



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 195 027**

⑤① Int. Cl.⁷: C07D 473/16

C07D 473/40

C07D 473/32

A61K 31/52

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **96941088.5**

⑧⑥ Fecha de presentación: **29.11.1996**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 874 847**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **04.11.1998**

⑤④ Título: **Nuevos derivados de purina que poseen en particular propiedades anti-proliferativas y sus aplicaciones biológicas.**

③⑦ Prioridad: **01.12.1995 FR 9514237**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
01.12.2003

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
01.12.2003

⑦③ Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA RE-
CHERCHE SCIENTIFIQUE**
3, rue Michel Ange
75016 Paris Cedex, FR
Institut de Botanique Expérimentale

⑦② Inventor/es: **Meijer, Laurent;**
Bisagni, Emile;
Legrauerend, Michel y
Strnad, Miroslav

⑦④ Agente: **Ruo, Alessandro**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Nuevos derivados de purina que poseen en particular propiedades anti-proliferativas y sus aplicaciones biológicas.

La invención tiene por objeto nuevos derivados de purina que poseen propiedades anti-proliferativas y sus aplicaciones biológicas,

Se refiere en particular a los derivados de purina dotados de un efecto inhibidor frente a proteínas quinasas ciclina dependientes, o de forma abreviada cdk.

El estudio de los mecanismos moleculares que controlan el ciclo celular ha permitido demostrar la función reguladora de las cdk. Estas proteínas están constituidas por al menos dos sub-unidades, una sub-unidad catalítica (cuyo cdc2 es el prototipo) y una sub-unidad reguladora (ciclina). Se han descrito ocho cdk, cdk1 (=cdc2), cdk2-cdk8.

A excepción de cdk3, para la que no se conoce ninguna ciclina asociada, éstas cdk están reguladas por asociación transitoria con un miembro de la familia de las ciclinas : ciclina A (cdc2, cdk2), ciclina B1-B3 (cdc2), ciclina C (cdk8), ciclina D1-D3 (cdk2-cdk4-cdk5-cdk6), ciclina E (cdk2), ciclina H (cdk7).

Cada uno de estos complejos está implicado en una fase del ciclo celular. La actividad de las cdk está regulada por modificación postraduccional, por asociaciones transitorias con otras proteínas y por modificación de su localización intracelular. Los reguladores de las cdk comprenden activadores (ciclinas, cdk7/ciclina H, fosfatasa cdc25), las subunidades p9^{CKS} y p15^{cdk-BP} y las proteínas inhibidoras (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p21^{cip1}, p18, p27^{Kip1}).

Paralelamente a las investigaciones puramente fundamentales sobre los mecanismos reguladores de la división celular, la importancia de las disregulaciones de las quinasas ciclinas dependientes en el desarrollo de tumores humanos ha quedado demostrada por numerosos estudios. Así, se ha observado la sobreexpresión de ciclinas D y E en numerosos tumores, la sobreexpresión de cdc2, las propiedades oncogénicas de las ciclinas D y A, la expresión temporal anormal de quinasas ciclinas dependientes, la mayor disregulación de los inhibidores protéicos (mutaciones, deleciones).

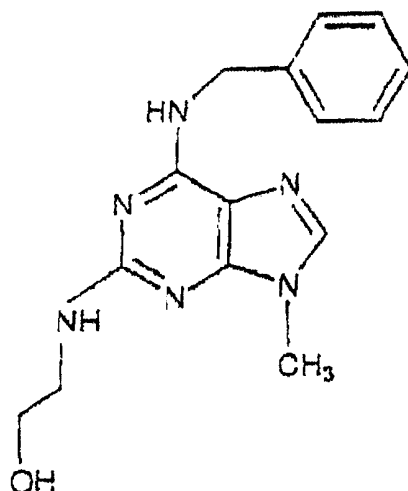
Los reguladores del ciclo de división celular son objeto de muchísimos estudios clínicos (utilización como marcadores indicativos para el tratamiento).

Estos resultados estimulan en gran medida los esfuerzos para obtener una comprensión detallada de los mecanismos reguladores del ciclo celular. Asimismo, conducen a la investigación, por cribado, de las moléculas inhibidores de quinasas ciclinas dependientes.

Se han descrito muchos inhibidores de quinasas, como la butirolactona, el flavopiridol y la 2(2-hidroxietilamino)-6-benzilamino-9-metilpurina, denominada olomucina. Los trabajos relativos a la olomucina han sido comunicados por Veseley y cols. en el artículo con referencia (1) en la lista de referencias bibliográficas que figura al final de la descripción.

Este inhibidor de cdc2, de gran eficacia (su IC₅₀ es de 7 μ M) es muy selectivo (se han ensayado más de 35 quinasas), responde a la siguiente fórmula:

(Ver Fórmula en página siguiente)



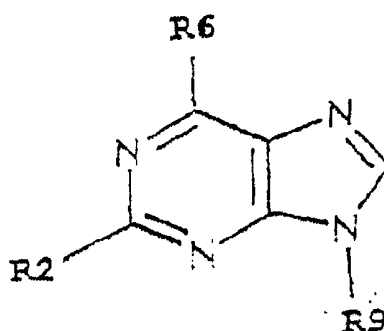
Los trabajos de los inventores en este campo les han llevado a elaborar nuevas moléculas particularmente interesantes, que inhiben cdc2 en pequeñas dosis, conservando al mismo tiempo la especificidad enzimática de la olomucina.

La invención tiene por tanto por objeto proporcionar nuevos derivados de purina que poseen en particular importantes propiedades anti-proliferativas.

La invención se refiere también a un procedimiento para la obtención de estos derivados por vía de síntesis, lo cual permite su preparación a escala industrial.

Asimismo, se refiere a su aplicación en terapéutica y también como herbicida.

Los derivados de purina de la invención se caracterizan porque responden a la fórmula 1



en la que

- R2 representa un radical hidroxipropilamino, 1 - hidroxil - 2 - butilamino, aminoetilamino, (R) - 2 - (hidroximetil) pirrolidin - 1 - ilo, 1 - fenil - 2hidroxietilamino o hidroxipentilamino,
- R6 representa un radical benzilamino opcionalmente sustituido por un halógeno, y
- R9 representa un radical isopropilo o cicloalquilo.

De manera ventajosa, R9 es el grupo isopropilo.

Los derivados de purina preferidos de la invención se eligen de entre los compuestos en los que R2, R6 y R9 son los indicados en la siguiente tabla

TABLA 1

	R2	R6	R9	IC ₅₀ μMcdc2/ciclina B
5	3-hidroxipropilamino	benzilamino	isopropilo	1
	2-hidroxipropilamino	benzilamino	isopropilo	0,9
10	1-hidroximetilpropilamino	benzilamino	isopropilo	0,65
	Aminoetilamino	benzilamino	isopropilo	1
15	2R-2-hidroximetilo-pirrolidina-1-ilo	benzilamino	isopropilo-(9H)	0,45
	(R)-amino-2-fenietanol	benzilamino	isopropilo-(9H)	1
20	(R, S)-amino-pentanol	benzilamino	isopropilo-(9H)	0 9
	(R)-amino-proanol	benzilamino	isopropilo-(9H)	0,85
25	(S)-amino-propanol	benzilamino	isopropilo-(9H)	1
	(R)-N-pirrolidina metanol	(3-yodo)benzilamino	isopropilo-(9H)	0,45 μM
30	(R)-N-pirrolidina metanol	benzilamino	Ciclopentil(9H)	0,7

Se prefieren en particular los siguientes derivados, a saber : la 2 - (R,S) - (6 - benzilamino - 9 - isopropil - 9H - purin - 2 - ilamino) - butan - 1 - ol, la (2R) - [2 - hidroxi - metil - pirrolidina - 1 - il] - 6 - benzilamino - 9 - isopropilo - (9H) - purina no cristalina, la 2 - (R) - [6 - benzilamino - 9 - isopropilo - (9H) - purina - 2 - il] - amino - 2 - fenietanol, la 2 - (R,S) - [6 - benzilamino - 9 - isopropilo - (9H) - purina - 2 - il] - amino - pentanol, la 2 - (R) - [6 - benzilamino - 9 - isopropilo - (9H) - purina - 2 - il] - amino - propanol, la 2 - (S) - [6 - benzilamino - 9 - isopropilo - (9H) - purina - 2 - il] - amino - propanol, la 2 - (R) - (-) - [6 - (3 - yodo) - benzilamino - 9 - isopropilo - (9H) - purina - 2 - il] - N - pirrolidina metanol y la 2 - (R) - (-) - [6 - benzilamino - 9 - ciclopentilo - (9H) - purina - 2 - il] - N - pirrolidina metanol.

