



FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIOS BIOLÓGICOS DE NUEVOS
INHIBIDORES DE LAS QUINASAS BCR-ABL Y BTK QUE POSEEN EL
NÚCLEO PURÍNICO 2,6,9-TRISUSTITUIDO COMO POTENCIALES
AGENTES PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA

JEAN-LUC GERARD BERTRAND DELARD

Tesis para optar al Grado
Académico de Doctor en Química.

Director de Tesis : **Dr. Cristian Salas Sánchez**

Santiago de Chile, diciembre de 2022



FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

Tesis presentada por:

Jean-Luc Gerard Bertrand Delard

Para optar al Grado Académico de Doctor en Química.

Aprobado por:

Dr. David Pessoa M.

Comité de Tesis

Dr. Jaime Mella R.

Comité de Tesis

Dr. Patricio Iturriaga V.

Comité de Tesis

Dr. Marcos Caroli R.

Comité de Tesis

Dr. Cristian Salas S.

Director de Tesis

Diciembre, 2022

Dedicada a mis padres, hermanos, tíos y sobrino.

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) por la entrega del beneficio de beca Doctorado Nacional N° 21180975 que facilitó el desarrollo de esta tesis.

En segundo lugar, agradezco al Dr. Cristian Salas quien me guió y enseñó durante todos estos años, desde seminarios de investigación, tesis de pregrado y ahora en esta tesis doctoral. Todos mis logros académicos han sido apoyados por él y, por eso, le estoy inmensamente agradecido.

Muchas gracias al comité de tesis por su tiempo, gran disposición y recomendaciones en cada instancia del seguimiento de esta tesis doctoral.

Agradezco al Dr. Alejandro Castro, Dr. Jaime Mella y Juan Cabezas por su ayuda y colaboración en la metodología *in silico* de este trabajo.

Un especial agradecimiento al Dr. Vladimir Krystof de la universidad de Palacky, Olomouc, Republica Checa. Quien me recibió y me instruyo en las metodologías biológicas realizadas en la pasantía de esta tesis doctoral. En esta instancia tuve el agrado de conocer a Hana Dostalova, Mirek Perina y Denisa Hendrychova quienes fueron una fundamental ayuda en mi proceso de aprendizaje y amistad en el país checo.

Quisiera agradecer a la Dra. Angélica Fierro, Dr. Virginia Delgado y Dr. Alan Cabrera por su amistad, sabios consejos y las largas tardes de conversación. De esta misma manera, un especial agradecimiento a mis compañeras de laboratorio y grandes amigas: Ana María Zarate y Thalía Delgado, quienes

siempre me han dado un apoyo incondicional.

Quiero agradecer al Dr. Christian Espinosa-Bustos por su apoyo, enseñanzas y recomendaciones a lo largo de mi carrera. Además, mi gratitud a los alumnos de pregrado que tuve la suerte de instruir en la química orgánica y medicinal: Tito, Jeremie, Jorge, Valentina y Nicolas. Me enseñaron que la investigación y la docencia son dos áreas que me apasionan.

Y finalmente, quisiera agradecer a todos quienes participaron en mi vida universitaria y privada, y que apoyaron su grano de arena en mi llegada hasta este momento.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

Lista de abreviaciones

OMS	Organización Mundial de la Salud
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
Bcr-Abl	<i>Breakpoint cluster</i> región-Abelson
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LPL-T	Leucemia ProLinfocítica de células T
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
RCB	Receptor de Células B
BTK	<i>Bruton Kinase</i>
LCM	Linfoma de Células de Manto
IC ₅₀	<i>Half-maximal inhibitory concentration</i>
3D-QSAR	<i>3D-Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
TMS	Tetrametilsilano
CCF	Cromatografía en capa fina
UV	Ultravioleta
p.f	punto de fusión

SNAr	Sustitución Nucleofílica Aromática
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
TEA	Trietilamina
t.a.	temperatura ambiente
MW	Microonda
W	Watt
DEG	Dietilenglicol
ATP	Adenosina Trifosfato
DTT	Ditiotreitol
GI ₅₀	<i>Half-maximal growth inhibition concentration</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CoMFA	<i>Comparative Molecular Field Analysis</i>
MCP	Mínimos Cuadrados Parciales
LOO	<i>Leave-One-Out</i>
DMMCP	Distancia de muestra de los mínimos cuadrados parciales
PE	Precisión Estándar
XP	<i>Xtra Pretition</i>
REA	Relación Estructura Actividad
IM	Imatinib
IB	Ibrutinib
PDB	<i>ProteinDataBank</i>

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Cáncer	1
1.2 Leucemia mieloide crónica.....	6
1.3 Leucemia linfocítica crónica	12
1.4 Desarrollo de nuevos compuestos como potenciales inhibidores de Bcr-Abl y BTK.....	18
2. Hipótesis del trabajo	25
2.1 Investigación propuesta	26
3. Objetivos:.....	31
3.1 Objetivo general	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
3.2.1 Objetivos sintéticos	31
3.2.2 Objetivos biológicos	31
3.2.3 Objetivos computacionales	31
4. Metodología	33
4.1 Información general	33
4.2 Análisis retrosintético de los derivados I – IV	34
4.3 Análisis retrosintético de los derivados V	35
4.4 Análisis retrosintético de los derivados VI	36
4.5 Objetivo Específico 1.- Síntesis y caracterización de ligandos series I - VI	38
4.5.1 Derivados de las series I - IV	38
4.5.2 Derivados de la serie V - VI.....	41

4.6	Objetivo Específico 2.-Estudios biológicos	43
4.6.1	Ensayos de inhibición enzimática	43
4.6.2	Cultivo celular	43
4.6.3	Ensayos citotóxicos	44
4.6.4	Citometría de flujo	44
4.6.5	Inmunotransferencia	45
4.6.6	Ensayo de Caspasa 3/7	45
4.7	Objetivo específico 3.- Estudios <i>in silico</i>	46
4.7.1	3D-QSAR	46
4.7.2	Acoplamiento molecular	48
5.	Resultados y discusión	50
1.1.	Síntesis de los compuestos propuestos	50
5.1.1	Obtención de los derivados 2a-e y 2'a-e: Reacción de <i>N</i> -alquilación.....	50
5.1.2	Obtención de los intermediarios 3a-ad (series I, II y III): Sustitución Nucleofílica Aromática (S _N Ar).....	53
5.1.3	Obtención de los derivados finales 10a-o, 11a-e y 12a-l (series I, II y III): Reacción de acoplamiento cruzado de Buchwald-Hartwig	55
5.1.4	Obtención del derivado 14a (serie IV): <i>N</i> -7-alquilación de pirrolopirimidina.....	62
5.1.5	Obtención de los derivados 15a-c (serie IV): Sustitución nucleofílica aromática.....	63
5.1.6	Obtención de los compuestos finales 16a-c (serie IV): Reacción de acoplamiento cruzado de Buchwald-Hartwig	65
5.1.7	Síntesis de los derivados benzamidas (serie V): Reacción sobre cloruro de acilo y reducción selectiva.....	66

5.1.8 Síntesis de los derivados 21a–h (serie V): Sustitución Nucleofílica Aromática.....	69
5.1.9 Síntesis de los compuestos finales 23a–h (serie V): Reacción de acoplamiento cruzado Buchwald-Hartwig	70
5.1.10 Síntesis del derivado 20 (serie VI): Reacción de Wolf-Kishner	72
5.1.11 Síntesis de los derivados 22a – 22e (serie VI): Sustitución Nucleofílica Aromática.....	73
5.1.12 Reacción de los compuestos finales 24a – 24e (serie VI): Reacción de acoplamiento cruzado Buchwald-Hartwig.	75
5.2 Resultados biológicos	78
5.2.1 Ensayos de inhibición enzimática	78
5.2.2 Estudios de citotoxicidad	86
5.2.3 Inhibición de las quinasas en modelos celulares.....	89
5.2.4 Ciclo celular	93
5.2.5 Mecanismo de muerte celular	94
5.3 Resultados computacionales	97
5.3.1 Relación estructura-actividad	97
5.3.2 Estudios de acoplamiento molecular	102
6. Conclusiones.....	106
7. Bibliografía.....	109
8. Anexos	116
8.1 Procedimiento sintético y caracterización de los compuestos químicos.....	116
8.1.1 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 2a–e y 2a'–e'	116

8.1.2	Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 3a – 3ad	118
8.1.3	Síntesis de 1-metil-4-(4-nitrofenil)piperazina, (5).....	128
8.1.4	Síntesis de 4-(4-metilpiperazin-1-il)anilina, (6).....	129
8.1.5	Procedimiento general para la síntesis de los nitrocompuestos 8a y 8b	129
8.1.6	Procedimiento general para la síntesis de las anilinas 9a y 9b	130
8.1.7	Procedimiento general para la síntesis de los compuestos finales 10a–o.....	131
8.1.8	Procedimiento general para la síntesis de los compuestos finales 11a–e	138
8.1.9	Procedimiento general para la síntesis de los compuestos finales 12a–l.....	141
8.1.10	Síntesis de 2,4-dicloro-7-(ciclopropilmetil)-7 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>d</i>]pirimidina, (14)	146
8.1.11	Procedimiento para la síntesis del 15a.....	147
8.1.12	Procedimiento general para la síntesis del 15b-d	148
8.1.13	Procedimiento general para la síntesis de los compuestos finales 16a–d.....	149
8.1.14	Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 17a–h.	150
8.1.15	Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 18a–h.	153
8.1.16	Procedimiento para la síntesis del compuesto 4-benzilanilina, (20).	156
8.1.17	Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 21a–h.	156

8.1.18 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 22a–e.	160
8.1.19 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos finales 23a–h.....	162
8.1.20 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos finales 24a–e	166
8.1.21 Espectros RMN de los derivados 2a–e	169
8.1.22 Espectros RMN de los derivados 3a–ad.....	189
8.1.23 Espectros RMN del derivado 5.....	266
8.1.24 Espectros RMN del derivado 6.....	268
8.1.25 Espectros RMN del derivado 8a–b.....	270
8.1.26 Espectros RMN del derivado 9a–b.....	274
8.1.27 Espectros RMN de los compuestos finales 10a–o	276
8.1.28 Espectros RMN de los compuestos finales 11a–e	313
8.1.29 Espectros RMN de los compuestos finales 12a–l	327
8.1.30 Espectros RMN del derivado 14.....	359
8.1.31 Espectros RMN de los derivados 15a–c.....	361
8.1.32 Espectros RMN de los derivados 16a–c.....	369
8.1.33 Espectros RMN de los derivados 17a–h.....	375
8.1.34 Espectros RMN de los derivados 18a–h.....	397
8.1.35 Espectros RMN del derivado 20.....	419
8.1.36 Espectros RMN de los derivados 21a–h.....	421
8.1.37 Espectros RMN de los derivados 22a–e	443
8.1.38 Espectros RMN de los compuestos finales 23a–h	453
8.1.39 Espectros RMN de los compuestos finales 24a–e	475
8.2 Espectros de masa.....	485
8.2.1 Espectros de masa de los derivados 2a–e.....	485
8.2.2 Espectros de masa de los derivados 3a–ad	490

8.2.3	Espectro de masa del derivado 5.....	504
8.2.4	Espectros de masa del derivado 6.....	505
8.2.5	Espectros de masa del derivado 8.....	506
8.2.6	Espectros de masa del derivado 9.....	506
8.2.7	Espectros de masa de los compuestos finales 10a–o.....	507
8.2.8	Espectros de masa de los compuestos finales 11a-11d.....	515
8.2.9	Espectros de masa de los compuestos finales 12a-12l.....	517
8.2.10	Espectro de masa del derivado 14.....	523
8.2.11	Espectro de masa de los derivados 15a-15c	524
8.2.12	Espectro de masa de los compuestos finales 16a-16c	526
8.2.13	Espectro de masa de los derivados 17a-17h	527
8.2.14	Espectro de masa de los derivados 18a-18h	531
8.2.15	Espectros de masa del derivado 20.....	535
8.2.16	Espectro de masa de los derivados 21a-21h	536
8.2.17	Espectro de masa de los derivados 22a-22e	540
8.3	Procedimientos bio-informaticos.....	543
8.3.1	3D-QSAR	543
8.4	Protocolo de acoplamiento molecular.....	548
8.4.1	Preparación del ligando co-cristalizado.....	548
8.4.2	Preparación de los ligandos sintetizados	548
8.4.3	Preparación de la proteína	549
8.4.4	Preparación de la grilla y el acoplamiento molecular	549
8.5	Referencias de anexo.....	556

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de mutaciones en Bcr-Abl más resistentes a imatinib, dasatinib, nilotinib y ponatinib basada en estudios clínicos publicados entre 2001-2018.

9

Tabla 2. Inhibición *in vitro* de los compuestos **10a-o**, **11a-e**, **12a-l**, **16a-d**, **23a-h** y **24a-e** en las quinasas Abl, BTK, and Cdk-2/Cyclin E..... 78

Tabla 3. Citotoxicidad *in vitro* de los compuestos **10a-o**, **11a-c**, **12a-l** y **16a** sobre distintas líneas celulares cancerígenas. 87

Tabla 4. Puntuaciones de afinidad de unión (kcal/mol) para las purinas seleccionadas en los sitios activos de la enzima..... 102

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que dictan colectivamente el crecimiento maligno: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión y metástasis en los tejidos. Imagen tomada y modificada de Hannan y col. 2
- Figura 2.** Modelo jerárquico hematopoyético. Imagen diseñada a partir de referencia Brown. G y col 5
- Figura 3. A)** Esquema de señalización intracelular por activación de Bcr-Abl. **B)** Efectividad de los fármacos utilizados tres escenarios: Bcr-Abl normal, Bcr-Abl mutado y Bcr-Abl con mutación T315I. Imagen tomada y modificada de O'Hare T. y cols..... 7
- Figura 4.** Estructuras químicas de algunos inhibidores de Bcr-Abl de interés clínico: **A)** Imatinib (primera generación), dasatinib y nilotinib (segunda generación). **B)** Ponatinib, rebastanib, bafetinib y danusertib (tercera generación). Tomada de Rossari F. y cols.....11
- Figura 5. A)** Rol de BTK en la vía de señalización de receptores de células B. **B)** Modelo esquemático que muestra la regulación de BTK por la fosfatidilinositol-(3,4,5)-trisfosfato (PIP3). Imágenes tomadas y modificadas de Pal Singh, S y cols. y Mohamed, A. J. y cols., respectivamente. 15
- Figura 6.** Representación de la regulación recíproca de la señalización de BTK y la señalización del factor nuclear κ B (NF- κ B). Imagen tomada y modificada de Mohamed, A. J. y cols. 15
- Figura 7.** Estructuras químicas de antineoplásicos de primera línea e inhibidores de BTK, ibrutinib y acalabrutinib. utilizados en el tratamiento de

LLC.....	17
Figura 8. Estructuras químicas de purinas antitumorales y compuestos antineoplásicos aprobados por la FDA.....	19
Figura 9. <i>Izquierda</i>) Estructura química de AP-23464 y numeración de cada átomo del centro de purina. <i>Derecha</i>) Modo de unión propuesto de AP-23464 a Src. Imagen tomada y modificada de Wang Y. y col.	19
Figura 10. A) Optimización del núcleo heterocíclico de imidazolpirazina para el desarrollo de nuevos inhibidores de BTK y B) acoplamiento molecular de 8 y BTK. Imagen tomada y modificada de Shi Q. y cols.....	21
Figura 11. Estructuras de los mejores inhibidores de Bcr-Abl y BTK desarrolladas por nuestro grupo de investigación. Imagen tomada de Bertrand y cols.	22
Figura 12. Acoplamiento molecular entre ligando V y A) Bcr-Abl (2GQG) y B) BTK (3GEN). Imagen tomada de Bertrand y cols.....	23
Figura 13. Estructuras químicas generales propuestas para nuevas moléculas inhibidores de Bcr-Abk y BTK.....	26
Figura 14. Representación de los regioisómeros N-9 y N-7-alquilados. A y B) muestra el ¹ H RMN para ambos regioisómeros. C y D) muestra el análisis por HMBC de ambos regioisómeros indicando la diferencia en la correlación H-1' vs C-8, C-5 y C-4, lo que conlleva a una asignación espectral inequívoca. .	52
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 3f	55
Figura 16. A) Espectro de ¹ H RMN del compuesto 6 . B) Espectro de ¹ H RMN del compuesto 10f	62
Figura 17. Espectro de ¹ H RMN del compuesto 14	63
Figura 17. Espectro de ¹ H RMN del compuesto 15a	65

Figura 18. Espectro de ^1H RMN del compuesto 16a .	66
Figura 19. Espectro de ^1H RMN del compuesto 17g .	67
Figura 20. Espectro de ^1H RMN del compuesto 18g .	69
Figura 21. Espectro de ^1H RMN del compuesto 21g .	70
Figura 22. Espectro de ^1H RMN del compuesto 23g .	71
Figura 23. Mecanismo de reacción de reducción de Wolf-Kishner. Imagen tomada y modificada de bibliografía László Kürti y Barbara Czako.	72
Figura 24. Espectro de ^1H RMN del compuesto 20 .	73
Figura 25. Espectro de ^1H RMN del compuesto 22e .	74
Figura 26. Espectro de ^1H RMN del compuesto 24e .	76
Figura 26. Inhibición de quinasas por 10f (<i>izquierda</i>) y 10i (<i>derecha</i>) en células K562. Las células se trataron con vehículo o la concentración indicada del compuesto durante 24 h; Se utilizó imatinib (IM, 1 μM) como control positivo. Las células se lisaron y las proteínas se detectaron mediante inmunotransferencia.	91
Figura 27. Inhibición de quinasas por a) 10i en células K562, b) 12j en RAMOS y c) 24c y 24d en RAMOS. Las células se trataron con vehículo o la concentración indicada del compuesto durante 4 h; Se utilizó imatinib (IM, 1 μM) e ibrutinib (IB, 2 μM) como control positivo. Las células Ramos se estimularon con anti-IgM (5 $\mu\text{g/mL}$) durante 10 min antes de la recolección. Las células se lisaron y las proteínas se detectaron mediante inmunotransferencia.	93
Figura 28: Efecto en el ciclo celular de a) compuesto 10i en K562 y b) 12j en Ramos luego de un tratamiento de 24 h.	94

Figura 29: Efecto de 10i en K562 a) escisión de PARP después de 4 h de tratamiento y b) actividad relativa de caspasa 3/7 después de 24 h de tratamiento.	96
Figura 30: Mapas de contornos estéricos (A, B) y electrostáticos (C, D) en Bcr-Abl. El compuesto más activo V (A,C) se compara con el menos activo 12k (B,D)	99
Figura 31: Mapas de contornos estéricos (A, B) y electrostáticos (C, D) en BTK. El compuesto más activo 24d (A,C) se compara con el menos activo 16b (B, D)	101
Figura 32. Representaciones de los modos de unión de los compuestos 10i (A) y 12j (B) en el sitio activo de Bcr-Abl. La imagen de la derecha es la representación tridimensional del mejor resultado de acoplamiento para cada compuesto. La imagen de la izquierda es una vista superior de un diagrama de interacciones de ligandos con el sitio de unión.	104
Figura 33. Representaciones de los modos de unión de los compuestos 10i (A) y 12j (B) en el sitio activo de BTK. La imagen de la derecha es la representación tridimensional del mejor resultado de acoplamiento para cada compuesto. La imagen de la izquierda es una vista superior de un diagrama de interacciones de ligandos con el sitio de unión.	105

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Estructuras químicas generales para los compuestos de las series I – VI como nuevos potentes inhibidores de Bcr-Abl y BTK. a) serie I , b) serie II , c) serie III , d) serie IV , e) serie V y f) serie VI	30
Esquema 2. Análisis retrosintético para la obtención de los compuestos de las series I – IV.....	35
Esquema 3. Análisis retrosintético para la obtención de los compuestos serie V	36
Esquema 4. Análisis retrosintético para la obtención de los compuestos serie VI	37
Esquema 5: <i>Reactivos y condiciones:</i> i) Haluro de alquilo, DMF, t.a., 12 h. ii) Anilina, DIPEA, <i>n</i> -butanol, reflujo, 12 h. iii) <i>N</i> -metilpiperazina, K ₂ CO ₃ , DMF, t.a., 2 h. iv) Hidracina, Pd-C, etanol, 70 °C, 2 h. v) <i>N</i> -metilpiperazina, TEA, DMF, t.a., 2 h. vi) H ₂ (g), Pd-C, etanol, reflujo, 2 h. vii) 6 o 9a , Pd(OAc) ₂ , XantPhos, K ₂ CO ₃ 2 M, dioxano, 2 h, MW, 50 W. viii) bromuro de metilciclopropilo, DMF, t.a., 12 h. ix) Anilina, DIPEA, <i>n</i> -butanol, reflujo, 12 h. x) amina comercial, DIPEA, <i>n</i> -butanol, reflujo, 12 h.	40
Esquema 6. <i>Reactivos y condiciones:</i> i) Anilina, TEA, DMF, t.a., 2 h. ii) H ₂ (g), Pd-C, etanol, t.a., 2 h. iii) hidracina, KOH, DEG, 200 °C, 12 h. iv) Anilina correspondiente , DIPEA, <i>n</i> -butanol, reflujo, 12 h. v) 6 , Pd(OAc) ₂ , XantPhos, K ₂ CO ₃ 2 M, dioxano, 2 h, MW, 50 W.	42
Esquema 7. Equilibrio tautomérico de purinas.	52
Esquema 8: <i>Reactivos y condiciones:</i> i) K ₂ CO ₃ , DMF, t.a., 12 h.	53
Esquema 9: <i>Reactivos y condiciones:</i> ii) Anilina, DIPEA, <i>n</i> -butanol, reflujo, 12 h.	54

Esquema 10. Mecanismo catalítico Buchwald-Hartwig, acoplamiento carbono-nitrógeno catalizada por paladio. Imagen diseñada a partir de referencia J. Hartwig.	57
Esquema 11: <i>Reactivos y condiciones:</i> iii) <i>N</i> -metilpiperazina, K ₂ CO ₃ , DMF, t.a., 2 h. iv) Hidracina, Pd-C, etanol, 70 °C, 2 h v) <i>N</i> -metilpiperazina, TEA, DMF, t.a., 2 h.	59
Esquema 12: <i>Reactivos y condiciones:</i> vi) 6 o 9a-b , Pd(OAc) ₂ , XantPhos, K ₂ CO ₃ 2 M, dioxano, 2 h, 100 °C, Microondas, 50 W, 20 – 66 %.	60
Esquema 13: <i>Reactivos y condiciones:</i> vii) bromuro de metilciclopropilo, K ₂ CO ₃ (s), DMF, t.a., 12 h, 82 %.	62
Esquema 14: <i>Reactivos y condiciones:</i> viii) Anilina, <i>t</i> -butóxido de potasio, DMF, 90 min, t.a., 67 – 88 %.	64
Esquema 15: <i>Reactivos y condiciones:</i> ix) Amina correspondiente, TEA, DMF, t.a., 2 h. x) H ₂ (g), Pd-C, etanol, t.a., 2 h.	68
Esquema 16: <i>Reactivos y condiciones:</i> xi) hidracina monohidrato, KOH, dietilenglicol, 200 °C, 12 h, 82 %.	72
Esquema 17: Número de compuestos sintetizados en cada serie.	77
Esquema 18: Relación estructura-actividad para los compuestos finales en cada quinasa.	85

Resumen

Las quinasas Bcr-Abl y BTK se encuentran entre las dianas terapéuticas para el tratamiento de la leucemia. Por lo tanto, algunas estrategias se han centrado en el uso de inhibidores de estas quinasas como herramientas quimioterapéuticas para tratar la leucemia, como imatinib (para Bcr-Abl) o ibrutinib (para BTK). Sin embargo, la eficacia de estos fármacos se ha visto reducida debido a varios mecanismos de resistencia, lo que ha motivado el desarrollo de nuevos inhibidores más efectivos.

En un estudio previo, en nuestro grupo de laboratorio se diseñó, sintetizó y evaluó una pequeña serie de derivados de purina 2,6,9-trisustituidos como inhibidores de Bcr-Abl y BTK. A partir de ello, se identificaron dos potentes inhibidores de ambas quinasas con valores de IC_{50} de 40 nM y 580/660 nM para Bcr-Abl y BTK, respectivamente. En esta tesis de doctoral, continuando con el programa para desarrollar derivados de purina 2,6,9-trisustituidos con actividad anticancerígena, se reporta una nueva serie de cuarenta y nueve derivados de purina con efectos interesantes sobre ambas proteínas, en donde se remarcan los compuestos **10i** y **12j** como inhibidores de Bcr-Abl y BTK. Se identificó que la longitud y el volumen de la cadena de alquilo en N-9 influyeron dramáticamente en el efecto inhibidor de estas quinasas. Mientras que para Bcr-Abl un grupo voluminoso (isopentilo) o una cadena de alquilo lineal de más de cinco carbonos disminuyó la potencia (valores $IC_{50} = 100 \mu M$). Para BTK, una cadena lineal de cinco o seis carbonos aumentó de manera interesante la actividad (dependiendo del resto aminofenilo en C-6, puede ser *n*-pentilo o *n*-hexilo). Mediante estudios de inmunotransferencia se comprobó que los compuestos **10i** y **12j** inhibían la vía de señalización de Bcr-Abl y BTK, respectivamente a nivel celular. Además, **10i** detiene el ciclo celular en G1 y promueve la expresión de proteínas pro-apoptóticas. Los resultados del

acoplamiento demuestran que la cadena alquílica juega un papel crucial en la posición para la inhibición con en cada quinasa así como una doble interacción de puente de hidrógeno entre el fragmento aminofenilo en C-6 y N-7 con Met318 (Bcr-Abl) y Met477 (BTK). Para sistematizar la información de la relación estructura-actividad se realizó un 3D-QSAR para validar nuestro diseño y proponer una serie racional de modificaciones estructurales que den lugar a una nueva familia de compuestos.

