hao, Z.; Fu, C.; Hu, Q.; Gao, F.; Ren, H.; Chen, D.; Han, J.; Ying, Z.; Wang, G. TDP-43 loss of function increases TFEB activity and blocks autophagosome-lysosome fusion. *EMBO J.* **2016**, *35* (2), 121-142.

necesitan ser traducidos en esas condiciones. Este mecanismo destaca de nuevo la relación entre TDP-43 y el ARN.⁴⁷

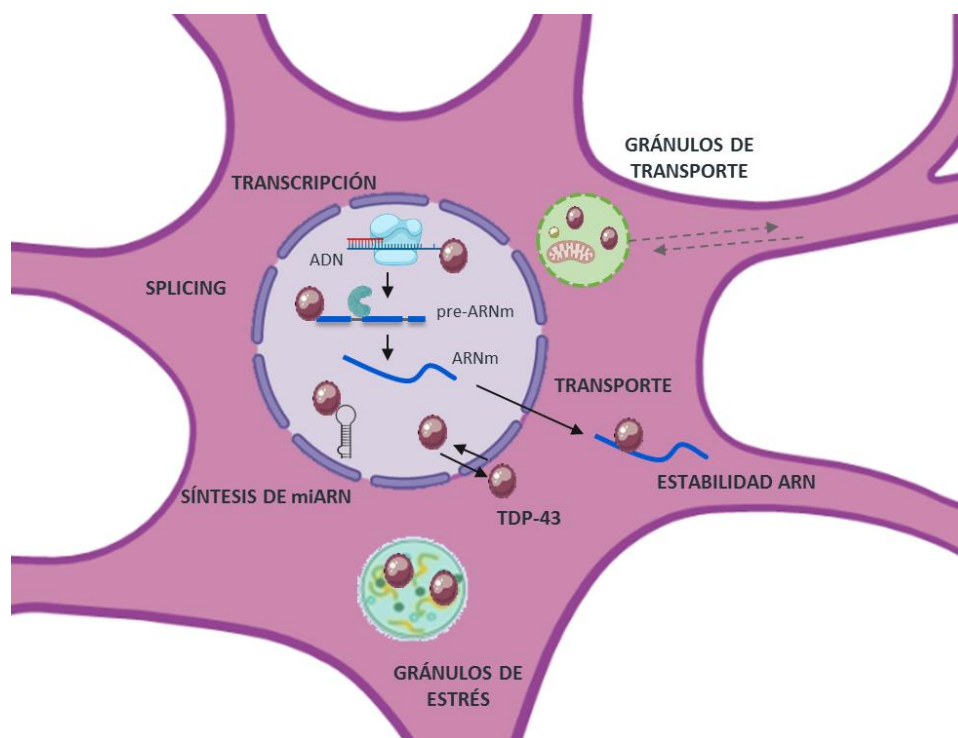


Figura 8. Funciones principales de TDP-43 en la célula.

Las proteinopatías de TDP-43 agrupan aquellas enfermedades donde se encuentran lesiones histopatológicas en el citoplasma, formadas por la proteína TDP-43 fragmentada o en su forma completa, con diferentes modificaciones postraduccionales aberrantes, como la hiperfosforilación, la acetilación, la SUMOilación o la ubiquitinación.²⁴ La principal cuestión respecto a la acumulación citosólica de TDP-43 es si esta se debe a una ganancia de función tóxica o si la reducción de los niveles nucleares de TDP-43 supone una pérdida de función de la proteína. Actualmente se cree que es una combinación de ambas hipótesis y que cambios en el dominio de localización nuclear y el motivo de exportación nuclear inducen la acumulación citosólica de la proteína, de manera que la alteración de la homeostasis normal de TDP-43 es lo que motiva la formación de los agregados presentes en DFT y ELA.

⁴⁷ Liu-Yesucevitz, L.; Bilgutay, A.; Zhang, Y. J.; Vanderweyde, T.; Citro, A.; Mehta, T.; Zaarur, N.; McKee, A.; Bowser, R.; Sherman, M.; Petrucelli, L.; Wolozin, B. Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS One*. **2010**, 5 (10), e13250.

Los epítomos que promueven la formación de agregados tóxicos de TDP-43 son las Ser409/410 dado que la fosforilación de estos residuos reduce la dinámica de renovación de la proteína, promoviendo la acumulación citoplasmática.²⁷ Por otro lado, los fragmentos de 25 y 35 kDa de la proteína también resultan tóxicos. Por ejemplo, la sobreexpresión de la forma fragmentada de 25 kDa produce menor autofagia y activación del proteasoma⁴⁸ al mismo tiempo que está asociada a déficits cognitivos.⁴⁹

1.1.2 Proteinopatías de TDP-43

Los agregados de TDP-43 se encuentran hasta en el 97% de los pacientes con ELA, tanto de origen familiar como esporádico, siendo el principal marcador patológico de la enfermedad.²⁴ Sin embargo, desde este descubrimiento en el año 2006, se ha visto que la proteína TDP-43 está involucrada en otras enfermedades y procesos neuropatológicos, los cuales se exponen brevemente a continuación.³⁹

Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

La ELA es la enfermedad neuromuscular más frecuente que afecta entre 2-3 personas por cada 100 000 habitantes en Europa.⁵⁰ Esta patología provoca la muerte progresiva de las motoneuronas del cerebro y la médula espinal de los pacientes, lo que desencadena una parálisis gradual de los músculos y finalmente el fallecimiento por parada cardiorrespiratoria en un plazo medio de 3 a 5 años tras el inicio de los síntomas. La ELA familiar (ELAf), que afecta a un 10% de los pacientes, cuenta con cuatro mutaciones que presentan hasta el 50% de los casos (*C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS/TLS*).⁵¹ Sin embargo, la ELA esporádica (ELAE) tiene una etiología desconocida, si bien en las últimas décadas se han identificado diversos factores de riesgo como la exposición a metales pesados, agentes químicos presentes en la agricultura, el tipo de dieta, la actividad física o el tabaquismo.⁵²

⁴⁸ Caccamo, A.; Majumder, S.; Oddo, S. Cognitive decline typical of frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice expressing the 25-kDa C-terminal fragment of TDP-43. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180* (1), 293-302.

⁴⁹ Medina, D. X.; Orr, M. E.; Oddo, S. Accumulation of C-terminal fragments of transactive response DNA-binding protein 43 leads to synaptic loss and cognitive deficits in human TDP-43 transgenic mice. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35* (1), 79-87.

⁵⁰ Logroscino, G.; Traynor, B. J.; Hardiman, O.; Chio, A.; Mitchell, D.; Swingler, R. J.; Millul, A.; Benn, E.; Beghi, E.; Eurals Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2010**, *81* (4), 385-390.

⁵¹ Mejzini, R.; Flynn, L. L.; Pitout, I. L.; Fletcher, S.; Wilton, S. D.; Akkari, P. A. ALS genetics, mechanisms and therapeutics: Where are we now? *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 1310.

⁵² Ingre, C.; Roos, P. M.; Piehl, F.; Kamel, F.; Fang, F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Epidemiol.* **2015**, *7*, 181-193.

Como se ha comentado en la introducción, actualmente sólo existen dos fármacos disponibles en el mercado para el tratamiento sintomático de la ELA: el riluzol y la edaravona. El descubrimiento de TDP-43 como componente principal en los agregados histopatológicos del 97% de los pacientes de ELA supone una nueva hipótesis de trabajo en la búsqueda de fármacos que frenen la muerte neuronal, hasta el momento muy poco desarrollada.

Demencia frontotemporal (DFT)

La DFT es la segunda demencia más habitual en pacientes de menos de 65 años, detrás de la EA y se clasifica como una demencia presenil que afecta entre 2.7-4.1 personas por cada 100 000 habitantes europeos al año.⁵³ Es una enfermedad que se caracteriza por la disfunción en el lenguaje, trastornos progresivos y tempranos en la personalidad y el comportamiento debidos al deterioro de los lóbulos frontal y temporal del cerebro.^{54,55} En el ámbito molecular, en las neuronas y la glía de los pacientes se encuentran agregados proteicos de diferentes composiciones, lo que lleva a una clasificación de los casos en diferentes subtipos de DFT: DFT-TDP, que supone un 45% de los pacientes y se caracteriza por la presencia de TDP-43 en los agregados; DFT-tau, con agregados de proteína tau en las inclusiones patológicas de otro 45% de los pacientes y DFT-FUS, tan solo en el 1 % de los enfermos.⁵⁶ Al contrario que otras enfermedades neurodegenerativas, el origen genético de la DFT representa hasta un 50% de los enfermos que presentan un patrón de herencia autosómica dominante.

A menudo se dice que la ELA y la DFT son extremos fenotípicos de un mismo espectro de enfermedad, por diversos motivos como los agregados de TDP-43 o el perfil genético de ambas. Existen ciertas mutaciones que hacen que los pacientes sean más proclives a presentar síntomas de ambas enfermedades, y otras que sólo dan lugar a formas puras de la DFT o la ELA (Figura 9). Además, hasta un 15% de pacientes con ELA desarrollan alteraciones cognitivas o de

⁵³ Onyike, C. U.; Diehl-Schmid, J. The epidemiology of frontotemporal dementia. *Int. Rev. Psychiatry* **2013**, *25* (2), 130-137.

⁵⁴ Sieben, A.; Van Langenhove, T.; Engelborghs, S.; Martin, J. J.; Boon, P.; Cras, P.; De Deyn, P. P.; Santens, P.; Van Broeckhoven, C.; Cruts, M. The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol.* **2012**, *124* (3), 353-372.

⁵⁵ Mackenzie, I. R.; Neumann, M.; Bigio, E. H.; Cairns, N. J.; Alafuzoff, I.; Kril, J.; Kovacs, G. G.; Ghetti, B.; Halliday, G.; Holm, I. E.; Ince, P. G.; Kamphorst, W.; Revesz, T.; Rozemuller, A. J.; Kumar-Singh, S.; Akiyama, H.; Baborie, A.; Spina, S.; Dickson, D. W.; Trojanowski, J. Q.; Mann, D. M. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol* **2010**, *119*(1), 1-4.

⁵⁶ Mackenzie, I. R.; Neumann, M.; Baborie, A.; Sampathu, D. M.; Du Plessis, D.; Jaros, E.; Perry, R. H.; Trojanowski, J. Q.; Mann, D. M.; Lee, V. M. A harmonized classification system for FTLD-TDP pathology. *Acta Neuropathol.* **2011**, *122* (1), 111-113.

comportamiento compatibles con la DFT⁵⁷ y un 15% de los pacientes con DFT cumplen con los criterios diagnósticos característicos de la ELA.⁵⁸ Por ejemplo, el descubrimiento de la mutación en el gen C9Orf72, que está detrás de un 35% de los casos de ELA familiar y un 10-30% de los casos de DFT, termina de confirmar no sólo la relación a nivel molecular y clínico de ambas enfermedades, sino también a nivel genético.⁵⁹ En la actualidad, no existe ningún tratamiento farmacológico aprobado para la DFT, y las intervenciones terapéuticas se basan en terapias de rehabilitación y logopedia con el fin de tratar los diferentes síntomas.⁶⁰

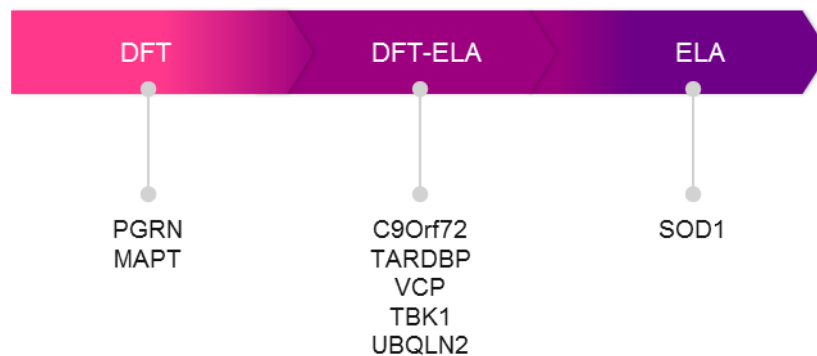


Figura 9. Espectro genético de la demencia frontotemporal y la esclerosis lateral amiotrófica.

Encefalopatía de predominio límbico asociada a la edad con inclusiones de TDP-43 (LATE)

La demencia LATE se observa frecuentemente en pacientes de más de 80 años, que presentan agregados patológicos de TDP-43 fosforilada en regiones de la amígdala, el hipocampo y el giro frontal medio, todas estructuras del sistema límbico. Esta demencia fue descrita por primera vez en el año 2019,²⁵ debido a que comparte mecanismos patológicos con la EA y la DFT, enfermedades con las que hasta entonces había sido confundida.

A nivel sintomático, es complicado discernir entre las tres demencias más frecuentes (EA, DFT, LATE) aunque LATE tiene una edad de inicio más tardía y se relaciona más fuertemente con síntomas de amnesia que afectan a las regiones límbicas del cerebro. Debido al reciente descubrimiento de esta enfermedad, a día de hoy es difícil de diagnosticar y seguir, ya que no

⁵⁷ Phukan, J.; Elamin, M.; Bede, P.; Jordan, N.; Gallagher, L.; Byrne, S.; Lynch, C.; Pender, N.; Hardiman, O. The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2012**, *83* (1), 102-108.

⁵⁸ Ringholz, G. M.; Appel, S. H.; Bradshaw, M.; Cooke, N. A.; Mosnik, D. M.; Schulz, P. E. Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* **2005**, *65* (4), 586-590.

⁵⁹ Nguyen, H. P.; Van Broeckhoven, C.; van der Zee, J. ALS genes in the genomic era and their implications for FTD. *Trends Genet.* **2018**, *34* (6), 404-423.

⁶⁰ Liscic, R. M.; Alberici, A.; Cairns, N. J.; Romano, M.; Buratti, E. From basic research to the clinic: innovative therapies for ALS and FTD in the pipeline. *Mol. Neurodegener.* **2020**, *15* (1), 31.

existen biomarcadores específicos. Además, aún no se han desarrollado modelos animales que nos permitan estudiar con detenimiento los mecanismos característicos de la enfermedad, por ello aún queda un gran camino por recorrer para descubrir tratamientos terapéuticos efectivos para esta demencia.

Implicación de TDP-43 en otras enfermedades neurodegenerativas

En las enfermedades mencionadas anteriormente TDP-43 tiene un papel central, de manera que es el principal componente proteico de los agregados que se encuentran en ellas. Hay otras enfermedades raras como la enfermedad de Alexander, en las que también se han descrito depósitos de TDP-43 hiperfosforilado. En concreto, la presencia de la patología de TDP-43 en las fibras de Rosenthal presentes en los astrocitos parece correlacionar directamente con la progresión de la enfermedad, sugiriendo un papel activo en el desarrollo de la patología.⁶¹ Es importante señalar que TDP-43 también está presente en numerosas EN más prevalentes como la EA, EP, la degeneración corticobasal (CBD), la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la demencia con cuerpos de Lewy (LBD) y la enfermedad de Huntington, donde se ha reportado que su presencia agravaría la proteinopatía primaria.^{39,62}

Todo ello muestra que TDP-43 es una proteína relevante en la degeneración observada en distintas EN y por tanto, la modulación de su proteinopatía puede ser una estrategia terapéutica muy interesante para el tratamiento de estas.

1.2 Proteínas quinasa como diana terapéutica

En los últimos años las proteínas quinasas han demostrado ser unas dianas atractivas para el tratamiento de distintas enfermedades, en especial el cáncer y las enfermedades inflamatorias, y es por ello que existen más de 71 pequeñas moléculas inhibitoras de quinasas en el mercado.⁶³ Actualmente las quinasas son las dianas más habituales en las líneas de investigación farmacológica, desde la aprobación en 2001 de imatinib (Gleevec®), el primer inhibidor de quinasas aprobado por la FDA.⁶⁴ Por el momento, solo 17 inhibidores de este tipo están indicados para enfermedades no

⁶¹ Walker, A. K.; Daniels, C. M.; Goldman, J. E.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.; Messing, A. Astrocytic TDP-43 pathology in Alexander disease. *J. Neurosci.* **2014**, *34* (19), 6448-6458.

⁶² Schwab, C.; Arai, T.; Hasegawa, M.; Yu, S.; McGeer, P. L. Colocalization of transactivation-responsive DNA-binding protein 43 and huntingtin in inclusions of Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2008**, *67* (12), 1159-1165.

⁶³ Roskoski, R., Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacol. Res.* **2020**, *152*, 104609.

⁶⁴ Lyseng-Williamson, K.; Jarvis, B. Imatinib. *Drugs* **2001**, *61* (12), 1765-1774.

oncológicas, y son muchos los esfuerzos y las moléculas en fases clínicas para enfermedades del SNC, inflamatorias e infecciosas.⁶⁵

Las quinasas catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP hasta los aminoácidos serina, treonina o tirosina del sustrato, y esto juega un papel esencial en procesos celulares tales como las cascadas de señalización celular implicadas en procesos de proliferación, apoptosis o transcripción del material genético, entre muchos otros.

Aunque las quinasas humanas presentan diversidad en sus secuencias de aminoácidos completas, todas comparten una estructura tridimensional similar en el dominio quinasa, donde se une el ATP, y constan de tres subestructuras comunes: un dominio N-terminal formado por láminas β dispuestas de forma antiparalela y una hélice α , un dominio C-terminal formado por hélices α y una región bisagra que conecta ambas y es donde se encuentra el sitio de unión al ATP (Figura 10).

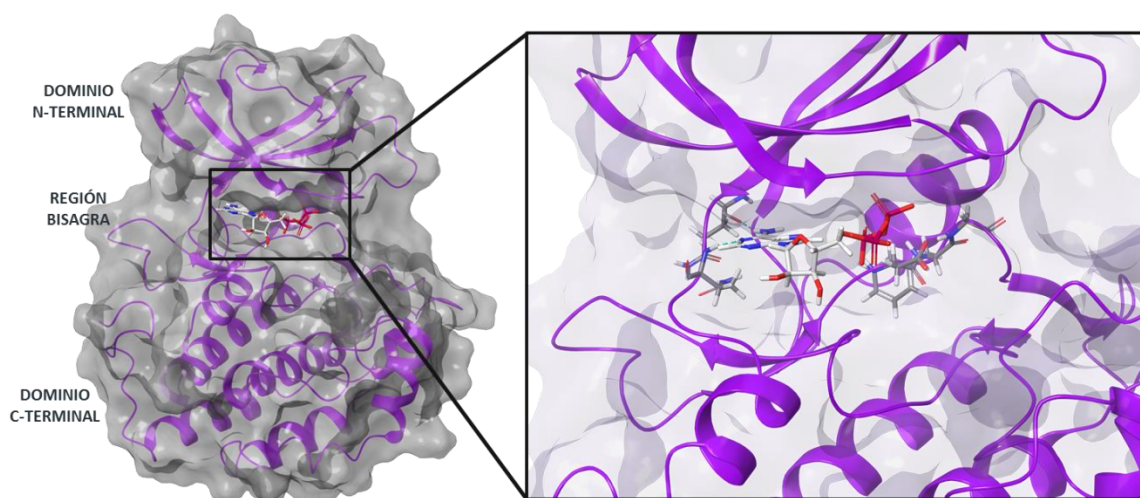


Figura 10. Estructura típica de una proteína quinasa cristalizada con ATP. Se observan los dos dominios, N-terminal y C-terminal conectados por la región bisagra (código PDB: 4BTJ).

Una parte importante del bolsillo de unión al ATP es el motivo DFG (aspártico, fenilalanina, glicina), responsable de la unión con el ión Mg^{2+} que es imprescindible para la actividad catalítica.⁶⁶ Este motivo, controla el acceso de los ligandos al sitio activo adoptando dos conformaciones: *DFG-in*, cuando la cadena lateral del aspártico está orientada hacia el bolsillo y *DFG-out* cuando está orientada hacia fuera del bolsillo. Si caracterizamos los inhibidores según el modo de unión,

⁶⁵ Attwood, M. M.; Fabbro, D.; Sokolov, A. V.; Knapp, S.; Schioth, H. B. Trends in kinase drug discovery: Targets, indications and inhibitor design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (11), 839-861.

⁶⁶ Schroder, M.; Bullock, A. N.; Fedorov, O.; Bracher, F.; Chaikuad, A.; Knapp, S. DFG-1 residue controls inhibitor binding mode and affinity, providing a basis for rational design of kinase inhibitor selectivity. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 10224-10234.

encontramos dos tipos: inhibidores reversibles, se unen a la proteína por medio de interacciones de tipo enlace de hidrógeno (EdH), electrostáticas o iónicas, e inhibidores irreversibles, que se unen de manera covalente a un residuo de cisteína próximo al sitio del ATP, bloqueándolo. Los inhibidores reversibles son los más comunes de entre los aprobados para uso clínico y pueden categorizarse en cuatro grupos (Figura 11):

- ◆ Inhibidores tipo I, ATP-competitivos que interaccionan con la quinasa en su forma activa en el lugar de unión al ATP, cuando el motivo DFG está en conformación “in”.
- ◆ Inhibidores tipo II, que interaccionan con la quinasa en su forma inactiva, cuando el motivo DFG está en conformación “out”. En este caso la conformación DFG-out permite que algunos inhibidores puedan acceder a bolsillos accesorios cercanos al sitio del ATP que en la conformación activa son inaccesibles.
- ◆ Inhibidores tipo III, éstos se unen en un bolsillo alostérico adyacente al sitio de unión del ATP.
- ◆ Inhibidores tipo IV, aquellos que se unen a la proteína en un bolsillo alostérico alejado del sitio de unión del ATP.

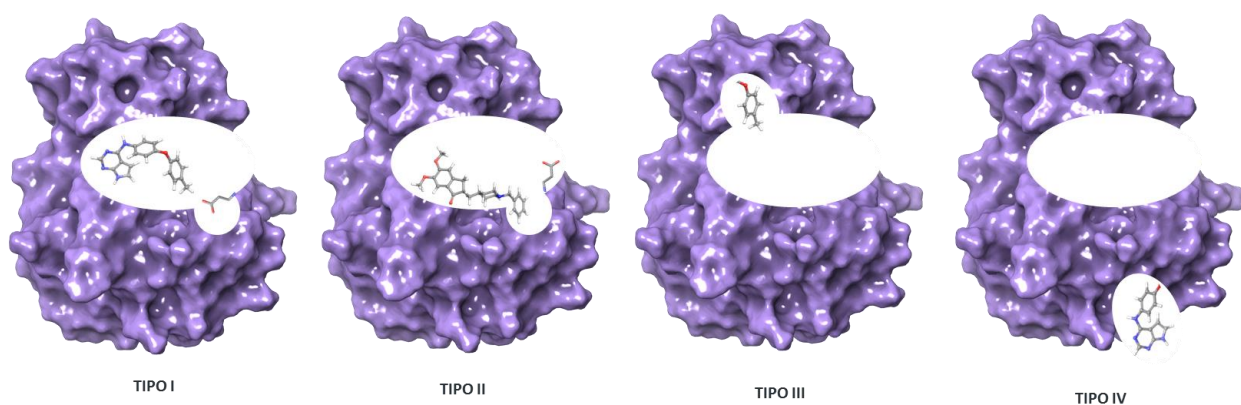


Figura 11. Tipos de inhibidores reversibles de proteínas quinasa.

El dogma inicial de la biología estructural establecía que el dominio quinasa de las proteínas estaba demasiado conservado y sería imposible el diseño de inhibidores selectivos, pero gracias a los numerosos estudios con cristalografía de rayos X de complejos quinasa-ligando (existen más de 6 700 estructuras depositadas en el Protein Data Bank, PDB), se ha demostrado que existen

elementos estructurales únicos rodeando los sitios de unión al ATP que pueden ayudar al diseño de inhibidores selectivos.⁶⁷

Al mismo tiempo la selectividad es un tema controvertido en el descubrimiento de fármacos debido a que distintos inhibidores ya aprobados por las agencias regulatorias han resultado ser menos selectivos de lo esperado, pero sin presentar efectos secundarios acusados.⁶⁸ Esto motiva a pensar que en enfermedades complejas, como el cáncer o las enfermedades neurodegenerativas, donde convergen diversos mecanismos patológicos, la necesidad de inhibidores completamente selectivos ya no es prioritaria, pero sin perder de vista el equilibrio entre eficacia y toxicidad.⁶⁹

1.2.1 Inhibidores de quinasas relacionadas con la proteinopatía de TDP-43

Como se ha visto, hay muchos resultados de investigación recientes que posicionan a TDP-43 como una diana farmacológica interesante para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Así pues, se han desarrollado distintas estrategias dirigidas a promover la reducción de los agregados de TDP-43, impedir la formación de los gránulos de estrés o modular la autofagia entre otras.³⁹ De estas estrategias, los inhibidores de proteínas quinasa, son unos de los grupos de fármacos en fases clínicas más avanzadas y cuyos resultados y modos de acción se detallarán a continuación (Figura 12).³¹

La activación de RIPK1 desencadena muerte neuronal, liberación de citoquinas e inflamación tal y como se ha demostrado en células de la médula espinal de pacientes de ELA.⁷⁰ El compuesto DNL-788, es un inhibidor de esta quinasa que ha demostrado seguridad en voluntarios sanos y comenzará una fase II próximamente. Trametinib es un inhibidor potente y selectivo de MEK1/2, que se encuentra en fase I/II en Corea del Sur (NCT04326283), debido al papel de esta quinasa en la cascada de las MAPK/ERKs que median la apoptosis y muerte neuronal.

El fasudil es un inhibidor de la quinasa ROCK que ha demostrado aumentar la esperanza de vida de animales SOD^{G93A}, protegiendo las motoneuronas mediante la regulación de la microglía y la

⁶⁷ Li, Q.; Kang, C. Mechanisms of action for small molecules revealed by structural biology in drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*(15), 5262.

⁶⁸ Müller, S.; Chaikuad, A.; Gray, N. S.; Knapp, S. The ins and outs of selective kinase inhibitor development. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11* (11), 818-821.

⁶⁹ Bolognesi, M. L.; Cavalli, A. Multitarget drug discovery and polypharmacology. *ChemMedChem* **2016**, *11* (12), 1190-1192.

⁷⁰ Ito, Y.; Ofengeim, D.; Najafov, A.; Das, S.; Saberi, S.; Li, Y.; Hitomi, J.; Zhu, H.; Chen, H.; Mayo, L.; Geng, J.; Amin, P.; DeWitt, J. P.; Mookhtiar, A. K.; Florez, M.; Ouchida, A. T.; Fan, J. B.; Pasparakis, M.; Kelliher, M. A.; Ravits, J.; Yuan, J. RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS. *Science* **2016**, *353* (6299), 603-608.

astroglía.⁷¹ Esto unido a su facilidad para la administración oral y sus propiedades de penetración al SNC han motivado una fase II en Europa para la cual se esperan resultados en julio de 2022 (NCT03792490).

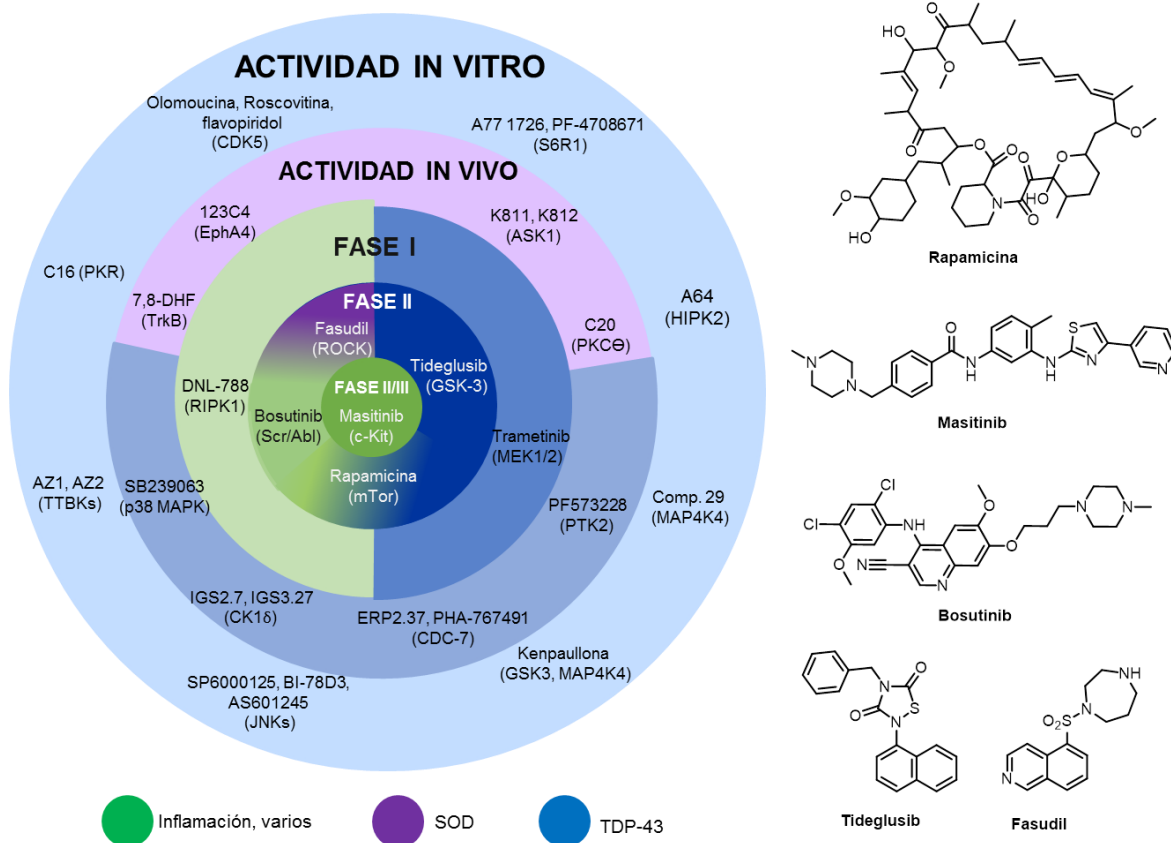


Figura 12. (Izda.) Inhibidores de proteínas quinasas en distintas fases de desarrollo para la ELA. El color indica el mecanismo de acción terapéutica. (Dcha.) Estructura química de los compuestos en fases clínicas avanzadas (II y III) Figura adaptada de la ref. 31.

El bosutinib, inhibidor de las quinasas Src y Abl, se encuentra en fase clínica II (NCT04744532) debido a su efecto en la promoción de la autofagia y la reducción de la muerte neuronal. El inhibidor alostérico de mTOR, rapamicina, modula la autofagia y la neuroinflamación, reduciendo las inclusiones de TDP-43 y mejorando el fenotipo cognitivo y motor de modelos animales.⁷² Actualmente se encuentra en fase clínica II en Italia (NCT03359538), aunque aún no se

⁷¹ Tönges, L.; Günther, R.; Suhr, M.; Jansen, J.; Balck, A.; Saal, K. A.; Barski, E.; Nientied, T.; Gotz, A. A.; Koch, J. C.; Mueller, B. K.; Weishaupt, J. H.; Sereda, M. W.; Hanisch, U. K.; Bahr, M.; Lingor, P. Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* **2014**, *62* (2), 217-232.

⁷² Wang, I. F.; Guo, B. S.; Liu, Y. C.; Wu, C. C.; Yang, C. H.; Tsai, K. J.; Shen, C. K. Autophagy activators rescue and alleviate pathogenesis of a mouse model with proteinopathies of the TAR DNA-binding protein 43. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109* (37), 15024-15029.

han reportado resultados. Tideglusib es un compuesto inhibidor de la quinasa GSK3 β , que actúa reduciendo la hiperfosforilación de TDP-43 en modelos animales⁷³ y entrará en fase clínica II en 2022 en Suiza (NCT05105958).

Por último, cabe destacar masitinib, un inhibidor de tirosina quinasa con efecto modulador de la microglía que en la fase II demostró beneficios significativos en la puntuación ALSFRS-R y que a nivel molecular previene la degeneración de las motoneuronas, controlando la microgliosis y la aparición y expansión de células gliales aberrantes en modelos de ELA.⁷⁴

Por otro lado, puesto que la hiperfosforilación del epítipo Ser409/410 de TDP-43 es clave en los mecanismos de neurodegeneración, los inhibidores de proteínas quinasa responsables directas de esta hiperfosforilación pueden ser también una estrategia terapéutica efectiva. Sólo tres quinasas han sido descritas con esta función: CK1, CDC7 y TTBK1/2.

Caseína quinasa 1

La caseína quinasa 1 (CK1) es una serina/treonina quinasa, descrita por primera vez en la década de los 70, con siete isoformas (α , β , γ 1-3, δ y ϵ) en el cuerpo humano y diferentes funciones fisiológicas incluyendo los ritmos circadianos y la apoptosis.⁷⁵ Pero es por su papel principal en la fosforilación de diferentes sustratos como tau o TDP-43 que CK1 se ha posicionado como una diana atractiva en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como EA, EP y ELA.⁷⁶

De todas las isoformas, sólo δ y ϵ han sido descritas como responsables de la fosforilación de TDP-43, y fueron las primeras quinasas reportadas como actoras directas de este proceso.²⁹ Aunque hay descritos varios inhibidores de CK1 en la literatura, solo el efecto de los benzotiazoles descubiertos y desarrollados en este grupo de investigación ha sido estudiado sobre la patología de TDP-43.

⁷³ Martinez-Gonzalez, L.; Gonzalo-Consuegra, C.; Gomez-Almeria, M.; Porras, G.; de Lago, E.; Martin-Requero, A.; Martinez, A. Tideglusib, a non-ATP competitive inhibitor of GSK-3beta as a drug candidate for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (16), 8975-8989.

⁷⁴ Trias, E.; Ibarburu, S.; Barreto-Nunez, R.; Babdor, J.; Maciel, T. T.; Guillo, M.; Gros, L.; Dubreuil, P.; Diaz-Amarilla, P.; Cassina, P.; Martinez-Palma, L.; Moura, I. C.; Beckman, J. S.; Hermine, O.; Barbeito, L. Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflammation* **2016**, *13* (1), 177.

⁷⁵ Cheong, J. K.; Virshup, D. M. Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43* (4), 465-469.

⁷⁶ Perez, D. I.; Gil, C.; Martinez, A. Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31* (6), 924-954.

De una familia de más de 40 inhibidores de CK1 con actividad en el rango nanomolar, el benzotiazol IGS-2.7 (Figura 13) es capaz de preservar las motoneuronas de la medula espinal así como reducir los niveles de TDP-43 fosforilada y atenuar la actividad inflamatoria de la microglía en ratones transgénicos de TDP-43^{A315T}.⁷⁷ Además, este compuesto también ha mostrado su potencial terapéutico en un modelo celular de pacientes con DFT, donde el tratamiento con IGS-2.7 reduce la fosforilación de TDP-43 y recupera la homeostasis de la proteína, validando la estrategia terapéutica de la modulación de TDP-43 en diferentes proteinopatías.⁷⁸

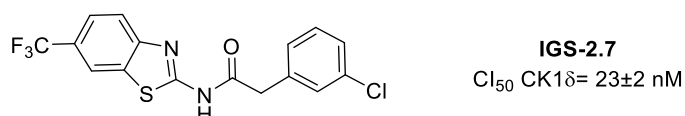


Figura 13. Estructura química del benzotiazol IGS-2.7, inhibidor de CK1 desarrollado para el tratamiento de la ELA y la DFT.

Quinasa del ciclo de división celular 7

La quinasa del ciclo de división celular 7 (CDC7) es fundamental en la regulación del ciclo celular y por ello, se han descrito diversos inhibidores para el tratamiento del cáncer llegando algunos de ellos a fases clínicas.⁷⁹ En el año 2013 se demostró por primera vez que esta quinasa era responsable de la fosforilación directa de TDP-43, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además esta quinasa co-localiza con lesiones de TDP-43 de neuronas de la corteza cerebral de pacientes de DFT.³⁰ Así, el tratamiento de un modelo de patología de TDP-43 en *Caenorhabditis elegans* con el inhibidor de CDC7, PHA-767491, mostró la reducción de esta hiperfosforilación de TDP-43 y la preservación de las motoneuronas. Sin embargo, el compuesto no es capaz de atravesar la BHE, y por ello se han diseñado formulaciones innovadoras del fármaco en nanopartículas poliméricas orgánicas, que son capaces de mejorar la permeabilidad y mantener el efecto terapéutico del compuesto,⁸⁰ validando CDC7 como diana para las proteinopatías de TDP-43.

⁷⁷ Martínez-González, L.; Rodríguez-Cueto, C.; Cabezedo, D.; Bartolome, F.; Andrés-Benito, P.; Ferrer, I.; Gil, C.; Martín-Requero, A.; Fernández-Ruiz, J.; Martínez, A.; de Lago, E. Motor neuron preservation and decrease of *in vivo* TDP-43 phosphorylation by protein CK-1delta kinase inhibitor treatment. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 4449.

⁷⁸ Alquezar, C.; Salado, I. G.; de la Encarnación, A.; Pérez, D. I.; Moreno, F.; Gil, C.; de Munain, A. L.; Martínez, A.; Martín-Requero, A. Targeting TDP-43 phosphorylation by casein kinase-1delta inhibitors: A novel strategy for the treatment of frontotemporal dementia. *Mol. Neurodegener.* **2016**, *11* (1), 36-50.

⁷⁹ Shimizu, T.; Doi, T.; Kondo, S.; Takahashi, H.; Yamamoto, N.; E., S.-W.; Zhou, X.; Bahamon, B.; Li, H.; Kuboki, Y. First-in-human phase 1 study of TAK-931, an oral cell division cycle 7 (CDC7) inhibitor, in patients (pts) with advanced solid tumors. *Am. J. Clin. Oncol.* **2018**, *36* (15_suppl), 2506-2506.

⁸⁰ Rojas-Prats, E.; Tosat-Bitrian, C.; Martínez-González, L.; Nozal, V.; Pérez, D. I.; Martínez, A. Increasing brain permeability of PHA-767491, a cell division cycle 7 kinase inhibitor, with biodegradable polymeric nanoparticles. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (2), 180.

En un esfuerzo por desarrollar nuevos inhibidores capaces de penetrar en el SNC, en 2021 este grupo de investigación describió una nueva familia de mercaptopurinas inhibidoras de CDC7 (Figura 14).⁸¹ En este grupo de 40 derivados de purina, ATP-competitivos, inhibidores de CDC7 en un rango de inhibición del bajo micromolar, destaca el compuesto ERP-2.37, que ha mostrado un menor declive motor, así como reducción en la fosforilación de TDP-43 en el tejido de la médula espinal, en un modelo transgénico de TDP-43^{A315T}, confirmando el potencial de la modulación de CDC7 en procesos neurodegenerativos.

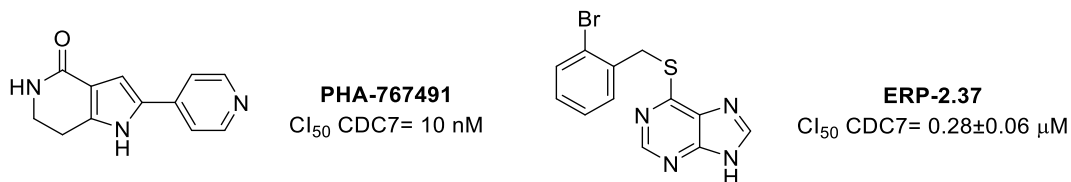


Figura 14. Estructura química de algunos inhibidores de CDC7.

1.3 TTBK1 como nueva diana para la patología de TDP-43

De las tres enzimas responsables de la directa fosforilación de TDP-43, la tau tubulina quinasa 1/2 (TTBK1/2) es la proteína quinasa descrita más recientemente. Por ello son pocos los inhibidores de esta quinasa que se conocen, y ninguno de ellos ha sido probado en modelos de proteinopatía de TDP-43, por lo que en esta tesis doctoral hemos desarrollado un proyecto de química médica nuevo para encontrar inhibidores de TTBK1 para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

1.3.1 Expresión, regulación y función de las TTBKs

La quinasa de tau y tubulina TTBK es una proteína quinasa dual, que fosforila residuos de serina, treonina y tirosina y pertenece a la superfamilia de CK1. Presenta dos isoformas: TTBK1 y TTBK2 con distintos patrones de expresión y funciones biológicas en el organismo. CK1δ es la isoforma más similar a TTBK así, los dominios quinasa de TTBK1 y CK1δ tienen un 38% de identidad y un 52% de similitud.³³

El gen de *TTBK1* se encuentra en el cromosoma 6p21.1 y contiene un total de 6 932 pares de bases. Codifica para una proteína de 1 321 aminoácidos de localización citoplasmática, con un

⁸¹ Rojas-Prats, E.; Martínez-González, L.; Gonzalo-Consuegra, C.; Liachko, N. F.; Pérez, C.; Ramírez, D.; Kraemer, B. C.; Martín-Requero, A.; Pérez, D. I.; Gil, C.; de Lago, E.; Martínez, A. Targeting nuclear protein TDP-43 by cell division cycle kinase 7 inhibitors: A new therapeutic approach for amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *210*, 112968.

dominio quinasa definido entre los residuos 34 y 297 altamente conservado entre especies, un dominio único de poliglutamato (733-771) y una región rica en prolina al final de la secuencia (Figura 15). Esta quinasa se expresa específicamente en el SNC, en mayor medida en la corteza cerebral adulta, el cerebelo y en el cerebro fetal humano.⁸²

El gen de *TTBK2* se localiza en el cromosoma 15q15.2, contiene 3 732 nucleótidos y codifica para una proteína de 1 244 aminoácidos que se localiza en el citoplasma. *TTBK2* se expresa de manera ubicua en el cuerpo humano, aunque se encuentra en mayores niveles en los testículos, las células de Purkinje del cerebelo, en la capa granular, el hipocampo, el mesencéfalo y la sustancia *nigra* del cerebro. La proteína contiene un dominio quinasa definido entre los residuos 21 y 284 y una región rica en serina.⁸³

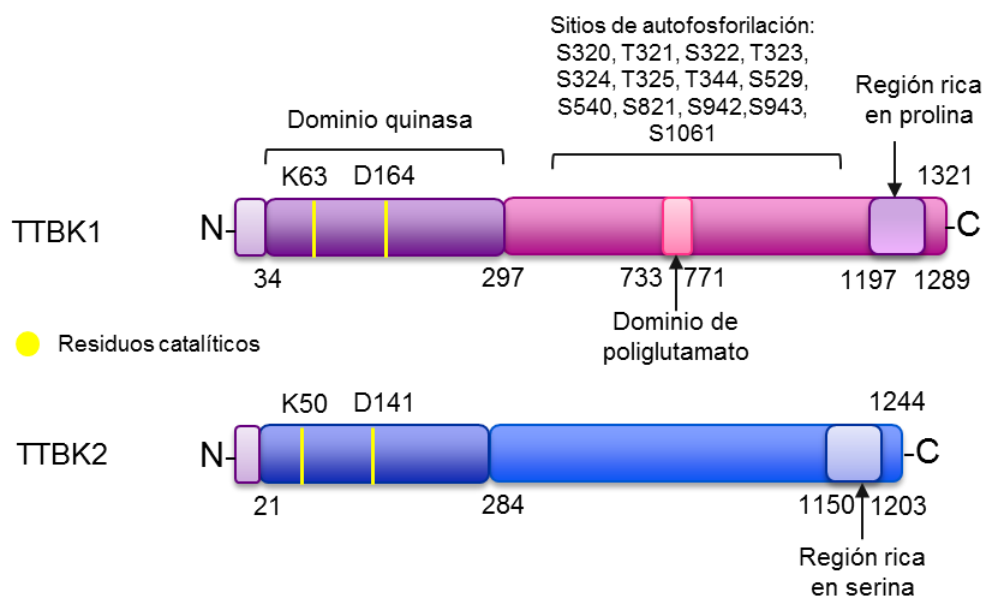


Figura 15. Esquema de los dominios estructurales de TTBK1 y TTBK2.

La función y estructura fuera del dominio quinasa de unas proteínas de tan elevado peso molecular aún resultan desconocidas, aunque han sido recientemente vinculadas con funciones de regulación de la expresión, la actividad enzimática y la localización celular. Por ejemplo, los dominios quinasa co-expresados con tau (TTBK1: 1-297, TTBK2: 1-285) no son funcionales por sí solos y provocan que las quinasa se expresen en menor nivel y aparezcan en agregados. Para

⁸² Sato, S.; Cerny, R. L.; Buescher, J. L.; Ikezu, T. Tau-tubulin kinase 1 (TTBK1), a neuron-specific tau kinase candidate, is involved in tau phosphorylation and aggregation. *J. Neurochem.* **2006**, *98* (5), 1573-1584.

⁸³ Takahashi, M.; Tomizawa, K.; Sato, K.; Ohtake, A.; Omori, A. A novel tau-tubulin kinase from bovine brain. *FEBS Lett.* **1995**, *372* (1), 59-64.

TTBK1 se han descrito hasta 13 sitios de autofosforilación (Figura 15), que cuando son mutados hacen que la quinasa pierda su actividad.⁸⁴

Desde el punto de vista funcional, la isoforma TTBK2 es fundamental en la iniciación del crecimiento de los cilios (ciliogenesis), la dinámica de los microtúbulos y el tráfico de neurotransmisores.³³ Sin embargo, la isoforma TTBK1 hasta el momento solo se ha reportado como responsable en procesos patológicos, hiperfosforilando sustratos como tau en la EA y TDP-43 en la ELA y la DFT. Por estas razones, la modulación selectiva de TTBK1 podría ser considerada una estrategia terapéutica eficaz para el tratamiento de distintas enfermedades neurodegenerativas.

1.3.2 Funciones patológicas de las TTBKs

TTBK1 fue descrita por primera vez en el año 2006, debido a su papel en la fosforilación de la proteína tau en cerebros de pacientes con la EA.⁸² TTBK1 es responsable de la fosforilación de la Ser422, un epítipo clave en la formación temprana de los ovillos neurofibrilares y se ha encontrado sobreexpresada en pacientes con EA.^{85, 86} Además, TTBK1 se ha relacionado con la protección frente a la EA ya que polimorfismos de un único nucleótido (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphisms*) en el gen de *TTBK1* contribuyen a un desarrollo de EA tardío y al riesgo de sufrir la enfermedad en dos cohortes de población.^{87,88} Por otro lado, TTBK2 es responsable de la fosforilación de tau en la Ser208 y Ser210, epítopos que se encuentran en cerebros de pacientes con EA.⁸³

TDP-43 también ha sido descrito como sustrato de las TTBKs, que son capaces de fosforilar la proteína tanto *in vitro* como *in vivo* además de co-localizar con las inclusiones de TDP-43 en tejidos de la corteza frontal y la médula espinal de pacientes con DFT y ELA respectivamente.³² Este mismo estudio sugiere que TTBK1 es la isoforma predominante en la hiperfosforilación de TDP-43.

⁸⁴ Bao, C.; Bajrami, B.; Marcotte, D. J.; Chodaparambil, J. V.; Kerns, H. M.; Henderson, J.; Wei, R.; Gao, B.; Dillon, G. M. Mechanisms of regulation and diverse activities of tau-tubulin kinase (TTBK) isoforms. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2021**, *41* (4), 669-685.

⁸⁵ Lund, H.; Cowburn, R. F.; Gustafsson, E.; Stromberg, K.; Svensson, A.; Dahllund, L.; Malinowsky, D.; Sunnemark, D. Tau-tubulin kinase 1 expression, phosphorylation and co-localization with phospho-Ser422 tau in the Alzheimer's disease brain. *Brain Pathol.* **2013**, *23* (4), 378-389.

⁸⁶ Sato, S.; Xu, J.; Okuyama, S.; Martinez, L. B.; Walsh, S. M.; Jacobsen, M. T.; Swan, R. J.; Schlautman, J. D.; Ciborowski, P.; Ikezu, T. Spatial learning impairment, enhanced CDK5/p35 activity, and downregulation of NMDA receptor expression in transgenic mice expressing tau-tubulin kinase 1. *J. Neurosci.* **2008**, *28* (53), 14511-21

⁸⁷ Vazquez-Higuera, J. L.; Martinez-Garcia, A.; Sanchez-Juan, P.; Rodriguez-Rodriguez, E.; Mateo, I.; Pozueta, A.; Frank, A.; Valdivieso, F.; Berciano, J.; Bullido, M. J.; Combarros, O. Genetic variations in tau-tubulin kinase-1 are linked to Alzheimer's disease in a Spanish case-control cohort. *Neurobiol. Aging* **2011**, *32* (3), 550.e5-550.e9.

⁸⁸ Yu, N. N.; Yu, J. T.; Xiao, J. T.; Zhang, H. W.; Lu, R. C.; Jiang, H.; Xing, Z. H.; Tan, L. Tau-tubulin kinase-1 gene variants are associated with Alzheimer's disease in Han Chinese. *Neurosci. Lett.* **2011**, *491* (1), 83-86.

Por otro lado, TTBK2 ha sido ampliamente estudiada debido a su relación con una enfermedad denominada ataxia cerebrosespinal 11 (SCA11). Esta enfermedad rara, que sólo ha sido descrita en 5 familias en todo el mundo, aunque no es letal causa trastornos motores tales como movimiento de ojos anormal, pérdida de equilibrio, baja coordinación motora y signos piramidales. Las mutaciones heterocigóticas en el gen que codifica por TTBK2 producen formas truncadas de la proteína que conducen a una quinasa menos funcional y cuya localización se concentra en el núcleo. Además se sabe que mutaciones homocigóticas de *TTBK2* producen una forma truncada de la quinasa que resulta letal debido a serias deficiencias en el desarrollo del cerebro de embriones de ratones.⁸⁹

1.3.3 Estructura de TTBK1 y TTBK2 e inhibidores descritos

Estructuralmente las dos isoformas comparten un 35% de identidad y un 63% de similitud en la secuencia completa, sin embargo, sus dominios quinasa son altamente homólogos llegando a tener un 87.5% de identidad y un 96% de similitud.

A día de hoy solo se conoce la estructura tridimensional del dominio quinasa de ambas isoformas, de manera que existen siete estructuras de TTBK1 (4BTM, 4BTK, 4BTJ, 4NFN, 4NFM, 7JXY, 7JXX) y dos de TTBK2 (6VRF, 6UOK), cristalizadas con algunos inhibidores, con ATP o en forma apo.^{90,91} Estas estructuras nos permiten reconocer que a 6Å alrededor del sitio de unión al ATP los residuos de ambas proteínas están conservados, por lo que el diseño de inhibidores de tipo I o tipo II selectivos es un reto importante para la química médica. De esta manera los inhibidores ATP-competitivos reportados hasta el momento no muestran selectividad por ninguna isoforma (Figura 16).

Entre los inhibidores de TTBK1 conocidos, la dimetoxiquinazolina **AZ1** y la pirrolopirimidina **AZ2** recogidas en la Figura 16, están co-cristalizadas con el dominio quinasa de TTBK1, sin embargo sus Cl_{50} para la inhibición de estas quinasas no estaban descritos. Por ello, en este trabajo se

⁸⁹ Bouskila, M.; Esoof, N.; Gay, L.; Fang, E. H.; Deak, M.; Begley, M. J.; Cantley, L. C.; Prescott, A.; Storey, K. G.; Alessi, D. R. TTBK2 kinase substrate specificity and the impact of spinocerebellar-ataxia-causing mutations on expression, activity, localization and development. *Biochem. J.* **2011**, *437* (1), 157-167.

⁹⁰ Xue, Y.; Wan, P. T.; Hillertz, P.; Schweikart, F.; Zhao, Y.; Wissler, L.; Dekker, N. X-ray structural analysis of tau-tubulin kinase 1 and its interactions with small molecular inhibitors. *ChemMedChem* **2013**, *8* (11), 1846-1854.

⁹¹ Kiefer, S. E.; Chang, C. J.; Kimura, S. R.; Gao, M.; Xie, D.; Zhang, Y.; Zhang, G.; Gill, M. B.; Mastalerz, H.; Thompson, L. A.; Cacace, A. M.; Sheriff, S. The structure of human tau-tubulin kinase 1 both in the apo form and in complex with an inhibitor. *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.* **2014**, *70* (2), 173-181.

decidió sintetizarlos, evaluarlos enzimáticamente y utilizarlos de este modo como controles en nuestro programa de química médica.

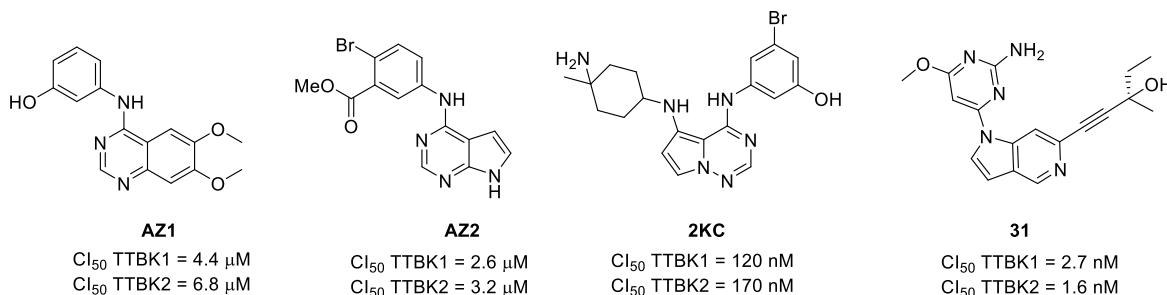


Figura 16. Estructura química y valores de Cl₅₀ de los inhibidores de TTBK1 y TTBK2 reportados en la literatura.

Si analizamos los valores de Cl₅₀, estudiamos las interacciones observadas con la quinasa en las estructuras cristalinas reportadas y los comparamos con el compuesto **2KC**, el otro inhibidor de TTBK1/2 descrito al inicio de este proyecto, podemos ver que **AZ1** y **AZ2** se unen a la región bisagra mediante uno o dos enlaces de hidrógeno con las Gln108 y Gln110. Mientras que **2KC**, establece enlaces de hidrógeno con tres regiones diferentes del bolsillo: la región bisagra, el Asp176 del motivo DFG y el Glu77, maximizando su red de contactos, lo que podría explicar su elevada potencia (Figura 17).

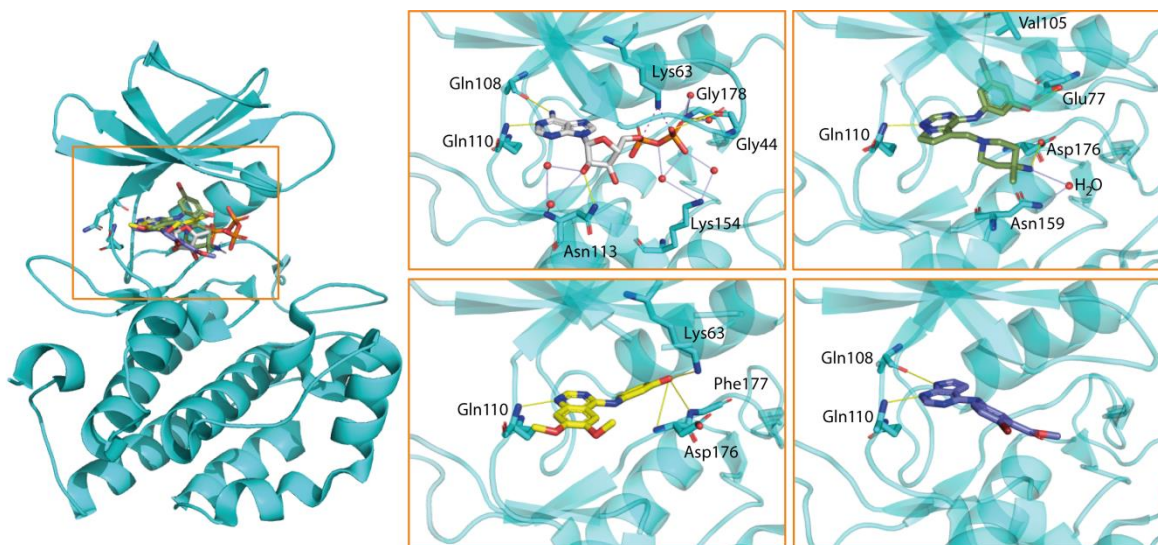


Figura 17. Diagrama de interacciones del ATP (blanco) y los inhibidores **2KC** (verde), **AZ1** (amarillo) y **AZ2** (azul) con el dominio quinasa de TTBK1 obtenidas a partir de las estructuras cristalográficas depositadas en el PDB (códigos: 4BTJ, 4BTM, 4BTK y 4NFN).

Por último, el azaindol **31** pertenece a una familia de inhibidores de TTBK1 y TTBK2 reportada en el año 2021, diseñados para el tratamiento de la EA.⁹² Los compuestos demostraron reducir la fosforilación de la proteína tau en la Ser422, mostrando por primera vez la eficacia de los inhibidores de TTBK1/2 en enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, el compuesto no es selectivo y no ha sido probado en ningún modelo de patología de TDP-43.

Por ello, como primer objetivo de esta tesis doctoral se propuso el diseño y síntesis de nuevos compuestos inhibidores de la quinasa TTBK1 para el tratamiento de proteinopatías de TDP-43.

⁹² Halkina, T.; Henderson, J. L.; Lin, E. Y.; Himmelbauer, M. K.; Jones, J. H.; Nevalainen, M.; Feng, J.; King, K.; Rooney, M.; Johnson, J. L.; Marcotte, D. J.; Chodaparambil, J. V.; Kumar, P. R.; Patterson, T. A.; Murugan, P.; Schuman, E.; Wong, L.; Hesson, T.; Lamore, S.; Bao, C.; Calhoun, M.; Certo, H.; Amaral, B.; Dillon, G. M.; Gilfillan, R.; de Turiso, F. G. Discovery of potent and brain-penetrant tau tubulin kinase 1 (TTBK1) inhibitors that lower tau phosphorylation in vivo. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (9), 6358-6380.

2 Resultados y discusión

2.1 Diseño y síntesis de nuevos compuestos inhibidores de TTBK1

Partiendo de los inhibidores cristalizados **AZ1** y **AZ2**, se propusieron diferentes modificaciones estructurales con el fin de mejorar la potencia de inhibición de TTBK1. (Figura 18):

- ◆ Anillo heterociclo principal (en rosa): se exploran diferentes ciclos fusionados de [6+6] ó [6+5] con átomos dadores (NH) o aceptores de puente de hidrógeno (S) y sin éstos (CH).
- ◆ Conector (en morado): se explora la naturaleza y longitud de la cadena de unión al anillo aromático.
- ◆ Naturaleza del anillo secundario (en azul): se explora la sustitución con anillos alifáticos y aromáticos con distintos grupos funcionales (electroatractores o electrodonadores).

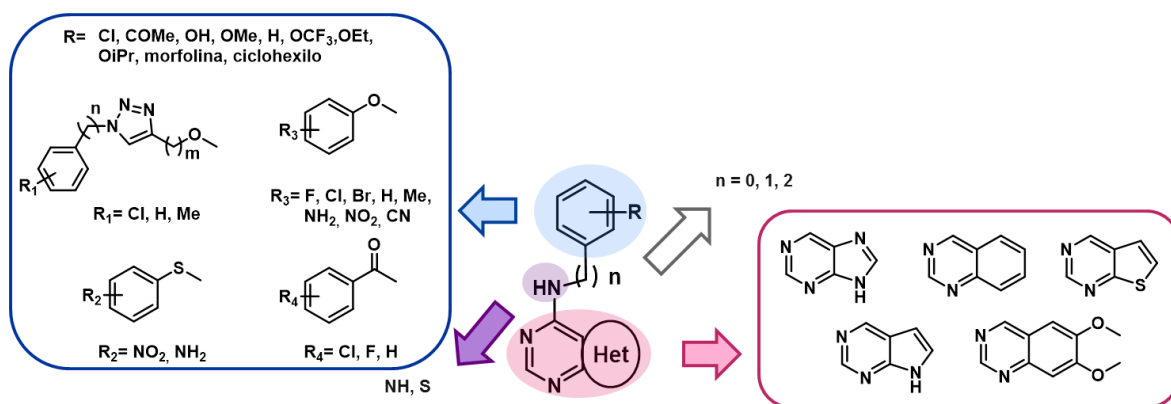
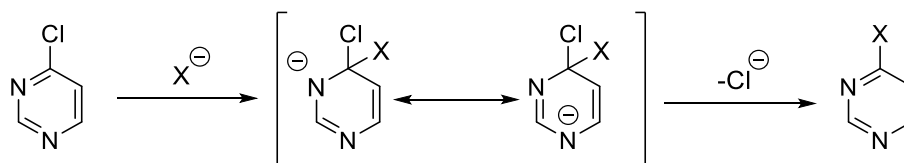


Figura 18. Modificaciones estructurales que contienen los nuevos compuestos diseñados para ser evaluados como inhibidores de TTBK1.

2.1.1 Síntesis de purinas

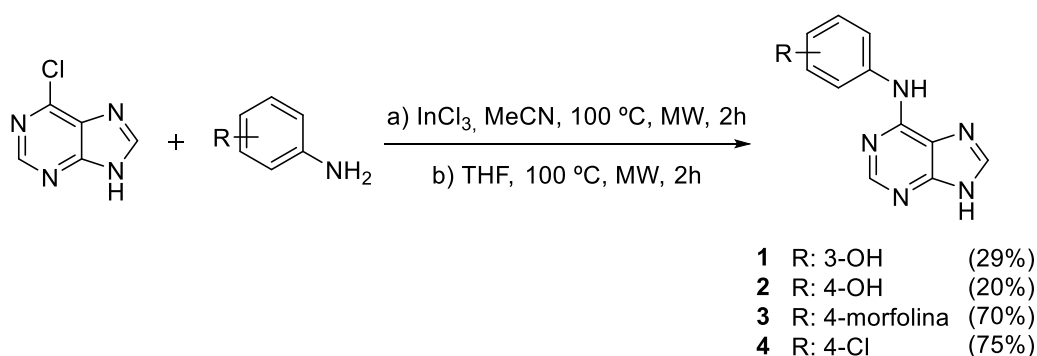
En primer lugar, se exploró la importancia del anillo heterocíclico principal, sintetizando purinas con anillos aromáticos y diferentes sustituyentes.

Se diseñó una síntesis en la se obtuvieron las purinas deseadas mediante una reacción de sustitución nucleófila aromática (S_NAr) de 6-cloropurinas con diferentes derivados de anilina para dar lugar a los compuestos **1** - **4**. Dado el carácter π -deficiente del anillo de pirimidina sobre el que se sitúa el átomo de cloro, hay una mayor facilidad para adicionar nucleófilos por lo que la reacción podría darse en ausencia de catalizadores o bases (Esquema 1).



Esquema 1. Mecanismo de reacción en la sustitución nucleófila aromática sobre un anillo de pirimidina.

Sin embargo, para favorecer la sustitución y aumentar el rendimiento de la reacción se decidió utilizar el tricloruro de indio como catalizador de Lewis.⁹³ En el caso del compuesto **4**, el uso del catalizador de Lewis dio lugar a una masa de aspecto pastoso e insoluble en distintos disolventes orgánicos, que podría deberse a la polimerización de los reactivos al tener un sustituyente de tipo halógeno. Por este motivo, el uso del tricloruro de indio se descartó para las siguientes reacciones con anillos de pirimidina con sustituyentes de tipo halógeno (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis de las purinas **1 – 4** y rendimientos de las reacciones indicados entre paréntesis.

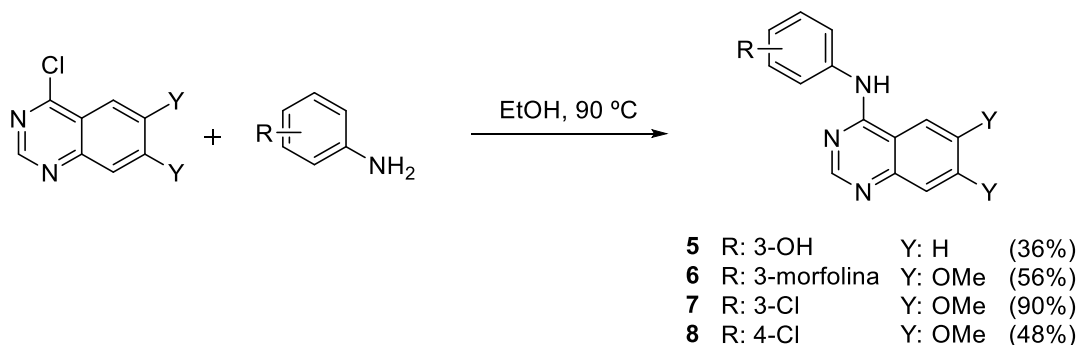
Estos compuestos sintetizados fueron caracterizados inequívocamente mediante experimentos de resonancia magnética nuclear de (¹H-RMN y ¹³C-RMN) mono- y bidimensionales (COSY, HMQC, HMBC) y técnicas de análisis elemental o espectrometría de masas.

2.1.2 Síntesis de quinazolinas y dimetoxiquinazolinas

Para continuar con la evaluación de la importancia del anillo heterocíclico se planteó diseñar compuestos con dos ciclos fusionados de [6+6] de tipo quinazolina, con o sin sustituyentes de tipo metoxilo en las posiciones 6 y 7, ya que este tipo de heterociclo es habitual en los inhibidores de quinasas comerciales.⁶⁵ En este caso la reacción se realizó partiendo de 4-cloro-6,7-dimetoxiquinazolina o 4-cloroquinazolina y distintas anilinas disueltas en etanol para dar lugar a los

⁹³ Staderini, M.; Bolognesi, M. L.; Menéndez, J. C. Lewis acid-catalyzed generation of C-C and C-N bonds on π -deficient heterocyclic substrates. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (1), 185-195.

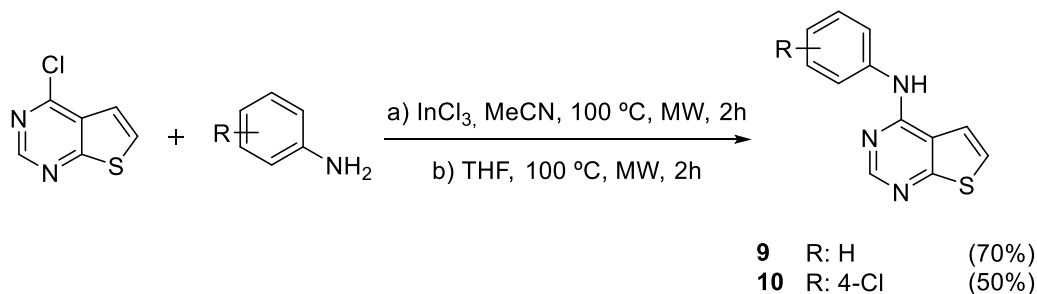
derivados **5** - **8** con rendimientos moderados o buenos y que fueron de nuevo caracterizados convenientemente de la manera indicada en el apartado anterior (Esquema 3).



Esquema 3. Síntesis de las quinazolininas y dimetoxiquinazolininas **5** - **8** y rendimientos de las reacciones indicados entre paréntesis.

2.1.3 Síntesis de tienopirimidinas

Continuando con la evaluación de la importancia del anillo heterocíclico principal se diseñaron y sintetizaron los derivados de tienopirimidinas, utilizando las condiciones de reacción descritas en el apartado 2.1.1, partiendo de 4-clorotieno[2,3-*d*]pirimidina y anilina o 4-cloroanilina para dar lugar a los derivados **9** y **10** con buenos rendimientos (Esquema 4).

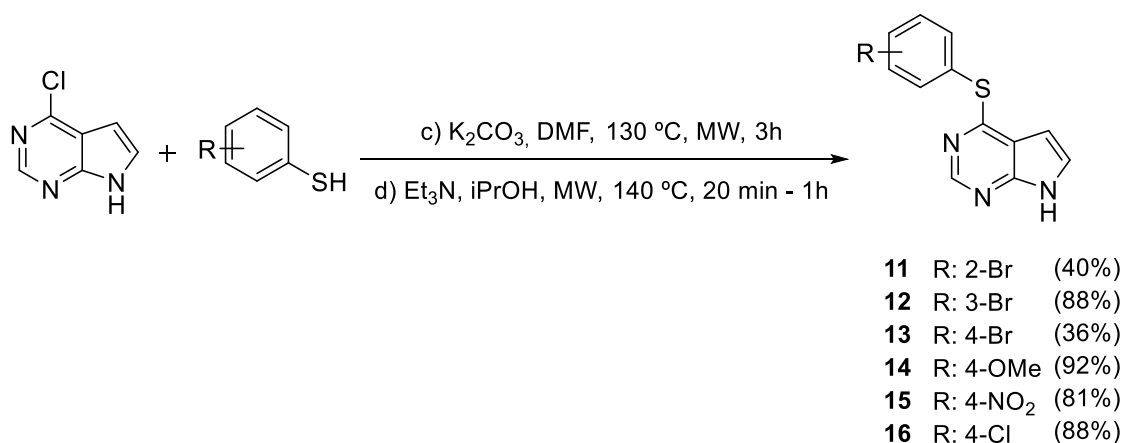


Esquema 4. Síntesis de las tienopirimidinas **9** y **10** y rendimientos de las reacciones indicados entre paréntesis.