La invención se refiere asimismo a los isómeros ópticos y a las mezclas racémicas de los derivados más arriba definidos, en particular al isómero R del (2 - [6 - benzilamino - 9 - isopropilo - (9H) - purina - 2 - il] - amino - 2 - fenietanol y del 2 - [6 - benzilamino - 9 - isopropilo - (9H) - purina - 2 - il] - amino - propanol.

Los derivados más arriba definidos se obtienen según los métodos clásicos de la síntesis orgánicos. Se utiliza un derivado de purina de partida cuyas sustituciones permiten introducir los grupos deseados.

Utilizando por ejemplo un derivado de purina 2-cloro, 6-benzilamino, es posible introducir un grupo alquilo en posición 9, por reacción con, por ejemplo, el halogenuro de alquilo correspondiente.

La reacción con un aminoalcohol permitirá después introducir, en la posición 2, un grupo alquilo-hidroxialquilamino en lugar del grupo cloro.

Según un aspecto de gran interés, los derivados de la invención poseen propiedades inhibitorias de quinasas de gran selectividad. Estos efectos inhibidores son reversibles.

Las cdk desempeñan una función central en el inicio, el desarrollo y la terminación de eventos del ciclo celular, las moléculas inhibitorias de cdk son susceptibles de limitar una proliferación celular no deseada como el cáncer, la psoriasis, el crecimiento de hongos, de parásitos (animales, protistas) pero también de plantas (herbicidas) y de intervenir en la regulación de enfermedades neurodegenerativas como la apoptosis neuronal y la enfermedad de Alzheimer.

ES 2 195 027 T3

Las quinasas más especialmente sensibles a los efectos inhibidores de estos derivados son las cdc2, las cdk2 y las cdk5.

Su inhibición se obtiene con dosis muy pequeñas de derivados de purina.

Asimismo, se observa que como más general una IC₅₀ frente a cdc2 inferior a 50 μ M, e incluso a la de la olomucina (7 μ M), se considera sin embargo un potente inhibidor.

La invención se refiere en particular a los derivados de purina que presentan una IC₅₀ no superior a 5 μ M y más especialmente la 2 - (1 - D,L - hidroximetilpropilamino -) - 6 - benzilamino - 9 - isopropilpurina, denominada también de aquí en adelante roscovitina, cuya IC₅₀ es de 0,65 μ M, la 6 - benzilamino - 2 - [(2R) - 2 - hidroximetil - pirrolidina - 1 - il] - 9 - isopropilo - (9H) - purina no cristalina, el 2 - (R) - (-) - [6 - (3 - yodo) - benzilamino - 9 - isopropilo - (9H) - purina - 2 - il] - N - pirrolidina metanol.

Por otro lado, este derivado, que constituye un inhibidor de gran eficacia y de gran selectividad frente a los cdk, cdc2, cdk2 y cdk5 tiene, de manera inesperada, efectos sobre las quinasas erk 1 y erk 2 similares a los de la olomucina. La selectividad es por tanto claramente superior frente a las quinasas ciclinas dependientes. Esta ventaja, que encontramos en los otros derivados de purina de la invención, permite eliminar las interferencias con las vías de transducción de señales que son anteriores que implican a las quinasas erk 1 y erk 2 en numerosas respuestas celulares distintas de la división celular.

Asimismo, la invención se refiere a los complejos de los derivados de purina con las cdk y, muy especialmente, a la forma cristalizada del complejo de cdk2 y de roscovitina.

Los estudios realizados con los derivados de la invención han demostrado tener, además de sus propiedades inhibidoras específicas de quinasas, efectos celulares y sobre la apoptosis de gran interés.

Así, en una concentración muy baja (micromolar para la roscovitina y buen número de otros derivados), son capaces de inhibir la transición profase/metafase, según lo demostrado por las experiencias realizadas sobre los ovocitos de estrellas de mar y los embriones de erizos, y que están referidos en los ejemplos.

Sobre los extractos acelulares del sapo africano, son capaces de inhibir a la vez el factor promotor de la fase M y la síntesis de ADN.

De manera ventajosa, estos efectos celulares se obtienen en concentraciones muy bajas de derivados.

Se sabe que se han realizado varios estudios sobre las relaciones existentes entre el ciclo celular y la apoptosis. Varias vías conducen células a la apoptosis, algunas de las cuales son dependientes de quinasas y otras, por el contrario, no parecen necesitar estas enzimas. Se ha demostrado que la apoptosis puede ser inducida en la etapa G1 ó G2 y como consecuencia de daños en el ADN, ciertas células se detienen en la etapa G1 y entonces se induce una vía apoptótica dependiente de p53.

En otras situaciones, parece que las células se detienen en la fase G2/M, en respuesta a los daños causados al ADN y se observa la activación de una vía apoptótica p53 independiente.

Esta vía resulta ser particularmente importante para la terapia de tumores en los que se observa una pérdida activa de p53.

Por tanto, se mide el interés de disponer, con los derivados de la invención, de medios para estimular una apoptosis p53 independiente en las células detenidas en la etapa G2 por daño en el ADN con la ayuda de agentes como la mitoxantrona o el cisplatino.

Los inhibidores de cdc2 de la invención pueden así aumentar los efectos terapéuticos de los agentes anti-tumorales normalmente utilizados.

Como inhibidores de cdk5, los derivados de la invención también pueden desempeñar igualmente un papel para reducir la hiperfosforilación anormal de tau detectada durante la enfermedad de Alzheimer.

A estas diferentes propiedades ventajosas, se añade el interés de una ausencia de cito-toxicidad de los derivados de la invención.

La invención por tanto se refiere al aprovechamiento de las propiedades de estos derivados en particular de sus propiedades antimitóticas y anti-neurodegenerativas, para la elaboración de composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se caracterizan por que encierran una cantidad eficaz de al menos un derivado de purina según lo arriba definido, en asociación con un vehículo farmacéutico inerte.

Las composiciones de la invención son particularmente apropiadas como medicamentos antimitóticos, en particular para la quimioterapia de los cánceres, o incluso para el tratamiento de la psoriasis, de parasitosis como las debidas a las protistas o a los hongos, o de la enfermedad de Alzheimer, o de la apoptosis neuronal.

Estas composiciones contienen en este caso los principios activos de otros medicamentos. Se citarán principalmente su asociación con medicamentos antimitóticos, como aquellos a base de taxol, cis-platino, los agentes que intercalan el ADN y otros.

Las presentaciones con vistas a la venta, en particular al etiquetado y las instrucciones de uso, y ventajosamente, a su envase, se elaboran en función de la aplicación terapéutica prevista.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son administrables en diferentes formas, más especialmente por vía oral o inyectable.

Para la administración por vía oral, se recurre en particular a los comprimidos, las cápsulas, las pastillas, las cápsulas de gelatina y a las gotas. Estas composiciones contienen ventajosamente de 1 a 100 mg de principio activo por unidad de toma, preferentemente de 10 a 40 mg.

Otras formas de administración comprenden soluciones inyectables por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular, elaboradas a partir de soluciones estériles o esterilizables. Igualmente, puede tratarse de suspensiones o de emulsiones.

Estas formas inyectables contienen por unidad de toma de 1 a 50 mg de principio activo, preferentemente de 10 a 30 mg.

A título indicativo, la posología utilizable en el hombre corresponde a las siguientes dosis: así por ejemplo, se administra al paciente en una o varias tomas de 10 a 50 mg/día para el tratamiento de tumores, o para tratar la psoriasis o la parasitosis.

La invención también se refiere a composiciones herbicidas que comprenden al menos un derivado de purina según lo arriba definido, eventualmente asociado a otros agentes fitofarmacéuticos.

La invención también se refiere a los reactivos biológicos cuyos principios activos están constituidos por los derivados de purina más arriba definidos.

Estos reactivos pueden utilizarse como referencias o patrones en los estudios sobre la división celular.