Abstract

Bcr-Abl and BTK kinases are among the targets that have been considered for the treatment of leukaemia. Therefore, some strategies have focused on the use of inhibitors as chemotherapeutic tools to treat leukaemia, such as imatinib (for Bcr-Abl) or ibrutinib (for BTK). However, the efficacy of these drugs has been reduced due to several resistance mechanisms, which have motivated the development of new and more effective inhibitors.

In a previous study, in our laboratory group designed, synthesized, and evaluated a small series of 2,6,9-trisubstituted purine derivatives as Bcr-Abl and BTK inhibitors. From this, two potent inhibitors of both kinases were identified with IC₅₀ values of 40 nM and 580/660 nM for Bcr-Abl and BTK, respectively. In this PhD. thesis, continuing the program to develop 2,6,9-trisubstituted purine derivatives with anticancer activity, a new series of forty-nine purine derivatives with interesting effects on both kinases is reported, highlighting compounds **10i** and **12j** as Bcr-Abl and BTK inhibitors. It was identified that the length and volume of the alkyl chain at *N*-9 dramatically influenced the inhibitory effect on these kinases. While for Bcr-Abl a bulky group (isopentyl) or a lineal alkyl chain longer than five carbons decreased the potency (IC₅₀ values = 100 μM). For BTK a lineal five- or six-carbon chain increased interestingly the activity (depending to the aminophenyl moiety on C-6, it can be *n*-pentyl or *n*-hexyl). Using immunoblot studies, it was found that compounds **10i** and **12j** inhibited the Bcr-Abl and BTK signaling pathway, respectively, at cellular level. Furthermore, **10i** arrested the cell cycle in G1 and promotes the expression of pro-apoptotic proteins.

The docking results demonstrate that the alkyl chain plays a crucial role in the position that the compound for inhibition with each kinase as well as a double

hydrogen bridge interaction between the aminophenyl fragment at C-6 and N-7 with Met318 (Bcr-Abl) and Met477 (BTK). To systematize the structure-activity relationship information a 3D-QSAR was carried out to validate our design and to propose a rational series of structural modifications leading to a new family of compounds.

1. Introducción

1.1 Cáncer

Es cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas, en donde, células del organismo empiezan a dividirse sin control y se diseminan a los otros tejidos del cuerpo. El crecimiento maligno de esta enfermedad esta dictado por seis alteraciones esenciales, las cuales son: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión y metástasis en los tejidos (**Figura 1**).¹ Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda enfermedad que más decesos ocasiona a nivel mundial, después de las enfermedades cardiovasculares.² La aparición de estas neoplasias puede ser gatillada por una suma de factores ambientales, tales como: dietas altas en calorías, carnes, y grasas, exposición prolongada a radiación, tabaquismo, entre otros y, por factores genéticos inherentes del individuo dentro de las cuales se puede encontrar mutaciones genéticas, hormonales y alteraciones inmunológicas. De esta forma, las células normales afectadas se transforman paulatinamente en células tumorales lo que resulta en una proliferación descontrolada y en la alteración de los mecanismos de que regulan tanto su diferenciación como su proliferación.



Figura 1. Seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que dictan colectivamente el crecimiento maligno: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibidoras del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión y metástasis en los tejidos. Imagen tomada y modificada de Hannan y col.¹

En el año 2020 se registraron 53.365 nuevos casos de esta patología en Chile, con una tasa de incidencia y mortalidad del 195.5 y 95.7 por cada 100.000 habitantes. El cáncer de próstata, pulmón y estómago encabezan la lista de

mortalidad en nuestro país. Sin embargo, la leucemia, linfoma y mieloma múltiple representan una tasa no menor de mortalidad, siendo también de gran importancia sanitaria. En su conjunto, son parte de las enfermedades neoplásicas de la sangre o también conocidos como tumores no sólidos (**Gráfico 1**).^{3,4}

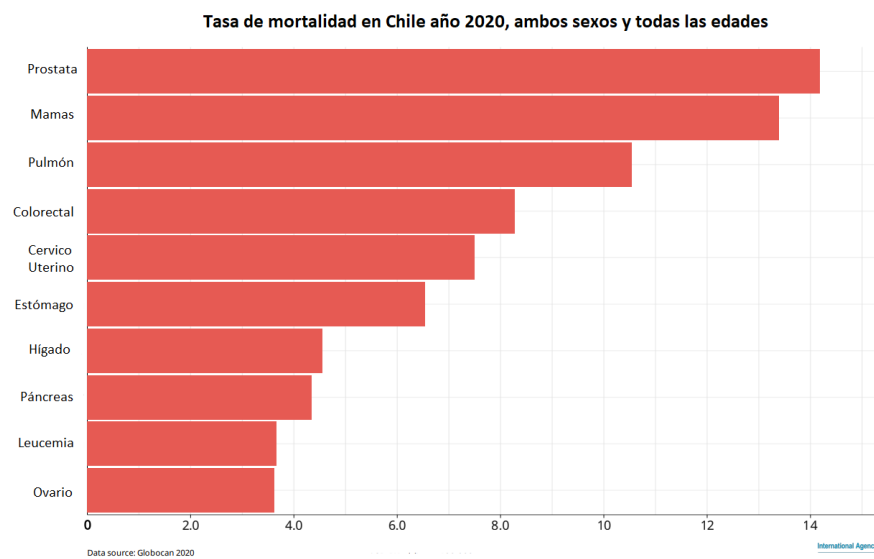


Gráfico 1: Tasa de mortalidad de los 10 tipos de cáncer con mayor defunción para todos los sexos y edades en el año 2020, Chile. Imagen tomada y modificada de GloboCan 2020, OMS.³

La leucemia, el linfoma y el mieloma múltiple son enfermedades neoplásicas en donde células sanguíneas cancerosas proliferan e invaden la médula ósea, tejido linfóide y la sangre periférica pudiendo llegar ocasionalmente a otros tejidos. Debido a que en la sangre coexisten diversos tipos de células con distinta funcionalidad, es importante determinar cuáles de ellas ocasionan esta

enfermedad. Esto porque todas ellas tienen un potencial efecto neoplásico. Como se indica en la **Figura 2**, los diferentes tipos de células existentes en la sangre provienen de una misma célula progenitora (célula madre hematopoyética), la cual da origen a dos linajes de células madre: linfoide y mieloide. Esta última diferenciación, reside en la localización donde mayormente estas células maduran en el proceso hemostático. De esta manera, el linaje mieloide madura en la médula ósea y el linaje linfoide en órganos del sistema linfático (nódulos, bazo y timo), sin embargo, la maduración temprana de las células linfoides reside en la médula ósea.⁵

La célula madre linfoide se diferencia a su vez a linfoblastos, los cuales se diferencian y maduran a linfocitos B y T, en donde ambos pueden expresar ciertas alteraciones genómicas que se traducen en la formación de células cancerígenas. La leucemia linfoide y linfomas se originan a partir de un progenitor linfoide, la diferencia yace en el órgano en donde se genera la carcinogénesis: si la neoplasia de las células linfoides se origina en la médula ósea la enfermedad se cataloga como leucemia, en cambio, si se origina en tejido linfoide se cataloga como linfoma.

Los linfocitos B maduros circulan en el torrente sanguíneo hasta que reconocen un antígeno, que lo activa para convertirse en células B de memoria o célula plasmática. El mieloma múltiple es un cáncer de las células plasmáticas, en el que un clon de células plasmáticas malignas crece sin control en la médula ósea y otros órganos.

Por otra parte, la célula madre mieloide se diferencia a dos linajes inmaduros, monoblastos y mieloblastos; en donde el primero de ellos da origen a monocitos y macrófagos; y el segundo de ellos, da origen al conjunto de

células granulocíticas (glóbulos blancos mieloides), eritrocitos y plaquetas. La leucemia mieloide surge de transformaciones malignas de un progenitor mieloide en la médula ósea. Por último, cada célula cancerígena, independiente del linaje mencionado, puede generar dos tipos de leucemias: aguda y crónica. Esta clasificación se relaciona con el grado de maduración de las células neoplásicas y con su agresividad.⁵⁻⁸

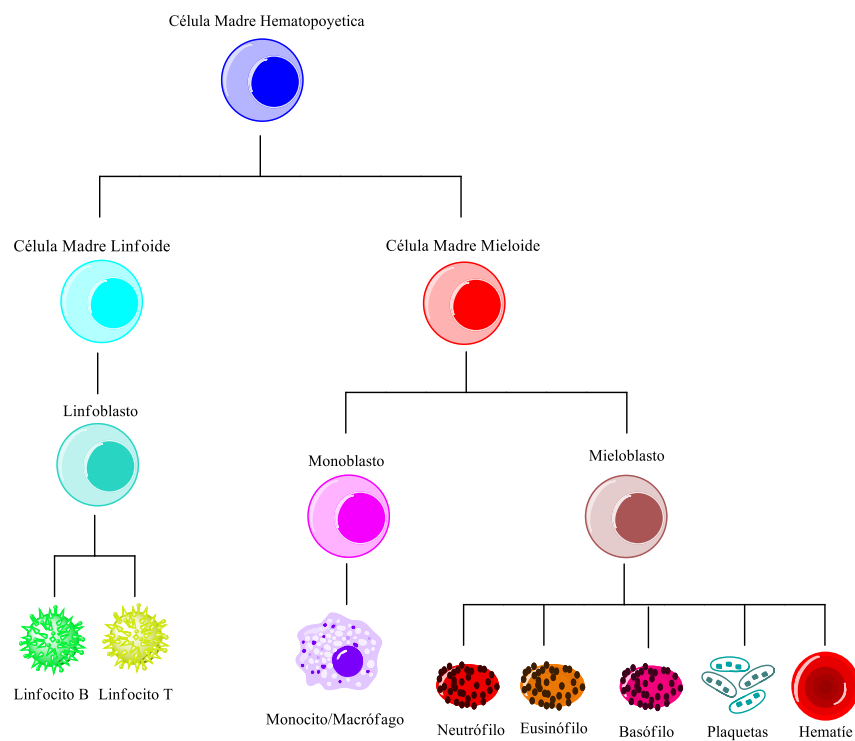


Figura 2. Modelo jerárquico hematopoyético. Imagen diseñada a partir de referencia Brown. G y col.⁶

1.2 Leucemia mieloide crónica

Dentro de los tipos de leucemia de mayor prevalencia esta la leucemia mieloide crónica (LMC), la cual es un tipo de cáncer que se inicia en la médula ósea, pero que con frecuencia traspasa a la sangre. Esta enfermedad se ha relacionado con una anomalía cromosómica en el 95 % de los pacientes de LMC, la cual se debe a una translocación del cromosoma 9 al 22. Esta translocación genera un nuevo cromosoma, denominado “cromosoma Filadelfia”, en honor a la universidad que lo descubrió.^{7,9,10} La translocación produce el gen fusionado *Bcr/Abl*, lo que se traduce en la síntesis de la proteína tirosina quinasa citosólica *Breakpoint cluster* región-Abelson (Bcr-Abl). Esta proteína fusionada genera una sobre activación de vías relacionadas con el cáncer, debido a que en su dominio *N*-terminal, perteneciente al segmento Bcr, facilita la autofosforilación en el residuo de tirosina 177 (Bcr-Abl-Y177) pudiendo unirse a la proteína Grb2 e inducir la formación del complejo Grb2-SOS, de esta manera, activar la señalización de Ras y el reclutamiento de la quinasa fosfatidilinosil-3-ol (PI3K). La señalización de RAS activa a la familia de proteínas quinasas MAPK y aumenta la proliferación celular.¹⁰⁻¹² PI3K activa la serina-treonina quinasa AKT, que funciona promoviendo la supervivencia al suprimir la actividad de los factores de transcripción de *forkhead* (FOXO) potenciando la proliferación celular mediante la inactivación de proteínas pro-apoptóticas (BAD), y, por último, la activación de mTOR, lo que conduce a una mejor traducción de proteínas y proliferación celular.¹³⁻¹⁵ Una función crítica adicional de Bcr-Abl es la activación de STAT5 a través de la fosforilación directa o indirecta de JAK2. Se ha demostrado que STAT5 es crucial en la mantención de la leucemogénesis mieloide y linfoide (**Figura 3A**).^{16,17}

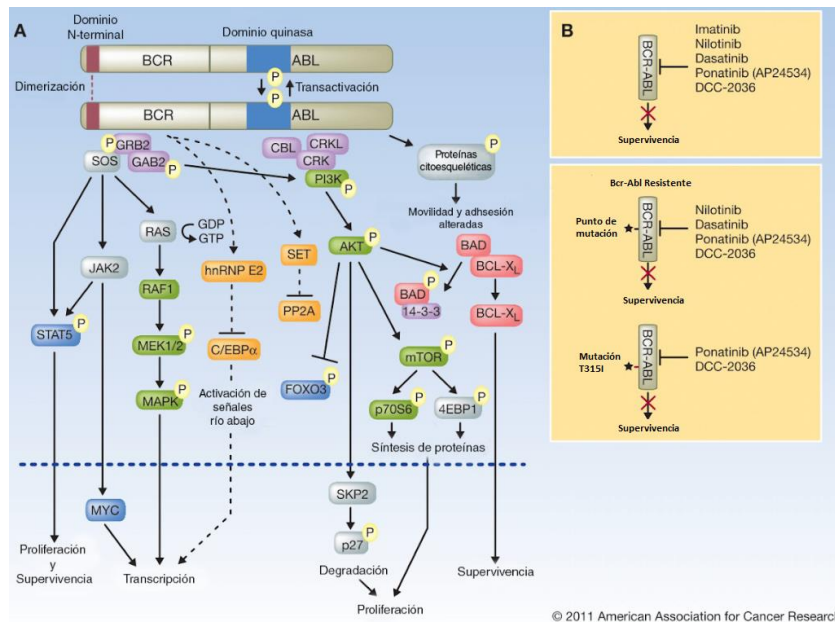


Figura 3. A) Esquema de señalización intracelular por activación de Bcr-Abl. **B)** Efectividad de los fármacos utilizados tres escenarios: Bcr-Abl normal, Bcr-Abl mutado y Bcr-Abl con mutación T315I. Imagen tomada y modificada de O'Hare T. y col. ¹⁰

Al ser Bcr-Abl expresada sólo en estas células neoplásicas y estar directamente relacionada con vías de señalización que producen proliferación celular, esta proteína ha sido uno de los blancos terapéuticos más abordados en esta quimioterapia de LMC. Dentro del arsenal de fármacos disponibles, se destaca imatinib (**Figura 4A**), el cual fue el primer inhibidor de Bcr-Abl desarrollado y es utilizado de primera línea en el tratamiento de LMC. Sin embargo, en función de su uso, se ha evidenciado la aparición de ciertos mecanismos de resistencia a este fármaco. Dentro de estos mecanismos se menciona aquel mediado principalmente por mutaciones en el dominio de

quinasa de Bcr-Abl, las cuales generan una disminución en la unión fármaco-receptor. Se han encontrado diversas mutaciones resistentes a imatinib, como se resumen en la **Tabla 1**, dentro de estas mutaciones se destaca el intercambio de glutamato por lisina en posición 255 (E255K) la cual disminuye la interacción de imatinib con la proteína.¹⁸⁻²⁰ Debido a esta evidencia, fármacos de segunda y tercera generación como nilotinib y dasatinib han surgido como una alternativa a los tratamientos de LMC sensibles y/o resistentes a imatinib con mutación E255K.^{21,22} Sin embargo, no mostraron ser efectivos en el tratamiento con mutación T315I, siendo este intercambio la mutación más predominante en los casos de LMC. En consecuencia, fármacos de tercera generación como ponatinib surgieron como posibles candidatos en el tratamiento de esta enfermedad con mutación T315I (**Figura 1B y 3B**).^{18,21-23} Esta última droga fue suspendida por la FDA en el año 2013 y aprobada nuevamente en 2016 bajo condiciones estrictas de uso ya que produce efectos adversos dañinos y perjudiciales para la vida.²⁴ Considerando lo anterior, es que en la actualidad se están llevando a cabo estudios preclínicos y fase clínica I/II para nuevos compuestos inhibidores de esta proteína fusionada resistentes a los tratamientos actuales (**Figura 4B**).²¹

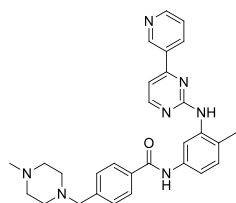
Tabla 1. Lista de mutaciones en Bcr-Abl más resistentes a imatinib, dasatinib, nilotinib y ponatinib basada en estudios clínicos publicados entre 2001-2018.²⁵

Mutación resistente a imatinib	M237V, I242T, M244V , K247R, L248V, G250E , G250R, Q252R, Q252H , Y253F , Y253H , E255K , E255V , E258D, W261L, L273M, E275K, E275Q, D276G , T277A, E279K, V280A, V289I, V289L, V289A, E292Q, E292V, I293V, L298V, F311L , F311I, T315I , F317L , F317V, F317I, F317C, Y320C, L324Q, Y342H, M343T, A344V, A350V, M351T E355D, E355G , E355A, F359V , F359I F359C, F359L, D363Y, L364I, A365V, A366G, L370P, V371A, E373K, V379I, A380T, F382L, L384M , L387F , L387V, M388L, H396R , H396P , H396A, A397P, S417F, S417Y, I418S, I418V, A433T, S438C, E450K, E450G, E450A, E450V, E453G, E453A E453K, E453V, E453Q, E459K , E459V, E459G, E459Q, M472I, P480L, F486S
Mutación resistente a dasatinib	V299L, T315I , T315A , F317L, F317V, F317I, F317C
Mutación resistente a nilotinib	Y253H, E255K, E255V, T315I , F359V, F359I, F359C
Mutación resistente a posatinib	T315M, T315L

Las mutaciones más frecuentes se presentan destacadas en amarillo.

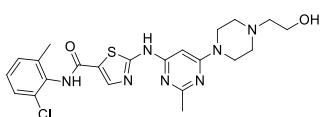
Por otro lado, es importante considerar que, la expresión del gen fusionado *Bcr/Abl* no solo se presenta en leucemias mieloide, también se ha encontrado el cromosoma Filadelfia en un 30-40 % de los pacientes de leucemias linfocíticas agudas (LLA).²⁶ Por esta razón, el desarrollo de nuevos inhibidores de Bcr-Abl, pudieran ser útiles tanto para el tratamiento de LMC como para LLA.

A



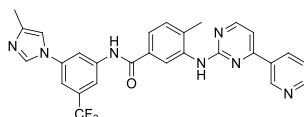
Imatinib

Aprobado por la FDA en 2001
Primera generación



Dasatinib

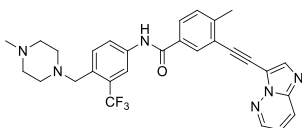
Aprobado por la FDA en 2006
Segunda generación



Nilotinib

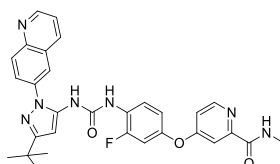
Aprobado por FDA 2007
Segunda generación

B



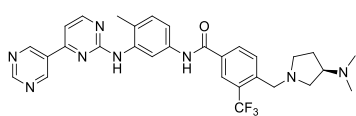
Ponatinib

Aprobado por FDA en 2016
Tercera generación



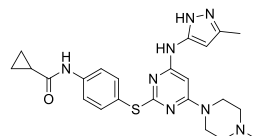
DCC-2036 (Rebastinib)

Fase I
Tercera generación



INNO-406 (Bafetinib)

Fase I
Tercera generación



MK-0457 (Tozasertib)

Fase II
Tercera generación

Figura 4. Estructuras químicas de algunos inhibidores de Bcr-Abl de interés clínico: **A)** Imatinib (primera generación), dasatinib y nilotinib (segunda

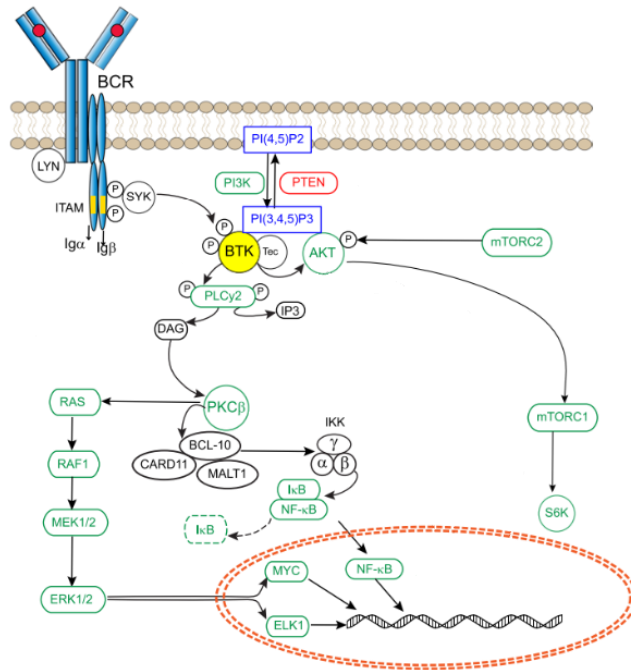
generación). **B)** Ponatinib, rebastanib, bafetinib y danusertib (tercera generación). Tomada de Rossari F. y col. ²¹

1.3 Leucemia linfocítica crónica

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la neoplasia sanguínea más común en adultos.^{2,27} La LLC es siempre una enfermedad de las células B neoplásicas, mientras que la leucemia de células T se ha denominado leucemia prolinfocítica de células T (LPL-T). Al contrario de la LMC, la LLC se origina por distintas mutaciones, mayormente deleciones en el cromosoma 11 y 13, lo que representa el 80 % de las causas de LLC. Estas mutaciones producen desequilibrio de la homeostasis celular, debido a que proteínas encargadas del daño y reparo del ADN se localizan en estos cortes cromosómicos, como, por ejemplo, la proteína ataxia telangiectasia-mutada (ATM), encargada del control del ciclo celular e inductor de la apoptosis por daño en el ADN. Por otro lado, se genera un incremento y sobreactivación de las vías de señalización que están relacionadas con el desarrollo y mantenimiento celular, principalmente las que están implicadas con la activación de MYC y MAPK, proteínas vinculadas con la proliferación, inhibición de la apoptosis, metabolismo y síntesis de proteínas.²⁷⁻²⁹ Dentro de estas vías de señalización, se destaca la activación mediada por receptores de células B (RCB). Los RCB han sido ampliamente estudiado durante varias décadas por sus funciones en respuestas inmunológicas, pero recién a fines de los años 90 y comienzos del siglo XXI se comenzó a investigar su relevancia en LLC, debido que la aparición de esta enfermedad en etapas tempranas de maduración de los RCB era más agresiva y con peor pronosis, esto situó a los RCB como una diana terapéutica importante en el tratamiento de LLC.³⁰⁻³²

Como se puede ver en la **Figura 5A**, la cascada de señalización se activa con la interacción de un antígeno con los RCB, esto provoca la agregación de correceptores CD79A/B, reclutando, a su vez, la tirosina quinasa LYN y SYK, las cuales fosforilan los co-receptores amplificando la señal inicial. SYK con posterioridad se fosforila y de este modo activa a PI3K, el cual convierte PIP2 en PIP3, este último sirve como un sitio de acoplamiento para la fosforilación de la quinasa de Bruton (BTK) y proteína quinasa B (PBK o AKT) (**Figura 5B**). Por su parte, AKT activa la vía de señalización mTOR, mientras que BTK fosforila a PKC γ 2, produciendo un segundo mensajero que estimula a PKC β , generando así dos funciones; la fosforilación de RAS y activación de la vía MAPK y; fosforilación del complejo I κ B($\alpha\beta\gamma$) resultando en la destrucción de este mismo, induciendo la liberación del factor transcripcional NF- κ B estando ahora libre para translocar al núcleo donde promueve la expresión de genes de regulación recíproca y supervivencia (**Figura 6**).^{33,34}

A)



B)