2.1.4 Síntesis de pirrolopirimidinas.

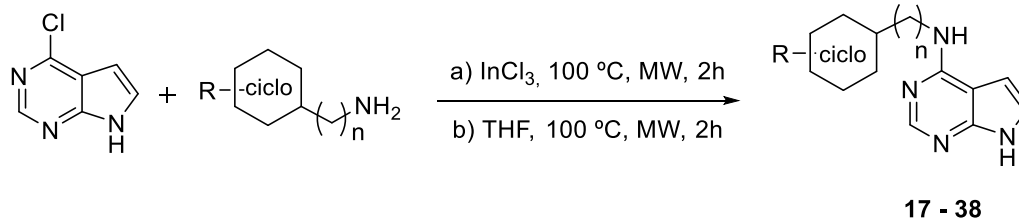
En este caso, se sintetizaron diferentes compuestos con un anillo principal de pirrolopirimidina, utilizándose este heterociclo privilegiado para estudiar en primer lugar la importancia de la naturaleza del conector entre el anillo de pirrolopirimidina y el anillo aromático. De esta manera, partiendo de la 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina, se obtuvieron los compuestos **11** - **16** con rendimientos de moderados a muy buenos mediante una S_NAr con diferentes tiofenoles (Esquema 5). En esta ocasión se utilizaron bases como el carbonato potásico o la trietilamina para

favorecer la sustitución nucleófila ya que la reacción utilizando tricloruro de indio como catalizador no funcionó.



Esquema 5. Síntesis de las pirrolopirimidinas **11** – **16** y rendimientos de las reacciones indicados entre paréntesis.

Por otro lado, utilizando diferentes bencilaminas, fenetilaminas, ciclohexilaminas y anilinas, y bajo las condiciones descritas en el apartado 2.1.1, se obtuvieron los compuestos **17** - **38** con rendimientos generalmente de buenos a muy buenos. (Esquema 6 y Tabla 2).



Esquema 6. Síntesis de las pirrolopirimidinas **17** - **38**.

De acuerdo con lo observado y comentado en el apartado 2.1.1 en aquellas reacciones en las que el sustituyente R de las bencilaminas, fenetilaminas o anilinas era de tipo halógeno (F, Cl, Br), se prescindió del uso de tricloruro de indio para evitar la polimerización de los reactivos. En la Tabla 2 se recogen todos los sustituyentes introducidos en el anillo aromático y los rendimientos de las reacciones.

Tabla 2. Rendimientos obtenidos para la síntesis de las pirrolopirimidinas **17 - 38**.

Comp.	n	Ciclo	R	Rto (%)	Comp.	n	Ciclo	R	Rto (%)
17	0	fenilo	3-OH	87	28	0	fenilo	[b]ciclohexilo	23
18	0	fenilo	4-OH	38	29	0	fenilo	[b]1,3-dioxol	15
19	0	fenilo	4-morfolina	24	30	0	fenilo	4-COMe	25
20	0	fenilo	4-Cl	92	31	0	fenilo	3-morfolina	58
21	1	fenilo	4-Cl	55	32	0	fenilo	H	64
22	2	fenilo	4-Cl	25	33	0	fenilo	4-OMe	74
23	1	fenilo	4-OH	14	34	0	fenilo	4-OCF ₃	92
24	2	fenilo	4-OH	23	35	0	fenilo	4-OiPr	66
25	0	fenilo	3-Cl	49	36	0	fenilo	4-OEt	20
26	0	fenilo	2-Cl	69	37	0	fenilo	4-OPh	53
27	0	fenilo	2-OH	20	38	0	ciclohexilo	-	26

2.1.5 Evaluación enzimática de la inhibición de TTBK1 y TTBK2

Tras la síntesis de las diferentes familias de compuestos, su capacidad inhibitoria frente al dominio quinasa de TTBK en sus isoformas 1 y 2 fue evaluada. El ensayo se llevó a cabo utilizando ATP radiomarcado con ³³P, en la Unidad de Fosforilación y Ubiquitinación de la Universidad de Dundee.^{94,95} En un primer paso, todos los compuestos fueron evaluados a una concentración fija de 10 μM, obteniéndose así el porcentaje de inhibición enzimática de las moléculas. Sólo en los casos en los que la inhibición resultante fue ≥50 % se determinó el valor de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) del compuesto, realizando las curvas de dosis-respuesta a 10 concentraciones de compuesto diferentes. Además, con el fin de desarrollar los compuestos con mayor selectividad hacia la isoforma 1, se definió el “Índice de selectividad” como el cociente entre el valor de CI₅₀ respecto a TTBK1 y el valor de CI₅₀ respecto a TTBK2. Como se puede ver en la Tabla 3, se consiguieron obtener distintos compuestos con capacidad inhibitoria frente a TTBK1 y TTBK2.

⁹⁴ Hastie, C. J.; McLauchlan, H. J.; Cohen, P. Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: A protocol. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (2), 968-971.

⁹⁵ Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C. J.; McLauchlan, H.; Klevernic, I.; Arthur, J. S.; Alessi, D. R.; Cohen, P. The selectivity of protein kinase inhibitors: A further update. *Biochem. J.* **2007**, *408* (3), 297-315.

Tabla 3. Resultados de la evaluación enzimática de la inhibición frente a TTBK1 y TTBK2 de los derivados sintetizados.

Comp.	TTBK1 Cl ₅₀ (μM) % inh@ 10 μM	TTBK2 Cl ₅₀ (μM) % inh@ 10 μM	Índice selectividad	Comp.	TTBK1 Cl ₅₀ (μM) % inh@ 10 μM	TTBK2 Cl ₅₀ (μM) % inh@ 10 μM	Índice selectividad
1	11.4	13%	0.22	20	3.2	20.3	0.15
2	3%	1%	-	21	32%	10%	-
3	25%	12%	-	22	18.2	86.0	0.21
4	8%	1%	-	23	23%	10%	-
5	15%	29%	-	24	12.8	37.7	0.33
6	18%	10%	-	25	15.2	13.9	1.09
7	12%	1%	-	26	21.8	42.1	0.51
8	13%	4%	-	27	14%	1%	-
9	20%	-	-	28	23%	10%	-
10	17%	-	-	29	1.6	7.6	0.21
11	12%	1%	-	30	4.3	9.3	0.46
12	1%	1%	-	31	4.7	5.7	0.82
13	34%	1%	-	32	0.8	1.7	0.47
14	7%	1%	-	33	0.5	1.3	0.39
15	11%	1%	-	34	1.0	8.8	0.11
16	1%	1%	-	35	1.5	8.4	0.17
17	6.1	6.7	0.90	36	2.3	13.7	0.16
18	3.0	7.4	0.45	37	0.4	0.9	0.45
19	4.9	15.7	0.30	38	3%	15%	-

A partir de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la estructura química de los diferentes compuestos, se establecieron una serie de relaciones entre la estructura química y la actividad biológica de los derivados preparados respecto a TTBK1.

Respecto al anillo heterocíclico principal:

- ◆ Las purinas son menos activas que los análogos con anillo de pirrolopirimidina: compuestos **1 - 4** vs **17 - 20**.
- ◆ Las quinazolininas y dimetoxiquinazolininas son, así mismo, compuestos inactivos: compuestos **5 - 8**.
- ◆ Las tienopirimidinas son también compuestos inactivos en todos los casos: **9** vs **32** y **10** vs **20**.
- ◆ En general, los derivados de pirrolopirimidina preparados muestran actividades inhibitorias frente a TTBK1 y 2 en el rango sub-micromolar y bajo micromolar

Todo esto indica, por una parte, la importancia de tener anillos fusionados de tipo [6+5] y la presencia en el anillo de cinco eslabones de un átomo dador de enlace de hidrógeno en la posición 7 para la actividad inhibitoria. Esta conclusión puede explicar la falta de actividad de los derivados de quinazolinina y dimetoxiquinazolinina (**5 - 8**) y los derivados de tienopirimidina (**9, 10**). En el caso de la menor actividad observada para los derivados de purina (**1 - 4**), debido a la tautomería en el anillo de imidazol, este hidrógeno puede situarse en la posición 9 del anillo de cinco eslabones, como se puede observar en la Figura 19. Con el programa MarvinSketch (versión 18.10.0 de ChemAxon Ltd.) se ha podido calcular que a pH fisiológico de 7.4, el protón mayoritariamente se encuentra en el nitrógeno 9 (Figura 19a). Esta observación podría explicar la inactividad de los compuestos **1 - 4** ya que en esta forma tautomérica el compuesto pierde la posibilidad de establecer el doble enlace de hidrógeno dador-aceptor con la región bisagra, reduciendo las interacciones con la proteína (Figura 19b). Esto, con respecto a las pirrolopirimidinas que no tienen posibilidad de tautomería, explicaría que las purinas resulten en compuestos inactivos.

Todos estos resultados, confirman que el anillo de pirrolopirimidina es el más activo de estas familias de compuestos y por ello se seleccionó esta estructura heterocíclica, común en otros inhibidores de proteínas quinasa,⁶⁵ como ciclo principal para los siguientes inhibidores de TTBK1.

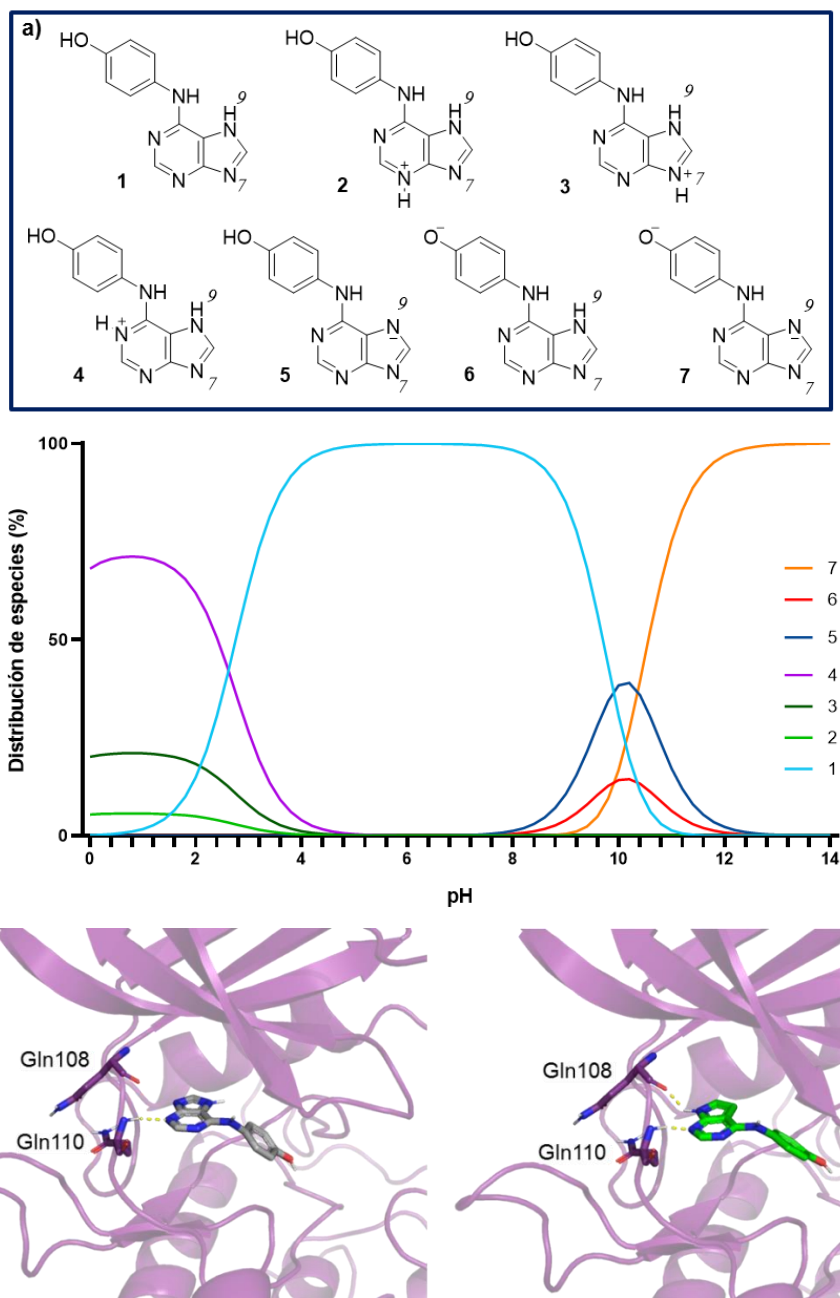


Figura 19. a) Diagrama de distribución de especies del compuesto **2** a distintos valores de pH. b) Posiciones de docking de los compuestos **2** (izda.) y **18** (dcha.) en la cavidad catalítica de TTBK1. Las líneas de guiones amarillos representan los enlaces de hidrógeno.

Respecto a la naturaleza y longitud del conector entre el anillo heterocíclico principal de pirrolopirimidina y el sustituyente aromático se pudo concluir que:

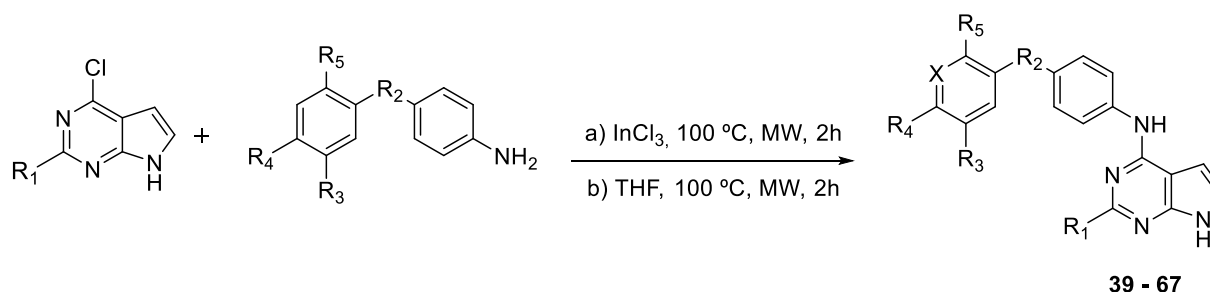
- ◆ Tener un conector de tipo tioéter resulta en compuestos inactivos (**11-16**).
- ◆ Los compuestos con un grupo metileno entre la amina exocíclica y el anillo aromático resultan inactivos **21** vs **20** y **23** vs **18**. Cuando el conector es un etileno, los compuestos

recuperan ligeramente la actividad, resultando menos potentes que sus análogos conectados directamente: **22 vs 20** y **24 vs 18**.

Respecto a la posición de los sustituyentes en el anillo aromático se observó que:

- ◆ Los compuestos con un sustituyente en posición *para*- resultan ser los más activos de sus series seguidos de *meta*- y *orto*- (**20 > 25 > 26** o **18 > 17 > 27**). Esta sustitución es la que tienen los compuestos **33** y **37** que resultan ser los más activos de todos los compuestos sintetizados.

En concreto, el descubrimiento del compuesto **37** llevó a diseñar nuevos derivados de pirrolopirimidinas con dos anillos aromáticos en los que modificar la naturaleza y longitud del conector entre los mismos, así como la sustitución del segundo anillo aromático (Esquema 7). También se apostó por introducir otro grupo amino en la posición 2 del anillo herocíclico principal con el fin de aumentar los contactos con la región bisagra de la quinasa. Siguiendo la misma metodología sintética que para las anteriores pirrolopirimidinas preparadas, se obtuvieron los compuestos del **39 - 67** con los rendimientos indicados en la Tabla 4.



Esquema 7. Síntesis de las pirrolopirimidinas **39 - 67**.

Los compuestos **46** y **63** se obtuvieron a partir de la reducción del grupo nitro de sus correspondientes análogos **45** y **62** utilizando cloruro de estaño (II) como agente reductor (Esquema 8).⁹⁶

⁹⁶ Garcia, A. M.; Brea, J.; Morales-Garcia, J. A.; Perez, D. I.; Gonzalez, A.; Alonso-Gil, S.; Gracia-Rubio, I.; Ros-Simo, C.; Conde, S.; Cadavid, M. I.; Loza, M. I.; Perez-Castillo, A.; Valverde, O.; Martinez, A.; Gil, C. Modulation of cAMP-specific PDE without emetogenic activity: New sulfide-like PDE7 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (20), 8590-8607.

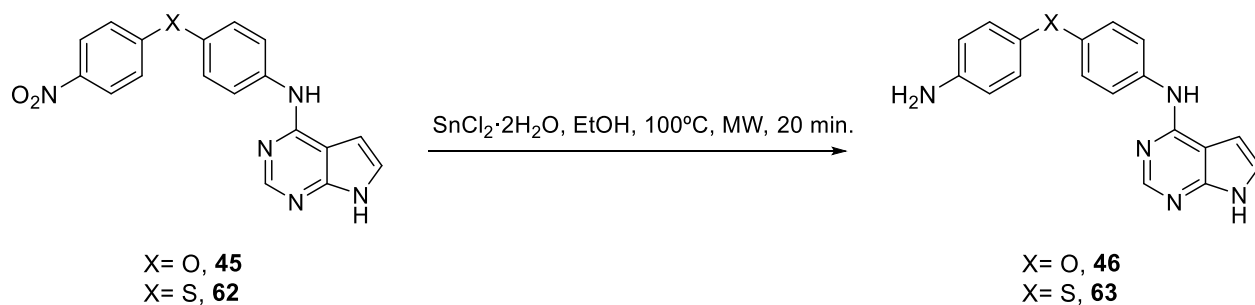

 Esquema 8. Síntesis de las pirrolopirimidinas **46** y **63**.

 Tabla 4. Rendimientos obtenidos y sustituyentes de las pirrolopirimidinas **39** - **67**.

Comp.	X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Rendimiento (%)
39	CH	H	-O-	H	Cl	H	62
40	CH	H	-O-	H	F	H	40
41	CH	H	-O-	H	CN	H	6
42	CH	H	-O-	H	OMe	H	63
43	CH	H	-O-	H	CF ₃	H	74
44	CH	H	-O-	H	Br	H	83
45	CH	H	-O-	H	NO ₂	H	83
46	CH	H	-O-	H	NH ₂	H	9
47	CH	H	-O-	H	Me	H	57
48	CH	H	-O-	Me	H	H	80
49	CH	H	-O-	Cl	H	H	62
50	CH	H	-O-	F	H	H	57
51	CH	H	-O-	CF ₃	H	H	78
52	CH	H	-O-	OMe	H	H	33
53	CH	H	-O-	H	H	Cl	79
54	CH	H	-O-	H	H	F	61
55	CH	H	-O-	H	H	OMe	64
56	CH	H	-O-	H	Cl	Cl	63
57	N	H	-O-	H	H	H	35
58	CH	NH ₂	-O-	H	Cl	H	70
59	CH	NH ₂	-O-	H	CF ₃	H	74
60	CH	NH ₂	-O-	Cl	H	H	93

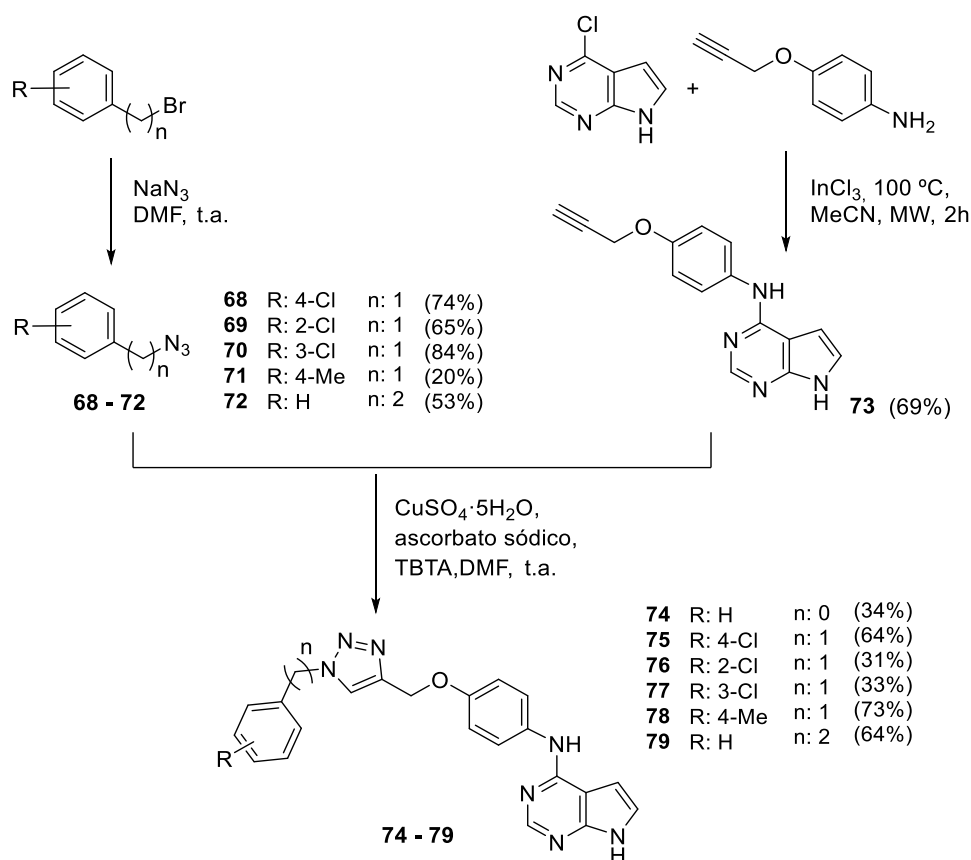
Tabla 4 (continuación). Rendimientos obtenidos y sustituyentes de las pirrolopirimidinas **39 – 67**.

Comp.	X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Rendimiento (%)
61	CH	NH ₂	-O-	CF ₃	H	H	45
62	CH	H	-S-	H	NO ₂	H	42
63	CH	H	-S-	H	NH ₂	H	69
64	CH	H	-OCH ₂ -	H	H	H	28
65	CH	H	-CO-	H	H	H	97
66	CH	H	-CO-	H	F	H	19
67	CH	H	-CO-	Cl	Cl	H	35

Por último, se exploró la posibilidad sintetizar compuestos con una estructura más extendida utilizando química click catalizada por cobre para obtener triazoles a partir de alquinos y azidas.⁹⁷ En primer lugar, se obtuvo el alquino **73** a través de una S_NAr catalizada por InCl₃ y este compuesto se hizo reaccionar con distintas azidas obtenidas a partir de la reacción de distintos bencil o fenetil bromuros con azida sódica (Esquema 9). Para la reacción de cicloadición del alquino y la azida se utilizó sulfato de cobre (II) como catalizador y L-ascorbato sódico como agente reductor y tris(benciltriazolilmetil)amina (TBTA) como ligando. Este compuesto es un ligando complejante y estabilizador de las especies de Cu (I) utilizado habitualmente para evitar la oxidación del mismo y aumentar su actividad catalítica.⁹⁸ Dado que el alquino **73** presenta varios átomos de nitrógeno que podrían complejar el cobre y por lo tanto, reducir la disponibilidad del compuesto en la reacción, se utilizó la TBTA como ligando auxiliar. Aun así, la síntesis de los triazoles **74 - 79** se produjo con unos rendimientos de bajos a moderados (Esquema 9).

⁹⁷ Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28* (2), 278-308.

⁹⁸ Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2853-2855.


 Esquema 9. Síntesis de las azidas **68 - 72** y las pirrolopirimidinas **73 - 79**.

Tras la síntesis de esta nueva familia de compuestos, su capacidad inhibitoria se evaluó en la MRC Phosphorylation Unit de la Universidad de Dundee de la misma manera que los compuestos anteriores, dando lugar a los valores de inhibición enzimática recogidos en la Tabla 5.

Tabla 5. Evaluación enzimática de la inhibición frente a TTBK1 y TTBK2 de los derivados sintetizados.

Comp.	TTBK1 Cl ₅₀ (μM)	TTBK2 Cl ₅₀ (μM) o % inh a 10 μM	Índice selectividad	Comp.	TTBK1 Cl ₅₀ (μM)	TTBK2 Cl ₅₀ (μM) o % inh a 10 μM	Índice selectividad
39	0.24	4.22	0.05	57	0.75	6.05	0.12
40	0.77	3.02	0.25	58	0.45	2.70	0.16
41	0.44	2.14	0.20	59	0.58	4.49	0.13
42	0.54	0.97	0.55	60	0.37	3.05	0.12

Tabla 5 (continuación). Evaluación enzimática de la inhibición frente a TTBK1 y TTBK2 de los derivados sintetizados.

Comp.	TTBK1 Cl ₅₀ (μM)	TTBK2 Cl ₅₀ (μM) o % inh a 10 μM	Índice selectividad	Comp.	TTBK1 Cl ₅₀ (μM)	TTBK2 Cl ₅₀ (μM) o % inh a 10 μM	Índice selectividad
43	5.03	5%	0.06	61	1.32	3.90	0.33
44	0.75	1.21	0.61	62	2.72	22.72	0.11
45	0.42	1.24	0.33	63	0.65	4.94	0.13
46	0.52	4.90	0.10	64	0.75	1.21	0.61
47	1.02	8.79	0.11	65	1.71	11.92	0.14
48	2.20	6.40	0.34	66	1.50	5.40	0.27
49	1.55	1%	0.02	67	9%	-	-
50	0.59	3.06	0.19	74	29%	1%	-
51	5.61	1%	0.06	75	0.61	2.87	0.21
52	0.84	6.79	0.12	76	0.36	2.75	0.13
53	0.53	0.49	1.08	77	0.48	2.03	0.24
54	0.73	2.35	0.31	78	0.99	1.75	0.57
55	3.56	9.54	0.37	79	0.39	2.61	0.15
56	2.30	5.72	0.40				

Analizando la estructura química y los resultados de actividad enzimática de esta segunda subfamilia de compuestos se pudieron extraer distintas conclusiones:

- ◆ La presencia de un grupo amino en la posición 2 del anillo de pirrolopirimidina da lugar a compuestos igual o más activos en TTBK1 pero menos selectivos respecto a TTBK2 (**58 - 61 vs 39, 43, 49, 51**).
- ◆ El conector entre grupos aromáticos que da lugar a compuestos más activos es el éter, seguido del tioéter y por último el carbonilo.
- ◆ Respecto a la posición y naturaleza de los sustituyentes de los anillos aromáticos, los diferentes factores electrónicos y estéricos de los distintos sustituyentes presentes, pueden explicar las actividades obtenidas. Los compuestos más selectivos resultaron ser

39, 43, 49 y 51, cuyos sustituyentes son cloro o trifluorometilo en posiciones *meta*- o *para*-, siendo el compuesto 39 el más activo y selectivo de todos los sintetizados.

- ◆ Los compuestos con un triazol son bastante activos para TTBK1 y algunos de ellos bastante selectivos (véase 76 o 79).

2.2 Estudio estructural de los compuestos con TTBK1 y TTBK2

2.2.1 Expresión, purificación y co-cristalización de TTBK1 y TTBK2 con compuestos seleccionados

La determinación de la estructura tridimensional de los complejos ligando-proteína resulta una estrategia de elevada utilidad tanto para conocer las interacciones fundamentales que determinan la capacidad inhibitoria de los compuestos como para mejorar el diseño de estos, extendiendo la red de interacciones ligando-proteína.⁹⁹ Para ello, es necesaria la expresión de proteínas recombinantes que nos permiten obtener grandes cantidades de proteína mediante técnicas de ingeniería genética y cultivo celular. Para realizar este proceso se siguen distintos pasos:

- ◆ Construcción del vector genético con la secuencia que codifica la proteína de interés.
- ◆ Transfección de las células con dicho vector.
- ◆ Inducción de la expresión proteica utilizando la maquinaria celular de la célula huésped.
- ◆ Lisado celular, extracción y purificación de la proteína de interés.

Tabla 6. Ventajas, inconvenientes y ejemplos de los principales sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

	LEVADURA	BACTERIA	INSECTO	MAMÍFERO
✓	<ul style="list-style-type: none"> • Modificaciones postraduccionales • Bajo coste • Rápida expresión • Proceso escalable • Proteínas secretadas e intracelulares 	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil manipulación • Bajo coste • Rápida expresión • Proceso escalable 	<ul style="list-style-type: none"> • Modificaciones postraduccionales • Rapidez relativa • Libre de endotoxinas • Alto nivel de secreción • Purificación sencilla 	<ul style="list-style-type: none"> • Amplio abanico de modificaciones postraduccionales • Correcto plegamiento proteico • Libre de endotoxinas • Apropriado para proteínas bioactivas
✗	<ul style="list-style-type: none"> • Glicosilación incorrecta o excesiva 	<ul style="list-style-type: none"> • Sin modificaciones postraduccionales • Formación de cuerpos de inclusión • Bajo rendimiento en proteínas eucariotas • Dificultad para expresar proteínas de alto PM 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempos de producción largos • Mayor coste de medios de cultivo • Generación del baculovirus lenta • Glicosilación ligeramente distinta 	<ul style="list-style-type: none"> • Glicosilación incorrecta o excesiva • Alto coste producción • Mayor tiempo de producción • Rendimiento relativamente bajo
EJEMPLOS				
	<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia pastoris</i></p>	<p><i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i></p>	<p><i>Spodoptera frugiperda (Sf9)</i> <i>Trichoplusia ni (HI5)</i></p>	<p><i>Chinese hamster ovarias (CHO)</i> <i>Human embryonic kidney (HEK293)</i></p>

⁹⁹ Anderson, A. C. The process of structure-based drug design. *Chem. Biol.* **2003**, *10* (9), 787-797.

En la expresión de proteínas humanas tradicionalmente se utilizan distintas líneas celulares de diferentes orígenes y niveles de complejidad: levaduras, bacterias, células de insecto o células humanas (Tabla 6).

Durante la presente tesis doctoral, se realizó una estancia internacional en el Sincrotrón Elettra (Trieste, Italia) bajo la supervisión de la Dra. Paola Storici, cuyo objetivo fue la expresión, purificación y cristalización de la quinasa GSK3 β . En este caso el sistema elegido para la expresión fueron las células de insecto, ya que habían dado resultados satisfactorios con anterioridad para la producción de esta quinasa.¹⁰⁰ En este sistema, es necesaria la creación de un baculovirus para infectar las células de insecto.¹⁰¹ Además, se estudiaron diferentes condiciones para obtener el mayor rendimiento en expresión de GSK3 β variando parámetros tales como el tiempo de crecimiento de las colonias, la temperatura o el ratio de baculovirus inoculado. Tras la expresión, lisado y purificación, se consiguió obtener la cantidad de proteína necesaria para realizar distintos ensayos de co-cristalización y *soaking* con ligandos del grupo de investigación que finalmente dieron lugar a cristales.

En este punto, se realizó una segunda estancia de investigación en el laboratorio del Prof. Juan Hermoso, en el Instituto de Química Física Rocasolano (IQFR-CSIC) para optimizar los cristales que posteriormente se difractaron en el Sincrotrón ALBA (Cerdanola del Valles, Barcelona). A pesar de los múltiples intentos realizados, los cristales obtenidos no mostraron los ligandos de interés unidos a los distintos bolsillos de GSK3 β cómo se puede ver en las estructuras finales representadas en la Figura 20.

Sin embargo, esta estancia de investigación permitió obtener gran experiencia y soltura tanto en el proceso de producción y purificación de proteínas como en la posterior determinación estructural a partir de datos de difracción de rayos X. Así, se planteó como objetivo de este capítulo la producción y co-cristalización del dominio quinasa de TTBK1 con los compuestos sintetizados.

¹⁰⁰ Redenti, S.; Marcovich, I.; De Vita, T.; Perez, C.; De Zorzi, R.; Demitri, N.; Perez, D. I.; Bottegoni, G.; Bisignano, P.; Bissaro, M.; Moro, S.; Martinez, A.; Storici, P.; Spalluto, G.; Cavalli, A.; Federico, S. A triazolotriazine-based dual GSK-3 β /CK-1 δ ligand as a potential neuroprotective agent presenting two different mechanisms of enzymatic inhibition. *ChemMedChem* **2019**, *14* (3), 310-314.

¹⁰¹ Kost, T. A.; Condreay, J. P.; Jarvis, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (5), 567-575.

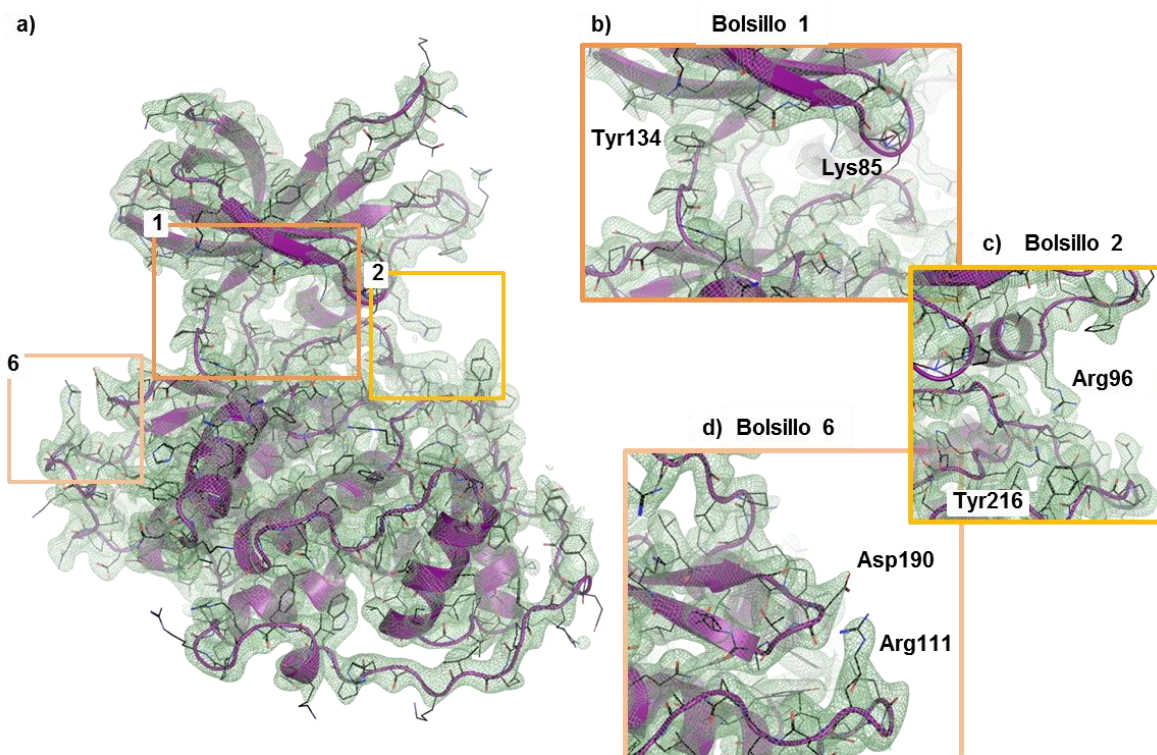


Figura 20. a) Mapa de densidad electrónica de GSK3 β de uno de los cristales obtenidos y difractados con rayos X donde no se observa densidad electrónica de ninguno de los ligandos con los que se cristalizó la proteína, b) Detalle del bolsillo 1, c) Detalle del bolsillo 2, d) Detalle del bolsillo 6.

Para la expresión del dominio quinasa de TTBK1, se trabajó bajo la supervisión del Dr. Daniel Lietha, del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB-CSIC). El sistema de expresión elegido que en este caso fueron las bacterias siguiendo la metodología descrita en la literatura.⁹⁰ A pesar de que en algunos casos las proteínas quinasa pueden encontrarse en los cuerpos de inclusión para evitar la toxicidad que crean en las bacterias, éstas son un sistema de expresión de proteínas recombinantes muy útil debido al bajo coste de los medios de cultivo y la rapidez en la expresión.¹⁰² Así, se llevó a cabo la expresión, purificación y cristalización del dominio quinasa de TTBK1 con el compuesto **39**.

Por otro lado, la colaboración con el Prof. Stefan Knapp (Universidad de Frankfurt) permitió obtener complejos de los compuestos **33** y **53** con TTBK1 y **37**, **42** y **53** con TTBK2.

La cepa de bacteria *Escherichia coli* BL21(DE3) fue la elegida para expresar el dominio quinasa de TTBK1 en el CIB, comprendido entre los aminoácidos 14-313. Las células BL21(DE3) se

¹⁰² Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front. Microbiol.* **2014** 5, 172.

transformaron añadiendo el plásmido que contenía un gen que codificaba para TTBK1 y para un gen de resistencia a la canamicina. Las bacterias se sembraron en una placa Petri con agar y canamicina, para seleccionar las colonias resistentes a ese antibiótico y por tanto portadoras de la quinasa de interés.¹⁰³ Al día siguiente, tras el crecimiento de las colonias, se seleccionó una colonia aislada que se expandió en un matraz Erlenmeyer de 50 mL con medio de lisogenia toda la noche a 37 °C. Una vez realizada la pre-expansión, el cultivo se creció en volúmenes de 1 L a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.8, momento en el que se indujo la expresión de la proteína por la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), dejando el cultivo a 20 °C durante toda la noche.

Tras esto, el cultivo se recogió, centrifugó y el pellet de células se resuspendió en un tampón de lisis. Las células se lisaron mediante sonicación a 0 °C para evitar la desnaturalización de las proteínas. Posteriormente, la mezcla se filtró para eliminar las membranas celulares, el ADN y otras impurezas. La purificación del lisado se realizó en tres pasos:

- ◆ Primero se realizó una cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC), utilizando una columna de nanopartículas de agarosa con grupos quelantes de níquel. Esta metodología permite retener selectivamente la quinasa de interés, a través de la cola de histidinas expresada en el extremo N-terminal de la secuencia proteica del vector de GenScript (hTTBK_coli_pET-28a(+)-TEV) que se une a los grupos de níquel quelantes.¹⁰⁴ Después se eluyó con un tampón de imidazol, que compite en afinidad con las histidinas, desplazando estas y permitiendo recoger fracciones de la proteína de interés.
- ◆ Posteriormente se realizó una cromatografía de intercambio iónico (IEC) que separa las proteínas de acuerdo con la fuerza de sus interacciones totales con grupos cargados positiva o negativamente en una resina. En este caso, debido al pH del tampón que contenía la quinasa (pH 8) se utilizó una columna de intercambio catiónico. De la misma manera que antes, la proteína se eluye a medida que se va aumentando la fuerza iónica del tampón que compite con la proteína y permite recoger distintas fracciones de proteína pura.¹⁰⁵

¹⁰³ Kholod, N.; Mustelin, T. Novel vectors for co-expression of two proteins in *E. coli*. *Biotechniques*. **2001**, *31* (2), 322-323, 326-328.

¹⁰⁴ Kim, Y.; Babnigg, G.; Jedrzejczak, R.; Eschenfeldt, W. H.; Li, H.; Maltseva, N.; Hatzos-Skintges, C.; Gu, M.; Makowska-Grzyska, M.; Wu, R.; An, H.; Chhor, G.; Joachimiak, A. High-throughput protein purification and quality assessment for crystallization. *Methods* **2011**, *55* (1), 12-28.

¹⁰⁵ Kosanovic, M.; Milutinovic, B.; Goc, S.; Mitic, N.; Jankovic, M. Ion-exchange chromatography purification of extracellular vesicles. *Biotechniques*. **2017**, *63* (2), 65-71.

- ◆ Por último, se realizó una cromatografía de exclusión molecular (SEC) también llamada filtración en gel, que separa las moléculas en función de su tamaño molecular. En este caso, las proteínas van eluyendo de la columna según su tamaño molecular y el tampón utilizado sirve para disolver la proteína sin interferir en su interacción con la columna. Este paso también se utiliza para cambiar el tampón en el cual se almacena finalmente la proteína de interés.

Todas estas operaciones nos permitieron obtener la proteína pura, cuyas fracciones se reunieron y concentraron a 9.6 mg/mL para ser finalmente alicuotadas y conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización en los ensayos de cristalización (Figura 21).

A menudo, la cola de histidinas, secuencia de 28 aa en el extremo N-terminal con fragmento de reconocimiento de proteasa que nos permite purificar la proteína, se elimina mediante la digestión de la fracción obtenida tras la IMAC con la proteasa del tabaco. En nuestro caso, se procedió de dos maneras paralelas, en una fracción se dejó la cola de histidinas, ya que no tiene por qué influir en la cristalización, y en la otra fracción se procedió a digerir la proteína con la proteasa. Tras esta digestión se observó un fuerte precipitado identificado por electroforesis en gel como TTBK1, perdiendo así la mayoría de cantidad de proteína soluble en esta segunda fracción.

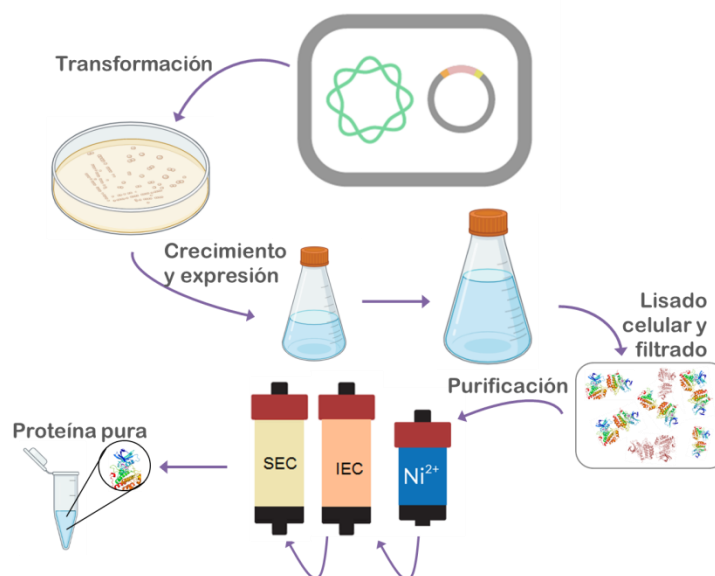


Figura 21. Esquema del procedimiento de expresión y purificación de proteínas llevado a cabo.

Por lo tanto, se continuó con los experimentos de cristalización con la primera fracción que contenía la cola de histidinas unida al dominio quinasa de TTBK1.

Para la obtención de cristales de los complejos ligando-proteína es necesario el establecimiento de un equilibrio que permita que las moléculas de proteína se ordenen de modo natural en una red repetitiva denominada cristal. De entre las distintas técnicas de cristalización disponibles, en esta tesis doctoral se realizó la mezcla de nuestras alícuotas de proteína preincubadas con el compuesto **39** con distintas soluciones precipitantes. Esta mezcla produce una disminución de la solubilidad de la proteína provocando una precipitación controlada de la misma, que en condiciones estables genera pequeños núcleos cristalinos cuyo crecimiento paulatino puede dar lugar a cristales de tamaño adecuado para la difracción de rayos X.¹⁰⁶

Para los experimentos de cristalización es necesario probar distintas soluciones y mezclas de sustancias precipitantes y disponer una gota de entre 0.1-1 μL de proteína en disolución enfrentándola a la solución precipitante. Esta gota puede disponerse como “gota colgante” (*hanging drop*), más habitual en técnicas de cribado manual o “gota sentada” (*sitting drop*), característico de técnicas de cristalización robotizadas. En nuestro caso, comenzamos los distintos experimentos de cristalización partiendo de las condiciones reportadas en la bibliografía para otros cristales de TTBK1 y variando ligeramente el pH del tampón así como el porcentaje del agente precipitante.^{88,90} Estos experimentos permitieron obtener cristales de un tamaño adecuado y forma de plato cuadrado al cabo de una semana mediante la metodología de gota colgante. Los mejores cristales aparecieron en el pocillo con el siguiente contenido: 27% (p/v) polietilenglicol 4 000, 200 mM sulfato amónico, 100 mM citrato sódico pH 5.6 y 10 mM tris(2-carboxietil)fosfina. Los cristales fueron recogidos y criogenizados en una solución con la composición del pocillo + 20% etilenglicol para proceder a su difracción de rayos X en el Sincrotrón ALBA.

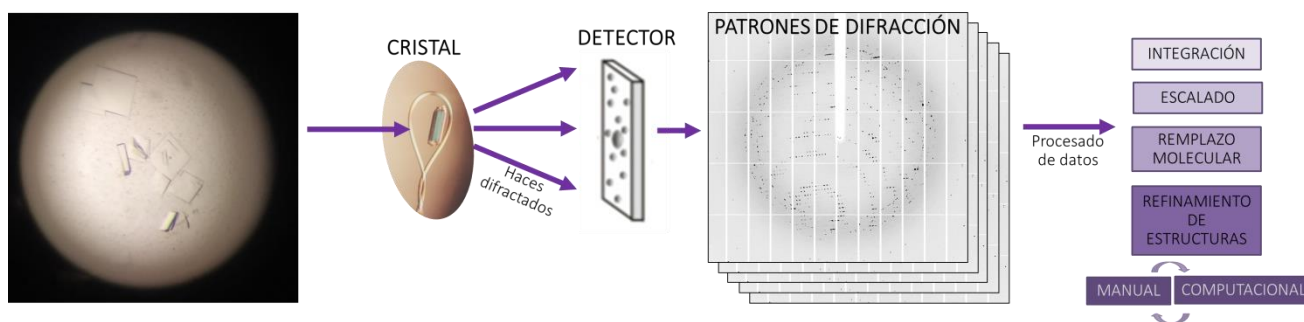


Figura 22. Cristales obtenidos del complejo TTBK1-**39**, y proceso de recogida y procesado de datos de difracción de rayos X.

¹⁰⁶ McPherson, A.; Gavira, J. A. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* **2014**, *70* (Pt 1), 2-20.

Tras la recolección de datos en los distintos patrones de difracción de rayos X, éstos se procesaron en varias fases: integrado de las reflexiones utilizando el programa XDS, escalado de los datos con Aimless, reemplazo molecular con Phaser y distintos ciclos de refinamiento tanto manual como computacional utilizando RefMac y Coot (Figura 22).

Así, se obtuvo la estructura tridimensional del complejo TTBK1-**39** que se muestra en la Figura 23. El compuesto **39** establece dos enlaces de hidrógeno con los residuos Gln108 y Gln110 de la región bisagra y además la sustitución del segundo anillo aromático con un átomo de cloro en posición *para*- permite llegar a establecer un enlace de halógeno con la Arg119, pudiendo esto contribuir a la elevada afinidad del compuesto (Figura 23b).

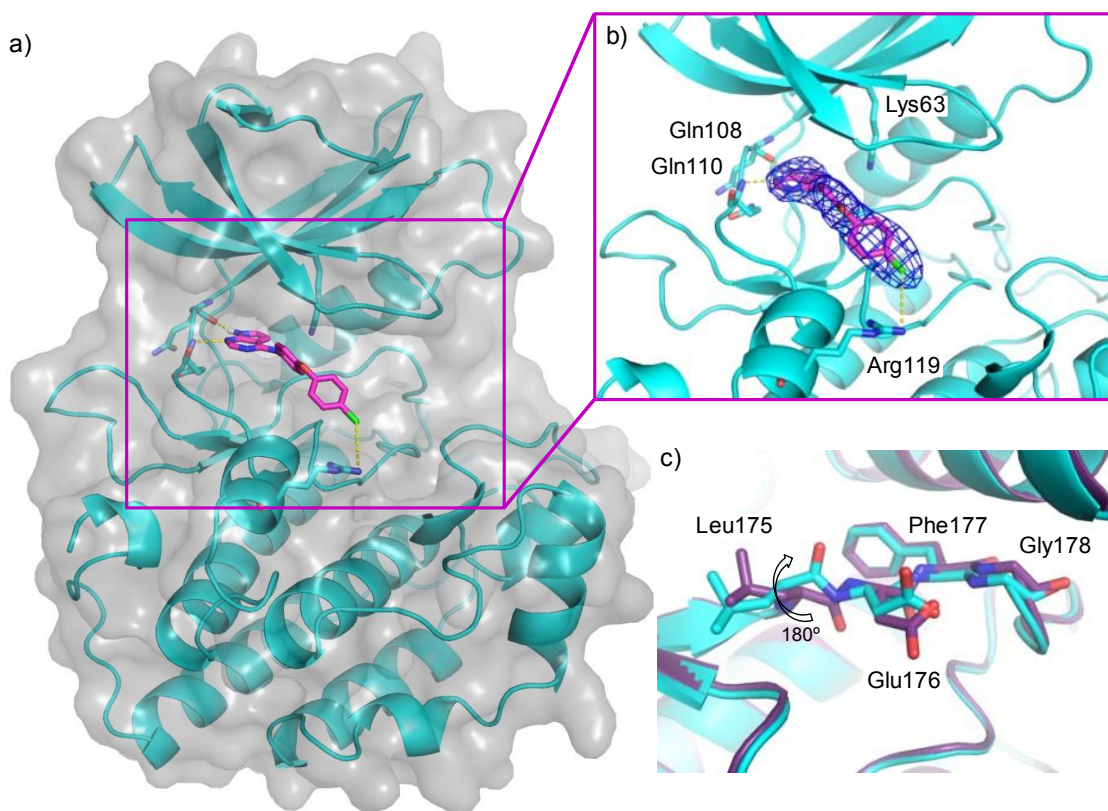


Figura 23. Estructura del complejo obtenido por cristalización de rayos X con el dominio quinasa de TTBK1 y el compuesto **39**. b) Detalle del modo de unión y densidad electrónica observada para el compuesto **39**. c) Detalle del giro del carbonilo del residuo Leu175 (TTBK1) previo al motivo DFG, comparado con la quinasa unida al ATP (morado, código PDB: 4NFN). Los enlaces de hidrógeno están señalados con líneas discontinuas amarillas. Código PDB: 7QHW

De manera similar se obtuvieron las estructuras de los complejos TTBK1-**33** (Figura 24a), TTBK1-**53** (Figura 24b), TTBK2-**37**, TTBK2-**42** y TTBK2-**53**, recogidas en la Figura 25.

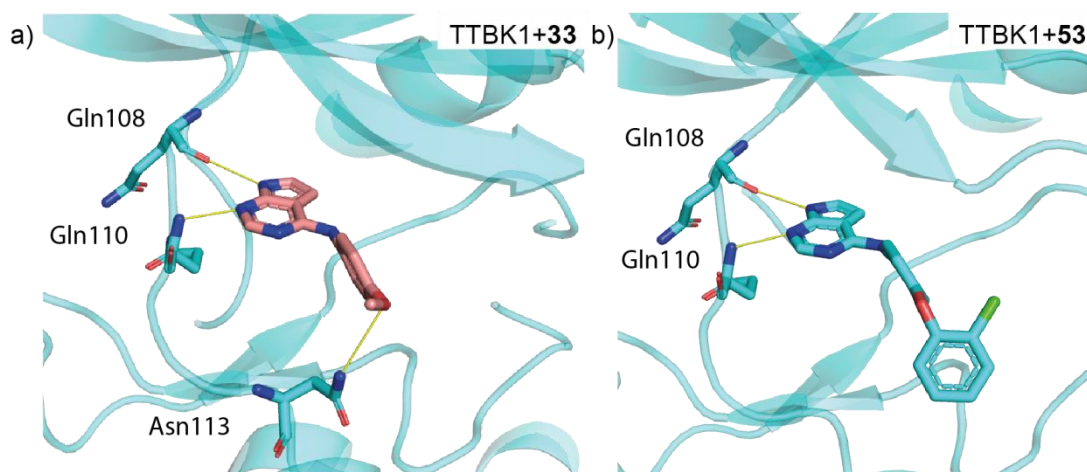


Figura 24. Detalle de los modos de unión de los compuestos **33** (a) y **53** (b) con el dominio quinasa de TTBK1. Los enlaces de hidrógeno están señalados con líneas amarillas. Códigos PDB: 7Q8W, 7Q8V

Todas las estructuras mostraron que los compuestos sintetizados se unían en la región bisagra de las quinasas, donde también se une el ATP, estableciendo un doble enlace de hidrógeno dador-aceptor con los residuos Gln108 y Gln110 (TTBK1)/ Gln95 y Gln97 (TTBK2). Además, los anillos aromáticos unidos al grupo amino exocíclico de los compuestos cristalizados se disponían hacia la entrada del bolsillo frontal de la proteína y no se orientaban hacia las lisinas catalíticas.

Por otro lado, se observó un giro de 180° en el carbonilo del residuo Leu175 anterior al motivo DFG, respecto a la estructura cristalizada con ATP. Este giro también se observó para la isoforma 2, en la que la presencia de moléculas de agua, observadas gracias a la alta resolución del cristal (1.6Å), permite establecer enlaces de hidrógeno mediados por agua entre el grupo amino exocíclico y el residuo Leu162 previo al motivo DFG (Figura 25a,b,c). Todos los compuestos son inhibidores de tipo I, ya que en estos modos de unión observados el motivo DFG está hacia dentro. La región DFG se ha demostrado como una región muy plástica cuya disposición puede condicionar la selectividad de distintos compuestos. Además esta rotación en el carbonilo del esqueleto de la proteína se ha observado en otras quinasas, lo que permite que los inhibidores se acomoden en una región específica del bolsillo trasero de la proteína que podría conferir mayor selectividad y potencia a estos inhibidores.^{107,65}

¹⁰⁷ Young, M. A.; Shah, N. P.; Chao, L. H.; Seeliger, M.; Milanov, Z. V.; Biggs, W. H., 3rd; Treiber, D. K.; Patel, H. K.; Zarrinkar, P. P.; Lockhart, D. J.; Sawyers, C. L.; Kuriyan, J. Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutant in complex with the Aurora kinase inhibitor VX-680. *Cancer Res.* **2006**, *66* (2), 1007-1014.

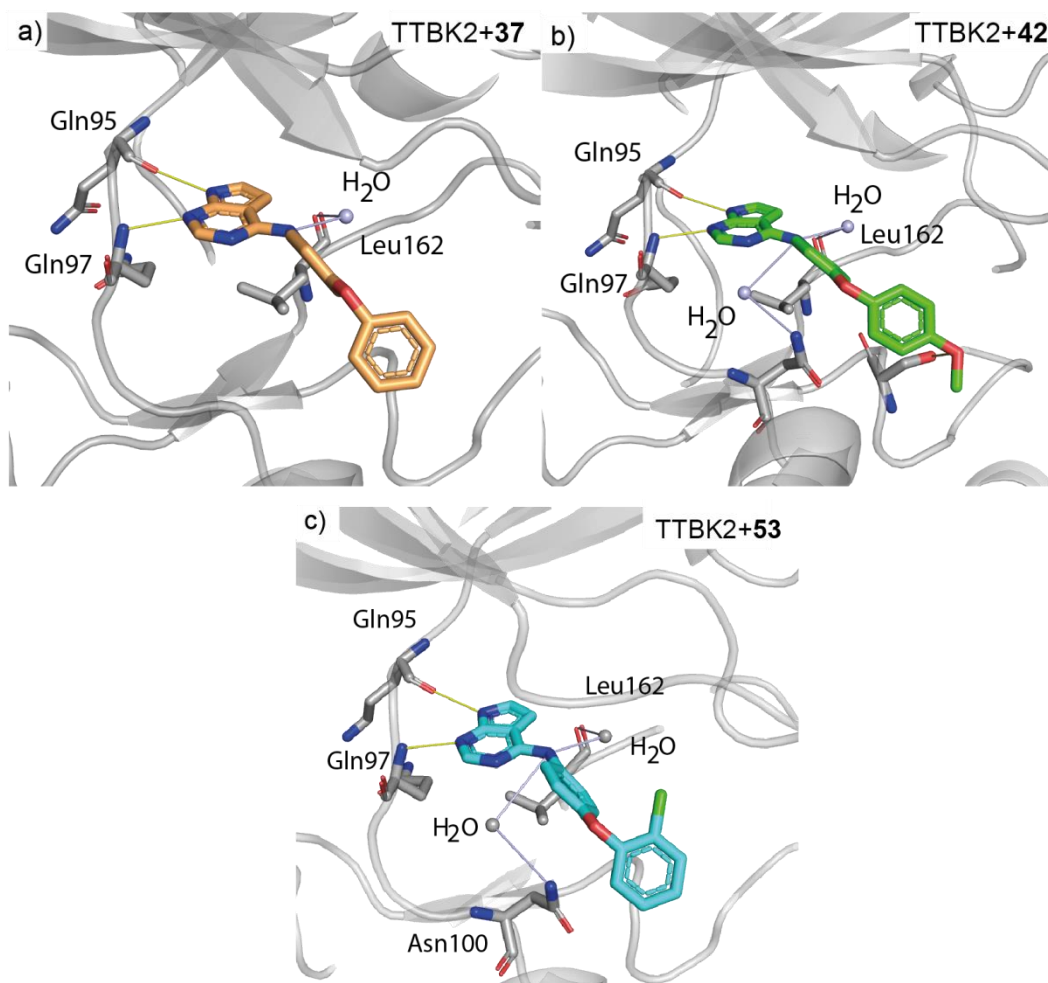


Figura 25. Detalle del modo de unión de los compuestos **37** (a), **42** (b) y **53** (c) con TTBK2 en la región bisagra de la proteína. Los enlaces de hidrógeno están señalados con líneas amarillas y los mediados por agua con líneas azules. Códigos PDB: 7Q8Z, 7Q90, 7Q8Y.

La comparación entre los complejos obtenidos para TTBK1-**53** y TTBK2-**53** (Figura 25d), nos permitió observar que la mayor diferencia estructural se encuentra en el loop de glicinas, justo encima del sitio de unión al ATP. Para la isoforma 2, el loop de glicinas comprendido entre los aa 41-46, estaba desplazado hasta 5.5Å, algo que podría estar motivado por el empaquetamiento cristalino de la proteína y no por la unión con el ligando.

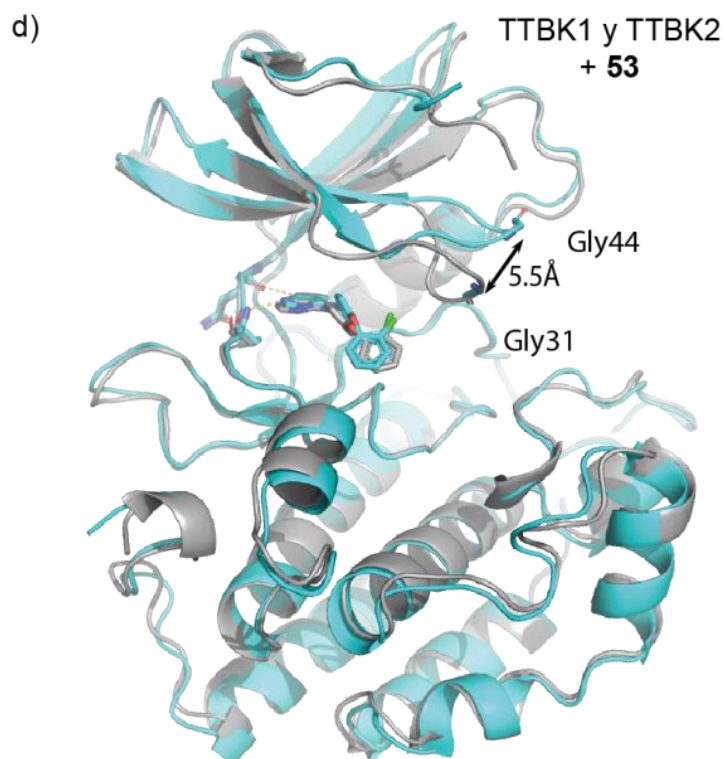


Figura 25(continuación) d) Superposición de las estructuras de TTBK1 (azul) y TTBK2 (gris) unidas al compuesto **53**. Los enlaces de hidrógeno están señalados con líneas amarillas.

Los estudios cristalográficos realizados y las estructuras obtenidas mostraron que la selectividad de los compuestos no parece deberse a interacciones electrostáticas con determinados aminoácidos de la cavidad catalítica de las enzimas, y por lo tanto, esta selectividad se debería estudiar con métodos computacionales que permiten analizar la unión enzima-ligando de manera dinámica.¹⁰⁸

2.2.2 Estudio del modo de unión con métodos computacionales

A la luz de los datos estructurales obtenidos mediante cristalografía y difracción de rayos X, se llevaron a cabo estudios computacionales para poder explicar la selectividad de alguno de los compuestos obtenidos. Con la colaboración del Dr. David Ramírez (Universidad de Concepción, Chile) se estudió el comportamiento dinámico en la unión de los compuestos **39** (TTBK1 Cl_{50} : 0.24 μ M, TTBK2 Cl_{50} : 4.22 μ M), **49** (TTBK1 Cl_{50} : 1.55 μ M, TTBK2 inhibición 1%) y **53** (TTBK1 Cl_{50} : 0.53 μ M, TTBK2 Cl_{50} : 0.49 μ M).

¹⁰⁸ Liu, K.; Watanabe, E.; Kokubo, H. Exploring the stability of ligand binding modes to proteins by molecular dynamics simulations. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **2017**, *31* (2), 201-211.

Así, se realizaron estudios de dinámica molecular (DM) de los compuestos **39**, **49** y **53** con TTBK1 y TTBK2. Se ejecutaron DM de 500 ns, partiendo de las estructuras cristalográficas en todos los casos posibles, y de las posiciones de los estudios de *docking* para los demás compuestos. Tras la ejecución de las dinámicas y su posterior análisis, se calcularon diferentes valores como la fluctuación media de los átomos (RMSF) (Figura 26) y la desviación media de los compuestos (RMSD) dentro del sitio activo (Figura 27).

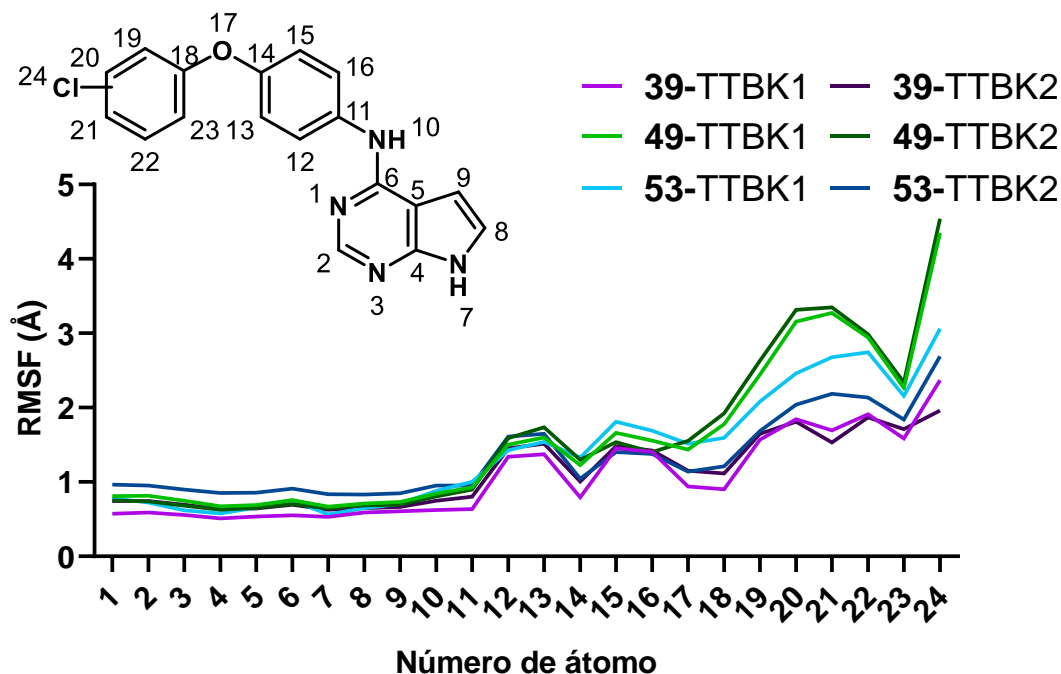


Figura 26. Gráfico que muestra la fluctuación media (RMSF) de los átomos de cada compuesto a lo largo de la DM.

Como se puede ver en la Figura 26, el anillo de pirrolopirimidina (átomos 1-9) se encuentra estable en la cavidad catalítica y es el segundo anillo aromático, que contiene el átomo de cloro (átomos 18-24), el que muestra mayor fluctuación. Para el caso del átomo de cloro del compuesto **49** se obtuvieron valores de RMSF de hasta 4.5 Å, que duplican los valores obtenidos para los otros compuestos, lo que indica la alta movilidad de este segundo anillo aromático.

Este comportamiento más inestable se puede confirmar observando los valores de RMSD de los ligandos comparados con la proteína (Figura 27). Para el compuesto **49**, la gráfica muestra una mayor movilidad respecto a sus análogos, comparando tanto el valor de RMSD medio (4.75 ± 0.86 Å), como su valor de RMSD máximo (7.5 Å), muy por encima de los compuestos **39** y **53**. Éstos se

mantienen más estables en la zona de unión del ATP a lo largo de toda la dinámica puesto que sus valores de RMSD se encuentran comprendidos entre 2.00 y 2.54 Å.

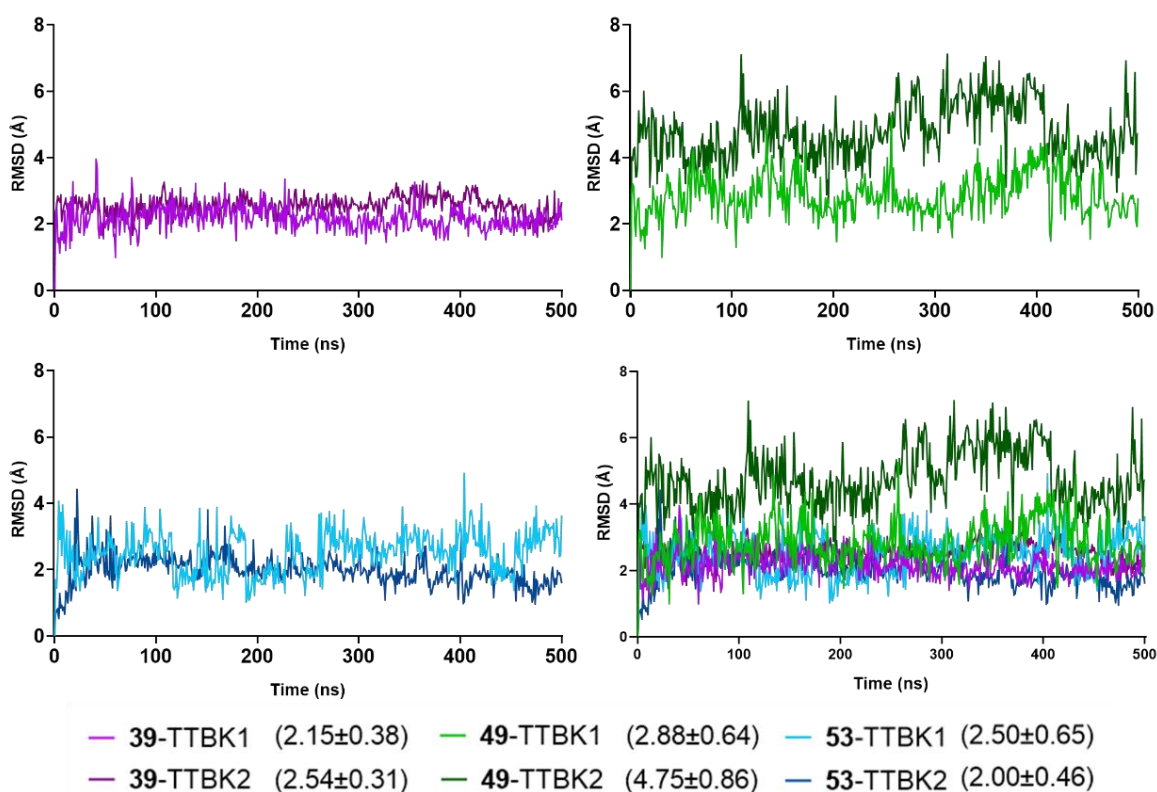


Figura 27. Gráficos que muestran la RMSD de los compuestos estudiados mediante DM.

A continuación, para poder visualizar el movimiento de los compuestos en la cavidad catalítica observado tanto en los gráficos de RMSF como de RMSD, se agruparon las trayectorias de los compuestos respecto al valor de RMSD (Figura 28). En las figuras se muestran en el panel de la izquierda el dominio quinasa de TTBK1 (azul) o TTBK2 (gris), en el panel central una ampliación de la pose obtenida mediante *docking* o cristalografía y en el panel derecho los agrupamientos o *cluster* obtenidos tras la DM en base a los valores de RMSD del ligando.

Para el compuesto **39**, los *cluster* permiten confirmar y visualizar lo observado en los gráficos de RMSF y RMSD: el ligando se mantiene estable a lo largo de la DM en el centro activo (Figura 28 a y b).