Otras características y ventajas de la invención se refieren en los ejemplos que siguen y se muestran en las figuras 1 a 8 en las cuales:

- la figura 1, representa los resultados de cinéticas en condiciones lineales a partir de ensayos relativos a la actividad de la p34^{cdc2}/ciclina B a diferentes concentraciones de roscovitina,
- la figura 2, el porcentaje de ruptura de vesícula germinal de ovocitos de estrella de mar en función de la concentración de roscovitina,
- la figura 3, los efectos de la roscovitina sobre la maduración de ovocitos de estrellas de mar,

- la figura 4, los efectos de la roscovitina sobre el ciclo mitótico de embriones de erizos,
- la figura 5, estos embriones detenidos en la etapa profase tardía, y
- la figura 6, los efectos de la roscovitina sobre la síntesis de ADN *in vitro* y la actividad MPF,
- la figura 7, representa los efectos de la roscovitina sobre la inhibición del crecimiento de células L 1210 y la detención de su ciclo celular en G2/M, en la figura 7A se representa el crecimiento de células L1210 después de dos días de exposición a diversas concentraciones de roscovitina (media \pm desviación estándar relativa al crecimiento de célula testigo no tratada), en la figura 7B se representan las medias (\pm desviación estándar) de la distribución del ciclo de las células que ya han sido cultivadas durante 48 horas en presencia o en ausencia de roscovitina 60 μ M,
- la figura 8, representa el efecto de inhibición de la roscovitina sobre la fosforilación *in vivo* de vimentina a nivel de lugares específicos en cdc2.

Material y métodos

Productos químicos

Ortovanadato de sodio, 1-metiladenina (1 MeAde), EGTA, EDTA, MOPS, β -glicerofosfato, ditioneitol (DTT), fluoruro de sodio, nitrofenilfosfato, leupeptina, aprotinina, inhibidor de tripsina de soja, benzamidina, historia H1 (tipo III-S), proteína básica de mielina, caseína, protamina sulfato, isopropil β -D-tiogalactopiranosida (IPTG), Sefarosa 4B activado por CNBr, medio LB, glutatona y bolitas de glutatona-Sefarosa. Ortovanadato de sodio, todos estos productos son como los comercializados por Sigma Chemicals.

Los análogos de purina se disuelven generalmente de manera que se dispongan de soluciones de existencias de 100 mM en el DIVISO. La concentración final de DIVISO en la mezcla de reacción es inferior al 1 % (v/v).

El (γ - 32 P]-ATP es un producto de Amersham.

La proteína GST-Retinoblastoma se expresa en las bacterias y se purifica en las bolitas de glutatona-Sefarosa según lo antes descrito en (1) y(2).

Tampones

Tampón de homogeneización:

60 mM de β -glicerofosfato, 15 mM de p-nitrofenil-fosfato, 25 mM de MOPS (pH 7,2), 15 mM de EGTA, 15 mM de $MgCl_2$, 1 mM de DTT, 1 mM de vanadato de sodio, 1 mM de NaF, 1 mM de fenilfosfato, 10 μ g de leupeptina/ml, 10 μ g de aprotinina/ml, 10 μ g de inhibidor de tripsina de soja ml y 100 μ M de benzamidina.

Tampón C: composición del tampón de homogeneización, pero con 5 mM de EGTA, sin NaF y sin inhibidores de proteasa.

Preparaciones de los extractos de ovocitos de estrella de mar en fase M

Para obtener las preparaciones de extractos de ovocitos a gran escala, se obtienen las gónadas de *Marthasterias glacialis* maduras y se incuban con 10 μ M de 1-MeAde en agua de mar natural filtrada por filtro Millipore hasta la oviposición. Los ovocitos se encuentran entonces en fase M. Se les separa del medio de incubación por centrifugación, se les congela directamente en nitrógeno líquido y se mantienen a -80°C (ver (1) y (3)).

Los ovocitos en fase M se homogeneizan en el tampón de homogeneización a razón de 2 ml/g de ovocitos.

ES 2 195 027 T3

Tras la centrifugación durante 45 minutos a 100000 g, el líquido sobrenadante se recupera y directamente se utiliza para la purificación por cromatografía de afinidad de la quinasa p34^{cdc2}/ciclina B sobre las bolitas de p9^{CKShs1}-Sefarosa (ver (1) y (4)).

5 *Enzimas*

Las actividades de las quinasas se determinan a 30°C en el tampón C, a menos que se indique lo contrario. Los valores de los blancos se restan de los datos y las actividades se calculan en pmoles de fosfato incorporado en el aceptador de proteína para una incubación de 10 minutos.

10

Los testigos se utilizan con las disoluciones apropiadas de DMSO.

La fosforilación del sustrato se determina, en este caso, por autoradiografía tras SDS-PAGE. Se purifica la p34^{cdc2}/ciclina B a partir de los ovocitos de la fase M de las estrellas de mar por cromatografía de afinidad sobre las bolitas de p9^{CKShs1}-Sefarosa y a partir de ahí se efluyen con ayuda de p9^{CKShs1} como se describe más arriba (ver (2), (3) y (5)).

15

Para la determinación, se utiliza 1 mg de histona H1 (Sigma tipo III-S)/ml, en presencia de 15 μ M de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (3,000 Ci/mmol, 1 mCi/ml) en un volumen final de 30 μ l (ver (1) y (6))

20

Después de un tiempo de incubación de 10 minutos a 30°C, se deposita la parte alícuota de 25 μ l de líquido sobrenadante en papel de fosfo celulosa Whatman P81 y, después de 20 segundos, se lavan los filtros 5 veces (durante al menos 5 minutos cada vez) en una solución de 10 ml de ácido fosfórico por litro de agua.

25

Los filtros húmedos son transferidos en ampollas de centelleo de plástico de 6 ml, más tarde se añaden 5 ml de fluido de centelleo ACS (Amersham) y se mide la radioactividad en un contador Packard.

La actividad quinasa se expresa en pmoles de fosfato incorporado en la histona H1 durante 10 minutos de incubación o en porcentaje de actividad máxima.

30

Para realizar las experiencias de cinética en condiciones lineales, se utiliza, como se describe arriba, el sistema de ensayos hasta el punto final para la quinasa p34^{cdc2} pero, sobre la base de ensayos preliminares, se utilizan concentraciones apropiadas no saturantes, en sustrato.

35

La quinasa p34^{cdc2}/ciclina B se añade de forma que se obtenga una actividad lineal con relación a la concentración en enzima y al tiempo.

En la mayoría de los casos, esto necesita una disolución enzimática de 3 a 10 veces en el tampón C.

40

Los datos de velocidad se expresan en pmoles incorporados en el sustrato por segundo, por cantidad de enzima añadida. Las constantes de inhibición aparentes se determinan por análisis gráfico. Las p33^{cdk2}/ciclina A y p33^{cdk2}/ciclina E se reconstituyen a partir de extractos de células de insectos sf9 infectadas por diferentes baculovirus.

45

Las ciclinas A y E son proteínas de fusión de GST-ciclinas y los complejos se purifican sobre bolitas de glutatión-Sefarosa.

Las actividades quinasas se determinan con 1 mg/ml de histona H1 (Sigma, tipo IIIS), en presencia de 15 μ M de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, durante 10 minutos, en un volumen final de 30 μ l, como lo descrito para la quinasa p34^{cdc2}/ciclina B.

50

La p33^{cdk5}/p25 se purifica a partir de cerebro bovino (7), pero no se utiliza la etapa de cromatografía Mono S.

55

Las fracciones activas recuperadas a partir de la columna de Superosa 12 se reúnen y concentran hasta obtener una concentración final de aproximadamente 25 μ g de enzima/ml.

60

ES 2 195 027 T3

La determinación de la quinasa se efectúa con 1 mg/mi de histona H1 (Sigma, tipo IIIS), en presencia de 15 μ M de [γ - 32 P] ATP, durante 10 minutos en un volumen final de 30 μ l, como se describe para la p34^{cdc2}/ciclina B.

5 La p33^{cdk4}/ciclina D1, se obtiene a partir de lisados de células de insectos. Cdk4 es un producto de construcción GST-cdk4 y el complejo activo se purifica sobre bolitas de glutatona-Sefarosa.

Su actividad quinasa se determina con una proteína purificada GSTretinoblastoma en presencia de 15 μ M de [γ - 32 P] ATP, en un volumen final de 30 μ l.