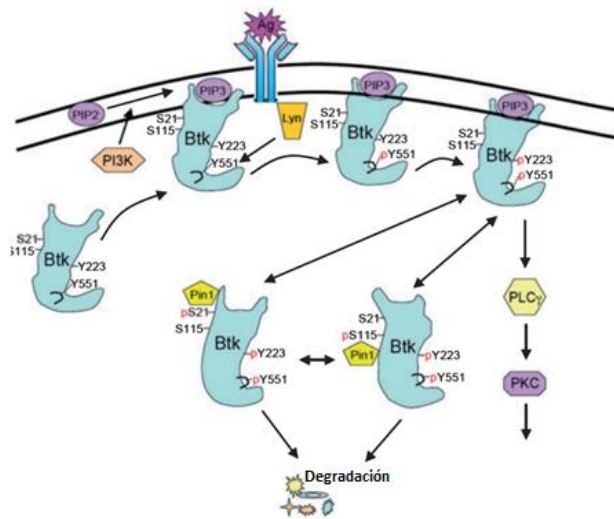


Figura 5. A) Rol de BTK en la vía de señalización de receptores de células B. **B)** Modelo esquemático que muestra la regulación de BTK por la fosfatidilinositol-(3,4,5)-trisfosfato (PIP3). Imágenes tomadas y modificadas de Pal Singh, S y cols. y Mohamed, A. J. y cols., respectivamente.^{33, 34}

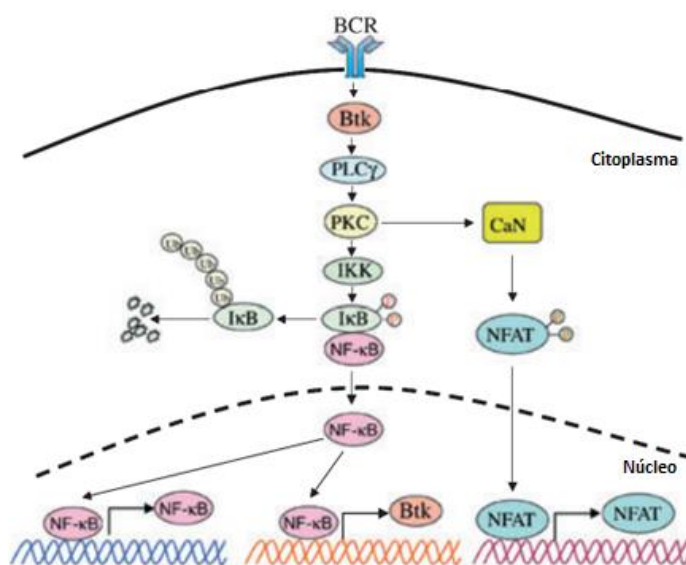


Figura 6. Representación de la regulación recíproca de la señalización de BTK y la señalización del factor nuclear κB (NF-κB). Imagen tomada y modificada de Mohamed, A. J. y cols.³⁴

Varios medicamentos se han aprobado en las últimas tres décadas para el tratamiento de LLC, como, por ejemplo, las inmuno-quimioterapias con fludarabina, ciclofosfamida y rituximab o clorambucilo con obinutuzumab, las cuales han demostrado ser tratamientos eficaces en mejorar la sobrevida de los pacientes con LLC (**Figura 7**).^{27,35} Aunque, en los últimos 2 años,

inhibidores específicos que interrumpen vías importantes en el desarrollo de esta enfermedad han comenzado a reemplazar las inmuno-quimioterapias en las indicaciones de primera y segunda línea.²⁷ Dentro de los inhibidores en la vía de señalización se encuentra ibrutinib, el cual, al igual que imatinib, es un inhibidor de tirosina quinasa citosólica. Específicamente, ibrutinib inhibe eficientemente a BTK deteniendo de esta forma la cascada de señalización río abajo que está implicada en proliferación y sobrevivencia de células B neoplásicas.^{27,36} BTK fue descubierta y estudiada por primera vez en una inmunodeficiencia llamada agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, enfermedad que resultaba en un sistema inmunológico deficiente en células B. Se descubrió que una mutación en esta proteína jugaba un rol importante en la maduración y función de este tipo de células, reteniéndolas en progenitores inmaduros en la médula ósea.³⁷ De esta manera, al estar relacionado con la maduración y vía de señalización de las células B, BTK se situó como un blanco terapéutico de interés farmacológico tanto para el tratamiento de LLC como también para enfermedades autoinmunes.^{38,39}

Ibrutinib fue uno de los primeros fármacos en ser utilizado para el tratamiento de la LLC como inhibidor de BTK y, actualmente, es utilizado como primera línea para el tratamiento de LLC. Este antineoplásico se une irreversiblemente mediante su fragmento aceptor de Michael al residuo C481, pero en consecuencia de su uso, mecanismos de resistencias como mutaciones en posición 481 de cisteína por serina (C481S) han aparecido, volviendo esta reacción menos concebida por la disminución del poder nucleofílico del grupo alcohol. Además, su alta afinidad por otras proteínas, como, por ejemplo, quinasas de la familia Tec y factores de crecimiento epidérmico, entre otros, volvió necesaria la búsqueda de nuevos fármacos como nuevos inhibidores selectivos de esta proteína.^{27,40,41} Acalabrutinib es un fármaco de segunda

generación aprobado por la FDA en el año 2017 para el tratamiento de LLC y de linfoma de células de manto (LCM). Esta molécula es más potente y selectiva hacia BTK que ibrutinib (**Figura 7**).⁴¹ A finales del 2016, se descubrió una nueva mutación que generaba resistencia tanto a ibrutinib como acalabrutinib, correspondiente a C481T, debido a la desaparición del grupo tiol donador de Michael, que conllevaba a la insensibilidad total a estos fármacos de inhibición irreversible. La aparición de resistencias a las drogas utilizadas hoy en día como primera y segunda línea en el tratamiento de esta enfermedad vuelve imperativo la búsqueda de nuevas moléculas inhibidoras de esta vía de señalización.^{42,43}

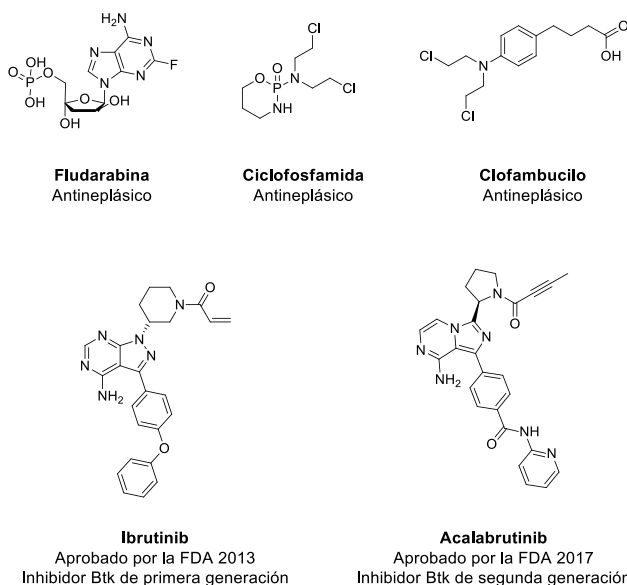


Figura 7. Estructuras químicas de antineoplásicos de primera línea e inhibidores de BTK, ibrutinib y acalabrutinib. utilizados en el tratamiento de LLC.

1.4 Desarrollo de nuevos compuestos como potenciales inhibidores de Bcr-Abl y BTK

Diversos compuestos han sido diseñados, sintetizados y evaluados como posibles inhibidores de manera independiente de las quinasas Bcr-Abl y BTK. La totalidad de estas moléculas corresponden a estructuras con un núcleo heterocíclico, encontrándose un vasto grupo de estudios que basan su esqueleto en pirimidinas, piridazinas o purinas.^{44–46} Este último heterociclo ha sido ampliamente utilizado en fármacos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, como se puede observar en la **Figura 8**^{47–49} debido a que este esqueleto ofrece un punto de partida beneficioso en el diseño de nuevos fármacos, ya que se encuentra relacionado en una gran variedad de procesos biológicos, es por ello que, este núcleo se considera un andamio privilegiado o “*privileged scaffold*”.⁵⁰ Sin embargo, no existe hasta el momento un fármaco aprobado para el tratamiento de la leucemia mieloide y/o linfocítica crónica conteniendo el heterociclo de purina.

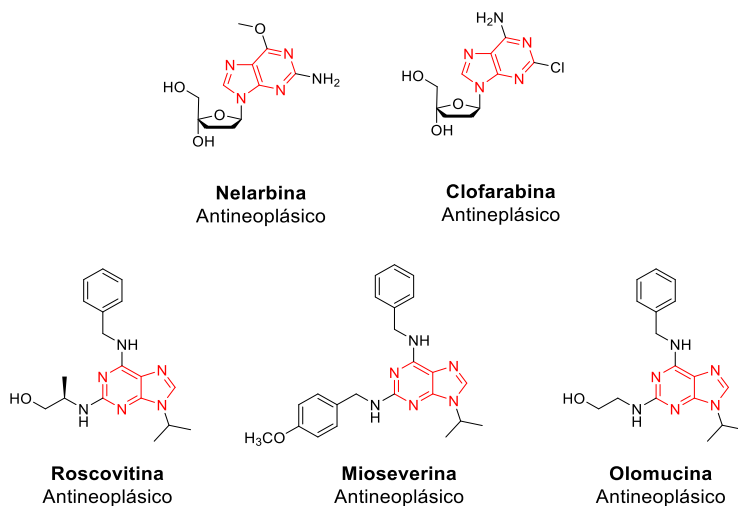


Figura 8. Estructuras químicas de purinas antitumorales y compuestos antineoplásicos aprobados por la FDA.

Pese a lo anterior, se han estudiado una extensa variedad de compuestos inhibidores de ambas proteínas en ensayos preclínicos, generando una valiosa información sobre patrones de sustitución en el esqueleto de purina.⁴⁵ Por ejemplo, Wang y colaboradores, descubrieron que en el compuesto AP-23464, sustituciones en C-6 de la purina con anilinas, eran de vital importancia debido a interacciones de tipo puente de hidrógeno entre el ligando y Met341 y Src, quinasa que posee alto grado de homología con Bcr-Abl. Por otro lado, sustituciones en N-9 del heterociclo, se orientaban al bolsillo hidrofóbico de la proteína, donde sustituyentes alquílicos y aromáticos de baja polaridad, con un donador de puente de hidrógeno en extremo de la cadena, incrementaban la afinidad por dicha proteína (**Figura 9**).⁵¹

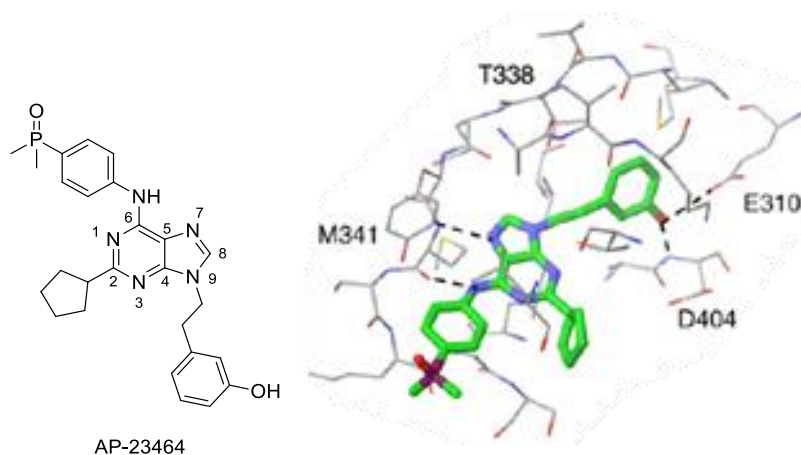
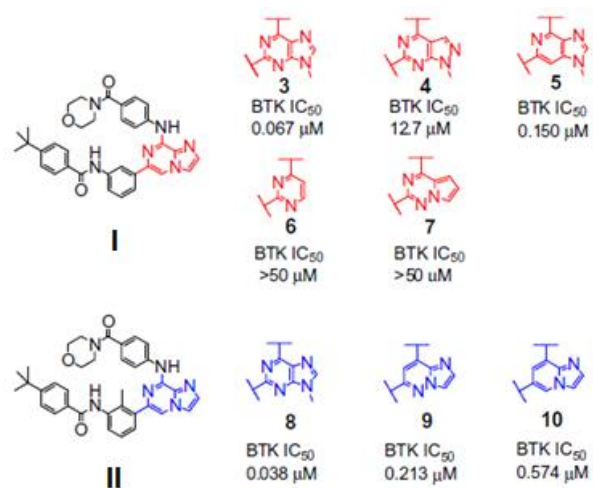


Figura 9. Izquierda) Estructura química de AP-23464 y numeración de cada átomo del centro de purina. Derecha) Modo de unión propuesto de AP-23464 a Src.

Imagen tomada y modificada de Wang Y. y col.⁵¹

En cuanto a BTK, Shi y colaboradores, estudiaron como la modificación de diversos heterociclos determinaba el grado de inhibición de BTK (**Figura 10A**). De aquí, encontraron que los derivados de purina presentaban los resultados con mayor potencia inhibitoria. Específicamente, ellos observaron que; el N-7 de la purina, junto con el N-H proveniente del fragmento anilínico en C-6, presentaban una interacción de tipo puente de hidrógeno con metionina 477 (**Figura 10B**). Compuestos que no posean este N-7 son inactivos sobre BTK. De esta misma manera, el reemplazo isostérico del N-H anilínico, por oxígeno, disminuye drásticamente el grado de inhibición de BTK.⁵²

A)



B)

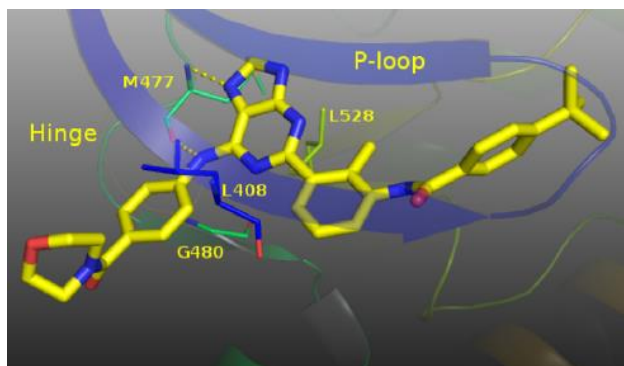


Figura 10. A) Optimización del núcleo heterocíclico de imidazolpirazina para el desarrollo de nuevos inhibidores de BTK y **B)** acoplamiento molecular de 8 y BTK. Imagen tomada y modificada de Shi Q. y cols.⁵²

Por otro lado, continuando con el programa de desarrollo de nuevos agentes antitumorales del tipo purinas trisustituidas, en nuestro grupo de laboratorio se diseñó, sintetizó y evaluó 14 nuevas moléculas como posibles inhibidores de Bcr-Abl y BTK. Interesantemente, se obtuvieron 3 nuevos compuestos inhibidores de estas quinasas en el orden nanomolar (**Figura 11**).⁵³ Además, estos tres compuestos fueron citotóxicos en modelos celulares *in vitro* de leucemia (valores de IC₅₀ entre 0.77-1.53 mM en líneas celulares K562 y RAMOS, las cuales son utilizadas como modelos *In vitro* para los estudios de las vías de señalización Bcr-Abl y BTK, respectivamente).

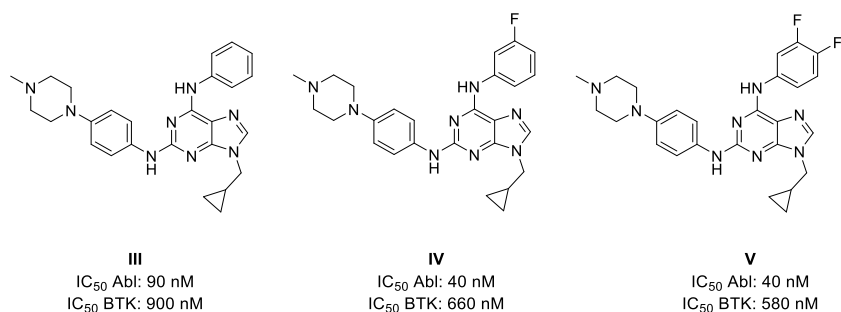
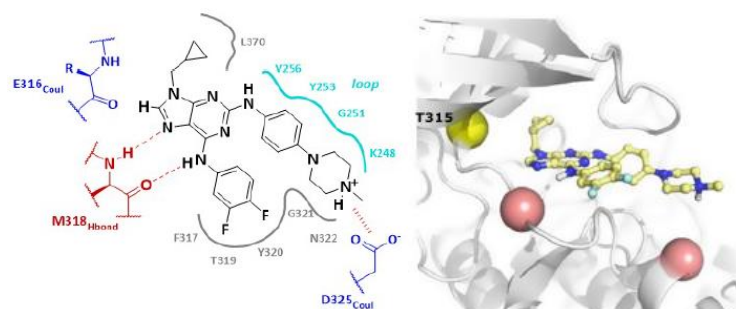


Figura 11. Estructuras de los mejores inhibidores de Bcr-Abl y BTK desarrolladas por nuestro grupo de investigación. Imagen tomada de Bertrand y cols.⁵³

Para comprender de mejor forma, los requisitos estructurales que determinan el grado de inhibición de estos tres compuestos sobre Bcr-Abl y BTK, se realizó un estudio de acoplamiento molecular entre el ligando **V** y las estructuras cristalinas de estas quinasas GQG (Bcr-Abl) y 3GEN (BTK). Del análisis respectivo complejo Bcr-Abl-**V**, según la **Figura 12A** se observaron: *i*) la formación de un puente de hidrógeno con Met318 y *ii*) las interacciones hidrofóbicas con el bolsillo interno del sitio de unión con los aminoácidos Val299, Met290, Ile316, Leu248 y Tyr253. Por otro lado, para el complejo BTK-**V**, según la **Figura 12B**, se observaron: *i*) una interacción electrostática con el Asp 539 y la piperazina protonada, *ii*) puentes de hidrógenos entre el carbonilo y el N-H anilínico del ligando y el NH de Met477 con N-7 del centro de purina. Adicionalmente, se observó que el sitio de unión de BTK presenta un bolsillo hidrofóbico más pequeño que Bcr-Abl, donde este bolsillo está compuesto por Val458, leu528, Val416 y Lys430. Finalmente, como se puede observar en la derecha de la **Figura 12**, tanto en Bcr-Abl como en BTK, el compuesto **V** interacciona con la proteína alejado de los aminoácidos reportados como

puntos de mutación relacionados a resistencias a los fármacos utilizados, T315 y C481, respectivamente.

A)



B)

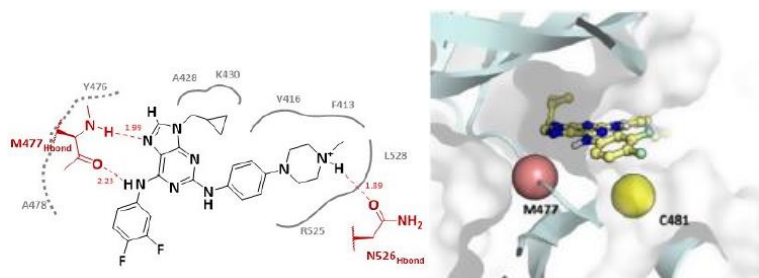


Figura 12. Acoplamiento molecular entre ligando **V** y A) Bcr-Abl (2GQG) y B) BTK (3GEN). Imagen tomada de Bertrand y cols.⁵³

Considerando los antecedentes antes mencionados y la investigación desarrollada por nuestro grupo de investigación en este tema, en este proyecto de tesis doctoral se propone: el diseño, síntesis, evaluación biológica y estudios de acoplamiento molecular de nuevos derivados de purinas trisustituídas como inhibidores de Bcr-Abl y BTK en su forma nativa, con el fin de aportar en el desarrollo de potenciales agentes quimioterapéuticos para el

tratamiento de tumores no sólidos, esencialmente leucemias (LMC y LLA). Además, como BTK está directamente relacionada en la maduración y diferenciación de los linfocitos B, estos compuestos podrían ser candidatos para el tratamiento de enfermedades inmunológicas tales como: Lupus, síndrome de Sjögren, artrosis reumatoide y urticarias.

2. Hipótesis del trabajo

Basados en estructuras químicas de fármacos usados en el tratamiento de enfermedades hematológicas, como la leucemia, nuevos inhibidores de Bcr-Abl y BTK y, compuestos provenientes de nuestro grupo de investigación con actividad en ambas proteínas, se propone la siguiente hipótesis para esta tesis doctoral:

La modificación química del anillo de purina en la posición C-6, por fragmentos derivados de anilina con diferentes patrones de sustituciones, sean estas incorporaciones de grupos atractores de electrones en *meta* para, extensión del sistema aromático por medio de algunos linkers, el aumento de hidrofobicidad unido al N-9 de la purina y alargamiento de la porción *N*-metilpiperazina del fragmento unido al C-2 de purina, permite generar un conjunto de compuestos, de donde se obtendrán nuevos potentes inhibidores de Bcr-Abl y BTK y con marcados efectos citotóxicos en modelos celulares de leucemia.

2.1 Investigación propuesta

Dado los antecedentes mencionados, esta tesis doctoral propone el diseño, síntesis, evaluación biológica y estudios de acoplamiento moléculas de nuevos inhibidores de las proteínas quinasas Bcr-Abl y BTK para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y linfocítica crónica, respectivamente, esquematizados como **series I – VI** (**Figura 13**).

Cada serie propuesta se basa a partir de un análisis estructural de diferentes inhibidores de las proteínas Bcr-Abl y BTK y el compuesto **V** como referencia, lo cual permitió se recoge en el **Esquema 1a-f** y se justifica a continuación:

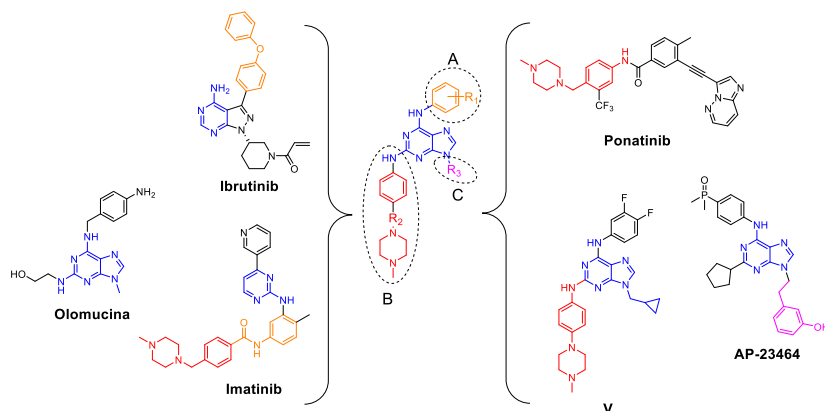


Figura 13. Estructuras químicas generales propuestas para nuevas moléculas inhibidores de Bcr-Abl y BTK.

- i. El núcleo de purina estará presente en todas las series de compuestos, debido a que derivados de este heterociclo presentan actividad sobre modelos tumorales incluyendo leucemia.
- ii. El fragmento A (R₁), correspondiente a la **serie I**, contendrá atractores

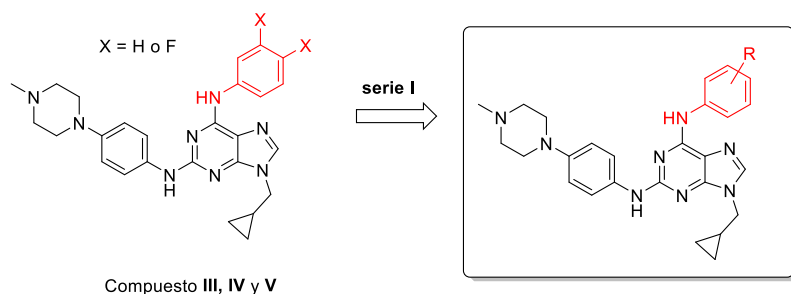
de electrones en posición *meta* y/o *para*, con el fin de evaluar el efecto inductor y/o resonante que causa sobre el hidrógeno del NH de esta anilina y su relación con la interacción puente de hidrógeno con Met318 y Met477 en Bcr-Abl y BTK, respectivamente. Se adicionará un grupo donador de densidad electrónica por inducción en posición *meta* para confirmar la hipótesis, manteniendo constante el resto del esqueleto de los compuestos **5a**, **5c** y **5d** de referencia (**Esquema 1a**).

- iii. El fragmento B (R₂) se compone de una extensión del grupo *N*-metilpiperazina, esto se basa en la distancia del puente iónico y de hidrógeno presentes en Bcr-Abl y BTK respectivamente. Se pretende acortar esta distancia incorporando un grupo carbonilo y un CH₂ entre el nitrógeno piperidínico y el anillo de benceno, determinando si se requiere mayor o menor rigidez en este segmento, manteniendo constante el resto del esqueleto de los compuestos **III**, **IV** y **V** de referencia. Esto dará a lugar a la **serie II (Esquema 1b)**.
- iv. El fragmento C (R₃) se compone de diferentes grupos alquílicos unidos al anillo de purina, manteniendo constante el resto del esqueleto de los compuestos **III**, **IV** y **V** de referencia. Se pretende estudiar el efecto que tendría la extensión de la cadena alquílica en la sustitución de N-9 de la purina sobre la inhibición de ambas enzimas como consecuencia de un incremento en las interacciones en el bolsillo hidrofóbico, lo que origina la **serie III (Esquema 1c)**.
- v. El nitrógeno 7 de purina será sustituido por CH para corroborar la importancia de este heteroátomo de esta posición en la inhibición de estas quinasas, manteniendo constante el resto del esqueleto de los compuestos **III**. Por otro lado, a partir de los compuestos **III**, **IV** y **V** de referencia, se hará un reemplazo del fragmento anilina por NH₂, ciclohexilamina y bencilamina, con el fin de corroborar la necesidad de

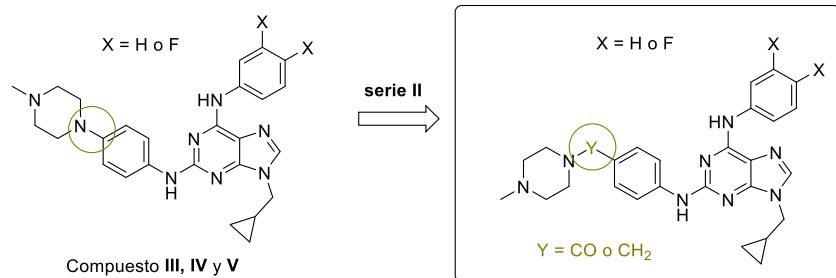
la conjugación entre en anillo purínico y anilínico en C-6. Dando a lugar la **serie IV (Esquema 1d)**.