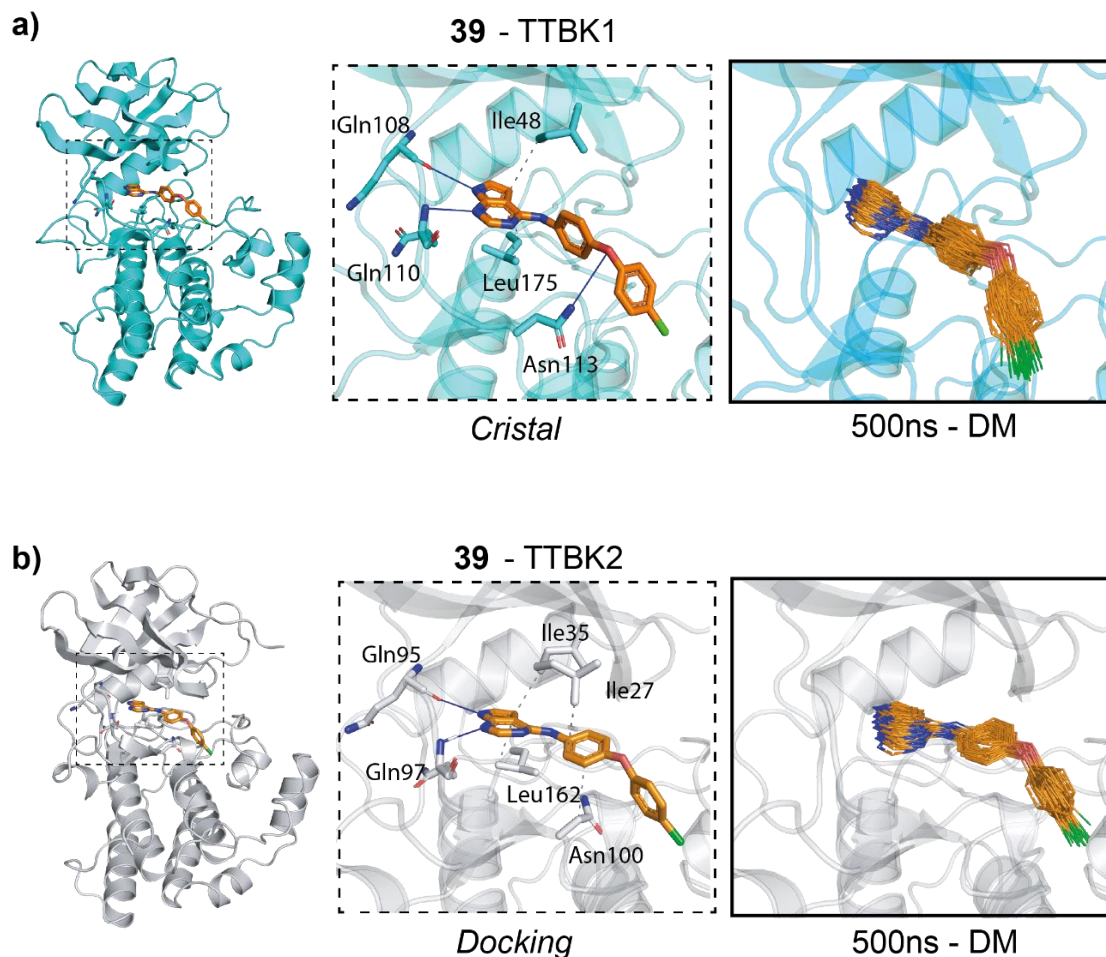


Figura 28. Estudio de dinámica molecular de los compuestos **39** con (a) y TTBK2 (b). El panel medio muestra una ampliación de los cristales o *docking* de cada compuesto y el panel derecho los agrupamientos (cluster) obtenidos de la DM. Los enlaces de hidrógeno están señalados con líneas azules y las interacciones hidrofóbicas con líneas discontinuas grises.

Analizando los agrupamientos obtenidos para el compuesto **49**, se observa que tiene una alta movilidad en la cavidad catalítica, puesto que se obtienen dos cluster diferentes para la interacción con ambas isoformas (Figura 28 c y d). El segundo anillo aromático tiene dos posiciones muy diferenciadas: una hacia el interior de la cavidad catalítica y otra hacia el exterior.

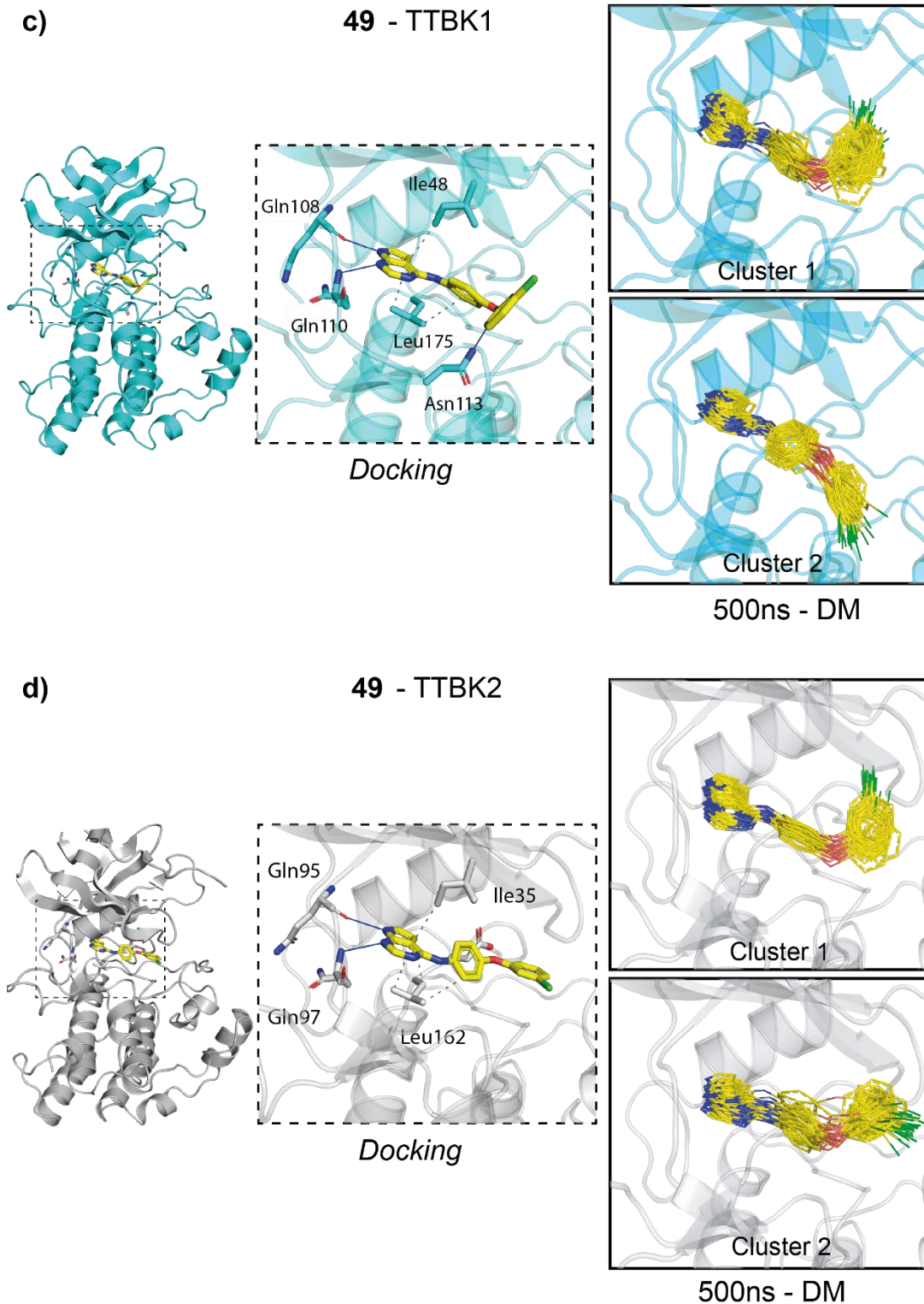


Figura 28 (continuación) Estudio de dinámica molecular de los compuestos **53** con TTBK1 (c) y TTBK2 (d). El panel medio muestra una ampliación de la pose inicial del docking del compuesto y el panel derecho los agrupamientos (cluster) obtenidos de la DM. Los enlaces de hidrógeno están señalados con líneas azules y las interacciones hidrofóbicas con líneas discontinuas grises.

Esto demuestra que el compuesto no se mantiene estable en una sola posición a lo largo de la DM, y unido a los valores de RMSF y RMSD antes expuestos explicaría la menor potencia del compuesto en la inhibición de las TTBKs.

En el caso del compuesto **53**, se vuelve a observar que la pose del ligando en el único cluster obtenido confirma los bajos valores de RMSD y RMSF para este compuesto, ya que se mantiene estable en la misma posición a lo largo de la DM (Figura 28 e y f).

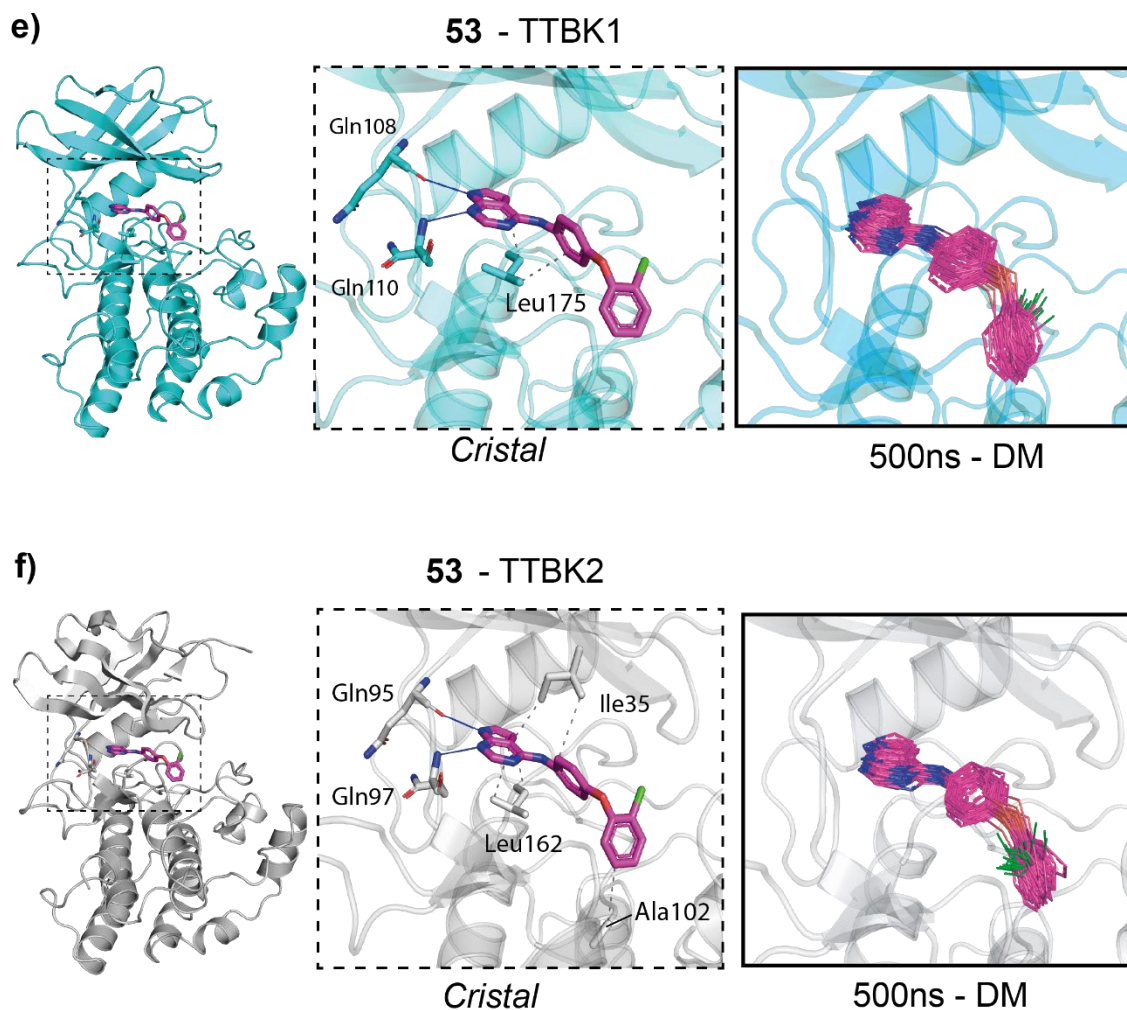


Figura 28 (continuación) Estudio de dinámica molecular de los compuestos **53** con TTBK1 (e) y TTBK2 (f). El panel medio muestra una ampliación de los cristales del compuesto y el panel derecho los agrupamientos (cluster) obtenidos de la DM. Los enlaces de hidrógeno están señalados con líneas azules y las interacciones hidrofóbicas con líneas discontinuas grises.

2.3 Evaluación de la selectividad de los compuestos frente a otras quinasas

Como se ha visto a través de la cristalización de los complejos formados por ambas isoformas y los inhibidores sintetizados, los compuestos son ATP-competitivos, al unirse con las quinasas en el sitio de este nucleótido. Este bolsillo está conservado en las quinasas humanas, siendo algunos de los residuos que rodean a la cavidad catalítica los que aportan la selectividad y diferencian las proteínas entre sí. Con el fin de evaluar la selectividad de los compuestos **39** y **49**, que de toda la serie son los que presentaban un mejor índice de selectividad TTBK1/TTBK2, se evaluó la inhibición de estos compuestos frente a una serie de quinasas del quinoma humano elegidas en base a semejanza o diferencia estructural con nuestras quinasas y a su función biológica en procesos de interés (Figura 29).

Se puede observar en la Figura 29a que el compuesto **39** inhibe principalmente la quinasa TTBK1. Además, frente a la quinasa CK1 δ con la que comparte cierto grado de homología (38% identidad) observamos ausencia de inhibición. Si calculamos el índice S_{35} ,¹⁰⁹ que determina la fracción de quinasas que son moduladas por el compuesto en un porcentaje de actividad residual menor del 35% vemos que este valor es 0.04, indicando selectividad sobre otras quinasas. El compuesto **49**, sin embargo, es menos selectivo ya que su valor S_{35} es de 0.19.

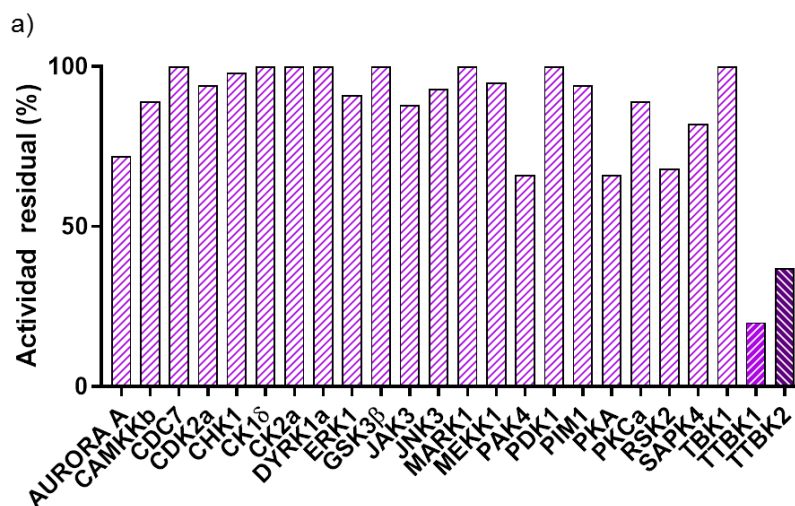


Figura 29. Actividad residual del compuesto **39** (a) y **49** (b) a una concentración de 10 μ M frente a diferentes quinasas.

¹⁰⁹ Cheng, A. C.; Eksterowicz, J.; Geuns-Meyer, S.; Sun, Y. Analysis of kinase inhibitor selectivity using a thermodynamics-based partition index. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (11), 4502-4510.

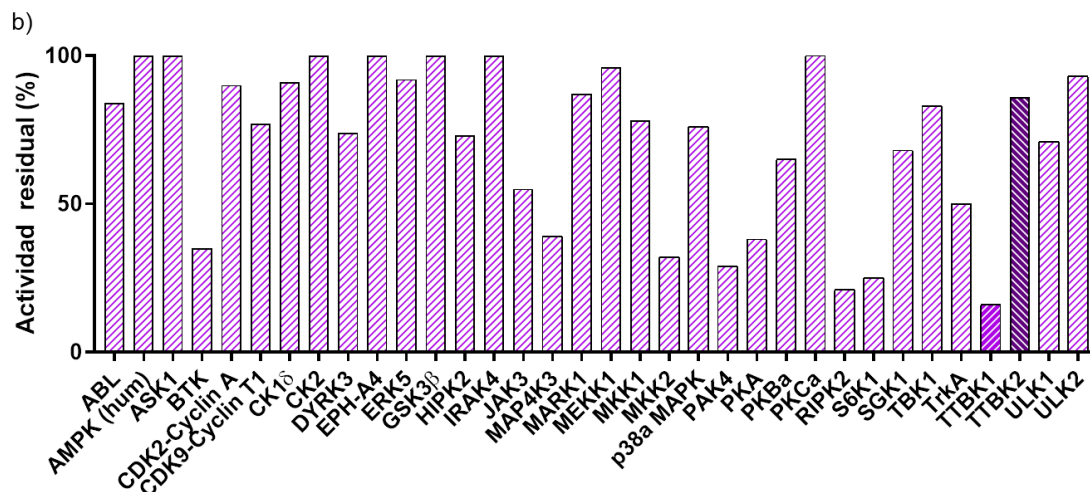


Figura 29 (continuación). Actividad residual del compuesto 39 (a) y 49 (b) a una concentración de 10 μ M frente a diferentes quinasas.

2.4 Predicción del paso de la barrera hematoencefálica.

Una característica esencial que deben presentar los compuestos dirigidos al tratamiento de enfermedades del SNC es la capacidad de penetrar la barrera hematoencefálica (BHE). Precisamente, esta propiedad hace que muchos fármacos con buena actividad biológica no lleguen a entrar en fases clínicas debido a su baja permeabilidad en el SNC o a otras malas propiedades farmacocinéticas.^{110,111} Esta estructura biológica consiste en una compleja red de células endoteliales de la red capilar del SNC, rodeadas por pericitos y astrocitos, lo que en conjunto protege al cerebro del paso de sustancias tóxicas que puedan circular por los vasos sanguíneos (Figura 30).¹¹²

¹¹⁰ Tsaion, K.; Bottlaender, M.; Mabondzo, A.; Foundation, A. s. D. D. ADDME-Avoiding drug development mistakes early: central nervous system drug discovery perspective. *BMC Neurol.* **2009**, *9* S1.

¹¹¹ Butlen-Ducuing, F.; Petavy, F.; Guizzaro, L.; Zienowicz, M.; Haas, M.; Alteri, E.; Salmonson, T.; Corruble, E. Regulatory watch: Challenges in drug development for central nervous system disorders: a European Medicines Agency perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15* (12), 813-814.

¹¹² Serlin, Y.; Shelef, I.; Knyazer, B.; Friedman, A. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2015**, *38*, 2-6.

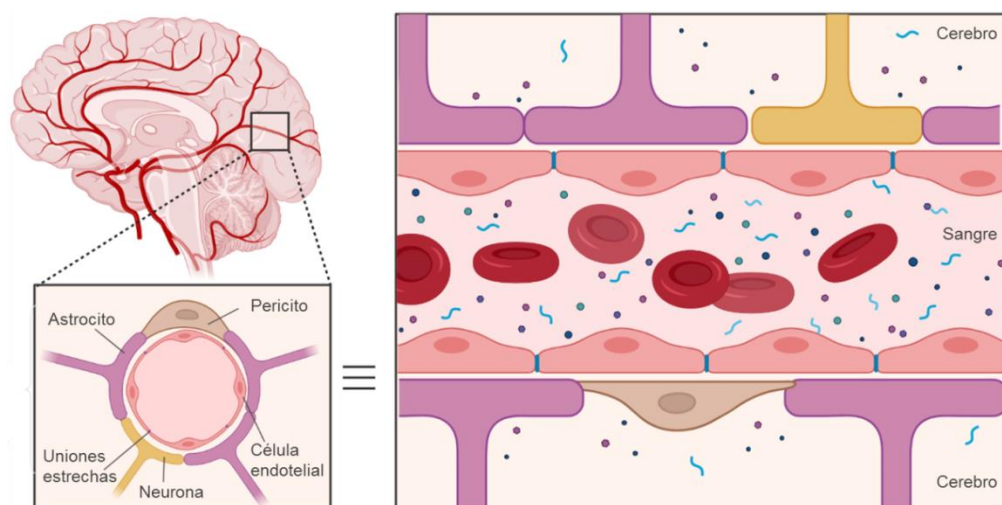


Figura 30. Estructura de la barrera hematoencefálica.

Con el fin de continuar el desarrollo de aquellos compuestos que presenten esta propiedad indispensable, la predicción del paso de barrera hematoencefálica se llevó a cabo mediante la metodología PAMPA (del inglés *parallel artificial membrane permeability assay*). Este método experimental, puesto a punto en el grupo de investigación para moléculas altamente insolubles en medios acuosos,¹¹³ permite predecir la permeabilidad efectiva de distintos compuestos que atraviesan la BHE por difusión pasiva. En primer lugar, se debe validar el método experimental mediante el análisis de diez fármacos en uso comerciales cuya capacidad de atravesar la BHE humana es conocida. En nuestro caso se obtuvo una buena correlación lineal entre el valor de permeabilidad efectiva experimental (P_e) y el descrito en la bibliografía ($R^2 = 0.9905$) (Figura 31).

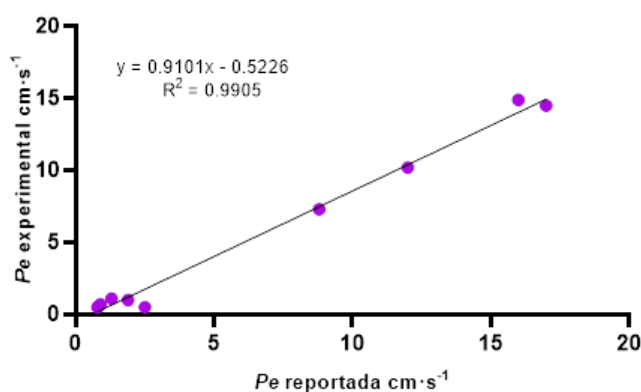


Figura 31. Correlación lineal entre el valor de P_e experimental y el descrito en la bibliografía para los diez compuestos comerciales utilizados como controles en el experimento de PAMPA.

¹¹³ Perez, D. I.; Pistolozzi, M.; Palomo, V.; Redondo, M.; Fortugno, C.; Gil, C.; Felix, G.; Martinez, A.; Bertucci, C. 5-Imino-1,2,4-thiadiazoles and quinazolines derivatives as glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) and phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors: determination of blood-brain barrier penetration and binding to human serum albumin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *45* (5), 677-684.

Una vez validado el método, la recta de correlación obtenida nos permite determinar los valores límite para definir un compuesto como permeable (SNC+: aquellos con un valor de $Pe > 3.64 \times 10^{-6}$ cm/s) o no permeable al SNC (SNC-: aquel con un valor de $Pe < 1.82 \times 10^{-6}$ cm/s). Los compuestos con valores de Pe comprendidos entre 3.64 y 1.82 no se pueden predecir correctamente con esta metodología y se definen como SNC+/-, quedando en una zona de incertidumbre experimental. Una vez obtenida esta recta y validado el método, procedimos a evaluar la capacidad de atravesar la BHE de aquellos compuestos activos frente a TTBK1 y cuya Cl_{50} estuviera por debajo de $2.5 \mu\text{M}$ (Figura 32).

Como se puede observar, la mayoría de los compuestos evaluados se predicen como permeables a la BHE. Cabe destacar, que los derivados que contienen un triazol (75-79) y los compuestos 34 y 57 no poseen esta capacidad y por lo tanto, a pesar de ser inhibidores de TTBK1 fueron descartados para los siguientes ensayos. Además, la Pe de los compuestos 33, 36, 50 y 54 no se pudo determinar correctamente con este método. Por último, cabe mencionar que los compuestos 41 y 46 no se pudieron evaluar puesto que no resultaron solubles en las condiciones del experimento.

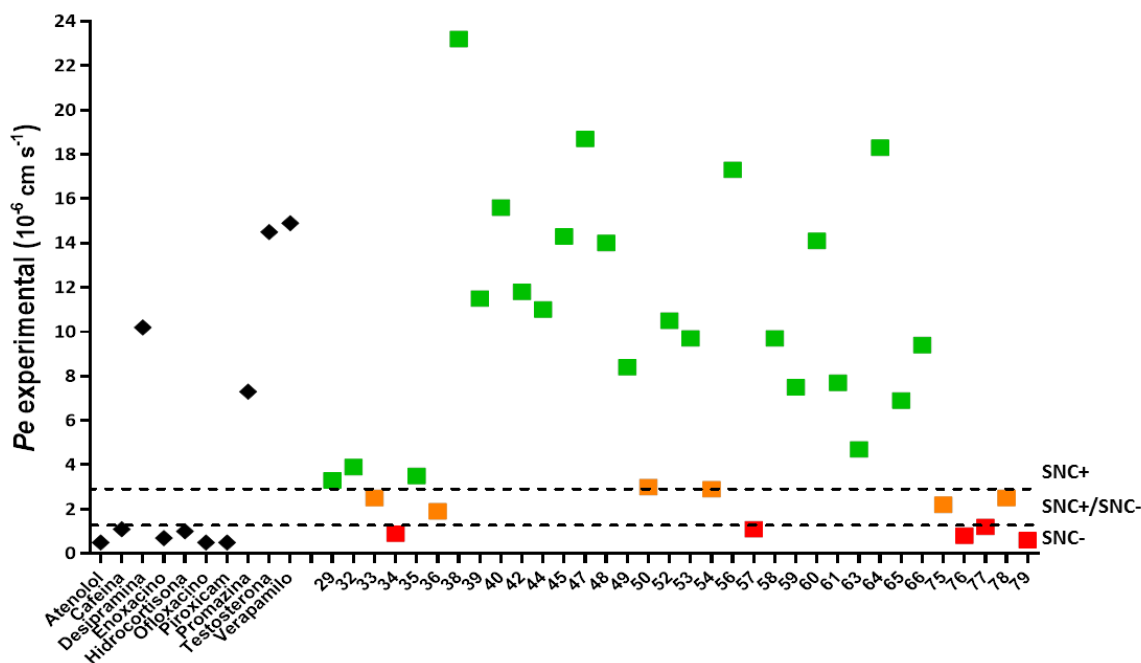


Figura 32. Permeabilidad efectiva a través de la BHE de los fármacos de control (rombos) y los inhibidores de TTBK1 (cuadrados) evaluados utilizando la metodología PAMPA (SNC+, permeable; SNC- no permeable; SNC+/-SNC- están en el área gris y no se puede determinar su permeabilidad pasiva con este ensayo).

2.5 Evaluación del potencial terapéutico de inhibidores de TTBK1 en modelos celulares representativos

Con el fin de evaluar el potencial terapéutico de los inhibidores de TTBK1 sintetizados en la presente tesis doctoral para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, se estudió el perfil neuroprotector de los compuestos en un cultivo de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) frente al daño inducido por el ácido etacrínico (AE) y por el ácido ocadaico (AO), dos toxinas muy utilizadas en modelos de daño neuronal. Para seleccionar y desarrollar aquellos fármacos con mejores propiedades biológicas y farmacocinéticas utilizamos dos criterios: en primer lugar, se incluyeron los compuestos determinados como permeables en el ensayo PAMPA del apartado 2.4. En segundo lugar, se eligieron los compuestos con mayor selectividad hacia la isoforma 1, evaluándose en el ensayo celular aquellos compuestos permeables con un valor de índice de selectividad menor a 0.25. Aplicando estos criterios 14 se obtuvieron compuestos para ser evaluados en los modelos celulares.

2.5.1 Evaluación de los inhibidores de TTBK1 en modelos de patología de tau

Los inhibidores de TTBK1 descritos hasta el momento se han estudiado en el modelo de toxicidad por hiperfosforilación de tau, resultando en una disminución de la fosforilación del epítipo preferente de TTBK1, la Ser422.⁹² Por ello, los inhibidores sintetizados en esta tesis doctoral también fueron estudiados en el modelo de toxicidad inducida por tratamiento con ácido ocadaico (AO). Este ácido es un inhibidor de la fosfatasa PP2A que provoca efectos tóxicos en las células y una hiperfosforilación de la proteína tau, con la consiguiente toxicidad y muerte celular.¹¹⁴

En un primer ensayo se evaluó la seguridad de los compuestos en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Las células fueron tratadas con los compuestos a distintas concentraciones (5 y 10 μ M) durante 24h para descartar aquellos que produjeran una reducción en la viabilidad celular medida con el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Figura 33).

¹¹⁴ Kamat, P. K.; Rai, S.; Nath, C. Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. *Neurotoxicology* **2013**, *37*, 163-172.

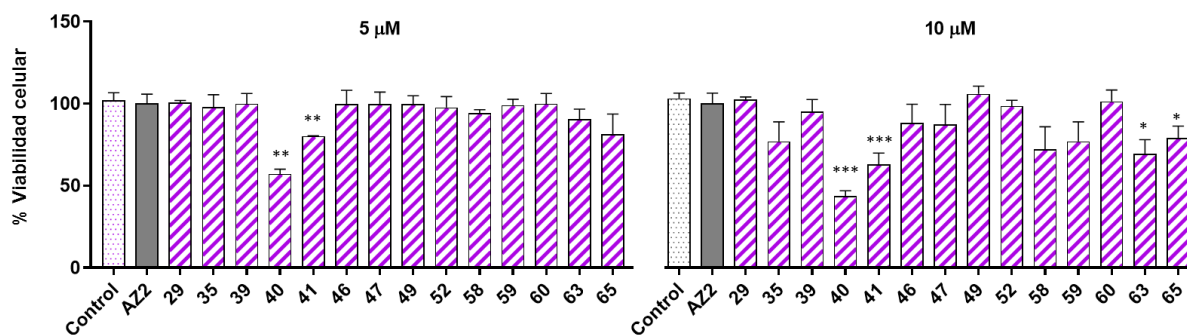


Figura 33. Viabilidad celular en presencia o ausencia de inhibidores de TTBK1 a 5 y 10 μM , en células SH-SY5Y. El ensayo MTT se utilizó para determinar la viabilidad celular 24 horas después del tratamiento con los fármacos. Cada punto de datos representa la media \pm SEM de tres réplicas en cuatro experimentos diferentes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significativamente diferente de las células control).

Como se puede observar en la Figura 33 los compuestos **40** y **41** reducen la viabilidad celular a las dos concentraciones ensayadas, por lo que se descartaron para los siguientes experimentos. En general, los compuestos mostraron cierta tendencia a la toxicidad cuando se probaron a 10 μM por lo que la concentración máxima de los compuestos en el ensayo de neuroprotección se fijó en 5 μM .

Aquellos compuestos que resultaron ser seguros a una concentración de 5 μM se evaluaron a esta y a una concentración menor (1 μM) en el modelo de toxicidad inducida por con AO (40 μM) (Figura 34). Todos los compuestos presentaron un perfil neuroprotector frente al daño inducido por el ácido ocaidaico, lo que confirma los resultados descritos para los anteriores inhibidores de TTBK1 como moduladores efectivos de la proteinopatía de tau.

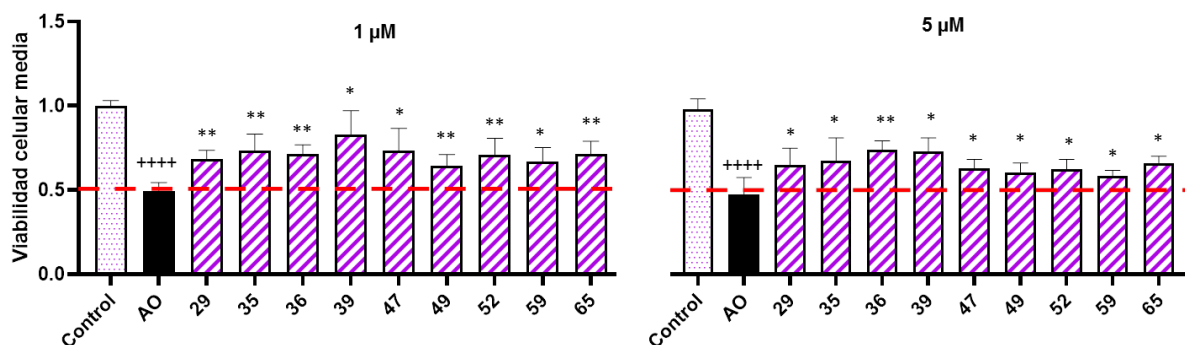


Figura 34. Efecto neuroprotector de los inhibidores de TTBK1 en células de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas con AO (40 μM). Viabilidad celular medida por ensayo MTT después de haber estado expuesta a AO durante 24 h en presencia o ausencia de tratamiento farmacológico (1 y 5 μM). (++++ $p < 0.0001$ significativamente diferente de las células de control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significativamente diferente de las células tratadas con AO).

2.5.2 Evaluación de los inhibidores de TTBK1 en modelos de patología de TDP-43

2.5.2.1 Evaluación de los inhibidores de TTBK1 en el modelo de ácido etacrínico

Debido al papel que juega TTBK1 en la fosforilación anormal de TDP-43, se estudió la posible eficacia de estas moléculas en la modulación de la proteinopatía de TDP-43. Para ello, se probaron los compuestos en un modelo de neurotoxicidad inducida por tratamiento con ácido etacrínico (AE). Esta toxina produce hiperfosforilación de TDP-43, ya que provoca la depleción del glutatión, desencadenando un aumento del estrés oxidativo y finalmente la muerte celular.¹¹⁵

Teniendo en cuenta los resultados del apartado anterior se evaluó el potencial neuroprotector de los compuestos a una concentración de 5 μ M frente a la hiperfosforilación de TDP-43 inducida por el tratamiento con el AE. Las células se tratan con los compuestos 1 hora antes de la adición del AE (40 μ M) y la viabilidad celular se mide a las 24 h con el ensayo de MTT (Figura 35a). En este ensayo se utilizaron como controles el inhibidor de GSK3 β , **tideglusib** y el inhibidor previamente reportado de TTBK1, **AZ2**. A la vista de los resultados presentados en la Figura 35a tres de los compuestos ensayados (**39**, **47** y **49**) mostraron un efecto neuroprotector estadísticamente significativo, así como los dos compuestos control.

Para estudiar si este efecto neuroprotector se debía a una reducción directa de la fosforilación de la proteína TDP-43, y más en concreto en el epítipo Ser409/410, se realizaron análisis por Western Blot de las células tratadas (Figura 35b). Se pudo observar que los tres nuevos inhibidores sintetizados fueron capaces de reducir la hiperfosforilación de TDP-43 en la Ser409/410 a niveles de las células control, un efecto del que el compuesto control **AZ2** carecía.

¹¹⁵ Iguchi, Y.; Katsuno, M.; Takagi, S.; Ishigaki, S.; Niwa, J.; Hasegawa, M.; Tanaka, F.; Sobue, G. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *45* (3), 862-870.

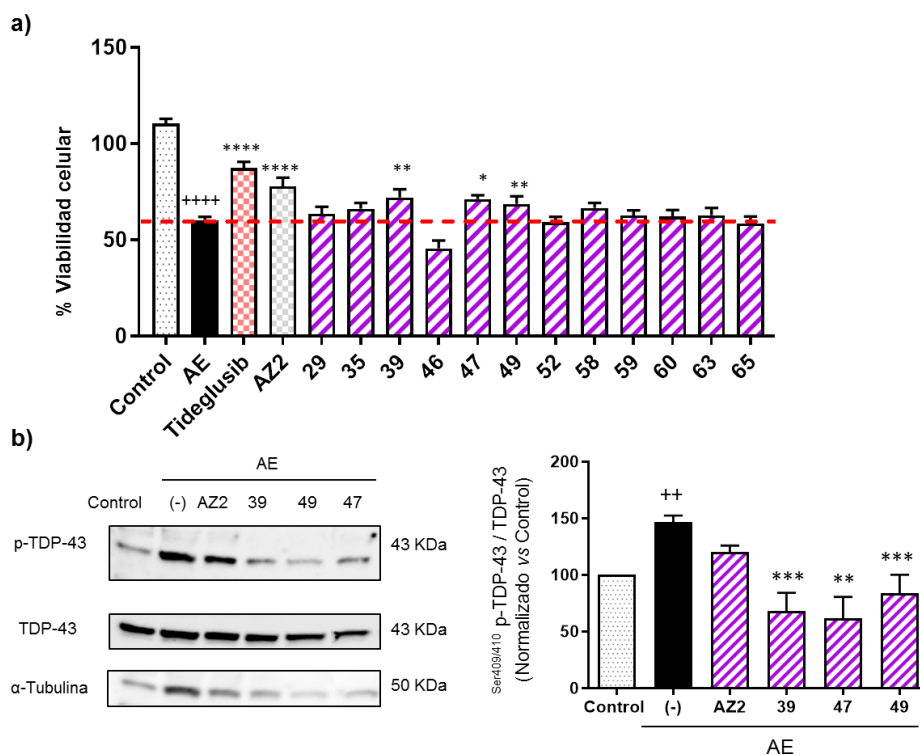


Figura 35. Efecto neuroprotector de los inhibidores de TTBK1 en células de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas con AE. a) Viabilidad celular medida por ensayo MTT después de haber estado expuesta a AE durante 24 h en presencia o ausencia de tratamiento farmacológico (5 μ M). b) Western blot representativo que muestra niveles de fosforilación de TDP-43 de las células SH-SY5Y tratadas con los compuestos **AZ2**, **39**, **47** y **49** (5 μ M). Cada punto de datos representa la media \pm SEM de tres replicas en cuatro experimentos diferentes (* p <0.05; ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001 significativamente diferente de las células tratadas con AE; ++ p <0.01, **** p <0.0001 significativamente diferente de las células de control).

Teniendo en cuenta los valores de inhibición de **AZ2** (TTBK1 CI_{50} : 2.6 μ M, TTBK2 CI_{50} : 3.2 μ M) y comparándolos con los de los compuestos efectivos **39** (TTBK1 CI_{50} : 0.24 μ M, TTBK2 CI_{50} : 4.22 μ M), **47** (TTBK1 CI_{50} : 1.02 μ M, TTBK2 CI_{50} : 8.79 μ M) y **49** (TTBK1 CI_{50} : 1.55 μ M, TTBK2 CI_{50} > 100 μ M) concluimos que el efecto neuroprotector podría deberse a la potencia y selectividad de los compuestos, ya que éstos son los más selectivos de la serie. Esto demuestra por primera vez el efecto de moduladores selectivos de la enzima TTBK1 sobre la fosforilación de TDP-43.

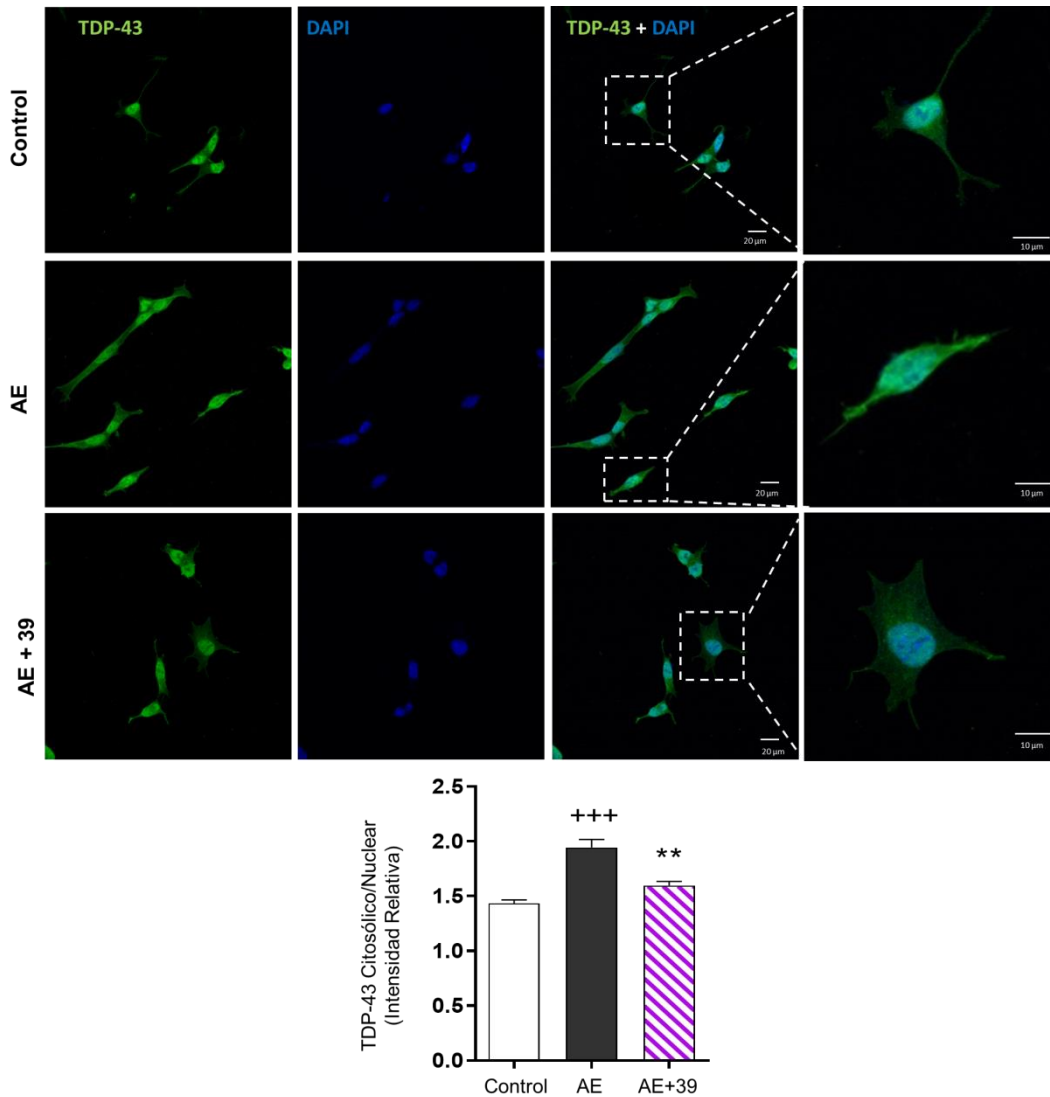


Figura 36. Análisis de inmunofluorescencia de la localización subcelular de TDP-43 en células SH-SY5Y. Las células fueron pretratadas con el compuesto **39** (5 μ M) y expuestas a AE (40 μ M) durante 24 horas. La localización de TDP-43 se evaluó mediante microscopía de barrido láser confocal. Barra de escala: 10 μ m y 20 μ m. La cuantificación del TDP-43 citosólico se analizó en al menos 50 células diferentes de 3 pocillos separados (n=3). Los datos representan la media \pm SEM (aumento 63x). (**p<0.005 significativamente diferente de las células tratadas con AE, +++p<0.001 significativamente diferente del control).

Por último, se quiso comprobar si este efecto sobre la hiperfosforilación de TDP-43 era capaz de modular también la localización celular de la proteína. Mediante inmunofluorescencia de las células SH-SY5Y tratadas con el compuesto **39** se pudo ver que el tratamiento revertía la localización citoplasmática anormal observada en las células sin tratar. Así, el inhibidor de TTBK1 fue capaz de recuperar la homeostásis celular de TDP-43 aumentando los niveles de la misma en el núcleo de las células (Figura 36).

2.5.3 Evaluación de los inhibidores de TTBK1 en linfoblastos de pacientes de ELA

En este grupo de investigación, con la colaboración de la Dra. Ángeles Martín-Requero se ha establecido un biobanco de células de personas sanas y pacientes de ELA, con el fin de evaluar posibles candidatos a fármaco en una plataforma innovadora que represente los mecanismos patológicos de la enfermedad y sea accesible y sencilla de mantener. El biobanco consiste en células periféricas de sangre, linfocitos inmortalizados con el virus de Epstein-Barr, para establecer una línea celular estable de linfoblastos y que ha demostrado recapitular los principales eventos patológicos de la enfermedad: la hiperfosforilación, fragmentación y agregación de TDP-43 y la desregulación de la homeostasis celular de esta proteína.¹¹⁶

De esta manera, aquellos compuestos prometedores que en el modelo celular de hiperfosforilación de TDP-43 por tratamiento con AE fueron capaces de reducir los niveles de TDP-43 fosforilado se probaron en linfoblastos de pacientes con ELA esporádico (ELAe) para confirmar el potencial terapéutico de los inhibidores de TTBK1 en la modulación de esta proteínopatía. Como se puede ver en la Figura 37a, el tratamiento a una concentración de 10 μ M con los compuestos **39** y **49** redujo la hiperfosforilación endógena de TDP-43 observada en este modelo. Además, ambos tratamientos con los compuestos aumentaron los niveles de TDP-43 en el núcleo de las células según se observa en la Figura 37b. Estos resultados confirman en células humanas extraídas de pacientes, el potencial de los inhibidores de TTBK1 en la modulación de la patología de TDP-43, en concreto en la ELA.

¹¹⁶ Posa, D.; Martinez-Gonzalez, L.; Bartolome, F.; Nagaraj, S.; Porras, G.; Martinez, A.; Martin-Requero, A. Recapitulation of pathological TDP-43 features in immortalized lymphocytes from sporadic ALS patients. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56* (4), 2424-2432.

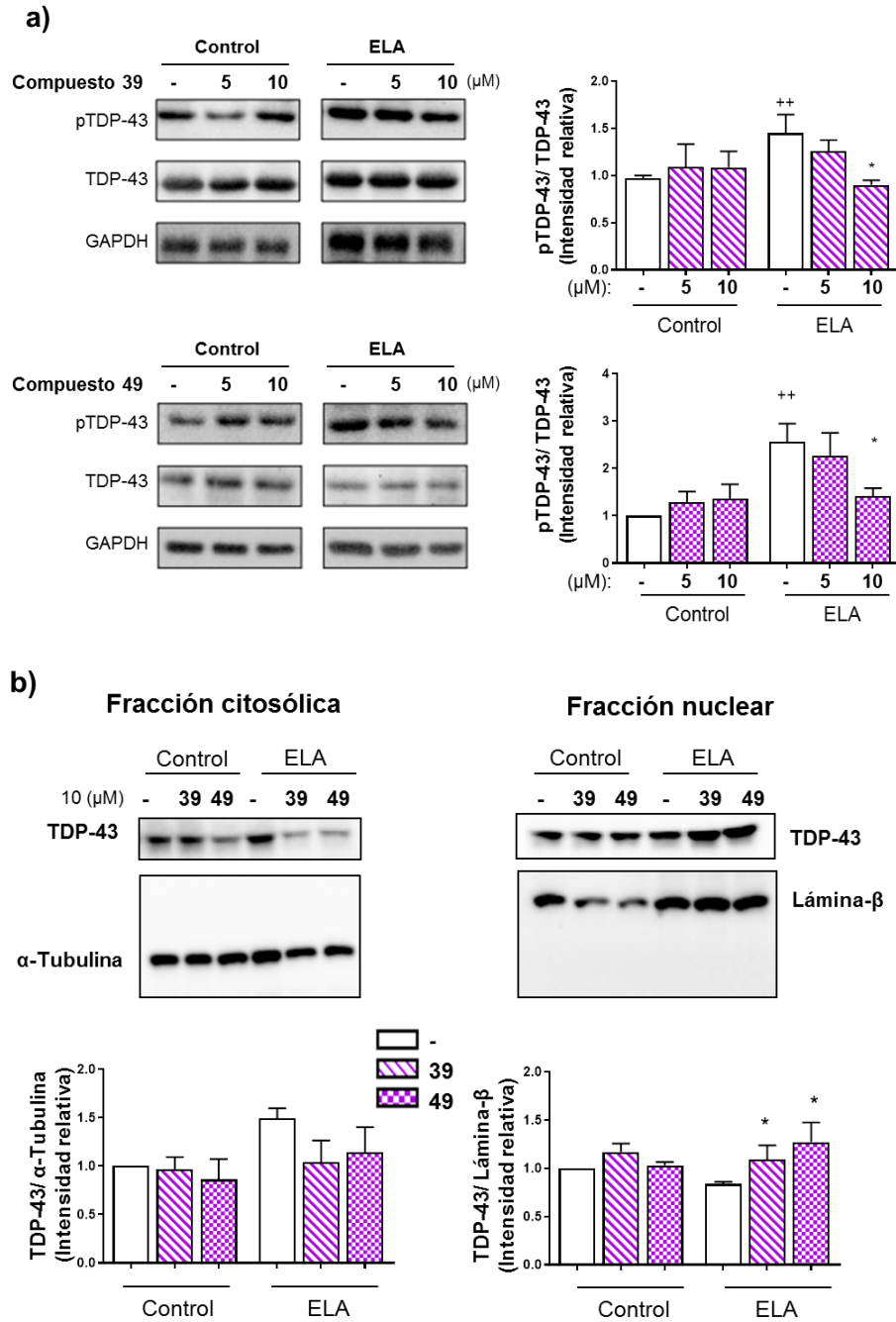


Figura 37. a) Western blot representativo y cuantificación de los niveles de pTDP-43 y TDP-43 total en presencia o ausencia de los inhibidores de TTBK1 **39** y **49** a 5 y 10 μM en los linfoblastos de pacientes con ELAe y controles. b) Localización subcelular de TDP-43 en los linfoblastos de ELAe y control en presencia o ausencia de los compuestos **39** y **49** a 10 μM. Como control de carga se ha utilizado Lamina-β para la fracción nuclear y α-Tubulina para la fracción citosólica. Los valores representan la media ± SEM de 3 experimentos diferentes. (** $p < 0.01$ con diferencias significativas frente a al grupo control sin tratamiento y * $p < 0.05$ con diferencias significativas frente al ELAe sin tratamiento).

2.6 Evaluación de la eficacia de un candidato en modelos transgénicos de ratón

En base a los resultados tan interesantes y prometedores obtenidos para los inhibidores de TTBK1 en los diferentes modelos celulares se propuso evaluar un candidato en modelos *in vivo*. Para ello primero, se estudió el perfil farmacocinético del compuesto **39** en ratones macho BALB/c sanos con el fin de elegir la mejor ruta de administración y la dosis adecuada. Se evaluaron los niveles de compuesto en plasma y en cerebro tras la administración de una sola dosis por inyección intraperitoneal (i.p) (5 mg.Kg⁻¹) o por administración oral (p.o) (10 mg.Kg⁻¹). Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Perfil farmacocinético del compuesto **39** en plasma y cerebro tras una sola administración por inyección intraperitoneal (5 mg.Kg⁻¹) o por administración oral (10 mg.Kg⁻¹) en ratones macho BALB/c.

Ruta	Dosis	Matriz	T _{max} (h)	C _{max} (ng.mL ⁻¹)	AUC _{final} (h.ng.mL ⁻¹)	T _{1/2} (h)	Cerebro-Kp (AUC _{final})
i.p	5 mg.Kg ⁻¹	Plasma	1.00	1429.08	5958.82	3.75	2.63
		Cerebro ^a	1.00	4174.12	15652.49	3.46	
p.o	10 mg.Kg ⁻¹	Plasma	2.00	2265.04	18406.33	3.30	2.67
		Cerebro ^a	2.00	4923.89	49172.57	3.40	

^aConcentración cerebral y área bajo la curva (AUC) expresados como ng.g-1 y h.ng.g-1 respectivamente.

Como se observa en la Tabla 7, el compuesto es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, encontrándose niveles altos de la pirrolopirimidina **39** en cerebro, confirmando así las predicciones obtenidas con el ensayo PAMPA. La proporción de los niveles del candidato **39** en cerebro:plasma es 2.6:1 lo que indica que el compuesto se distribuye mayoritariamente a cerebro. Además, en la administración oral de este compuesto también se obtienen niveles plasmáticos y cerebrales elevados por lo que el derivado **39** se puede administrar de forma oral, representando un valor añadido importante para su futuro desarrollo como tratamiento crónico.

La vía de administración intraperitoneal, en la que se llegan a concentraciones plasmáticas y cerebrales superiores a la CI₅₀ del compuesto, fue la ruta elegida para los estudios *in vivo* realizados a continuación.

2.6.1 Evaluación en un modelo de proteinopatía de TDP-43 con fenotipo motor

Para evaluar el potencial de los inhibidores de TTBK1 en la modulación de la proteinopatía de TDP-43 se eligió el modelo transgénico de ratón Prp-hTDP-43^{A315T}. Para ello, en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Eva de Lago (Universidad Complutense de Madrid) se probó la eficacia del compuesto **39** en este modelo animal. El modelo se basa en la sobreexpresión de TDP-43 humana y mutada en la alanina 315 por una treonina en uno de los dos alelos del gen, en ratones C57BL/6. Como promotor se utiliza la proteína priónica de ratón (Prp), lo que hace que el constructo Prp-hTDP-43^{A315T} se exprese ubicuamente, incluidos el cerebro y la médula espinal. Este modelo animal recapitula las características patológicas de la proteinopatía de TDP-43: pérdida de peso, degeneración de las motoneuronas, agregados proteicos citoplasmáticos, gliosis y debilidad muscular.¹¹⁷

Una vez establecida la dosis adecuada tras el estudio de farmacocinética *in vivo* y teniendo en cuenta la potencia inhibitoria del compuesto, los ratones fueron tratados por i.p a una dosis de 5 mg/kg/día a partir del día 65 post-natal (fase pre-sintomática) durante 30 días consecutivos, cuando fueron sacrificados para proceder al análisis de los tejidos. Se establecieron cuatro grupos para el estudio: ratones silvestres sin tratamiento (WT-Veh), ratones silvestres tratados con **39** (WT+**39**), ratones TDP-43^{A315T} sin tratamiento (TDP43-Veh) y ratones TDP-43^{A315T} tratados con **39** (TDP43+**39**).

A nivel histológico, los animales tratados con el compuesto **39** reprodujeron los mismos resultados observados en los modelos *in vitro*: una reducción en la hiperfosforilación en la Ser409/410 de TDP-43 en la médula espinal de los ratones (Figura 38a). Este efecto se observó de manera significativa en los animales tratados sin interferir en la cantidad total de TDP-43 (Figura 38b).

¹¹⁷ Wegorzewska, I.; Bell, S.; Cairns, N. J.; Miller, T. M.; Baloh, R. H. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106* (44), 18809-18814.

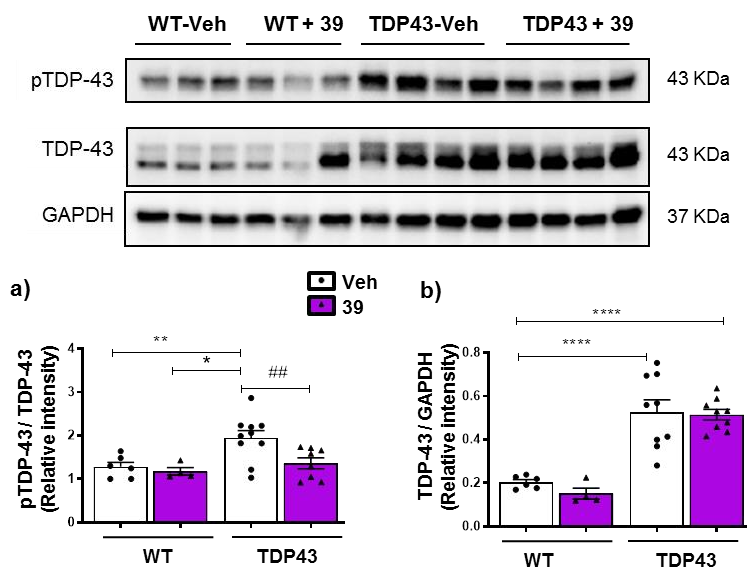


Figura 38. Niveles de TDP-43 total y fosforilada en los residuos Ser409/410 en la sección lumbar de la médula espinal de los ratones silvestres o transgénicos tratados con el compuesto **39** o con el vehículo, analizados por WB. (N ≥ 6 ratones por grupo) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh; ## $p < 0.01$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

Como consecuencia del tratamiento con el inhibidor de TTBK1, se produjo una reducción en la pérdida de motoneuronas para aquellos ratones tratados con el compuesto **39**, como se puede observar en la Figura 39. Este efecto neuroprotector se confirmó por tinción de Nissl que marca los ácidos nucleicos de las neuronas, así como mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo acetilcolintransferasa (Chat) que marca las neuronas de la unión neuromuscular. Se demostró además, que el compuesto **39** no resultaba tóxico al no afectar la supervivencia de las motoneuronas en los animales silvestres tratados con compuesto.

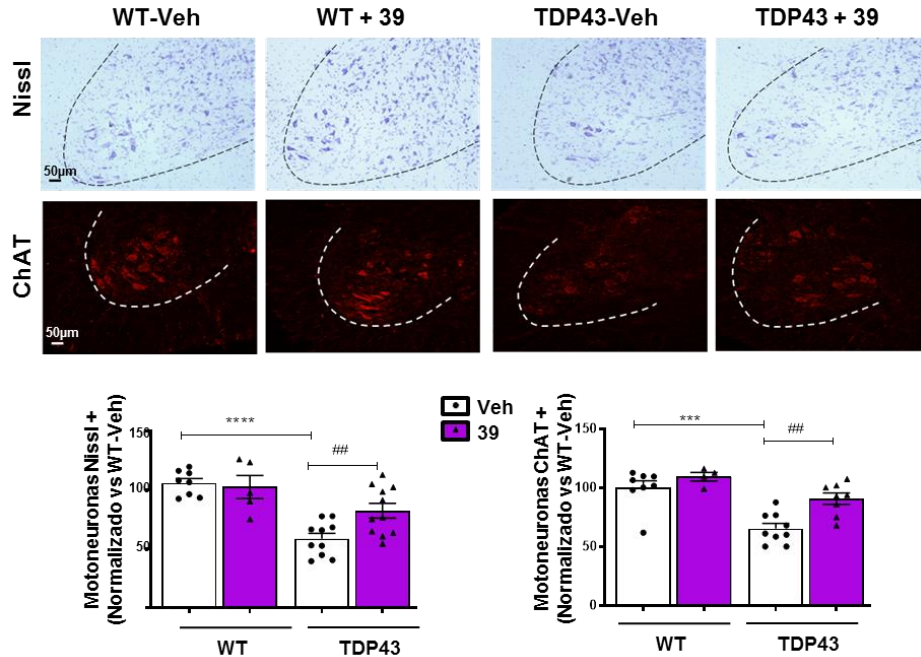


Figura 39. Cuantificación del número de motoneuronas marcadas con la tinción de Nissl o con un anticuerpo de Chat en la porción lumbar de la médula espinal de ratones silvestres o transgénicos tratados con compuesto **39** o vehículo. (N ≥ 6 ratones por grupo) (**** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh; ## $p < 0.01$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

2.6.2 Evaluación en un modelo de proteinopatía de TDP-43 con fenotipo cognitivo

Los inhibidores de TTBK1 aquí descritos han demostrado tener un potencial en la modulación de la proteinopatía de TDP-43 así como en la de tau. Dado que ambas proteinopatías son características de pacientes con DFT (DFT-tau y DFT-TDP) como se ha indicado en el apartado 1.1.2, los compuestos capaces de inhibir TTBK1 podrían ser una estrategia innovadora y efectiva para el tratamiento de esta enfermedad.

En colaboración con el grupo de la Dra. Eva de Lago (Universidad Complutense de Madrid), se utilizó una línea de ratones transgénicos FVB-N/CaMKII-TDP43, que se caracterizan por expresar hasta 2.5 veces más de la proteína TDP-43 murina bajo el promotor de la α -Calcio-Calmodulina quinasa II (CaMKII) en neuronas corticales y del hipocampo de ratones de la cepa FVB-N para evaluar un inhibidor de TTBK1.¹¹⁸ Este aumento en la expresión produce déficits cognitivos tempranos a partir del día postnatal 60 y atrofia en el hipocampo.

¹¹⁸ Tsai, K. J.; Yang, C. H.; Fang, Y. H.; Cho, K. H.; Chien, W. L.; Wang, W. T.; Wu, T. W.; Lin, C. P.; Fu, W. M.; Shen, C. K. Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTLD-U. *J. Exp. Med.* **2010**, *207* (8), 1661-1673.

Para demostrar esta hipótesis, los ratones FVB-N/CaMKII-TDP43 fueron tratados con el compuesto **39** por administración i.p a una dosis de 5 mg/kg/día a partir del día 45 post-natal (fase pre-sintomática) durante 45 días consecutivos, tras lo cual fueron sacrificados para proceder al análisis de los tejidos. Se establecieron tres grupos para el estudio: ratones silvestres sin tratamiento (WT), ratones FVB-N/CaMKII-TDP43 sin tratamiento (TG) y ratones FVB-N/CaMKII-TDP43 tratados con **39** (TG+39). Además del análisis histológico, el deterioro cognitivo se evaluó a través de un test de reconocimiento de objeto nuevo (NOR) en el día 60 y 90 post-natal, es decir a los 15 días del inicio del tratamiento y justo antes del sacrificio.

Los ratones tratados con el compuesto **39** demostraron un menor declive cognitivo, eran más curiosos y empleaban más tiempo en reconocer objetos nuevos comparados con los ratones transgénicos sin tratar (Figura 40a). Este efecto se ve en la evolución del índice de discriminación, que evalúa el tiempo que emplean en reconocer el objeto nuevo que se les proporciona en favor del antiguo. Los animales transgénicos tratados con el compuesto **39** no sufren el declive observado en los animales sin tratar (Figura 40b).

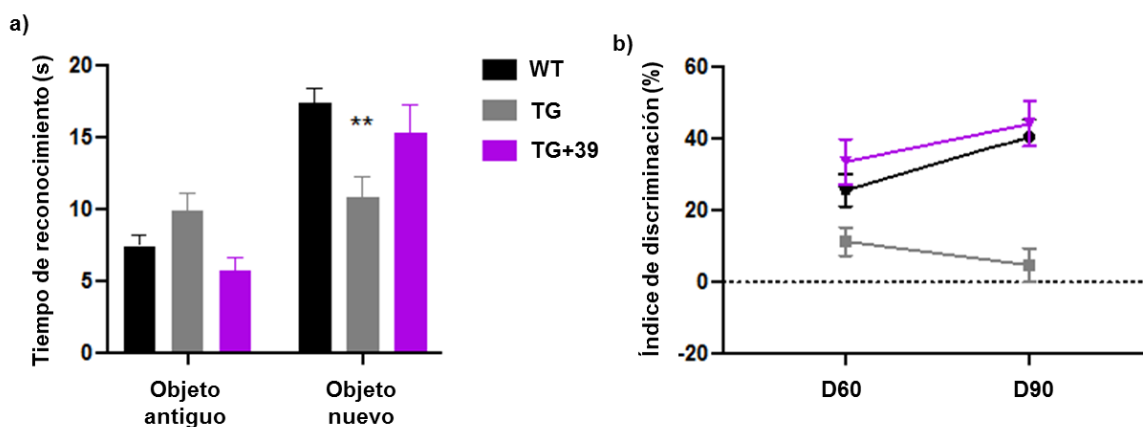


Figura 40. Evaluación comportamental de los animales del estudio. a) Tiempo de reconocimiento que emplea el animal en el test de reconocimiento de objeto nuevo (NOR) medido en segundos. b) Análisis de la evolución del índice de discriminación a lo largo del tratamiento.

A nivel histológico se pudieron confirmar de nuevo los resultados obtenidos en ensayos *in vitro*: en la corteza cerebral de los ratones tratados con el compuesto **39**, se observaron menores niveles de TDP-43 fosforilada (Figura 40c).

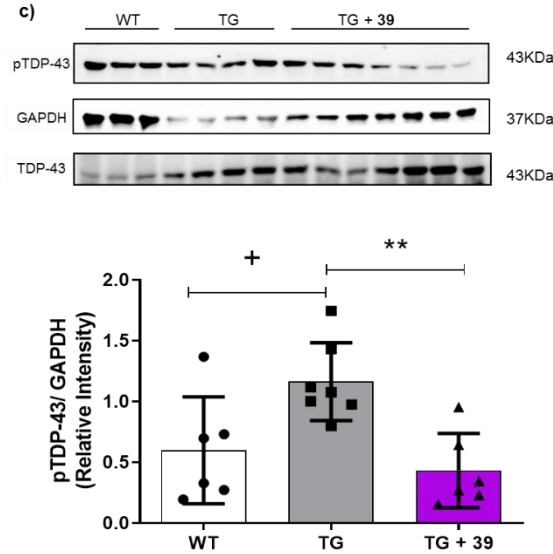


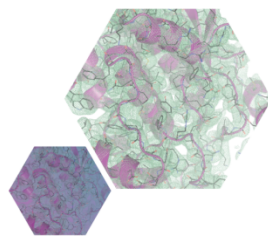
Figura 40c. Niveles de TDP-43 fosforilada en la corteza de los ratones silvestres o transgénicos tratados con el compuesto **39** o con el vehículo, analizados por WB. (** $p < 0.01$; con diferencias significativas frente al grupo TG; $^+p < 0.05$ con diferencias significativas frente al grupo WT).

Todos estos resultados demuestran por primera vez el potencial de los compuestos inhibidores de TTBK1 como moduladores efectivos de la patología de TDP-43 resultando en fármacos atractivos para el tratamiento enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis lateral amiotrófica o la demencia frontotemporal.^{119,120}

Como resumen de este primer capítulo, se ha sintetizado una nueva familia de inhibidores selectivos de la quinasa TTBK1. Estos compuestos se han cristalizado con los dominios catalíticos de TTBK1 y TTBK2 y sus modos de unión se han estudiado de manera experimental y computacional. Además, la eficacia de estos nuevos inhibidores en la modulación de la proteinopatía de TDP-43 se ha demostrado tanto en modelos celulares como en modelos animales representativos. El mejor compuesto de la serie ha sido capaz de disminuir la hiperfosforilación aberrante y como consecuencia, producir un efecto neuroprotector frente a la pérdida de motoneuronas en el ratón con fenotipo motor. Por otro lado, el compuesto también ha podido recuperar el fenotipo cognitivo de los ratones en un segundo modelo *in vivo* demostrando por primera vez el potencial de los inhibidores de TTBK1 en el tratamiento de proteinopatías de TDP-43.

¹¹⁹ Nozal, V., Martínez-González, L., Gomez-Almeria, M., Gonzalo-Consuegra, C., Santana, P., Chaikuad, A., Pérez-Cuevas, E., Knapp, S., Lietha, D., Martínez, A., *et al.* TDP-43 modulation by tau tubuline kinase 1 inhibitors: a new avenue for future amyotrophic lateral sclerosis therapy. *J. Med. Chem.* **2022**, 65 (2), 1585–1607

¹²⁰ Martínez, A., Gil, C., Nozal, V., Palomo, V., Martín-Requero, A., Martínez-González, L., Pérez-Cuevas, E. Inhibidores de la quinasa de tau y tubulina (TTBK) N. de solicitud: P202130653, **2021**.



CAPÍTULO 2

COMPUESTOS MULTIDIANA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

1 Introducción

1.1 Compuestos multidiana, una aproximación innovadora

La alta eficacia terapéutica de algunos de los fármacos más antiguos, tales como el ácido acetilsalicílico, el paracetamol o la metformina, se puede atribuir a su actividad pleiotrópica en diferentes dianas: la suma de los efectos farmacodinámicos da lugar a su perfil clínico superior.^{121,122} Históricamente la identificación de este tipo de moléculas ha sido el resultado de la serendipia, mientras que en la actualidad, y para algunas enfermedades complejas para las cuales la aproximación tradicional no ha dado lugar a curas efectivas, cada vez son más los proyectos de química médica que enfocan sus esfuerzos en la investigación de agentes terapéuticos polivalentes. Los métodos *in vitro*, computacionales y las sondas químicas ayudan a la búsqueda racional y sistemática de combinaciones de dianas sinérgicas que podrían producir efectos terapéuticos más potentes que las moléculas con una sola diana.¹²³

El término agente, ligando o compuesto multidiana o ligando múltiple fue acuñado en 2004 por Morphy y Rankovic³⁷ y ha despertado un interés creciente en el campo de la química médica, resultando en una manera novedosa de diseñar moléculas. Este tipo de compuestos podrían ser de gran utilidad en áreas como las enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas, las infecciosas, el cáncer o las metabólicas y cardiovasculares debido a su compleja naturaleza multifactorial o la emergencia de resistencia a los tratamientos disponibles.¹²⁴

Estas enfermedades están causadas por una amalgama de mecanismos y cascadas patológicas para las cuales la modulación de una sola diana ha resultado, hasta el momento, en tratamientos de carácter paliativo. Así, para restaurar el equilibrio fisiológico y sobre todo, generar la eficacia terapéutica suficiente y necesaria las terapias de combinación emergen como tratamientos prometedores al hipotetizarse como más efectivos.¹²⁴ Este tipo de aproximaciones se puede conseguir por dos vías: la combinación de distintos fármacos específicos de diferentes dianas

¹²¹ Dzeshka, M. S.; Shantsila, A.; Lip, G. Y. Effects of Aspirin on endothelial function and hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **2016**, *18* (11), 83.

¹²² Wu, T.; Horowitz, M.; Rayner, C. K. New insights into the anti-diabetic actions of metformin: from the liver to the gut. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *11* (2), 157-166.

¹²³ Proschak, E.; Stark, H.; Merk, D. Polypharmacology by design: A medicinal chemist's perspective on multitargeting compounds. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (2), 420-444.