10

Después de 15 minutos de incubación se añade tampón de Laemmli (2 x 30 μ l).

El sustrato fosforilado se disuelve mediante SDS-PAGE al 10 % y se analiza por autoradiografía por exposición durante aproximadamente 14 horas en MP Hiperfilm y densitometría.

15

La p33^{cdk6}/ciclina D2 se obtiene a partir de lisados de células de insectos (8). Para los ensayos, se opera como se ha indicado más arriba para la proteína p33^{cdk4}/ciclina D1.

20

Las *quinasas MAP*: Las GST-erk1 (9), clonada a partir de un banco humano HepG2, se expresa en las bacterias, se purifica sobre bolitas de glutatona-Sefarosa y se testa con 1 mg de proteína básica de mielina por mi en presencia de 15 μ M de [γ - 32 P] ATP según lo antes descrito para la quinasa p34^{cdc2}/ciclina B.

25

Las proteínas erk1 y erk2 marcadas con la ayuda de la histona, se activan *in vitro* por MAPKK, se purifican (afinidad-Ni y Mono Q) y se ensayan como se ha descrito más arriba durante 10 minutos, en un volumen final de 30 μ l.

30

La sub-unidad catalítica de la quinasa cAMP-dependiente purificada a partir de corazón de bovino se testa con 1 mg de histona H1 por ml, en presencia de 15 μ M de [γ - 32 P] ATP, como se describe más arriba para la p34^{cdc2}/ciclina B.

35

La quinasa cGMP-dependiente (10), purificada hasta la homogeneidad a partir de músculo liso de traquea de origen bovino, se ensaya con 1 mg de histona H1 por mi, en presencia de 15 μ M de [γ - 32 P] ATP, como se describe más arriba para la p34^{cdc2}/ciclina B.

40

La caseína quinasa 2 se aísla de citosol de hígado de rata (11) y se ensaya con 1 mg de caseína por ml y 15 μ M de [γ - 32 P] ATP. El sustrato se deposita sobre filtros Whatman 3MM y se lava con 10 % de TCA (WN).

45

La quinasa de la cadena ligera de miosina se purifica a partir de molleja de pollo (12) se ensaya en presencia de 100 nM de calmodulina, 100 μ M de CaCl₂, 50mM de HEPES, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT y 0,1 mg de BSA/ml con pH 7,5, utilizando un péptido de síntesis a base del sitio de fosforilación de la cadena ligera de miosina de músculo liso (KKRPQRATSNVFAM, 50 μ M) y en presencia de 15 μ M de [γ - 32 P] ATP, en un volumen final de 50 μ l.

50

La incorporación de fosfato radioactivo se controla por filtros de fosfocelulosa según lo anteriormente descrito. La ASK- γ , homóloga en la planta de GSK-3, se expresa como proteína de fusión GST en *E. coli* (13) y se purifica sobre glutatona-Sefarosa. La actividad de la quinasa ASK-*gamma* se determina, durante 10 minutos a 30°C, con 5 pgm, de proteína básica de mielina, en presencia de 15 μ M de [γ - 32 P] ATP, en un volumen final de 30 μ l. La proteína básica de mielina fosforilada se recupera sobre papel de fosfocelulosa Whatman P81 como se describe más arriba para la p34^{cdc2}/ciclina B.

55

El ámbito tirosino kinásico del receptor de insulina (14) se sobreexpresa en un sistema de baculovirus y se purifica hasta la homogeneidad. Su actividad quinasa se determina durante 10 minutos a 30°C con 5 μ g de Raytide (Oncogene Sciences), en presencia de 15 μ M de [γ - 32 P] ATP, en un volumen final de 30 μ l. El producto Raytide fosforilado se recupera sobre papel de fosfocelulosa Whatman P81 como se describe más arriba para la p34^{cdc2}/ciclina B.

60

Ejemplo 1

Síntesis de la roscovitina

5 La síntesis se efectúa en 3 etapas y comporta la preparación 1) en primer lugar de la 6 - benzilamino - 2 - cloropurina, después 2) de la 6 - benzilamino - 2 - cloro - 9 - isopropilpurina, y 3) de la 6 - benzilamino - 2 - R - (1 - etil, 2 - hidroxietilamino) - 9 - isopropilpurina.

1) *Síntesis de la 6 - benzilamino - 2 - cloropurina:*

10

Se opera como describe Hocart en *Phytochemistry* 1991, 30, 2477-2486.

2) *Síntesis de la 6 - benzilamino - 2 - cloro - 9 - isopropilpurina (1)*

15

Se somete a agitación a temperatura ambiente, durante tres días, una mezcla de 6-benzilamino-2-cloropurina (3,7 g; 14,2 mmol), de carbonato de potasio (IIg; 80/mmol) y de bromuro de isopropilo (8,2 ml; 87 mmol) en 100 ml de DIVISO absoluto. Por cromatografía de capa fina [CHCl_3 -MeOH (98:2)], se constata la ausencia de 6-benzilamino-2-cloropurina. Se elimina por destilación en vacío por debajo de 50°C el DIVISO y el exceso de bromuro de isopropilo. El residuo se reparte entre el agua y el acetato de etilo. La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 y se evapora al vacío.

20

Por cristalización en MeOH, se obtienen 3,51 g (82 %) de producto; P.F. 181-182°C; UV (MeOH): λ_{max} 273,5; IR (Nicolet 205, KBr, DRIFT cm^{-1} 1713, 1626, 1572, 1537, 1497, 1471, 1456, 1425, 1398, 1355, 1314, 1292, 1255, 1228, 1202.

25

3) *Síntesis de la 6 - benzilamino - 2 - R - (1 - etil - 2 - hidroxietilamino) - 9 - isopropil - purina (II):*

Se calienta en un horno a 160-165°C, durante 3 h 30, una ampolla sellada en la que se ha hecho el vacío, con 2,7 g (8,95 mmol) de I y 17 ml (0,18 mole) de R(-)-2-amino-1-butanol (Fluka 90 %, R:S>9:1). Se evapora el exceso de amina a una temperatura inferior a 50°C, y se purifica el producto en una columna de cromatografía utilizando cantidades crecientes de MeOH en CHCl_3 , a saber 0, después 2, y 3 %.

30

Por cristalización en acetato de etilo, se obtienen 2,2 g de II (69 %); P. F. 132-134°C, $[\alpha] = +35,1$ (c = 0,29, CHCl_3). Espectrografía de masa [Finnigam MAT 90, BE geometría 70 eV, temperatura de la fuente 250°C, corriente de emisión 1 mA, voltaje de aceleración 5 keV, entrada directa, temperatura DIP entre 190-220°C. El HRMS se ha efectuado por el método de superposición de picos utilizando Ultramark 1600 F (PCR Inc.; FL; EEUU) como estándar] 354.2167 (M+, $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}$ calc. 354.2168, 27 %), 325 (7 %), 324 (29 %), 232 (100 %), 295 (3 %), 282 (7 %), 281 (3 %), 217 (6 %), 185 (5 %) 134 (3 %), 91 (34 %). FTIR (Nicolet 205; KBr, DRIFT, cm^{-1}): 1622, 1610, 1547, 1540, 1452, 1389, 1370, 1261, 1068.

40

Ejemplo 2

Estudio de las propiedades inhibitorias de quinasas de la roscovitina y de sus efectos sobre el ciclo celular.

45 a) *estudio de las propiedades inhibitorias de quinasas.*

Las actividades de las enzimas incluidas en la siguiente tabla se han medido tras añadir roscovitina u olomucina, según las concentraciones crecientes. Estas actividades se han medido con sustratos apropiados (histona H1, proteína básica de mielina, caseína, etc.) con 15 μM de ATP.

50

Las IC_{50} se han calculado a partir de las curvas dosis-respuesta obtenidas. La indicación (-) significa que no se ha observado ningún efecto inhibitor. La concentración más elevada ensayada figura entre paréntesis.