- vi. En la búsqueda de selectividad entre Bcr-Abl y BTK, se adicionarán al Fragmento A extensiones del anillo de anilina presentes en diversos inhibidores de cada proteína, surgiendo así la **serie V**, con extensión en *meta* y *para* por un fragmento amida (**Esquema 1e**).
- vii. Finalmente, la extensión del Fragmento A con difeniléter procedente como un fragmento en común en diversos inhibidores de BTK (ibrutinib, zanubrutinib). Además, se sustituirá el oxígeno por diversos isósteros de este mismo para definir la importancia de este heteroátomo en la contribución espacial y electrónica del fragmento, originando la **serie VI (Esquema 1f)**.

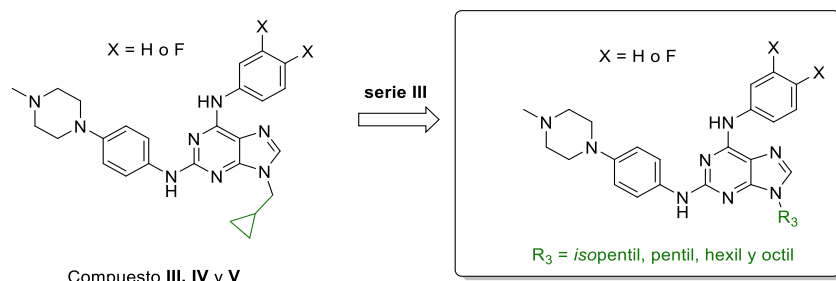
a)



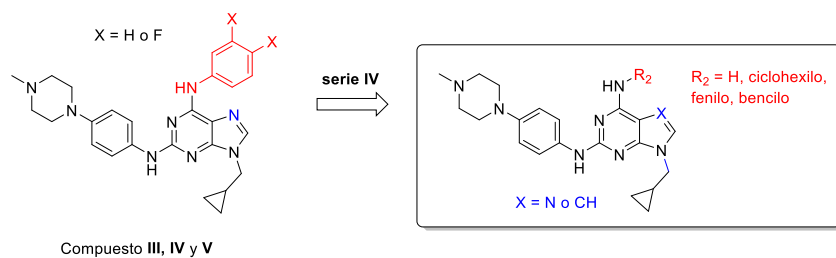
b)



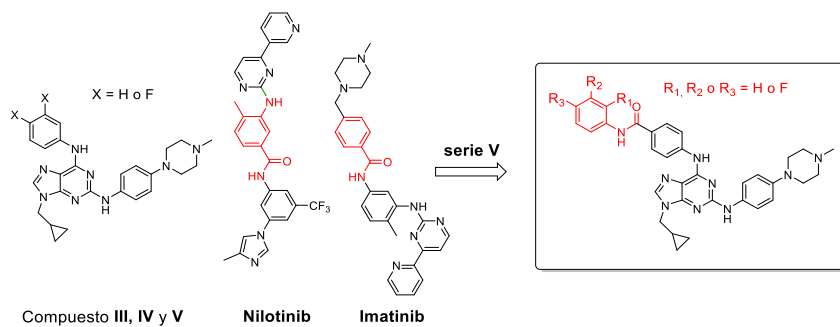
c)



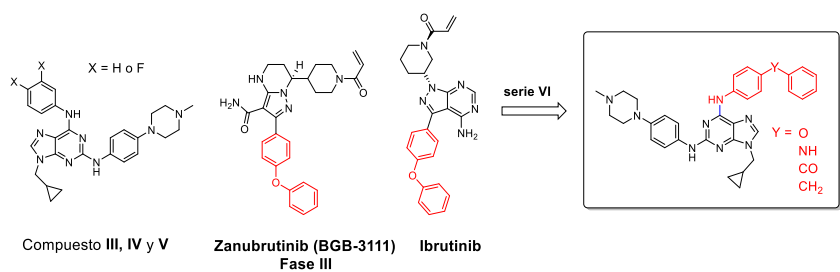
d)



e)



f)



Esquema 1. Estructuras químicas generales para los compuestos de las series I – VI como nuevos potentes inhibidores de Bcr-Abl y BTK. a) serie I, b) serie II, c) serie III, d) serie IV, e) serie V y f) serie VI.

3. Objetivos:

3.1 Objetivo general

Diseñar, sintetizar, realizar estudios biológicos e *in silico* de nuevos derivados de purinas 2,6,9-trisustituidas como inhibidores de las quinasas Bcr-Abl y BTK, en la búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas para la leucemia.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Objetivos sintéticos

1. Sintetizar los ligandos correspondientes a las **series I-VI**.
2. Caracterizar cada uno de los intermediarios y compuestos finales, mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

3.2.2 Objetivos biológicos

1. Evaluar la capacidad inhibitoria de los compuestos sobre Bcr-Abl y BTK, mediante ensayos dosis-respuesta en modelos enzimáticos.
2. Evaluar la citotoxicidad de los compuestos sintetizados, por métodos colorimétricos, en líneas celulares comerciales de células cancerígenas sanguíneas y en células no neoplásicas.
3. Evaluar los efectos en la señalización río abajo mediante técnicas inmuno western-blot.
4. Evaluar marcadores de muerte celular, tales como, retención del ciclo celular, activación de caspasas 3/7 y proteínas claves en procesos apoptóticos.

3.2.3 Objetivos computacionales

1. Realizar estudios de acoplamiento molecular para los ligandos de

mejor perfil farmacológico, con estructuras cristalinas de Bcr-Abl y BTK.

2. A partir de los resultados biológicos realizar un estudio 3D-QSAR, para comprender de forma cuantitativa la relación estructura-actividad en ambas proteínas.

4. Metodología

4.1 Información general

Los reactivos, solventes químicos y biológicos utilizados en este trabajo doctoral fueron adquiridos de fuentes comerciales como: Sigma Aldrich, Merck, AK Scientific y Bioslab. Los espectros ^1H , ^{13}C , ^{19}F , DEPT-135, COSY, TOCSY, HMQC, HSQC y HMBC de RMN fueron adquiridos mediante un espectrómetro Bruker Avance III HD400 (Alemania) a temperatura ambiente utilizando CDCl_3 o $\text{DMSO}-d_6$ como disolvente y TMS como estándar interno.

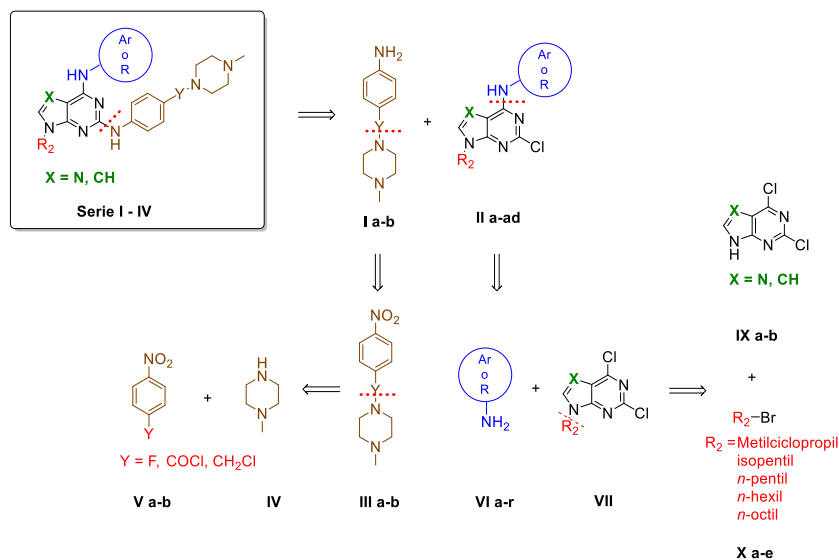
El seguimiento de las reacciones se efectuó por cromatografía en capa fina (CCF) sobre un soporte de aluminio de 0.2 mm de espesor con gel de sílica 60 254 PF y el análisis se realizó por la visualización con una lámpara de UV con emisión a 254 y 365 nm.

La separación y purificación de los compuestos se realizó mediante cromatografía en columna con gel de sílice tipo 60G de tamaño de partícula 70 – 230 mallas como fase estacionaria y fase móvil según se especifique en cada compuesto. Los puntos de fusión (p.f.) fueron determinados en un aparato modelo Stuart Scientific SMP3, no se encuentran corregidos y se expresan en grados Celsius ($^{\circ}\text{C}$).

Los espectros de masa se midieron con un espectrómetro de masa de alta resolución Exactive Plus Orbitrap, Thermofisher Scientific (Bremen, Alemania) para los compuestos finales y equipo UHPLC marca Eksigent acoplado a detector de masas marca ABSciex, modelo Triple Quad 4500 para los compuestos intermediarios.

4.2 Análisis retrosintético de los derivados I – IV

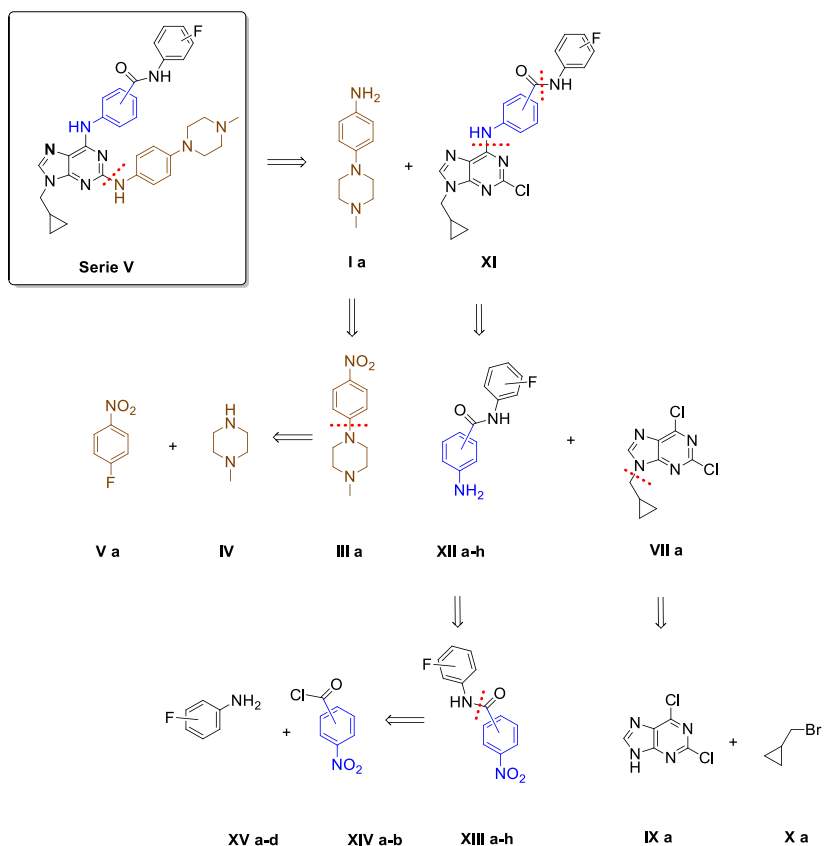
A través de un esquema retrosintético (**Esquema 2**), las moléculas objetivo podrían ser obtenidas mediante una desconexión del enlace carbono-nitrógeno del C-2 de la purina, a partir de sus equivalentes sintéticos piperazinanilina **I a-b** y purina trisustituida **II a-ad**. A su vez, **I a-b** se obtendría a través de una transformación de grupo funcional del equivalente **III a-b**, la cual se obtendría a partir de una desconexión en el enlace carbono-nitrógeno correspondiendo a los equivalentes piperazina **IV** comercial y nitro derivado **V a-b**. Por otro lado, **II** se produciría por una fragmentación del enlace carbono-nitrógeno en el C-6 del heterociclo, los cuales corresponderían a anilinas o aminas comerciales **VI a-r** y el precursor **VII**. Esta último, se obtendría a través de la purina o pirrolopirimidina disustituida comercial **IX a-b**, respectivamente y los distintos radicales alquilo **X** también comerciales.



Esquema 2. Análisis retrosintético para la obtención de los compuestos de las **series I – IV**.

4.3 Análisis retrosintético de los derivados V

A través de un esquema retrosintético (**Esquema 3**), las moléculas objetivo podrían ser obtenidas mediante una desconexión del enlace carbono-nitrógeno del C-2 de la purina, a partir de sus equivalentes sintéticos piperazinanilina **I a** y purina trisustituida **XI**. En donde **I a** será obtenido como se detalló para **serie I-IV**. Por otro lado, **XI** se produciría por una fragmentación del enlace carbono-nitrógeno en el C-6 de la purina, los cuales corresponderían a anilinas **XII a-h** y el precursor **VII a**. Esta último, se obtendría a través de la purina disustituida comercial **IX a**, respectivamente y bromuro de metilciclopropilo **Xa** también comercial. Las anilinas **XIII** se obtendrían a partir de una transformación de grupo funcional de los precursores **XIII a-h**, los cuales se generarían por una escisión del enlace amida de los equivalentes cloruros de nitrobenzoílo comerciales **XIV a-b** y anilinas comerciales **XV a-d**.

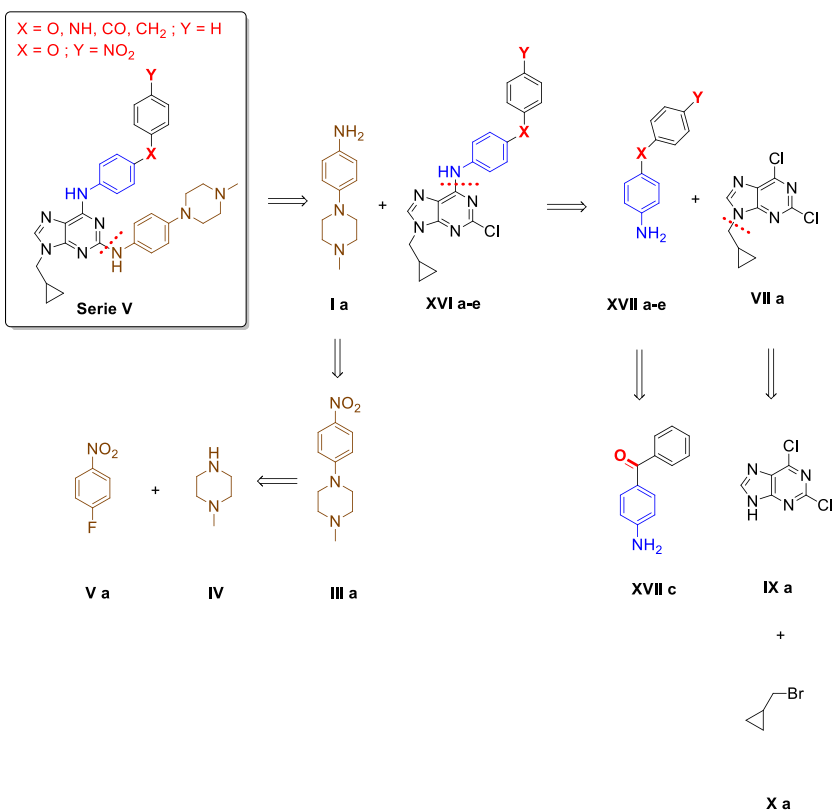


Esquema 3. Análisis retrosintético para la obtención de los compuestos serie V.

4.4 Análisis retrosintético de los derivados VI

Al igual que para la **serie V**, a través del esquema retrosintético (**Esquema 4**), las moléculas objetivo podrían ser obtenidas mediante una desconexión del enlace carbono-nitrógeno del C-2 de la purina, a partir de sus equivalentes sintéticos piperazinanilina **I a** y purina trisustituída **XVI a-e**. En donde **I a** será

obtenido como se detalló para **serie I-IV**. Por otro lado, **XVI a-e** se produciría por una fragmentación del enlace carbono-nitrógeno en el C-6 de la purina, los cuales corresponderían a anilinas **XII a-c, e** comerciales y el precursor **VII a**. Esta último, se obtendría como se detalló en la **serie V**. La anilina **XVII d** se obtendría a partir de una transformación de grupo funcional a partir de la anilina comercial **XVII c**.



Esquema 4. Análisis retrosintético para la obtención de los compuestos **serie VI**.

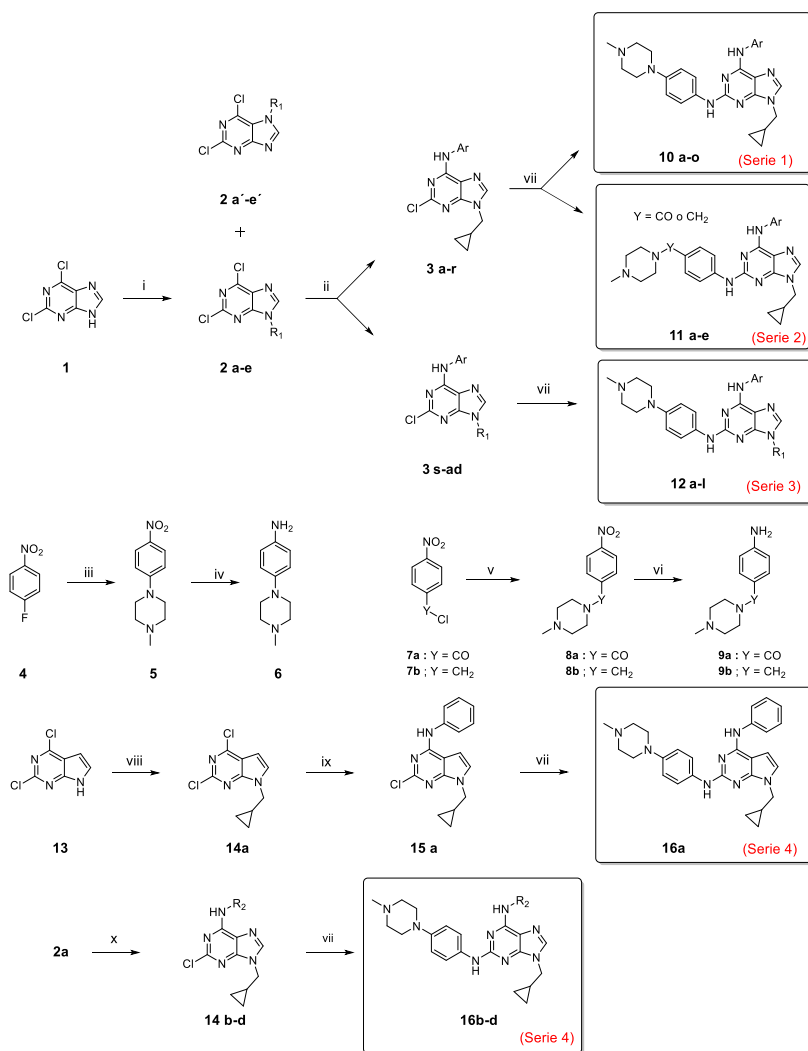
4.5 **Objetivo Específico 1.- Síntesis y caracterización de ligandos series I - VI**

A partir del esquema retrosintético planteado, se propone la ruta sintética para 49 nuevos compuestos correspondientes a derivados de purina trisustituídas **series I - VI**. A continuación, se presenta la ruta de síntesis de dichos derivados en los **esquemas 5 y 6**.

4.5.1 Derivados de las series I - IV

Como se puede observar en el **Esquema 5**, la ruta sintética comienza con la *N*-alquilación de la purina diclorada comercial **1** con los distintos radicales alquílicos propuestos y K_2CO_3 como base, generando los regioisómeros **2a-e** y **2a'-e'** en proporción 3:1, respectivamente.⁵⁴ Los derivados sustituidos en *N*-9 de la purina de interés fueron sometidos a una reacción de sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) con distintas aminas comerciales en *n*-butanol y diisopropilamina (DIPEA) como base, para la obtención de los compuestos **3a-ad**.^{53,54} Por otro lado, mediante una reacción S_NAr con 4-fluoronitrobenceno, *N*-metilpiperazina y K_2CO_3 en DMF a temperatura ambiente, se obtuvo el derivado **5**, el cual es posteriormente reducido con hidracina y Pd-C en etanol a reflujo, para dar a lugar el compuesto anilínico **6**. Por otra parte, mediante una reacción sobre adición-eliminación con cloruro 4-nitrobenzoilo **4a** y *N*-metilpiperazina, trietilamina (TEA) como base en DMF a temperatura ambiente para dar a lugar el derivado **8** que posteriormente es reducido a la anilina **9** con cloruro de estaño hidratado, Pd-C como catalizador en etanol a reflujo.^{55,56} Posteriormente, en convergencia con los sustratos **3a-ad** y el derivado **6**,

mediante una aminación de acoplamiento cruzado Buchwald-Hartwig, catalizada por paladio en medio básico se obtienen los compuestos finales **10a-o** y **12a-l**. De la misma manera, pero ocupando la anilina **9a-b** se obtienen los compuestos finales **11a-e**. Los compuestos de la **serie IV** se obtienen de forma similar, en donde en primera instancia se alquila el N-7 de la pirrolopirimidina **13** con bromuro de metilciclopropilo y K_2CO_3 para dar a lugar al intermediario **14a**, el cual es sometido a una $SNAr$ con anilina para obtener el derivados **15a**, por otro lado, los derivados **14b-d** son sintetizados desde la purina alquilada **2a**, sustituyendo en C-6 con amonio o aminas alifáticas, donde posteriormente estos derivados son catalizados en presencia de paladio mediante un acoplamiento cruzado Buchwald-Hartwig para obtener los compuestos finales **16a-c**.^{53,57-59}

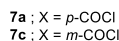


Esquema 5: Reactivos y condiciones: i) Haluro de alquilo, DMF, t.a., 12 h. ii) Anilina, DIPEA, *n*-butanol, reflujo, 12 h. iii) *N*-metilpiperazina, K₂CO₃, DMF, t.a., 2 h. iv) Hidracina, Pd-C, etanol, 70 °C, 2 h. v) *N*-metilpiperazina, TEA,

DMF, t.a., 2 h. vi) H₂ (g), Pd-C, etanol, reflujo, 2 h. vii) **6** o **9a**, Pd(OAc)₂, XantPhos, K₂CO₃ 2 M, dioxano, 2 h, MW, 50 W. viii) bromuro de metilciclopropilo, DMF, t.a., 12 h. ix) Anilina, DIPEA, *n*-butanol, reflujo, 12 h. x) amina comercial, DIPEA, *n*-butanol, reflujo, 12 h.

4.5.2 Derivados de la serie V - VI

Como se puede apreciar en el **Esquema 6**, la síntesis de la **serie V** se desarrolla de la misma manera **que serie I-IV**, partiendo desde la purina alquilada **2** sintetizada anteriormente en **serie I**. Adicionalmente, se sintetizaron las aminobenzamidas a utilizar mediante una reacción sobre cloruro de nitrobenzoílo **4a-b** y las anilinas respectivas para dar los compuestos **17a-h** con una posterior reducción con hidrógeno en paladio-carbono activado obteniéndose las anilinas con anillo extendido objetivo **18a-h**. Luego se realizó una reacción S_NAr entre las aminobenzamidas sintetizadas **18a-h** en *n*-butanol y DIPEA a reflujo para obtener los productos de **21a-h**, respectivamente. Posteriormente, la aminación Buchwald-Hartwig con los intermediarios **21a-h** y la anilina **6** sintetizada previamente, da a lugar los compuestos finales **23a-h**. Por otro lado, la **serie VI** se desarrolla de manera similar, comenzando con la purina alquilada **2a**, siendo sustituida mediante S_NAr con las distintas anilinas comerciales para dar a lugar a los intermediarios **22a-e**, en donde 4-bencilanilina **20** se obtiene a partir de la anilina comercial **19** mediante una reacción Wolff-Kishner con hidracina, dietilenglicol (DEG) a 200 °C.^{60,61} Por último, los derivados **22a-e** se hicieron reaccionar en un acoplamiento cruzado Buchwald-Hartwig para la obtención de los compuestos finales **24a-e**.