¹²⁴ Zimmermann, G. R.; Lehar, J.; Keith, C. T. Multi-target therapeutics: When the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov. Today* **2007**, *12* (1-2), 34-42.

administrados en diferentes comprimidos y el uso de compuestos multidiana que interactúen con más de una diana biológica y produzcan un efecto sinérgico en un solo comprimido.¹²⁵

Los compuestos multidiana ofrecen distintas ventajas cuando son diseñados correctamente, equilibrando adecuadamente la potencia inhibitoria y eligiendo la combinación de dianas terapéuticas más efectiva. Así, pueden reducir la complejidad de los tratamientos y su farmacología, los efectos secundarios y las interacciones entre fármacos proporcionando al mismo tiempo una mayor adherencia a los tratamientos. Además, podrían reducir los costes de manufactura ya que al desarrollar una sola molécula se disminuyen los ensayos clínicos necesarios.

En el diseño de fármacos multidiana lo ideal sería obtener compuestos cuya modulación de distintas proteínas ofrezca efectos sinérgicos o aditivos y resulte en un tratamiento más potente. Este apunte no es trivial y es necesario conocer a fondo la enfermedad y las distintas cascadas patológicas implicadas si se quiere diseñar un compuesto multidiana efectivo. En principio, cualquier combinación de dianas es posible, sin embargo, algunas resultan más sencillas que otras. Cuanto más diferentes sean las dianas terapéuticas, respecto a sus sitios de unión, más complejo podría resultar el diseño de compuestos multidiana que deben interactuar con estas proteínas distintas. Además, la localización celular y tisular también es limitante, puesto que el hecho de que las dianas se encuentren en distintos tejidos aumentaría la complejidad intrínseca del diseño de este tipo de moléculas.¹²³ Este proceso de creación de nuevos ligandos múltiples se puede apoyar en métodos computacionales, tanto para la identificación de farmacóforos comunes como para la predicción de los efectos sinérgicos de la combinación de dianas dentro de una cascada patológica.¹²⁶

1.1.1 Estrategias para el diseño de compuestos multidiana

Los compuestos multidiana se pueden clasificar en tres tipos de acuerdo con su arquitectura molecular y los farmacóforos que los componen (Figura 41).

¹²⁵ Bolognesi, M. L. Polypharmacology in a single drug: Multitarget drugs. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (13), 1639-1645.

¹²⁶ Sheng, Z.; Sun, Y.; Yin, Z.; Tang, K.; Cao, Z. Advances in computational approaches in identifying synergistic drug combinations. *Brief Bioinform.* **2018**, *19* (6), 1172-1182.

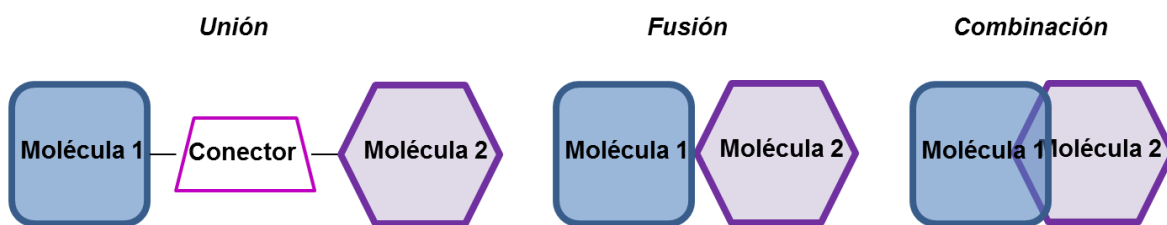


Figura 41. Estrategias de diseño de fármacos multidiana.

La manera más sencilla de producir ligandos multidiana es la estrategia de unión de dos farmacóforos independientes mediante un conector. Esta opción suele producir compuestos de mayor tamaño que, aunque puedan presentar algún inconveniente, como el empeoramiento de las propiedades farmacocinéticas, es una estrategia muy perseguida en el caso de la administración dirigida de medicamentos como, por ejemplo, la conjugación de anticuerpos y fármacos.¹²⁷ Además, la ventaja principal de esta aproximación es que no es necesaria la modificación excesiva de la estructura química de las moléculas que se unen para introducir el conector, lo que hace que el fármaco multidiana pueda mantener más fácilmente la actividad inicial. La fusión de farmacóforos para dar lugar a compuestos multidiana también puede aumentar el peso molecular de estos, así como su lipofilia, dos características a menudo indeseadas en los fármacos. La estrategia más compleja es la de combinación de farmacóforos, que si bien puede ser poco eficiente cuando las estructuras no se combinan adecuadamente y se eliminan partes de las moléculas claves para la actividad enzimática. Aunque es la más favorable en cuanto a características farmacocinéticas, a menudo la optimización de este tipo de ligandos es una tarea complicada.

1.2 Una demencia compleja: marcadores patológicos de la enfermedad de Alzheimer

Como se ha comentado en la introducción, la enfermedad de Alzheimer es la demencia más habitual entre la población anciana, con una prevalencia del 5% en Europa¹²⁸ (Incidencia: 11 por cada 1 000 personas-año) y que debido al incremento en la esperanza de vida se calcula que afectará en el año 2050 a más de 16.5¹²⁹ millones de personas en nuestro continente. Los principales marcadores neuropatológicos que se encuentran en los cerebros de pacientes de EA

¹²⁷ Nolting, B. Linker technologies for antibody-drug conjugates. *Methods Mol. Biol.* **2013**, 1045, 71-100.

¹²⁸ Niu, H.; Alvarez-Alvarez, I.; Guillen-Grima, F.; Aguinaga-Ontoso, I. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurologia* **2017**, 32 (8), 523-532.

¹²⁹ Brookmeyer, R.; Johnson, E.; Ziegler-Graham, K.; Arrighi, H. M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2007**, 3 (3), 186-191.

son: las placas seniles extracelulares y los ovillos neurofibrilares intracelulares (Figura 42). Ambas lesiones afectan principalmente a las neuronas del hipocampo y la corteza cerebral encargadas de la memoria y el aprendizaje y provocan tanto una distrofia en las sinapsis como una reducción en el número de las mismas, desencadenando finalmente en una muerte neuronal en esta región del cerebro.¹³⁰

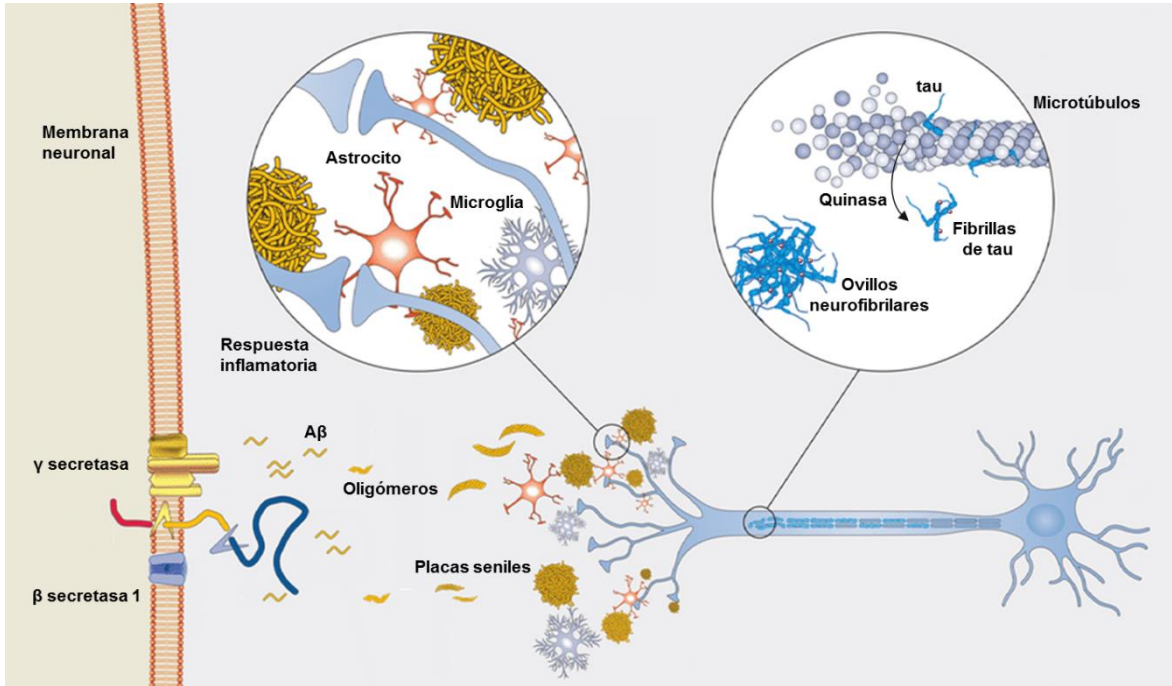


Figura 42. Mecanismo de formación de los dos principales marcadores patológicos de la EA: ovillos neurofibrilares intracelulares y placas seniles extracelulares. Figura adaptada de ref. 131

Las placas seniles, son unas lesiones esféricas que resultan de la agregación extracelular del péptido β -amiloide ($A\beta$) el principal producto del procesamiento anormal de la proteína precursora del β -amiloide (APP).¹³² APP es una proteína de membrana, altamente expresada en el cerebro, cuya ruptura proteolítica secuencial, primero por la enzima precursora del amiloide en el sitio β o β -secretasa (BACE1) y posteriormente por la γ -secretasa da lugar a oligómeros amiloidogénicos de 39-43 aminoácidos de longitud, entre los que destacan las especies $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$, que son más

¹³⁰ Shankar, G. M.; Li, S.; Mehta, T. H.; Garcia-Munoz, A.; Shepardson, N. E.; Smith, I.; Brett, F. M.; Farrell, M. A.; Rowan, M. J.; Lemere, C. A.; Regan, C. M.; Walsh, D. M.; Sabatini, B. L.; Selkoe, D. J. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **2008**, *14* (8), 837-842.

¹³¹ Panza, F.; Lozupone, M.; Seripa, D.; Imbimbo, B. P. Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer disease: Is it now a long shot? *Ann. Neurol.* **2019**, *85* (3), 303-315.

¹³² Hardy, J.; Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, *297* (5580), 353-356.

insolubles y se agregan dando lugar a las placas seniles.¹³³ Estos oligómeros A β ₄₀ y A β ₄₂ resultan tóxicos, generando reducción y atrofia en la sinapsis, apoptosis y otros mecanismos patológicos.^{130,134}

Por otro lado, los ovillos neurofibrilares están compuestos por tau, una proteína de unión a microtúbulos abundante en los axones y cuya función es el mantenimiento del citoesqueleto neuronal y el transporte axonal. Debido a una hiperfosforilación anormal de la proteína tau, ésta pierde la afinidad a los microtúbulos, dando lugar a oligómeros menos solubles que se asocian para dar lugar a agregados tóxicos.¹³⁵ Numerosas proteínas quinasas han sido descritas como responsables de esta hiperfosforilación anormal, entre ellas GSK3, p38, TTBK1, PKA, CK1/2, CDK5, CaMKII.¹³⁶

Tradicionalmente ambos mecanismos patológicos se habían descrito como independientes, sin embargo, cada vez son más las evidencias que señalan una relación entre ambas cascadas, demostrando la sinergia en su toxicidad y contribución al desarrollo de la EA.¹³⁷ Por un lado, las placas seniles empiezan a depositarse entre 10 y 20 años antes de la aparición de los síntomas clínicos y diversos estudios indican que hasta un 40% de individuos cognitivamente sanos tenían una abundante cantidad de placas seniles en el cerebro.¹³⁸ Por otro lado, las hipótesis actuales apuntan a que las placas seniles se desarrollan antes que los ovillos neurofibrilares y la patología de tau se correlaciona mejor con los déficits cognitivos. Desde la identificación de ambos mecanismos patológicos, las terapias se han enfocado principalmente en tratar la patología del péptido β -amiloidé sin haber obtenido resultados en la reducción de la demencia de los pacientes.¹³⁹ Sin embargo, en los últimos años los tratamientos con inmunoterapia dirigidos a tau han cobrado mayor interés y están dando resultados prometedores en ensayos preclínicos.¹⁴⁰

¹³³ Ashford, J. W. The dichotomy of Alzheimer's disease pathology: Amyloid-beta and tau. *J. Alzheimers Dis.* **2019**, *68* (1), 77-83.

¹³⁴ Hardy, J. The discovery of Alzheimer-causing mutations in the APP gene and the formulation of the "amyloid cascade hypothesis". *FEBS J.* **2017**, *284* (7), 1040-1044.

¹³⁵ Iqbal, K.; Liu, F.; Gong, C. X.; Grundke-Iqbal, I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr. Alzheimer Res.* **2010**, *7* (8), 656-664.

¹³⁶ Martin, L.; Latypova, X.; Wilson, C. M.; Magnaudeix, A.; Perrin, M. L.; Yardin, C.; Terro, F. Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* **2013**, *12* (1), 289-309.

¹³⁷ Busche, M. A.; Hyman, B. T. Synergy between amyloid-beta and tau in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **2020**, *23* (10), 1183-1193.

¹³⁸ Jansen, W. J.; Ossenkoppele, R.; Knol, D. L.; Tijms, B. M.; Scheltens, P.; Verhey, F. R.; Visser, P. J.; Amyloid Biomarker Study, G.; Aalten, P.; Aarsland, D.; et al. Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: A meta-analysis. *JAMA.* **2015**, *313* (19), 1924-1938.

¹³⁹ Selkoe, D. J.; Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8* (6), 595-608.

¹⁴⁰ Congdon, E. E.; Sigurdsson, E. M. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2018**, *14* (7), 399-415.

Además, dado que en la EA se ven implicadas numerosos eventos patológicos, tales como la neuroinflamación y el estrés oxidativo, el tratamiento de esta compleja patología requiere la búsqueda de nuevas estrategias innovadoras que permitan descubrir nuevos agentes terapéuticos que frenen la muerte neuronal que se produce en la EA.¹⁴¹

1.3 BACE1 como diana terapéutica

Dado que las proteasas β y γ -secretasa son responsables del procesamiento del APP que da lugar a las especies tóxicas del A β , han sido consideradas dianas terapéuticas interesantes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, las funciones biológicas de γ -secretasa tales como la iniciación de la diferenciación y proliferación celular durante el desarrollo embrionario,¹⁴² así como el papel de esta secretasa en el procesamiento del APP no amiloidogénico, hacen que la inhibición de esta proteasa esté considerada como perjudicial. Esto ha posicionado a BACE1 en el centro de las estrategias para reducir la producción del A β y es por ello por lo que se han descrito numerosos inhibidores de β -secretasa.¹⁴³

Sin embargo, esta proteína de 501 aminoácidos representa un gran reto para los químicos médicos debido a su amplísima cavidad catalítica, donde se sitúan dos residuos aspártico catalíticos (Asp32 y Asp228) en el loop 10S, protegidos por una solapa o “*flap*”, definido entre los residuos Val67 y Glu77, que controla la apertura o cierre de esta cavidad catalítica, regulando así el acceso de sustratos (Figura 43a). El sitio de unión de ligandos de esta proteasa incluye los subsitios S1, S2, S3, S4, S1', S2', S3' y S4'.¹⁴⁴

Los inhibidores de BACE1 se pueden clasificar de la siguiente manera (Figura 43b):

- ◆ Inhibidores péptidomiméticos: Los compuestos agrupados en esta clase imitan al sustrato natural peptídico a través de fragmentos de tipo aminoacídico. También se incluyen derivados heterocíclicos que contienen bioisómeros de estados de transición, como hidroxietilaminas o isoftalamidas. En este grupo destacan inhibidores como el compuesto

¹⁴¹ Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (3), 347-372.

¹⁴² Haass, C. Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* **2004**, *23* (3), 483-488.

¹⁴³ Moussa-Pacha, N. M.; Abdin, S. M.; Omar, H. A.; Alniss, H.; Al-Tel, T. H. BACE1 inhibitors: Current status and future directions in treating Alzheimer's disease. *Med. Res. Rev.* **2020**, *40* (1), 339-384.

¹⁴⁴ Rombouts, F. J. R.; Alexander, R.; Cleiren, E.; De Groot, A.; Carpentier, M.; Dijkmans, J.; Fierens, K.; Masure, S.; Moechars, D.; Palomino-Schatzlein, M.; Pineda-Lucena, A.; Trabanco, A. A.; Van Glabbeek, D.; Vos, A.; Tressadern, G. Fragment binding to beta-secretase 1 without catalytic aspartate interactions identified via orthogonal screening approaches. *ACS Omega* **2017**, *2* (2), 685-697.

OM-003, que es capaz de interactuar con BACE1 entre los subsitios S4-S4' con un valor de K_i de 0.3 nM^{145} y la sulfona cíclica cHEA, que presenta un grupo hidroxietilamina con una Cl_{50} de 2 nM^{146}

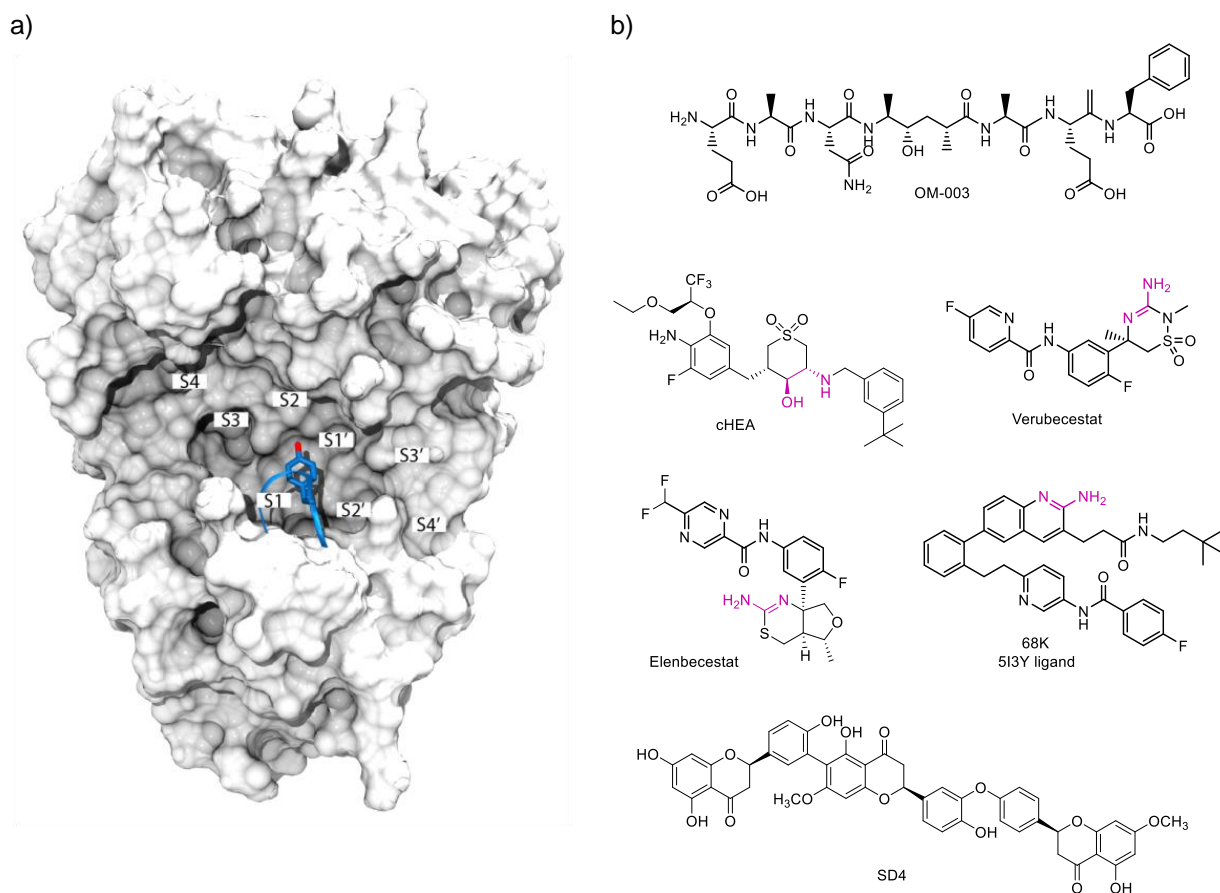


Figura 43. a) Estructura tridimensional de BACE1 y detalle de los subsitios dentro del sitio de unión con la Tyr71 en azul. b) Estructura química de algunos inhibidores descritos para BACE1.

- ◆ Inhibidores no peptidomiméticos: Son moléculas orgánicas convencionales de naturaleza heterocíclica, que presentan la ventaja de una mayor estabilidad metabólica, y en caso de ser de un tamaño adecuado también tienen mejores propiedades farmacocinéticas.¹⁴⁷ Este grupo de compuestos se caracteriza por presentar un grupo amidina como farmacóforo, además de distintos heterociclos unidos por grupos amida que tienden a ocupar los bolsillos

¹⁴⁵ Hong, L.; Turner, R. T.; Koelsch, G.; Shin, D.; Ghosh, A. K.; Tang, J. Crystal structure of memapsin 2 (beta-secretase) in complex with an inhibitor OM00-3. *Biochemistry* **2002**, *41* (36), 10963-10967.

¹⁴⁶ Rueeger, H.; Lueoend, R.; Rogel, O.; Rondeau, J. M.; Mobitz, H.; Machauer, R.; Jacobson, L.; Staufienbiel, M.; Desrayaud, S.; Neumann, U. Discovery of cyclic sulfone hydroxyethylamines as potent and selective beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) inhibitors: Structure-based design and in vivo reduction of amyloid beta-peptides. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (7), 3364-3386.

¹⁴⁷ Coimbra, J. R. M.; Marques, D. F. F.; Baptista, S. J.; Pereira, C. M. F.; Moreira, P. I.; Dinis, T. C. P.; Santos, A. E.; Salvador, J. A. R. Highlights in BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 178.

S1 a S3. Ejemplos de estos compuestos son el verubecestat (CI_{50} : 2 nM)¹⁴⁸ elenbecestat (E2609, CI_{50} : 27 nM)¹⁴⁹ o el compuesto 68K (CI_{50} : 0.8 μ M).¹⁵⁰ Algunos de estos compuestos han llegado a fases clínicas pero se discontinuaron por falta de eficacia.

- ◆ Inhibidores derivados de productos naturales: diversos compuestos derivados de flavonoides, triterpenos o esteroides han demostrado capacidad inhibitoria frente a BACE1, como el triflavonoide representado en la Figura 43b con una CI_{50} : 0.75 μ M.¹⁵¹

Aún no se ha aprobado un fármaco que sea capaz de frenar la neurodegeneración modulando esta cascada patológica, aunque han sido varios los compuestos evaluados en fases clínicas. A pesar de que fármacos como el verubecestat o elenbecestat que sí que han demostrado interaccionar con la diana de forma efectiva, ya que reducían la producción del A β así como el volumen de las placas seniles, los efectos cognitivos no han supuesto una mejora significativa de los pacientes.¹⁴³ Estos resultados demuestran la necesidad de otro tipo de fármacos para el tratamiento de estas enfermedades complejas como la EA, así los compuestos multidiana surgen como prometedores agentes terapéuticos.

1.4 ¿Cómo tratar la enfermedad de Alzheimer con compuestos multidiana?

Como se ha comentado anteriormente, una patología tan compleja como la EA podría beneficiarse del tratamiento con compuestos multidiana.^{152,153} En la literatura se pueden encontrar distintos ejemplos de este tipo de moléculas para su tratamiento. Es habitual encontrar compuestos multidiana combinando fármacos ya aprobados, como la tacrina o el donepezilo, o dirigidos a dianas farmacológicas ya validadas como la acetilcolinesterasa o el receptor NMDA.^{154,155}

¹⁴⁸ Sandgren, V.; Back, M.; Kvarnstrom, I.; Dahlgren, A. Design and synthesis of hydroxyethylene-based BACE-1 inhibitors incorporating extended P1 substituents. *Open Med. Chem. J.* **2013**, *7*, 1-15.

¹⁴⁹ Kumar, D.; Ganeshpurkar, A.; Kumar, D.; Modi, G.; Gupta, S. K.; Singh, S. K. Secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Long road ahead. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *148*, 436-452.

¹⁵⁰ Jordan, J. B.; Whittington, D. A.; Bartberger, M. D.; Sickmier, E. A.; Chen, K.; Cheng, Y.; Judd, T. Fragment-linking approach using (19)F NMR spectroscopy to obtain highly potent and selective inhibitors of beta-secretase. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (8), 3732-3749.

¹⁵¹ Zou, Z.; Xu, P.; Zhang, G.; Cheng, F.; Chen, K.; Li, J.; Zhu, W.; Cao, D.; Xu, K.; Tan, G. Selagintriflavonoids with BACE1 inhibitory activity from the fern *Selaginella doederleinii*. *Phytochemistry* **2017**, *134*, 114-121.

¹⁵² Dias, K. S.; Viegas, C. Multi-target directed drugs: A modern approach for design of new drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Neuropharmacol.* **2014**, *12* (3), 239-255.

¹⁵³ Van der Schyf, C. J. The use of multi-target drugs in the treatment of neurodegenerative diseases. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2011**, *4* (3), 293-298.

¹⁵⁴ Nepovimova, E.; Uliassi, E.; Korabecny, J.; Pena-Altamira, L. E.; Samez, S.; Pesaresi, A.; Garcia, G. E.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Bergamini, C.; Fato, R.; Lamba, D.; Roberti, M.; Kuca, K.; Monti, B.; Bolognesi, M. L. Multitarget drug design strategy: Quinone-tacrine hybrids designed to block amyloid-beta aggregation and to exert anticholinesterase and antioxidant effects. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (20), 8576-8589.

¹⁵⁵ Reggiani, A. M.; Simoni, E.; Caporaso, R.; Meunier, J.; Keller, E.; Maurice, T.; Minarini, A.; Rosini, M.; Cavalli, A. In vivo characterization of ARN14140, a memantine/galantamine-based multi-target compound for Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33172.

Otros ejemplos incluyen actividades quelantes de metales, inhibidoras de la butirilcolinesterasa, la monoaminooxidasa (MAO) o de proteínas quinasa.^{156,157,158} A pesar de los numerosos ejemplos descritos en la literatura, aún a día de hoy no hay ningún fármaco multidiana aprobado para el tratamiento de la EA.

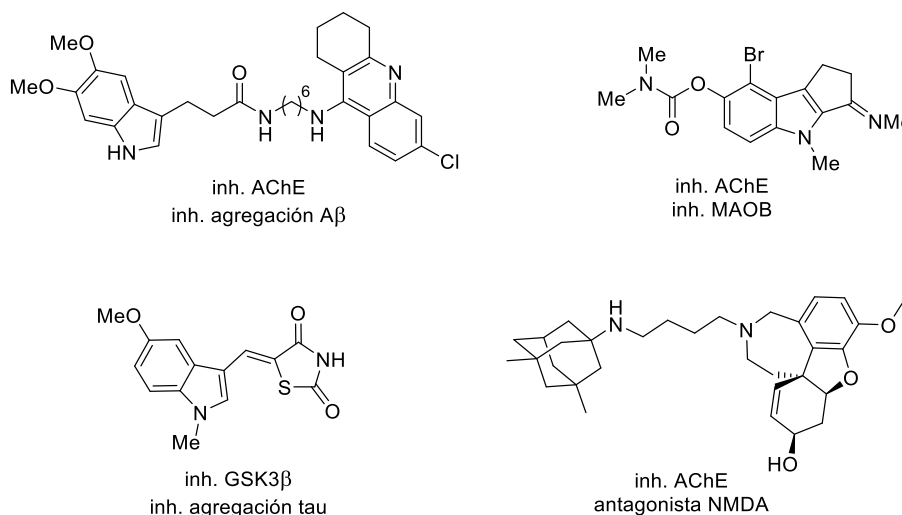


Figura 44. Estructura química de diversos inhibidores multidiana descritos para la EA.

Una de las claves de éxito para este tipo de inhibidores es la selección adecuada de las dianas a modular, en nuestro caso, se decidió intervenir en la formación de los dos principales eventos patológicos: las placas seniles, inhibiendo la proteasa BACE1 y los ovillos neurofibrilares, inhibiendo quinazas responsables de la hiperfosforilación de tau.

De esta manera el segundo objetivo de esta tesis doctoral es el diseño y síntesis de ligandos múltiples dirigidos a BACE1 y a dos proteínas quinasa implicadas en estos eventos patológicos como son LRRK2, CK1δ, GSK3β y TTBK1, incluyendo tres actividades biológicas diferentes en los compuestos multidiana.

¹⁵⁶ Silva, D.; Mendes, E.; Summers, E. J.; Neca, A.; Jacinto, A. C.; Reis, T.; Agostinho, P.; Bolea, I.; Jimeno, M. L.; Mateus, M. L.; Oliveira-Campos, A. M. F.; Unzeta, M.; Marco-Contelles, J.; Majekova, M.; Ramsay, R. R.; Carreiras, M. C. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of nitrile-containing compounds: Exploring multiple activities as anti-Alzheimer agents. *Drug Dev. Res.* **2020**, *81* (2), 215-231.

¹⁵⁷ Gandini, A.; Bartolini, M.; Tedesco, D.; Martinez-Gonzalez, L.; Roca, C.; Campillo, N. E.; Zaldivar-Diez, J.; Perez, C.; Zuccheri, G.; Miti, A.; Feoli, A.; Castellano, S.; Petralla, S.; Monti, B.; Rossi, M.; Moda, F.; Legname, G.; Martinez, A.; Bolognesi, M. L. Tau-centric multitarget approach for Alzheimer's disease: Development of first-in-class dual glycogen synthase kinase 3beta and tau-aggregation inhibitors. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (17), 7640-7656.

¹⁵⁸ Albertini, C.; Salerno, A.; de Sena Murteira Pinheiro, P.; Bolognesi, M. L. From combinations to multitarget-directed ligands: A continuum in Alzheimer's disease polypharmacology. *Med. Res. Rev.* **2021**, *41* (5), 2606-2633.

2 Resultados y discusión

2.1 Síntesis de prototipos de compuestos multidiana

Dado que los inhibidores de BACE1 son habitualmente compuestos de gran tamaño y teniendo en cuenta los farmacóforos presentes en los inhibidores de naturaleza no peptídica señalados en el apartado 1.3, partimos de una hipótesis por la cual la unión de pequeñas moléculas inhibitoras de proteínas quinasa podría dar lugar a compuestos de volumen estérico moderado como potenciales inhibidores de BACE1. Respecto a los inhibidores de quinasa, dada la amplia experiencia del grupo de investigación, se planteó partir de pequeñas moléculas presentes en la quimioteca MBC¹⁵⁹ cuya inhibición de ciertas quinasas fuera conocida. Al haber sido estos compuestos desarrollados en el grupo de investigación, las relaciones estructura química-actividad biológica se conocían, de manera que se introdujeron los cambios necesario en las moléculas en aquellas partes donde no afectarían a la actividad enzimática tras la unión de los fragmentos.

De esta manera y como prueba de concepto para nuestra hipótesis de trabajo, se eligió modular una sola quinasa, en este caso LRRK2 y BACE1. El heterociclo principal de la molécula-prueba de concepto sería un benzotiazol, fragmento conocido como inhibidor de LRRK2¹⁶⁰ y a partir de él, para generar las moléculas híbridas se plantearon dos tipos de conectores químicos: los tioéteres y los triazoles.

Los disulfuros son conectores de tipo lábil muy habituales, utilizados en el diseño de agentes conjugados, por ejemplo para unir anticuerpos y fármacos.¹⁶¹ En nuestro caso, se decidió utilizar los tioéteres para evitar la susceptibilidad que presenta el enlace disulfuro a la reducción, y dar lugar a compuestos más estables.

Por otro lado, los triazoles son considerados bioisómeros de las amidas, por lo cual, son conectores muy apropiados para ser utilizados en el diseño de un inhibidor de proteasas.¹⁶² Al mismo tiempo, la accesibilidad sintética de este conector es alta debido a que se obtiene como

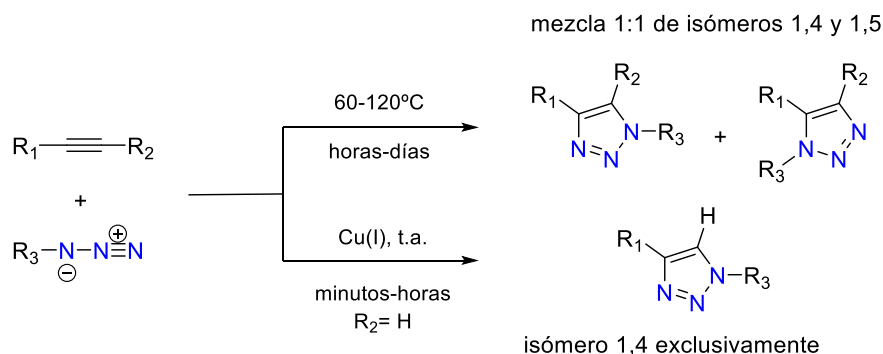
¹⁵⁹ Sebastian-Perez, V.; Roca, C.; Awale, M.; Reymond, J. L.; Martinez, A.; Gil, C.; Campillo, N. E. Medicinal and biological chemistry (MBC) library: An efficient source of new hits. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57* (9), 2143-2151.

¹⁶⁰ Zaldivar-Diez, J.; Li, L.; Garcia, A. M.; Zhao, W. N.; Medina-Menendez, C.; Haggarty, S. J.; Gil, C.; Morales, A. V.; Martinez, A. Benzothiazole-based LRRK2 inhibitors as Wnt enhancers and promoters of oligodendrocytic fate. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (5), 2638-2655.

¹⁶¹ Frigerio, M.; Kyle, A. F. The chemical design and synthesis of linkers used in antibody drug conjugates. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17* (32), 3393-3424.

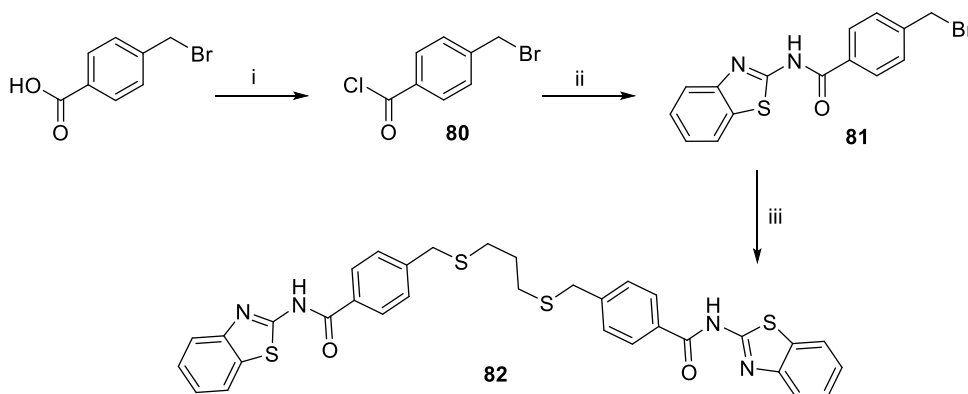
¹⁶² Bonandi, E.; Christodoulou, M. S.; Fumagalli, G.; Perdicchia, D.; Rastelli, G.; Passarella, D. The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (10), 1572-1581.

resultado de una cicloadición 1,3-dipolar de una azida con un alquino, a través de una reacción catalizada por cobre (I). Esta reacción, descrita por primera vez por Huisgen en 1960, constituye la ruta más sencilla y eficiente para sintetizar 1,2,3-triazoles disustituídos, que en ausencia del catalizador de cobre necesitan altas temperaturas y largos tiempos de reacción y conducen a una mezcla de regioisómeros 1,4 y 1,5 disustituídos (Esquema 10).

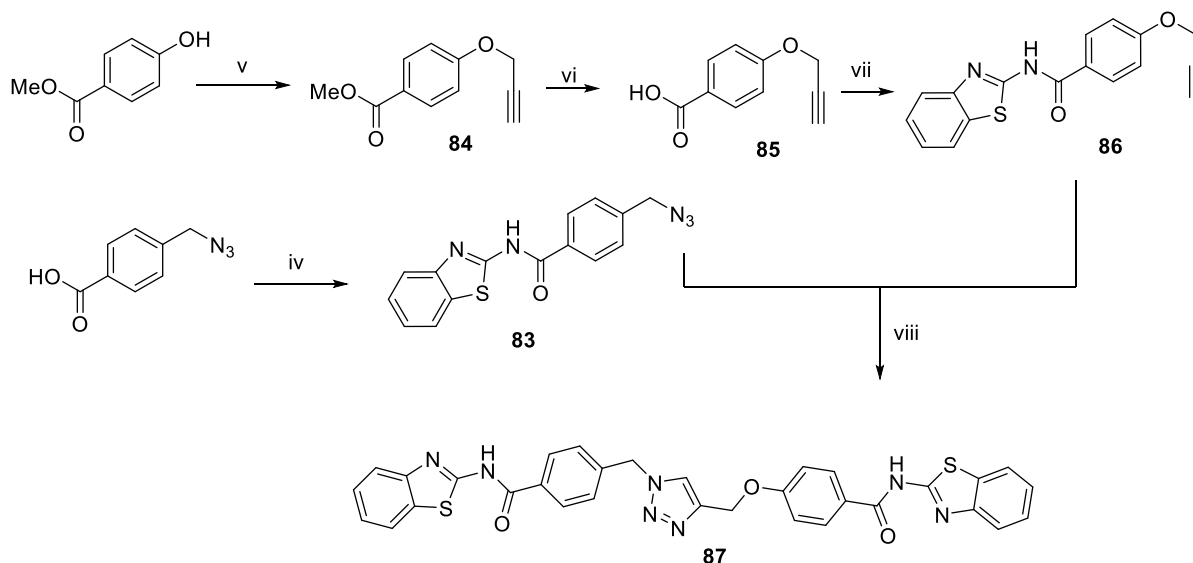


Esquema 10. Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos bajo condiciones térmicas y catalizada por cobre (I).

Partiendo del heterociclo de benzotiazol, se diseñaron y sintetizaron los compuestos descritos en el Esquema 11. En el caso del tioeter **82**, la formación del compuesto final se realizó a través de una reacción de sustitución nucleófila a partir del bromuro primario **81** con propano-1,3-ditiol, en medio básico. Para la síntesis del derivado de triazol **87**, se funcionalizaron los anillos aromáticos unidos al benzotiazol con fragmentos alquino y azida para dar lugar a los compuestos **83** y **86**. Finalmente, a través de la química click catalizada por cobre, utilizando sulfato de cobre y L-ascorbato sódico como agente reductor, se obtuvo el triazol **87**.



Esquema 11. Síntesis del prototipo de compuesto multidiana **82**. i) SOCl_2 , 80°C ; ii) 2-amino-benzotiazol, 100°C , MW, THF; iii) K_2CO_3 , propano-1,3-ditiol, THF, 80°C ;



Esquema 11 (continuación). Síntesis del prototipo de compuesto multidiana **87**. iv) EDC, DMAP, DMF, t.a., 5 min. después 2-amino-benzotiazol, t.a.; v) 3-bromopropino, K_2CO_3 , MeCN, 90 °C; vi) NaOH, MeOH:THF (1:1 v/v) t.a.; vii) EDC, DMAP, DMF, t.a. 5 min. después 2-amino-benzotiazol, t.a.; viii) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, L-ascorbato sódico, DMF, t.a.

2.2 Estudios biológicos y teóricos de los prototipos multidiana

2.2.1 Evaluación enzimática de la capacidad inhibitoria

Una vez sintetizados los compuestos **82** y **87**, se evaluó su potencial multidiana analizando la inhibición enzimática de ambos compuestos frente a la quinasa LRRK2 y la proteasa BACE1 (Tabla 8). La determinación de la inhibición de LRRK2 se realizó en Invitrogen utilizando la metodología ADAPTA¹⁶³ y la determinación de la inhibición de BACE1 se realizó en el grupo de investigación, de acuerdo con el protocolo indicado en la parte experimental, utilizando BACE1 recombinante humana y tecnología FRET.

Tabla 8. Valores de la inhibición de LRRK2 y BACE1 de los compuestos **82** y **87**.

Comp.	LRRK2 CI_{50} (μM)	BACE1 CI_{50} (μM)
82	1.88 ± 0.14	7.16 ± 0.34
87	1.83 ± 0.18	3.72 ± 0.37

¹⁶³ Kashem, M. A.; Nelson, R. M.; Yingling, J. D.; Pullen, S. S.; Prokopowicz, A. S.; Jones, J. W.; Wolak, J. P.; Rogers, G. R.; Morelock, M. M.; Snow, R. J.; Homon, C. A.; Jakes, S. Three mechanistically distinct kinase assays compared: Measurement of intrinsic ATPase activity identified the most comprehensive set of ITK inhibitors. *J. Biomol. Screen.* **2007**, *12* (1), 70-83.

La evaluación enzimática, mostró que ambos compuestos mantuvieron la actividad inhibitoria de LRRK2 y además presentaron actividad frente a BACE1, pudiendo ser considerados entonces compuestos multidiana. Además, podemos observar que la actividad inhibitoria de los compuestos en ambas enzimas está balanceada, una de las características deseables en compuestos multidiana.

2.2.2 Estudios computacionales del modo de unión de los compuestos con BACE1

Para poder conocer en profundidad el modo de unión de estos dos compuestos en la amplia cavidad catalítica de BACE1 se realizaron estudios computacionales de acoplamiento molecular con la proteasa y los compuestos **82** y **87**. Con el fin de elegir la estructura de BACE1 donde la cavidad catalítica de la proteína tuviera los aminoácidos dispuestos de una manera más adecuada para realizar los estudios de acoplamiento molecular se siguieron los siguientes pasos. En primer lugar, se descargaron las más de 400 estructuras de BACE1 con un compuesto cristalizado depositadas en el PDB y se creó una librería de compuestos. Después de prepararlos con el módulo LigPrep de Schrodinger, se utilizó el software LiSiCa,¹⁶⁴ que realiza un cribado virtual de ligandos y una puntuación de éstos en base a las similitudes tridimensionales con un compuesto de referencia, en este caso el compuesto **87**. De esta manera, se determinó que el ligando cristalizado en la estructura 5I3Y era el más similar a **87** (Coef. 0.2698).

Partiendo de esta estructura (5I3Y), y tras prepararla de manera adecuada utilizando el módulo *Protein Preparation Wizard* de Maestro, se efectuaron los estudios de acoplamiento molecular con los dos compuestos preparados con el módulo *LigPrep* y después, se realizaron cálculos de energía libre de unión (ΔG_{bind}) de las poses obtenidas con el método MM-GBSA (del inglés *Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area*). Finalmente con la mejor pose resultante, se hizo una minimización del complejo ligando-proteína, en un radio de 5Å en torno al ligando para dar flexibilidad al receptor y permitir que los residuos del sitio de unión se acomodaran mejor a los compuestos (Figura 45).

¹⁶⁴ Lesnik, S.; Stular, T.; Brus, B.; Knez, D.; Gobec, S.; Janezic, D.; Konc, J. LiSiCA: A software for ligand-based virtual screening and its application for the discovery of butyrylcholinesterase inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (8), 1521-1528.

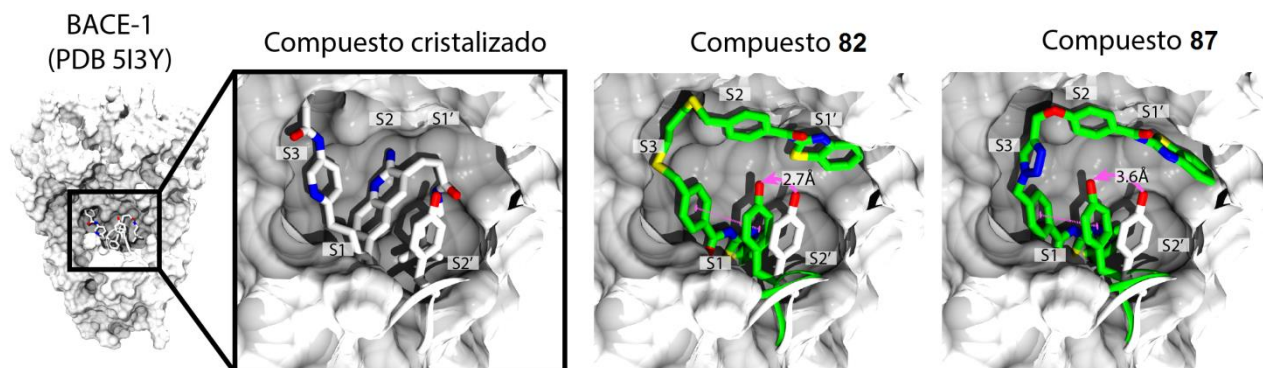


Figura 45. Representación del modo de unión del compuesto cristalizado en la estructura 5I3Y y los modos de unión obtenidos para los compuestos **82** y **87** en la cavidad catalítica de BACE1. Las líneas discontinuas rosas indican el desplazamiento de la Tyr71.

Se pudo observar que ambos compuestos se disponen de maneras similares en el sitio de unión, en torno a la Tyr71, un residuo que se ha demostrado crucial en la modulación de la actividad de la proteasa.¹⁶⁵ Ambos ligandos multidiana ocupan los mismos subsitos que el compuesto referencia y, haciendo una comparación con éste, se vio que tanto el compuesto **82** como el **87**, producen un desplazamiento de la Tyr71 (2.7Å y 3.6Å respectivamente), que se aproxima a uno de los anillos aromáticos de los compuestos para establecer con ellos interacciones de tipo π - π . Esto resulta en una conformación más cerrada del *flap* en el sitio catalítico habitual de diversos inhibidores no peptídicos de BACE1.¹⁶⁵

2.2.3 Estudio de competitividad con el sustrato en BACE1

Para confirmar los resultados del estudio computacional y demostrar que los compuestos interaccionaban con BACE1 en el sitio de unión, se realizó un experimento de competitividad con el sustrato, utilizando diferentes concentraciones de este, y el compuesto **87**. El diagrama de Lineweaver-Burk de la Figura 46 indica que el compuesto **87** es competitivo con el sustrato, al cortarse las rectas a distintas concentraciones en el eje Y del gráfico.

¹⁶⁵ Xu, Y.; Li, M. J.; Greenblatt, H.; Chen, W.; Paz, A.; Dym, O.; Peleg, Y.; Chen, T.; Shen, X.; He, J.; Jiang, H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Flexibility of the flap in the active site of BACE1 as revealed by crystal structures and molecular dynamics simulations. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2012**, *68* (Pt 1), 13-25.

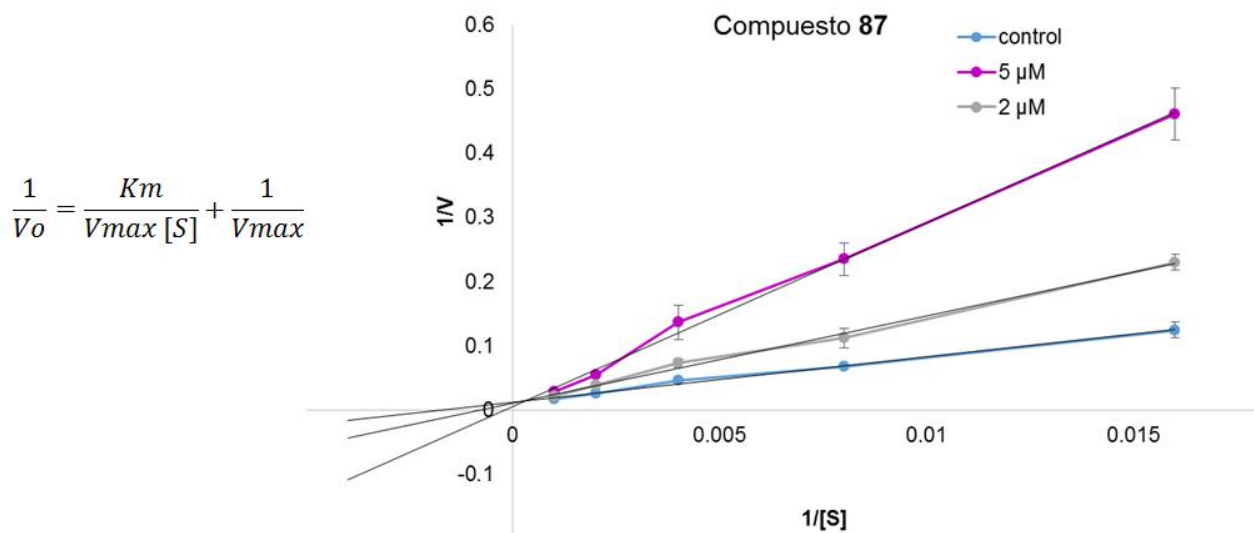


Figura 46. Ecuación y diagrama de Lineweaver-Burk del compuesto **87** en su inhibición de BACE1.

2.2.4 Ensayos celulares de reducción del péptido β -amiloide.

Para confirmar el potencial de estos nuevos compuestos multidiana en la reducción de las especies amiloidogénicas del péptido β -amiloide ($A\beta$) y en colaboración con la Dra. Eva Carro (Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre) se evaluaron en un modelo celular de neuroblastoma humano con una transfección estable del APP, que expresa altas cantidades de esta proteína y secreta $A\beta$, por acción de la BACE1 endógena.¹⁶⁶

Primero se estudió el efecto del nuevo inhibidor de BACE1, el compuesto **87**, en la viabilidad celular. Para ello se trataron dos líneas celulares, línea SK-N-MC (células control de neuroblastoma humano) y la línea SK-APP (células con sobreexpresión de APP) con el triazol durante 24 y 48 horas. En la Figura 47 se puede ver cómo hay una gran diferencia entre la viabilidad celular de las células que sobreexpresan APP con respecto de las células control ($p < 0.0001$), disminuyendo en las primeras hasta casi un 50%. El tratamiento con el compuesto **87** no afecta a la viabilidad celular de las líneas que en el caso de la línea SK-APP ya se encuentra disminuída por la sobreexpresión del APP.

¹⁶⁶ Recuero, M.; Serrano, E.; Bullido, M. J.; Valdivieso, F. Abeta production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP. *FEBS Lett.* **2004**, *570* (1-3), 114-118.

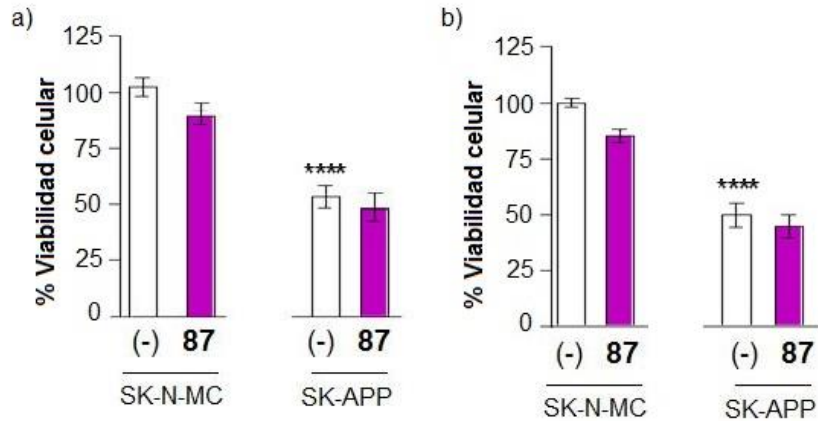


Figura 47. Efecto de la inhibición de BACE durante 24 horas (a) o 48 h (b) sobre la viabilidad celular en las células SK-N-MC y SK-APP medido mediante el ensayo MTT. En todos los casos los histogramas muestran el porcentaje de células viables referido a las células control sin tratar y son el promedio de 3 experimentos independientes \pm SEM. **** $p < 0.0001$.

Una vez descartada la toxicidad del tratamiento con el nuevo compuesto **87**, se evaluó si este inhibidor de la proteasa BACE1 era capaz de reducir la producción de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$, midiendo los niveles tanto en los lisados celulares como en el medio extracelular. Como se puede ver en la Figura 48, el tratamiento con el compuesto **87** fue capaz de reducir los niveles de $A\beta_{40}$, tanto en el medio extracelular como en los lisados, así como los niveles de $A\beta_{42}$ en el medio extracelular de manera estadísticamente significativa.

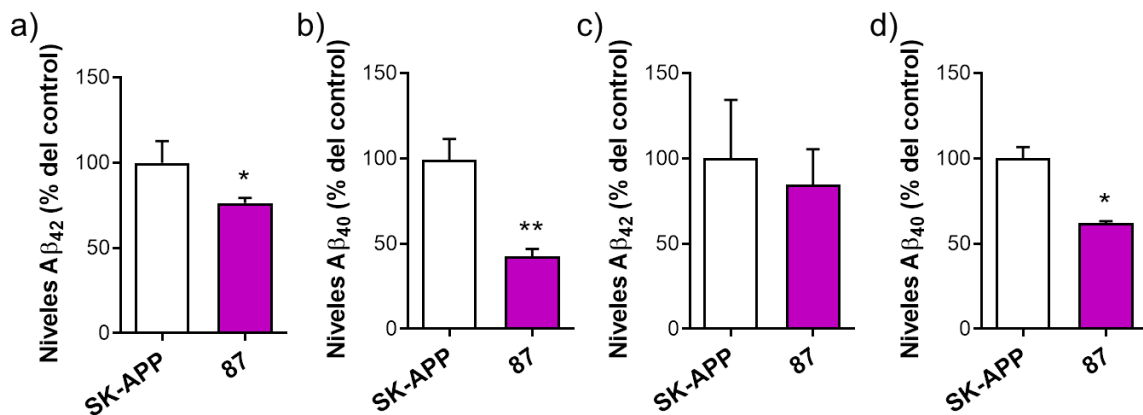


Figura 48. Niveles del fragmento de 40 y 42 aa de β -amiloide tras 24h de tratamiento con el compuesto **87** (a, b) medio extracelular (c,d) lisados celulares.

Tras analizar todos estos resultados, y viendo que ambos prototipos multidiana tienen valores de inhibición enzimática similares y se unen a BACE1 en los mismos subsitios, los dos nuevos compuestos diseñados pueden considerarse ligandos multidiana, en los que hay una

inhibición de la quinasa LRRK2 y se ha ganado la actividad inhibitoria de la proteasa. De esta manera se valida la hipótesis inicial de trabajo. Por tanto, el siguiente paso consistió en introducir otra actividad adicional: la inhibición de otra quinasa diferente. Para la síntesis de estos nuevos compuestos multidiana se optó por continuar con el anillo de triazol como conector. Tanto por la accesibilidad sintética de fragmentos alquino o azida, la compatibilidad de estos con diversos grupos funcionales como por la sencillez y versatilidad de la cicloadición 1,3-dipolar de alquinos y azidas catalizada por cobre (I), lo que hace que esta reacción sea muy utilizada en la química médica para obtener nuevas moléculas de manera rápida y eficiente.⁹⁷

2.3 Diseño y síntesis de nuevos compuestos multidiana

El punto de partida del proyecto fueron diferentes familias de compuestos dirigidas a inhibir enzimas implicadas en la EA como CK1 δ , GSK3 β , LRRK2 y TTBK1 disponibles en nuestra propia quimioteca (Figura 49). Así, analizando las estructuras químicas de las diferentes familias de compuestos se diseñaron nuevas moléculas que poseían fragmentos alquino y azida necesarios, en aquellos sitios donde no se afectara la actividad enzimática, para realizar la posterior reacción de formación de triazoles catalizada por cobre. Los compuestos de partida recogidos en la Figura 49 fueron evaluados frente a BACE1 para comprobar que no tuvieran una actividad inhibitoria basal sobre la proteasa (Tabla 9) y así poder confirmar, que la nueva actividad inhibitoria se debía a la unión de fragmentos para dar lugar a un ligando múltiple.

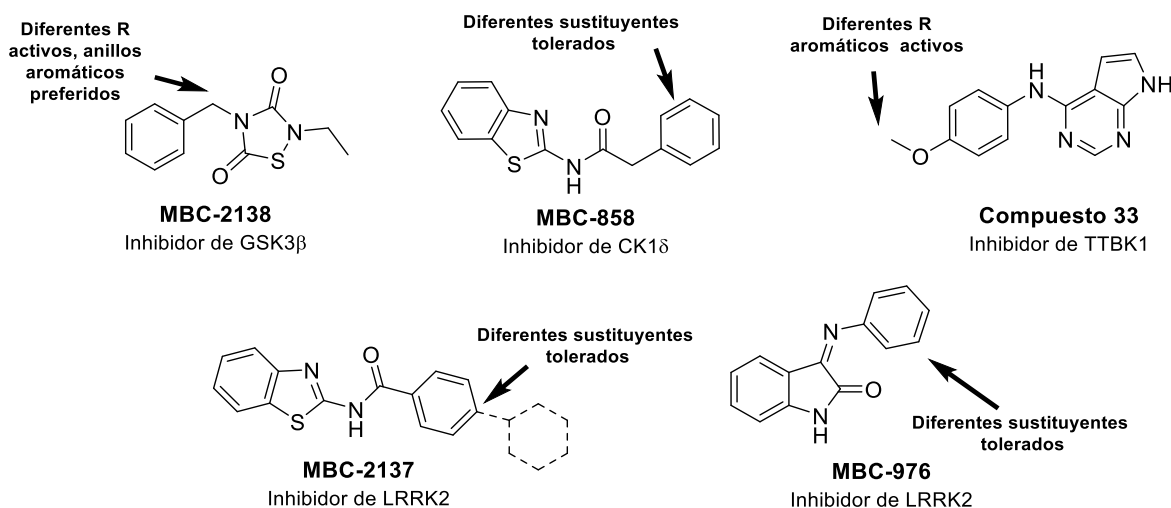
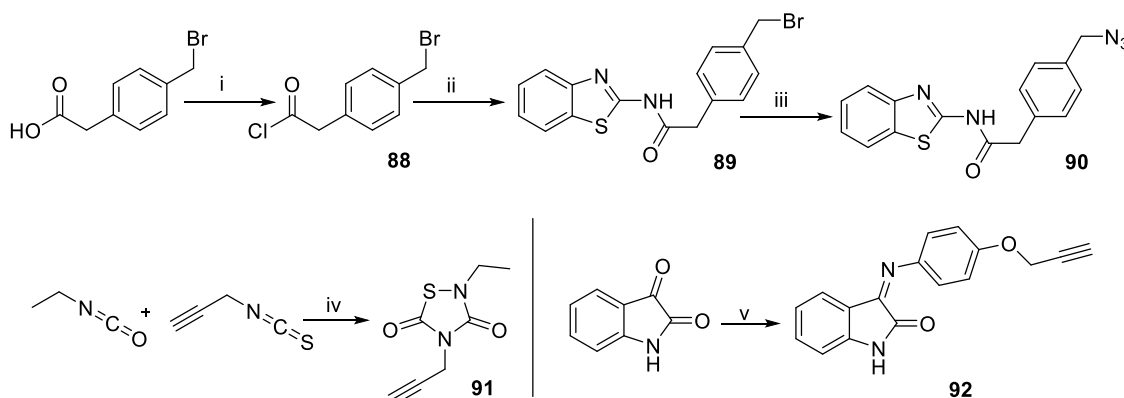


Figura 49. Estructuras químicas y modificaciones estructurales toleradas por los inhibidores de quinastas disponibles en la quimioteca del grupo de investigación.

Tabla 9. Actividad enzimática de los inhibidores de quinasas utilizados como productos de partida para el diseño de los compuestos multidiana.

Comp.	LRRK2 IC ₅₀ (μM)	CK1δ IC ₅₀ (μM)	GSK3β IC ₅₀ (μM)	TTBK1 IC ₅₀ (μM)	BACE1 IC ₅₀ (μM)
MBC-2138	-	-	0.53 ± 0.03	-	>20
MBC-858	-	0.33 ± 0.03	-	-	>20
Compuesto 33	-	-	-	0.52 ± 0.15	>20
MBC-2137	1.05 ± 0.19	-	-	-	>20
MBC-976	2.98 ± 0.36	-	-	-	>20

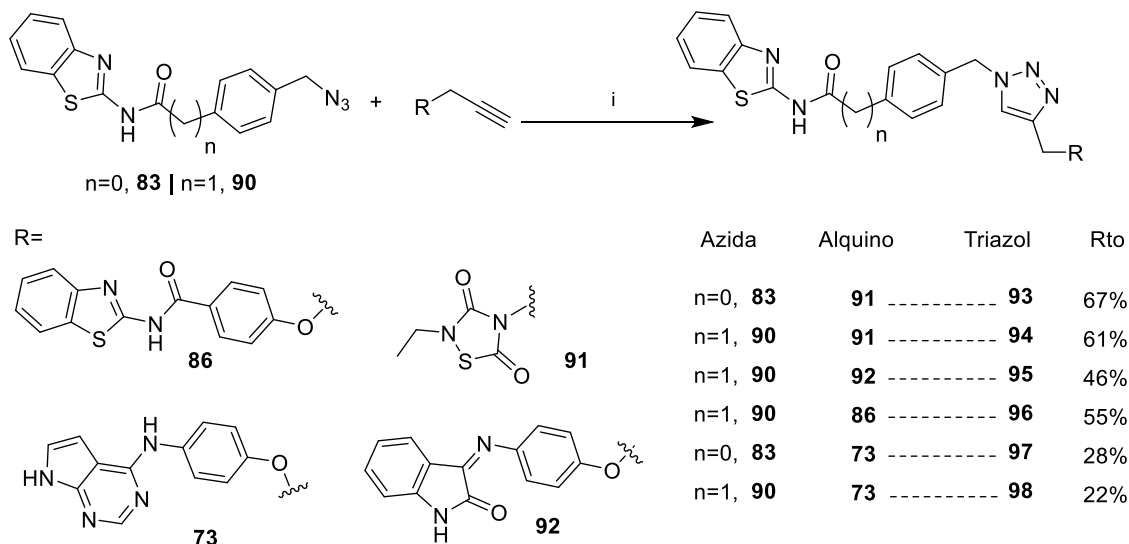
Una vez estudiadas las posiciones susceptibles de aceptar los fragmentos alquino o azida sin interferir demasiado en la actividad inhibitoria de las moléculas, se realizó la síntesis de los compuestos diseñados (Esquema 12) con excepción del derivado de TTBK1 (alquino **73**) cuya síntesis se ha descrito en el capítulo 1. La azida **90**, se obtuvo tras tres pasos de reacción: primero, la formación de un cloruro de acilo, para posteriormente realizar un acomplamiento con 2-amino-benzotiazol y finalmente producir la azida tras la sustitución del bromuro primario **89** utilizando azida sódica. La formación de la tiadiazolidindiona **91** se realizó mediante la ciclación de isotiocianato de propargilo e isocianato de etilo con cloruro de sulfurilo. Por último, la indolinona **92** se obtuvo tras la reacción de la isatina con 4-(prop-2-en-1-iloxi)anilina (Esquema 12).



Esquema 12. i) SOCl₂, THF, 70 °C; ii) 2-amino-benzotiazol, 100 °C, MW; iii) NaN₃, DMSO, t.a.; iv) SO₂Cl₂, 0 °C; v) 4-(prop-2-en-1-iloxi)anilina, EtOH, reflujo.

Estas reacciones permitieron obtener un conjunto de 2 azidas: azida **83**, derivada de un inhibidor de LRRK2 y azida **90**, derivada de un inhibidor de CK1δ, y 4 alquinos: alquino **73**, derivado de un inhibidor de TTBK1; alquino **91**, derivado de un inhibidor de GSK3β y alquinos **86** y **92**, derivados de inhibidores de LRRK2. Estos fragmentos se combinaron utilizando química click

catalizada por cobre, utilizando sulfato de cobre y L-ascorbato sódico en DMF, para dar lugar a los triazoles **93-98**, con rendimientos bajos o moderados (Esquema 13).



Esquema 13. Procedimiento de síntesis de los triazoles **93-98**: i) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, L-ascorbato sódico, DMF, t.a.

2.4 Evaluación enzimática de los nuevos compuestos multidiana

Una vez sintetizados los nuevos triazoles, la actividad inhibitoria de los compuestos fue evaluada en las correspondientes quinasas y en BACE1 (Tabla 10). Primero se evaluó la capacidad inhibitoria de los compuestos a una concentración de $10 \mu\text{M}$ por duplicado. En aquellos casos en los que el porcentaje de inhibición enzimática superó el 50%, se determinó la concentración inhibitoria 50 (Cl_{50}), realizando curvas dosis-respuesta a 10 concentraciones distintas de compuesto.

Tabla 10. Resultados de la evaluación enzimática de la inhibición de los derivados sintetizados frente a BACE1 y las quinasas correspondientes.

Comp.	LRRK2 $\text{Cl}_{50} (\mu\text{M})$	CK1 δ $\text{Cl}_{50} (\mu\text{M})$	GSK3 β $\text{Cl}_{50} (\mu\text{M})$	TTBK1 $\text{Cl}_{50} (\mu\text{M})$	BACE1 $\text{Cl}_{50} (\mu\text{M})$
93	0.82 ± 0.14	-	2.36 ± 0.27	-	3.31 ± 0.27
94	-	1.25 ± 0.21	3.85 ± 0.32		30%*
95	13.51 ± 5.23	6.47 ± 0.68	-		7.24 ± 0.38
96	7.09 ± 2.22	26%*	-		2.51 ± 0.43
97	0.24 ± 0.06	-	-	4.20 ± 1.13	0.68 ± 0.10
98	-	17.52 ± 1.20	-	0.11 ± 0.01	6.81 ± 0.19

* Inhibición enzimática a $10 \mu\text{M}$. La Cl_{50} no se calculó debido a la escasa solubilidad del compuesto

Los resultados mostraron que, en general, los nuevos derivados de triazol preparados mantuvieron su actividad inhibitoria en las quinasas de interés, excepto para el compuesto **96**, que resultó inactivo en CK1 δ . Con respecto a la actividad inhibitoria de la proteasa, pudimos observar que todos los compuestos sintetizados resultaron activos en la inhibición de BACE1 con la excepción del compuesto **94** que, debido a su baja solubilidad no pudo determinarse su CI₅₀. De todos los triazoles sintetizados destaca el compuesto **97** que presentó una CI₅₀ respecto a BACE1 diez veces menor que los demás compuestos de la serie, así como una inhibición micromolar de TTBK1 y del rango del bajo micromolar para LRRK2. Por todo ello, pudimos confirmar que la estrategia de la incorporación de triazoles como fragmento de unión resulta en compuestos multidiana que pueden ser utilizados para el tratamiento de la EA.

2.5 Estudio computacional del modo de unión de los compuestos en BACE1

Con el fin de estudiar el posible modo de unión de los nuevos triazoles que demostraron tener capacidad inhibitoria frente a la proteasa BACE1, se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular. Para ello, se realizó la misma metodología indicada en el apartado 2.2.2. En todos los casos se observó que la solapa o “*flap*” entorno a la Tyr71 se desplazaba entre 1.5 y 3Å con respecto a la posición inicial (Figura 50).

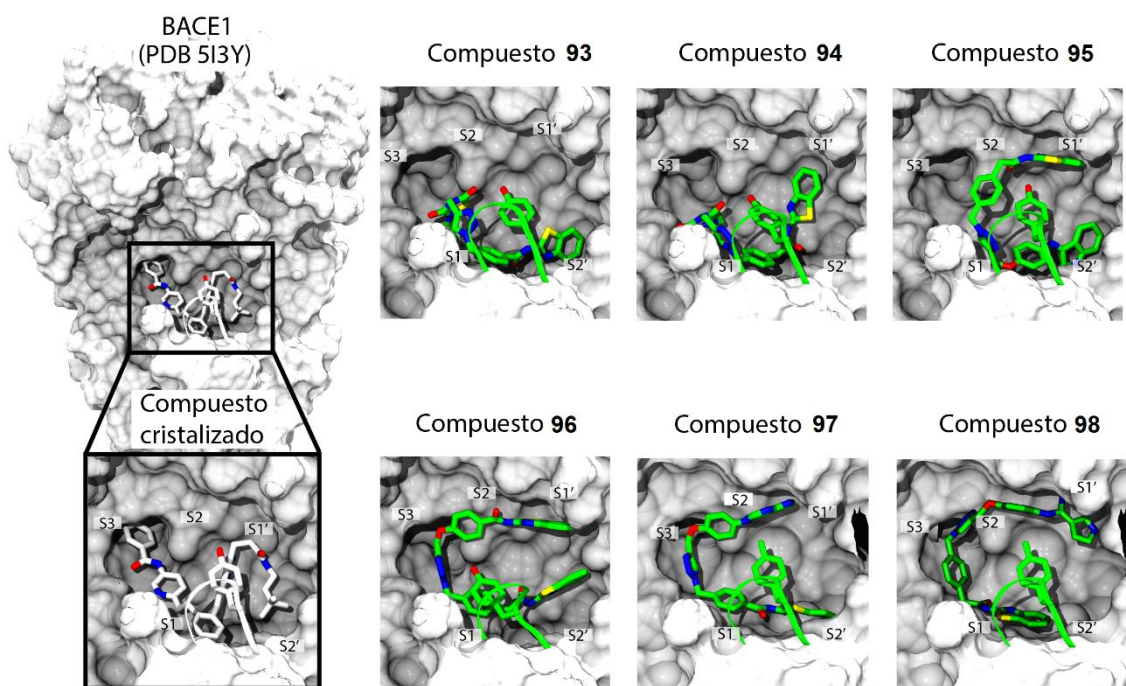


Figura 50. Modo de unión de los compuestos **93-98** en la cavidad catalítica de BACE1. La imagen de la izquierda muestra el modo de unión del compuesto cristalizado en la estructura del PDB código 5I3Y.