55

60

TABLA 2

Enzima	IC ₅₀ (μ M) Roscovitina	Olomucina
cdc2/ciclina B	0,65	7
cdk2/ciclina A	0,7	7
cdk2/ciclina E	0 7	7
cdk4/ciclina D1	> 1000	> 1000
cdk5/p35	0,16	3
cdk6/ciclina D3	> 500	> 250
GST-erk1	30	30
erk1	34	50
erk2	14	40
PK cAMP-dependiente	> 1000	> 2000
PK cGMP-dependiente	- 1000	> 2000
Quinasa de la cadena ligera de miosina	90	> 1000
Caseína quinasa 2	-(1000)	> 2000
ASK- γ (planta GSK-3)	220	130
insulina-receptor tirosina quinasa	70	400
c-src	250	-
v-abl	> 1000	-

El examen de estos resultados muestra que la roscovitina presenta una actividad 10 veces más elevada que la olomucina frente a las huéspedes cdc2 y cdk2 y 20 veces más elevada frente a cdk5.

Comparativamente, su efecto parece limitado, según lo observado con la olomucina sobre las quinasas cdk4/ciclina D1et cdk6/ciclina D2 (las IC₅₀ son superiores a 100 μ M). Esta ausencia de efecto ha sido confirmada con cdk4 procedente de diferentes fuentes. Operando en condiciones idénticas, la GST p16^{INK4A} inhibe a la cdk4/ciclina D1

• *especificidad del efecto inhibidor*

Como se puede constatar, la mayor parte de las quinasas son inhibidas de forma débil o nula.

A pesar de que la roscovitina presenta una eficacia al menos 10 veces superior a la de la olomucina frente a sus huéspedes cdk, su efecto inhibidor es muy similar al de la olomucina frente a la erk1 y erk2. También resulta necesaria una concentración 40 veces más elevada de roscovitina para inhibir erk1 (20 veces para erk 2) de manera similar a la inhibición de cdc2.

• b) *Efectos sobre el ATP*

Para estudiar el mecanismo de acción de la roscovitina, se han realizado experiencias de cinética en presencia de concentraciones crecientes de roscovitina, con variación de los niveles del ATP (de 0,1 a 0,5 mM), la concentración en histona H1 se mantiene constante a 0,7 mg/ml.

Los resultados aparecen referidos en la figura 1.

Estos resultados muestran que la roscovitina actúa como inhibidor competitivo para el ATP. Teniendo en cuenta la linealidad de las pendientes en función de las concentraciones de roscovitina, se la ha calificado como inhibidor lineal. La constante de inhibición aparente K_i es de 1,2 μ M.

El análisis de la estructura del co-cristal de roscovitina y de cdk2 confirma que la roscovitina se une, como la olomucina, en la zona de enlace con el ATP y que su ciclo de purina está orientado, como el de la olomucina, a saber, de manera totalmente diferente del ciclo purina de la ATP.

• c) *Estudio del efecto sobre la síntesis de ADN y la actividad MPF.*

Se incluyen los resultados de los experiencias realizadas sobre numerosos tipos celulares.

• *Efecto sobre la maduración de ovocitos de estrella de mar y sobre la defosforilación de la tirosina de p34^{cdc2} in vivo.*

Los ovocitos de estrellas de mar, detenidos en la profase, se tratan, durante 15 minutos, con concentraciones crecientes de roscovitina antes de añadir la hormona 1-MeAde (1 μ M). Transcurridos 30 minutos, se anota el % de ruptura de vesícula germinal (GVBD). Estos valores aparecen relacionados en la figura 2 en función de la concentración en roscovitina (en μ M). La roscovitina inhibe la ruptura de la envoltura nuclear con una IC_{50} de 5 μ M (la IC_{50} de la olomucina, operando en las mismas condiciones, es de 30 μ M). Estos resultados se muestran en la figura 2.

Como ya se ha observado con la olomucina, la roscovitina disminuye, pero no inhibe, la defosforilación de la tirosina de p34^{cdc2} *in vivo*. Se tratan los ovocitos con 10 μ M de roscovitina durante 15 minutos antes de añadir 1 μ M de 1-MeAde al tiempo 0. Los extractos se preparan en diferentes tiempos y se cargan sobre una columna de bolitas de p9^{ckshs1}-Sefarosa.

Las proteínas que están unidas a las bolitas se disuelven mediante SDS-PAGE antes de efectuar un Western blot con los anticuerpos anti-PSTAIRE. La figura 3 presenta una foto del Western blot. Las formas fosforiladas de p34^{cdc2} aparecen en la parte superior y las formas fosforiladas en la parte inferior.

Así pues, la roscovitina no inhibe la activación de cdc2, sino su actividad. La defosforilación de la tirosina de p34^{cdc2} se cataliza mediante cdc25 y precede normalmente a la activación de la quinasa cdc2 en la transición G2/M. Aún más, la quinasa cdc2 fosforila y sobre-activa la fosfatasa de cdc25. La roscovitina ha podido provocar por tanto una interrupción en el nivel cdc2 quinasa, que entraña una disminución de la defosforilación.

• *efectos sobre el ciclo mitótico de embriones de erizos.*

Se añade roscovitina 60 minutos después de la fertilización. 120 minutos después de la fertilización se toma el porcentaje de embriones divididos. Los resultados se muestran en la figura 4.

Se constata que ésta provoca una parada en el estado profase tardía, que es dosis-dependiente.

La IC_{50} es de 10 μ M. (Incluso a 100 μ M, la olomucina sólo provoca una ralentización de la transición profase/metafase, pero no detiene a las células en profase).

Se observa un gran núcleo en los huevos así detenidos por la roscovitina como se muestra en la figura 5.

Esta detención resulta totalmente reversible. En efecto, tras varios lavados con agua de mar, los huevos entran de nuevo en los ciclos mitóticos y se desarrollan en larvas pluteus normales. Estos resultados se obtienen incluso a concentraciones elevadas de roscovitina de 100 μ M.

- *Efectos sobre la síntesis del ADN in vitro y sobre la actividad MPF en los extractos de huevos de sapo africano*

Los ensayos se realizan según (15), operando tal y como se describe en (1) para la olomucina.

Se incuban extractos de sapo africano detenidos en la fase metafase con roscovitina y con cromatina de esperma.

Con concentraciones de roscovitina entre 0 y 5 μM , los cromosomas se mantienen fuertemente condensados y no hay ninguna envoltura nuclear visible. Con una concentración de 10 μM , y por encima, aparecen núcleos de interfase con la cromatina parcialmente descondensada y una envoltura nuclear intacta, que muestra que ha sido inhibida la actividad MPF (la IC_{50} es de 5 μM).

Se ha estudiado igualmente la síntesis del ADN operando tal y como se describe en (1) para la olomucina.

Se ha añadido también a un extracto de huevos, detenidos en la fase metafase, roscovitina y cromatina de esperma.

El extracto se ha abandonado a continuación en la fase interfase mediante la adición de CaCl_2 (15) y (16). La síntesis del ADN total se ha medido 3 h más tarde mediante incorporación de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ en el material precipitable mediante el TCA.

Como muestra la figura 6, la replicación es inhibida por la roscovitina con una IC_{50} de 15 μM .

La invención ofrece pues nuevas purinas dotadas de propiedades inhibitoras de cdc2/ciclina B de especificidad elevada.

Ejemplo 3

Propiedades bioquímicas y efectos de la roscovitina en las células de mamíferos

Método

Cribado in vitro de células tumorales humanas

Sesenta alineaciones celulares de tumores humanos que comprenden nueve tipos de tumores se han cultivado durante 24 horas antes de ser sometidas a una exposición continua de 48 horas a 0,01-100 μM de roscovitina. Para estimar la citotoxicidad, se ha utilizado un ensayo de proteína sulfurhodaminina B.

Cultivo de célula L1210

Con la ayuda de un hemocitómetro, se han contado las células L1210 tomadas de cultivos en crecimiento exponencial en medio RPMI-1640 suplementado con suero de ternera fetal al 10 %, con penicilina y con estreptomycin, han sido elevadas a una tasa de 5×10^4 células por mililitro en placas de cultivos tisulares de 96 pocillos en presencia o en ausencia de diversas concentraciones de roscovitina o de olomucina, y se han incubado a continuación a 37°C bajo CO_2 al 5 %. Para invertir el efecto roscovitina, las células L1210 cultivadas durante dos días en presencia o en ausencia de roscovitina se han lavado con PBS para eliminar cualquier traza de producto activo, se han contado y se han recolocado en un medio fresco que no contiene ningún producto activo (roscovitina u olomucina). El crecimiento celular se ha medido diariamente utilizando el ensayo con tetrazolio en microcultivo. El análisis del ciclo celular se ha realizado sobre células fijadas en etanol, tratadas con RNase 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y coloreadas con yoduro de propidio. La adquisición de datos se ha realizado con la ayuda de un citómetro de flujo Coulter (Hialeah, FL, EEUU) EPICS Elite (marca registrada) y el análisis de estos datos se realizó con la ayuda de un programa informático Multicycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, EEUU) (marca registrada). Todos los ensayos se repitieron tres veces y todas las experiencias se repitieron al menos dos veces.