42

4.6 Objetivo Específico 2.-Estudios biológicos

4.6.1 Ensayos de inhibición enzimática

Las quinasas Abl1 y Cdk-2/ciclina E se produjeron internamente en el laboratorio Growth Regulator, del Dr. Vladimir Krystof en Universidad de Palacky, Olomouc, Republica Checa, y BTK se adquirió de ProQinase. Las reacciones de la quinasa se ensayaron con un sustrato adecuado (péptido GGEAIYAAPFKK 500 μ M para Abl, histona H1 1 mg/mL para CDK2, poli(Glu:Tyr; 4:1) 100 μ M) en presencia de ATP (1 μ M para Abl, 15 μ M para Cdk-2 y BTK), 0,05 μ Ci [γ -33P]ATP y el compuesto de prueba en un volumen final de 10 μ L de buffer de reacción (60 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 3 mM $MgCl_2$, 3 mM $MnCl_2$, 3 μ M ortovanadato de sodio, DTT 1,2 mM, 2,5 μ g/50 μ L PEG20.000). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 5 μ L de solución acuosa al 3 % de H_3PO_4 . Las alícuotas se colocaron sobre fosfocelulosa P-81 (Whatman), se lavaron 3 veces con solución acuosa al 0,5 % de H_3PO_4 y finalmente secado al aire. La inhibición de la quinasa se cuantificó utilizando un analizador de imágenes digitales FLA-7000. La concentración de los compuestos de prueba necesarios para reducir la actividad en un 50 % se determinó a partir de las curvas de respuesta a la dosis y se notificó como el valor IC_{50} .

4.6.2 Cultivo celular

Las líneas celulares humanas se obtuvieron de German Collection of Microorganisms and Cell Cultures y se cultivaron de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las células MV4-11 se mantuvieron en medio

RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Las células CCRF-CEM se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 20 %, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). La línea celular K562 se cultivó en DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Las células Ramos (obtenidas de DSMZ) se mantuvieron en IMDM suplementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/mL). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5 %.

4.6.3 Ensayos citotóxicos

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con resazurina, una sonda indicadora para medir las reacciones de oxidación-reducción que ocurren en las mitocondrias de las células vivas. Las células se trataron por triplicado con seis dosis diferentes de cada compuesto durante 72 h. Después del tratamiento, se añadió una solución de resazurina (Sigma Aldrich) durante 4 h y se midió la fluorescencia de resorufina correspondiente a la cantidad de células vivas a 544 nm/590 nm (excitación/emisión) utilizando un lector de microplacas Fluoroskan Ascent (Labsystems). El valor GI₅₀, la concentración de fármaco letal para el 50 % de las células, se calculó a partir de las curvas de respuesta a la dosis.

4.6.4 Citometría de flujo

Se sembraron células K562 y RAMOS, después de un período de preincubación, se trataron con compuestos ensayados durante 24 h. Después de la tinción con yoduro de propidio, el contenido de ADN se analizó mediante

citometría de flujo utilizando un láser de 488 nm (BD FACS Verse con software BD FACSuite™, versión 1.0.6.). La distribución del ciclo celular se analizó utilizando ModFit LT (Verity Software House).

4.6.5 Inmunotransferencia

Se prepararon los lisados celulares, en los cuales las proteínas fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Después del bloqueo con BSA, la incubación durante la noche con anticuerpos primarios específicos y la incubación con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, se detectó la actividad de la peroxidasa con reactivos Super-Signal West Pico (Thermo Scientific) utilizando una cámara CCD LAS-4000 (Fujifilm). Los siguientes anticuerpos específicos se adquirieron de Señalización celular anti-STAT5, anti-fosfo-STAT5 Y694, anti-ERK1/2, anti-fosfo- ERK1/2 T202/Y204, anti-MEK1/2 (D1A5), antifosfo-MEK1/2 S217/221 (41G9), anti-AKT (C67E7) y antifosfo-AKT S473 (D9E).

4.6.6 Ensayo de Caspasa 3/7

Las células K562 y RAMOS se cultivaron en una placa de 96 pocillos durante la noche. Al día siguiente, las células se trataron con concentraciones crecientes de los compuestos **10i** y **12j** durante 24 h. Después de la incubación, se agrega 3x buffer de ensayo de caspasa-3/7 (150 mM HEPES pH 7,4, 450 mM NaCl, 150 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 1,2 mM EGTA, 1,5 % Nonidet P40, 0,3 % CHAPS, 30 % sacarosa, 30 mM DTT, PMSF 3 mM) que contenía sustrato peptídico 150 µM Ac-DEVD-AMC (Enzo Life Sciences) y,

después de 2 h de incubación, se midió la actividad de caspasa-3/7 utilizando un lector de microplacas Fluoroskan Ascent (LabSystems) a 346 nm/442 nm (excitación/emisión).

4.7 Objetivo específico 3.- Estudios *in silico*

4.7.1 3D-QSAR

4.7.1.1 Procesamiento de datos

Los estudios de CoMFA se realizaron en el conjunto completo de 31 derivados de purina (**Tabla S3, Anexo 8.4.1**). La actividad biológica IC₅₀ se convirtió en valores de pIC₅₀ (-log IC₅₀, en concentración molar). Los compuestos se dividieron en conjuntos de entrenamiento y prueba en una proporción de 80:20, respectivamente. En todos los casos, el rango biológico de pIC₅₀ estuvo entre 2 y 3 unidades logarítmicas. Los estudios de CoMFA se lograron con el software Sybyl X-1.2 instalado en Windows 10 en un computador con CPU Intel Core i7.

Para obtener los mejores conformeros para cada purina, estos se dibujaron en ChemDraw y se sometieron a una optimización geométrica preliminar utilizando mecánica molecular MM2 que se implementó en el software ChemBio3D. Después de esto, los compuestos se minimizaron mediante el método de Powell implementado en Sybyl (1000 iteraciones y 0,005 Kcal/molÅ como gradiente de terminación). Luego, se asignaron cargas MMFF94 a cada átomo en cada molécula. Las estructuras minimizadas se superpusieron con el protocolo Distill (**Figura 1S, Anexo 8.4.1**).

4.7.1.2 Cálculos de campo CoMFA

Después de la minimización de las moléculas, se calcularon los potenciales estéricos y electrostáticos para cada uno de los compuestos finales, dentro de una red virtual de 2 Å de separación. Para ello, se utilizó una sonda representando a un átomo (carbono sp³ con un radio de Van der Waals de 1,52 Å y una carga de +1.0), en donde, 30,0 kcal/mol fue el valor límite para la visualización de ambos campos estéricos y electrostáticos.

4.7.1.3 Validación interna y análisis de los Mínimos Cuadrados Parciales (MCP)

Se utilizó el método estadístico de mínimos cuadrados parciales (MCP) para buscar correlaciones entre las variables CoMFA (potenciales estérico y electrostático) y las variables biológicas dependientes de la actividad). Para encontrar el mejor modelo, el análisis de validación cruzada se ejecutó a través de *Leave-One-Out* (LOO) y distancia de muestra MCP [DMMCP]. De este análisis se obtuvieron q^2 y N (número óptimo de componentes) para cada modelo. El valor de q^2 debe ser superior a 0,5 y es un indicador de la capacidad predictiva interna del modelo. Se calcula a partir de la siguiente Ecuación (1):

$$q^2 = 1 - \frac{\sum (y_i - y_{pred})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad (1)$$

En donde y_i , $\bar{y}$ e y_{pred} son los observadores, medias y actividades predictivas el conjunto de entrenamiento, respectivamente.

4.7.1.4 Validación externa

Los modelos fueron sometidos a una validación adicional a través de la evaluación de la predicción de actividad para el conjunto de prueba. Se utilizó el método descrito por Golbraik, que propone que un modelo es adecuado si cumple los siguientes criterios:

$$q^2 > 0,5 \quad (2)$$

$$r^2 > 0,6 \quad (3)$$

$$0,85 \leq k \leq 1,15 \text{ o } 0,85 \leq k' \leq 1,15 \quad (4)$$

El cumplimiento de estos valores es fundamental para garantizar una adecuada capacidad predictiva externa de los modelos.

4.7.2 Acoplamiento molecular

Los estudios de modelación molecular se realizaron utilizando Schrödinger Suite 2021-1. Todas las minimizaciones se realizaron utilizando el campo de fuerza OPLS4. El cristal de rayos X de la estructura de Bcr-Abl (PDB ID: 2GQG; resolución: 2,40 Å) y BTK (PDB ID: 4OT5; resolución: 1,55 Å) co-cristalizados con sus respectivos inhibidores se descargaron de la base de datos de proteínas (<https://www.rcsb.org/> (consultado el 5 de marzo de 2021)).^{62,63} Primero, las moléculas de agua y los ligandos que no participaban en la unión al sitio activo se eliminaron. Luego, la estructura de la enzima se preparó usando el módulo de preparación de proteínas, donde los aminoácidos que faltan se agregaron usando el programa Prime, los

aminoácidos polares se protonaron a pH 7.0, y los hidrógenos de las proteínas se redujeron al mínimo.^{64,65} Los ligandos co-cristalizados se usaron para preparar la rejilla del sitio de unión para el acoplamiento molecular. Primero, se utilizó el método de acoplamiento (PE) de "Precisión estándar" para generar 20 poses por ligando. Luego, las mejores poses se refinaron con el "*Xtra Pretition*" (XP) método del programa Glide.^{66,67} El método de acoplamiento se validó por primera vez mediante autoacoplamiento del ligando cocrystalizado al sitio activo de la enzima. Esto resultó en un acoplamiento pose con un RMSD inferior a 0,5 Å de la pose del ligando co-cristalizado (consulte la **Figura S2, Anexo 8.4.1**). A continuación, se utilizó el protocolo de acoplamiento molecular validado para estudiar el ligando-proteína interacciones para los compuestos **10i** y **12j** en el sitio activo de la enzima y predecir su unión patrón (Para obtener más detalles, consulte **Anexos 8.4**).

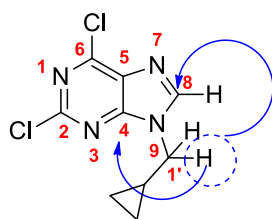
5. Resultados y discusión

1.1. Síntesis de los compuestos propuestos

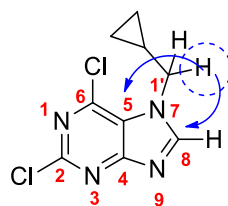
La síntesis de purinas 2,6,9 trisustituidas de las **series I-VI** están descritas en el capítulo IV y caracterizadas en el **Capítulo 8.1**, material anexo.

5.1.1 Obtención de los derivados **2a-e** y **2'a-e**: Reacción de *N*-alquilación

El primer paso de reacción para obtener las moléculas propuestas de las **series I-III** contempló una *N*-alquilación sobre el anillo de purina con diferentes halogenuros de alquilo en condiciones básicas, en DMF como solvente a temperatura ambiente para dar los derivados *N*-9 y *N*-7 alquilados **2a-e** + **2'a-e** en proporción 3/1 respectivamente. Este hallazgo se logró confirmar mediante el aislamiento de todos los dos compuestos del crudo de reacción mediante cromatografía en columna con sílica gel. Con la ayuda de un análisis de espectroscopía bidimensional por HMBC, se logró caracterizar cada regioisómero presente en el anillo de purina. El análisis espectroscópico del compuesto **2a**, a modo de ejemplo de los compuestos alquilados, indica que en el regioisómero *N*-9-alquilado la señal del protón H-1' a 4.11 ppm muestra un acoplamiento con la señal del C-4 a 153.45 ppm y con la señal del C-8 a 145.47 ppm (**Figura 14 A y C**); sin embargo, en el regioisómero *N*-7-alquilado la señal del protón H-1' a 4.33 ppm aparece con una señal del C-8 a 149.70 ppm y con el C-5 a 121.62 ppm como se representa en la **Figura 14 B y D**.

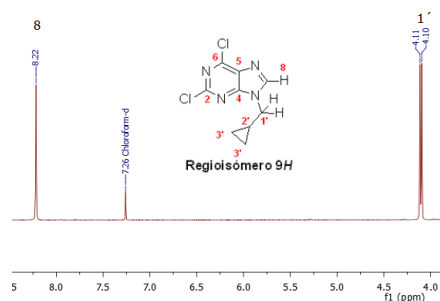


Regioisómero 9H

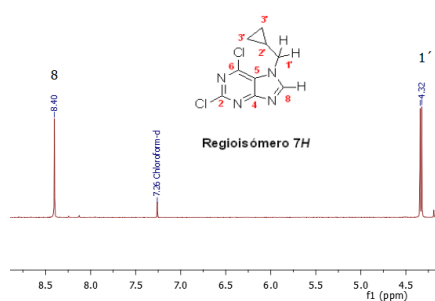


Regioisómero 7H

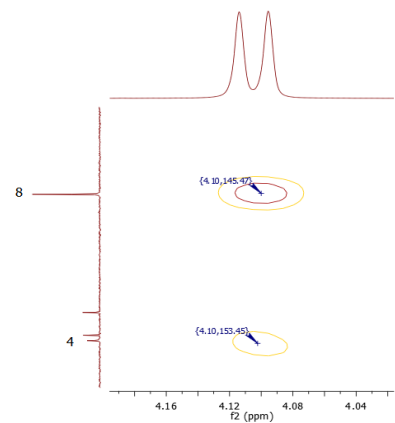
A



B



C



D

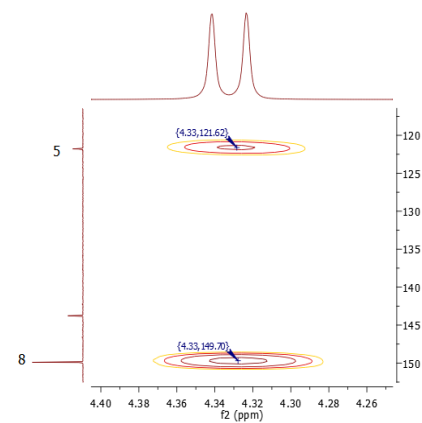
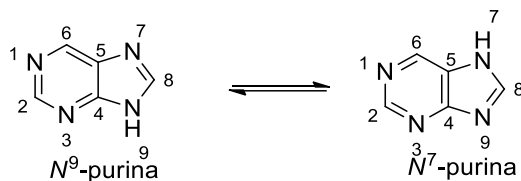


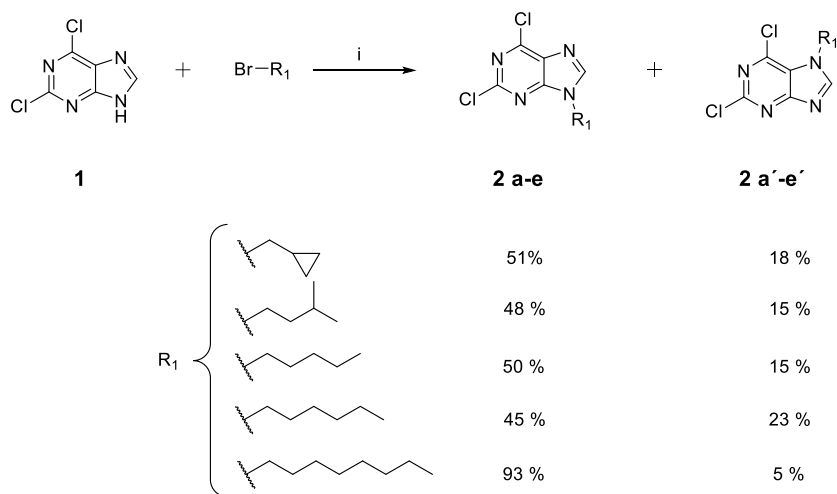
Figura 14. Representación de los regioisómeros N-9 y N-7-alquilados. **A y B)** muestra el ^1H RMN para ambos regioisómeros. **C y D)** muestra el análisis por HMBC de ambos regioisómeros indicando la diferencia en la correlación H-1' vs C-8, C-5 y C-4, lo que conlleva a una asignación espectral inequívoca.

La obtención de ambos regioisómeros en la etapa de *N*-alquilación se debe a que el anillo de purina presenta una tautomería en el anillo de imidazol, lo que conlleva a que se formen ambos productos de reacción (**Esquema 7**). Esta tautomería no se presenta en los nitrógenos N-1 o N-3, debido a que el par electrónico de estos heteroátomos no se encuentran participando de la resonancia, por lo que la obtención de 1*H*-purina o 3*H*-purina rompe la aromaticidad del sistema, siendo termodinámicamente desfavorable estas sustituciones.⁶⁸



Esquema 7. Equilibrio tautomérico de purinas.⁶⁸

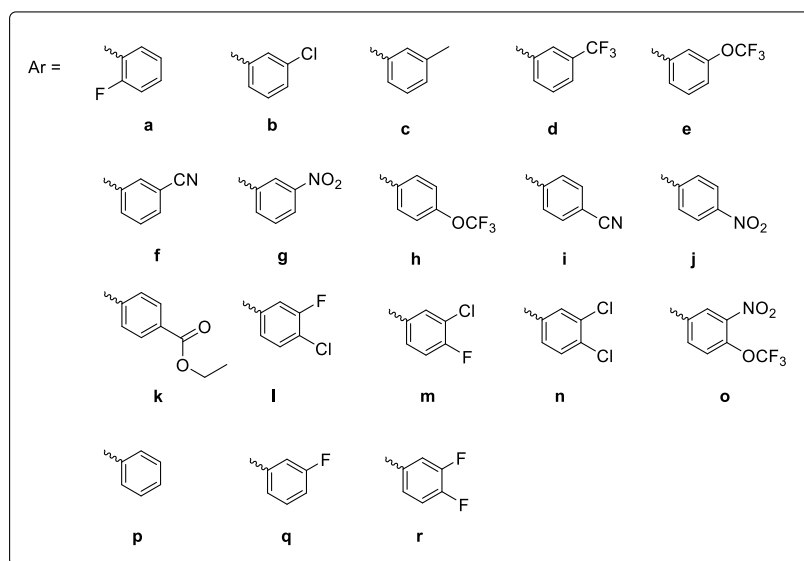
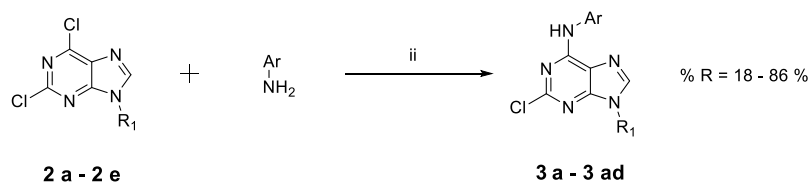
Esta misma metodología se utilizó para la síntesis caracterización y determinación de los regioisómeros *N*-7 y *N*-9 de todos los derivados alquílicos de purina **2a-e** y **2a'-e'**, como se puede apreciar en el **Esquema 8**.



Esquema 8: Reactivos y condiciones: i) K₂CO₃, DMF, t.a., 12 h.

5.1.2 Obtención de los intermediarios **3a-ad** (series I, II y III): Sustitución Nucleofílica Aromática (S_NAr)

El siguiente paso de reacción para acceder a derivados **3a-ad** fue a través de una sustitución nucleofílica aromática sobre el C-6 del heterociclo de purina con diferentes anilinas. Se utilizó como solvente *n*-butanol por 12 h a reflujo y una base no nucleofílica voluminosa como DIPEA para evitar que exista competencia entre la base y las aminas presentes en el medio de reacción. El rendimiento de la reacción fue entre 18 - 86 %, como se puede apreciar en el **Esquema 9**.



Esquema 9: Reactivos y condiciones: ii) Anilina, DIPEA, *n*-butanol, reflujo, 12 h.

En el espectro de ^1H RMN de la **Figura 15** se observan las señales características para el compuesto **3f**, a modo de ejemplo de esta serie, las cuales contemplan las señales del anillo de anilina 8.19 – 7.35 y el N-H anilínico que integra para 1 protón en 8.62 ppm y el desplazamiento químico $\Delta = -0.024$ ppm del C-H de purina en 7.98 ppm desde 8.22 ppm del precursor diclorado.

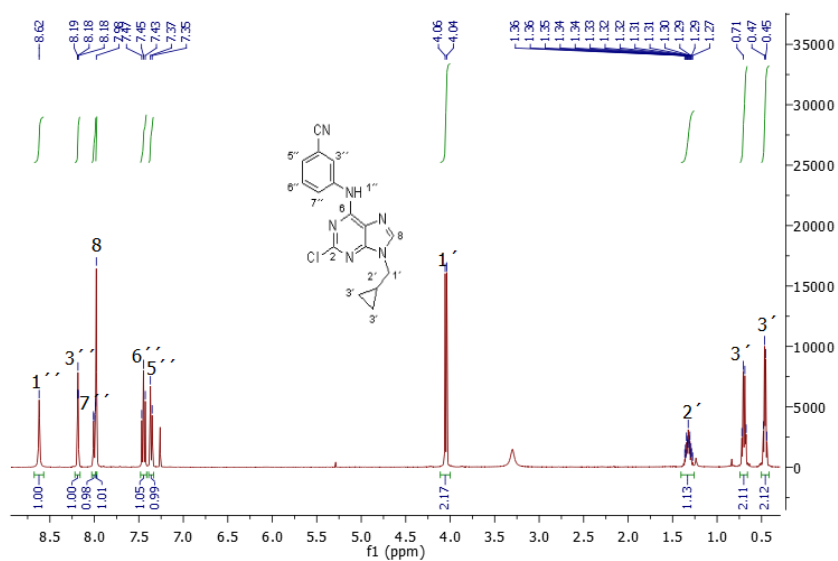


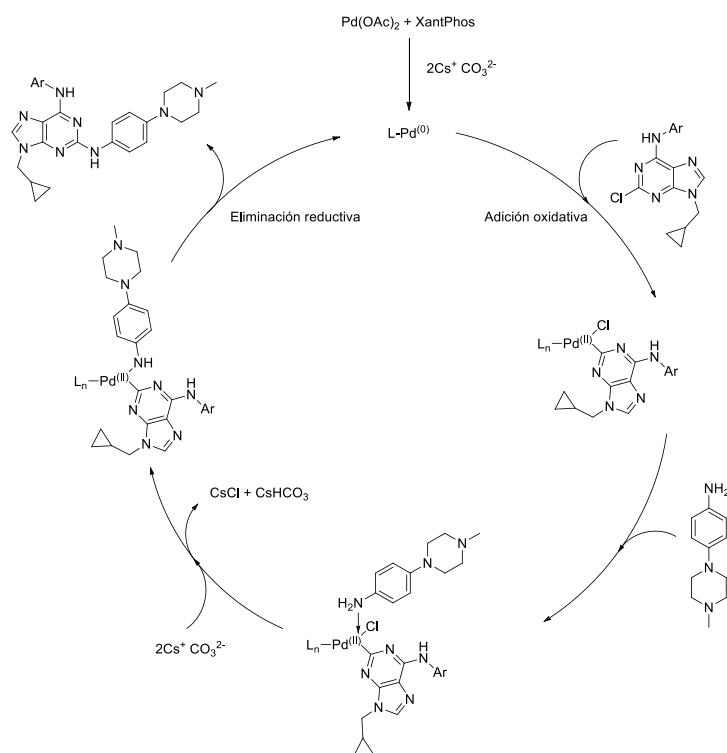
Figura 15. Espectro de RMN ^1H del compuesto **3f**.

Los análisis espectroscópicos, confirman que los 30 compuestos **3a–ad** fueron obtenidos con un rendimiento de reacción que varió entre 18 - 86 %. Las propiedades espectroscópicas son descritas en la sección **8.2 y 8.3 Material Anexo**.

5.1.3 Obtención de los derivados finales 10a–o, 11a–e y 12a–l (series I, II y III): Reacción de acoplamiento cruzado de Buchwald-Hartwig

El último paso en la ruta sintética propuesta comprende la formación de un enlace carbono-nitrógeno a través de la reacción de Buchwald-Hartwig. Esta reacción implica la formación del catalizador de paladio (0) (Pd^0) *in situ* debido

a que es el metal de transición activo en el ciclo catalítico. Para que la reacción, mediante el sustrato utilizado $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, funcione, el paladio debe ser reducido a Pd^0 , lo cual se logra adicionando 2 equivalentes, con respecto al acetato de paladio, de una fosfina para que mediante la acción de la base carbonatada sea oxidada formando óxido de fosfina y Pd^0 . De esta manera, el primer paso del ciclo catalítico de la reacción de Buchwald-Hartwig es la adición oxidativa del Pd^0 al haluro de arilo, generando la especie de Pd^{II} . En el segundo paso, la amina se incorpora al ciclo uniéndose al Pd^{II} desplazando al cloro mediante una transmetalación del halógeno hacia el cesio. Por último, la eliminación reductiva da como resultado la formación del enlace C-N deseado, como se muestra en el **Esquema 10**.