Además, analizando en profundidad las interacciones con la cavidad catalítica,¹⁶⁷ se puede ver que estas son de tres tipos: enlaces de hidrógeno (EdH), y electrostáticas (π - π y catión- π) y se encuentran recogidas en la Tabla 11.

Tabla 11. Interacciones observadas entre los residuos de la cavidad catalítica de BACE1 y los compuestos **93-98** en el estudio de acoplamiento molecular y valor del desplazamiento del residuo de Tyr71.

Comp.	Interacciones			Desplazamiento Tyr71	
	EdH	π - π	Catión- π		
93	Tyr71 Gln73 Gln74	Trp76 Arg128		Arg128	2.0 Å
94	Asp32	Tyr71	Tyr71		2.4 Å
95	Asn39 Tyr71 Gln73	Gly74 Trp76	Tyr71	Arg128	1.7 Å
96	Ser35 Tyr71 Arg128	Thr231 Thr232 Thr232	Tyr71	Arg128	4.0 Å
97	Tyr71 Trp76 Thr231	Thr232 Thr232 Thr329	Trp76	Arg235	2.3 Å
98	Tyr71 Lys107 Tyr198 Lys224	Thr232 Arg235 Thr329		Arg235	2.1 Å

Como se puede ver en la Figura 51, todos los compuestos establecen numerosas interacciones con la cavidad catalítica de BACE1, tanto enlaces de hidrógeno, como interacciones aromáticas de tipo π - π o catión- π , estabilizando los ligandos en el sitio de unión y haciendo que el *flap* comprendido entre los residuos Val67 y Glu77 se desplace entre 1.7 y 4 Å, de manera que la Tyr71 es capaz de establecer enlaces de hidrógeno con todos los triazoles. Esta interacción se ha reportado como clave para la flexibilidad de la cavidad catalítica y la redefinición de los subsitios S1 y S2', de manera que puedan alojar mejor ciertas moléculas.¹⁶⁵

¹⁶⁷ Adasme, M. F.; Linnemann, K. L.; Bolz, S. N.; Kaiser, F.; Salentin, S.; Haupt, V. J.; Schroeder, M. PLIP 2021: expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (W1), W530-W534.

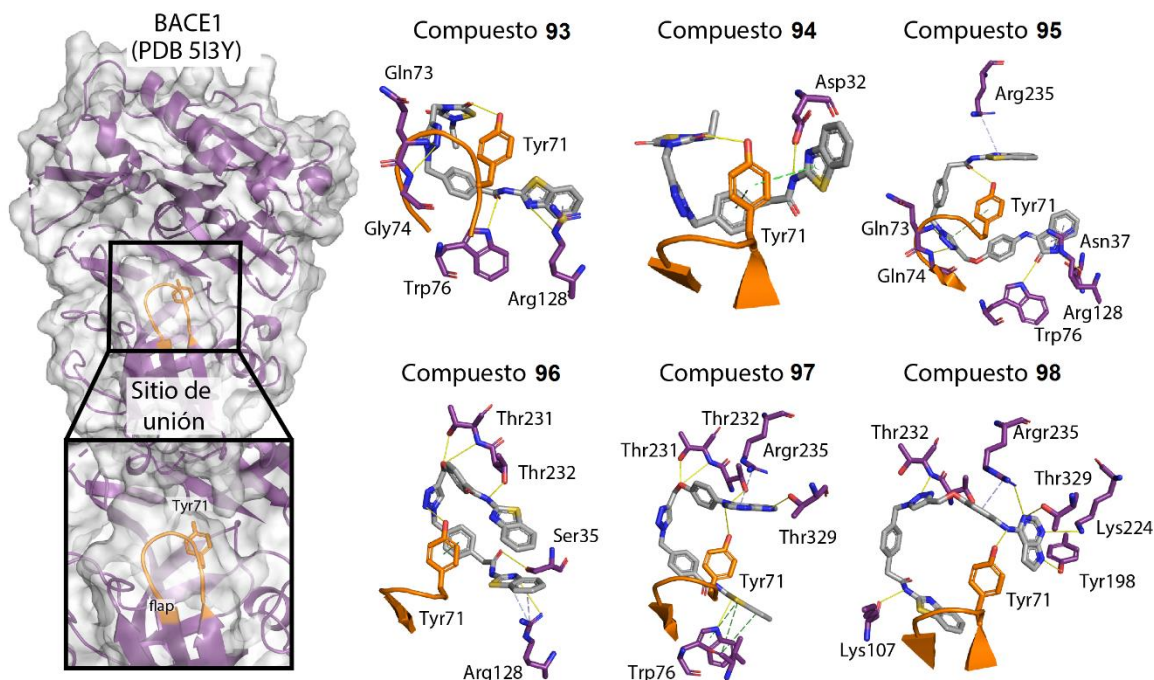


Figura 51. Detalle de las interacciones de los compuestos **93-98** con BACE1 observadas en el estudio de acoplamiento molecular ligando-proteína. En naranja se muestra el residuo Tyr71 del *flap*, en amarillo los EdH, en azul las interacciones catión- π y en verde las interacciones π - π .

2.6 Evaluación biológica de los nuevos compuestos multidiana en modelos celulares representativos

Una vez comprobado que los triazoles multidiana sintetizados presentaban actividad inhibitoria de quinasas y de la proteasa BACE1 y estudiar su modo de unión con la proteasa, se estudió el potencial de estos compuestos en ensayos celulares representativos para confirmar la ventaja de tratar patologías complejas como la EA con moléculas multidiana. Para este fin se utilizaron dos ensayos diferentes, uno evaluó el potencial de los nuevos compuestos en un modelo relacionado con la producción del péptido β -amiloide y el otro estudió la consecuencia de la inhibición de la actividad de ciertas quinasas en un modelo relacionado con la hiperfosforilación de tau.

2.6.1 Evaluación en un modelo de la patología del β -amiloide

Tal y como se describió en el apartado 2.2.4, los nuevos triazoles sintetizados fueron ensayados en células que sobreexpresan la proteína precursora del β -amiloide (SKK-APP) y fueron comparadas con aquellas células control que no poseían esa sobreexpresión (SK-N-MC). En un primer ensayo se evaluó si el tratamiento con los nuevos compuestos a 10 μ M tenía algún efecto

tóxico sobre la viabilidad de estas líneas celulares (Figura 52). Se puede observar que la viabilidad de las células que sobreexpresan APP se ve disminuida hasta casi un 50% en comparación con las células control. De acuerdo con la Figura 52, los compuestos **95** y **96** reducían significativamente la viabilidad celular de las células control tanto a 24 como a 48 horas y por lo tanto se descartaron en los siguientes ensayos celulares.

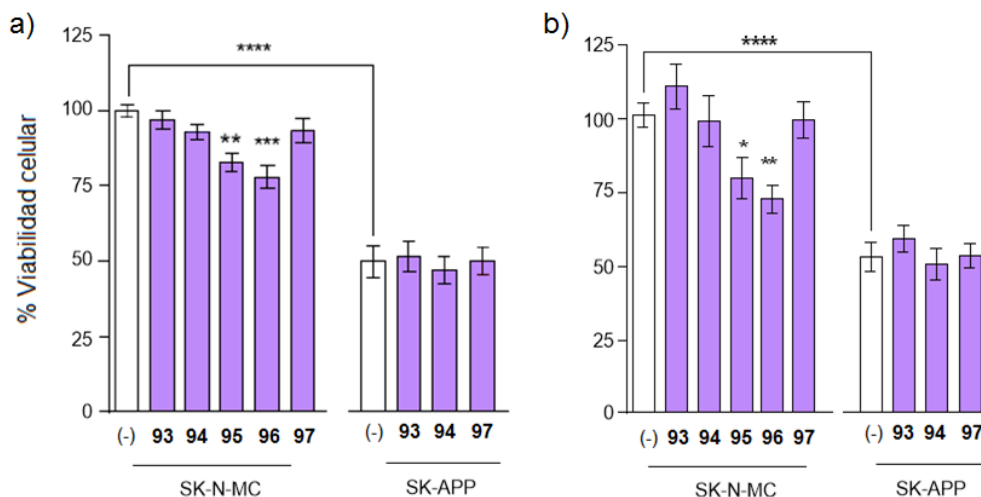


Figura 52. Efecto de los triazoles **93-97** sobre la viabilidad de las células SK-APP a) después de 24 h de tratamiento, b) después de 48 h de tratamiento. En todos los casos los histogramas muestran el porcentaje de células viables referido a las células control sin tratar y son el promedio de 3 experimentos independientes \pm SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ y **** $p<0.0001$.

Tras este primer ensayo, se analizaron los niveles de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ después del tratamiento con los compuestos **93**, **94** y **97** durante 48 horas en la línea celular SK-APP, que es la que sobreexpresa el APP y por tanto, es donde se espera que haya una mayor producción de los péptidos $A\beta$. Los niveles de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ se midieron tanto en los lisados celulares como en el medio extracelular (Figura 53).

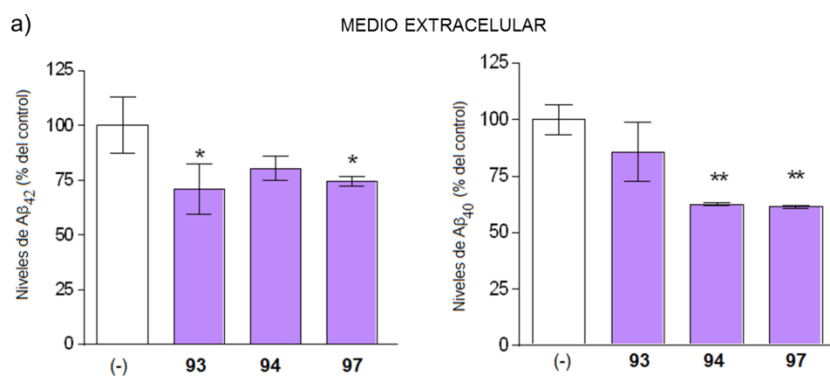


Figura 53. Niveles de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en medidos en a) el medio extracelular y b) en los lisados celulares. En todos los casos, los histogramas muestran el porcentaje de $A\beta_{40}$ o $A\beta_{42}$ referido a las células SK-APP sin inhibidores y son el promedio de 3 experimentos independientes \pm SEM. * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ medidos con un ensayo ELISA.

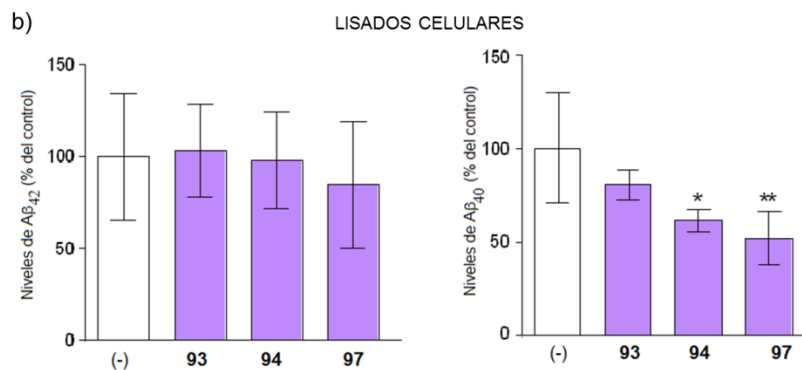


Figura 53 (continuación). Niveles de Aβ₄₀ y Aβ₄₂ en medidos en a) el medio extracelular y b) en los lisados celulares. En todos los casos, los histogramas muestran el porcentaje de Aβ₄₀ o Aβ₄₂ referido a las células SK-APP sin inhibidores y son el promedio de 3 experimentos independientes ± SEM. **p*<0.05 y ***p*<0.01 medidos con un ensayo ELISA.

Se puede ver que, en general, los compuestos reducen de manera significativa los niveles del péptido Aβ₄₂ en el medio extracelular, mientras que los niveles del péptido Aβ₄₀ se vieron reducidos tanto en el medio extracelular como en los lisados tras el tratamiento con los compuestos. Estos resultados demuestran que estos inhibidores de BACE1 son capaces de modular la producción de los oligómeros amiloidogénicos y por lo tanto, podrían interferir en la producción de las placas seniles, reduciendo su formación, aunque esto debería ser confirmado en modelos *in vivo*.

2.6.2 Evaluación en un modelo de la patología de tau

Los ligandos multidiana sintetizados se evaluaron también en un modelo de toxicidad por hiperfosforilación de tau. Como se ha comentado en el capítulo 1 de la presente tesis doctoral, el tratamiento de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) con el ácido ocadaico, un inhibidor de la fosfatasa PP2A, produce una hiperfosforilación de tau que conduce a una reducción de la viabilidad celular.¹¹⁴ Así pues, se evaluaron en este modelo, los triazoles multidiana anteriormente sintetizados y capaces de modular la producción del péptido β-amiloide. En este caso, se determinó si los nuevos compuestos multidiana eran capaces de revertir la muerte celular causada por el tratamiento con el ácido ocadaico y además se evaluó si el efecto del ligando multidiana ofrecía ventajas en la neuroprotección celular comparándolo con el tratamiento sinérgico de las células con las moléculas de origen (Figura 54).

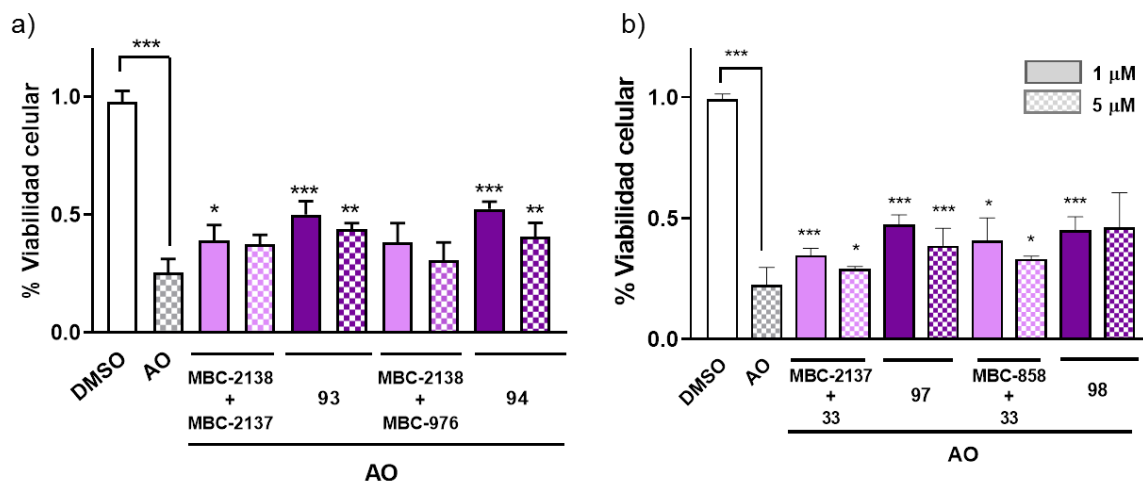


Figura 54. Viabilidad celular en presencia o ausencia de compuestos multidiana a 1 y 5 μM , en células SH-SY5Y a) compuestos **93** y **94**, b) compuestos **97** y **98**. El ensayo MTT se utilizó para determinar la viabilidad celular 24 horas después del tratamiento con los fármacos. Cada punto de datos representa la media \pm SEM de tres réplicas en cuatro experimentos diferentes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significativamente diferente de las células control).

Según se observa en la Figura 54a el tratamiento con los triazoles **93** y **94**, produjo un aumento significativo de la viabilidad celular tanto a 1 como a 5 μM , viéndose al mismo tiempo que este efecto no se conseguía con el tratamiento simultáneo con los fragmentos inhibidores de quinasas (MBC-2138 + MBC-2137 y MBC-2138 + MBC-976, respectivamente). Para los triazoles **97** y **98**, se observó que el tratamiento con el compuesto multidiana ofrecía un rescate de la muerte neuronal con mayor nivel de significancia ($p < 0.001$) respecto al tratamiento simultáneo con los fragmentos. Todos estos datos demuestran la ventaja de la administración de una sola molécula que posea más de una actividad terapéutica, confirmando por tanto el valor de los triazoles aquí sintetizados en el tratamiento de patologías complejas como la EA.

2.7 Química click *in situ* utilizando BACE1 como molde de reacción

De acuerdo con los resultados expuestos, se puede ver que el diseño y síntesis de compuestos multidiana es una buena estrategia para el tratamiento de enfermedades complejas como la EA. Si bien, la metodología clásica expuesta a lo largo del capítulo que implica la combinación de fragmentos inhibidores de quinasas permite gran versatilidad al mismo tiempo consume mucho tiempo y recursos, puesto que es necesaria la síntesis de los fragmentos y posteriormente la de los triazoles para poder confirmar la actividad enzimática del compuesto final en BACE1. Para solventar este problema se puso a punto la metodología denominada química click *in situ*, descrita por primera vez por Sharpless y Kolb para obtener inhibidores de

acetilcolinesterasa.¹⁶⁸ La química click *in situ* se vale de la propia enzima a inhibir para dirigir el descubrimiento de nuevos compuestos: aquellos fragmentos que tras interactuar con la diana de manera complementaria puedan unirse de manera irreversible entre sí.

En nuestro caso, se utilizó BACE1 como molde de reacción con la hipótesis de que la proteasa podría seleccionar aquellos fragmentos que tras disponerse de manera adecuada dentro de la cavidad catalítica de la enzima, ésta pudiera catalizar la formación del triazol. De esta manera, partiendo de fragmentos inactivos en la proteasa, ésta sería capaz de catalizar la formación de triazoles solo para aquellos compuestos para los que este compuesto final estableciera importantes interacciones y por lo tanto, fuera capaz de inhibir la actividad enzimática de BACE1.

Para poner a prueba la hipótesis se eligió estudiar la formación del triazol **87** a partir de sus correspondientes fragmentos **83** y **86**. Durante la optimización del método se evaluaron distintos parámetros experimentalmente:

- ◆ El medio de la reacción: tampón de fosfato salino (PBS) a pH 7.0 o acetato sódico a pH 4.5.
- ◆ El tiempo de la incubación con la proteasa: 24 o 40 horas.
- ◆ Distintas concentraciones de BACE1: 0.25, 0.5 y 1 μM .
- ◆ Distintas concentraciones de los fragmentos: 0, 10, 15, 30, 100 y 200 μM .

Se realizaron distintos experimentos de incubación de la enzima recombinante humana BACE1, junto con los fragmentos **83** y **86**, que inicialmente venían de disoluciones stock en DMSO, y que fueron llevadas a la concentración final deseada en un tampón acuoso a un volumen final de 50 μL . Las reacciones se incubaron en el tiempo y temperaturas determinados en cada caso y finalmente la formación de los triazoles fue analizada mediante HPLC-MS con el modo de SIM (del inglés *single ion mode*), obteniendo las siguientes conclusiones:

- ◆ Las reacciones ensayadas utilizando PBS como medio de reacción dieron resultados poco reproducibles, al contrario que con el tampón de acetato sódico. Esto puede deberse a que el pH óptimo para la actividad enzimática de BACE1 se encuentra en torno a 4.5.¹⁶⁹

¹⁶⁸ Manetsch, R.; Krasinski, A.; Radic, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. *In situ* click chemistry: Enzyme inhibitors made to their own specifications. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (40), 12809-12818.

¹⁶⁹ Yuan, J.; Venkatraman, S.; Zheng, Y.; McKeever, B. M.; Dillard, L. W.; Singh, S. B. Structure-based design of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (11), 4156-4180.

- ◆ A las 24 horas se observaba formación del triazol y no hay diferencia significativa respecto a la formación a las 40 horas, por lo que se fijó el tiempo de incubación en 24 horas (Figura 55).

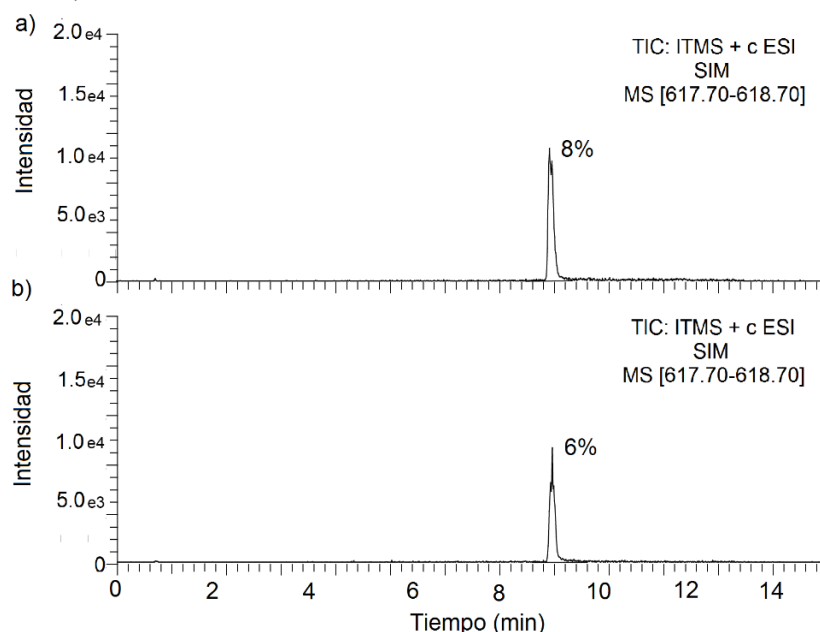


Figura 55. HPLC-MS-SIM de la incubación de BACE1 (0.5 μ M) con **83** y **86** (30 μ M) tras a) 24 horas b) 40 horas.

- ◆ Respecto a la concentración óptima de proteasa, por un lado confirmamos que en ausencia de BACE1 los triazoles no se formaban (Figura 56), mientras que a medida que se aumentaba la concentración de la enzima, el área de triazol formado aumentaba. Finalmente se eligió realizar los experimentos con una concentración de BACE1 de 0.5 μ M, ya que no se observaban diferencias significativas respecto al doble de concentración.

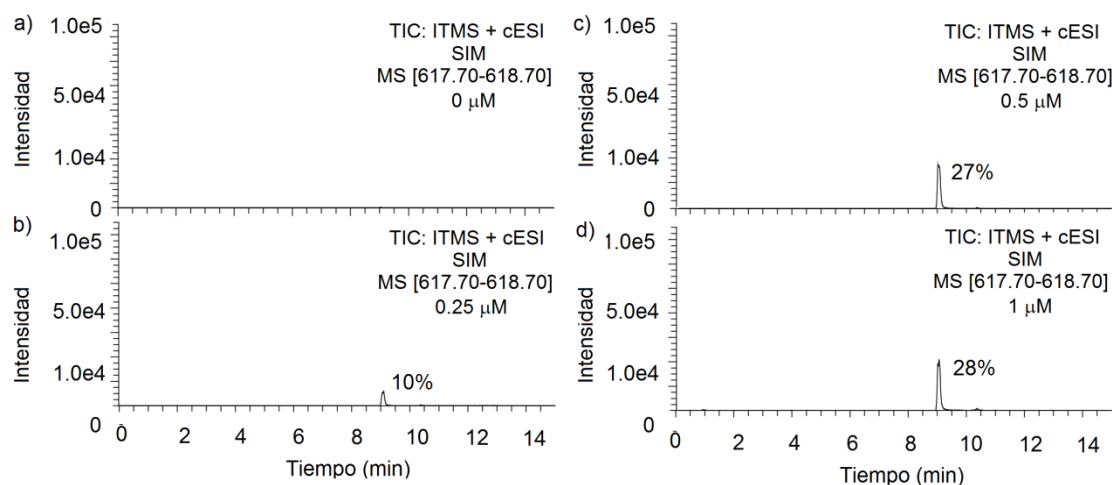


Figura 56. Optimización de la concentración de BACE1 para la reacción de química click *in situ* entre **83** y **86** utilizando a) 0 μ M, b) 0.25 μ M, c) 0.5 μ M d) 1 μ M de BACE1.

- ◆ Respecto a las concentraciones de los fragmentos, se incubaron distintas concentraciones de **83** y **86** utilizando una concentración fija de 0.5 μM de BACE1. Como se puede ver en la Figura 57, la formación del triazol se observa a partir de una concentración de 15 μM y hasta 200 μM . Se eligió una concentración de fragmentos de 100 μM como la óptima ya que proporcionaba una altura de pico aceptable (Figura 57d).

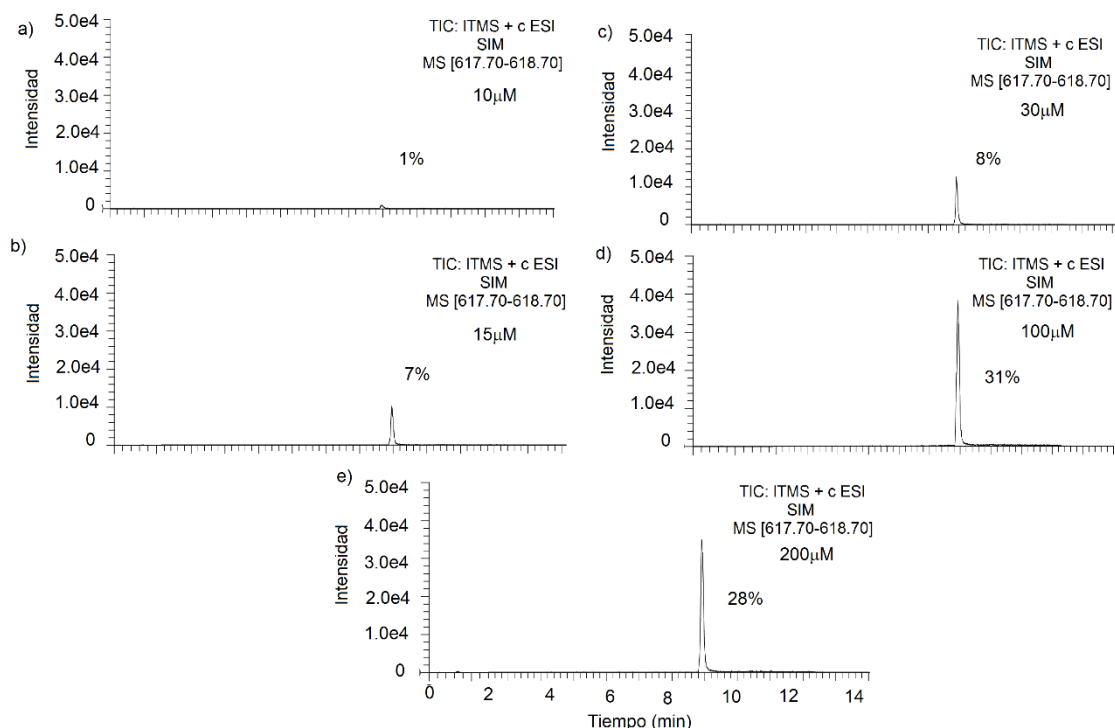
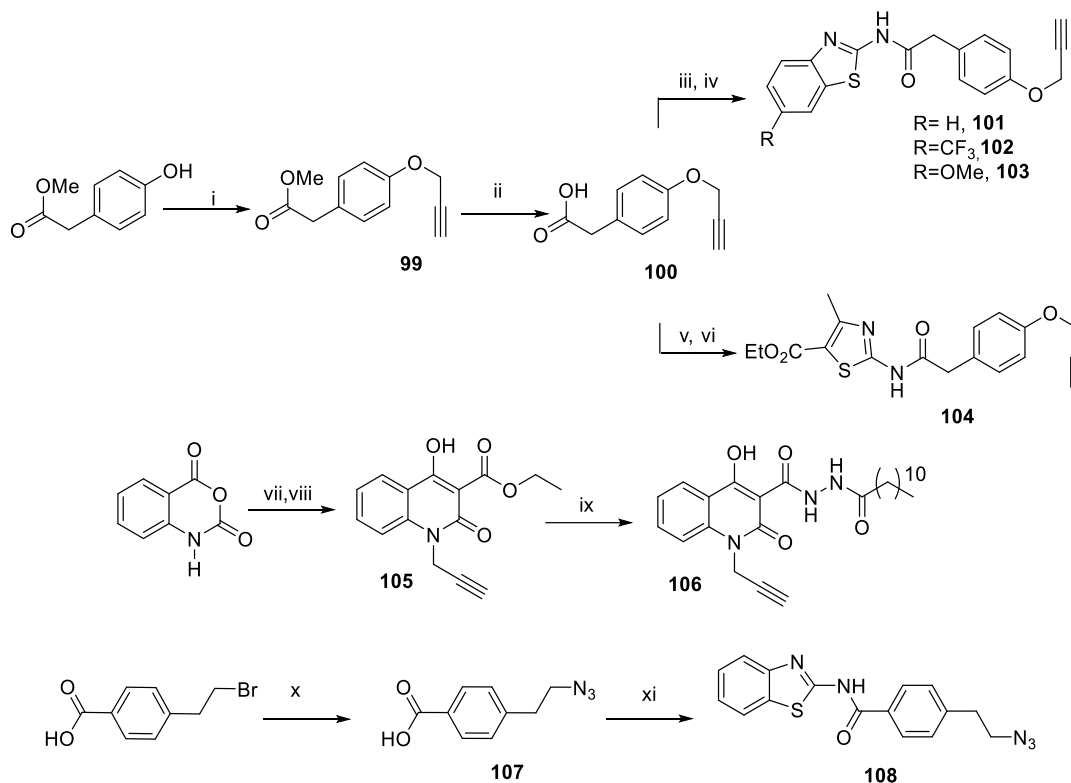


Figura 57. Optimización de la concentración de los fragmentos para la reacción de química click *in situ* entre la azida **83** y el alquino **86** utilizando a) 10 μM , b) 15 μM , c) 30 μM , d) 100 μM y e) 200 μM con BACE1 (0.5 μM).

Una vez optimizadas las condiciones de la química click *in situ*, se establecieron los siguientes parámetros: concentración de BACE1: 0.5 μM , concentración de fragmentos: 100 μM , temperatura: ambiente, tampón: acetato sódico a pH 4.5 y tiempo de incubación: 24 horas.

Para continuar con la preparación de compuestos multidiana, se sintetizó una pequeña quimioteca de alquinos y azidas derivados de distintos inhibidores, descritos en el Esquema 14. Los alquinos **101-103** derivan de inhibidores de CK1 δ y se obtuvieron a través de la reacción del ácido 2-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)acético (**100**) con cloruro de tionilo para dar lugar al correspondiente cloruro de acilo que se acopló con distintos 2-aminobenzotiazoles. Los compuestos **104** y **106** son derivados de inhibidores de GSK3 β . El compuesto **104** se obtuvo de la misma manera que los

benzotiazoles anteriores pero haciendo reaccionar el cloruro de acilo con 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo. El alquino **106** se obtuvo a través de la reacción de **105** con dodecilhidrazida.



Esquema 14. i) 3-bromopropino, K₂CO₃, THF, 80 °C; ii) NaOH, H₂O:THF (1:4 v/v) t.a.; iii) SOCl₂, CH₂Cl₂, 70 °C; luego iv) 2-amino-benzotiazol, THF, 110 °C, MW; v) SOCl₂, THF, 70 °C; luego vi) 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo, THF, 120 °C, MW; vii) 3-bromopropino, NaH, DMF, 0 °C; viii) malonato de etilo, NaH, DMF, 85 °C; ix) dodecil hidrazida, DMF, 160 °C; x) NaN₃, DMF, 80 °C; xi) EDC, DMAP, DMF, t.a., 5 min luego 2-amino-benzotiazol, t.a.

Tras la síntesis de los fragmentos se realizaron los experimentos de química click *in situ* con BACE1 con diferentes parejas de azida y alquino para seleccionar aquellas parejas de fragmentos que dieran lugar a triazoles activos frente a la proteasa. Se realizaron en total 19 reacciones de química click *in situ* combinando los fragmentos sintetizados (Figura 58). Como se puede ver en la Figura 58, tras las reacciones de química click *in situ* se observaron picos en las mezclas de 10 parejas, considerándolas como *hits* positivos y en aquellas mezclas donde no se observó el pico correspondiente al triazol se consideraron negativos, un total de 9.

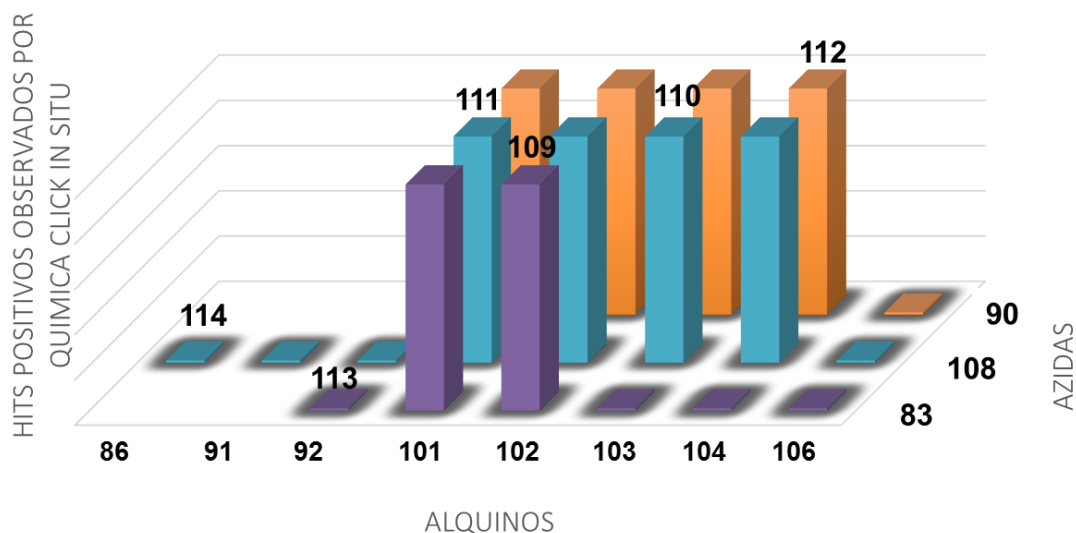
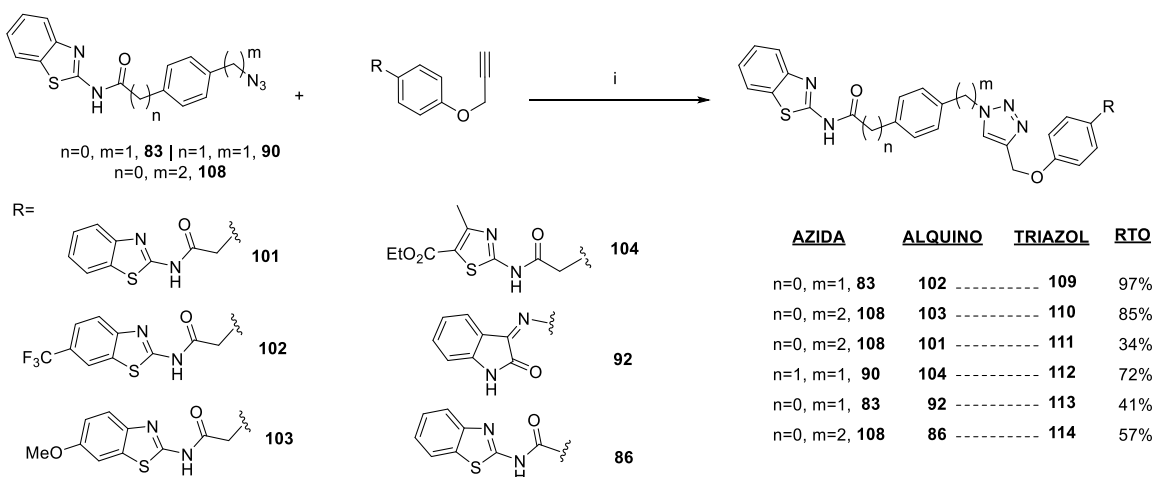


Figura 58. Hits obtenidos tras las diferentes reacciones de química click *in situ* utilizando BACE1 como molde de reacción. Los datos representados son el resultado de dos experimentos independientes.

A continuación se realizó la síntesis orgánica tradicional de algunos de los triazoles, tanto los hits negativos como los positivos (Esquema 15). Los números encima de las barras de la Figura 58 indican los códigos de los triazoles sintetizados para confirmar la validez de la metodología: los compuestos **109-112** deberían ser inhibidores de BACE1 mientras que los compuestos **113** y **114** no deberían presentar esa actividad biológica. La síntesis de los triazoles se realizó siguiendo la metodología de química click de alquinos y azidas catalizada por cobre (I), como en ocasiones, anteriores obteniendo rendimientos de moderados a muy buenos.



Esquema 15. Síntesis orgánica de los triazoles **109-114**: i) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, L-ascorbato sódico, DMF, t.a.

Tras la síntesis orgánica, la actividad enzimática de los triazoles fue ensayada tanto en sus quinasas de interés como en la proteasa BACE1, de acuerdo con lo descrito anteriormente. Como se puede ver en la Tabla 12, los cuatro triazoles identificados como inhibidores de BACE1 (**109-112**) en la metodología de química click *in situ* fueron confirmados como tal mediante el ensayo enzimático. Estas moléculas presentaban además inhibición enzimática de sus quinasas de interés, con valores de Cl_{50} balanceados entre todas las actividades inhibitorias. Por otro lado, los triazoles **113** y **114** no presentaron actividad enzimática frente a BACE1, tal y como predijo la metodología de química click *in situ*.

 Tabla 12. Actividad enzimática de los triazoles seleccionados por química click *in situ*.

Comp.	LRRK2 % inhibición o Cl_{50} (μ M)	CK1 δ % inhibición o Cl_{50} (μ M)	GSK3 β % inhibición	BACE1 % inhibición o Cl_{50} (μ M)
109	0.71 \pm 0.26	0.40 \pm 0.06	-	7.21 \pm 0.35
110	0.44 \pm 0.10	12.58 \pm 0.70	-	11.00 \pm 1.36
111	3.19 \pm 1.01	30%*	-	8.57 \pm 0.45
112	-	5.40 \pm 0.91	26%*	6.76 \pm 0.61
113	54%*	-	-	<20%
114	98%	-	-	<20%

Estos resultados confirman la validez de la química click *in situ* para para acelerar el descubrimiento de nuevos inhibidores de la proteasa BACE1.

2.8 Predicción del paso de la barrera hematoencefálica de los compuestos multidiana

Por último, y dado que los compuestos sintetizados interaccionan con dianas terapéuticas presentes en el SNC, es preciso que estas moléculas sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Siguiendo la metodología descrita en el capítulo 1 se evaluó la permeabilidad efectiva experimental de los triazoles activos frente a BACE1 mediante la metodología de PAMPA.

En este caso el protocolo se modificó ligeramente para poder medir las absorbancias de los compuestos mediante HPLC-MS. En primer lugar y para validar el ensayo se midió la permeabilidad efectiva de fármacos en uso cuya permeabilidad experimental de la BHE humana es conocida y la

correlación lineal entre los valores experimentales obtenidos y los bibliográficos dio un buen valor de correlación ($R^2 = 0.9638$) (Figura 59).

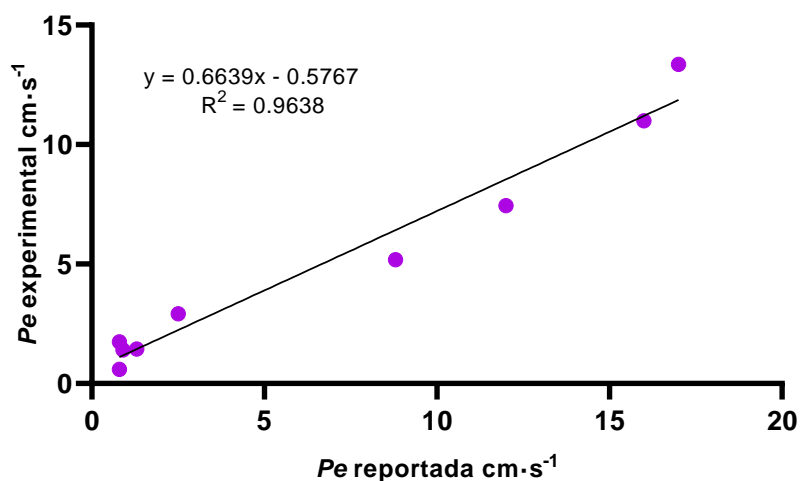


Figura 59. Correlación lineal entre el valor de Pe experimental y el descrito en la bibliografía para los nueve compuestos comerciales utilizados como controles en el experimento de PAMPA. Nota: la hidrocortisona no fue utilizada como compuesto control al no observarse su absorbancia en el detector de fotodiodos (PDA) del equipo de cromatografía.

Una vez validado el ensayo, la recta de correlación obtenida permitió definir los valores para clasificar un compuesto como permeable al SNC. Aquellos compuestos con un valor de $Pe > 3.20 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, fueron definidos como permeables (SNC+) y aquellos con un valor de $Pe < 1.90 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ no serían permeables (SNC-). Los compuestos que presentaran valores comprendidos entre estos dos valores no podrían ser predichos adecuadamente con este método, al quedar en la zona de incertidumbre experimental. Finalmente, se procedió a evaluar la capacidad de atravesar la BHE de los triazoles activos. Los compuestos **87**, **96** y **112** resultaron insolubles en las condiciones del ensayo, mientras que la permeabilidad efectiva experimental de los triazoles (**93-95**, **97-98** y **109-111**) se recoge en la Figura 60. El compuesto **95** no se pudo confirmar al aparecer en la zona de incertidumbre. Por otro lado, los compuestos **93** y **110** no se detectaron en la placa aceptora de acuerdo con los resultados del HPLC-PDA por lo que su permeabilidad fue determinada negativa. Por tanto, dos de los compuestos multidiana aquí descritos (**94** y **111**) podrían ser considerados

como buenos candidatos para el tratamiento de la EA al ser permeables al SNC y tener tres actividades biológicas diferentes con buenas propiedades en cultivos celulares.¹⁷⁰

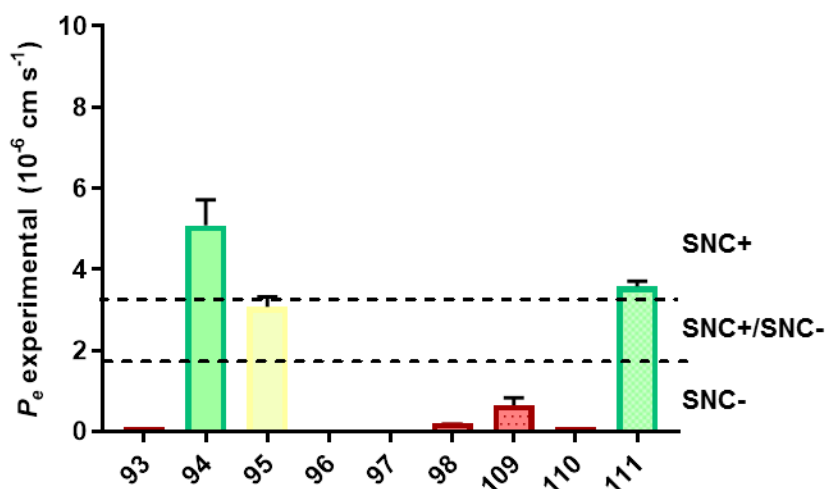


Figura 60. Permeabilidad efectiva a través de la BHE de los triazoles activos en BACE1 utilizando la metodología PAMPA (SNC+, permeable; SNC- no permeable; SNC+/SNC- están en el área gris y no se puede determinar su permeabilidad pasiva con este ensayo).

Estos datos confirman la dificultad de los compuestos multidiana para presentar unas buenas propiedades farmacocinéticas. En un esfuerzo por mejorarlas se podrían seguir distintas estrategias. Por un lado, introducir grupos funcionales que mejoraran la lipofilia y la solubilidad de las moléculas, reduciendo la fracción de carbonos sp², algo que se ha descrito como favorable no sólo para mejorar la propiedades farmacocinéticas¹⁷¹ sino en el caso de los inhibidores de BACE1, para que éstos presenten una mejor complementariedad respecto al sitio de unión.¹⁷² Por otro lado, la formulación de compuestos poco permeables al SNC en nanopartículas orgánicas ha demostrado ser una estrategia eficaz para aquellos fármacos que tienen dificultad para permear la BHE y podrían utilizarse para encapsular estos triazoles estando estos trabajos en curso.^{81,173}

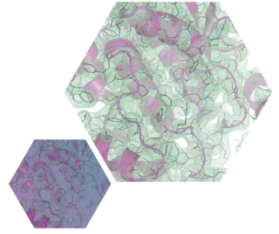
¹⁷⁰ Nozal, V.; Garcia-Rubia, A.; Cuevas, E. P.; Perez, C.; Tosat-Bitrian, C.; Bartolome, F.; Carro, E.; Ramirez, D.; Palomo, V.; Martinez, A. From kinase inhibitors to multitarget ligands as powerful drug leads for Alzheimer's disease using protein-templated synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60* (35), 19344-19354.

¹⁷¹ Ritchie, T. J.; Macdonald, S. J.; Young, R. J.; Pickett, S. D. The impact of aromatic ring count on compound developability: further insights by examining carbo- and hetero-aromatic and -aliphatic ring types. *Drug Discov. Today* **2011**, *16* (3-4), 164-171.

¹⁷² Schaduangrat, N.; Prachayasittikul, V.; Choomwattana, S.; Wongchitrat, P.; Phopin, K.; Suwanjang, W.; Malik, A. A.; Vincent, B.; Nantasenam, C. Multidisciplinary approaches for targeting the secretase protein family as a therapeutic route for Alzheimer's disease. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39* (5), 1730-1778.

¹⁷³ Nozal, V.; Rojas-Prats, E.; Maestro, I.; Gil, C.; Perez, D. I.; Martinez, A. Improved controlled release and brain penetration of the small molecule S14 using PLGA nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (6), 3206.

Como resumen de este segundo capítulo de tesis doctoral, se han diseñado y sintetizado nuevos triazoles-1,4-disustituidos que han resultado ser inhibidores de la proteasa BACE1 así como de dos quinasas. El potencial multidiana de los compuestos ha sido demostrado en ensayos celulares, tanto en la modulación de la patología de tau como en el β -amiloide. Además, se ha estudiado el modo de unión de los triazoles activos en la cavidad catalítica de BACE1 lo que ha permitido entender interacciones claves para su inhibición. Asimismo, se ha implementado una nueva metodología, la química click *in situ* para utilizar la propia enzima BACE1 como molde de reacción para seleccionar de manera más efectiva nuevos inhibidores. Por último, la permeabilidad de los compuestos multidiana al sistema nervioso central ha sido determinada, obteniéndose dos nuevos candidatos con buenas propiedades como compuestos multidiana para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.



CONCLUSIONES | CONCLUSIONS

En la presente tesis doctoral se han propuesto dos aproximaciones innovadoras para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Por un lado, la modulación de la patología de TDP-43, protagonista en enfermedades tales como la esclerosis lateral amiotrófica o la demencia frontotemporal y por otro, el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con nuevos compuestos multidiana.

1. Los inhibidores de TTBK1 diseñados y sintetizados en el primer capítulo, han resultado moduladores efectivos de la patología de TDP-43 en modelos celulares representativos. Además uno de estos compuestos, ha demostrado la reducción de la muerte las motoneuronas en el modelo murino con fenotipo motor y la mejora tanto sintomatológica como histológica de los ratones en un modelo de fenotipo cognitivo de TDP-43. Esto demuestra que la primera hipótesis innovadora de modulación de una proteína única, como es TDP-43 podría resultar en un tratamiento eficaz para enfermedades como la ELA o la DFT.

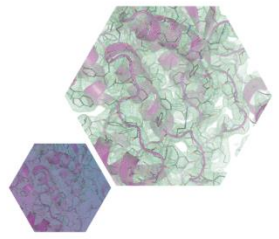
2. Los nuevos compuestos multidiana, diseñados y sintetizados en el segundo capítulo, además de presentar actividad inhibitoria en dos quinasas implicadas en la hiperfosforilación de tau también son capaces de inhibir la proteasa BACE1. Estas moléculas han reducido la producción de fragmentos amiloidogénicos en un modelo celular de la patología del β -amiloide. Por otro lado, han mostrado un perfil neuroprotector mejorado en otro modelo celular de la patología de tau. Estos compuestos pueden suponer una aproximación terapéutica novedosa y efectiva para el tratamiento de enfermedades complejas como la EA.

In this doctoral thesis two innovative approaches for the treatment of neurodegenerative diseases are presented. On the one hand, the modulation of TDP-43 pathology, which is crucial in diseases such as amyotrophic lateral sclerosis or frontotemporal dementia and on the other hand, the treatment of Alzheimer's disease with new multitarget compounds.

1. TTBK1 inhibitors that have been designed and synthesized in the first chapter have demonstrated to be effective modulators of the TDP-43 pathology in representative cellular models. Moreover, one of these compounds has shown a reduction in the death of motor neurons in the mice model with motor phenotype and the symptomatologic and histologic improvement of

the mice in the cognitive model of TDP-43 pathology. Altogether this demonstrates that the first innovative hypothesis based on TDP-43 modulation could result in an efficacious treatment for diseases such as ALS or FTD.

2. The new multitarget compounds, designed and synthesized in the second chapter, in addition to their inhibitory activity of two protein kinases, involved in the hyperphosphorylation of tau, are able to inhibit the protease BACE1. These molecules have shown reduction of the production of amyloidogenic fragments in a cellular model of the β -amyloid pathology. Besides that, they have shown an improved neuroprotective profile in another cellular model of tau pathology. These compounds could emerge as an innovative and effective therapeutic approach for the treatment of complex diseases such as AD.



PARTE EXPERIMENTAL

1 Síntesis orgánica

Los reactivos comerciales se obtuvieron de las casas comerciales de Sigma Aldrich, Across Organics, Fluorochem, Activate Scientific y Alfa Aesar. El dispositivo de microondas utilizado fue un equipo Initiator TM de Biotage®. Las cromatografías de capa fina (CCF) se realizaron en placas cromatográficas de gel sílice de Merck tipo 60 F254 con un espesor de 0.2 mm. Las CCF son reveladas con luz ultravioleta con $\lambda = 254/365\text{nm}$. Las separaciones por columna cromatográfica se prepararon con gel de sílice Merck de especificaciones 60 (230-400 mesh ASTM). Los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y bidimensionales se realizaron en un espectrómetro Bruker AVIII 300 MHz BACS-60 o Bruker AV 500 MHz, situado en el centro de apoyo a la investigación (CAI) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Los desplazamientos químicos, δ , se expresan en ppm y son calculados tomando como referencia el pico de señal del disolvente utilizado. La multiplicidad de las señales (s: singlete, d: doblete, dd: doblete de dobletes, ddd: doblete de dobletes de dobletes, t: triplete, td: triplete de dobletes, m: multiplete), las constantes de acoplamiento ($J = \text{Hz}$) y la asignación estructural se indican en cada caso como referencia. El espectro adquirido se analizó con el software MestreNova 10.2. El HPLC-MS empleado es un equipo Thermofisher acoplado con detector de masas Finnigan™ LXQ TM. Los puntos de fusión se midieron en un equipo Büchi Melting Point M-560. El equipo utilizado para realizar el microanálisis elemental fue el LECO CHNS-932, situado en el centro de apoyo a la investigación (CAI) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). El equipo utilizado para determinar la masa molecular exacta fue un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200LC acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6500 con fuente de ionización ESI/APCI y analizador de híbrido cuadrupolo/tiempo de vuelo (QTOF) situado en el Servicio de Espectrometría de Masas del Instituto de Química Orgánica General, (ICOG-CSIC).

1.1 Síntesis de los compuestos del capítulo 1.

Procedimiento general A: 1 equivalente del correspondiente heterociclo (6-cloropurina, 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina, 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-amina o 4-cloro-tieno[2,3-d]pirimidina), 1 equivalente de la correspondiente anilina y 0.1 equivalente de tricloruro de indio se disolvieron en 2 mL de acetonitrilo. El crudo se agitó bajo radiación microondas a 100 °C entre 2 y 4

horas. Después, se añadieron 20 mL de AcOEt y la mezcla se lavó con disoluciones saturadas de NaHCO₃ y NaCl (20 mL). Las fases orgánicas se reunieron y se secaron con MgSO₄, se filtraron y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla de CH₂Cl₂ y MeOH como eluyentes (proporción 40:1).

Procedimiento general B: 1 equivalente del correspondiente heterociclo (6-cloropurina, 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina o 4-clorotieno[2,3-*d*]pirimidina) y 1 equivalente de la correspondiente anilina se disolvieron en 2 mL de tetrahidrofurano. El crudo se agitó bajo radiación microondas a 100 °C hasta que se completó la reacción. Después, se añadieron 20 mL de AcOEt y la mezcla se lavó con disoluciones saturadas de NaHCO₃ y NaCl (20 mL). Las fases orgánicas se reunieron y se secaron con MgSO₄, se filtraron y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla de CH₂Cl₂ y MeOH como eluyentes (proporción 40:1).

Procedimiento general C: 1 equivalente de 4-cloro-6,7-dimetoxiquinazolina o 4-cloroquinazolina y 1.25 equivalente de la correspondiente anilina se disolvieron en 12 mL de etanol. El crudo se agitó a 90 °C hasta que se completó la reacción. Después, se añadieron 20 mL de AcOEt y la mezcla se lavó con disoluciones saturadas de NaHCO₃ y NaCl (20 mL). Las fases orgánicas se reunieron y se secaron con MgSO₄, se filtraron y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla de CH₂Cl₂ y MeOH como eluyentes (proporción 40:1).

Procedimiento general D: 1 equivalente de 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina, 1 equivalente del correspondiente tiofenol y 2 equivalente de carbonato potásico se disolvieron en 3 mL de DMF (anhidro). El crudo se agitó bajo radiación microondas a 130 °C durante 3 horas. Después, se añadió agua a la mezcla de reacción para precipitar el compuesto deseado. El crudo resultante se filtró y se purificó mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla de CH₂Cl₂ y MeOH como eluyentes (proporción 40:1).

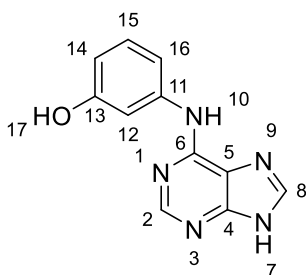
Procedimiento general E: 1 equivalente de 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina, 1 equivalente del correspondiente tiofenol y 2 equivalentes de trietilamina se disolvieron en 10 mL de isopropanol. El crudo se agitó bajo radiación microondas a 140 °C entre 20 min y 1 hora. Después, se evaporó el

disolvente a presión reducida y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla de CH₂Cl₂ y MeOH como eluyentes (proporción 40:1).

Procedimiento general F: 1 equivalente del nitroderivado y 5.5 equivalentes de cloruro de estaño (II) se disolvieron en 12 mL de etanol. El crudo se agitó bajo radiación microondas a 100 °C durante 20 min. Después, se disolvió en 20 mL AcOEt, se lavó con agua y el pH de la fase acuosa se ajustó a 10 utilizando NaOH 1M. La fase orgánica se lavó con agua y una disolución saturada de NaCl, se secó con MgSO₄ y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo se purificó mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla de CH₂Cl₂ y MeOH como eluyentes (proporción 40:1).

1.1.1 Síntesis de los derivados de purina

3-((9H-purin-6-il)amino)fenol (1)

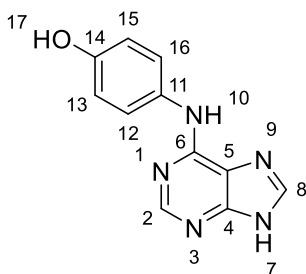


Procedimiento general A. Reactivos: 6-cloropurina (250 mg, 1.63 mmol), 3-aminofenol (177 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido beige. Rendimiento: 107 mg, 29 %. P.f.: 339-340 °C.

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13.16 (s, 1H, H-17), 9.61 (s, 1H, H-7), 9.31 (s, 1H, H-10), 8.36 (s, 1H, H-2), 8.26 (s, 1H, H-8), 7.55 (s, 1H, H-12), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-16), 7.08 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-15), 6.42 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, H-14). ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 158.2 (C-13), 152.8 (C-2-4), 150.9 (C-6), 141.1 (C-11), 140.0 (C-8), 129.3 (C-15), 120.0 (C-5), 111.8 (C-16), 110.0 (C-14), 108.3 (C-12). ESI calculado C₁₁H₁₀N₅O [M + H]⁺ 228.0880 hallado 228.0877.

4-((9H-purin-6-il)amino)fenol (2)



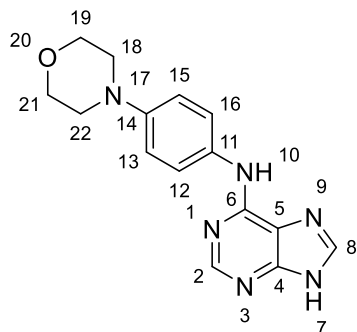
Procedimiento general A. Reactivos: 6-cloropurina (350 mg, 2.26 mmol), 4-aminofenol (247 mg, 2.26 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido marrón. Rendimiento: 99 mg, 20%. P.f.: 336-338 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13.06 (s, 1H, H-7), 9.47 (s, 1H, H-2), 9.14 (s, 1H, H-8), 8.26 (s, 1H, H-

10), 8.20 (s, 1H, H-17), 7.64 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-12-16), 6.72 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-13-15). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 153.1 (C-2), 152.1 (C-6) 151.9 (C-8), 150.1 (C-4), 139.3 (C-14), 131.2 (C-11), 122.8 (C-13-15), 119.1 (C-5), 114.8 (C-12-16). ESI calculado $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 228.0880 hallado 228.0879.

***N*-(4-morfolinilfenil)-9*H*-purin-6-amina (3)**

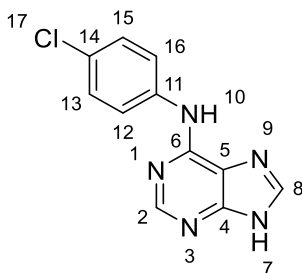


Procedimiento general A. Reactivos: 6-cloropurina (250 mg, 1.63 mmol), 4-morfolinoanilina (177 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido marrón. Rendimiento: 331 mg, 70%. P.f. 269-270 °C.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 13.05 (s, 1H, H-7), 9.58 (s, 1H, H-10), 8.31 (s, 1H, H-2), 8.24 (s, 1H, H-8), 7.75 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12-16), 6.92 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-13-15), 3.74 (t, $J = 4.2$ Hz, 4H, H-19,21), 3.05 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H, H-18,22). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 151.9 (C-2), 151.6 (C-6), 150.9 (C-5), 146.9 (C-14), 139.9 (C-8), 132.0 (C-11), 121.9 (C-12-16), 118.4 (C-4), 115.4 (C-13-15), 66.2 (C-19-21), 49.1 (C-18-22). ESI calculado $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 297.1458 hallado 297.1457.

***N*-(4-clorofenil)-9*H*-purin-6-amina (4)**



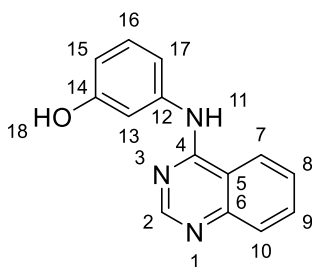
Procedimiento general B. Reactivos: 6-cloropurina (350 mg, 2.26 mmol) y 4-cloroanilina (288 mg, 2.26 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 416 mg, 75 %. P.f.: 329-330 °C.

^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 13.21 (s, 1H, H-7), 9.95 (s, 1H, H-10), 8.40 (s, 1H, H-2), 8.30 (s, 1H, H-8), 8.03 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-12-16), 7.37 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-13-15). ^{13}C -RMN (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 151.7 (C-6), 151.6 (C-2), 150.6 (C-4), 140.2 (C-8), 138.9 (C-11), 128.2 (C-12-16), 125.8 (C-14), 121.8 (C-13-15), 119.5 (C-5). ESI calculado $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{ClN}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 246.0541 hallado 246.0542.

1.1.2 Síntesis de los derivados de quinazolina y dimetoxiquinazolina

3-(Quinazolin-4-il)-fenol (5)

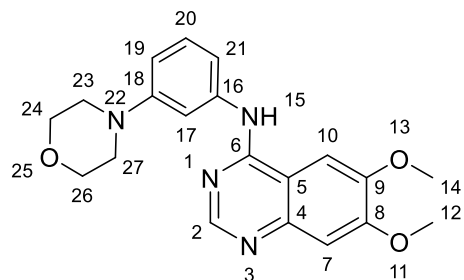


Procedimiento general C. Reactivos: 6-cloroquinazolina (150 mg, 1.63 mmol) y 3-aminofenol (222 mg, 2.04 mmol).

Sólido marrón. Rendimiento: 92 mg, 36 %. P.f.: 230-231 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 9.69 (s, 1H, H-18), 9.48 (s, 1H, H-11), 8.60 (s, 1H, H-2), 8.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-13), 7.96-7.77 (m, 2H, H-8-10), 7.64 (ddd, $J = 8.3, 6.8, 1.5$ Hz, 1H, H-9), 7.45 (s, 1H, H-7), 7.34-7.26 (m, 1H, H-15), 7.19 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-16), 6.57 (ddd, $J = 8.0, 2.4, 1.1$ Hz, 1H, H-17). $^{13}\text{C-RMN}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 157.7 (C-4), 157.3 (C-2), 154.4 (C-6), 140.6 (C-14), 140.1 (C-12), 132.9 (C-8), 129.0 (C-16), 127.7 (C-10), 126.2 (C-9), 123.0 (C-7), 115.2 (C-5), 113.1 (C-17), 110.9 (C-15), 109.5 (C-13). Análisis elemental $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$ calculado %C 70.87, %H 4.67, %N 17.71 hallado %C 70.37 \pm 0.35, %H 4.86 \pm 0.30, %N 17.50 \pm 0.30.

N-(3-morfolinilfenil)-6,7-dimetoxiquinazolin-4-amina (6)

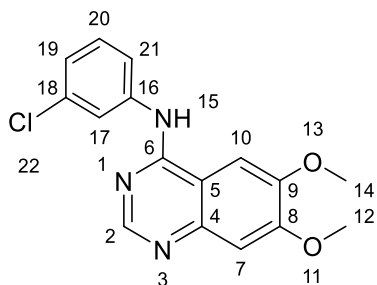


Procedimiento general C. Reactivos: 4-cloro-6,7-dimetoxiquinazolina (300 mg, 1.34 mmol) y 3-morfolinoanilina (297 mg, 1.67 mmol).

Sólido beige. Rendimiento: 272 mg, 56 %. P.f.: 214-215 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 9.35 (s, 1H, H-15), 8.44 (s, 1H, H-3), 7.83 (s, 1H, H-6), 7.36-7.29 (m, 2H, H-17-19), 7.23 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-20), 7.18 (s, 1H, H-9), 6.72 (ddd, $J = 8.1, 2.4, 1.1$ Hz, 1H, H-9), 3.96 (s, 3H, H-14), 3.93 (s, 3H, H-12), 3.76 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H, H-24-26), 3.13 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H, H-23-27). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 157.3 (C-6), 155.0 (C-8), 153.8 (C-9), 152.3 (C-2), 149.6 (C-4), 147.8 (C-18), 141.0 (C-16), 129.6 (C-19), 114.6 (C-21), 111.5 (C-20), 110.2 (C-17), 109.7 (C-5), 108.0 (C-7), 102.8 (C-10), 67.0 (C-24-26), 57.1 (C-12), 56.6 (C-14), 49.5 (C-23-27). Análisis elemental $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3$ calculado %C 65.56, %H 6.05, %N 15.29 hallado %C 64.92 \pm 0.35, %H 5.98 \pm 0.30, %N 14.99 \pm 0.30.

N-(3-clorofenil)-6,7-dimetoxiquinazolin-4-amina (7)

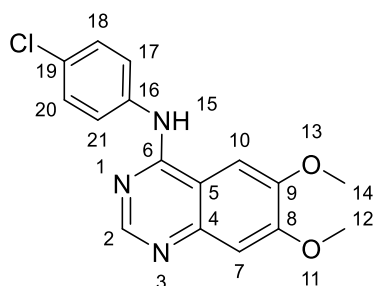


Procedimiento general C. Reactivos: 4-cloro-6,7-dimetoxiquinazolina (300 mg, 1.34 mmol) y 3-cloroanilina (213 mg, 1.67 mmol).

Sólido grisáceo. Rendimiento: 380 mg, 90 %. P.f.: 219-220 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 10.57 (s, 1H, H-15), 8.72 (s, 1H, H-2), 8.13 (s, 1H, H-10), 8.01 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-17), 7.80 (ddd, *J* = 8.2, 2.1, 1.0 Hz, 1H, H-13), 7.48 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-14), 7.32-7.23 (m, 2H, H-7-15), 4.02 (s, 3H, H-20), 3.99 (s, 3H, H-22). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 157.1 (C-6), 155.4 (C-8), 150.7 (C-2), 149.6 (C-9), 141.4 (C-4), 139.8 (C-16), 132.7 (C-18), 130.1 (C-20), 124.3 (C-17), 122.7 (C-19), 121.6 (C-21), 108.1 (C-5), 103.5 (C-7), 102.9 (C-10), 56.6 (C-12), 56.2 (C-14). Análisis elemental C₁₆H₁₄N₃O₂ calculado %C 54.56, %H 4.29, %N 11.93 hallado %C 54.61±0.35, %H 4.53±0.30, %N 12.06±0.30.

N-(4-clorofenil)-6,7-dimetoxiquinazolin-4-amina (8)



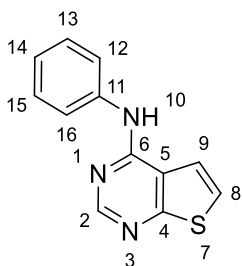
Procedimiento general C. Reactivos: 4-cloro-6,7-dimetoxiquinazolina (300 mg, 1.34 mmol) y 4-cloroanilina (213 mg, 1.67 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 202 mg, 48 %. P.f.: 253-254 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 9.55 (s, 1H, H-15), 8.48 (s, 1H, H-2), 7.86 (d, *J* = 8.9 Hz 2H, H-17-21), 7.82 (s, 1H, H-7), 7.44 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-18-20), 7.19 (s, 1H, H-10z), 3.96 (s, 3H, H-12), 3.93 (s, 3H, H-14). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 156.1 (C-6), 154.3 (C-8), 152.6 (C-2), 148.9 (C-9), 146.8 (C-4), 138.5 (C-16), 128.3 (C-18-20), 126.8 (C-19), 123.6 (C-17-21), 108.8 (C-5), 107.1 (C-10), 101.8 (C-7), 56.2 (C-12), 55.8 (C-14). Análisis elemental C₁₆H₁₄N₃O₂ calculado %C 60.86, %H 4.54, %N 12.95 hallado %C 60.60±0.35, %H 4.54±0.30, %N 12.95±0.30.

1.1.3 Síntesis de los derivados de tienopirimidina

N-fenil-tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (9)

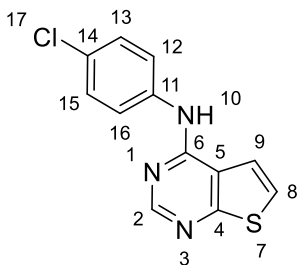


Procedimiento general A. Reactivos: 4-clorotieno[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.50 mmol), anilina (140 mg, 1.50 mmol) y tricloruro de indio (33 mg, 0.15 mmol).

Sólido verde. Rendimiento: 240 mg, 70%. P.f. 175-176 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 9.65 (s, 1H, H-10), 8.49 (s, 1H, H-2), 7.89 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-8), 7.86-7.81 (m, 2H, H-12-16), 7.73 (d, 1H, $J = 5.9$ Hz, H-9), 7.46-7.31 (m, 2H, H-13-15), 7.16-7.04 (m, 1H, H-14). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 166.5 (C-4), 154.8 (C-6), 153.2 (C-2), 139.2 (C-11), 128.5 (C-13-15), 123.8 (C-8), 123.3 (C-14), 121.5 (C-12-16), 119.5 (C-9), 116.9 (C-5). Análisis elemental $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{S}$ calculado %C 63.41, %H 3.99, %N 18.49, %S 14.11 hallado %C 63.36 \pm 0.35, %H 4.16 \pm 0.30, %N 18.46 \pm 0.30, %S 14.07 \pm 0.35.

N-4-clorofeniltieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (10)



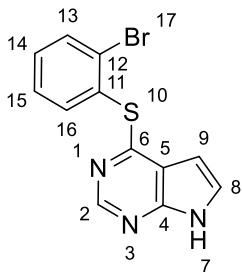
Procedimiento general B. Reactivos: 4-clorotieno[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.50 mmol), 4-cloroanilina (187 mg, 1.50 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 195 mg, 50%. P.f. 179-180 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 9.75 (s, 1H, H-10), 8.52 (s, 1H, H-2), 7.95-7.84 (m, 3H, H-8, 12,16), 7.75 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-9), 7.43 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-13-15). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 166.6 (C-4), 154.6 (C-6), 153.0 (C-2), 138.3 (C-11), 128.5 (C-13-15), 126.8 (C-14), 124.2 (C-9), 122.8 (C-12-16), 119.4 (C-8), 117.0 (C-5). Análisis elemental $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{ClN}_3\text{S}\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ calculado %C 49.92, %H 3.84, %N 14.55, %S 11.10 hallado %C 50.22 \pm 0.35, %H 3.13 \pm 0.30, %N 14.09 \pm 0.30, %S 10.76 \pm 0.35.