Fosforilación in vivo de vimentina

Para estudiar la fosforilación *in vivo* de la vimentina por la quinasa cdc2, las células han sido tratadas o no tratadas con roscovitina 60 μM durante 48 horas antes de una exposición de la colcemida 10 ng/ml durante dos horas más. Los extractos celulares se han colocado a continuación para migración sobre un

gel SDS-PAGE 10 %, se han transferido por Western blots y se han incubado con anticuerpos 4A4. Estos anticuerpos reaccionan de forma cruzada con la vimentina fosforilada por cdc2, pero no reaccionan ni con la vimentina fosforilada por otras quinasas (proteína quinasa cAMP dependiente, proteína quinasa C, proteína quinasa Ca^{2+} calmodulina-dependiente) ni con la vimentina no fosforilada: los anticuerpos 4A4 reconocen específicamente la vimentina que está fosforilada al nivel de su residuo Ser-55 por la quinasa cdc2 en el momento de entrada en mitosis de la célula.

Resultados

La roscovitina (0,01-100 μM exposición durante 48 horas) ha sido probada en 60 alineaciones celulares humanas tumorales que comprenden nueve tipos de tumores (leucemia, cáncer de células no pequeñas de pulmón, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer de riñón, cáncer de próstata y cáncer de mama). Todas las alineaciones celulares han presentado una sensibilidad equivalente a la roscovitina. El valor medio IC_{50} es de 16 μM (mientras que en el caso de la olomucina es de 60,3 μM). No se ha observado ninguna correlación entre la sensibilidad de las alineaciones celulares a la roscovitina y la presencia de p53 salvaje o mutado. El método de análisis Compare ha mostrado que los efectos de la roscovitina y del flavopiridol son comparables.

En cuanto a los efectos de la roscovitina en el crecimiento de la alineación celular L1210, se observa una inhibición dosis dependiente muy clara del crecimiento, como muestra la figura 7A.

En la figura 7A se representa el crecimiento celular en función de la concentración de roscovitina o de olomucina.

Las curvas son sensiblemente idénticas tras dos o tres días de cultivo, como se ha observado con las células tumorales mencionadas más arriba.

La roscovitina es aproximadamente cuatro veces más eficaz que la olomucina a la hora de inhibir el crecimiento celular (IC_{50} de 40 μM para la roscovitina y 160 μM para la olomucina).

Aunque la mayor parte de las células son viables ($96 \pm 2\%$ por exclusión al azul Tripano) tras un tratamiento de 48 horas con roscovitina 60 μM , se mantienen irreversiblemente detenidas, incluso después de lavados extensivos.

Las células expuestas a 120 μM de roscovitina mueren rápidamente.

Los efectos de la roscovitina sobre la distribución del ciclo celular se han estudiado a continuación mediante citometría de flujo.

Con 60 μM de roscovitina, las células permanecen detenidas en G1 y se acumulan en G2 como muestra la figura 7B donde están representadas las proporciones (%) de cada fase del ciclo celular observado (G1, S, G2/M) en presencia o en ausencia de roscovitina.

Con el propósito de identificar el objetivo molecular *in vivo* de la roscovitina, se han utilizado anticuerpos 4A4. Los resultados ilustran en la Figura 8 donde están representadas las proteínas totales extraídas de las células tratadas (+) o no tratadas (-) con roscovitina y después disueltas en SDS-PAGE antes de la transferencia Western con los anticuerpos 4A4. Las células no tratadas se paran en metafase y acumulan vimentina fosforilada por cdc2. Por el contrario, las células tratadas con roscovitina no presentan vimentina fosforilada por cdc2, lo que muestra que la cdc2 ha sido de hecho inhibida *in vivo* y que las células han sido detenidas antes de la metafase.

La roscovitina contribuye igualmente a reducir la hiperfosforilación de tau observada durante la enfermedad de Alzheimer: una cdk específica del cerebro (cdk5/p35) que fosforila determinados lugares de tau es especialmente sensible a la roscovitina.

Referencias Bibliográficas

- 1- Vesely y cols. ((1994) Eur. J. Biochem. 224, 771-786.11.
- 2- Azzi y cols. (1994) J. Biol. Chem. 269, 13279-13288.
- 3- Baratte y cols. (1992) Anticancer Res. 12; 873-880.

ES 2 195 027 T3

- 4- Azzi y cols. (1992) Eur. J. Biochem. 203, 353-360.
- 5- Richardson y cols. (1990) Genes and Deveipments 4, 1332-1344.
- 5 6- Meijer y cols. (1991) EMBO J 10; 1545-1554.
- 7- Lew y cols. (1992) J. Biol. Chem. 267, 13383-13390
- 10 8- Meyerson y cols. (1994) Molecul. Cellul. Biol. 14, 2077-2086.
- 9- Charest y cols. (1993) Molecul Cellul Biol. 13, 4679-4690.
- 10- Landgraf y cols. (1989) Eur. J. Biochem. 181, 643-650.
- 15 11- Pinna, L. A (1990) Biochim. Biophys. Acta 1054, 267-284.
- 12- Craig y cols. (1987) J. Biol. Chem. 262, 3278-3284.
- 20 13- Bianchi y cols. (1994) Mol. Gen. Genet 242, 337-345
- 14- Kallen y cols. (1990) Biochem. Biophys. Res. Comm. 168, 616-624.
- 15- Blow y cols. (1986), Cell 47, 577-587.
- 25 16- Blow (1993) J. Cell-Biol. 122, 993-1002

30

35

40

45

50

55

60

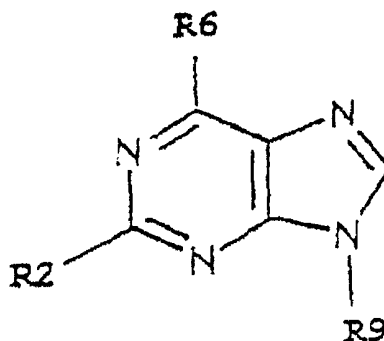
REIVINDICACIONES

1. Derivados de purina biológicamente activos, **caracterizados** porque responden a la fórmula:

5

10

15



20 en la que

- R2 representa un radical hidroxipepilamino, 1 - hidroxí - 2 - butilamino, aminoetilamino, (R) - 2 - (hidroximetil)pirrolidin - 1 - ilo, 1 - fenil - 2 - hidroxietilamino o hidroxipentilamino,
- R6 representa un radical benzilamino opcionalmente sustituido por un halógeno, y
- R9 representa un radical isopropilo o cicloalquilo.

2. Los isómeros ópticos y las mezclas racémicas de los derivados según la reivindicación 1.

30

3. El [(R) - 1 - (6 - benzilamino - 9 - ciclopentil - 9H - purin - 2 - il)pirrolidin - 2il] metanol según la reivindicación 1 ó 2.

4. El 2 - (R,S) - (6 - benzilamino - 9 - isopropil - 9H - purin - 2 - ilamino) - butan - 1 - ol según la

35

5. El 2 - (R) - (6 - benzilamino - 9 - isopropil - 9H - purin - 2 - ilamino) - butan - 1 - ol según la reivindicación 1 ó 2.

6. Composiciones farmacéuticas, **caracterizadas** porque comprenden una cantidad eficaz de al menos un derivado de purina según una de las reivindicaciones 1 a 5, en asociación con un vehículo farmacéutico.

40

7. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 6, **caracterizadas** porque se pueden administrar por vía oral o inyectable.

45

8. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 6, **caracterizadas** porque se trata de tabletas, comprimidos, cápsulas, píldoras y porque contienen de 1 a 100 mg de principio activo por unidad de toma, con preferencia de 10 a 40 mg,

9. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 6, **caracterizadas** porque se trata de soluciones inyectables, solución que contiene dichas soluciones ventajosamente de 1 a 50 mg de principio activo por unidad de toma, con preferencia de 10 a 30 mg.