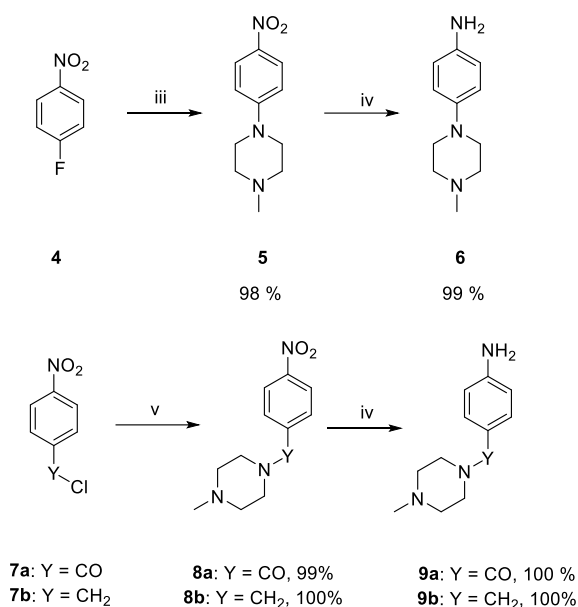


Esquema 10. Mecanismo catalítico Buchwald-Hartwig, acoplamiento carbono-nitrógeno catalizada por paladio. Imagen diseñada a partir de referencia J. Hartwig.⁵⁸

La síntesis de los compuestos finales se lleva a cabo en un vial de microondas de 10 mL en donde se agrega acetato de paladio y 9,9-dimetil-4,5-bis(difenilfosfin)xanteno (Xantphos), ambos comerciales, en *p*-dioxano a temperatura ambiente, luego se agrega la anilina **6**, **9a** o **9b**, según corresponda, el derivado de purina y una disolución de carbonato de potasio 2 M. Mediante el uso de calentamiento por microondas, el tiempo de reacción se reduce considerablemente obteniéndose rendimientos similares a los

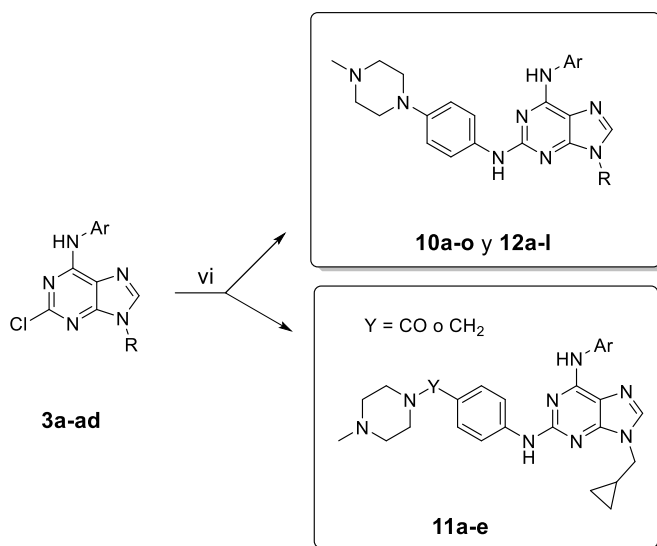
obtenidos por calentamiento convencional.⁶⁹

La anilina **6** fue sintetizada previamente a partir del derivado 4-fluoronitrobenceno y *N*-metilpiperazina mediante una sustitución nucleofílica en DMF a temperatura ambiente. Posterior a la purificación del derivado nitrado **5** con un rendimiento del 98 %, se procedió a su reducción con hidracina en etanol y Pd-C activado, reflujo por 2 horas, para dar la anilina **6**. Por otro lado, la anilina **9a–b** fue sintetizada a partir del sustrato cloruro de 4-nitrobenzoilo o bromo 4-nitrobencilo, mediante una adición-eliminación de *N*-metilpiperazina, utilizando TEA como base en DMF por 2 horas. Tras la filtración se obtiene el compuesto puro **8a** con 99 % de rendimiento y **8b** con 100 %, que es reducido en las mismas condiciones que el derivado **5**, para dar la anilina **9a** y **9b** correspondiente, **Esquema 11**.



Esquema 11: *Reactivos y condiciones:* iii) *N*-metilpiperazina, K₂CO₃, DMF, t.a., 2 h. iv) Hidracina, Pd-C, etanol, 70 °C, 2 h v) *N*-metilpiperazina, TEA, DMF, t.a., 2 h.

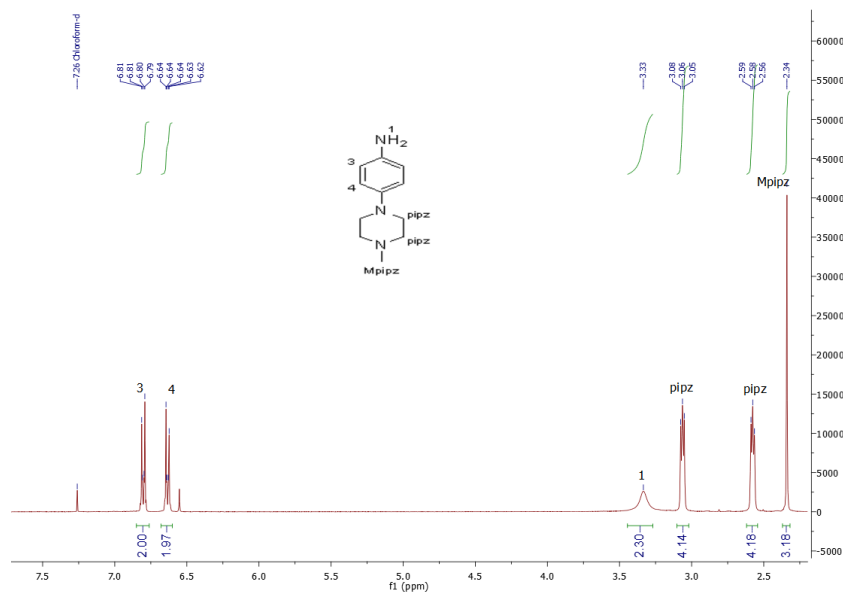
Las tres anilinas **6**, **9a–b** fueron obtenidas al 100 % de rendimiento en su procedimiento de reducción y fueron utilizadas inmediatamente en el paso siguiente, debido a problemas de inestabilidad frente a la luz en periodos cortos de tiempo, **Esquema 12**. El espectro de ¹H RMN del compuesto **6**, a modo de ejemplo de estas anilinas, muestra el sistema *orto-para* sustituidos de la anilina en 6.80 y 6.63 ppm, además se aprecia los dos hidrógenos del NH₂ en 3.33 ppm, por otro lado, los dos multipletes en 3.06 y 2.58 ppm correspondientes a los cuatro CH₂ del anillo de piperazina y tres hidrógenos en 2.34 ppm correspondientes al *N*-metilpiperazina, como se muestra en la **Figura 16A**.



Esquema 12: Reactivos y condiciones: vi) **6 o 9a-b**, Pd(OAc)₂, XantPhos, K₂CO₃ 2 M, dioxano, 2 h, 100 °C, Microondas, 50 W, 20 – 66 %.

Todos los productos fueron purificados a través de una columna de sílica gel, obteniendo rendimientos de reacción entre 20 – 66 %. El espectro de ¹H-RMN del derivado **10f** (**Figura 16B**), a modo de ejemplo de esta serie, muestra la aparición de dos dobletes aromáticos en 7.53 y 6.97 ppm que integran para dos cada uno, correspondientes al sistema *orto-para* sustituidos de la anilina sustituyente en C-2 de la purina. Además, la aparición de un singlete en 7.17 ppm correspondiente al NH 1''' de esta anilina con un desplazamiento químico de $\Delta = 3.84$ ppm. Por otra parte, en la zona alifática aparecen dos multipletes que integran para cuatro hidrógenos cada uno, correspondientes a los hidrógenos del anillo de piperazina y de un singlete a 2.35 ppm que integra para tres hidrógenos correspondiente al *N*-metilpiperazina.

A



B

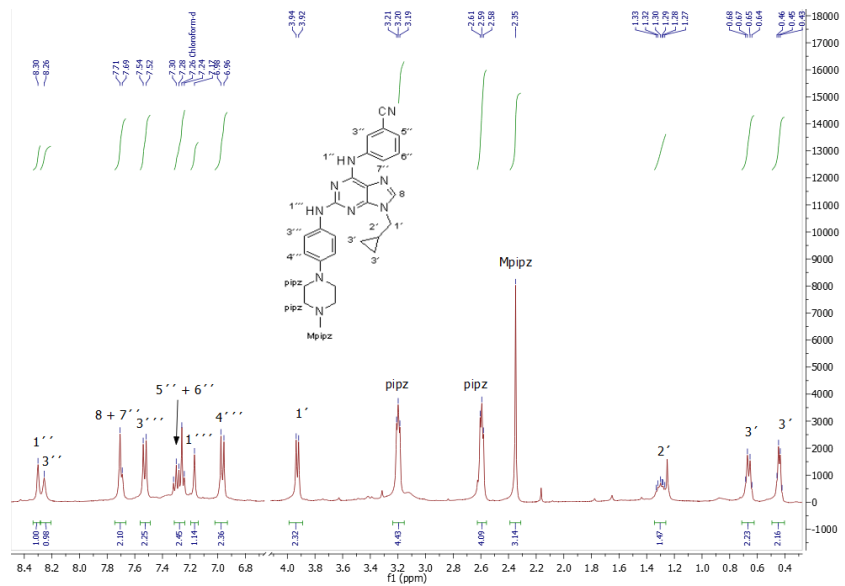
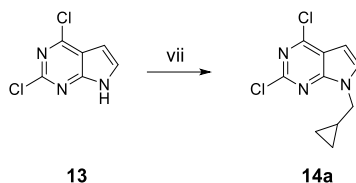


Figura 16. A) Espectro de ^1H RMN del compuesto **6**. **B)** Espectro de ^1H RMN del compuesto **10f**.

5.1.4 Obtención del derivado **14a** (serie IV): *N*-7-alquilación de pirrolopirimidina

La síntesis de los compuestos de la **serie IV** comienza con la *N*-alquilación del sustrato comercial 2,4-dicloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina con bromuro de metilciclopropilo en condiciones básica en DMF a temperatura ambiente, obteniéndose como producto el derivado **14a** alquilado con un 82 % de rendimiento, **Esquema 13**.



Esquema 13: *Reactivos y condiciones:* vii) bromuro de metilciclopropilo, K_2CO_3 (s), DMF, t.a., 12 h, 82 %.

En la **Figura 17** se observa dos dobletes que integran para uno cada uno en 7.35 y 6.58 ppm correspondientes a H-9 y H-8, respectivamente. Además, la aparición de un doblete alifático en 4.08 ppm correspondiente a H1', un multiplete en 1.35 – 1.15 ppm correspondiente a H2' y dos cuartetos que integran para 2 cada uno en 0.63 y 0.42 ppm.

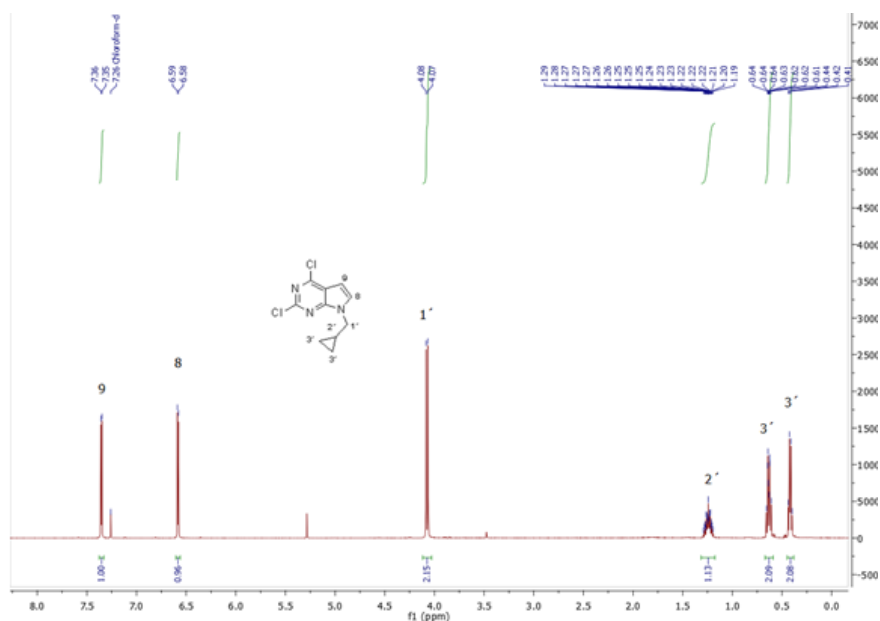
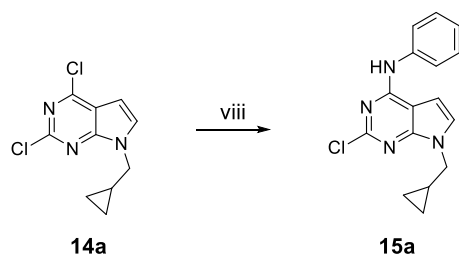


Figura 17. Espectro de ^1H RMN del compuesto **14**.

5.1.5 Obtención de los derivados **15a–c** (serie IV): Sustitución nucleofílica aromática.

Debido a la sustitución del N-7 del heterociclo de purina por CH, la síntesis de los derivados **15a–c**, no fue posible mediante el método mencionado en el **capítulo 5.1.2**, de esta manera, se realizó a temperatura ambiente en condiciones básicas con *t*-butóxido de potasio en DMF por 90 minutos según descritos por bibliografía.⁷⁰ Los rendimientos variaron entre 67 – 88 %, **Esquema 14**.



Esquema 14: *Reactivos y condiciones:* viii) Anilina, *t*-butoxido de potasio, DMF, 90 min, t.a., 67 – 88 %.

En la **Figura 18** se observa las señales del compuesto **15a**, a modo de ejemplo de esta serie, donde se aprecian las típicas del anillo de anilina entre 7.53 – 7.21 ppm además de la presencia del N-H a 7.21 ppm. Adicionalmente, se observa el desplazamiento químico a mayor campo del H-8 visible en 6.98 ppm y H-9 en 5.88 ppm.

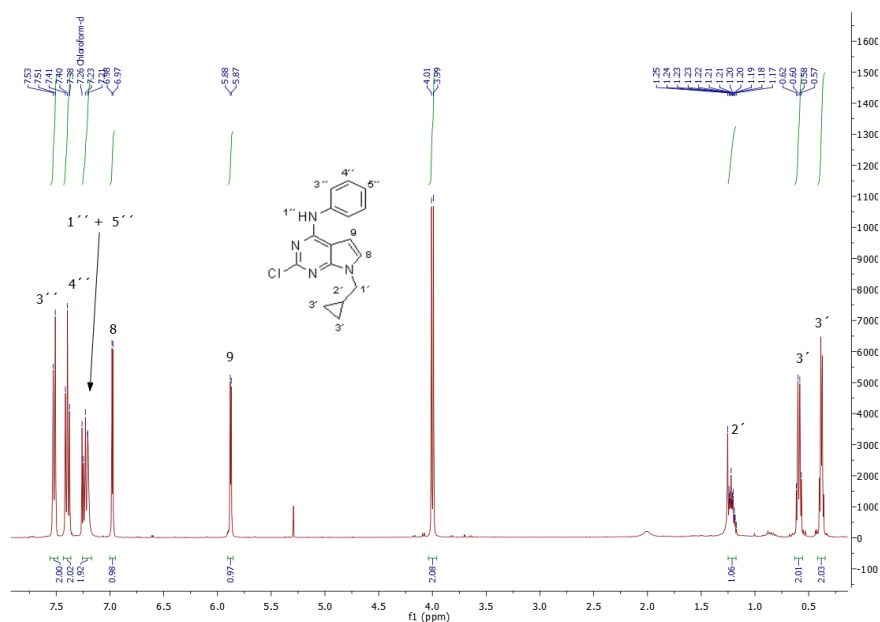


Figura 17. Espectro de ^1H RMN del compuesto **15a**.

5.1.6 Obtención de los compuestos finales **16a–c** (serie IV): Reacción de acoplamiento cruzado de Buchwald-Hartwig

Los compuestos finales **16a–c** fueron sintetizados de la misma manera que se explicó en el **Capítulo 5.1.3**. Los rendimientos variaron entre 36 - 43 %. En la **Figura 18** se observa el ^1H RMN del compuesto **16a** a modo de ejemplo de esta serie, en donde se aprecia la aparición del sistema doblete *orto-para* sustituido de la anilina sustituyendo en el C-2 de la purina en 7.59 y 6.93 ppm correspondientes a H-3''' y H-4''', respectivamente. El desplazamiento químico de $\Delta = 3.47$ ppm a campo débil del N-H 1''' con respecto al derivado anilínico **6**, observándose en 6.80 ppm. La aparición de los 8 hidrógenos del

sistema piperazina en 3.18 y 2.62 ppm, además, los tres hidrógenos singlete de *N*-metilpiperazina en 2.38 ppm.

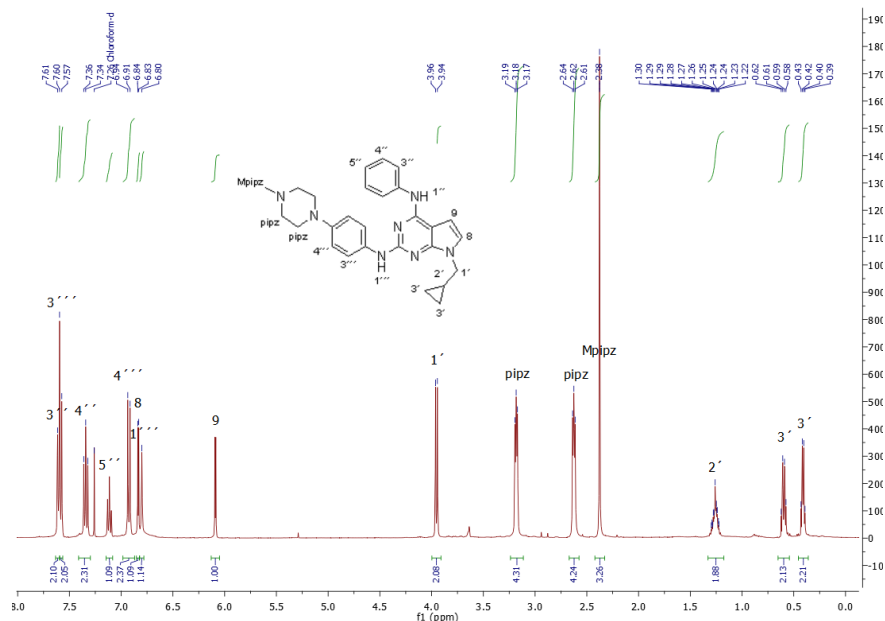


Figura 18. Espectro de ^1H RMN del compuesto **16a**.

5.1.7 Síntesis de los derivados benzamidas (serie V): Reacción sobre cloruro de acilo y reducción selectiva.

La síntesis de los derivados nitrados **17a–h** correspondió a una adición-eliminación sobre el correspondiente cloruro de nitrobenzoílo (**4a** o **4b**, ver **Esquema 6**) con las respectivas anilinas, en DMF a temperatura ambiente. Posterior a su filtración se obtuvieron los compuestos sólidos con rendimientos entre el 60 - 100 %. En la **Figura 19**, a modo de ejemplo de esta serie, se

observa el N-H amida del compuesto **17g** que integra para uno en 10.72 ppm, los dos dobletes típicos de sustitución *orto-para* de los protones H-2 y H-3 en 8.37 y 8.17 ppm, respectivamente. Además, la aparición de un triplete doblete en 7.75 ppm, debido a correlación $^2J_{H-F} = 11.7$ Hz y $^3J_{H-H12} = 2.2$ Hz, respectivamente, correspondiente a H-8. Consecuentemente, el protón H-12 en 7,56 ppm correlaciona con H-11 que aparece en 7.41 ppm con $^2J_{H-H11} = 8.2$ Hz y H-8 $^3J_{H-H8} = 1.0$ Hz. Por último, el H-10 con multiplicidad doblete de doble triplete $^{2,3}J_{F-H10-H11, F-H8, F-H12} = 8.6, 2.6$ y 0.7 Hz en 6.96 ppm.

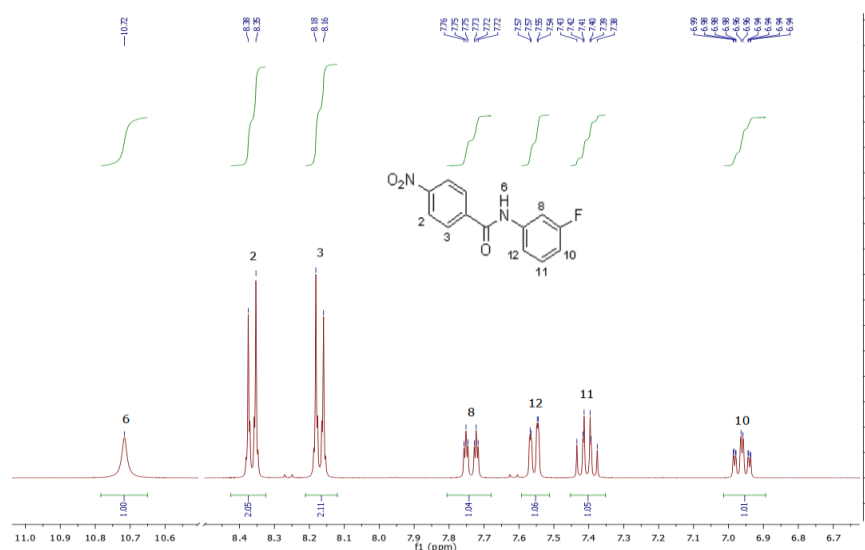
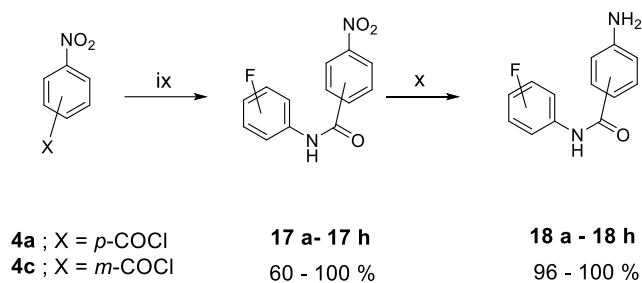


Figura 19. Espectro de ^1H RMN del compuesto **17g**.

Luego, se procedió a su reducción con hidrógeno en etanol y Pd-C activado, temperatura ambiente por 2 horas, para dar las anilinas correspondientes **18a–h**, con rendimientos entre 96 – 100 %, **Esquema 15**.



Esquema 15: *Reactivos y condiciones:* ix) Amina correspondiente, TEA, DMF, t.a., 2 h. x) H₂ (g), Pd-C, etanol, t.a., 2 h.

La **Figura 20**, a modo de ejemplo de esta serie, muestra la aparición de una nueva señal correspondiente a NH₂ del compuesto **18g** en 5.77 ppm. Por otra parte, el desplazamiento químico a campo alto de los protones H-3 y H-4 7.70 ppm y 6.59 ppm con un $\Delta = -0.67$ ppm y $\Delta = -1.58$ ppm, respectivamente, debido al efecto donador por resonancia del grupo amino.

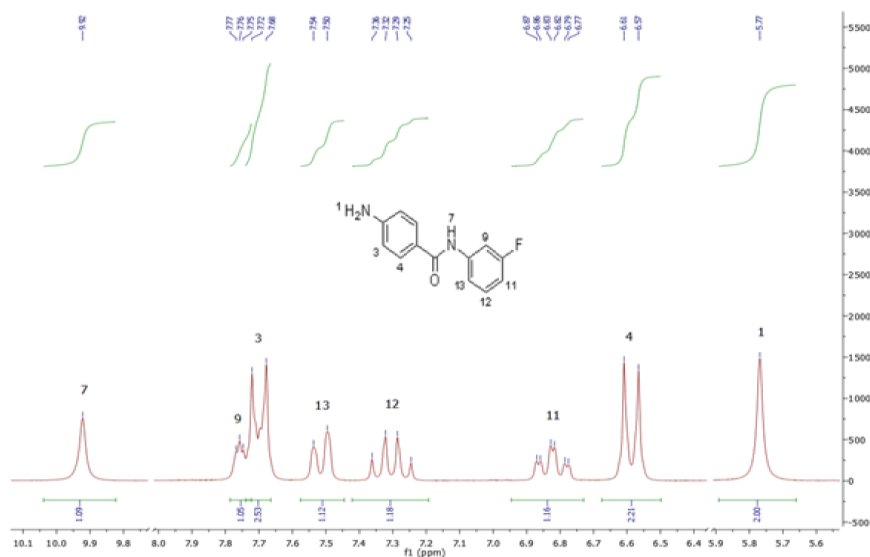


Figura 20. Espectro de ¹H RMN del compuesto **18g**.

5.1.8 Síntesis de los derivados 21a–h (serie V): Sustitución Nucleofílica Aromática

Los compuestos **21a–h** fueron sintetizados de la misma manera que se explicó en el **capítulo 5.1.2**. Los rendimientos variaron entre 38 - 87 %. En la **Figura 21** se observa el ¹H RMN del compuesto **21g** a modo de ejemplo de esta serie, en donde se aprecia la aparición del sistema doblete *orto-para* sustituido de la anilina en 8.05 y 7.97 ppm correspondientes a H-3''' y H-4''', con un desplazamiento químico de $\Delta = 0.35$ ppm y $\Delta = 1.38$ ppm, respectivamente. El desplazamiento químico de $\Delta = 4.53$ ppm a campo débil del NH 1''' con respecto al derivado anílico **18g**, observándose en 10.30 ppm. La aparición del hidrógeno purínico H-8 en 8.43 ppm y los hidrógenos del sistema alquilado

metilciclopropilo en 4.04 ppm N-CH₂, 1.33 ppm CH y 0.54 – 0.44 ppm 2 x CH₂.