1.1.4 Síntesis de los derivados de pirrolopirimidina

4-((2-bromofenil)tio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (11)

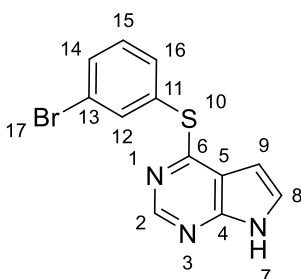


Procedimiento general D. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol), 2-bromotiofenol (246 mg, 1.30 mmol), K₂CO₃ (360 mg, 2.60 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 159 mg, 40%. P.f.: 178-179 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.24 (s, 1H, H-7), 8.46 (s, 1H, H-2), 7.88-7.77 (m, 2H, H-13-15), 7.54-7.39 (m, 3H, H-8-14-16), 6.08 (dd, *J* = 3.6, 1.8 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 158.2 (C-6), 150.3 (C-2), 150.0 (C-4), 137.9 (C-15), 133.5 (C-13), 131.7 (C-14), 129.9 (C-11), 129.5 (C-12), 128.6 (C-16), 126.5 (C-8), 115.0 (C-5), 98.1 (C-9). ESI calculado C₁₂H₉BrN₃S [M + H]⁺ 305.9695 hallado 305.9698.

4-((3-bromofenil)tio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (12)

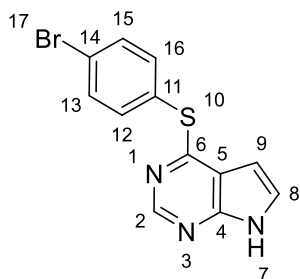


Procedimiento general E. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol), 3-bromotiofenol (246 mg, 1.30 mmol), trietilamina (360 μL, 2.60 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 345 mg, 88%. P.f.: 169-170 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.26 (s, 1H, H-7), 8.49 (s, 1H, H-2), 7.86 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-12), 7.71 (ddd, *J* = 8.0, 2.0, 1.0 Hz, 1H, H-16), 7.65 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1H, H-14), 7.51 (dd, *J* = 3.6, 2.4 Hz, 1H, H-8), 7.45 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-15), 6.20 (dd, *J* = 3.6, 1.8 Hz, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 158.6 (C-6), 150.6 (C-2), 150.2 (C-4), 137.3 (C-12), 134.3 (C-14), 132.6 (C-16), 131.5 (C-15), 130.8 (C-11), 126.9 (C-8), 122.2 (C-13), 115.2 (C-5), 98.5 (C-9). ESI calculado C₁₂H₉BrN₃S [M + H]⁺ 305.9695 hallado 305.9699.

4-((4-bromofenil)tio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (13)

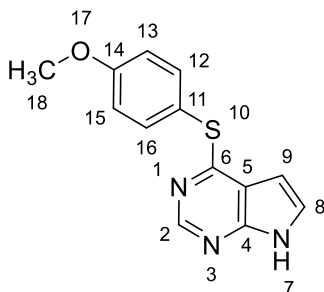


Procedimiento general D. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol), 4-bromotiofenol (246 mg, 1.30 mmol), K₂CO₃ (360 mg, 2.60 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 295 mg, 36%. P.f.: 167-168 °C.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 12.24 (s, 1H, H-9), 8.47 (s, 1H, H-2), 7.69 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-13-15), 7.58 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-12-16), 7.50 (dd, $J = 3.5, 2.5$ Hz, 1H, H-8), 6.19 (dd, $J = 3.5, 1.8$ Hz, 1H, H-9). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 159.0 (C-6), 150.8 (C-2), 150.3 (C-4), 137.6 (C-12-16), 132.8 (C-13-15), 128.1 (C-11), 127.0 (C-8), 123.6 (C-14), 115.4 (C-5), 98.7 (C-9). ESI calculado $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{BrN}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 305.9695 hallado 305.9699.

4-((4-metoxifenil)tio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (14)

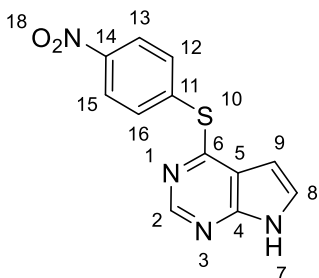


Procedimiento general E. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (100 mg, 0.65 mmol), 4-metoxitiofenol (91 mg, 0.65 mmol), trietilamina (180 μL , 1.30 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 154 mg, 92%, P.f.: 194-195 $^\circ\text{C}$.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 12.14 (s, 1H, H-7), 8.43 (s, 1H, H-2), 7.57 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-12-16), 7.41 (dd, $J = 3.6, 2.2$ Hz, 1H, H-8), 7.06 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-13-15), 5.92 (dd, $J = 3.6, 1.5$ Hz, 1H, H-9), 3.83 (s, 3H, H-18). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 160.7 (C-6/14), 160.6 (C-6/14), 150.2 (C-2), 149.9 (C-4), 137.4 (C-12-16), 126.0 (C-8), 118.2 (C-11), 115.0 (C-13-15), 114.5 (C-5), 98.3 (C-9), 55.4 (C-18). ESI calculado $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{OS}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 258.0696 hallado 258.0697.

4-((4-nitrofenil)tio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (15)

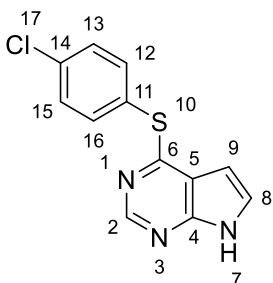


Procedimiento general E. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol), 4-nitrotiofenol (202 mg, 1.30 mmol), trietilamina (360 μL , 2.60 mmol).

Sólido amarillo. Rendimiento: 288 mg, 81%, P.f.: 189-190 $^\circ\text{C}$.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 12.36 (s, 1H, H-7), 8.55 (s, 1H, H-2), 8.27 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-13-15), 7.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-12-16), 7.57 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H, H-8), 6.37 (dd, $J = 3.6, 1.7$ Hz, 1H, H-9). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 156.4 (C-6), 150.4 (C-2), 150.1 (C-4), 147.3 (C-14), 138.0 (C-11), 134.3 (C-12,16), 127.2 (C-8), 124.0 (C-13,15), 115.8 (C-5), 98.4 (C-9). ESI calculado $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 273.0441 hallado 273.0442.

4-((4-clorofenil)tio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (16)

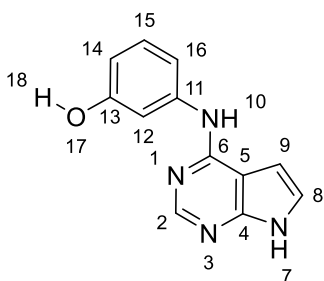


Procedimiento general E. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol), 4-clorotiofenol (246 mg, 1.30 mmol), trietilamina (360 μ L, 2.60 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 360 mg, 88%. P.f.: 245-246 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 12.24 (s, 1H, H-7), 8.47 (s, 1H, H-2), 7.66 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-13-15), 7.55 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H-12-16), 7.49 (dd, $J = 3.5, 2.4$ Hz, 1H, H-8), 6.18 (dd, $J = 3.6, 1.8$ Hz, 1H, H-7). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 159.1 (C-6), 150.8 (C-2), 150.3 (C-4), 137.4 (C-13-15), 134.9 (C-11), 129.9 (C-12-16), 127.5 (C-14), 127.0 (C-8), 115.4 (C-5), 98.7 (C-9). ESI calculado $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 262.0200 hallado 262.0205.

3-((7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)amino)fenol (17)

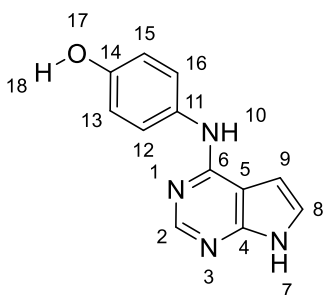


Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 3-aminofenol (178 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido marrón. Rendimiento: 145 mg, 87 %. P.f.: 253-255 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.75 (s, 1H, H-18), 9.34 (s, 1H, H-7), 9.17 (s, 1H, H-10), 8.28 (s, 1H, H-2), 7.50 (s, 1H, H-12), 7.33-7.18 (m, 2H, H-14-16), 7.10 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-15), 6.80 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-8), 6.43 (dd, $J = 8.0, 2.3$ Hz, 1H, H-9). $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 157.8 (C-15), 153.9 (C-6), 151.2 (C-2), 151.0 (C-4), 141.8 (C-11), 129.4 (C-13), 122.4 (C-8), 111.5 (C-12), 109.6 (C-14), 107.7 (C-16), 104.1 (C-5), 99.2 (C-9). ESI calculado $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 227.0927 hallado 227.0929.

4-((7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)amino)fenol (18)

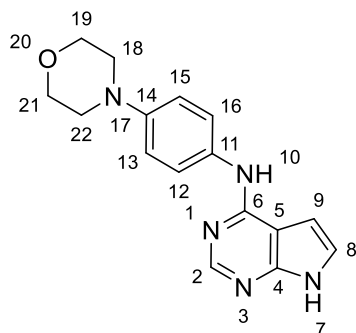


Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (350 mg, 2.28 mmol), 4-aminofenol (249 mg, 2.28 mmol) y tricloruro de indio (51 mg, 0.23 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 182 mg, 38%. P.f. 274-276 °C.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 11.65 (s, 1H, H-7), 9.17 (s, 1H, H-2), 9.05 (s, 1H, H-10), 8.18 (s, 1H, H-18), 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-13-15), 7.17 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-9), 6.77 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-12-16), 6.63 (dd, $J = 3.5, 2.1$ Hz, 1H, H-8). ^{13}C -RMN (76 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 154.0 (C-14), 153.0 (C-6), 150.9 (C-2), 150.6 (C-4), 131.6 (C-11), 123.0 (C-12-16), 121.4 (C-5), 114.9 (C-13-15), 103.0 (C-8), 98.8 (C-9). ESI calculado $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 227.0927 hallado 227.0925.

N-(4-morfolinilfenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (19)

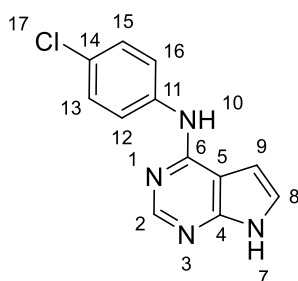


Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-morfolinoanilina (285 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido grisáceo. Rendimiento: 106 mg, 24%. P.f. 254-255 °C.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 11.65 (s, 1H, H-7), 9.10 (s, 1H, H-3), 8.20 (s, 1H, H-10), 7.67 (dd, $J = 7.2, 2.2$ Hz, 2H, H-13-15), 7.17 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-9), 6.94 (dd, $J = 6.9, 2.1$ Hz, 2H, H-12-16), 6.67 (dd, $J = 3.5, 1.8$ Hz, 1H, H-8), 3.74 (t, $J = 9.4, 4.9$ Hz, 4H, H-19-21), 3.06 (t, $J = 9.2, 4.7$ Hz, 4H, H-18-22). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 153.8 (C-6), 150.9 (C-4), 150.7 (C-2), 146.7 (C-14), 132.5 (C-11), 122.0 (C-12-16), 121.6 (C-8), 115.4 (C-13-15), 103.2 (C-5), 98.8 (C-9), 66.1 (C-19-21), 49.1 (C-18-22). ESI calculado $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 296.1506 hallado 296.1496.

N-(4-clorofenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (20)

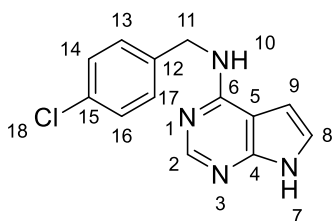


Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol) y 4-cloroanilina (262 mg, 1.63 mmol).

Sólido verdoso. Rendimiento: 362 mg, 92%. P.f.: 259-260 °C.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 11.82 (s, 1H, H-7), 9.43 (s, 1H, H-10), 8.30 (s, 1H, H-2), 7.97 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-12-16), 7.38 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-13-15), 7.26 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 6.80 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 153.2 (C-6), 150.9 (C-4), 150.6 (C-2), 139.5 (C-11), 128.3 (C-13-15), 125.3 (C-14), 122.4 (C-8), 121.4 (C-12-16), 103.8 (C-5), 98.7 (C-9). Análisis elemental $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_4$ calculado %C 58.91, %H 3.71, %N 22.90 hallado %C 58.66 \pm 0.35, %H 3.78 \pm 0.30, %N 22.83 \pm 0.30.

***N*-(4-clorobenzil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (21)**

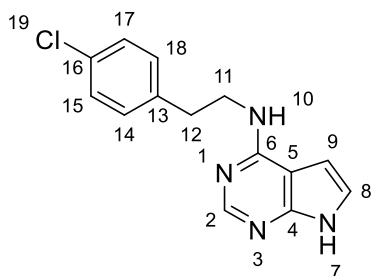


Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol) y 4-clorobencilamina (227 mg, 1.63 mmol).

Sólido beige. Rendimiento: 142 mg, 55%. P.f.: 208-209 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.53 (s, 1H, H-7), 8.08 (s, 1H, H-2), 7.97 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, H-10), 7.36 (s, 4H, H-13,14,16,17), 7.08 (dd, *J* = 3.4, 2.3 Hz, 1H, H-8), 6.56 (dd, *J* = 3.4, 1.9 Hz, 1H, H-9), 4.69 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, H-11). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 156.2 (C-6), 151.7 (C-2), 150.5 (C-2), 139.9 (C-12), 131.4 (C-15), 129.4 (C-13,17), 128.5 (C-14,16), 121.4 (C-8), 102.9 (C-5), 98.9 (C-9), 42.8 (C-11). Análisis elemental C₁₃H₁₁ClN₄ calculado %C 60.35, %H 4.29, %N 21.66 hallado %C 60.35±0.35, %H 4.24±0.30, %N 21.47±0.30.

***N*-(4-clorofenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (22)**

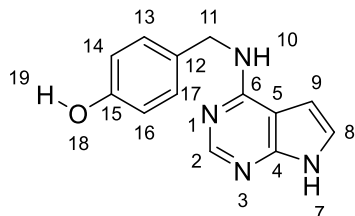


Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol) y 2-(4-clorofenil)etilamina (249 mg, 1.63 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 106 mg, 25%. P.f.: 207-208 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.48 (s, 1H, H-7), 8.12 (s, 1H, H-2), 7.47 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-10), 7.43-7.18 (m, 4H, H-14-15-17-18), 7.05 (dd, *J* = 3.4, 2.2 Hz, 1H, H-8), 6.51 (dd, *J* = 3.4, 1.7 Hz, 1H, H-9), 3.67 (q, *J* = 7.2, 5.8 Hz, 2H, H-11), 2.91 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-12). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 156.0 (C-6), 151.5 (C-2), 150.1 (C-4), 138.9 (C-13), 130.7 (C-16), 130.6 (C-14-18), 128.2 (C-15-17), 120.8 (C-8), 102.6 (C-5), 98.5 (C-9), 41.4 (C-11), 34.6 (C-12). ESI calculado C₁₄H₁₄ClN₄ [M + H]⁺ 273.0902 hallado 273.0895.

4-(((7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)metil)fenol (23)



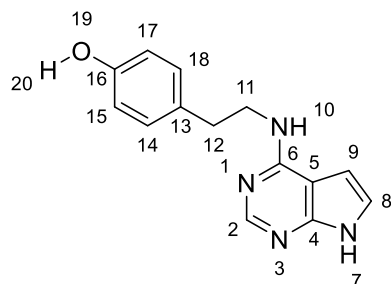
Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-hidroxibencilamina (197 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido beige. Rendimiento: 53 mg, 14%. P.f.: 206-207 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.49 (s, 1H, H-7), 9.27 (s, 1H, H-19), 8.10 (s, 1H, H-2), 7.81 (t, 1H, H-10), 7.15 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-13-15), 7.05 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-8), 6.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-14-16), 6.57 (dd, *J*

=3.5, 1.7 Hz, 1H, H-9), 4.58 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, H-11). ^{13}C -RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 156.2 (C-15), 156.0 (C-6), 151.5 (C-2), 150.2 (C-4), 130.5 (C-12), 128.7 (C-13-17), 120.8 (C-8), 115.0 (C-14-16), 102.5 (C-5), 98.7 (C-9), 42.7 (C-11). ESI calculado $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 241.1084 hallado 241.1079.

4-(2-((7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)amino)etil)fenol (24)

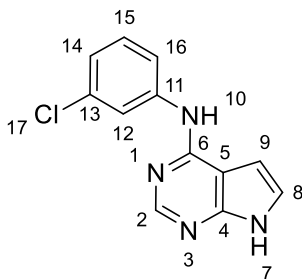


Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (100 mg, 0.65 mmol), 2-(4-hidroxifenil)etilamina (80 mg, 0.65 mmol) y tricloruro de indio (29 mg, 0.06 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 94 mg, 23%. P.f.: 246-247 °C

^1H -RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.47 (s, 1H, H-7), 9.18 (s, 1H, H-20), 8.11 (s, 1H, H-2), 7.45 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, H-10), 7.09-7.01 (m, 3H, H-8-14-18), 6.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-15-17), 6.52 (dd, $J = 3.4, 1.7$ Hz, 1H, H-9), 3.68-3.48 (m, 1H, H-11), 2.79 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-12). ^{13}C -RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 156.0 (C-6), 155.6 (C-16), 151.5 (C-2), 150.1 (C-4), 129.8 (C-13), 129.5 (C-14-18), 120.7 (C-8), 115.1 (C-15-17) 102.5 (C-5), 98.6 (C-9), 42.1 (C-11), 34.6 (C-12). ESI calculado $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 255.1240 hallado 255.1239.

N-(3-clorofenil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (25)

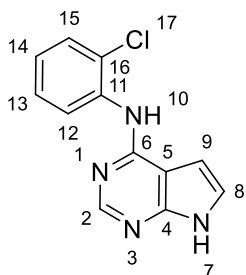


Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 3-cloroanilina (208 mg, 1.63 mmol).

Sólido verdoso. Rendimiento: 117 mg, 49%. P.f.: 234-235 °C.

^1H -RMN (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 12.81 (s, 1H, H-7), 11.42 (s, 1H, H-10), 8.45 (s, 1H, H-2), 7.89 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-16), 7.66 (ddd, $J = 8.1, 2.1, 1.0$ Hz, 1H, H-14), 7.54 -7.42 (m, 2H, H-8, 15), 7.34 (ddd, $J = 8.0, 2.1, 1.0$ Hz, 1H, H-12), 7.09 (dd, $J = 3.5, 1.7$ Hz 1H, H-9). ^{13}C -RMN (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 151.1 (C-6), 145.7 (C-4), 144.4 (C-2), 138.4 (C-15), 133.4 (C-11), 130.9 (C-8), 125.6 (C-12), 124.7 (C-13), 123.3 (C-16), 122.2 (C-14), 103.3 (C-5), 102.0 (C-9). ESI calculado $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClN}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 245.0589 hallado 245.0587.

***N*-(2-clorofenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (26)**



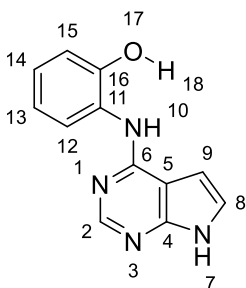
Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 2-cloroanilina (208 mg, 1.63 mmol).

Sólido verdoso. Rendimiento: 269 mg, 69%. P.f.: 220-221 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.73 (s, 1H, H-7), 9.07 (s, 1H, H-10), 8.13 (s, 1H, H-2), 7.69 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, H-16), 7.54 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, H-13), 7.37 (dt, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H, H-15), 7.24 (dt, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H, H-14), 7.14 (dd, *J* = 3.5, 2.3 Hz, 1H, H-8), 6.51 (dd, *J* = 3.5, 1.8 Hz, 1H, H-9).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 154.3 (C-6), 151.1 (C-4), 150.9 (C-5), 136.4 (C-12), 129.5 (C-13), 129.4 (C-11), 128.5 (C-16), 127.3 (C-15), 126.4 (C-14), 122.2 (C-8), 103.1 (C-5), 98.7 (C-9). Análisis elemental C₁₂H₉ClN₄ calculado %C 58.91, %H 3.71, %N 22.90 hallado %C 58.77±0.35, %H 3.79±0.30, %N 22.90±0.30.

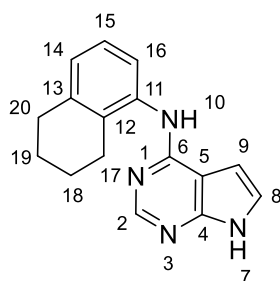
2-((7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)fenol (27)



Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (350 mg, 2.28 mmol), 2-aminofenol (245 mg, 2.28 mmol) y tricloruro de indio (50 mg, 0.23 mmol).

Sólido marrón. Rendimiento: 103 mg, 20%. P.f.: 233-235 °C.

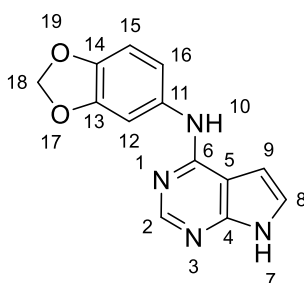
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.82 (s, 1H, H-7), 10.61 (s, 1H, H-10), 8.91 (s, 1H, H-18), 8.22 (s, 1H, H-2), 7.56 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, H-16), 7.22 (dd, *J* = 3.5, 2.3 Hz, 1H, H-8), 7.02 (ddd, *J* = 8.0, 7.1 1.6 Hz, 1H, H-14), 6.92 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, H-13), 6.84 (ddd, *J* = 7.9, 7.2, 1.6 Hz, 1H, H-15), 6.70 (dd, *J* = 3.5, 1.8 Hz, 1H, H-8). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 153.8 (C-6), 150.6 (C-4), 150.2 (C-2), 149.6 (C-12), 127.8 (C-11), 125.0 (C-14), 124.3 (C-16), 122.2 (C-8), 119.1 (C-15), 117.4 (C-13), 103.2 (C-5), 99.1 (C-9). ESI calculado C₁₂H₁₁N₄O [M + H]⁺ 227.0927 hallado 227.0926.

***N*-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1-il)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (28)**

Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (125 mg, 0.80 mmol), 5,6,7,8-tetrahidro-1-naftilamina (117 mg, 0.80 mmol) y tricloruro de indio (18 mg, 0.08 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 48 mg, 23%. P.f.: 239-240 °C.

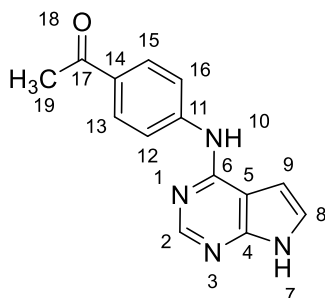
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.58 (s, 1H, H-7), 8.74 (s, 1H, H-10), 8.06 (s, 1H, H-2), 7.20-7.05 (m, 3H, H-8-16-15), 6.99 (dd, *J* = 7.3, 1.7 Hz, 1H, H-14), 6.22 (dd, *J* = 3.2, 1.5 Hz, 1H, H-9), 2.78 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, H-17), 2.61 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, H-20), 1.68 (t, *J* = 3.4 Hz, 4H, H-18-19). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 155.7 (C-6), 151.6 (C-2), 151.5 (C-4), 138.0 (C-11), 137.9 (C-13), 134.0 (C-12), 127.0 (C-14), 125.6 (C-16), 125.2 (C-15), 121.9 (C-8), 103.0 (C-5), 99.4 (C-9), 29.7 (C-17), 25.0 (C-20), 22.9 (C-18-19). Análisis elemental C₁₆H₁₆N₄ calculado %C 72.70, %H 6.10, %N 21.70 hallado %C 72.50±0.35, %H 6.05±0.30, %N 21.22±0.30.

***N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (29)**

Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 3,4-(metilendioxi)anilina (238 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido marrón. Rendimiento: 59 mg, 15%. P.f.: 282-283 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.69 (s, 1H, H-7), 9.17 (s, 1H, H-10), 8.22 (s, 1H, H-2), 7.58 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-16), 7.23-7.15 (m, 2H, H-8,12), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-13), 6.70 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9), 6.00 (s, 2H, H-18). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 153.6 (C-6), 150.77 (C-4), 150.72 (C-2), 146.9 (C-15), 142.3 (C-14), 134.7 (C-11), 121.9 (C-8), 113.3 (C-12), 107.8 (C-13), 103.3 (C-5), 103.0 (C-16), 100.8 (C-18), 98.7 (C-9). ESI calculado C₁₃H₁₁N₄O₂ [M + H]⁺ 255.0877 hallado 255.0877.

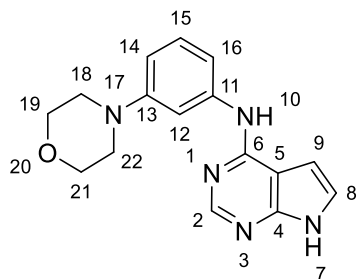
1-(4-((7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)fenil)etan-1-ona (30)

Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (350 mg, 2.28 mmol), 4-aminoacetofenona (308 mg, 2.28 mmol) y tricloruro de indio (50 mg, 0.23 mmol).

Sólido verde. Rendimiento: 144 mg, 25%. P.f.: 279-280 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.87 (s, 1H, H-7), 9.67 (s, 1H, H-10), 8.38 (s, 1H, H-2), 8.11 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-13-15), 7.96 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-12-16), 7.31 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 6.87 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9), 2.54 (s, 3H, H-19). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 196.2 (C-17), 152.9 (C-6), 151.2 (C-2), 150.5 (C-4), 145.2 (C-11), 130.2 (C-14), 129.3 (C-13-15), 122.9 (C-8), 118.6 (C-12-16), 104.3 (C-5), 98.7 (C-9), 26.7 (C-19). ESI calculado $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 253.1084 hallado 253.1081.

N-(3-morfolinilfenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (31)

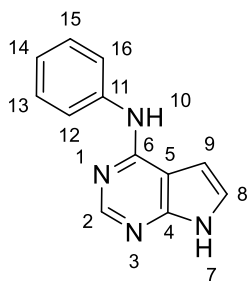


Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 3-morfolinoanilina (285 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido verde. Rendimiento: 273 mg, 58%. P.f.: 258-259 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.71 (s, 1H, H-7), 9.14 (s, 1H, H-10), 8.26 (s, 1H, H-2), 7.5-7.4 (m, 2H, H-12-16), 7.25-7.13 (m, 2H, H-8, 13), 6.76 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9), 6.66-6.59 (m, 1H, H-14), 3.76 (t, $J = 9.4, 4.9$ Hz, 4H, H-19-21), 3.11 (t, $J = 9.2, 4.7$ Hz, 4H, H-18-22). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 153.6 (C-6), 151.4 (C-15), 150.8 (C-2), 150.8 (C-4), 141.1 (C-11), 128.8 (C-13), 122.0 (C-8), 111.7 (C-12), 109.4 (C-14), 107.2 (C-16), 103.6 (C-5), 98.7 (C-9), 66.1 (C-19-21), 48.7 (C-18-22). Análisis elemental $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}$ calculado %C 65.07, %H 5.80, %N 23.71 hallado %C 64.88 \pm 0.35, %H 5.68 \pm 0.30, %N 23.20 \pm 0.30.

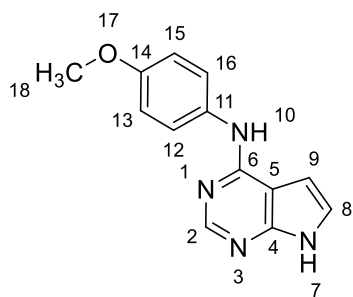
N-fenil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (32)



Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), anilina (149 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 215 mg, 64%. P.f.: 239-240 °C.

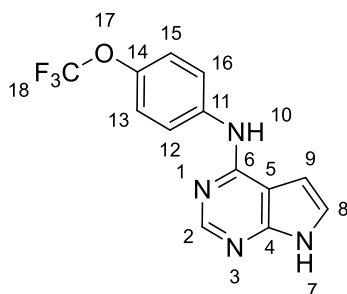
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.75 (s, 1H, H-7), 9.29 (s, 1H, H-10), 8.28 (s, 1H, H-2), 7.89 (dd, $J = 7.5, 1.0$ Hz, 2H, H-12-16), 7.33 (td, $J = 8.7, 2.1$ Hz, 2H, H-13-15), 7.23 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 7.01 (tt, $J = 7.2, 2.4, 1.1$ Hz, 1H, H-14), 6.79 (dd, $J = 3.5, 1.8$ Hz, 1H, H-9). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 153.5 (C-6), 150.8 (C-4), 150.7 (C-2), 140.4 (C-11), 128.4 (C-13-15), 122.1 (C-8), 122.0 (C-14), 120.2 (C-12-16), 103.6 (C-5), 98.8 (C-9). ESI calculado $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 211.0978 hallado 211.0979.

***N*-(4-metoxifenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (33)**

Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-metoxianilina (197 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido grisáceo. Rendimiento: 284 mg, 74%, P.f.: 229-230 °C.

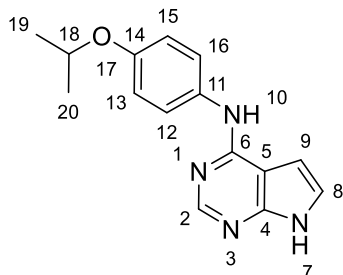
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.66 (s, 1H, H-7), 9.14 (s, 1H, H-10), 8.20 (s, 1H, H-2), 7.71 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.18 (dd, *J* = 3.5, 2.3 Hz, 1H, H-9), 6.92 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13-15), 6.67 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9), 3.75 (s, 3H, H-18). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 154.8 (C-15), 153.8 (C-6), 150.9 (C-2), 150.7 (C-4), 130.5 (C-11), 122.4 (C-12-16), 121.7 (C-8), 113.7 (C-13-15), 103.2 (C-5), 98.8 (C-9), 55.2 (C-18). Análisis elemental C₁₃H₁₂N₄O calculado %C 64.99, %H 5.03, %N 23.32 hallado %C 64.49±0.35, %H 5.03±0.30, %N 23.03±0.30.

***N*-(4-(trifluorometoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (34)**

Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-trifluorometoxianilina (289 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 400 mg, 92%. P.f.: 202-203 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.81 (s, 1H, H-7), 9.47 (s, 1H, H-10), 8.29 (s, 1H, H-2), 8.02 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H-12-16), 7.34 (dd, *J* = 9.2, 1.0 Hz, 2H, H-13-15), 7.26 (dd, *J* = 3.5, 2.3 Hz, 1H, H-8), 6.80 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 153.2 (C-6), 151.0 (C-4), 150.6 (C-2), 142.6 (d, *J*_{C-F} = 1.9 Hz, C-14), 139.7 (C-11), 122.5 (C-8), 121.4 (C-13-15), 121.2 (C-12-16), 120.2 (d, *J*_{C-F} = 255.3 Hz, C-18), 103.8 (C-5), 98.7 (C-9). Análisis elemental C₁₃H₉F₃N₄O calculado %C 53.07, %H 3.08, %N 19.04 hallado %C 52.81±0.35, %H 3.16±0.30, %N 18.99±0.30.

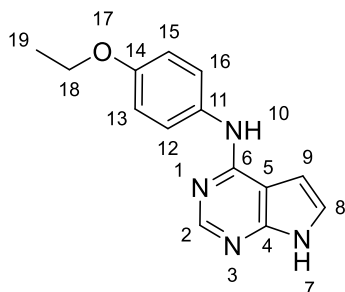
***N*-(4-isopropoxifenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (35)**

Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 3-morfolinoanilina (242 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 288 mg, 66%. P.f.: 218-219 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.66 (s, 1H, H-7), 9.13 (s, 1H, H-10), 8.20 (s, 1H, H-2), 7.69 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12-16), 7.17 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 6.89 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-13-15), 6.68 (dd, $J = 3.5, 1.8$ Hz, 1H, H-9), 4.54 (hept, $J = 6.0$, 1H, H-18), 1.26 (d, $J = 6.0$, 6H, H-19,20). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 153.8 (C-6), 152.9 (C-14), 150.9 (C-2), 150.7 (C-4), 133.2 (C-11), 122.4 (C-12-16), 121.7 (C-8), 115.7 (C-13-15), 103.2 (C-5), 98.8 (C-9), 69.4 (C-18), 21.9 (C-19,20). ESI calculado $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 269.1397 hallado 269.1393.

***N*-(4-etoxifenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (36)**

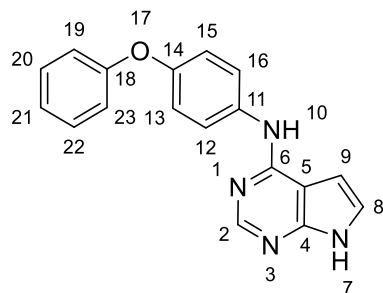


Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-etoxianilina (285 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido morado. Rendimiento: 83 mg, 20%. P.f.: 241-242 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.66 (s, 1H, H-7), 9.13 (s, 1H, H-10), 8.20 (s, 1H, H-2), 7.70 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-12-16), 7.17 (dd, $J = 3.4, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 6.91 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-13-15), 6.67 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9), 4.00 (q, $J = 7.0$, 2H, H-18), 1.33 (d, $J = 7.0$, 3H, H-19). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 154.0 (C-14), 153.8 (C-6), 150.9 (C-2), 150.7 (C-4), 133.2 (C-11), 122.4 (C-12-16), 121.7 (C-8), 114.2 (C-13-15), 103.2 (C-5), 98.8 (C-9), 63.1 (C-18), 14.8 (C-19). ESI calculado $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 255.1240 hallado 255.1236.

***N*-(4-fenoxifenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (37)**



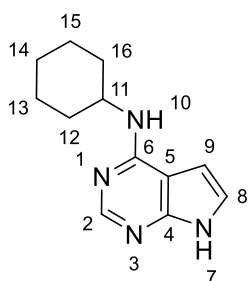
Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-feniloxianilina (333 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 255 mg, 53%. P.f.: 250-251 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.75 (s, 1H, H-7), 9.34 (s, 1H, H-10), 8.26 (s, 1H, H-2), 7.89 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12-16), 7.37 (dd, $J = 8.6, 7.3$ Hz, 2H, H-20-22), 7.23 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 7.13-6.96 (m, 5H, H-13-15-19-21-23), 6.77 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 157.6 (C-18), 153.5 (C-4), 150.8 (C-6), 150.75 (C-14), 150.7 (C-2), 136.3 (C-11), 129.9 (C-20-22), 122.7 (C-21) 122.1 (C-8), 122.0 (C-12-16), 119.4 (C-13-15), 117.6 (C-19-23), 103.5 (C-5), 98.7 (C-9). Análisis elemental

$C_{18}H_{14}N_4O$ calculado %C 71.51, %H 7.67, %N 18.53 hallado %C 71.04±0.35, %H 4.70±0.30, %N 18.38±0.30.

N-ciclohexil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (38)

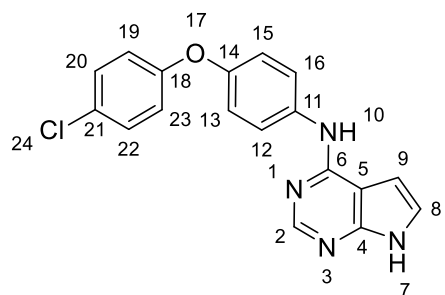


Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), ciclohexilamina (162 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido beige. Rendimiento: 91 mg, 26 %. P.f. 146-147 °C.

1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 11.41 (s, 1H, H-7), 8.06 (s, 1H, H-2), 7.09 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-10), 7.03 (dd, $J = 3.4, 2.2$ Hz, 1H, H-8), 6.57 (dd, $J = 3.4, 1.8$ Hz, 1H, H-9), 4.20-3.90 (m, 1H, H-11), 2.03-1.47 (m, 5H), 1.42-0.94 (m, 5H). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 155.3 (C-1), 151.4 (C-3), 150.2 (C-5), 120.4 (C-8), 102.3 (C-6), 98.8 (C-7), 48.5 (C-11), 32.8 (C-12-16), 25.5 (C-14), 25.0 (C-13-15). ESI calculado $C_{12}H_{17}N_4$ [M + H] $^+$ 217.1448 hallado 217.1439.

N-(4-(4-clorofenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (39)

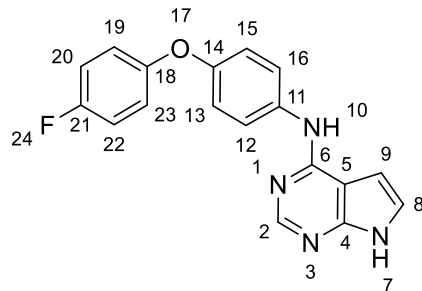


Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol) y 4-(4-clorofenoxi)anilina (351 mg, 1.63 mmol).

Sólido verdoso. Rendimiento: 363 mg, 62%. P.f.: 250-251 °C.

1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 11.77 (s, 1H, H-7), 9.36 (s, 1H, H-10), 8.26 (s, 1H, H-2), 7.92 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-13-15), 7.41 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-19-23), 7.24 (dd, $J = 3.4, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 7.06 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12-16), 7.00 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-20-22), 6.77 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 156.7 (C-18), 153.4 (C-6), 150.8 (C-4), 150.7 (C-2), 150.2 (C-11), 136.8 (C-14), 129.7 (C-19-23), 126.4 (C-21), 122.1 (C-8), 121.9 (C-13-15), 119.7 (C-12-16), 119.2 (C-22-20), 103.5 (C-5), 98.7 (C-9). Análisis elemental $C_{18}H_{13}ClN_4O$ calculado %C 64.20, %H 3.89, %N 16.64 hallado %C 64.15±0.35, %H 3.96±0.30, %N 16.69±0.30.

***N*-[4-(4-fluorofenoxi)fenil]-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (40)**

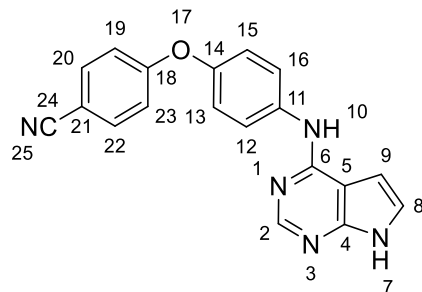


Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol) y 4-(4-fluorofenoxi)anilina (325 mg, 1.63 mmol).

Sólido beige. Rendimiento: 203 mg, 40%. P.f.: 227-228 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.75 (s, 1H, H-7), 9.33 (s, 1H, H-10), 8.25 (s, 1H, H-2), 7.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.22 (m, 3H, H-8-20-22), 7.03 (m, 4H, H-13-15-19-23), 6.76 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 159.4 (d, *J* = 238.1 Hz, C-21), 153.6 (d, *J*_{C-F} = 2.3 Hz, C-18), 153.5 (C-4), 151.3 (C-14), 150.79 (C-6), 150.77 (C-2), 136.3 (C-11), 122.1 (C-8), 122.0 (C-12-16), 119.6 (d, *J*_{C-F} = 8.4 Hz, C-19-23), 119.0 (C-13-15), 116.4 (d, *J*_{C-F} = 23.3 Hz, C-20-22), 103.5 (C-5), 98.7 (C-9). Análisis elemental C₁₈H₁₃FN₄O calculado %C 67.49, %H 4.09, %N 17.49 hallado %C 67.09±0.35, %H 4.09±0.30, %N 17.38±0.30.

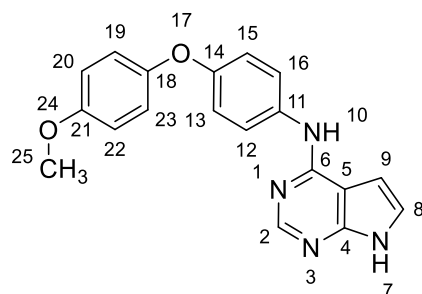
***N*-[4-(4-cianofenoxi)fenil]-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (41)**



Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-(4-cianofenoxi)anilina (336 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido beige. Rendimiento: 50 mg, 6%. P.f.: 259-260 °C.

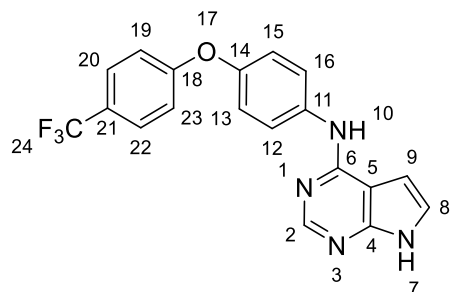
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.77 (s, 1H, H-7), 9.41 (s, 1H, H-10), 8.28 (s, 1H, H-2), 7.99 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.83 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-20-22), 7.25 (dd, *J* = 3.5, 2.3 Hz, 1H, H-8), 7.15 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13-15), 7.09 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-19-23), 6.79 (dd, *J* = 3.5, 1.8 Hz Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 161.9 (C-18), 153.3 (C-6), 150.8 (C-4), 150.7 (C-2), 148.4 (C-11), 137.8 (C-14), 134.6 (C-20-22), 122.2 (C-8), 121.8 (C-12-16), 120.7 (C-13-15), 118.8 (C-24), 117.3 (C-19-23), 104.5 (C-21), 103.6 (C-5), 98.7 (C-9). Análisis elemental C₁₉H₁₃N₅O calculado %C 69.71, %H 4.00, %N 21.39 hallado %C 69.33±0.35, %H 4.15±0.30, %N 21.01±0.30.

***N*-(4-(4-metoxifenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (42)**

Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-(4-metoxifenoxi)anilina (344 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 336 mg, 63%. P.f.: 202-203 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.74 (s, 1H, H-7), 9.30 (s, 1H, H-10), 8.25 (s, 1H, H-2), 7.84 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12-16), 7.23 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 7.04-6.94 (m, 6H, H-13-15-19-20-22-23), 6.76 (dd, $J = 3.1, 1.9$ Hz, 1H, H-9), 3.76 (s, 3H, H-25). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 155.2 (C-21), 153.5 (C-6), 152.4 (C-14), 150.8 (C-18), 150.7 (C-4), 150.4 (C-2), 135.5 (C-11), 122.0 (C-12-16), 121.9 (C-8), 119.8 (C-20-22), 118.0 (C-19-23), 115.0 (C-13-15), 103.4 (C-5), 98.7 (C-9), 55.4 (C-25). Análisis elemental $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$ calculado %C 68.66, %H 4.85, %N 16.86 hallado %C 67.97 \pm 0.35, %H 4.91 \pm 0.30, %N 16.64 \pm 0.30.

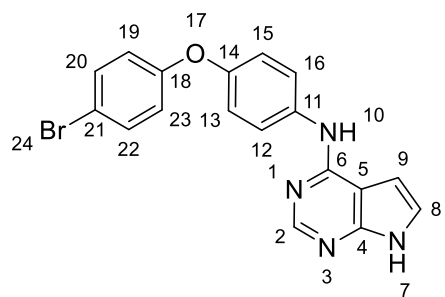
***N*-(4-(4-trifluorometilfenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (43)**

Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-(4-trifluorometilfenoxi)anilina (405 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido verdoso. Rendimiento: 438 mg, 74%. P.f.: 233-234 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.77 (s, 1H, H-7), 9.40 (s, 1H, H-10), 8.28 (s, 1H, H-2), 7.98 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12-16), 7.72 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-20-22), 7.24 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 7.14 (t, $J = 9.1$ Hz, 4H, H-13-15-19-23), 6.79 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 162.1 (C-18), 154.3 (C-6), 151.7 (C-2), 151.6 (C-4), 149.9 (C-11), 138.4 (C-14), 128.3 (q, $J_{\text{C-F}} = 3.6$ Hz, C-20-22), 125.2 (q, $J_{\text{C-F}} = 271.7$ Hz, C-24), 123.6 (q, $J_{\text{C-F}} = 32.1$ Hz, C-21), 123.1 (C-8), 122.7 (C-12-16), 121.4 (C-13-15), 118.0 (C-19-23), 104.5 (C-5), 99.6 (C-9). Análisis elemental $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}$ calculado %C 61.62, %H 3.54, %N 15.13 hallado %C 61.55 \pm 0.35, %H 3.51 \pm 0.30, %N 15.04 \pm 0.30.

***N*-(4-(4-bromofenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (44)**

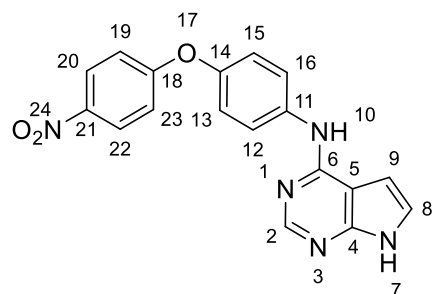


Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol) y 4-(4-bromofenoxi)anilina (336 mg, 1.63 mmol).

Sólido verde. Rendimiento: 518 mg, 83 %. P.f.: 257-258 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.75 (s, 1H, H-7), 9.35 (s, 1H, H-10), 8.27 (s, 1H, H-2), 7.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.54 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-20-22), 7.24 (dd, *J* = 3.5, 2.3 Hz, 1H, H-8), 7.08 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13-15), 6.96 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-19-23), 6.78 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 157.7 (C-18), 153.9 (C-6), 151.3 (C-4), 151.2 (C-2), 150.6 (C-14), 137.3 (C-11), 133.1 (C-20-22), 122.6 (C-8), 122.4 (C-12-16), 120.2 (C-19-23), 120.1 (C-13-15), 114.7 (C-21), 104.0 (C-5), 99.2 (C-9). Análisis elemental C₁₈H₁₃BrN₄O calculado %C 56.71, %H 3.44, %N 14.70 hallado %C 56.21±0.35, %H 3.51±0.30, %N 14.43±0.30.

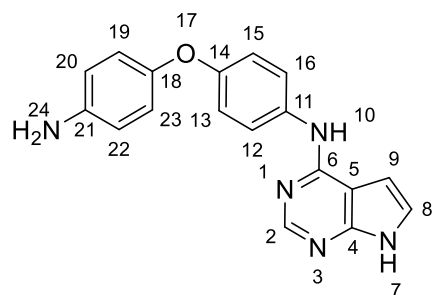
***N*-(4-(4-nitrofenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (45)**



Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-(4-nitrofenoxi)anilina (336 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido amarillo. Rendimiento: 172 mg, 66 %. P.f.: 270 °C.

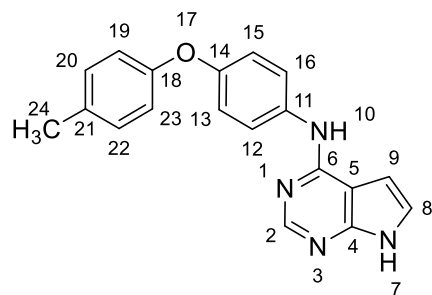
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.86 (s, 1H, H-7), 9.63 (s, 1H, H-10), 8.35-8.16 (m, 3H, H-2,20,22), 8.00 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.29-7.24 (m, 1H, H-8), 7.20 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13-15), 7.14 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, H-19-23), 6.84 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 163.6 (C-18), 153.1 (C-6), 150.5 (C-4), 150.1 (C-2), 148.7 (C-14), 142.0 (C-21), 137.7 (C-11), 126.2 (C-20-22), 122.5 (C-8), 122.3 (C-12-16), 120.9 (C-13-15), 116.9 (C-19-23), 103.6 (C-5), 99.1 (C-9). ESI calculado para C₁₈H₁₄N₅O₃ [M + H]⁺ 348.1091 hallado 348.1088.

***N*-(4-(4-aminofenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (46)**

Procedimiento general F. Reactivos: *N*-[4-(4-nitrofenoxi)fenil]-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (200 mg, 0.58 mmol) y dicloruro de estaño (715 mg, 3.17 mmol).

Sólido marrón. Rendimiento: 25 mg, 9 %. P.f.: 242-243 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.68 (s, 1H, H-7), 9.21 (s, 1H, H-10), 8.21 (s, 1H, H-2), 7.75 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12-16), 7.19 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 6.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-13-15), 6.76 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-19-23), 6.71 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9), 6.58 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-20-22), 4.92 (s, 2H, H-24). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 153.74 (C-14), 153.64 (C-6), 150.8 (C-4), 150.7 (C-2), 146.5 (C-18), 145.1 (C-21), 134.7 (C-11), 122.1 (C-12-16), 121.9 (C-8), 120.3 (C-19-23), 117.0 (C-13-15), 114.8 (C-20-22), 103.3 (C-5), 98.7 (C-9). ESI calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 318.1349 hallado 318.1348.

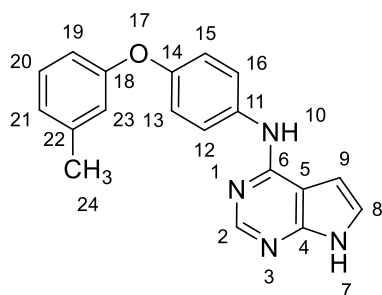
***N*-(4-(4-toliloxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (47)**

Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-(4-toliloxi)anilina (325 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido grisáceo. Rendimiento: 299 mg, 57%. P.f.: 229-230 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.72 (s, 1H, H-7), 9.29 (s, 1H, H-10), 8.24 (s, 1H, H-2), 7.85 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12-16), 7.22 (dd, $J = 3.5, 2.4$ Hz, 1H, H-8), 7.17 (dd, $J = 8.8, 0.7$ Hz, 2H, H-20-22), 6.99 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-13-15), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H-19-23), 6.75 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9), 2.28 (s, 3H, H-24). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 155.2 (C-18), 153.5 (C-6), 151.5 (C-14), 150.8 (C-2, 4), 136.0 (C-11), 131.9 (C-21), 130.3 (C-20-22), 122.03 (C-8), 121.98 (C-12-16), 118.9 (C-13-15), 117.9 (C-19-23), 103.5 (C-5), 98.7 (C-9), 20.2 (C-24). Análisis elemental $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$ calculado %C 72.13, %H 5.10, %N 17.71 hallado %C 71.84 \pm 0.35, %H 5.15 \pm 0.30, %N 17.96 \pm 0.30.

***N*-(4-(3-toliloxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (48)**

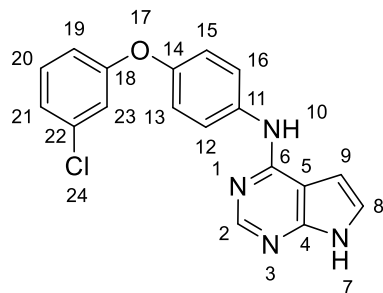


Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-(3-toliloxi)anilina (325 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido verdoso. Rendimiento: 416 mg, 80%. P.f.: 212-213 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.73 (s, 1H, H-7), 9.31 (s, 1H, H-10), 8.25 (s, 1H, H-2), 7.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.28-7.20 (m, 2H, H-8, 20), 7.02 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13-15), 6.91 (ddt, *J* = 7.5, 1.7, 0.8 Hz, 1H, H-21), 6.82-6.78 (m, 3H, H-9, 19, 23), 2.28 (s, 3H, H-24). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 157.7 (C-18), 153.5 (C-6), 150.9, 150.79, 150.76 (C-2, 4, 14), 139.6 (C-22), 136.3 (C-11), 129.6 (C-8), 123.5 (C-21), 122.1 (C-20), 121.9 (C-12-16), 119.4 (C-23), 118.1 (C-13-15), 114.7 (C-19), 103.5 (C-5), 98.7 (C-9), 21.0 (C-24). ESI calculado para C₁₉H₁₆N₄O [M + H]⁺ 317.1397 hallado 317.1393.

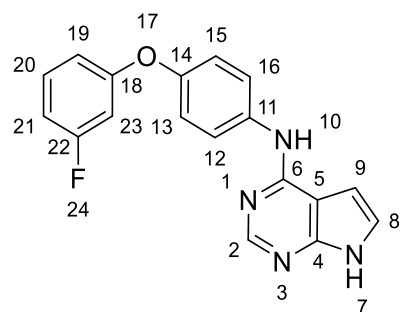
***N*-(4-(3-clorofenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (49)**



Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol) y 4-(3-clorofenoxi)anilina (351 mg, 1.63 mmol).

Sólido verdoso. Rendimiento: 335 mg, 62%. P.f.: 224-225 °C.

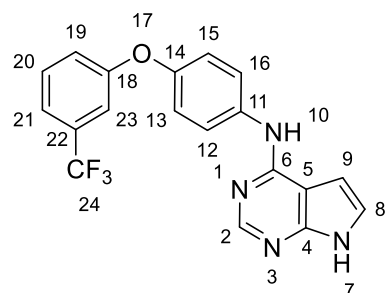
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.79 (s, 1H, H-7), 9.39 (s, 1H, H-10), 8.29 (s, 1H, H-2), 7.96 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.41 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-22), 7.26 (dd, *J* = 3.5, 2.2 Hz, 1H, H-8), 7.17 (ddd, *J* = 8.0, 2.0, 0.9 Hz, 1H, H-23), 7.12 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13-15), 7.03 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-21), 6.97 (ddd, *J* = 8.3, 2.3, 0.8 Hz, 1H, H-19), 6.80 (dd, *J* = 3.5, 1.8 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 158.9 (C-18), 153.4 (C-6), 150.8 (C-5), 150.8 (C-4), 149.7 (C-14), 137.1 (C-11), 133.9 (C-20), 131.4 (C-22), 122.5 (C-21), 122.2 (C-8), 121.9 (C-12-16), 120.0 (C-13-15), 117.2 (C-19), 116.0 (C-23), 103.54 (C-5), 98.70 (C-9). Análisis elemental C₁₈H₁₃ClN₄O calculado %C 64.20, %H 3.89, %N 16.64 hallado %C 64.06±0.35, %H 3.91±0.30, %N 16.75±0.30.

***N*-(4-(3-fluorofenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (50)**

Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-(3-fluorofenoxi)anilina (338 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 300 mg, 57%. P.f.: 213-214 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.75 (s, 1H, H-7), 9.36 (s, 1H, H-10), 8.26 (s, 1H, H-2), 7.94 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.44-7.34 (m, 1H, H-22), 7.23 (dd, *J* = 3.5, 2.3 Hz, 1H, H-8), 7.10 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13-15), 6.92 (tdd, *J* = 8.5, 2.4, 1.0 Hz, 1H, H-21), 6.85-6.75 (m, 3H, H-9-19-29). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 162.9 (d, *J*_{C-F} = 244.3 Hz, C-20), 159.4 (d, *J*_{C-F} = 11.0 Hz, C-18), 153.4 (C-6), 150.8 (C-4), 150.7 (C-2), 149.8 (C-14), 137.1 (C-11), 131.2 (C-22), 122.2 (C-8), 121.9 (C-12-16), 120.0 (C-13-15), 113.2 (d, *J*_{C-F} = 2.9 Hz, C-23), 109.3 (d, *J*_{C-F} = 21.2 Hz, C-21), 104.8 (d, *J*_{C-F} = 24.8 Hz, C-19), 103.6 (C-5), 98.7 (C-9). Análisis elemental C₁₈H₁₃FN₄O calculado %C 67.49, %H 4.09, %N 17.49 hallado %C 67.38±0.35, %H 4.20±0.30, %N 17.43±0.30.

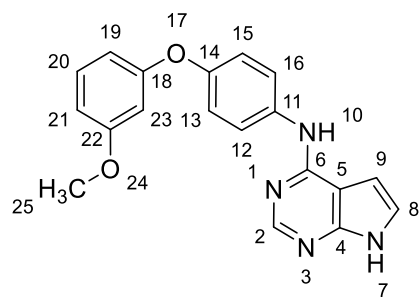
***N*-(4-(3-trifluorometilfenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (51)**

Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-(3-trifluoro-metilfenoxi)anilina (405 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido grisáceo. Rendimiento: 465 mg, 78%. P.f.: 176-177 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.75 (s, 1H, H-7), 9.37 (s, 1H, H-10), 8.27 (s, 1H, H-2), 7.96 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.61 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-22), 7.44 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-21), 7.32-7.19 (m, 3H, H-8-19-23), 7.13 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-13-15), 6.78 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 158.8 (C-18), 153.8 (C-6), 151.2 (C-2), 151.1 (C-4), 149.9 (C-14), 137.6 (C-11), 131.6 (C-22), 130.95 (q, *J*_{C-F} = 32 Hz, C-20), 127.7 (d, *J*_{C-F} = 272.5 Hz, C-24), 122.5 (C-8), 122.3 (C-12-16), 121.5 (C-23), 120.5 (C-13-15), 119.5 (d, *J*_{C-F} = 3.9 Hz, C-21), 113.9 (d, *J*_{C-F} = 4.0 Hz, C-19), 103.9 (C-5), 99.1 (C-9). Análisis elemental C₁₉H₁₃F₃N₄O calculado %C 61.62, %H 3.54, %N 15.13 hallado %C 61.60±0.35, %H 3.47±0.30, %N 15.22±0.30.

***N*-(4-(3-metoxifenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (52)**

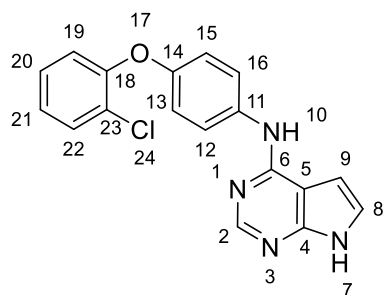


Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-(3-metoxifenoxi)anilina (280 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido verdoso. Rendimiento: 142 mg, 33%. P.f.: 210-211 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.73 (s, 1H, H-7), 9.32 (s, 1H, H-10), 8.25 (s, 1H, H-2), 7.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.31-7.20 (m, 2H, H-8-22), 7.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13-15), 6.76 (dd, *J* = 3.5, 1.8 Hz, 1H, H-9), 6.67 (ddd, *J* = 8.3, 2.4, 0.9 Hz, 1H, H-23), 6.59-6.48 (m, 2H, H-19-21), 3.73 (s, 3H, H-25). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 160.6 (C-20), 158.9 (C-18), 153.5 (C-6), 150.80 (C-4), 150.75 (C-2), 150.5 (C-14), 136.5 (C-11), 130.4 (C-22), 122.1 (C-8), 121.9 (C-12-16), 119.6 (C-13-15), 109.5 (C-21), 108.4 (C-23), 103.7 (C-19), 103.5 (C-5), 98.7 (C-9), 55.2 (C-25). ESI calculado para C₁₉H₁₇N₄O₂ [M + H]⁺ 333.1346 hallado 333.1342.

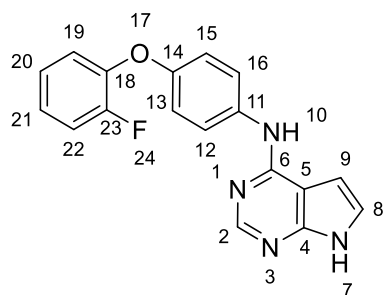
***N*-(4-(2-clorofenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (53)**



Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol) y 4-(2-clorofenoxi)anilina (286 mg, 1.30 mmol).

Sólido verdoso. Rendimiento: 346 mg, 79%. P.f.: 215-216 °C.

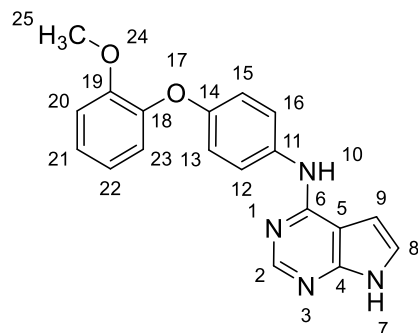
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.73 (s, 1H, H-7), 9.33 (s, 1H, H-10), 8.25 (s, 1H, H-2), 7.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.58 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, H-20), 7.34 (ddd, *J* = 8.2, 7.4, 1.6 Hz, 1H, H-22), 7.22 (dd, *J* = 3.5, 2.4 Hz, 1H, H-8), 7.17 (ddd, *J* = 8.0, 7.4, 1.5 Hz, 1H, H-21), 7.05-6.95 (m, 3H, H-13-15-23), 6.76 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 153.5 (C-6), 152.6 (C-18), 150.80 (C-4/14), 150.74 (C-4/14), 150.71 (C-2), 136.5 (C-11), 130.6 (C-20), 128.7 (C-22), 124.6 (C-21), 123.8 (C-19), 122.1 (C-8), 122.0 (C-12-16) 119.8 (C-23), 118.4 (C-13-15), 103.5 (C-5), 98.7 (C-9). Análisis elemental C₁₈H₁₃ClN₄O calculado %C 64.20, %H 3.89, %N 16.64 hallado %C 64.11±0.35, %H 3.96±0.30, %N 16.63±0.30.

***N*-(4-(2-fluorofenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (54)**

Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol) y 4-(2-fluorofenoxi)anilina (338 mg, 1.63 mmol).

Sólido verdoso. Rendimiento: 320 mg, 61%. P.f.: 219-220 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.73 (s, 1H, H-7), 9.31 (s, 1H, H-10), 8.24 (s, 1H, H-2), 7.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12-16), 7.49-7.31 (m, 1H, H-21), 7.24-7.08 (m, 4H, H-8-20-22-23), 7.01 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-13-15), 6.75 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 153.5 (C-6), 153.3 (d, $J_{\text{C-F}} = 245.8$ Hz, C-19), 151.3 (C-14), 150.79 (C-4), 150.75 (C-2), 143.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 11.2$ Hz, C-18), 136.2 (C-11), 125.3 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.8$ Hz, C-22), 124.7 (d, $J_{\text{C-F}} = 7.0$ Hz, C-23), 122.0 (C-12-16), 121.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 80.6$ Hz, C-20), 117.7 (C-13-15), 117.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 17.9$ Hz, C-21), 103.5 (C-5), 98.7 (C-9). Análisis elemental $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{O}$ calculado %C 67.49, %H 4.09, %N 17.49 hallado %C 67.38 \pm 0.35, %H 4.16 \pm 0.30, %N 17.44 \pm 0.30.

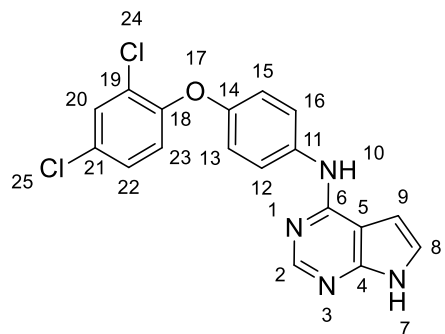
***N*-(4-(2-metoxifenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (55)**

Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-(4-nitrofenoxi)anilina (345 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 349 mg, 64%. P.f.: 214-215 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.69 (s, 1H, H-7), 9.23 (s, 1H, H-10), 8.21 (s, 1H, H-2), 7.76 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12-16), 7.20 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 7.18-7.14 (m, 2H, H-20-22), 7.02-6.92 (m, 2H, H-21,23), 6.86 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-13-15), 6.71 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9), 3.77 (s, 3H, H-25). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 153.6 (C-6), 152.6 (C-14), 151.1 (C-19), 150.8 (C-4), 150.7 (C-2), 144.6 (C-18), 135.0 (C-11), 124.9 (C-22), 122.1 (2C, C-12-16), 121.9 (C-8), 121.0 (C-21/23), 120.7 (C-21/23), 116.7 (C-13-15), 113.3 (C-20), 103.3 (C-5), 98.7 (C-9), 55.6 (C-25). Análisis elemental $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$ calculado %C 68.66, %H 4.85, %N 16.96 hallado %C 68.01 \pm 0.35, %H 4.82 \pm 0.30, %N 16.97 \pm 0.30.

***N*-(4-(2,4-clorofenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (56)**

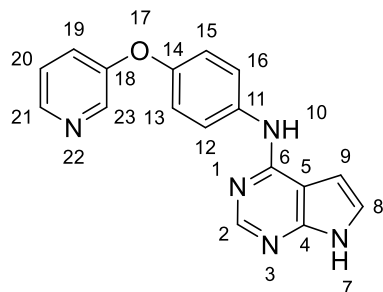


Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol) y 4-(2,4-dicloro fenoxi)anilina (330 mg, 1.30 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 302 mg, 63%. P.f.: 252-253 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.72 (s, 1H, H-7), 9.37 (s, 1H, H-10), 8.24 (s, 1H, H2), 7.89 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H-12-16), 7.72 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-20), 7.39 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H, H-22), 7.22 (dd, *J* = 3.5, 2.3 Hz, 1H, H-8), 7.02 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 3H, H-13-15-22), 6.75 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 153.6 (C-6), 152.0 (C-18), 150.9 (C-2,4), 150.5 (C-14), 136.9 (C-11), 130.1 (C-20), 128.8 (C-22), 127.7 (C-21), 124.9 (C-19), 122.4 (C-8), 122.2 (C-12-16), 120.9 (C-23), 118.8 (C-13-15), 103.7 (C-5), 98.9 (C-9). Análisis elemental C₁₈H₁₂Cl₂N₄O calculado %C 58.24, %H 3.26, %N 15.09 hallado %C 58.13±0.35, %H 3.33±0.30, %N 15.17±0.30.

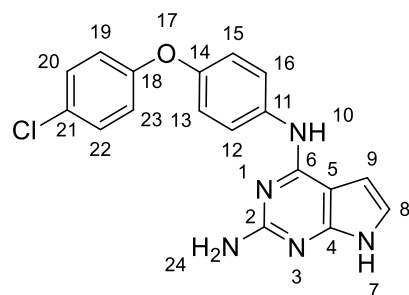
***N*-(4-(piridin-3-iloxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (57)**



Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol), 4-(piridin-3-iloxi)anilina (243 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (29 mg, 0.13 mmol).

Sólido beige. Rendimiento: 137 mg, 35%. P.f.: 203-204 °C.

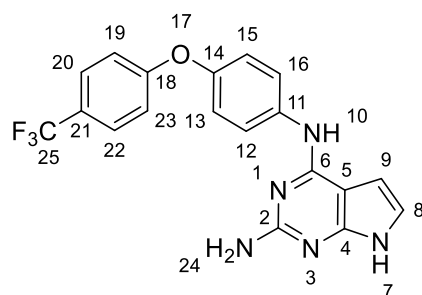
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm): δ 11.75 (s, 1H, H-7), 9.36 (s, 1H, H-10), 8.40-8.36 (m, 1H, H-23), 8.35-8.31 (m, 1H, H-21), 8.26 (s, 1H, H-2), 7.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.45-7.36 (m, 2H, H-19-20), 7.23 (dd, *J* = 3.5, 2.3 Hz, 1H, H-8), 7.10 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13-15), 6.77 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 154.2 (C-18), 153.5 (C-6), 150.82 (C-4), 150.74 (C-2), 150.1 (C-14), 143.9 (C-21), 140.2 (C-23), 137.0 (C-11), 124.60 (C-20/19), 124.55 (C-20/19), 122.2 (C-8), 121.9 (C-12-16), 119.5 (C-13-15), 103.6 (C-5), 98.7 (C-9). ESI calculado para C₁₇H₁₄N₅O [M + H]⁺ 304.11193 hallado 304.1191.

***N*⁴-(4-(4-clorofenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-2,4-diamina (58)**

Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-2-amina (60 mg, 0.35 mmol) y 4-(4-clorofenoxi)anilina (235 mg, 1.05 mmol (3 equivalentes)).

Sólido blanco. Rendimiento: 86 mg, 70%. P.f.: 232-233 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 10.83 (s, 1H, H-7), 8.94 (s, 1H, H-10), 7.98 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H-12-16), 7.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-20-22), 6.99 (m, 4H, H-13-15-19-23), 6.76 (dd, *J* = 3.5, 2.1 Hz, 1H, H-8), 6.53 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9), 5.70 (s, 2H, H-24). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 159.4 (C-2), 156.8 (C-18), 154.0 (C-6), 153.5 (C-4), 149.7 (C-14), 137.5 (C-11), 129.7 (H-20-22), 126.3 (C-21), 121.3 (C-12-16), 119.5+119.1 (C-13-15-19-23), 117.8 (C-8), 98.8 (C-9), 96.9 (C-5). ESI calculado para C₁₈H₁₅ClN₅O [M + H]⁺ 352.0960 hallado 352.0956.

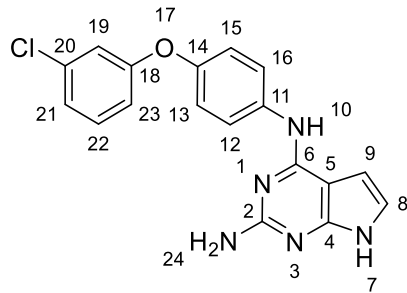
***N*⁴-(4-(4-(trifluorometil)fenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-2,4-diamina (59)**

Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-2-amina (50 mg, 0.30 mmol) y 4-(4-trifluorometilfenoxi)anilina (228 mg, 0.9 mmol (3 equivalentes)).