50

10. Composiciones farmacéuticas según una de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizadas** porque se utilizan como medicamentos antimitóticos.

55

11. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 10, **caracterizadas** porque se utilizan para la quimioterapia de los cánceres.

12. Composiciones farmacéuticas según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizadas** porque son utilizadas para el tratamiento de la psoriasis.

60

13. Composiciones farmacéuticas según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizadas** porque son utilizadas para el tratamiento de parasitosis.

14. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 13, **caracterizadas** porque se utilizan para el tratamiento de parasitosis debidas a hongos o a protistas.

15. Composiciones farmacéuticas según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizadas** porque se utilizan para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

16. Composiciones farmacéuticas según una de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizadas** porque se utilizan como medicamentos antineurodegenerativos, en particular anti-apoptosis neuronal.

17. Composiciones herbicidas, **caracterizadas** porque comprenden al menos un derivado de purina según una de las reivindicaciones 1 a 5, eventualmente en asociación con otros agentes fitofarmacéuticos.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

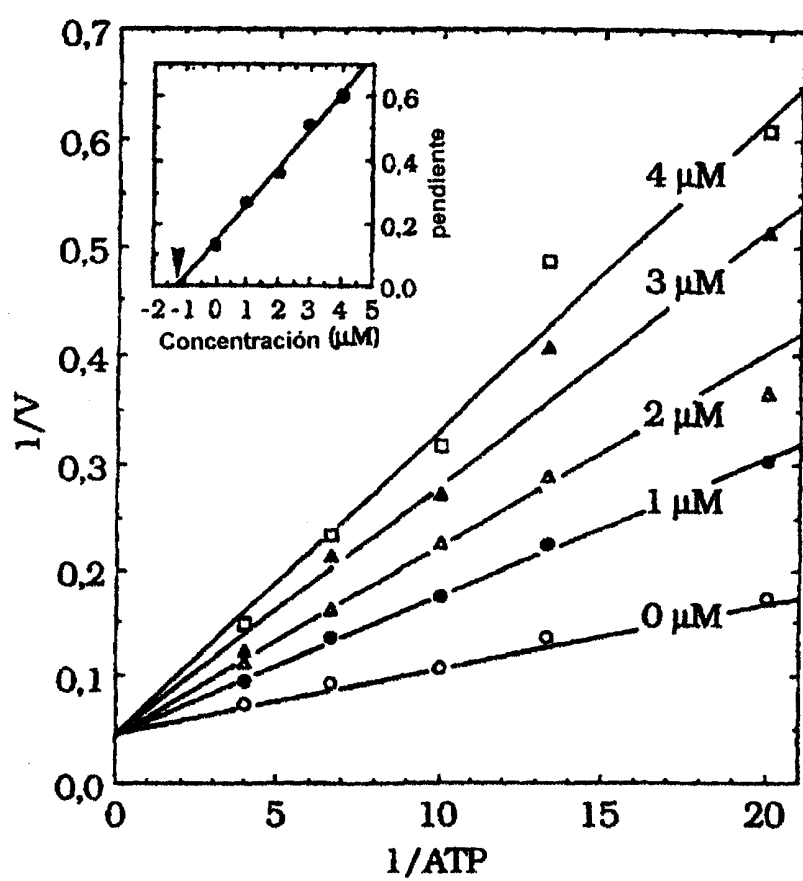


Figura 1

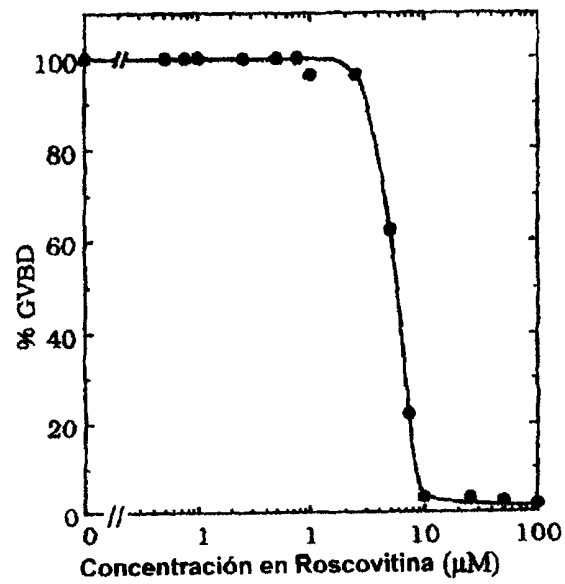


FIGURA 2

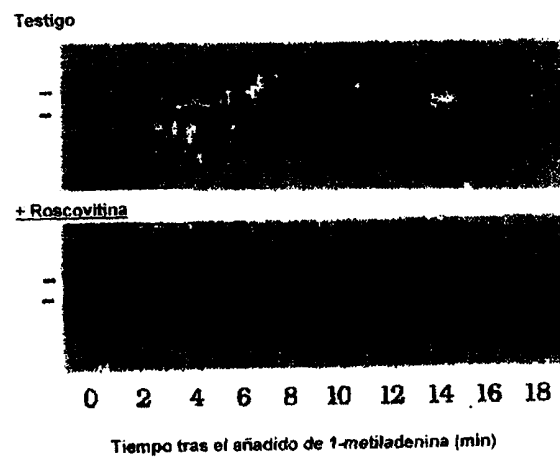


Figura 3

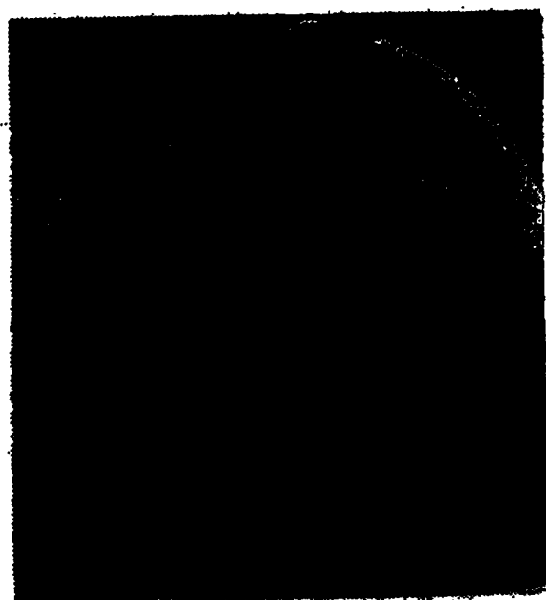


Figura 5

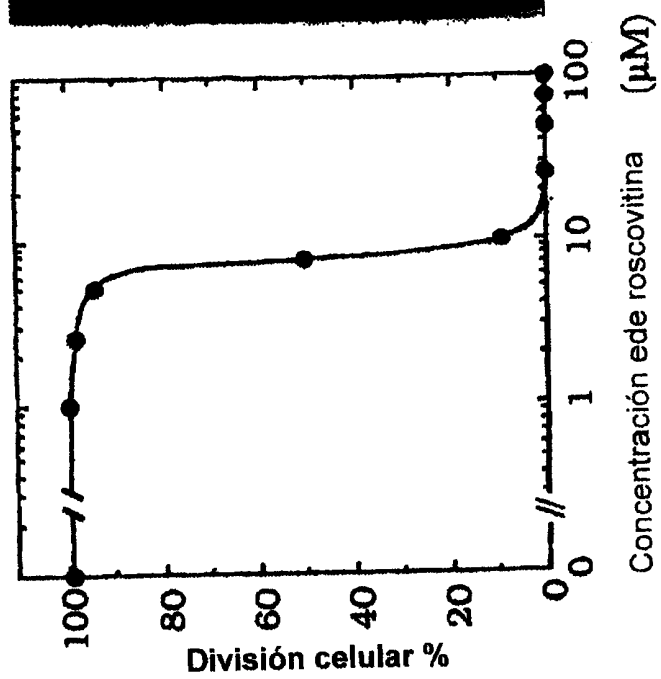


Figura 4

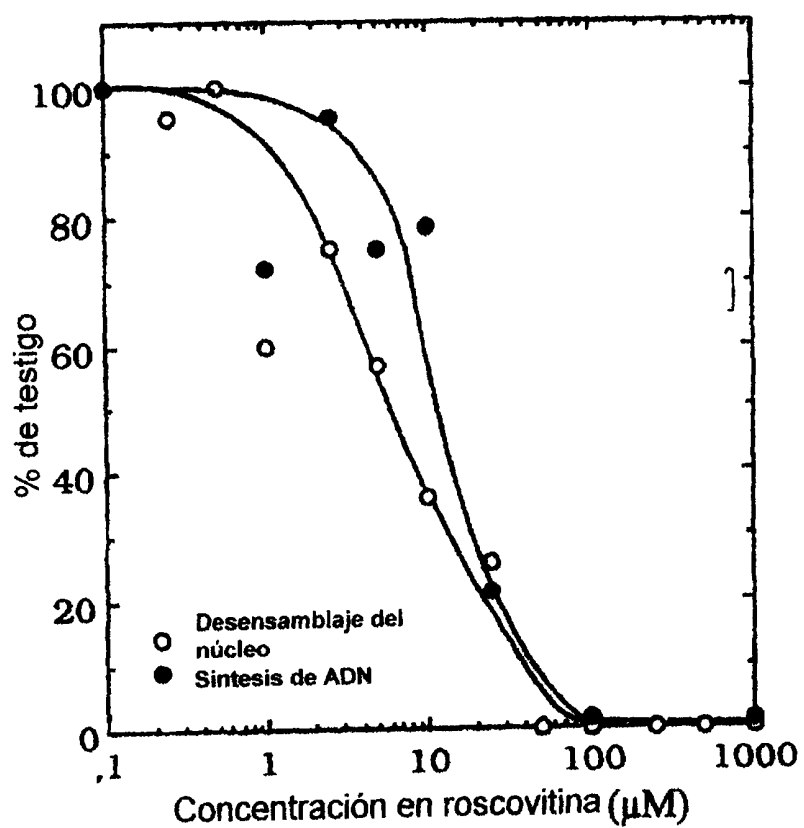


Figura 6

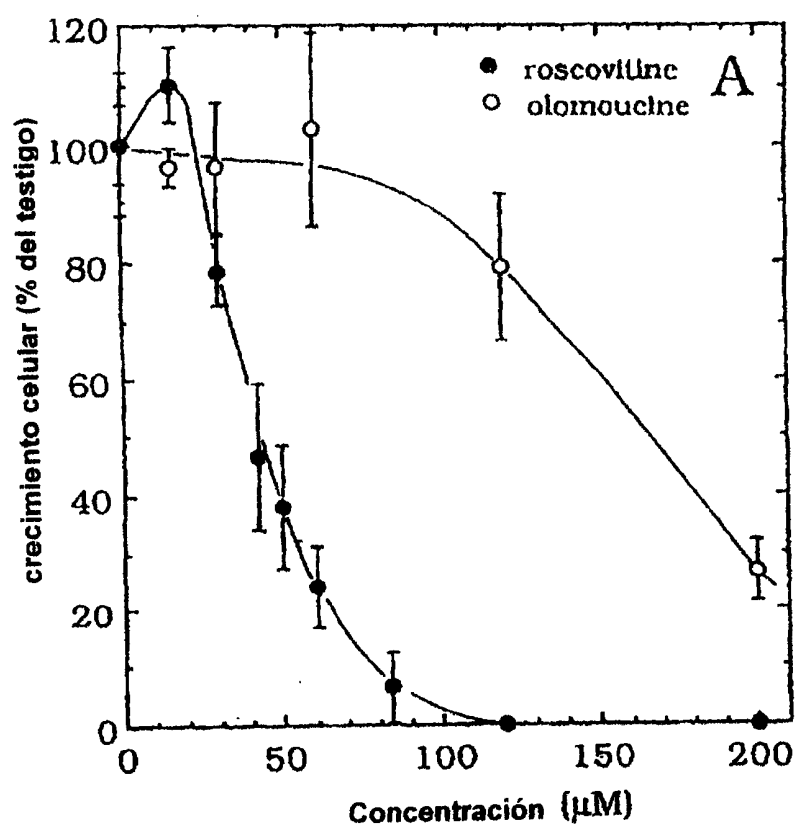
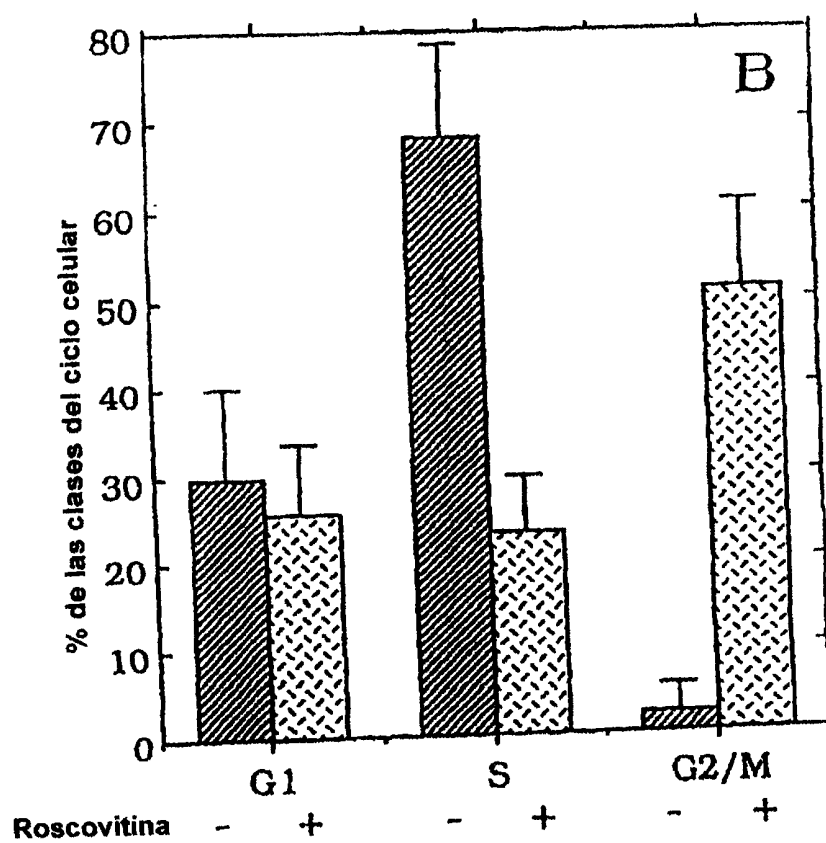


Figura 7a



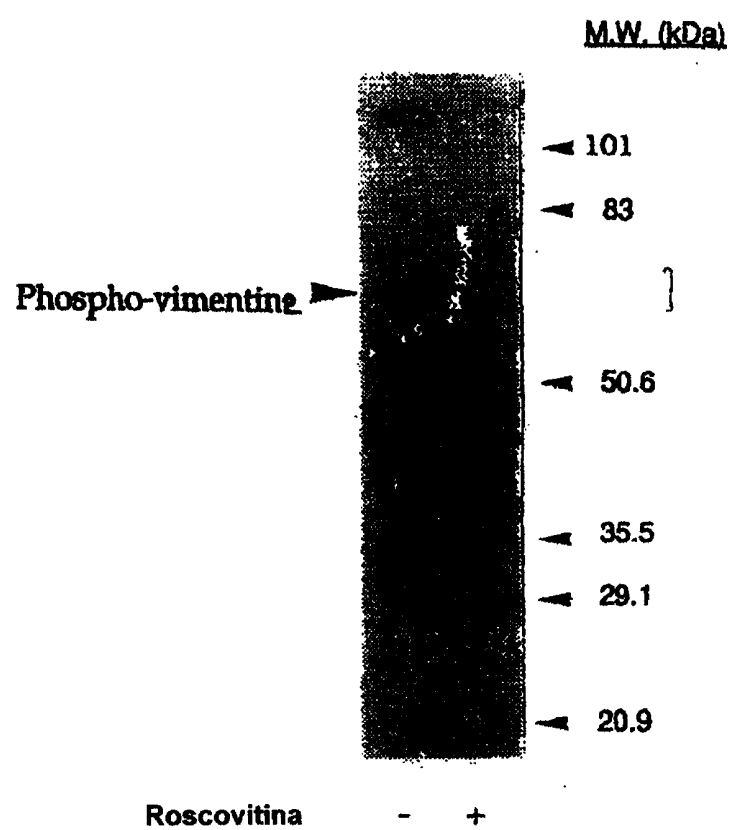


Figura 8