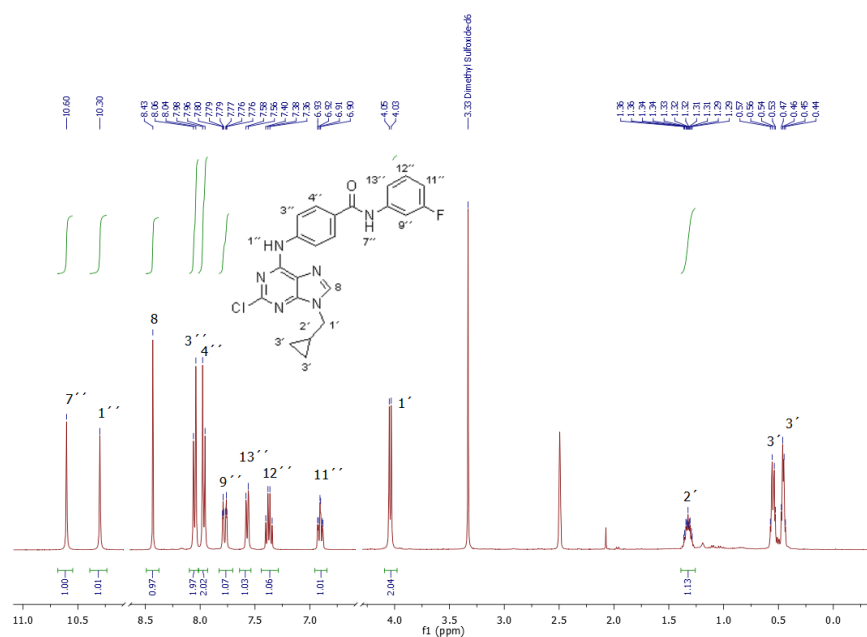


Figura 21. Espectro de ¹H RMN del compuesto **21g**.

5.1.9 Síntesis de los compuestos finales **23a–h** (serie V): Reacción de acoplamiento cruzado Buchwald-Hartwig

Los compuestos finales **23a–h** fueron sintetizados de la misma manera que se explicó en el **capítulo 5.1.3**. Los rendimientos variaron entre 43 - 93 %. En la **Figura 22** se observa el ¹H RMN del compuesto **23g** a modo de ejemplo de esta serie, en donde se aprecia la aparición del sistema doblete *orto-para* sustituido de la anilina sustituyendo en el C-2 de la purina en 7.82 y 7.73 ppm correspondientes a H-3''' y H-4''', respectivamente. El desplazamiento

químico no es posible de calcular ya que las muestras de los derivados **21a–h** se encuentran disueltas en distintos solventes deuterados en comparación a los compuestos finales, DMSO- d_6 y $CDCl_3$, respectivamente. Al igual que en el segmento 5.1.3, se corrobora la obtención de los compuestos finales por la aparición de las señales *orto-para* en 7.53 y 6.94 ppm correspondientes a los protones H3''' y H4''', además, de los ocho hidrógenos pertenecientes al anillo de piperazina en 3.22 – 2.64 ppm y el singlete que integra a tres hidrógenos en 2.39 ppm del *N*-metilo.

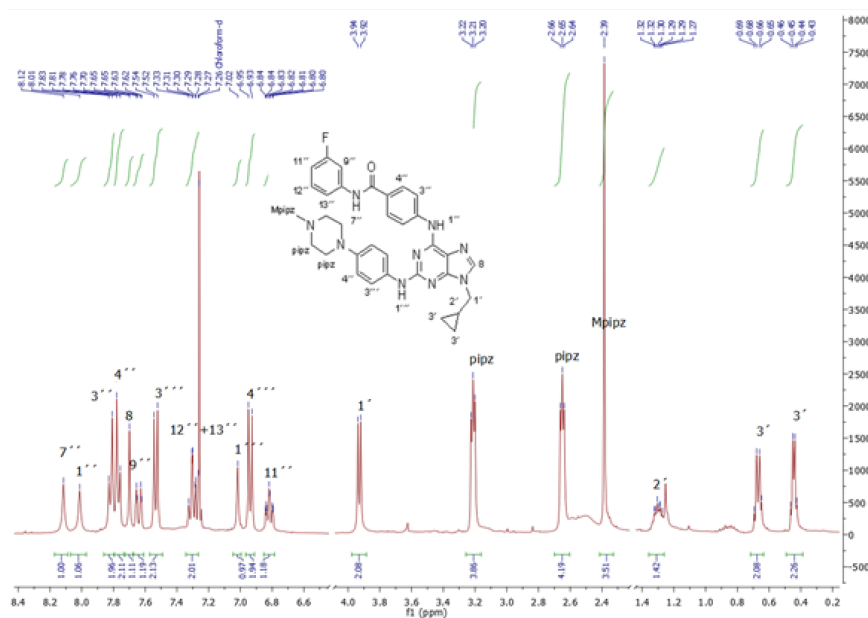
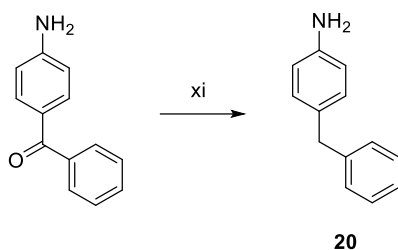


Figura 22. Espectro de 1H RMN del compuesto **23g**.

5.1.10 Síntesis del derivado 20 (serie VI): Reacción de Wolf-Kishner

La obtención de 4-bencilanilina (**20**) se realizó mediante una reducción de Wolf-Kishner en dietilenglicol, hidracina y KOH como base, **Esquema 16**. El mecanismo de esta reacción se presenta en la **Figura 23**, en donde se identifica la eliminación de nitrógeno gaseoso y agua, este último reaccionando con el derivado de anilina y convirtiéndose en hidroxilo, transfiriendo el hidrógeno al carbono reducido.⁶⁰



Esquema 16: *Reactivos y condiciones:* xi) hidracina monohidrato, KOH, dietilenglicol, 200 °C, 12 h, 82 %.

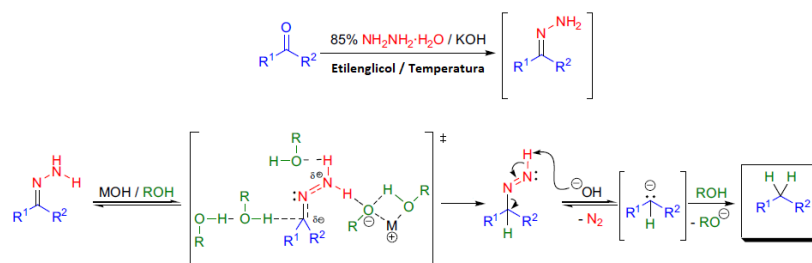


Figura 23. Mecanismo de reacción de reducción de Wolf-Kishner. Imagen tomada y modificada de bibliografía László Kürti y Barbara Czako.⁵⁹

En la **Figura 24**, se observa el ^1H RMN del compuesto **20**, se observa la aparición de un singlete que integra para dos hidrógenos en la zona alifática de 3.57 ppm correspondiente al CH_2 bencílico.

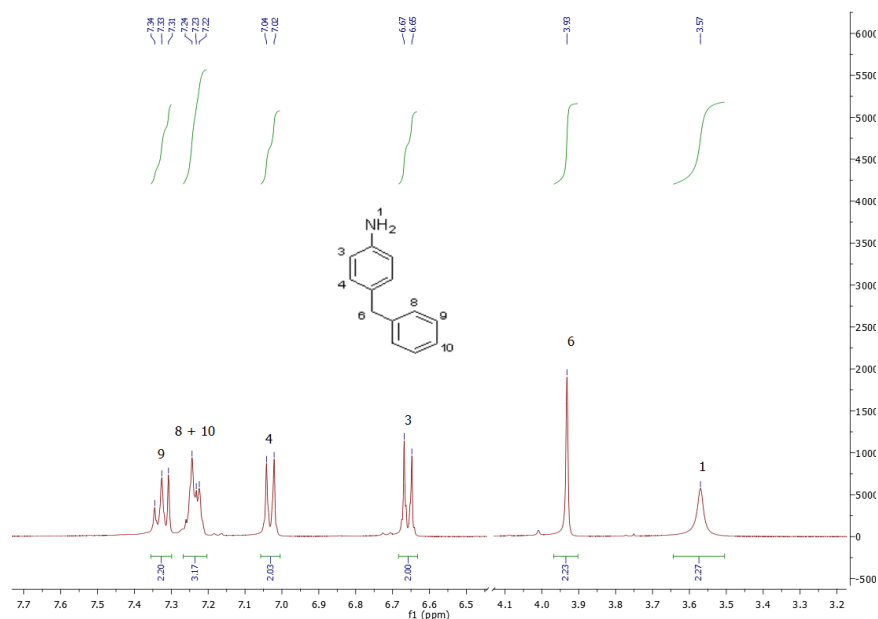


Figura 24. Espectro de ^1H RMN del compuesto **20**.

5.1.11 Síntesis de los derivados **22a – 22e** (serie VI): Sustitución Nucleofílica Aromática

Los compuestos **22a – 22e** fueron sintetizados de la misma manera que se explicó en el **capítulo 5.1.2**. Los rendimientos variaron entre 47 - 96 %. En la **Figura 25** se observa el ^1H RMN del compuesto **22e**, en donde el $\text{NH } 1''$ se encuentra a 10.21 ppm integrando para uno con un desplazamiento químico

de $\Delta = 6.64$ ppm, por otro lado, el singlete correspondiente al CH_2 6'' en 3.91 ppm sufrió un desplazamiento químico a campo alto de $\Delta = -0.02$ ppm con respecto a su derivado anilínico **20**. Las señales correspondientes al esqueleto de purina alquilada se encuentran en 8.35 ppm singlete que integra para un hidrógeno perteneciente al H8, 4.01 ppm doblete que integra para dos hidrógenos pertenecientes al CH_2 H1', 1.30 ppm multiplete que integra para 1 correspondiente al H2' y, por último, los dos CH_2 H3' con multiplicidad cuatruplete en 0.53 y 0.44 ppm.

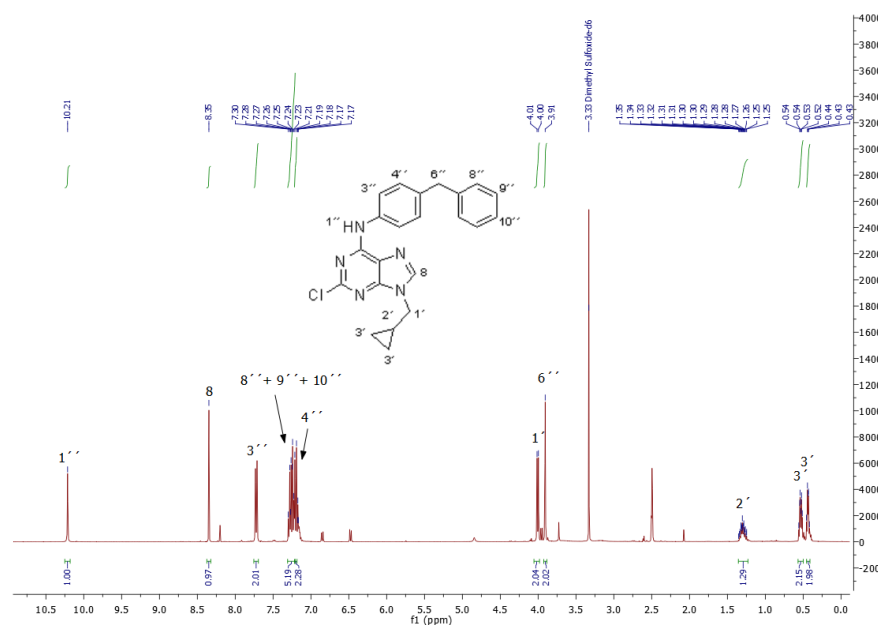


Figura 25. Espectro de ^1H RMN del compuesto **22e**.

**5.1.12 Reacción de los compuestos finales 24a – 24e (serie VI):
Reacción de acoplamiento cruzado Buchwald-Hartwig.**

Los compuestos finales **24a–e** fueron sintetizados de la misma manera que se explicó en el **capítulo 5.1.3**. Los rendimientos variaron entre 57 - 82 %. En la **Figura 26** se observa el ^1H RMN del compuesto **24e**, en donde se aprecia la aparición de nuevas señales con respecto al precursor **22e**, del sistema doblete *orto-para* sustituido de la anilina sustituyendo en el C-2 de la purina en 7.55 y 6.91 ppm correspondientes a H3''' y H4''', respectivamente, con un desplazamiento químico de $\Delta = 3.54$ ppm a campo débil del NH 1''' con respecto al derivado anílico **6**, observándose en 6.87 ppm. La aparición de los 8 hidrógenos del sistema piperazina en H1pipz 3.16 y H2pipz 2.60 ppm, además, los tres hidrógenos singlete de *N*-metilpiperazina en 2.387 ppm. Además, el apantallamiento del H1'' hacia campo alto, observándose en 7.60 ppm.

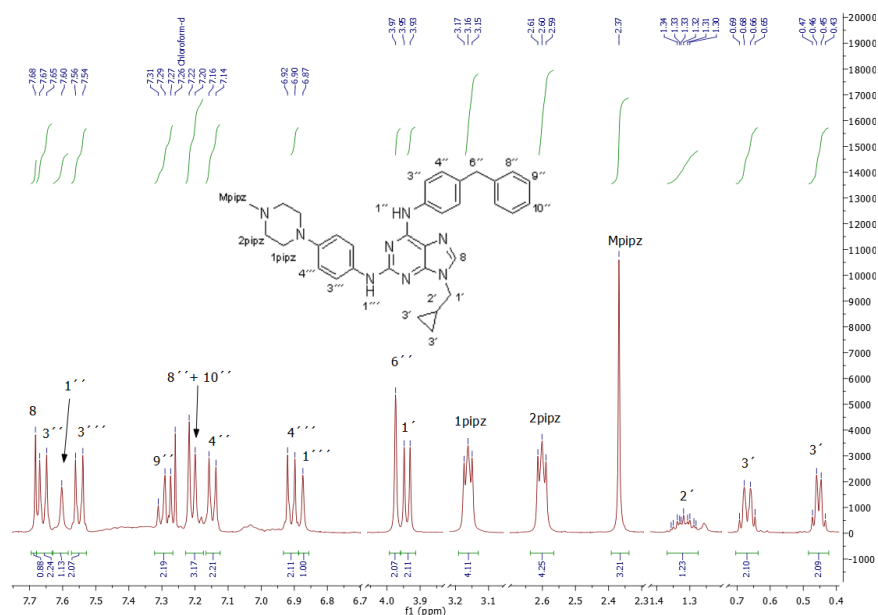
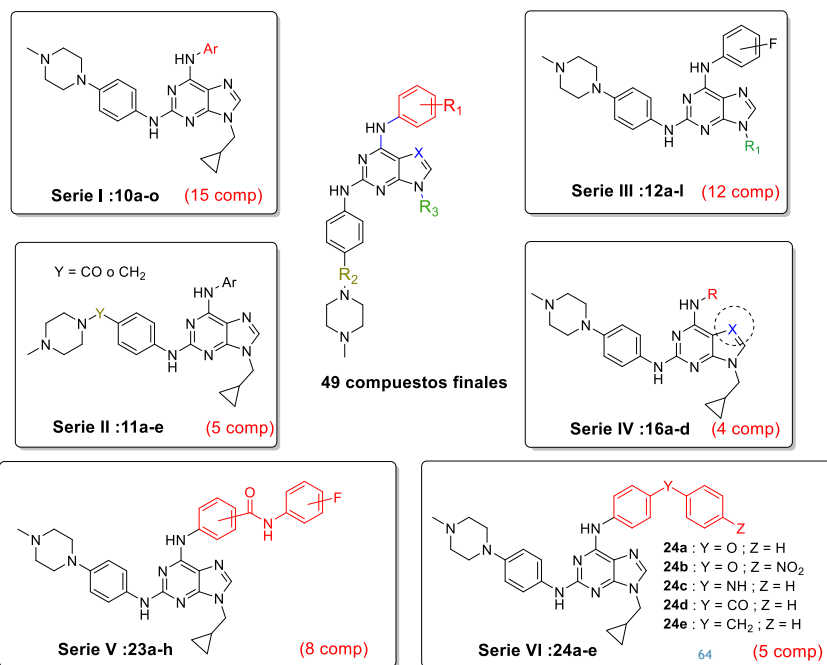


Figura 26. Espectro de ^1H RMN del compuesto **24e**.

De esta manera se logró sintetizar y caracterizar adecuadamente 77 intermediarios y 49 compuestos finales correspondientes a las **series I-VI (Esquema 17)**, en donde estos últimos serán evaluados en sus propiedades biológicas inhibitorias en las quinasas objetivos, como también, en su poder citotóxico sobre modelos celulares tumorales sanguíneos. A partir de una correlación inhibición enzimática/citotoxicidad se seleccionarán los compuestos adecuados para continuar con ensayos de inhibición enzimática en modelos celulares mediante técnicas de inmunotransferencia, determinación antiproliferativa y muerte celular.



Esquema 17: Número de compuestos sintetizados en cada serie.

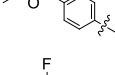
5.2 Resultados biológicos

5.2.1 Ensayos de inhibición enzimática

De acuerdo con los objetivos de este trabajo doctoral en desarrollar nuevos inhibidores de tirosina quinasa de importancia para el tratamiento de la leucemia, el siguiente paso fue analizar el comportamiento inhibitorio de todos los productos finales en Abl y BTK. Los resultados de este ensayo están resumidos en la **Tabla 2**. La serina/treonina quinasa Cdk-2 también fue ensayada a modo de observar la selectividad de estos compuestos sobre tirosinas quinasas.

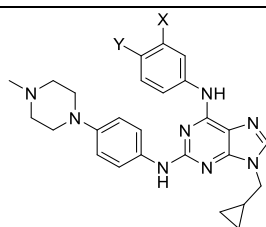
Tabla 2. Inhibición *in vitro* de los compuestos **10a-o**, **11a-e**, **12a-l**, **16a-d**, **23a-h** y **24a-e** en las quinasas Abl, BTK, and Cdk-2/Cyclin E.

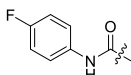
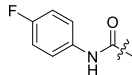
Compuesto	X	R	Ar	Y	IC ₅₀ (μM) ^a		
					Abl	BTK	Cdk-2/E
10a	N			--	4,19 ± 0,83	14,70 ± 1,48	13,96 ± 2,33
10b	N			--	0,12 ± 0,03	1,28 ± 0,18	19,95 ± 2,07
10c	N			--	0,10 ± 0,00	1,30 ± 0,02	> 20,00 ^b

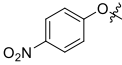
10d	N			--	$1,78 \pm 0,07$	$> 20,00$	$15,54 \pm 1,70$
10e	N			--	$0,42 \pm 0,10$	$4,12 \pm 0,90$	$> 20,00$
10f	N			--	$0,07 \pm 0,01$	$1,43 \pm 0,29$	$> 20,00$
10g	N			--	$0,11 \pm 0,01$	$1,36 \pm 0,16$	$5,62 \pm 0,52$
10h	N			--	$0,39 \pm 0,08$	$0,60 \pm 0,22$	$18,20 \pm 2,05$
10i	N			--	$0,10 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,19$	$10,85 \pm 1,60$
10j	N			--	$0,54 \pm 0,02$	$0,94 \pm 0,04$	$> 20,00$
10k	N			--	$0,04 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,18$	$> 50,00^c$
10l	N			--	$0,20 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,19$	$> 20,00$
10m	N			--	$0,27 \pm 0,05$	$2,39 \pm 0,43$	$10,80 \pm 3,84$
10n	N			--	$0,07 \pm 0,01$	$3,90 \pm 0,05$	$12,90 \pm 1,70$
10o	N			--	$0,44 \pm 0,12$	$5,03 \pm 0,99$	$12,60 \pm 2,12$
11a	N			-CO-	$1,21 \pm 0,11$	$6,01 \pm 0,72$	$> 20,00$
11b	N			-CO-	$0,57 \pm 0,03$	$1,72 \pm 0,19$	$0,57 \pm 0,03$
11c	N			-CO-	$0,94 \pm 0,22$	$2,73 \pm 0,17$	$14,15 \pm 1,24$

11d	N			-CH ₂ -	0,18 ± 0,08	0,28 ± 0,02	17,58 ± 1,14
11e	N			-CH ₂ -	0,22 ± 0,06	0,45 ± 0,02	12,01 ± 1,06
12a	N	isopentilo		--	1,78 ± 0,20	2,22 ± 0,96	22,08 ± 0,38
12b	N	isopentilo		--	> 50,00	3,78 ± 0,86	21,12 ± 1,91
12c	N	isopentilo		--	2,28 ± 0,80	1,89 ± 0,17	> 50,00
12d	N	<i>n</i> -pentilo		--	1,23 ± 0,02	0,42 ± 0,14	> 20,00
12e	N	<i>n</i> -pentilo		--	0,65 ± 0,07	0,36 ± 0,04	19,01 ± 8,98
12f	N	<i>n</i> -pentilo		--	1,36 ± 0,50	0,93 ± 0,14	> 20,00
12g	N	<i>n</i> -hexilo		--	9,82 ± 1,87	0,91 ± 0,02	> 20,00
12h	N	<i>n</i> -hexilo		--	> 100,00 ^d	0,32 ± 0,01	> 50,00
12i	N	<i>n</i> -hexilo		--	> 20,00	0,46 ± 0,03	> 20,00
12j	N	<i>n</i> -octilo		--	> 100,00	0,41 ± 0,10	19,04 ± 1,55
12k	N	<i>n</i> -octilo		--	> 100,00	0,97 ± 0,22	> 20,00
12l	N	<i>n</i> -octilo		--	> 50,00	0,58 ± 0,33	> 20,00
16a	CH			--	> 50,00	> 20,00	> 20,00

16b	N			--	$3,95 \pm 0,72$	$> 20,00$	$> 20,00$
16c	N			--	$11,1 \pm 4,67$	$> 20,00$	$> 20,00$
16d	N			--	$0,84 \pm 0,07$	P	$> 20,00$



Compuesto	X	Y	Abl	IC ₅₀ (μM) ^a	
				BTK	Cdk-2/E
23a		CH	$0,33 \pm 0,01$	$2,70 \pm 0,59$	$8,78 \pm 0,01$
23b		CH	$0,20 \pm 0,04$	$8,74 \pm 0,30$	$6,61 \pm 0,76$
23c		CH	$0,80 \pm 0,31$	$3,51 \pm 0,08$	$12,61 \pm 3,30$
23d		CH	$0,61 \pm 0,25$	$13,63 \pm 6,61$	$17,26 \pm 2,24$
23e	CH		$0,09 \pm 0,05$	$0,65 \pm 0,05$	$14,72 \pm 5,16$
23f	CH		$0,08 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,03$	$> 20,00$
23g	CH		$0,16 \pm 0,00$	$0,39 \pm 0,21$	$18,80 \pm 0,58$
23h	CH		$0,12 \pm 0,05$	$1,08 \pm 0,26$	$12,61 \pm 3,30$

24a	CH		0,42 ± 0,27	2,92 ± 0,25	17,19 ± 3,44
24b	CH		0,50 ± 0,09	1,17 ± 0,22	> 20,00
24c	CH		0,26 ± 0,04	0,29 ± 0,14	14,73 ± 3,36
24d	CH		0,07 ± 0,06	0,15 ± 0,09	> 20,00
24e	CH		0,14 ± 0,06	0,98 ± 0,44	> 20,00

Considerando los resultados expuestos en la **Tabla 2**, se obtienen las siguientes observaciones:

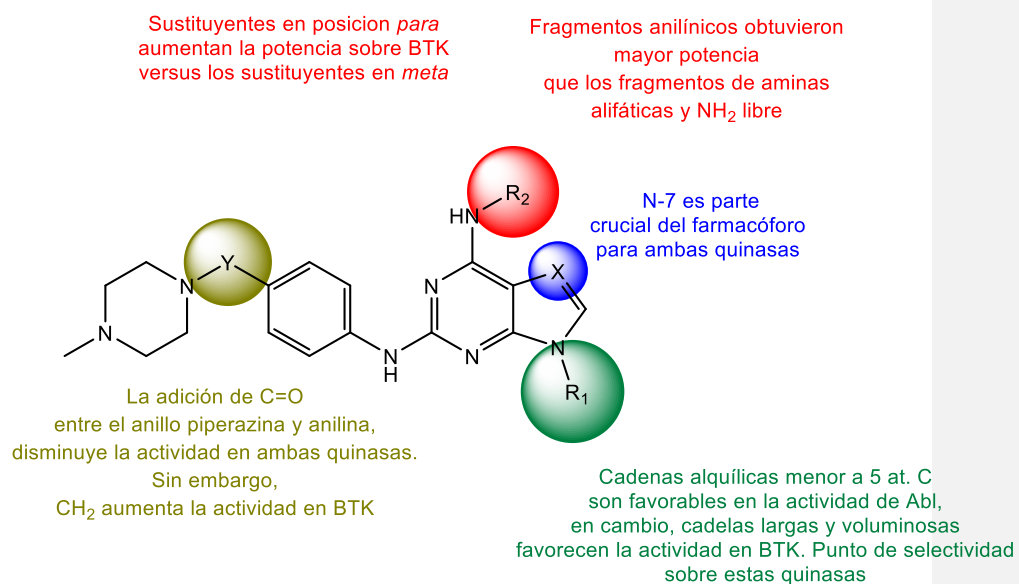
1. En términos de potencia, la quinasa Abl fue la proteína más sensible a la inhibición por los compuestos a concentraciones submicromolares (< 1,0 μ M, 59 %) en contraste con BTK (38 %).
2. Aunque para la quinasa Abl no se encontró un inhibidor más potente en comparación con nuestro compuesto previo (**V**), **10f**, **10k** y **24d** fueron los compuestos más activos de este nuevo grupo en estudio (IC_{50} = 0,04 μ M para el compuesto **10k** y 0,07 μ M, para **10f** y **24d**). Para BTK se obtuvieron algunos compuestos con actividad ligeramente mejor que **V** (con valores de IC_{50} < 0,58 μ M: **12d**, **12e**, **12i** y **12j**), destacándose de entre ellos, **11d** (IC_{50} = 0,28 μ M), **12h** (IC_{50} = 0,32 μ M) y **24d** (IC_{50} = 150 nM).