Sólido blanco. Rendimiento: 85 mg, 74%. P.f.: 201-202 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 10.85 (s, 1H, H-7), 8.99 (s, 1H, H-10), 8.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.72 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-20-22), 7.11 (dd, *J* = 9.0, 0.8 Hz, 2H, H-19-23), 7.07 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13-15), 6.77 (dd, *J* = 3.5, 2.2 Hz, 1H, H-8), 6.55 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9), 5.72 (s, 2H, H-24). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 161.3 (C-18), 159.4 (C-2), 153.9 (C-4), 153.5 (C-6), 148.5 (C-14), 138.2 (C-11), 127.4 (q, *J*_{C-F} = 3.7 Hz, H-20-22), 124.4 (d, *J*_{C-F} = 271.1 Hz, C-25), 122.7 (d, *J*_{C-F} = 32 Hz, C-21), 121.2 (C-12-16), 120.4 (C-13-15), 117.9 (C-8), 117.1 (C-19-23), 98.8 (C-9), 96.9 (C-5). ESI calculado para C₁₉H₁₅F₃N₅O [M + H]⁺ 386.1223 hallado 386.1220.

***N*⁴-(4-(3-clorofenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-2,4-diamina (60)**

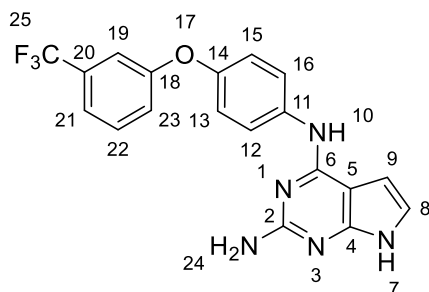


Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-2-amina (50 mg, 0.30 mmol) y 4-(3-cloro fenoxi)anilina (198 mg, 1.05 mmol (3 equivalentes)).

Sólido blanco. Rendimiento: 91 mg, 93%. P.f.: 177-178 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 10.84 (s, 1H, H-7), 8.97 (s, 1H, H-10), 8.00 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.39 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-22), 7.14 (ddd, *J* = 8.0, 2.0, 0.9 Hz, H-21) 7.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13-15) 6.99 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-19), 6.94 (ddd, *J* = 8.3, 2.4, 0.9 Hz, 1H, H-23), 6.76 (dd, *J* = 3.5, 2.2 Hz, 1H, H-8), 6.54 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9), 5.71 (s, 2H, H-25). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 159.4 (C-2), 159.1 (C-18), 153.9 (C-6), 153.5 (C-4), 149.1 (C-14), 137.8 (C-11), 133.9 (C-20), 131.3 (C-22), 122.5 (C-21), 121.3 (C-12-16), 119.9 (C-13-15), 117.8 (C-8), 117.1 (C-19), 116.0 (C-23), 98.8 (C-9), 96.9 (C-5). ESI calculado para C₁₈H₁₅ClN₅O [M + H]⁺ 352.0960 hallado 352.0955.

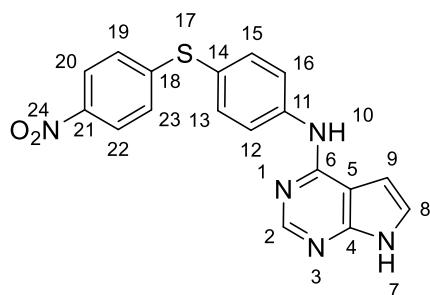
***N*⁴-(4-(3-(trifluorometil)fenoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-2,4-diamina (61)**



Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-2-amina (60 mg, 0.35 mmol) y 4-(3-trifluoro metilfenoxi)anilina (266 mg, 1.05 mmol (3 equivalentes)).

Sólido verdoso. Rendimiento: 52 mg, 45%. P.f.: 179-180 °C.

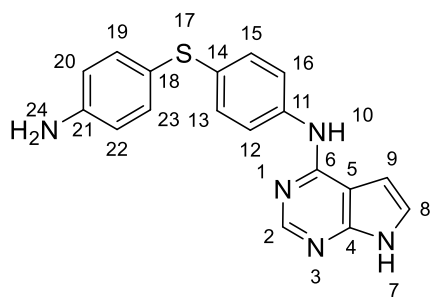
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 10.84 (s, 1H, H-7), 8.98 (s, 1H, H-10), 8.02 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H-12-16), 7.60 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-22), 7.44 (ddt, *J* = 7.7, 1.7, 0.9 Hz, 1H, H-21), 7.32-7.20 (m, 2H, H-19-23), 7.06 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-13-15), 6.76 (dd, *J* = 3.5, 2.2 Hz, 1H, H-8), 6.54 (dd, *J* = 3.5, 2.0 Hz, 1H, H-9), 5.72 (s, 2H, H-25). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 159.4 (C-2), 158.6 (C-18), 153.9 (C-6), 153.5 (C-4), 148.9 (C-14), 138.0 (C-11), 131.3 (C-22), 130.6 (d, *J*_{C-F} = 31.9 Hz, C-20), 123.8 (d, *J*_{C-F} = 272.5 Hz, C-25), 121.3 (C-12-16), 121.1 (C-19), 120.0 (C-13-15), 119.0 (d, *J*_{C-F} = 4.1 Hz, C-21), 117.9 (C-8), 113.4 (d, *J*_{C-F} = 4.0 Hz, H-23), 98.8 (C-9), 96.9 (C-5). ESI calculado para C₁₉H₁₅F₃N₅O [M + H]⁺ 386.1223 hallado 386.1219.

***N*-[4-((4-nitrofenil)tio)fenil]-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (62)**

Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-(4-nitrotiofenoxi)anilina (394 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido naranja. Rendimiento: 244 mg, 42%. P.f.: 265-266 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.46 (s, 1H, H-7), 10.72 (s, 1H, H-10), 8.43 (s, 1H, H-2), 8.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-12-16), 8.00 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-20-22), 7.67 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-19-23), 7.44 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-8), 7.33 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-13-15), 7.03 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 151.7 (C-6), 148.3 (C-11), 147.6 (C-4), 146.6 (C-2), 144.9 (C-14), 139.9 (C-18), 135.7 (C-19-23), 126.4 (C-13-15), 124.3 (C-12-16), 124.1 (C-21), 123.7 (C-8), 123.5 (C-20-22), 103.7 (C-5), 100.7 (C-9). Análisis elemental C₁₈H₁₃N₅O₂S calculado %C 59.49, %H 3.61, %N 19.27 %S 8.82 hallado %C 59.26±0.35, %H 3.70±0.30, %N 19.37±0.30, %S 8.95±0.35.

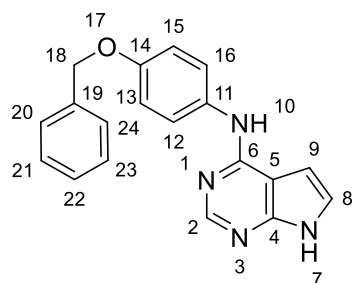
***N*-[4-((4-aminofenil)tio)fenil]-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (63)**

Procedimiento general F. Reactivos: *N*-[4-((4-nitrofenil)tio)fenil]-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (100 mg, 0.28 mmol) y dicloruro de estaño (341 mg, 1.51 mmol).

Sólido marrón. Rendimiento: 83 mg, 69%. P.f.: 200-201 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.79 (s, 1H, H-7), 9.44 (s, 1H, H-10), 8.25 (s, 1H, H-2), 7.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-12-16), 7.23 (dd, *J* = 3.5, 2.3 Hz, 1H, H-9), 7.14 (dd, *J* = 16.7, 8.6 Hz, 4H, H-19-20-22-23), 6.84 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-8), 6.61 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-13-15), 5.48 (s, 2H, H-24). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 153.3 (C-6), 150.8 (C-4), 150.6 (C-2), 149.3 (C-18), 138.5 (C-14), 135.0 (C-19-23), 131.3 (C-11), 128.2 (C-13-15), 122.1 (C-8), 120.9 (C-12-16), 117.1 (C-21), 114.7 (C-20-22), 103.6 (C-5), 98.7 (C-9). Análisis elemental C₁₈H₁₅N₅S calculado %C 59.49, %H 3.61, %N 19.27 %S 8.82 hallado %C 59.26±0.35, %H 3.70±0.30, %N 19.37±0.30, %S 8.95±0.35.

***N*-(4-(benziloxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (64)**

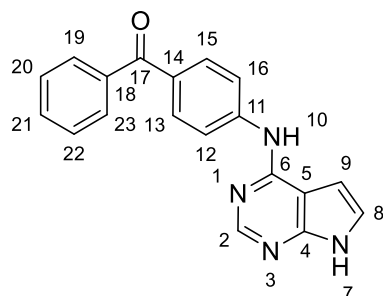


Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), 4-benciloxianilina (325 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 149 mg, 28 %. P.f.: 238-239 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.66 (s, 1H, H-7), 9.15 (s, 1H, H-10), 8.20 (s, 1H, H-2), 7.71 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H-12-16), 7.50-7.29 (m, 5H, H-20-21-22-23-24), 7.18 (dd, *J* = 3.5, 2.4 Hz, 1H, H-8), 7.00 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H-13-15), 6.67 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9), 5.09 (s, 2H, H-18). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 153.80 (C-14/C-6), 153.76 (C-14/C-6), 150.9 (C-4), 150.7 (C-2), 137.3 (C-19), 133.5 (C-11), 128.4 (C-21-23), 127.74 (C-22), 127.66 (C-20-24), 122.3 (C-12-16), 122.0 (C-8), 114.7 (C-13-15), 103.2 (C-5), 98.7 (C-9), 69.4 (C-18). ESI calculado para C₁₉H₁₇N₄O [M + H]⁺ 317.1397 hallado 317.1395.

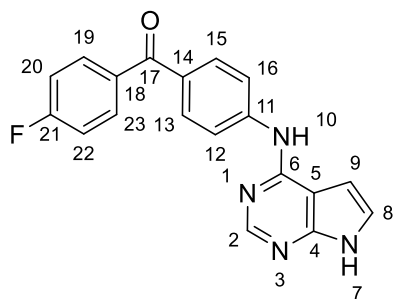
4-((7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)fenil)(fenil)metanona (65)



Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol), (4-aminofenil)(fenil)metanona (316 mg, 1.63 mmol) y tricloruro de indio (35 mg, 0.16 mmol).

Sólido verdoso. Rendimiento: 304 mg, 97 %. P.f.: 247-248 °C.

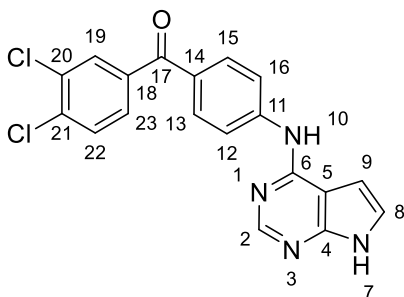
¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.91 (s, 1H, H-7), 9.76 (s, 1H, H-10), 8.38 (s, 1H, H-2), 8.16 (d, *J* = 8.9 Hz 2H, H-12-16), 7.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-19-23), 7.77-7.53 (m, 5H, H-13-15-20-21-22), 7.32 (dd, *J* = 3.5, 2.3 Hz, 1H, H-8), 6.89 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 194.4 (C-17), 152.8 (C-6), 151.2 (C-4), 150.5 (C-2), 145.1 (C-18), 137.9 (C-14), 132.0 (C-21), 131.1 (C-19-23), 129.6 (C-11), 129.3 (C-13-15), 128.4 (C-20-22), 123.0 (C-8), 118.6 (C-12-16), 104.4 (C-5), 98.7 (C-9). ESI calculado para C₁₉H₁₅N₄O [M + H]⁺ 315.1240 hallado 315.1238.

(4-((7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)amino)fenil)(4-fluorofenil)metanona (66)

Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (154 mg, 1.00 mmol) y (4-aminofenil)(4-fluorofenil)metanona (215 mg, 1.00 mmol).

Sólido verde. Rendimiento: 63 mg, 19%. P.f.: 275-276 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.89 (s, 1H, H-7), 9.75 (s, 1H, H-10), 8.38 (s, 1H, H-2), 8.16 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-12-16), 7.93-7.72 (m, 4H, H-13-15-19-23), 7.39 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-20-22), 7.32 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 6.88 (dd, $J = 3.5, 2.3$, 1H, H-9). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 193.1 (C-17), 164.3 (d, $J_{\text{C-F}} = 250.3$ Hz, C-21), 152.9 (C-6), 151.2 (C-4), 150.5 (C-2), 145.2 (C-14), 134.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.2$ Hz, C-18), 132.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 9.2$ Hz, C-19-23), 131.1 (C-13-15), 129.5 (C-11), 123.0 (C-8), 118.7 (C-12-16), 115.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 22.0$ Hz, C-20-22), 104.4 (C-5), 98.8 (C-9). $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{O}$ calculado %C 68.67, %H 3.94, %N 16.86 hallado %C 68.32 \pm 0.35, %H 3.90 \pm 0.30, %N 16.72 \pm 0.30.

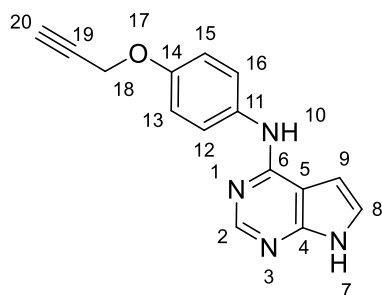
(4-((7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)amino)fenil)(3,4-diclorofenil)metanona (67)

Procedimiento general B. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (250 mg, 1.63 mmol) y (4-aminofenil)(3,4-diclorofenil)metanona (270 mg, 1.00 mmol).

Sólido verde. Rendimiento: 133 mg, 35%. P.f.: 274-275 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.92 (s, 1H, H-7), 9.79 (s, 1H, H-10), 8.40 (s, 1H, H-2), 8.19 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-12-16), 7.92 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-19), 7.82 (m, 3H, H-13-15-23), 7.69 (dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, 1H, H-20), 7.34 (dd, $J = 3.4, 2.4$ Hz, 1H, H-8), 6.89 (dd, $J = 3.4, 1.9$ Hz, 1H, H-9). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 192.0 (C-17), 152.8 (C-6), 151.2 (C-4), 150.5 (C-2), 145.6 (C-22), 138.4 (C-11), 134.6 (C-18), 131.5 (C-20), 131.3 (C-13-15), 130.9 (C-21), 130.8 (C-19), 129.3 (C-23), 128.7 (C-14), 123.1 (C-8), 118.7 (C-12-16), 104.5 (C-5), 98.7 (C-9). ESI calculado $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 383.0461 hallado 383.0457.

N-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (73)



Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol) y 4-(prop-2-in-1-iloxi)anilina (191 mg, 1.30 mmol) y tricloruro de indio (29 mg, 0.13 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 221 mg, 69%. P.f.: 217-218 °C.

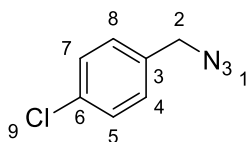
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 11.70 (s, 1H, H-7), 9.19 (s, 1H, H-3), 8.21 (s, 1H, H-10), 7.74 (dt, $J = 9.5, 3.4$ Hz, 2H, H-12-16), 7.19 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 6.98 (dd, $J = 9.0, 3.4$ Hz, 2H, H-13-15), 6.70 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9), 4.77 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-18), 3.57 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-20).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 153.7 (C-6), 152.6 (C-14), 150.8 (C-4), 150.7 (C-2), 134.0 (C-11), 122.1 (C-12-16), 121.8 (C-8), 114.8 (C-13-15), 103.2 (C-5), 98.7 (C-9), 79.5 (C-19), 78.1 (C-20), 55.6 (C-18). Análisis elemental $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$ calculado %C 68.17, %H 4.58, %N 21.20 hallado %C 67.86 \pm 0.35, %H 4.63 \pm 0.30, %N 21.23 \pm 0.30.

1.1.5 Síntesis de azidas

Procedimiento general de síntesis: En un matraz de 50 mL se añadieron 1 equivalente de derivado bencil o fenetil bromuro y 1.5 equivalente de azida sódica y se disolvieron en DMF (5 mL/mmol). La reacción se agitó toda la noche y al día siguiente se añadió agua y a continuación 20 mL de AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución de cloruro sódico saturada. El compuesto se usó en la siguiente reacción tras confirmar su presencia por RMN.

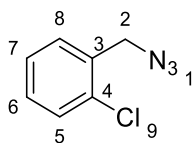
1-Azidometil-4-clorobenceno (68)



Reactivos: 1-bromometil-4-clorobenceno (150 mg, 0.73 mmol) y azida sódica (71 mg, 1.10 mmol).

Aceite ámbar. Rendimiento: 125 mg, 74%.

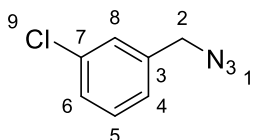
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 7.47 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-5-7), 7.42 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-4-8), 4.47 (s, 2H, H-2). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 135.2 (C-6), 133.2 (C-3), 130.8 (C-5-7), 129.2 (C-4-8), 53.2 (C-2).

1-Azidometil-2-clorobenceno (69)

Reactivos: 1-bromometil-2-clorobenceno (205 mg, 1.00 mmol) y azida sódica (98 mg, 1.50 mmol).

Aceite ámbar. Rendimiento: 110 mg, 65%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) δ 7.46-7.35 (m, 2H), 7.33-7.24 (m, 2H), 4.50 (s, 2H, H-2). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 133.8 (C-4), 133.3 (C-3), 130.0, 129.8, 129.6, 127.2, 52.3 (C-2).

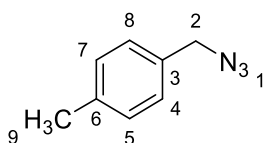
1-Azidometil-3-clorobenceno (70)

Reactivos: 1-bromometil-3-clorobenceno (206 mg, 1.00 mmol) y azida sódica (98 mg, 1.50 mmol).

Aceite ámbar. Rendimiento: 142 mg, 84%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 7.32 (dd, $J = 3.8, 0.8$ Hz, 3H), 7.25-7.12 (m, 1H), 4.33 (s, 2H, H-2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 137.5 (C-7), 134.9 (C-3), 130.3, 128.6, 128.3, 126.3, 54.3 (C-2).

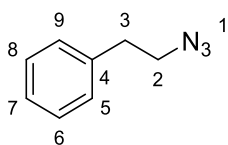
1-Azidometil-4-metilbenceno (71)

Reactivos: 1-bromometil-4-metilbenceno (185 mg, 1.00 mmol) y azida sódica (98 mg, 1.50 mmol).

Rendimiento: 30 mg, 20%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 7.34-7.15 (m, 4H, H-3,4,6,7), 4.38 (s, 2H, H-1), 2.31 (s, 3H, H-8).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 133.0 (C-2), 129.3 (C-4-6), 128.0 (C-3-7), 52.6 (C-1), 20.7 (C-8).

2-Azidoetilbenceno (72)

Reactivos: 1-bromoetilbenceno (185 mg, 1.00 mmol) y azida sódica (98 mg, 1.50 mmol).

Rendimiento: 70 mg, 53%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 7.35-7.18 (m, 5H, H-5,6,7,8,9), 3.56 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-2), 2.85 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-3).

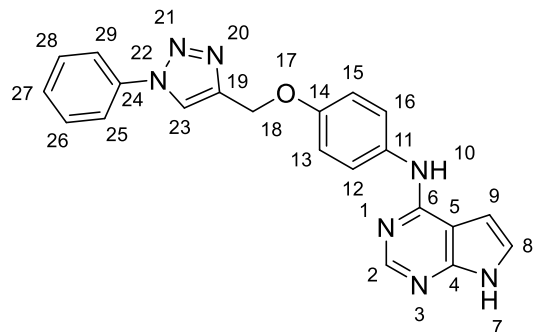
$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 138.8 (C-2), 137.5 (C-5), 129.3, 128.9, 126.9 (C-4), 52.0 (C-2), 34.9 (C-3).

1.1.6 Síntesis de triazoles

Procedimiento general de síntesis: 1 equivalente de azida, 1 equivalente de *N*-(4-(prop-2-in-1-ilo)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (**73**), 0.1 equivalentes de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.2 equivalentes de L-ascorbato sódico y 0.1 equivalentes de tris((1-benzil-4-triazolil)metil)amina

(TBTA) se disolvieron en DMF (0.1 mmol/1 mL). La reacción se agitó durante 24h y se paró añadiendo agua. La DMF se evaporó a presión reducida, el crudo resultante se disolvió en AcOEt y la fase orgánica se lavó con una disolución de cloruro sódico y agua (1:1) para eliminar todos los restos de DMF. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla de CH₂Cl₂ y MeOH como eluyentes (proporción 40:1).

***N*-(4-((1-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (74)**

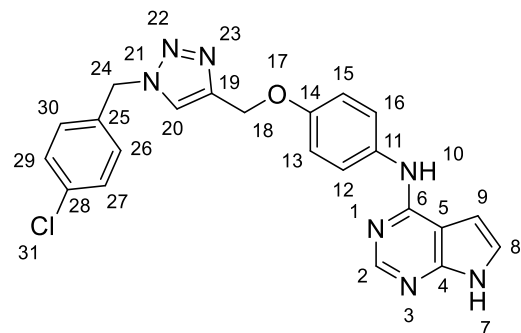


Reactivos: fenilazida (600 μ L, 0.30 mmol), *N*-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (80 mg, 0.30 mmol), CuSO₄·5H₂O (8 mg, 0.03 mmol), L-ascorbato sódico (12 mg, 0.06 mmol) y TBTA (16 mg, 0.03 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 86 mg, 34%. P.f. 267-268 °C.

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.68 (s, 1H, H-7), 9.18 (s, 1H, H-10), 8.97 (s, 1H, H-23), 8.22 (s, 1H, H-2), 7.92 (dd, *J* = 7.0, 1.5 Hz, 2H, H-25-29), 7.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-12-16), 7.61 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-26-28), 7.50 (tt, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H, H-27), 7.19 (dd, *J* = 3.5, 2.2 Hz, 1H, H-8), 7.08 (d, *J* = 9.1, 2H, H-13-15), 6.70 (dd, *J* = 3.5, 1.8 Hz, 1H, H-9), 5.23 (s, 2H, H-18). ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) 153.7 (C-6), 153.4 (C-14), 150.9 (C-2), 150.7 (C-4), 144.1 (C-19), 136.6 (C-24), 133.8 (C-11), 129.9 (C-26-28), 128.7 (C-27), 122.8 (C-23), 122.2 (C-12-16), 121.8 (C-8), 120.1 (C-25-29), 114.7 (C-13-15), 103.3 (C-5), 98.8 (C-9), 61.3 (C-18). ESI calculado C₂₁H₁₈N₇O [M + H]⁺ 384.1567 hallado 384.1564

***N*-(4-((1-(4-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (75)**



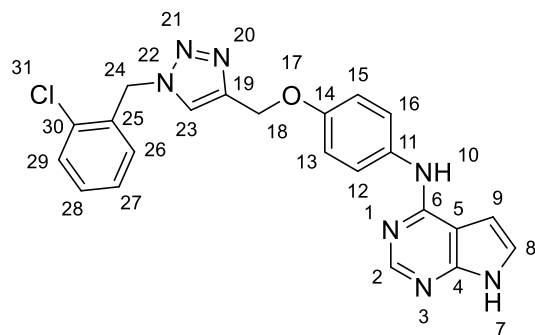
Reactivos: 1-azidometil-4-clorobenceno (60 mg, 0.36 mmol), *N*-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (94 mg, 0.36 mmol), L-ascorbato sódico (14 mg, 0.07 mmol), CuSO₄·5H₂O (9 mg, 0.04 mmol), y TBTA (19 mg, 0.04 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 100 mg, 64%. P.f.: 207-208 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.67 (s, 1H, H-7), 9.16 (s, 1H, H-10), 8.29 (s, 1H, H-20), 8.20 (s, 1H, H-2), 7.73 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H-12-16), 7.45 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-27-29), 7.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-26-30), 7.18 (dd, *J* = 3.5, 2.3 Hz, 1H, H-8), 7.01 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H-13-15), 6.68 (dd, *J* = 3.5, 1.8 Hz, 1H, H-9), 5.62 (s,

2H, H-24), 5.12 (s, 2H, H-18). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) 153.7 (C-6), 153.4 (C-14), 150.9 (C-4), 150.7 (C-2), 143.3 (C-19), 135.0 (C-25), 133.7 (C-11), 132.9 (C-28), 129.9 (C-26-30), 128.8 (C-27-29), 124.7 (C-20), 122.2 (C-12-16), 121.8 (C-8), 114.7 (C-13-15), 112.2 (C-5), 98.8 (C-9), 61.3 (C-18), 52.0 (C-24). ESI calculado $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 432.1334 hallado 432.1320

***N*-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (76)**

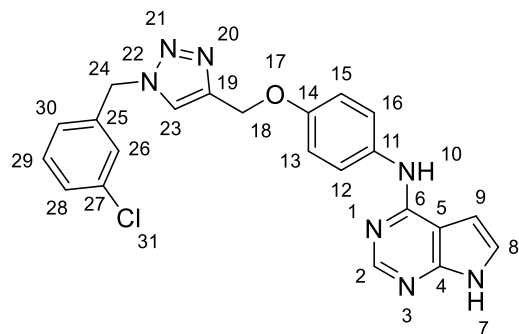


Reactivos: 1-azidometil-2-clorobenceno (55 mg, 0.33 mmol), *N*-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (86 mg, 0.33 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (8 mg, 0.03 mmol), L-ascorbato sódico (14 mg, 0.07 mmol) y TBTA (18 mg, 0.03 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 45 mg, 31%. P.f.: 173-174 °C.

^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 11.67 (s, 1H, H-7), 9.16 (s, 1H, H-10), 8.27 (s, 1H, H-23), 8.21 (s, 1H, H-2), 7.73 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12-16), 7.53 (dd, $J = 7.5, 1.7$ Hz, 1H, H-27), 7.39 (dd, $J = 7.4, 1.7$ Hz, 2H, H-28-29), 7.22 (dd, $J = 7.3, 2.1$ Hz, 1H, H-30), 7.18 (dd, $J = 3.4, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 7.02 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-13-15), 6.68 (dd, $J = 3.4, 1.9$ Hz, 1H, H-9), 5.73 (s, 2H, H-24), 5.13 (s, 2H, H-18). ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 153.7 (C-6), 153.4 (C-14), 150.9 (C-2), 150.7 (C-4), 143.0 (C-19), 133.7 (C-11), 133.3 (C-26), 132.6 (C-25), 130.5 (C-29), 130.2 (C-30), 129.6 (C-27), 127.7 (C-28), 125.0 (C-23), 122.2 (C-12-16), 121.8 (C-8), 114.7 (C-13-15), 103.2 (C-5), 98.7 (C-9), 61.3 (C-18), 50.6 (C-24). ESI calculado $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 432.1334 hallado 432.1337

***N*-(4-((1-(3-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (77)**



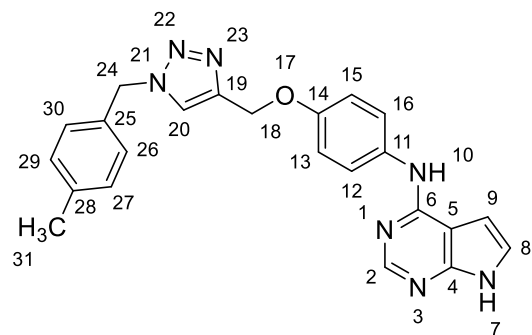
Reactivos: 1-azidometil-4-clorobenceno (72 mg, 0.42 mmol), *N*-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (111 mg, 0.42 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (11 mg, 0.04 mmol), L-ascorbato sódico (17 mg, 0.08 mmol) y TBTA (22 mg, 0.04 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 59 mg, 33%. P.f.: 177-178 °C.

^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 11.67 (s, 1H, H-7), 9.15 (s, 1H, H-10), 8.33 (s, 1H, H-23), 8.20 (s, 1H, H-2), 7.73 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-12-16), 7.41 (d, $J = 3.1$ Hz, 3H, H-28-29-30), 7.32-7.25 (m, 1H, H-26), 7.18 (dd, $J = 3.4, 2.3$ Hz, 1H, H-8), 7.02 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-13-15), 6.68 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-9), 5.64 (s, 2H, H-

24), 5.33 (s, 2H, H-18). ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 153.7 (C-6), 153.4 (C-14), 150.9 (C-4), 150.7 (C-2), 143.3 (C-19), 138.4 (C-25), 133.7 (C-11), 133.3 (C-27), 130.7 (C-29), 128.1 (C-30), 127.9 (C-28), 126.7 (C-26), 124.8 (C-23), 122.2 (C-12-16), 121.8 (C-8), 114.7 (C-13-15), 103.2 (C-5), 98.7 (C-9), 61.3 (C-18), 52.0 (C-30). ESI calculado $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 432.1334 hallado 432.1328

N-(4-((1-(4-metilbencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (78)

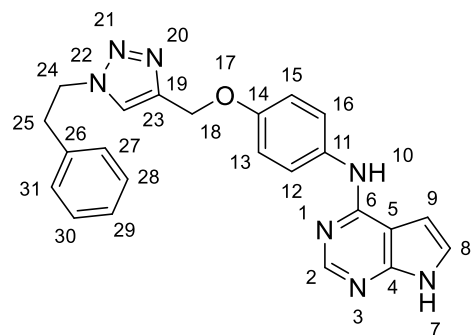


Reactivos: 1-azidometil-4-metilbenceno (30 mg, 0.20 mmol), *N*-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (54 mg, 0.20 mmol), L-ascorbato sódico (8 mg, 0.02 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg, 0.02 mmol), y TBTA (11 mg, 0.02 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 60 mg, 73%. P.f.: 215-216 °C.

^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 11.67 (s, 1H, H-7), 9.15 (s, 1H, H-10), 8.24 (s, 1H, H-23), 8.20 (s, 1H, H-2), 7.72 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12-16), 7.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-26-30), 7.20-7.15 (m, 3H, H-8-27-29), 7.00 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-13-15), 6.68 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H-9), 5.55 (s, 2H, H-24), 5.11 (s, 2H, H-18), 2.27 (s, 3H, H-31). ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 153.7 (C-6), 153.4 (C-14), 150.9 (C-2), 150.7 (C-4), 143.1 (C-19), 137.5 (C-28), 133.7 (C-11), 133.0 (C-25), 129.3 (C-27-29), 128.0 (C-26-30), 124.6 (C-23), 122.2 (C-12-16), 121.8 (C-8), 114.7 (C-13-15), 103.2 (C-5), 98.7 (C-9), 61.3 (C-18), 52.6 (C-24), 20.7 (C-31) ESI calculado $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 412.1880 hallado 412.1876

N-(4-((1-fenetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (79)



Reactivos: 1-azidoetilbenceno (70 mg, 0.50 mmol), *N*-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (139 mg, 0.50 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (13 mg, 0.05 mmol), L-ascorbato sódico (21 mg, 0.10 mmol) y TBTA (28 mg, 0.05 mmol).

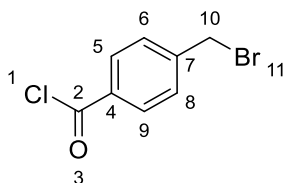
Sólido blanco. Rendimiento: 64 mg, 64%. P.f.: 206-207 °C.

^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 11.67 (s, 1H, H-7), 9.16 (s, 1H, H-10), 8.21 (s, 1H, H-2), 8.16 (s, 1H, H-23), 7.73 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-12-16), 7.30-7.16 (m, 6H, H-8-27-28-29-30-31), 7.00 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-13-15), 6.69 (dd, $J = 3.5, 2.1$ Hz, 1H, H-9), 5.10 (s, 2H, H-18), 4.62 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-24), 3.17 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-25). ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 153.7 (C-6), 153.4 (C-14), 150.9 (C-4), 150.7 (C-2), 142.7 (C-25).

19), 142.7 (C-26), 133.7 (C-11), 128.7 (C-31-27), 128.4 (C-28-30) 126.6 (C-29), 124.4 (C-23), 122.2 (C-12-16), 121.8 (C-8), 114.7 (C-13-15), 103.2 (C-5), 98.7 (C-9), 62.3 (C-18), 50.5 (C-24), 35.7 (C-25) . ESI calculado $C_{23}H_{22}N_7O$ $[M + H]^+$ 412.1880 hallado 412.1873

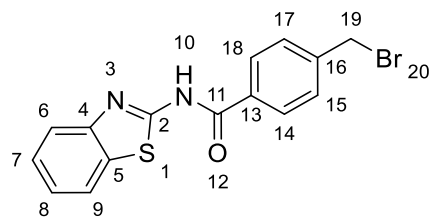
1.2 Síntesis de los compuestos del capítulo 2.

Cloruro de 4-(bromometil)benzoilo (**80**).



Una solución de ácido 4-(bromometil)benzoico (500 mg, 2.3 mmol) y cloruro de tionilo (410 mg, 3.3 mmol) en 2 mL de CH_2Cl_2 se agitó en atmósfera inerte a 80 °C toda la noche. Después, el disolvente y el exceso de cloruro de tionilo se eliminaron por evaporación a presión reducida para dar lugar al producto que se utilizó en la siguiente reacción tras identificar la presencia y pureza del producto por HPLC-MS. Sólido naranja. Rendimiento: 521 mg, 96%.

N-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-(bromometil)benzamida (**81**)

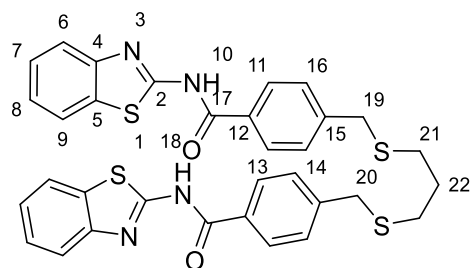


El producto anterior (**80**) (500 mg, 2.2 mmol) y 2-aminobenzotiazol (340 mg, 2.2 mmol) se disolvieron en THF y se agitaron 2 horas bajo radiación microondas a 80 °C. El crudo se disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó con sucesivas disoluciones de HCl (1M), $NaHCO_3$ y NaCl. Las fases orgánicas se reunieron, secaron con $MgSO_4$, filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida.

El crudo se purificó mediante cromatografía flash utilizando AcOEt y hexano como eluyentes (proporción 7:1). Sólido blanco Rendimiento: 300 mg, 39%.

1H -RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 12.91 (s, 1H, H-10), 8.12 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-14-18), 8.03 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6), 7.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-9), 7.69 – 7.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-15-17), 7.47 (ddd, $J = 8.3, 7.2, 1.3$ Hz, 1H, H-7), 7.39 – 7.28 (m, 1H, H-8), 4.79 (s, 2H, H-19). ^{13}C -RMN (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 165.9 (C-11), 159.1 (C-2), 149.0 (C-13), 143.3 (C-16), 132.1 (C-4), 129.9 (C-14-18), 129.4 (C-6), 129.2 (C-15-17), 126.7 (C-9), 124.2 (C-8), 122.2 (C-7), 121.0 (C-5).

4,4'-((propano-1,3-bis(tio))bis(metileno))bis(N-(benzo[d]tiazol-2-il)benzamida) (82)

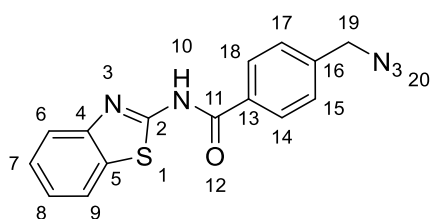


A una solución de carbonato de potasio (175 mg, 1.2 mmol) en THF se añadió propano-1,3-ditioil (23.4 mg, 0.2 mmol) y después de 30 min el producto anterior (**81**) (0.15 g, 0.4 mmol). La reacción se agitó a 80 °C durante 46 h. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un crudo amarillo que se disolvió en CH₂Cl₂ y se lavó con disoluciones de NaHCO₃ y NaCl. Las fases

orgánicas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía flash utilizando AcOEt y hexano como eluyentes (proporción 1:7). Sólido blanco. Rendimiento: 97 mg, 72%. P.f.: 184-185 °C.

*La molécula tiene simetría por lo que las señales están duplicadas, menos el C22 ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 12.83 (s, 2H, H-10), 8.10 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, H-11-13), 8.00 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-6), 7.78 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-9), 7.56-7.39 (m, 6H, H-8-14-16), 7.33 (td, *J* = 7.4, 7.1, 1.3 Hz, 2H, H-7), 3.81 (s, 4H, H-19), 2.53-2.41 (m, 4H, H-21), 1.83-1.68 (m, 2H, H-22). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 165.6 (C-17), 148.9 (C-5), 144.2 (C-15), 132.0 (C-4), 131.2 (C-12), 129.0 (C-14-16), 128.5 (C-11-13), 126.2 (C-8), 123.7 (C-7), 121.7 (C-6), 34.6 (C-19), 29.6 (C-21), 28.3 (C-22). ESI calculado para C₃₃H₂₉N₄O₂S₄ [M + H]⁺ 641.1168 hallado 641.1163.

N-(Benzo[d]tiazol-2-il)-4-(azidometil)-benzamida (83)



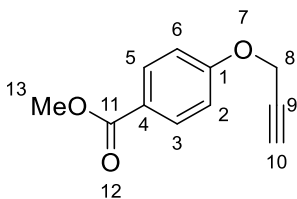
Una disolución de ácido 4-(azidometil)benzoico (354 mg, 2.0 mmol), EDC (383 mg, 4.0 mmol) y DMAP (488 mg, 2.0 mmol) en DMF (10 mL) se agitó durante 5 min a temperatura ambiente, se añade 2-amino-benzotiazol (300 mg, 2.0 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante la noche. Posteriormente, se añadió

agua (35 mL) y AcOEt (35 mL) y se lavó la fase orgánica con soluciones saturadas de NaHCO₃ y NaCl. El disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida y el crudo se purificó mediante cromatografía flash utilizando AcOEt y hexano como eluyentes (proporción 1:9). Sólido blanco. Rendimiento: 426 mg, 69%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.95 (s, 1H, H-10), 8.18 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-14-18), 8.03 (dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H, H-6), 7.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-9), 7.56 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-15-17), 7.48 (td, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, H-8), 7.35 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H, H-7), 4.60 (s, 2H, H-19). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 166.1 (C-11), 159.3 (C-2), 148.9 (C-4), 141.1 (C-6), 131.2 (C-13-16), 129.2 (C-14-18), 128.8 (C-15-17), 126.7 (C-9),

124.2 (C-8), 122.2 (C-7), 120.8 (C-5), 53.5 (C-19). ESI calculado para $C_{15}H_{12}N_5OS$ $[M + H]^+$ 310.0757 hallado 310.0765.

Metil-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzoato (**84**)

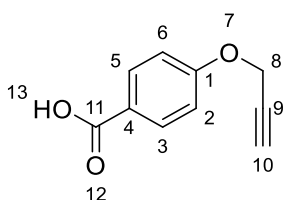


Se agregó 3-bromopropino (600 μ L, 7.67 mmol) a una disolución de metil 4-hidroxibenzoato (991 mg, 6.52 mmol) y carbonato de potasio (3.47 g, 25.1 mmol) en acetonitrilo (32 mL). La solución resultante se agitó durante la noche a reflujo. Después de enfriar a temperatura

ambiente la reacción se paró mediante la adición de agua, y se realizó una extracción con AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución saturada de NaCl, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró hasta la sequedad. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía flash utilizando AcOEt y hexano como eluyentes (proporción 1:4). Aceite incoloro. Rendimiento: 929 mg, 75%.

1H -RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.08 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-3-5), 7.00 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-2-4), 4.75 (s, 2H, H-8), 3.89 (s, 3H, H-13), 2.55 (s, 1H, H-10). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.8 (C-11), 157.1 (C-1), 130.7 (C-2-6), 128.4 (C-4), 115.7 (C-3-5), 79.0 (C-9), 76.0 (C-10), 56.1 (C-8), 52.4 (C-13).

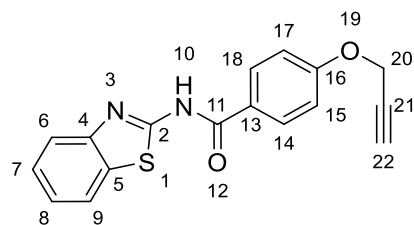
Ácido 4-(prop-2-in-1-iloxi)-benzoico (**85**)



El compuesto anterior (**84**) (3.8 g, 20 mmol) se disolvió en MeOH y THF (1:1 v/v, 30 mL), después se añadieron 5 mL de NaOH (4 g, 100 mmol) gota a gota y la mezcla se agitó durante 12h a temperatura ambiente. Después de ajustar el pH ≈ 3 con HCl 5 M, el disolvente se eliminó a presión reducida y se añadieron 200 mL de agua y se agitó durante 30 minutos. La sustancia insoluble se filtró y se lavó con agua fría. Sólido blanco. Rendimiento: 3.48 g, 99 %.

1H -RMN (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 7.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3-5), 7.01 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2-6), 4.84 (d, $J = 2.4$ Hz 2H, H-8), 3.55 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-10). ^{13}C -RMN (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 173.0 (C-11), 155.9 (C-1), 130.4 (C-2-6), 127.8 (C-4), 114.6 (C-3-5), 79.4 (C-9), 78.2 (C-10), 55.3 (C-8).

N-(Benzo[d]tiazol-2-il)-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzamida (**86**)

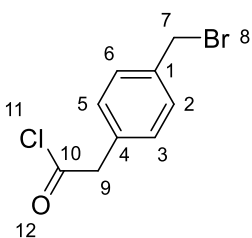


El compuesto **85** (704 mg, 4.0 mmol), EDC (766 mg, 4.0 mmol) y DMAP (976 mg, 8.0 mmol) se disolvieron en DMF. Después de agitar la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente, se agregó 2-amino-benzotiazol (600 mg, 4.0 mmol). La mezcla resultante se agitó toda la

noche a temperatura ambiente. Al añadir AcOEt (35 mL) el compuesto precipitó, se filtró y se lavó con agua fría. Sólido blanco. Rendimiento: 852 mg, 69%. P.f.: 150-152 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.77 (s, 1H, H-10), 8.17 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-3-5), 8.02 (d, $J = 7.6$, 1H, H-6), 7.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-9), 7.47 (ddd, $J = 8.2, 7.3, 1.3$ Hz, 1H, H-8), 7.34 (td, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 1H, H-7), 7.22-7.09 (m, 2H, H-2-6), 4.94 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-20), 3.66 (s, 1H, H-22). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 165.6 (C-11), 161.2 (C-2), 159.3 (C-16), 148.9 (C-4), 130.8 (C-15-17), 126.6 (C-9), 125.1 (C-13), 124.0 (C-8), 122.2 (C-7), 120.7 (C-5), 121.9 (C-6), 115.2 (C-14-18), 87.1 (C-21), 79.2 (C-22), 56.2 (C-20). ESI calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 309,0692 hallado 309,0699.

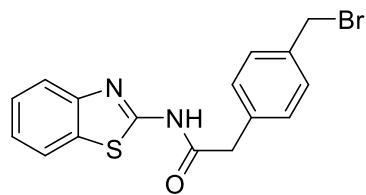
Cloruro de 2-(4-(bromometil)fenil)acetilo (**88**).



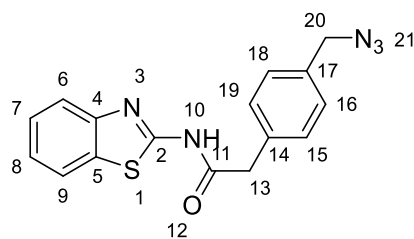
A una solución de ácido 2-(4-(bromometil)fenil)acético (2.35 g, 10 mmol) en cloroformo (15 mL) se añadió cloruro de tionilo (3.85 g, 32 mmol). La mezcla se calentó a 70 °C durante 6 h obteniendo una solución amarilla. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar el compuesto que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. Sólido amarillo. Rendimiento: 2.37 g, 96%.

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.44-7.38 (m, 2H), 7.28-7.24 (m, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.14 (s, 2H). $^{13}\text{C-RMN}$ (100.6 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.6, 137.8, 131.3, 129.9, 129.6, 52.6, 32.6.

N-(Benzo[d]tiazol-2-il)-2-(4-(bromometil)fenil)acetamida (**89**)



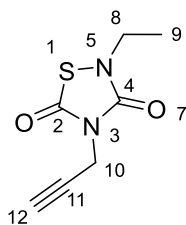
A una solución de aminobenzotiazol (600 mg, 4.0 mmol) en THF (7.5 mL) se añade el cloruro de acilo (**88**) (990 mg, 4.0 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se calienta bajo radiación de microondas a 100 °C durante 15 min. Después, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo con agua (35 mL) y CH_2Cl_2 (65 mL). El disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida y el sólido restante se purificó mediante cromatografía flash utilizando AcOEt y hexano como eluyentes (proporción 9:1) para obtener el producto deseado confirmado por HPLC-MS, que es usado inmediatamente en la siguiente reacción. Sólido blanco.

N-(Benzo[d]tiazol-2-il)-2-(4-(azidometil)fenil)acetamida (90)

A una solución del compuesto **89** (150 mg, 0.43 mmol) en DMSO (2 mL) se añadió azida de sodio (42 mg, 0.65 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. La reacción se paró agregando agua (5 mL) y se extrajo con éter etílico (20mL x 3). Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el disolvente

se eliminó a vacío. El crudo se purificó mediante cromatografía flash utilizando AcOEt y hexano como eluyentes (proporción 9:1). Sólido blanco. Rendimiento: 109 mg, 79%.

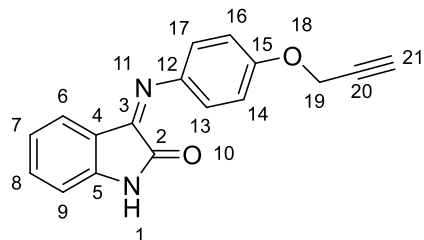
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.92 (s, 1H, H-10), 7.77 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-6), 7.66 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-9), 7.37 (ddd, *J* = 8.2, 7.3, 1.3 Hz, 1H, H-8), 7.26 (td, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H-7), 7.22-7.12 (m, 4H, H-15-16-18-19), 4.26 (s, 2H, H-20), 3.77 (s, 2H, H-13). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.5 (C-11), 159.0 (C-2), 148.3 (C-4), 135.7 (C-17), 133.2 (C-14), 132.4 (C-5), 130.3 (C-16-18), 129.3 (C-15-19), 126.9 (C-8), 124.6 (C-7), 122.0 (C-6), 121.1 (C-9), 54.7 (C-20), 43.5 (C-13). ESI calculado para C₁₆H₁₄N₅OS [M + H]⁺ 324.0814 hallado 324.0814.

2-Etil-4-(prop-2-in-1-il)-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (91)

Una mezcla de isocianato de etilo (163 μL, 2.0 mmol) e isotiocianato de propargilo (189 μL, 2.0 mmol) en THF (5 mL) se enfrió a 0 °C. Se agregó cloruro de sulfonilo (167 μL, 2.0 mmol) lentamente a 0 °C tras lo cual la mezcla se deja atemperar y se agitó durante la noche. Después el disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo se purificó por cromatografía flash en AcOEt y hexano como eluyentes (proporción 5:1). Aceite amarillo pálido. Rendimiento: 243 mg, 66%.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.37 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, H-10), 3.65 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-8), 2.23 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-12), 1.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.5 (C-4), 152.0 (C-2), 76.5 (C-11), 72.8 (C-12), 40.6 (C-8), 31.8 (C-10), 14.3 (C-9). ESI calculado para C₇H₉N₂O₂S [M + H]⁺ 185.0379 hallado 185.0385.

(Z)-3-((4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)imino)indolin-2-ona (92) (Mezcla 80:20|Z:E)



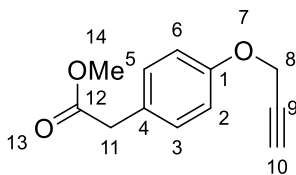
Una mezcla de isatina (294 mg, 2.0 mmol) y 4-(prop-2-en-1-iloxi)anilina (294 mg, 2.0 mmol) en etanol (3 mL) se calentó a 80 °C durante 1 h y después se dejó a temperatura ambiente durante 12 h. El producto obtenido se filtró y el sólido se purificó por cromatografía en gel de sílice con AcOEt:hexano (1:1). Sólido anaranjado. Rendimiento: 110 mg, 20%. P.f.: 230-232 °C.

Isómero Z : $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 10.97 (s, 1H, H-1), 7.35 (td, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1H, H-9), 7.13-7.08 (m, 2H, H-13-17), 7.03-6.97 (m, 2H, H-14-16), 6.90 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-6), 6.76 (td, $J = 7.7, 1.0$ Hz, 1H, H-8), 6.59 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, 1H, H-7), 4.85 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-19), 3.62 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-21). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 164.1 (C-3), 155.4 (C-15), 155.3 (C-2), 147.3 (C-5), 144.3 (C-12), 134.7 (C-9), 125.5 (C-6), 122.2 (C-7), 119.7 (C-14-16), 116.3 (C-13-17), 116.2 (C-4), 111.9 (C-8), 79.7 (C-20), 78.8 (C-21), 56.3 (C-19).

Isómero E (señales visibles): $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.86 (s, 1H, H-1), 7.59 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-6), 7.43 (td, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1H, H-9), 7.16 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-13-17), 6.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-14-16), 6.85 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5), 4.82 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-19), 3.60 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-21). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO) δ 159.10 (C-3), 155.79 (C-15), 152.47 (C-2), 145.60 (C-5), 142.25 (C-12), 134.16 (C-9), 122.88 (C-7), 122.79 (C-14-16), 122.67 (C-6), 122.50 (C-4), 114.84 (C-13-17), 111.03 (C-8), 79.83 (C-20), 78.72(C-21), 56.04 (C-19).

ESI calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 277.0972 hallado 277.0979.

Metil 2-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)acetato (99)



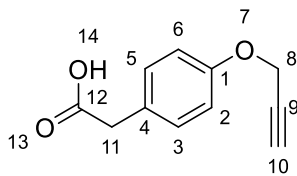
En un matraz se añadieron metil 2-(4-hidroxifenil)acetato (1.0 g, 6.0 mmol) y carbonato potásico (2.5 g, 18.0 mmol) y se disolvieron en 20 mL de THF anhidro. La mezcla se agitó bajo atmósfera inerte a 80 °C durante 30 min. Después, se añadió bromuro de propargilo (1.8 g, 15.0 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche.

El crudo se extrajo con AcOEt (20 mL) y la fase orgánica se lavó con una disolución saturada de NaCl, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y concentró a sequedad. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando AcOEt y hexano (proporción 10:1). Aceite incoloro. Rendimiento: 883 mg, 77%.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.21 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-3-5), 6.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2-6), 4.68 (d, $J = 2,3$ Hz, 2H, H-8), 3,68 (s, 3H, H-14), 3,57 (s, 2H, H-11), 2,51 (t, $J = 2,5$ Hz, 1H, H-10). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.6 (C-12), 157.1 (C-1), 130.7 (C-2-6), 127.4 (C-4), 115.4 (C-3-5), 78.9 (C-9), 75.9 (C-10), 56.2 (C-

8), 52.4 (C-14), 40.7 (C-11). Análisis elemental $C_{12}H_{12}O_3$ calculado %C 70.58, %H 5.92 hallado %C 70.35±0.35, %H 6.05±0.30.

Ácido 2-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)acético (100)

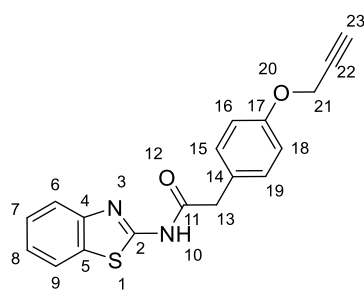


A una disolución del compuesto **99** (0,8 g, 4 mmol) en THF (16 mL) se añadió una solución de hidróxido de sodio (0,5 g, 12 mmol) en agua (4 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después, el pH se ajustó a ≈ 3 con una disolución 1 M de HCl y el

precipitado obtenido se filtró y se secó en estufa. Sólido blanco. Rendimiento: 533 mg, 70%.

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.56 (s, 1H, H-14), 7.18 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-3-5), 6.92 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-2-4), 4.76 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-8), 3.55 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-10), 3.49 (s, 2H, H-11). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.9 (C-12), 155.9 (C-1), 130.4 (C-3-5), 127.8 (C-4), 114.6 (C-2-6), 79.4 (C-9), 78.2 (C-10), 55.3 (C-8), 39.8 (C-11).

N-(Benzo[d]tiazol-2-il)-2-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)acetamida (101)

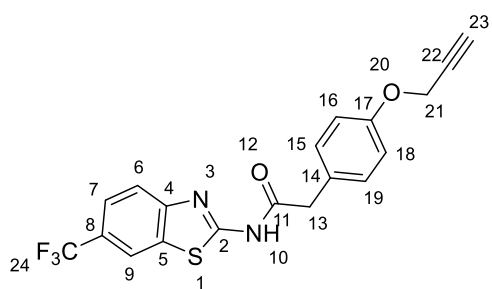


El compuesto **100** (250 g, 1.3 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro y se añadió $SOCl_2$ (150 μ L, 2.0 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó a 80 °C en atmósfera inerte durante 24 horas. El exceso de $SOCl_2$ y CH_2Cl_2 se eliminaron a presión reducida y el cloruro de acilo resultante se utilizó a continuación. El producto sintetizado se disolvió en THF (2.5 mL) y se añadió 2-aminobenzotiazol (150 g, 1.0 mmol) en un vial de microondas.

La reacción se agitó bajo radiación de microondas durante 2 horas a 110 °C. El crudo se extrajo con CH_2Cl_2 (20 mL) y las fases orgánicas se lavaron con NaCl, se secaron sobre $MgSO_4$ y se filtraron. El residuo aislado se purificó por cromatografía flash en gel de sílice utilizando AcOEt y hexano como eluyentes (proporción 9:1). Sólido blanco. Rendimiento: 180 mg, 60%. P.f.: 166-167 °C.

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.30 (s, 1H, H-13), 7.76 (ddd, $J = 8.0, 1.3, 0.7$ Hz, 1H, H-6), 7.68 (ddd, $J = 8.1, 0.9$ Hz, 1H, H-9), 7.43 (dt, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H, H-8), 7.32 (dt, $J = 8.4, 1.2$ Hz, 1H, H-7), 7.23 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-15-19), 6.94 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-16-18), 4.70 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-21), 3.81 (s, 2H, H-13), 2.55 (s, 1H, H-23). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 169.6 (C-11), 158.0 (C-2), 157.6 (C-17), 148.3 (C-4), 132.3 (C-5), 130.9 (C-15-19), 126.5 (C-8), 125.5 (C-14), 124.2 (C-7), 121.6 (C-6), 121.0 (C-9), 116.0 (C-16-18), 78.4 (C-22), 76.0 (C-23), 56.0 (C-21), 42.9 (C-13). ESI calculado para $C_{18}H_{15}N_2O_2S$ $[M + H]^+$ 323.0849 hallado 323.0847.

***N*-(6-(trifluorometil)benzo[*d*]tiazol-2-il)-2-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)acetamida (102)**

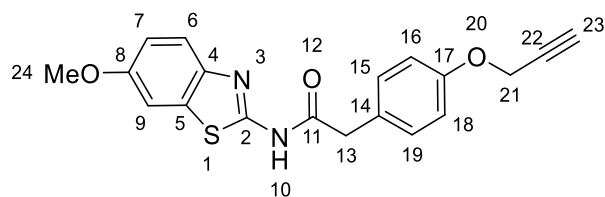


El compuesto **100** (250 g, 1.3 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro y se añadió SOCl₂ (150 μL, 2.0 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó a 80 °C en atmósfera inerte durante 24 horas. El exceso de SOCl₂ y CH₂Cl₂ se eliminaron a presión reducida y el cloruro de acilo resultante se utilizó a continuación. El producto sintetizado se disolvió en THF (2.5 mL) y se añadió

2-amino-6-trifluorometilbenzotiazol (230 mg, 1.0 mmol) en un vial de microondas. La reacción se agitó bajo radiación de microondas durante 2 horas a 110 °C. El crudo se extrajo con CH₂Cl₂ (20 mL) y las fases orgánicas se lavaron con NaCl, se secaron sobre MgSO₄ y se filtraron. El residuo aislado se purificó por cromatografía flash en gel de sílice utilizando AcOEt y hexano como eluyentes (proporción 9:1). Sólido blanco. Rendimiento: 237 mg, 61 %. P.f.: 127-128 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.39 (s, 1H, H-21), 8.11-8.09 (m, 1H, H-9), 7.78 (dt, *J* = 8.5, 0.8 Hz, 1H, H-6), 7.66 (ddd, *J* = 8.5, 1.8, 0.7 Hz, 1H, H-7), 7.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-15-19), 7.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-16-18), 4.71 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H-21), 3.90 (s, 2H, H-13), 2.55 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-23). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.1 (C-11), 161.7 (C-2), 157.8 (C-17), 146.5 (C-8), 131.1 (C-15-19), 130.6 (C-4), 127.8 (C-5), 126.20 (d, *J*_{C-F} = 271.6 Hz, C-24), 124.8 (C-14), 124.52 (d, *J*_{C-F} = 3.0 Hz, C-7), 120.0 (C-6), 119.73 (d, *J*_{C-F} = 4.1 Hz, C-9), 116.1 (C-16-18), 78.4 (C-22), 76.0 (C-23), 56.0 (C-21), 42.9 (C-13). ESI calculado para C₁₉H₁₄F₃N₂O₂S [M + H]⁺ 391.0723 hallado 391.0721.

***N*-(6-metoxibenzo[*d*]tiazol-2-il)-2-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)acetamida (103)**



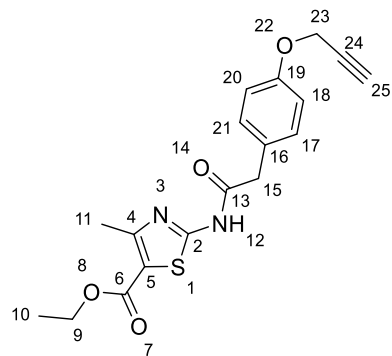
El compuesto **100** (250 mg, 1.3 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro y se añadió SOCl₂ (150 μL, 2.0 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó a 80 °C en atmósfera inerte durante 24h. El exceso de SOCl₂ y CH₂Cl₂ se

eliminaron a presión reducida y el cloruro de acilo resultante se utilizó en la siguiente reacción. El producto sintetizado se disolvió en THF (2.5 mL) y se añadió 2-amino-6-metoxibenzotiazol (220 mg, 1.0 mmol) en un vial de microondas. La reacción se agitó bajo radiación de microondas durante 2 horas a 110 °C. El crudo se extrajo con CH₂Cl₂ (20 mL) y las fases orgánicas se lavaron con NaCl, se secaron sobre MgSO₄ y se filtraron. El residuo aislado se purificó por cromatografía flash en gel de sílice utilizando AcOEt y hexano como eluyentes (proporción 6:1). Sólido blanco. Rendimiento: 200 mg, 51%. P.f.: 134-135 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): >12.5 (s, 1H, H-10), 7.54 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-6), 7.33-7.15 (m, 4H, H-9-

15-19), 7.05 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H, H-7), 6.98 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-16-18), 4.69 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-21), 3.84 (d, $J = 9.0$ Hz, 5H, H-13-24), 2.52 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-23). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169.5 (C-11), 157.5 (C-17), 157.2 (C-8), 156.5 (C-2), 141.3 (C-4), 133.0 (C-5), 130.9 (C-15-19), 125.5 (C-14), 121.2 (C-7), 116.0 (C-16-18), 115.7 (C-6), 104.5 (C-9), 78.4 (C-22), 76.0 (C-23), 56.0 (C-24), 42.9 (C-13). ESI calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 353.0954 hallado 353.0954.

4-Metil-2-(2-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)acetamido)tiazol-5-carboxilato de etilo (104)

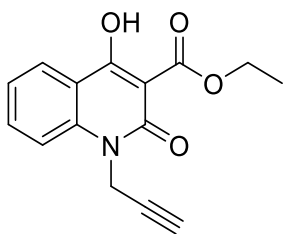


El ácido 2-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil) acético (100) (720 mg, 11.0 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro y se agregó SOCl_2 (120 μL , 1.5 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó a 80 °C en atmósfera inerte durante 24 horas. El exceso de cloruro de tionilo y disolvente se eliminaron a presión reducida y el producto resultante se utilizó a continuación. El producto sintetizado se disolvió en THF (2.5 mL) y se añadió 2-amino-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (200 mg, 1.0 mmol) en un vial de microondas. La

reacción se agitó bajo radiación de microondas durante 2 horas a 110 °C. El crudo se disolvió en CH_2Cl_2 (20 mL) y la fase orgánica se lavó con una disolución saturada de NaCl, se seca sobre MgSO_4 y se filtra. El residuo aislado se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando AcOEt y hexano como eluyentes (proporción 6:4). Sólido blanco. Rendimiento: 258 mg, 72%. P.f.: 208-209 °C.

^1H -RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 12.68 (s, 1H, H-12), 7.25 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-17-21), 6.94 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-18-20), 4.77 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-23), 4.22 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-9), 3.72 (s, 2H, H-15), 3.54 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-25), 2.50 (s, 3H, H-11), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-10). ^{13}C -RMN (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 170.8 (C-13), 162.5 (C-2), 160.0 (C-6), 156.7 (C-4/19), 156.6 (C-4/19), 130.7 (C-17-21), 127.6 (C-5), 115.3 (C-18-20), 114.5 (C-16), 79.8 (C-24), 78.6 (C-25), 61.0 (C-9), 55.8 (C-23), 41.2 (C-15), 17.5 (C-11), 14.7 (C-10). ESI calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 359.1060 hallado 359.1048.

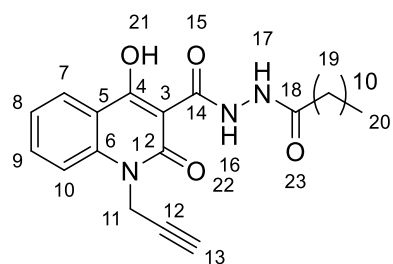
4-Hidroxi-1-(prop-2-en-1-il)-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carboxilato de etilo (105)



A una solución de anhídrido isatoico (1 g, 6.3 mmol) en DMF (20 mL), se añadieron hidruro de sodio (300 mg, 11.0 mmol) y bromuro de propargilo (1.3 g, 11.0 mmol) a 0 °C. Después, la reacción se agitó durante 5 h a temperatura ambiente y finalmente el exceso de bromuro de propargilo se eliminó a presión reducida y el producto resultante se utilizó en la siguiente reacción. El anterior producto se mezcló con

malonato de etilo (1.21 g, 7.6 mmol) e hidruro de sodio (200 mg, 7.6 mmol) y se agitó durante 12 h a 85 °C. La mezcla resultante se acidificó con HCl (1M) hasta la aparición de un precipitado que se filtró a vacío. El sólido se lavó con MeOH frío para proporcionar un sólido blanco que se utilizó en la siguiente reacción tras confirmar por HPLC-MS que se trataba del producto deseado. Rendimiento: 957 mg, 56%.

N'-dodecanoil-1-(prop-2-in-1-il)-4-hidroxi-2-oxi-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida (106)

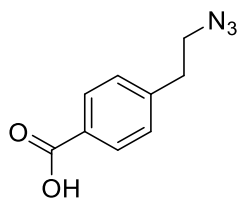


El producto anterior (105) (600 mg, 2.1 mmol) se disolvió en DMF (15 mL) y se añadió dodecil hidrazida (450 mg, 2.2 mmol). La mezcla se agitó a 60 °C durante 3 min y se dejó a temperatura ambiente. Tras la adición de MeOH (10 mL) el producto deseado precipitó, se filtró y se lavó con MeOH frío.

Sólido blanco. Rendimiento: 502 mg, 52%. P.f.: 163-164 °C.

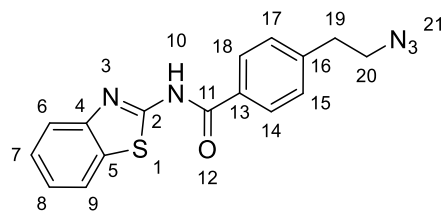
¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.81 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, H-16), 10.78 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, H-17), 8.15 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, H-9), 7.90 (ddd, *J* = 8.8, 7.1, 1.6 Hz, 1H, H-7), 7.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-10), 7.45 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-8), 5.14 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, H-11), 3.31 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-13), 2.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.55 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.34-1.19 (m, 18H), 0.93-0.76 (m, 3H, H-20). ¹³C-RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 171.4 (C-4), 169.6 (C-18), 167.1 (C-14), 160.4 (C-2), 138.4 (C-6), 134.8 (C-7), 124.7 (C-9), 123.2 (C-8), 115.7 (C-10), 115.1 (C-5), 78.7 (C-12), 74.9 (C-13), 32.9 (C-19), 31.3 (C-19), 30.7 (C-19), 29.0 (C-19), 28.9 (C-19), 28.7 (C-19), 28.5 (C-19), 25.0 (C-19), 22.1 (C-19), 14.0 (C-19). ESI calculado para C₂₅H₃₆N₃O₄ [M + H]⁺ 440.2544 hallado 440.2539.

Ácido 4-(2-azidoetil)benzoico (107)



Se disolvieron ácido 4-(2-bromoetil)benzoico (1.0 g, 4.4 mmol) y azida sódica (720 mg, 11.0 mmol) en DMF (10 mL) y la reacción se agitó a 80 °C durante 12 horas. El disolvente se evaporó y el crudo se resuspendió en agua fría y se acidificó con ácido acético glacial, tras lo cual apareció un sólido que se filtró y lavó con agua fría. El compuesto se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional tras confirmar su formación y pureza por HPLC-MS.

Sólido blanco. Rendimiento: 574 mg, 68%.

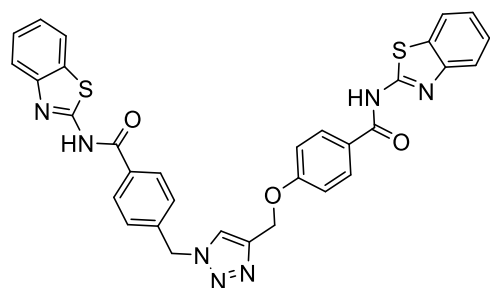
***N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-(2-azidoetil)benzamida (108)**

Se disolvieron la azida **107** (570 mg, 3.0 mmol), 2-aminobenzotiazol (450 mg, 3.0 mmol), DMAP (730 mg, 6.0 mmol) y EDC (630 mg, 3.3 mmol) en DMF (10 mL) y la reacción se agitó durante 12 h a temperatura ambiente. El crudo se disolvió en CH₂Cl₂ y se lavó con agua y una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice utilizando AcOEt y hexano como eluyentes (proporción 8:2). Sólido blanco. Rendimiento: 397 mg, 41%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.85 (s, 1H, H-10), 8.11 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-15-17), 8.03 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H, H-7), 7.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-6), 7.54-7.43 (m, 3H, H-9-14-18), 7.34 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H, H-8), 3.65 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-20), 2.96 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-19). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 166.2 (C-11), 159.3 (C-2), 148.9 (C-4), 144.3 (C-16), 132.0 (C-5), 130.6 (C-13), 129.6 (C-14-18), 128.9 (C-15-17), 126.6 (C-7), 124.1 (C-8), 122.2 (C-6), 120.8 (C-9), 51.5 (C-20), 34.8 (C-19). ESI calculado para C₁₆H₁₄N₅OS [M + H]⁺ 324.0914 hallado 324.0912.

Procedimiento general para la síntesis de los triazoles (87, 93-98, 107-112)

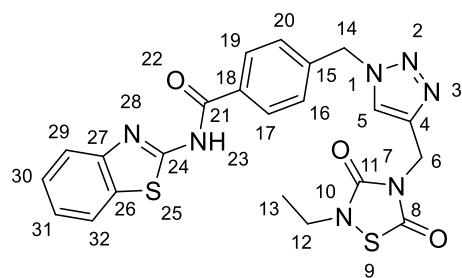
Una mezcla consistente en 1 equivalente de alquino y 1 equivalente de azida en DMF se hizo reaccionar toda la noche en presencia de sulfato de cobre (CuSO₄·5H₂O) (0.1 equivalentes) y L-ascorbato sódico (0.1 equivalentes). Tras el fin de la reacción se añadió agua a la mezcla, se extrajo con CH₂Cl₂:MeOH (9:1), y se lavó con una solución de hidróxido amónico al 5%. Las fases orgánicas se secaron con MgSO₄, se filtraron y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílica gel utilizando CH₂Cl₂:MeOH como disolventes (proporción 10:1).

***N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-((1-(4-(benzo[*d*]tiazol-2-ilcarbamoil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzamida (87).**

Reactivos: *N*-(Benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzamida (**86**) (58.8 mg, 0.2 mmol), *N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-(azidometil)-benzamida (**83**) (59.0 mg, 0.2 mmol), CuSO₄·5H₂O (5 mg, 0.02 mmol) y L-ascorbato sódico (8 mg, 0.04 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 71 mg, 57%. Sólido blanco. P.f.: 280-282 °C. (descompone).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): >12.5 (s, 1H), 10.95 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H), 8.01 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.52–7.33 (m, 4H), 7.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.01–6.94 (m, 2H), 6.88 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.75 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.15 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 4.73 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 166.0, 165.5, 162.0, 159.30, 159.29, 148.8 (2C), 143.0, 141.1, 132.1, 131.9, 130.8, 129.2, 128.4, 126.6, 126.5, 125.6, 124.6, 124.6, 124.1, 123.9, 122.1, 122.0, 120.7, 115.0, 61.7, 52.8. ESI calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 618.1377 hallado 618.1385.

***N*-(Benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-((4-((2-etil-3,5-dioxo-1,2,4-tiadiazolidin-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)benzamida (93)**

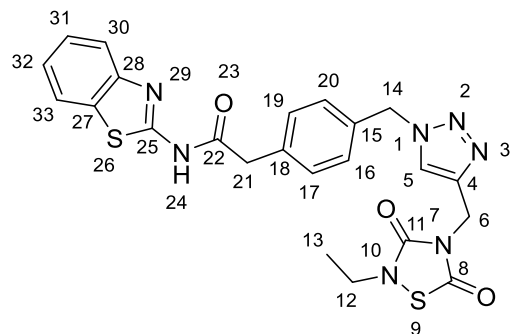


Reactivos: 3-etil-5-(prop-2-in-1-il)tiazolidin-2,4-diona (**91**) (37 mg, 0.2 mmol), *N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-(azidometil)-benzamida (**83**) (59 mg, 0.2 mmol) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg, 0.02 mmol) y L-ascorbato sódico (8 mg, 0.04 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 66 mg, 67%. Sólido blanco. P.f.: 204–206 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 12.92 (s, 1H, H-23), 8.23 (s, 1H, H-5), 8.14 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-17-19), 8.03 (d, $J = 7.6$, 1H, H-29), 7.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-32), 7.56–7.41 (m, 3H, H-16-20-31), 7.35 (td, $J = 7.6$, 1.2 Hz, 1H, H-30), 5.71 (s, 2H, H-6), 4.83 (s, 2H, H-14), 3.64 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-12), 1.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-13). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 166.2 (C-21), 152.5 (C-24), 148.9 (C-11), 142.1 (C-8), 141.2 (C-4), 132.1 (C-15/18), 131.9 (C-15/18), 129.3 (C-17-19), 128.5 (C-16-20), 126.7 (C-32), 124.6 (C-5), 124.2 (C-31), 122.3 (C-30), 121.5 (C-29), 120.8 (C-26), 52.8 (C-14), 40.1 (C-6), 37.5 (C-12), 14.0 (C-13). ESI calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 494,1064 hallado 494,1072.

***N*-(Benzo[*d*]tiazol-2-il)-2-(4-((4-((2-etil-3,5-dioxo-1,2,4-tiadiazolidin-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)fenil)acetamida (94)**

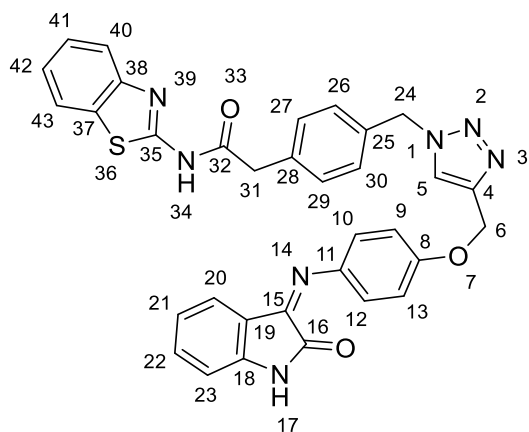


Reactivos: 3-etil-5-(prop-2-in-1-il)tiazolidin-2,4-diona (**91**) (37 mg, 0.2 mmol), *N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-2-(4-(azidometil)fenil)-acetamida (**90**) (64 mg, 0.2 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg, 0.02 mmol) y L-ascorbato sódico (8 mg, 0.04 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 62 mg, 61%. P.f.: 226–228 °C. (descompone).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 12.62 (s, 1H, H-24), 8.14 (s, 1H, H-5), 7.96 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-30),

7.75 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-33), 7.43 (td, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 1H, H-31), 7.36 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-17-19), 7.35–7.23 (m, 3H, H-16-20-32), 5.57 (s, 2H, H-6), 4.81 (s, 2H, H-14), 3.85 (s, 2H, H-21), 3.61 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-12), 1.13 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-13). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 170.5 (C-22), 166.1 (C-11), 158.4 (C-8), 152.5 (C-24), 149.0 (C-11), 142.0 (C-8), 141.6 (C-4), 135.1 (C-18), 131.9 (C-15), 130.2 (C-17-19), 128.6 (C-16-20), 126.6 (C-33), 124.2 (C-5), 124.0 (C-32), 122.2 (C-31), 121.0 (C-27), 53.0 (C-14), 41.9 (C-21), 40.0 (C-6), 37.5 (C-12), 14.0 (C-13). ESI calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}_2$ $[\text{M}]^+$ 507,1147 hallado 507,1156.

(Z)-N-(Benzo[d]tiazol-2-il)-2-(4-((4-((2-oxoindolin-3-iliden)amino)fenoxi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)fenil)-acetamida (95)

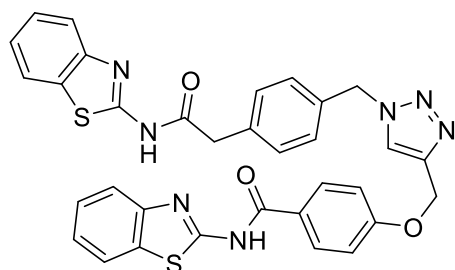


Reactivos: (Z)-3-(4-(prop-2-in-1-iloxi)benciliden)indolin-2-ona (13) (62 mg, 0.2 mmol) (92), N-(benzo[d]tiazol-2-il)-2-(4-(azidometil)fenil)-acetamida (90) (64 mg, 0.2 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg, 0.02 mmol) y L-ascorbato sódico (8 mg, 0.04 mmol).

Sólido naranja. Rendimiento: 55 mg, 46%. P.f.: 166–168 °C.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): >12.5 (s, 1H, H-34), 10.89 (s, 1H, H-17), 8.25 (s, 1H, H-5), 7.95–7.78 (m, 2H, H-30-33), 7.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.42–7.17 (m, 6H), 7.06 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-9-13), 6.94–6.86 (m, 2H), 6.82 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.68 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.54 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.54 (s, 2H, H-6), 5.10 (s, 2H, H-24), 3.77 (s, 2H, H-31). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 170.4, 162.7, 158.2, 156.2, 155.0, 148.8, 147.2, 143.8, 135.0, 134.6, 131.8, 130.2, 128.5, 126.5, 125.4, 125.1, 123.9, 122.1, 119.7, 115.9, 111.8, 61.7 (C-6), 53.0 (C-24), 41.8 (C-31). ESI calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 600.6765 hallado 600.6774.

N-(Benzo[d]tiazol-2-il)-4-((1-(4-(2-(benzo[d]tiazol-2-ilamino)-2-oxoetil)benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzamida (96)

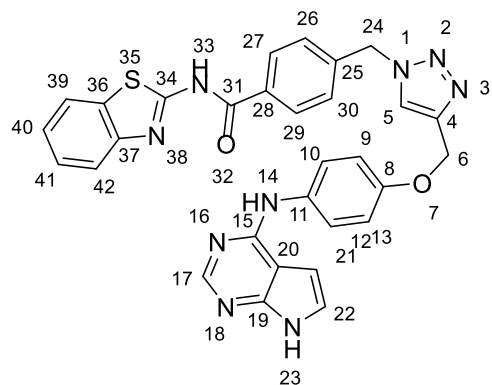


Reactivos: N-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-(azidometil)-benzamida (86) (59.0 mg, 0.2 mmol), N-(benzo[d]tiazol-2-il)-2-(4-(azidometil)fenil)-acetamida (90) (64 mg, 0.2 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg, 0.02 mmol) y L-ascorbato sódico (8 mg, 0.04 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 69 mg, 55%. P.f.: 198–200 °C. (descompone).

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.57 (s, 2H), 8.33 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.05–7.91 (m, 2H),

7.80–7.65 (m, 2H), 7.49–7.24 (m, 8H), 7.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.61 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 3.84 (s, 2H). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 170.5, 165.7, 162.8, 162.1, 158.3, 148.9, 143.0, 135.2, 135.1, 131.9, 130.9, 130.3, 128.6, 126.6, 125.3, 124.7, 124.0, 122.2, 121.0, 120.7, 115.1, 61.8, 53.1, 41.9. ESI calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 632.1533 hallado 632.1542.

4-((4-((4-((7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)-N-(benzo[d]tiazol-2-il)benzamida (97)

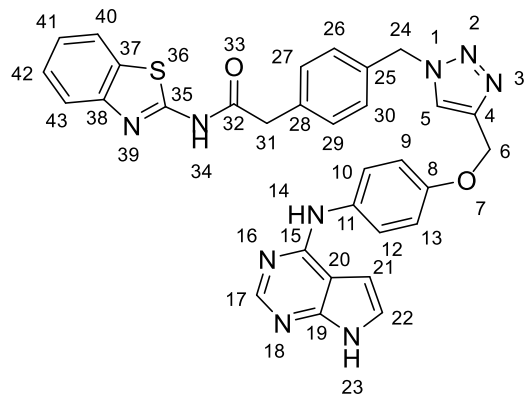


Reactivos: *N*-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-(azidometil)-benzamida (**86**) (79.3 mg, 0.3 mmol), *N*-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)-7H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (**73**) (92.2 mg, 0.3 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (8 mg, 0.03 mmol) y L-ascorbato sódico (12 mg, 0.06 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 48.6 mg, 28%. P.f.: 284-285 °C (descompone).

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.91 (s, 1H, H-33), 11.68 (s, 1H, H-23), 9.17 (s, 1H, H-14), 8.37 (s, 1H, H-5), 8.21 (s, 1H, H-17), 8.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-27-29), 8.02 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H, H-42), 7.78 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-40), 7.74 (dd, $J = 9.0, 5.0$ Hz, 2H, H-10-12), 7.52-7.43 (m, 3H, H-26-30-39), 7.34 (td, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 1H, H-41), 7.18 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-22), 7.03 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-9-13), 6.69 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-21), 5.75 (s, 2H, H-24), 5.15 (s, 2H, H-6). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 153.7 (C-15), 153.5 (C-8), 150.9 (C-19), 150.7 (C-17), 143.3 (C-4), 140.8 (C-25), 133.7 (C-11), 128.8 (C-27-29), 128.0 (C-26-30), 126.2 (C-36), 124.9 (C-5), 123.7 (C-37), 122.2 (C-10-12), 121.8 (C-22), 114.7 (C-9-13), 103.2 (C-20), 98.8 (C-21), 61.3 (C-6), 52.4 (C-24). ESI calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 574.1768 hallado 574.1760.

2-(4-((4-((4-((7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)fenil)-N-(benzo[d]tiazol-2-il)acetamida (98)

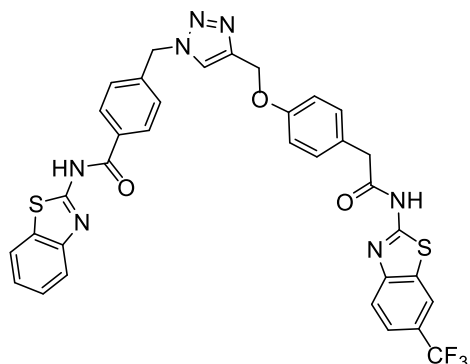


Reactivos: *N*-(benzo[d]tiazol-2-il)-2-(4-(azidometil)fenil)-acetamida (**90**) (54.6 mg, 0.2 mmol), *N*-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)-7H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (**73**) (66.8 mg, 0.2 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg, 0.02 mmol) y L-ascorbato sódico (8 mg, 0.04 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 25.6 mg, 22%. P.f.: 296-297 °C (descompone).

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.59 (s, 1H, H-34), 11.70 (s, 1H, H-23), 9.20 (s, 1H, H-14), 8.28 (s, 1H, H-5), 8.20 (s, 1H, H-17), 7.96 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, 1H, H-43), 7.73 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H, H-10-12-41), 7.43 (td, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H, H-40), 7.39-7.26 (m, 5H, H-26-27-29-30-42), 7.19 (dd, $J = 3.5, 2.3$ Hz, 1H, H-22), 7.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-9-13), 6.68 (dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 1H, H-21), 5.60 (s, 2H, H-24), 5.11 (s, 2H, H-6), 3.83 (s, 2H, H-31). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 170.5 (C-32), 158.3 (C-35), 154.09 (C-15), 154.06 (C-8), 151.2 (C-19), 151.06 (C-17), 149.0 (C-38), 143.7 (C-4), 135.1 (C-25), 131.9 (C-11), 130.3 (C-27-29), 128.6 (C-26-30), 126.6 (C-37), 125.0 (C-5), 124.0 (C-37), 122.2 (C-10-12), 121.8 (C-22), 114.7 (C-9-13), 103.2 (C-20), 98.8 (C-21), 61.3 (C-6), 52.4 (C-24). ESI calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 588.1925 hallado 588.1930.

***N*-(Benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-((4-((4-(2-oxo-2-((6-(trifluorometil)benzo[*d*]tiazol-2-il)amino)etil)fenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)benzamida (109)**

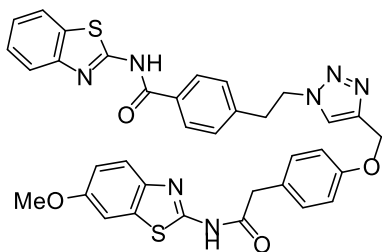


Reactivos: *N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-(azidometil)-benzamida (**83**) (38 mg, 0.12 mmol), 2-(4-(prop-2-in-1-ilo)fenil)-*N*-(6-(trifluorometil)benzo[*d*]tiazol-2-il)acetamida (**102**) (47 mg, 0.12 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3 mg, 0.01 mmol) y L-ascorbato sódico (5 mg, 0.02 mmol).

Sólido beige. Rendimiento: 81.2 mg, 97%. P.f.: 210–212 °C. (descompone).

^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.90 (s, 1H), 12.80 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.13 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.02 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.73 (dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, 1H), 7.52–7.43 (m, 3H), 7.34 (td, $J = 7.9, 1.1$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.74 (s, 2H), 5.15 (s, 2H), 3.80 (s, 2H). ^{13}C -RMN (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 170.9, 161.2, 157.1, 151.3, 143.1, 140.8, 132.0, 131.7, 130.4, 128.8, 128.0, 126.7, 126.2, 125.6, 124.9, 123.7, 123.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 10.3$ Hz) 122.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.7$ Hz), 122.4, 121.8, 120.9, 119.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 4.7$ Hz), 114.7, 61.1, 52.4, 40.9. ESI calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_3\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 700.1407 hallado 700.1403.

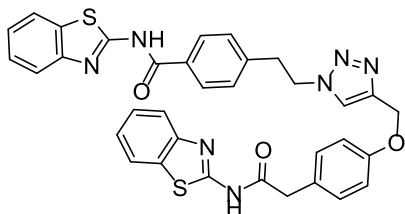
***N*-(Benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-(2-(4-((4-(2-((6-metoxibenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oxoetil)fenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)benzamida (110)**



Reactivos *N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-(2-azidoetil)-benzamida (**108**) (38.8 mg, 0.12 mmol), *N*-(6-metoxibenzo[*d*]tiazol-2-il)-2-(4-(prop-2-in-1-ilo)fenil)-acetamida (**103**) (42.3 mg, 0.12 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3 mg, 0.01 mmol) y L-ascorbato sódico (5 mg, 0.02 mmol). Sólido beige. Rendimiento: 68.9 mg, 85%. P.f.: 222–223 °C.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.41 (s, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.08–7.91 (m, 3H), 7.78 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.52–7.40 (m, 1H), 7.42–7.27 (m, 3H), 7.26 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.06–6.90 (m, 3H), 5.09 (s, 2H), 4.68 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.72 (s, 2H), 3.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 170.3, 157.1, 156.2, 156.0, 143.1, 142.6, 130.46, 129.1, 128.5, 127.1, 126.3, 124.6, 123.8, 121.8, 121.2, 120.4, 115.0, 114.8, 104.8, 61.2, 55.7, 50.0, 41.0, 35.5. ESI calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 676.1795 hallado 676.1793.

***N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-(2-(4-((4-(2-(benzo[*d*]tiazol-2-ilamino)-2-oxoetil)fenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)benzamida (111)**

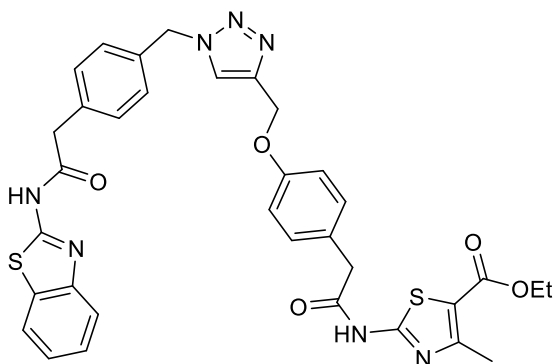


Reactivos: *N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-4-(2-azidoetil)-benzamida (**108**) (39.2 mg, 0.12 mmol), *N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-2-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)acetamida (**101**) (38.7 mg, 0.12 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3 mg, 0.01 mmol) y L-ascorbato sódico (5 mg, 0.02 mmol).

Sólido beige. Rendimiento: 26.4 mg, 34%. P.f.: 239-240 °C.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.82 (s, 1H), 12.55 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.08–7.89 (m, 4H), 7.76 (dd, $J = 13.2, 8.1$ Hz, 2H), 7.61–7.21 (m, 8H), 6.99 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.69 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.76 (s, 2H), 3.34 (m, 2H). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 170.5, 157.9, 157.0, 148.5, 143.0, 142.6, 132.5, 131.4, 130.4, 129.0, 128.5, 126.9, 126.2, 126.1, 124.5, 123.7, 123.5, 121.7, 120.5, 114.7, 111.9, 61.1, 49.9, 35.4. ESI calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 646.1690 hallado 646.1683.

2-(2-(4-((1-(4-(2-(Benzo[*d*]tiazol-2-ilamino)-2-oxoetil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)acetamido)-4-metiltiazol-5-carboxilato de etilo (112)



Reactivos: *N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-2-(4-(azidometil)fenil)acetamida (**90**) (29.8 mg, 0.09 mmol), 4-Metil-2-(2-(4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)acetamido)tiazol-5-carboxilato de etilo (**104**) (33.0 mg, 0.09 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3 mg, 0.01 mmol) y L-ascorbato sódico (5 mg, 0.02 mmol).

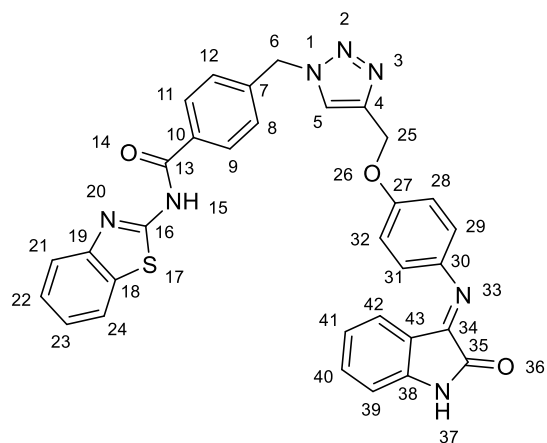
Sólido blanco. Rendimiento: 45.4 mg, 72%.

P.f.: 195-196 °C.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.66 (s, 1H), 12.59 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.98-7.93 (m, 1H), 7.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.43 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.31-7.26 (m, 3H), 7.23 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 5.58 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 4.22 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.71 (s, 2H), 2.54 (3H, s), 1.26 (t,

$J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 171.3, 171.0, 163.1, 160.5, 158.8, 158.0, 157.1, 149.5, 144.0, 135.63, 135.62, 132.4, 131.3, 130.7, 129.1, 127.7, 127.1, 125.6, 124.5, 122.7, 121.5, 115.7, 115.0, 62.0, 61.5, 53.5, 42.4, 41.8, 18.0, 15.2. ESI calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 682.1901 hallado 682.1897.

(Z)-N-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-((4-((2-oxoindolin-3-iliden)amino)fenoxi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)benzamida (113)

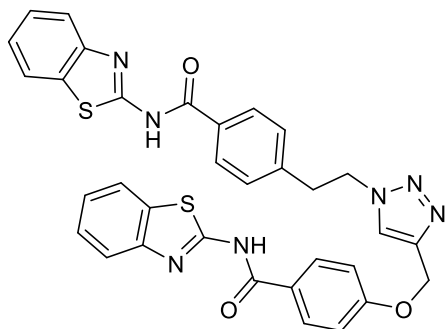


Reactivos: *N*-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-(azidometil)-benzamida (**83**) (92.8 mg, 0.3 mmol), (Z)-3-((4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)imino)indolin-2-ona (**92**) (82.9 mg, 0.3 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (8 mg, 0.03 mmol) y L-ascorbato sódico (12 mg, 0.06 mmol).

Sólido rojo. Rendimiento: 72.0 mg, 41 %. P.f.: 274–276 °C, descompone

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ >12.5 (s, 1H, H-15), 10.95 (s, 1H, H-37), 8.40 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-5), 8.15 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-9-11), 8.03 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-21), 7.89–7.68 (m, 1H, H-24), 7.48 (m, 3H, H-8-12-23), 7.35 (m, 2H, H-22-39), 7.15 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-29-31), 6.99 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-28-32), 6.89 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-42), 6.73 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-40), 6.61 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-41), 5.77 (s, 2H, H-6), 5.20 (s, 2H). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO) δ ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO) δ 166.0, 164.0, 159.4, 156.6, 156.2, 155.1, 152.2, 147.2, 145.4, 143.9, 143.5, 141.8, 141.1, 134.6, 132.1, 129.2, 128.3, 126.6, 125.4, 125.4, 124.1, 122.9, 122.7, 122.5, 122.5, 122.1, 120.6, 119.7, 116.0, 114.6, 111.8, 110.9, 61.7, 52.6. ESI calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 586.1656 hallado 586.1655.

***N*-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-((1-(4-(benzo[d]tiazol-2-ilcarbamoil)fenetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzamida (114)**



Reactivos: *N*-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-(2-azidoetil)-benzamida (**108**) (97.0 mg, 0.3 mmol), *N*-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzamida (**86**) (92.5 mg, 0.3 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (8 mg, 0.03 mmol) y L-ascorbato sódico (12 mg, 0.06 mmol).

Sólido blanco. Rendimiento: 108.0 mg, 57%.

P.f.: 295-297 °C.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ >12.5 (s, 2H), 8.24 (s, 1H), 8.16 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 8.06 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.98 (dd, $J = 12.4, 5.6$ Hz, 2H), 7.77 (m, 2H), 7.46 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.19 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.72 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.32 (m, 2H). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO) δ 166.1, 165.5, 162.7, 159.3, 148.7, 143.3, 142.5, 131.9, 130.8, 130.6, 129.3, 128.8, 126.5, 125.1, 124.6, 124.6, 124.0, 123.9, 122.1, 120.6, 115.0, 61.7, 50.3, 36.1. ESI calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{NaO}_3\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 654.1353 hallado 654.1349.

2 Procedimientos biológicos

2.1 Expresión, purificación y cristalización de GSK3 β .

La proteína GSK3 β se expresó mediante dos constructos: (35-386) y la proteína completa (1-420). Los baculovirus proporcionado por la Dr. Markovich se transformaron en las células de insecto *Trichoplusia ni* High 5 (H5) (Expression Systems LLC, Davies - USA). El cultivo (1.5×10^6 células/mL) se incubó en 1 L de medio SFM Express Five™ (Fisher) durante 4 días a 21 °C, 180 rpm. Los cultivos se recolectaron, centrifugaron a 1000xg a 4 °C durante 1 h. Tras un lavado con un tampón de PBS + 10% v/v de glicerol el pellet de células se congeló a -80 °C hasta su utilización. Para la purificación, las células se resuspendieron en el tampón de lisis (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 5% v/v glicerol, 10 mM Imidazol, 1x cOplete™ (Roche)), se filtraron a través de una gasa y sonicaron a 4 °C con el homogenizador (Emulsiflex - Avestin) para romper las células. Después, se añadió Benzonase Nuclease para eliminar y digerir los ácidos nucleicos y 5 mM MgCl₂ y la mezcla se incubó a t.a. durante 10 minutos. Después de la incubación, el lisado se centrifugó a 30000xg durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante se purificó por IMAC incubando con una resina NiNTA (Qiagen) bajo agitación lenta durante 1 h, a 4 °C. El flujo se recogió tras una centrifugación leve a 500xg durante 15 minutos. Posteriormente, la resina se lavó con 20 volúmenes de columna de tampón de resuspensión (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 5% v/v de glicerol, 10 mM de imidazol). Las fracciones de proteínas se eluyeron con el tampón de elución (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 5% v/v de glicerol, 500 mM de imidazol) y se continuó con la purificación más mediante cromatografía de intercambio catiónico en la columna HiTrap SP 5 mL (GE Healthcare). La proteína se eluyó aplicando un gradiente de NaCl del 3% al 30% en 20 volúmenes de columna con tampón A (20 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT, 5% v/v glicerol) y tampón B (tampón A + 1 M NaCl). El pico de elución principal, correspondiente a la proteína GSK3 β se recogió, se concentró hasta el valor deseado y se congeló a -80 °C hasta su utilización para la cristalización. Para las pruebas de cristalización se utilizaron los constructos de GSK3 β (35-386) para los compuestos tideglusib e

dihidrobromuro de 2,3-difenil-5-(4-morfoliletilimino)-2,5-dihidro-1,2,4-tiazol y la proteína completa para el compuesto N'-dodecanoil-1-etil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida. Se probaron distintos kits comerciales de cristalización de Hampton Research en el método de la gota sentada y los mejores cristales se obtuvieron en el pocillo que contenía GSK3 β en forma apo y el tampón de la siguiente composición: 13% PEG 8000, 100 mM TRIS acetato, 125 mM NaCl. Los compuestos se trataron de introducir en la estructura cristalina por medio de experimentos de *soaking*. La difracción con rayos X y resolución de las estructuras se realizó tal y como se describe en el siguiente apartado.

2.2 Expresión, purificación y cristalización del dominio quinasa de TTBK1 y TTBK2.

El dominio quinasa de la proteína TTBK1 (14-313) se expresó tomando el vector del gen de la proteína humana (GeneScrip hTTBK_coli_pET-28a(+)-TEV, que contenía una cola de polihistidinas más un dominio de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco y se expresó en una línea de bacteria *Escherichia coli* (BL21DE3). Para la transformación de las células se utilizaron células competentes obtenidas de la siguiente forma. Se crecieron 1 mL de stock comercial de células (BL21DE3) en 50 mL de medio de lisogenia (LB) durante la noche, a 37 °C hasta una densidad óptica de 0.3-0.4. Después, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y se resuspendió el pellet en 12 mL de una disolución fría de MgSO₄ 10 mM con 10% de glicerol y se mantuvieron 15 min en hielo antes de volver a centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos. Se repitió el paso anterior esta vez con una disolución de CaCl₂ 50 mM y 10% de glicerol. Tras la centrifugación las células se resuspendieron en 2 mL de CaCl₂ 10 mM y 10% de glicerol y se alicuotó en fracciones de 100 μ L.

Para la transformación se tomó una alícuota de células competentes BL21DE3 y se añadió el vector del gen a una concentración de 0.1 μ g/ μ L a 0 °C y una disolución 1 mM canamicina. Después, las células se mantuvieron 20 min a 0 °C, se calentaron a 42 °C un minuto y se enfriaron a 0 °C. A continuación se añadió 1 mL de medio enriquecido (SOC), se dejaron a 37 °C durante 1 hora, se centrifugaron 2 min para eliminar el sobrenadante y el pellet se resuspendió para finalmente sembrarlo en un disco Petri con agar-agar. La colonias crecieron durante la noche a 37 °C y después se tomó una colonia de bacterias aisladas y se creció un pre-cultivo de 50 mL durante la noche en medio de lisogenia (LB). Al día siguiente, el precultivo se diluyó en medio fresco en una concentración de 1:25 y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una dispersión óptica de 0.6. En este momento se indujo la expresión de la proteína añadiendo 1 mL isopropil- β -D-

tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM. El cultivo se dejó creciendo a 20 °C en agitación durante otra noche.

Los cultivos celulares se centrifugaron a 4 000 rpm a 4 °C durante 20 min y el sobrenadante se descartó. Las células se resuspendieron en 25 mL de tampón A (20 mM TRIS pH 8, 5 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 5% v/v glicerol, 0.05% p/v CHAPS, 1 mM TCEP, 10 mM imidazol y una pastilla de inhibidor de proteasas). A continuación se extrajo y purificó la proteína mediante varios pasos: las células se rompieron mediante sonicación a 0 °C (a amplitud 37) en varios ciclos de 15 segundos de sonicación y 30 de reposo. Después se centrifugaron a 4 000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se filtró con un filtro de 0.45 micras. La solución obtenida se cargó en una columna HisTrap™ HP. La proteína eluyó con concentraciones crecientes de imidazol utilizando el tampón B (20 mM TRIS pH 8, 5 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 5% v/v glicerol, 0.05% p/v CHAPS, 1 mM TCEP, 250 mM imidazol). Las fracciones que contenían la proteína se reunieron, la fuerza iónica de la mezcla se diluyó a una concentración final de NaCl de 50 mM y se cargó en una columna GE Healthcare mono S. Los tampones utilizados en este caso tenían la siguiente composición: 20 mM HEPES pH 7, 5% v/v glicerol y 1 mM TCEP y el tampón C 50 mM de NaCl y el D 1M NaCl. Después se eliminó la cola de histidinas con la proteasa del virus del tabaco a una concentración de 1:20 (250 µL) y se desfosforiló la proteína con lambda fosfatasa y MnCl₂ 1 M, se incubó 2.5 h a 4 °C. Por último, se cargó la mezcla en una columna SuperDex™ 200 y se eluyó en un tampón de la siguiente composición: 20 mM TRIS pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.05% p/v CHAPS, 2 mM TCEP y 5% v/v de glicerol. Las fracciones obtenidas se reunieron y se concentraron hasta un valor deseado y se conservaron a -80 °C. La primera expresión de la proteína se obtuvo a una concentración 9.57 mg/mL y la segunda a 11.8 mg/mL.

Cristalización.

Para la obtención de los complejos ligando-proteína se incubaron las alícuotas de proteína con los diferentes ligandos en un exceso molar 1:4 durante una hora a 0 °C. Después, los experimentos de cristalización se realizaron en placas de 24 pocillos (Crystalgen Inc., NY, EEUU) a 20 °C utilizando la técnica de la difusión de vapor en gota pendiente mezclando gotas de 0.5 µL proteína-ligando con 0.5 µL de reservorio. Los cristales del compuesto **39** con TTBK1 aparecieron en el pocillo que contenía 27% p/v PEG 4000, 200 mM NH₄SO₄, 100 mM Citrato sódico pH 5.6 y 10 mM TCEP. Los cristales en forma de plato fino aparecieron al cabo de una semana y continuaron

creciendo hasta 50 μm , tras lo cual fueron montados en lazos y crioprotectados en una solución que contenía el tampón del pocillo más un 20% v/v de etilenglicol y se congelaron en nitrógeno líquido.

Difracción de rayos X y determinación estructural.

La difracción de rayos X se realizó en el sincrotrón ALBA en la línea de luz BL13-XALOC, utilizando un detector Pilatus 6M. Para las otras estructuras cristalinas, los datos de difracción se recopilaron en Swiss Light Source. Los conjuntos de datos recopilados se procesaron con XDS¹⁷⁴ y AIMLESS.¹⁷⁵ La determinación de la estructura se realizó mediante el método de reemplazo molecular con PHASER¹⁷⁶ utilizando una estructura de TTBK1 anteriormente reportada (código PDB: 4BTM).

Tabla 13. Datos de la recolección y refinamiento de las estructuras.

Complejo	TTBK1-39
Código PDB	7QHW
Data Collection	
Resolución ^a (Å)	48.64-2.80 (2.80-2.99)
Grupo Espacial	C2
Dimensiones celdilla	$a = 126.1, b = 108.5, c = 110.3$ Å $\alpha, \gamma = 90.0^\circ, \beta = 94.5^\circ$
No. Reflexiones únicas ^a	34506
Complejidad ^a (%)	99.5 (99.8)
I/ σ ^a	5.0 (0.5)
R _{merge} ^a	0.138 (1.307)
CC (1/2)	0.992 (0.441)
Redundancia ^a	3.4 (3.5)
Refinamiento	
No. Átomos en refinamiento (P/L/O) ^b	4765 /48/ 83
B factor (P/L/O) ^b (Å ²)	60/114/47
R _{fact} (%)	20.0
R _{free} (%)	23.0
rms deviation bond ^c . (Å)	0.012
rms deviation angle ^c . (°)	1.6

a Los valores entre paréntesis muestran las estadísticas de las capas de mayor resolución.

b P/L/O indican proteína, moléculas de ligando presentes en los sitios activos y otras (moléculas de agua y disolvente), respectivamente.

c rms valor cuadrático medio, del inglés *root-mean-square*.

¹⁷⁴ Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (Pt 2), 133-144.

¹⁷⁵ Evans, P. R.; Murshudov, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2013**, *69* (7), 1204-1214.

¹⁷⁶ McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40* (Pt 4), 658-674.

El refinamiento de la estructura se realizó mediante varios ciclos de refinamiento computacional con REFMAC5¹⁷⁷ y la reconstrucción manual utilizando Coot.¹⁷⁸ La recopilación de datos cristalográficos y la estadística de refinamiento se resumen en la Tabla 13.

2.3 Determinación de la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica

Para la predicción del paso de la BHE se llevó a cabo la metodología PAMPA^{179,180} (del inglés «Parallel Artificial Membrane Permeability Assay»). Esta técnica consiste en un sistema artificial de placas paralelas separadas por una membrana cubierta con lípido de cerebro porcino que emula la barrera hematoencefálica. Diez fármacos comerciales aprobados por la FDA cuya permeabilidad experimental en humanos es conocida se utilizaron para validar el estudio: atenolol, cafeína, desipramina, enoxacino, hidrocortisona, ofloxacina, piroxicam, promazina, testosterona y verapamilo (Sigma-Aldrich, Merk, Fluka). Los compuestos de estudio y los controles (1-2 mg) se disolvieron en 5 mL del tampón del ensayo: tampón PBS a pH 7.4 y etanol en una proporción 70:30 (Sigma). A continuación se filtraron (filtros PDVF 30nm, Symta) realizándose posteriormente un barrido de las disoluciones con el lector de ultravioleta (UV) Varioskan™ (Termo Fisher) desde la longitud de onda 220 hasta la 400, obteniendo como resultado un espectro para cada compuesto en el que se identificaron las longitudes de onda a las que absorbe cada uno de ellos. Una vez determinada la absorbancia inicial de cada compuesto en sus longitudes de onda, se añadieron 180 µL de cada muestra a la placa donadora de 96 pocillos (Millipore) previamente cubierta con 5 µL de lípido de cerebro porcino (PBL, Avanti Polar Lipids) disuelto en dodecano (20 mg/mL, Sigma-Aldrich) y la placa aceptora de 96 pocillos (Millipore) se rellenó con 180 µL/pocillo del tampón del ensayo. A continuación se colocó la placa donadora sobre la aceptora formando un “sandwich”, que se incubó durante 2 horas y media a temperatura ambiente en una atmosfera húmeda. Tras esta incubación se retiró la placa donadora y se leyó la absorbancia de las soluciones de la placa aceptora a las longitudes de onda establecidas previamente, y se calculó la permeabilidad efectiva (*Pe*) de cada compuesto utilizando la siguiente ecuación:

¹⁷⁷ Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1997**, *53* (Pt 3), 240-255.

¹⁷⁸ Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (12), 2126-2132.

¹⁷⁹ Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (7), 1007-1010.

¹⁸⁰ Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38* (3), 223-232.

$$Pe = \frac{Vd \times Vr}{(Vd + Vr)St} \quad \text{Ln} \quad \frac{100 Vd}{100 Vd - \%T (Vd+Vr)} \quad \%T = \frac{Vr \times Ar}{(Ad_0 \times Vd)}$$

En donde: Vd: Volumen de la placa donadora (180 µL); Vr: volumen de la placa aceptora (180 µL); S: superficie del pocillo (0.266 cm²); t: tiempo de incubación (seg); Ar: absorbancia final (placa aceptora); Ad₀: absorbancia inicial (placa donadora).

Tras establecer una correlación directa entre la Pe experimental y la Pe descrita en la bibliografía de los diez fármacos control, se obtuvo una recta que nos permite determinar la permeabilidad de los compuestos.

Tabla 14. Valores obtenidos de permeabilidad (*Pe* 10⁻⁶ cm s⁻¹) sobre la barrera hematoencefálica para diez fármacos comerciales (reportados y experimentales) y permeabilidad experimental de los compuestos (SNC+, permeable; SNC- no permeable; SNC+/- están en el área de sombra y podrían o no cruzar la barrera por permeación pasiva. N.D: no es posible determinar en la condición experimental). *Los datos representan la media ± SD de 2 experimentos independientes

Compuesto	Bibl. ¹⁷⁰	<i>Pe</i> (10 ⁻⁶ cm s ⁻¹)*	Predicción	Compuesto	<i>Pe</i> (10 ⁻⁶ cm s ⁻¹)*	Predicción
Atenolol	0.8	0.5 ± 0.2		46		N.D
Cafeína	1.3	1.1 ± 0.1		47	18.7 ± 1.4	SNC +
Desipramina	12	10.2 ± 1.1		48	14.0 ± 0.4	SNC +
Enoxacino	0.9	0.7 ± 0.2		49	8.4 ± 1.6	SNC +
Hidrocortisona	1.9	1.0 ± 0.1		50	3.0 ± 0.01	SNC +/- SNC -
Ofloxacino	0.8	0.5 ± 0.1		52	10.5 ± 0.7	SNC +
Piroxicam	2.5	0.5 ± 0.2		53	9.7 ± 1.0	SNC +
Promazina	8.8	7.3 ± 0.6		54	2.9 ± 0.01	SNC +/- SNC -
Testosterona	17	14.5 ± 0.9		56	17.3 ± 0.1	SNC +
Verapamilo	16	14.9 ± 0.1		57	1.1 ± 0.1	SNC -
29		3.3 ± 0.1	SNC +	58	9.7 ± 1.0	SNC +
32		3.9 ± 0.8	SNC +	59	7.5 ± 0.1	SNC +
33		2.5 ± 0.1	SNC +/- SNC -	60	14.1 ± 0.4	SNC +
34		0.9 ± 0.2	SNC -	61	7.7 ± 0.6	SNC +
35		3.5 ± 0.2	SNC +	63	4.7 ± 0.5	SNC +
36		1.9 ± 0.7	SNC +/- SNC -	64	18.3 ± 1.2	SNC +
38		23.2 ± 1.4	SNC +	65	6.9 ± 0.6	SNC +
39		11.5 ± 1.0	SNC +	66	9.4 ± 0.4	SNC +
40		15.6 ± 1.3	SNC +	75	2.2 ± 0.8	SNC +/- SNC -
41			N.D	76	0.8 ± 0.1	SNC -
42		11.8 ± 0.3	SNC +	77	1.2 ± 1.1	SNC -
44		11.0 ± 1.2	SNC +	78	2.5 ± 0.1	SNC +/- SNC -
45		14.3 ± 1.1	SNC +	79	0.6 ± 0.2	SNC -

Un compuesto se predice como permeable (SNC+) si presenta una Pe superior a al valor de la ecuación de la recta obtenido cuyo $x=2$; y no permeable (SNC-) si la Pe es inferior al valor obtenido cuyo $x=4$. Los compuestos con una Pe comprendida entre estos valores se consideran dudosos (SNC+/SNC-) no pudiendo predecir con certeza si tienen capacidad de penetrar al SNC por difusión pasiva. Cada muestra fue analizada tomando de 3 a 5 longitudes de onda por triplicado y en 2 ensayos independientes. Los resultados se muestran como la media de los 2 ensayos con su valor de desviación estándar.

Para la determinación de la permeabilidad efectiva de los compuestos del capítulo 2 se modificó el protocolo para medir las muestras mediante un equipo de HPLC-MS. Se usaron los mismos controles indicados anteriormente (con excepción de la hidrocortisona que no se observó en el detector de fotodiodo de HPLC) y tanto los compuestos a medir como los controles se disolvieron en DMSO, para obtener disoluciones stock que fueron finalmente diluidas con PBS pH 7.4 para obtener una concentración de 5% de DMSO en el experimento. El ensayo se realizó en la misma placa de 96 pocillos (Millipore) y se cubrió con 4 μL (20 mg/mL) de lípido porcino seguidos de 180 μL de cada solución a medir. La placa donadora fue puesta sobre la aceptora y se incubó a temperatura ambiente durante 2.5 h. Después, las muestras de la placa aceptora fueron recogidas y diluidas 10 veces con PBS/DMSO (95/5) para proceder a su análisis con HPLC-MS. El pico de absorbancia de cada compuesto se comprobó mediante MS y se utilizó para calcular la concentración de compuestos y Pe experimental. Cada muestra se analizó por duplicados independientes. La cromatografía se realizó utilizando un equipo HPLC-MS de Thermo Fisher acoplado a un detector Finnigan TM LXQ TM con una columna Sunfire C18, 3.5 μm (50 mm x 4.6 mm) y un gradiente de acetonitrilo y agua Milli-Q (con 0.1% de ácido fórmico) como fase móvil. El gradiente estándar consistió en una carrera de 7 minutos del 5% al 95% de acetonitrilo a un caudal de 0.5 mL/min.

Tabla 15. Valores obtenidos de permeabilidad (Pe 10^{-6} cm s^{-1}) sobre la barrera hematoencefálica para 9 fármacos comerciales (reportados y experimentales) y permeabilidad experimental de los compuestos (SNC+, permeable; SNC- no permeable; SNC+/- están en el área de sombra y podrían o no cruzar la barrera por permeación pasiva. N.D: no es posible determinar en la condición experimental). *Los datos representan la media \pm SD de 2 experimentos independientes

Compuesto	Bibl. ¹⁸¹	Pe (10^{-6} cm s^{-1})*	Predicción	Compuesto	Pe (10^{-6} cm s^{-1})*	Predicción
Atenolol	0.8	0.6 \pm 0.47		93		N.D
Cafeína	1.3	1.5 \pm 0.3		94	5.1 \pm 0.6	SNC +
Desipramina	12	7.4 \pm 0.9		95	3.1 \pm 0.3	SNC +/ SNC -
Enoxacino	0.9	1.4 \pm 0.1		96		N.D
Ofloxacino	0.8	1.7 \pm 0.1		97		N.D
Piroxicam	2.5	2.9 \pm 0.4		98	0.2 \pm 0.01	SNC-
Promazina	8.8	5.2 \pm 0.4		109	0.7 \pm 0.2	SNC-
Testosterona	17	13.4 \pm 1.0		110		N.D
Verapamilo	16	11.0 \pm 1.5		111	3.6 \pm 0.1	SNC +

2.4 Determinación de la capacidad inhibitoria de los compuestos

2.4.1 Ensayo enzimático TTBK1 y TTBK2

Los inhibidores de TTBK1/TTBK2 fueron evaluados por la “MRC Protein Phosphorylation and Ubiquitination Unit” de la Universidad de Dundee siguiendo el siguiente protocolo. Entre 5 y 20 mU de la enzima humana recombinante TTBK1 [1-1321] o TTBK2 [1-450] se diluyen en 50 mM Tris pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 0.1% β -mercaptoetanol, 1mg/mL BSA y 10mM DTT y se ensayan frente a 0.3mM del péptido RRKDLHDDEEAMSITA en un volumen final de 25.5 μ l con 10 mM acetato de magnesio y 5nM [³³P- γ -ATP] (50-1000 cpm/pmole). La mezcla se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y la reacción enzimática se para con la adición de 0.5 M de ácido ortofosfórico al 3%. La mezcla se transfiere en unas placas P81 Unifilter® y los pocillos se lavaron con 50mM de ácido ortofosfórico.

2.4.2 Ensayo enzimático CK1 δ

Los inhibidores de CK1 δ fueron evaluados en el laboratorio siguiendo el siguiente protocolo. Se utilizó el Kit de Quinasa-Glo de Promega para detectar la actividad de los compuestos frente a los ensayos tamponados de CK1 δ Kinase-Glo utilizando placas de 96 pocillos negras. En un ensayo

¹⁸¹ Di, L., Kerns, E.H., Fan, K., McConnell, O.J., Carter, G.T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* 2003, 38, 223-232.

típico, se añadieron 10 μL de compuesto (disuelto en DMSO a una concentración de 1 mM y diluido de antemano en tampón a la concentración deseada) y 10 μL (16 ng) de enzima a cada pocillo seguido de 20 μL de tampón con 0.1 % de caseína como sustrato y 4 μM de ATP. La concentración final de DMSO en la mezcla de reacción no excedió del 1%. Después de una incubación de 60 minutos a 30 °C, la reacción enzimática se detuvo con 40 μL de reactivo Kinase-Glo. La luminiscencia se registró después de 10 minutos utilizando un lector multimodo Fluostar Optima (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Alemania). La actividad es proporcional a la diferencia del ATP total y consumido. Las actividades inhibitorias se calcularon sobre la base de las actividades máximas medidas en ausencia de inhibidor. La CI_{50} se definió como la concentración de cada compuesto que reduce un 50% la actividad enzimática con respecto a la que se produce sin inhibidor.

2.4.3 Ensayo enzimático GSK3 β

Los inhibidores de GSK3 β fueron evaluados en el laboratorio siguiendo el siguiente protocolo. Se utilizó el Kit de Quinasa-Glo de Promega para detectar la actividad de la enzima GSK3 β recombinante humana. Los ensayos de Kinase-Glo se realizaron en medio tamponado (50 mM de HEPES (pH 7.5), 1 mM de AEDT, 1 mM de EGTA y 15 mM de acetato de magnesio) utilizando placas de 96 pocillos negros. En un ensayo típico, 10 μL (10 μM) de compuesto (disuelto en DMSO a una concentración de 1 mM y diluido previamente en el tampón a la concentración deseada) y 10 μL (20 ng) de enzima se añadieron a cada pocillo seguido de 20 μL de disolución tampón de concentración 25 μM sustrato y 1 μM ATP. La concentración final de DMSO en la mezcla de reacción no excedió del 1%. Después de 30 minutos de incubación a 30 °C, la reacción enzimática se detuvo con 40 μL de reactivo Kinase-Glo. La luminiscencia se registró después de 10 minutos utilizando un lector multimodo Fluostar Optima (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Alemania). La actividad es proporcional a la diferencia del ATP total y consumido.

2.4.4 Ensayo enzimático BACE1

Los inhibidores de BACE1 fueron evaluados en el laboratorio siguiendo el siguiente protocolo. Los ensayos con la enzima BACE1 se realizaron *in vitro* utilizando FRET. Se utilizó un sustrato peptídico a base de APP (rodamina-EVNLDAEFK-quencher, K_m de 20 μM) portador de la mutación sueca y que contenía una rodamina como donante de fluorescencia y un acelerador de atenuación en cada extremo. El sustrato intacto es débilmente fluorescente y se vuelve altamente

fluorescente al sufrir la escisión enzimática. Los ensayos se realizaron en un tampón de acetato de sodio de 50 mM, pH 4.5 y una concentración enzimática final (1 U/mL). El cribado enzimático se realizó a una concentración 10 μ M del inhibidor. La mezcla fue incubada durante 60 minutos a 25 °C en ausencia de luz y luego se detuvo añadiendo una disolución de acetato de sodio 2.5 M. La fluorescencia se midió con un lector de microplacas Fluostar Optima (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Alemania) a 545 nm de excitación y 585 nm de emisión.

2.5 Química click *in situ* utilizando BACE1 como molde de reacción

En un eppendorf con una disolución de tampón de acetato sódico 50 mM a pH 4.5 se incubaron las parejas de azida y alquino a concentración final de 100 μ M, partiendo de disoluciones stock de 3 mM en DMSO. La enzima BACE1 (SigmaAldrich) se añadió a una concentración final de 0.5 μ M, todo en un volumen final de 50 μ L. La mezcla se incubó a temperatura ambiente bajo agitación durante 24 h. Las disoluciones y sus controles sin enzima se analizaron por HPLC-MS, en modo de ión único (SIM). La separación se realizó con un gradiente de acetonitrilo/agua (0.1% de ácido fórmico, con una mezcla inicial 10/90, v/v durante 15 minutos a un flujo de 0.5 mL/min). La formación selectiva de los triazoles se confirmó mediante la observación del peso molecular correspondiente. Los cromatogramas obtenidos se recogen en las Figuras 61-63

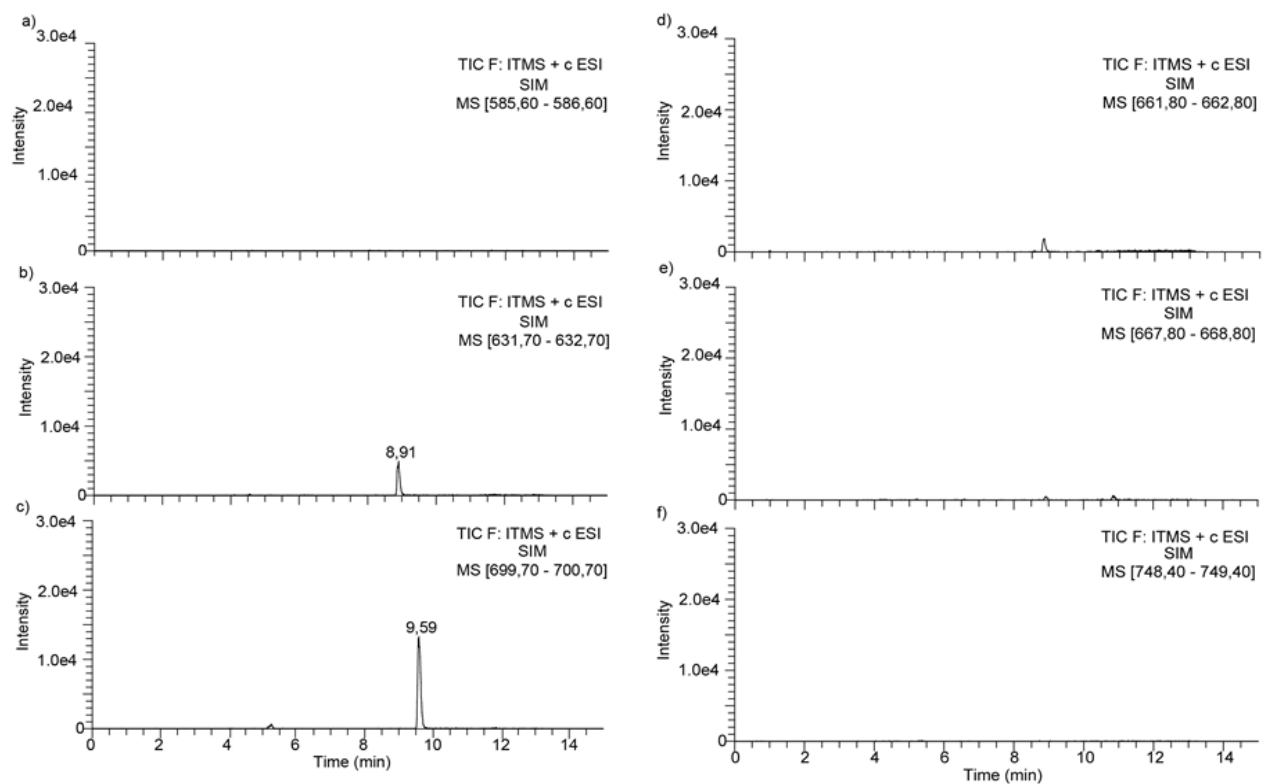


Figura 61. Cromatogramas LC/MS-SIM de la azida **83** incubada con diferentes alquinos en presencia de BACE1: a) alquino **92**, b) alquino **101**, c) alquino **102**, d) alquino **103**, e) alquino **104**, f) alquino **106**

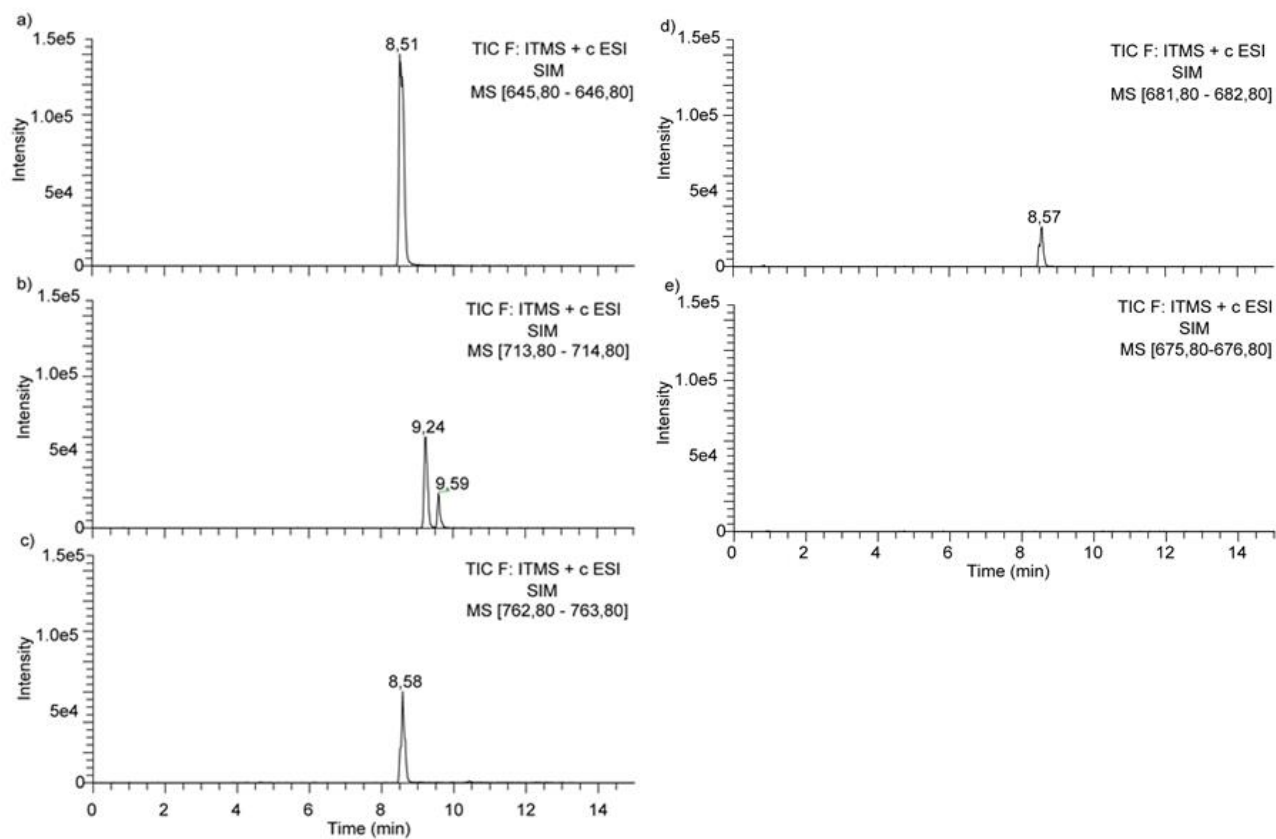


Figura 62. Cromatogramas LC/MS-SIM de la azida **90** incubada con diferentes alquinos en presencia de BACE1: a) alquino **101**, b) alquino **102**, c) alquino **103** d) alquino **104**, e) alquino **106**.

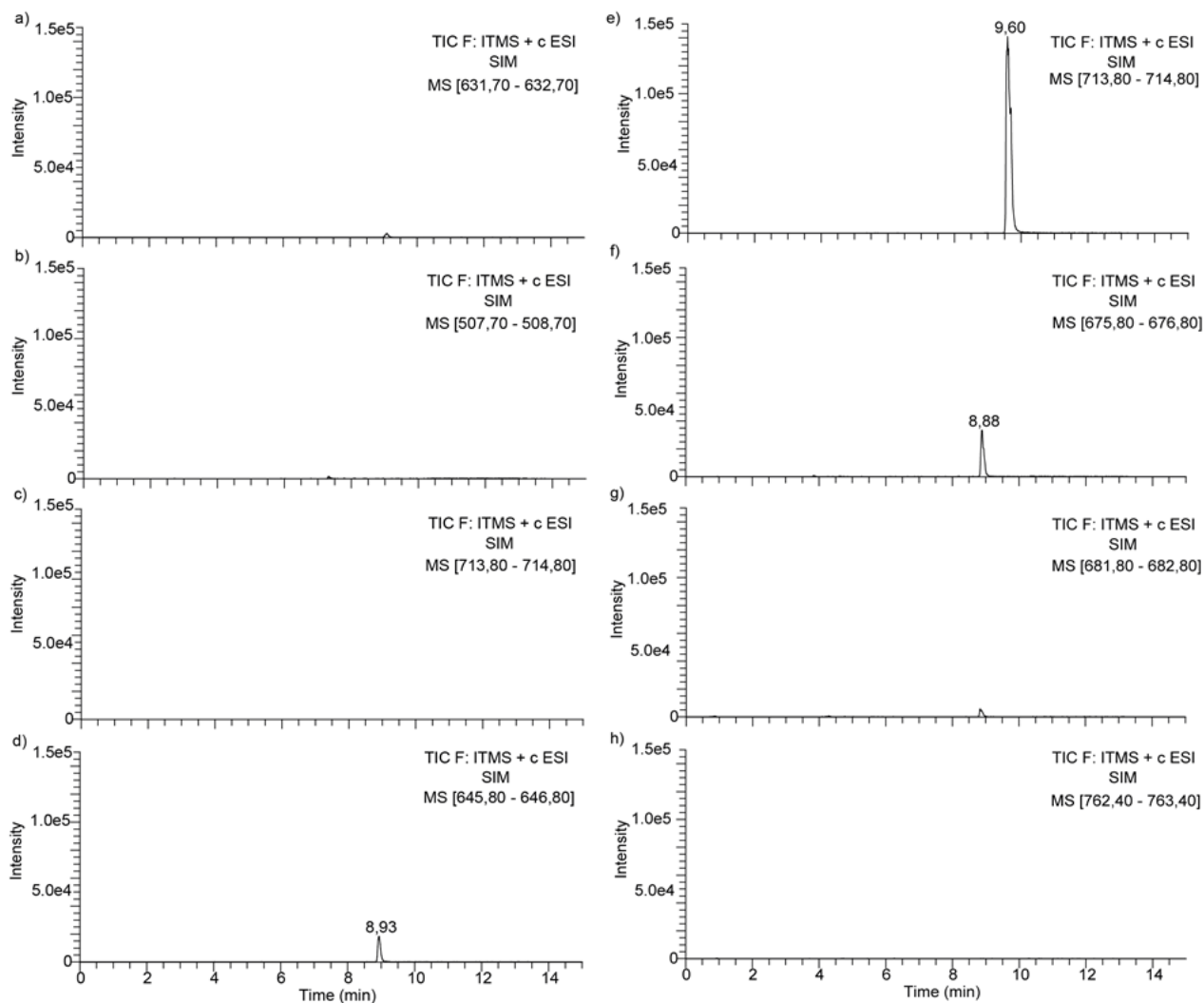


Figura 63. Cromatogramas LC/MS-SIM de la azida **108** incubada con diferentes alquinos en presencia de BACE1: a) alquino **86**, b) alquino **91**, c) alquino **92**, d) alquino **101**, : e) alquino **102**, f) alquino **103**, g) alquino **104**, h) alquino **106**.

3 Procedimientos computacionales

3.1 Estudios de dinámica molecular en TTBK1 y TTBK2

Para los estudios de dinámica molecular de los compuestos **39**, **49** y **53** en TTBK1 y TTBK2 se partió de dos puntos: la posición de los ligandos en las estructuras cristalinas de los complejos **39**-TTBK1, **53**-TTBK1 y **53**-TTBK2 o las mejores soluciones de un estudio de acoplamiento molecular entre los compuestos **39**-TTBK2, **49**-TTBK1 y **49**-TTBK2.

El estudio del acoplamiento proteína-ligando se realizó utilizando Glide y otros paquetes de Schrödinger relacionados.^{182, 183} Las estructuras cristalográficas obtenidas para TTBK1 y TTBK2 en complejo con los inhibidores reportados en esta tesis doctoral fueron utilizadas como punto de partida (códigos PDB: 7Q8V, 7QHW, 7Q8W, 7Q8Z, 7Q90, 7Q8Y).

Primero, la proteína se preparó utilizando Maestro Protein Preparation Wizard¹⁸⁴ eliminando ligandos, metales y moléculas de agua, agregando hidrógenos, ionizando residuos a pH 7.5 y completando las cadenas laterales ausentes usando Prime. La minimización de la estructura de la proteína se realizó con el campo de fuerza OPLS3. Los inhibidores de TTBK también se prepararon utilizando el campo de fuerza OPLS3. La grilla para el acoplamiento molecular se definió utilizando los ligandos cocrystalizados en TTBK1 y TTBK2 como centro de la caja. El acoplamiento molecular se realizó con la función de precisión estándar (SP) Glide y posteriormente, las 10 mejores poses por ligando fueron seleccionadas y sometidas a un refinamiento de sus puntuaciones energéticas utilizando los cálculos de MM-GBSA (del inglés *Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area*) con Prime obteniendo así un valor de energía libre de unión (ΔG_{bind}) más refinado y acorde con los valores de inhibición enzimática.¹⁸⁵

Una vez obtenidas las mejores poses para los compuestos, éstas fueron sometidas a 525 nanosegundos de simulaciones de dinámica molecular (DM) utilizando el software Desmond y el campo de fuerza OPLS3e. Para preparar los sistemas, los complejos fueron solvatados con moléculas de agua tipo SPC pre-equilibradas en una caja. Luego, los sistemas se neutralizaron agregando iones de Na⁺ o Cl⁻ para equilibrar la carga neta de los sistemas y se agregó NaCl a una concentración de 0.15 M para simular condiciones fisiológicas. Cada sistema se relajó utilizando el protocolo de relajación predeterminado de Desmond y luego se equilibró con una fuerza constante de resorte de 5.0 kcal mol⁻¹ Å⁻² aplicada a los átomos del esqueleto principal de TTBK y los ligandos, durante 25 ns a NPT: presión (1 atm), temperatura (300 K) y número de átomos constantes. También se utilizó el conjunto isotérmico-isobárico y el método Nosé-Hoover con un tiempo de relajación de 1 ps aplicando el algoritmo MTK, en un tiempo de 2 femtosegundos. Luego se tomó el

¹⁸² Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1750-1759.

¹⁸³ Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1739-1749.

¹⁸⁴ Sastry, G. M.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2013**, *27* (3), 221-234.

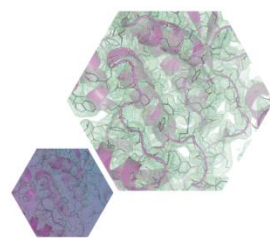
¹⁸⁵ Wang, E.; Sun, H.; Wang, J.; Wang, Z.; Liu, H.; Zhang, J. Z. H.; Hou, T. End-point binding free energy calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and applications in drug design. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (16), 9478-9508.

último fotograma y se realizó una segunda DM de 500 ns sin restricciones utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente. Los sistemas se analizaron utilizando, PyMol, VMD, y KNIME para estudiar las interacciones ligando-proteína a lo largo de las trayectorias de DM.

3.2 Estudios de acoplamiento molecular en BACE1

Para seleccionar adecuadamente la estructura cristalina correcta para los estudios computacionales de BACE1, se creó una biblioteca virtual de todos los ligandos (excluyendo compuestos e iones similares a péptidos) cocrystalizados con BACE1 presentes en el PDB y se prepararon con LigPrep a pH 7.0 ± 2.0 seleccionando solo un conformero por compuesto. Luego, los ligandos se compararon con el compuesto **87** utilizando el software LiSiCA de cribado virtual basado en ligandos, que utiliza el coeficiente de Tanimoto para buscar similitudes 3D entre un conjunto dado de compuestos. Este paso devolvió una estructura cristalográfica 3D: 5I3Y, donde BACE1 se encuentra co-cristalizada con un ligando similar a nuestro compuesto de referencia.

La estructura 5I3Y se preparó utilizando Maestro Protein Preparation Wizard¹⁷⁴ eliminando ligandos, metales y moléculas de agua, agregando hidrógenos, ionizando residuos a pH 7.5 y completando las cadenas laterales ausentes usando Prime. La minimización de la estructura de la proteína se realizó con el campo de fuerza OPLS3. La grilla se centró en los residuos catalíticos Asp32 y Asp228, con un tamaño lo suficientemente grande como para incluir los sitios involucrados en el sitio de unión del ligando cristalizado. Los estudios de acoplamiento molecular con los compuestos seleccionados se realizaron utilizando el software Glide y la función de puntuación Standard Precision (SP). Las 10 mejores poses por acoplamiento se postprocesaron utilizando el cálculo MM-GBSA de mecánica molecular implementado en el software Prime. En este caso primero se calculó el MM-GBSA, congelando toda la proteína y luego minimizando el ligando, así como los residuos de la proteína en un radio de 5 Å alrededor de cada compuesto, lo que permite la flexibilidad del receptor para adaptar los residuos involucrados en el sitio de unión en cada simulación. Los mejores resultados según la energía libre calculada fueron seleccionados para los análisis aquí presentados.



DIFUSIÓN DE RESULTADOS

El trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral ha permitido obtener las siguientes publicaciones:

- Nozal, V., Martínez, A. Tau Tubulin Kinase 1 (TTBK1), a new player in the fight against neurodegenerative diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *161*, 39-47.
- Palomo, V., Tosat-Bitrian, C., Nozal, V., Nagaraj, S., Martín-Requero, A., Martínez, A. TDP-43: A Key Therapeutic Target beyond Amyotrophic Lateral Sclerosis *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10* (3), 1183-1196.
- Palomo, V., Nozal, V., Rojas-Prats, E., Gil, C., Martínez, A. Protein kinase inhibitors for amyotrophic lateral sclerosis therapy. *Br. J. Pharmacol.* **2021**, *178* (6), 1316-1335.
- Nozal, V., García-Rubia, A., Cuevas, E. P., Pérez, C., Tosat-Bitrián, C., Bartolomé, F., Carro, E., Ramírez, D., Palomo, V., Martínez, A. From Kinase Inhibitors to Multitarget Ligands as Powerful Drug Leads for Alzheimer's Disease using Protein-Templated Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60*, 19344-19354.
- Nozal, V., Martínez-González, L., Gomez-Almeria, M., Gonzalo-Consuegra, C., Santana, P., Chaikuad, A., Pérez-Cuevas, E., Knapp, S., Lietha, D., Ramírez, D., Petralla, S., Monti, B., Gil, C., Martín-Requero, A., Palomo, V., de Lago, E., Martínez, A. TDP-43 modulation by tau tubuline kinase 1 inhibitors: a new avenue for future amyotrophic lateral sclerosis therapy. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (2), 1585–1607.

Además los compuestos sintetizados en la presente doctoral han dado lugar al registro de una patente:

- Martínez, A., Gil, C., Nozal, V., Palomo, V., Martín-Requero, A., Martínez-González, L., Pérez-Cuevas, E. Inhibidores de la quinasa de tau y tubulina (TTBK) N. de solicitud: P202130653, **2021**.

El trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral ha sido reconocido con los siguientes premios:

- Premio *ex aequo* de la Real Academia Nacional de Farmacia en el Concurso Científico **2018** por el trabajo titulado “Optimización de la estrategia de unión en el diseño de compuestos multidiana prometedores para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer”
- Premio *Almirall S.A.* en la XIX Convocatoria para Investigadores Noveles de la Sociedad Española de Química Terapéutica (SEQT) **2021** por el trabajo titulado “Isoform selective tau tubulin kinase 1 inhibitors reduce TDP-43 hyperphosphorylation and ameliorate ALS pathology.”
- Áccesit a la mejor comunicación del 5º convocatoria PhDay Complutense (EDUCM) en el año **2021**, por “LA UNIÓN HACE LA FUERZA: obtención de nuevos compuestos multidiana prometedores para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.”

Otras publicaciones realizadas durante el periodo de investigación:

- Gil, C., Ginex, T., Maestro, I., Nozal, V., Barrado-Gil, L., Cuesta-Geijo, M.Á., Urquiza, J., Ramírez, D., Alonso, C., Campillo, N.E., Martínez, A. COVID-19: Drug Targets and Potential Treatments. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (21), 12359-12386.
- Ginex, T., Garaigorta, U., Ramírez, D., Castro, V., Nozal, V., Maestro, I., García-Cárceles, J., Campillo, N. E., Martínez, A., Gastaminza, P., Gil, C. Host-Directed FDA-Approved Drugs with Antiviral Activity against SARS-CoV-2 Identified by Hierarchical In Silico/In Vitro Screening Methods. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (4), 332.
- Rojas-Prats, E., Tosat-Bitrián, C., Martínez-González, L., Nozal, V., Pérez, D. I., Martínez, A. Increasing brain permeability of PHA-767491, a cell division cycle 7 kinase inhibitor, with biodegradable polymeric nanoparticles. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (2), 180.
- Nozal, V., Rojas-Prats, E., Maestro, I., Gil, C., Perez, D. I., & Martinez, A. Improved Controlled Release and Brain Penetration of the Small Molecule S14 Using PLGA Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (6), 3206.