Desde el punto de vista químico, una relación estructura-actividad (REA, **Esquema 18**) se puede establecer para cada quinasa objetivo:

1. Se encontró que la sustitución en el anillo 6-fenilamino influyó notablemente en la potencia inhibitoria en ambas proteínas, dependiendo tanto de su tamaño como de su posición, Para Abl, no se tiene claro el patrón de sustitución, ya que, sin bien en primera instancia la sustitución en *meta* pareciese ser más efectiva con sustituyentes poco voluminosos, **10c** frente a **10d** (CH₃ en lugar de CF₃) correspondientes a la **serie I**, en compuestos con el anillo de anilina extendida también se encontró alta potencia en la quinasa, como es el compuesto **10k** con un IC₅₀ de 40 nM y **24d** con un IC₅₀ de 70 nM.
2. Para BTK, el patrón de sustitución en el anillo 6-fenilamino si bien también determina la potencia en la actividad, una correlación entre la estructura y el efecto biológico indicaría que la sustitución en posición *para* es más beneficiosa para la inhibición de esta quinasa. Esto según se observa al comparar los compuestos **10g** vs **10j** (NO₂), **10f** vs **10i** (CN) o **10e** vs **10h** (OCF₃). Asimismo, para los compuestos de la **serie V**, se aprecia que sustituyentes en la posición *orto* de la anilina favorece la actividad, como se observa en los compuestos **23a** vs **23e**, **23b** vs **23f**, **23c** vs **23g** y **23d** vs **23h**.
3. La presencia de flúor en la posición *orto* disminuyó la actividad inhibitoria en Abl y BTK, Además, un grupo voluminoso en posición *para* en los derivados disustituídos en 3,4 reduce la potencia en ambas quinasas, lo que se observa principalmente cuando el flúor se reemplaza por cloro, Todos estos resultados refutan la hipótesis original sobre la fuerza del enlace de hidrógeno en el sistema N-H/N-7-Met que es fundamental para la potencia de inhibición en Abl.
4. La longitud y el volumen de la cadena alquílica en *N*-9 influyeron dramáticamente en el efecto inhibitorio sobre las quinasas, Para Abl una

cadena voluminosa (isopentilo, especialmente **12b**) o alquílica lineal de más de cinco carbonos disminuyó la potencia (para **12h**, **12j** y **12k** valores $IC_{50} = 100 \mu M$), y para BTK una cadena lineal de cinco o seis carbonos aumentó de forma interesante la actividad (dependiendo del resto aminofenilo en C-6, puede ser *n*-pentilo o *n*-hexilo, **12d**, **12e**, **12h** o **12i**). Este es un hallazgo muy importante que podría considerarse para la selectividad entre estas dos quinasas.

5. La extensión del fragmento anilínico por fragmentos fenilamida conservados en fármacos utilizados hoy en día para la inhibición de Bcr-Abl no resultaron ser efectivos en mejorar la actividad en la quinasas Abl. Sin embargo, al explorar el efecto del oxígeno en el fragmento conservado de inhibidores de BTK de difenil éter, intercambiándolo por carbonilo (difenil cetona) se obtuvo que el compuesto **24d** resultó ser 3,8 veces más potente que el compuesto de referencia **V**.
6. Tanto para Abl y BTK, la adición del grupo carbonilo (CO) entre la anilina y la metilpiperazina, disminuyó la actividad en las quinasas. Sin embargo, la extensión entre estos dos fragmentos con CH_2 (**11d** y **11e**) incremento la actividad inhibitoria en BTK, hasta dos veces en el caso del compuesto **11d**, y disminuyo en Abl.
7. Finalmente, como era de esperar, la sustitución en C-6 por aminas no aromáticas y la sustitución de N-7 por CH, redujo significativamente la potencia, lo que hace referencia a la importancia la conjugación en el sistema purínico y anilínico sustituyendo en C-6, además, del rol primordial del N-7 en el sistema purínico, el cual había sido demostrado con anterioridad en los estudios de acoplamiento molecular en el capítulo 1,4 (Figura 12).



Esquema 18: Relación estructura-actividad para los compuestos finales en cada quinasa.

5.2.2 Estudios de citotoxicidad

A continuación, se procedió a examinar la actividad citotóxica de todos los compuestos sintetizados frente a las líneas celulares cancerosas K562 (leucemia mielógena crónica), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), MV4-11 (leucemia mielógena aguda), Ramos (linfoma no Hodgkin) y CEM (linfoma linfoblástico agudo), leucemia), con concentración creciente de cada compuesto durante 72 h. De acuerdo con los resultados que se muestran en la **Tabla 3**, estos derivados de purina produjeron valores de GI_{50} micromolares en todas las líneas celulares. Asimismo, MV4-11 fue la línea celular más sensible, Ramos medianamente sensible y CEM fue la menos sensible. En general, el compuesto **10i** fue el más citotóxico en células K562 y CEM (1,03 y 1,85 μ M), **10j** en células HL-60 y Ramos (0,42 y 1,30 μ M) y **12a** en células MV4-11 (0,73 μ M). Curiosamente, **10f** y **10i** mostraron una alta inhibición en Bcr-Abl, sin embargo, **10i** presenta una citotoxicidad 3 veces mayor que **10f** (3,68 y 1,03 μ M). Con respecto a la línea celular Ramos, los compuestos con mayor inhibición en el ensayo quinasas presentaron entre media a nula citotoxicidad en esta línea celular que expresa la quinasa BTK, en donde el compuesto **12i** y **12h** tuvieron valores de GI_{50} mayores a 25 μ M. Por otro lado, los derivados de purina **12d**, **12e** y **12j** resultaron tener valores citotóxicos en esta línea celular desde 13,78; 11,61 y 14,24 μ M, respectivamente.

Tabla 3. Citotoxicidad *in vitro* de los compuestos **10a-o**, **11a-c**, **12a-l** y **16a** sobre distintas líneas celulares cancerígenas.

Compuesto	GI ₅₀ (μM) ^a				
	K562	HL-60	MV4-11	Ramos	CEM
10a	21,32 ± 0,63	1,82 ± 0,35	6,47 ± 1,82	15,58 ± 0,88	17,12 ± 0,40
10b	1,99 ± 0,82	1,93 ± 1,05	1,94 ± 0,16	10,62 ± 3,08	19,05 ± 1,07
10c	2,86 ± 0,76	9,79 ± 0,87	1,42 ± 0,23	12,54 ± 0,48	16,45 ± 0,36
10d	4,51 ± 0,36	0,72 ± 0,16	2,84 ± 0,29	3,83 ± 0,10	23,78 ± 0,08
10e	5,18 ± 1,68	1,40 ± 0,13	2,88 ± 0,01	12,84 ± 0,03	19,53 ± 0,61
10f	3,68 ± 0,78	1,56 ± 0,88	1,05 ± 0,10	5,86 ± 3,64	13,44 ± 1 0,08
10g	2,93 ± 0,59	8,51 ± 1,79	1,98 ± 0,46	4,87 ± 0,01	11,45 ± 3,93
10h	2,90 ± 0,91	1,08 ± 0,31	2,45 ± 0,09	11,73 ± 2,88	14,95 ± 0,92
10i	1,03 ± 0,21	3,17 ± 0,57	0,89 ± 0,07	1,49 ± 0,05	1,85 ± 0,10
10j	2,84 ± 1,04	0,42 ± 0,08	2,21 ± 0,71	1,30 ± 0,5	2,52 ± 0,29
10k	2,70 ± 1,31	1,93 ± 0,17	2,43 ± 0,59	12,34 ± 1,58	13,91 ± 1,12
10l	3,45 ± 1,61	3,22 ± 0,74	2,56 ± 0,64	11,18 ± 2,64	15,41 ± 0,55
10m	2,57 ± 0,52	0,86 ± 0,11	1,88 ± 0,06	7,52 ± 0,41	13,35 ± 1,58
10n	5,54 ± 1,56	1,52 ± 0,34	4,81 ± 1,54	8,02 ± 1,30	17,54 ± 0,08
10o	2,60 ± 1,25	1,68 ± 0,01	1,49 ± 0,33	4,46 ± 0,38	14,83 ± 1,32
11a	8,91 ± 1,64	6,64 ± 1,42	1,24 ± 0,21	16,57 ± 0,67	> 25,00
11b	4,91 ± 0,01	1,08 ± 0,10	1,48 ± 0,54	7,07 ± 0,32	20,23 ± 3,73
11c	6,07 ± 0,08	2,39 ± 0,89	1,52 ± 0,31	14,69 ± 0,02	20,69 ± 4,07
11d	3,14 ± 0,24	3,11 ± 0,00	0,31 ± 0,10	2,05 ± 0,42	4,04 ± 0,36
11e	2,96 ± 0,60	1,57 ± 0,00	0,31 ± 0,04	1,74 ± 0,39	3,70 ± 0,29
12a	8,93 ± 5,52	1,52 ± 0,61	0,73 ± 0,25	10,07 ± 2,98	16,39 ± 2,41
12b	18,56 ± 3,73	2,04 ± 0,58	2,89 ± 0,95	18,69 ± 3,10	> 25,00
12c	9,40 ± 0,78	1,59 ± 0,47	1,43 ± 0,56	8,87 ± 0,94	16,81 ± 3,34

12d	6,70 ± 2,48	3,98 ± 1,06	1,28 ± 0,38	13,78 ± 3,13	19,12 ± 3,39
12e	2,14 ± 0,80	1,31 ± 0,00	1,31 ± 0,71	11,61 ± 1,46	19,03 ± 3,89
12f	> 25,00	3,61 ± 1,02	1,61 ± 0,63	> 25,00	> 25,00
12g	15,50 ± 4,98	6,11 ± 0,76	4,27 ± 1,45	22,53 ± 1,23	34,73 ± 1,37
12h	24,67 ± 0,41	8,77 ± 3,84	3,54 ± 1,53	> 25,00	> 25,00
12i	> 25,00	3,91 ± 0,07	3,86 ± 1,08	> 25,00	> 25,00
12j	8,19 ± 0,06	1,25 ± 0,11	4,45 ± 1,48	14,25 ± 2,61	23,58 ± 2,01
12k	10,04 ± 6,31	2,16 ± 0,48	12,42 ± 3,93	15,74 ± 0,37	21,27 ± 0,31
12l	11,85 ± 2,19	1,51 ± 1,49	16,28 ± 4,99	18,85 ± 2,11	> 25,00
16a	6,38 ± 1,14	3,58 ± 0,65	8,28 ± 2,90	12,83 ± 0,61	15,51 ± 1,46
16b	> 25,00	> 25,00	6,21 ± 2,61	> 25,00	> 25,00
16c	4,54 ± 0,83	8,54 ± 0,00	2,16 ± 0,55	2,62 ± 0,41	7,56 ± 0,64
16d	5,72 ± 0,00	--	11,53 ± 0,00	--	--
23a	1,80 ± 0,37	0,92 ± 0,00	0,39 ± 0,19	1,05 ± 0,19	1,39 ± 0,31
23b	1,58 ± 0,39	0,93 ± 0,00	0,44 ± 0,10	0,68 ± 0,14	1,24 ± 0,25
23c	1,76 ± 0,44	1,13 ± 0,00	0,49 ± 0,07	0,77 ± 0,13	1,51 ± 0,42
23d	1,20 ± 0,52	0,85 ± 0,00	0,37 ± 0,11	0,60 ± 0,14	1,13 ± 0,18
23e	1,89 ± 0,15	0,60 ± 0,00	0,60 ± 0,07	0,61 ± 0,20	1,37 ± 0,09
23f	3,17 ± 0,92	0,74 ± 0,00	0,47 ± 0,58	4,62 ± 0,18	5,59 ± 1,89
23g	2,13 ± 0,60	0,59 ± 0,00	0,63 ± 0,20	0,57 ± 0,15	1,49 ± 0,17
23h	1,78 ± 0,08	0,59 ± 0,00	0,46 ± 0,11	0,97 ± 0,21	1,71 ± 0,35
24a	4,17 ± 0,46	9,23 ± 0,00	1,02 ± 0,55	1,32 ± 0,26	3,49 ± 0,27
24b	10,91 ± 0,22	1,12 ± 0,00	2,09 ± 0,55	18,26 ± 5,62	> 25,00
24c	1,91 ± 0,19	0,56 ± 0,00	0,71 ± 0,55	1,00 ± 0,22	1,39 ± 0,09
24d	2,68 ± 0,20	0,92 ± 0,00	1,30 ± 0,55	2,54 ± 0,45	6,07 ± 0,35
24e	3,11 ± 0,53	0,51 ± 0,00	1,30 ± 0,55	0,92 ± 0,14	3,98 ± 0,86

^aValores de GI₅₀ fueron determinados por tres experimentos independientes, cada uno ensayado en triplicado en un rango de valores de 0,1 y 25 µM.

5.2.3 Inhibición de las quinasas en modelos celulares

En primera instancia se seleccionaron los compuestos a ensayar mediante una correlación entre la inhibición enzimática y citotoxicidad en la línea celular que exprese la quinasa. De esta manera, el derivado de purina **10f** y **10i** fueron seleccionados debido a que fueron los compuestos con menor valor de IC_{50} (0,07 y 0,10 μM) en la quinasa Abl, además, de presentar alta potencia citotóxica en la línea celular K562, GI_{50} = 3,68 y 1,03 μM . Por otro lado, compuestos con mayor potencia citotóxica en BTK fueron **11d**, **11e**, **12d**, **12e**, **12j**, **24c** y **24d**. Los tres primeros mencionados no serán evaluados en modelos celulares debido a que, **12j** posee selectividad hacia BTK sobre las otras quinasas, en especial Abl, en donde su IC_{50} fue mayor a 100 μM , en cambio los compuestos **11d**, **11e**, **12d** y **12e** tuvieron valores de 0,18, 0,22, 1,23 y 0,65 μM , respectivamente; sin embargo, **24c** y **24d** son poco selectivos, pero poseen la mayor potencia hacia esta quinasa, con valores de IC_{50} de 0,29 y 0,15 μM , respectivamente. Si bien **12h** resultó tener un menor IC_{50} que **12j** en el ensayo de quinasas, **12h** no fue citotóxico en la línea celular Ramos, tras lo cual **12j**, **24c** y **24d** si lo son, por lo cual, son los compuestos seleccionados para continuar con los ensayos biológicos en la vía de señalización mediada por BTK.

Por lo tanto, los derivados de purina **10f**, **10i**, **12j**, **24c** y **24d** se ensayaron para determinar la inhibición de las quinasas respectivas en modelos celulares. Para ello, las células se trataron durante 4 h o 24 h con una concentración creciente del compuesto respectivo: **10f** y **10i** en K562; **12j**, **24c** y **24d** en células Ramos. La inmunotransferencia del tratamiento de 24 h con **10f** y **10i**, demostró que el compuesto **10i** inhibía la autofosforilación de Bcr (pBcr) a una concentración menor a 0,5 μM , sin embargo, **10f** no mostró inhibición de esta

proteína. Desafortunadamente, como se observa en la **Figura 26, 10f** no logro niveles de inhibición comparables con **10i** en las proteínas sustrato de la vía de señalización de Bcr-Abl con un tratamiento de 24 h, no obstante, **10i** presento una clara disminución de estas proteínas a una concentración menor a 0,5 μM en Stat5 (pSTAT5) y CrkL (pCrkL) fosforilados, ambos sustratos directo de la quinasa oncogénica Bcr-Abl, por lo cual se decidió continuar los ensayos en K562 únicamente con este compuesto, de esta manera se ensaya a menores tiempos de incubación y con un espectro de concentraciones menores para observar de mejor manera la inhibición en la fosforilación de las proteínas objetivo. Se puede apreciar que el compuesto **10i** inhibe pBcr a una concentración menor a 0,08 μM . Además, el compuesto disminuyó el nivel de pSTAT5 bajo 0,4 μM y pCrkL con un ligero cambio bajo 0,4 μM , concordante con los resultados a 24 h (**Figura 27a**). Por otro lado, las células Ramos se trataron durante 4 h con dosis crecientes del compuesto **12j, 24c y 24d** y antes de la recolección se añadió IgM como requisito para la activación de la vía de señalización de la quinasa BTK. Como se muestra en la **Figura 27b** para el compuesto **12j** y **Figura 27c** para los compuestos **24c y 24d**, los compuestos redujeron la fosforilación de BTK y suprimieron la fosforilación de la proteína cadena abajo AKT por debajo de 2 μM , además, en contraste con los compuestos **24c y 24d**, **12j** logró disminuir la fosforilación de PLC γ 2 a una concentración por debajo de 20 μM . Este análisis demuestra que cada compuesto fue capaz de inhibir la vía oncogénica correspondiente en la línea celular seleccionada.

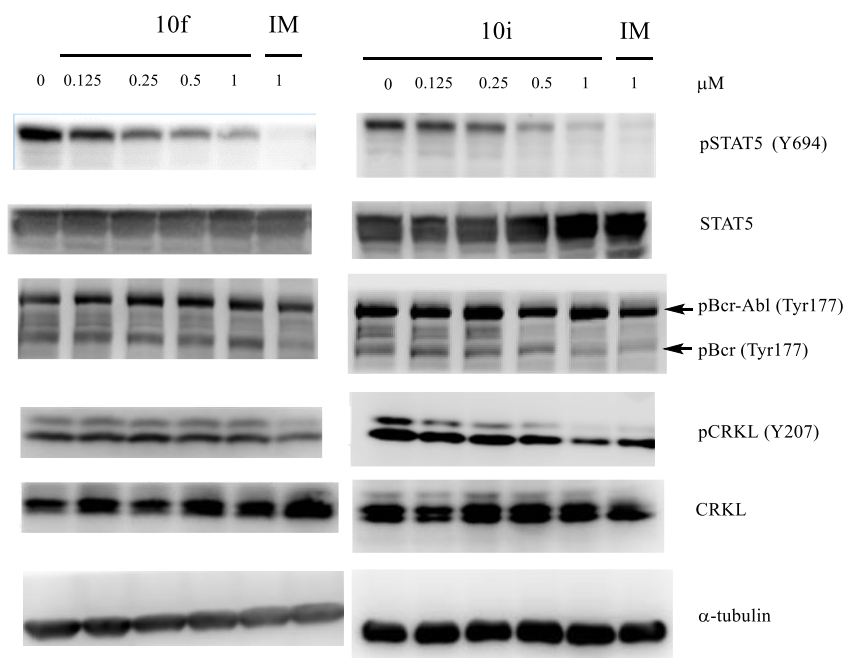
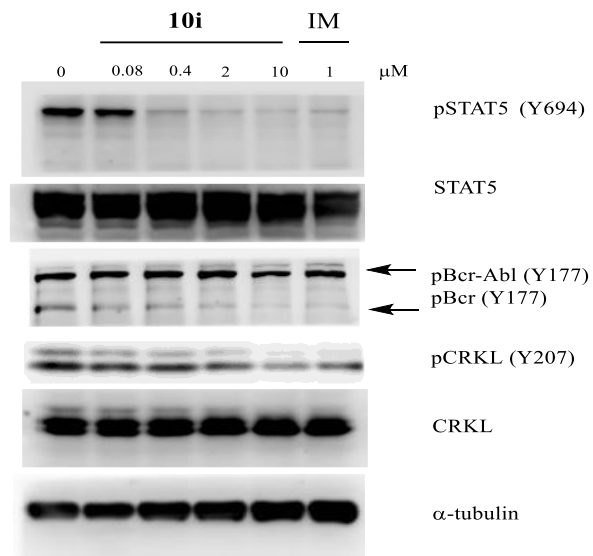
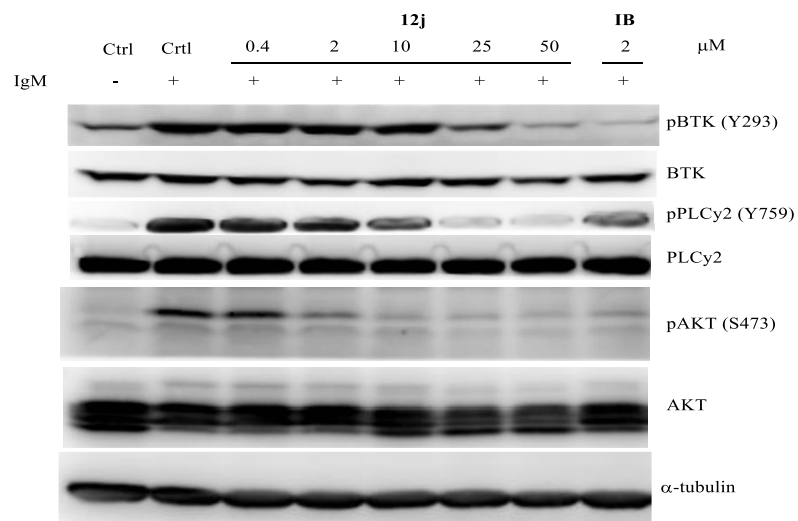


Figura 26. Inhibición de quinasas por **10f** (*izquierda*) y **10i** (*derecha*) en células K562. Las células se trataron con vehículo o la concentración indicada del compuesto durante 24 h; Se utilizó imatinib (IM, 1 μM) como control positivo. Las células se lisaron y las proteínas se detectaron mediante inmunotransferencia.

a)



b)



c)

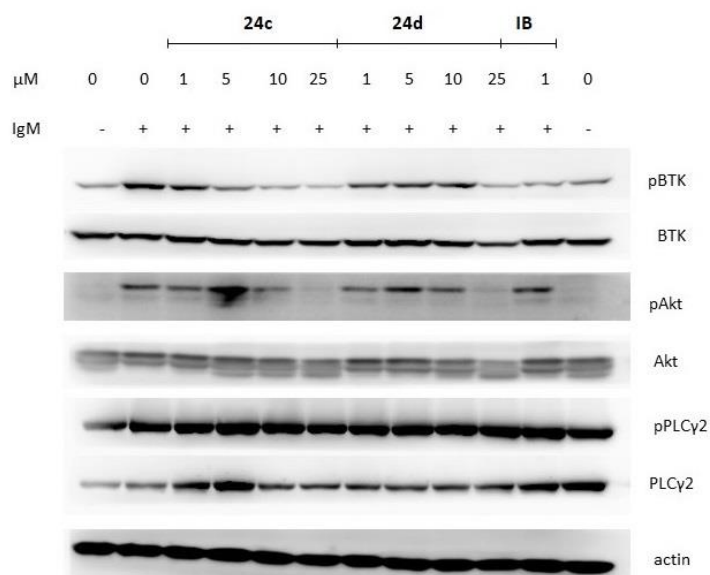


Figura 27. Inhibición de quinasas por **a) 10i** en células K562, **b) 12j** en RAMOS y **c) 24c** y **24d** en RAMOS. Las células se trataron con vehículo o la concentración indicada del compuesto durante 4 h; Se utilizó imatinib (IM, 1 μ M) e ibrutinib (IB, 2 μ M) como control positivo. Las células Ramos se estimularon con anti-IgM (5 μ g/mL) durante 10 min antes de la recolección. Las células se lisaron y las proteínas se detectaron mediante inmunotransferencia.

5.2.4 Ciclo celular

Considerando la clara inhibición de pSTAT5, que es una proteína involucrada en la proliferación celular, donde la inhibición de esta proteína induce la

detención del ciclo celular en la fase G1, se realizaron ensayos de ciclo celular para determinar el efecto antiproliferativo. Como se muestra en la **Figura 28a**, el compuesto **10i** después de 24 h de tratamiento en la línea celular K562, suprime la fase G2 y detiene el ciclo celular en las fases G1 y S a una concentración menor a 0,5 μM . Por otro lado, a modo de ejemplo de los inhibidores de BTK se muestra el compuesto **12j**, en donde se observa que no presenta retención alguna en el ciclo celular en las concentraciones ensayadas. Contrarrestando los resultados de citotoxicidad con ciclo celular, podría deducirse que este compuesto en la línea celular Ramos actúa citoestáticamente y no como agente citotóxico, sin embargo, mayores experimentos deben realizarse para confirmar esta hipótesis.

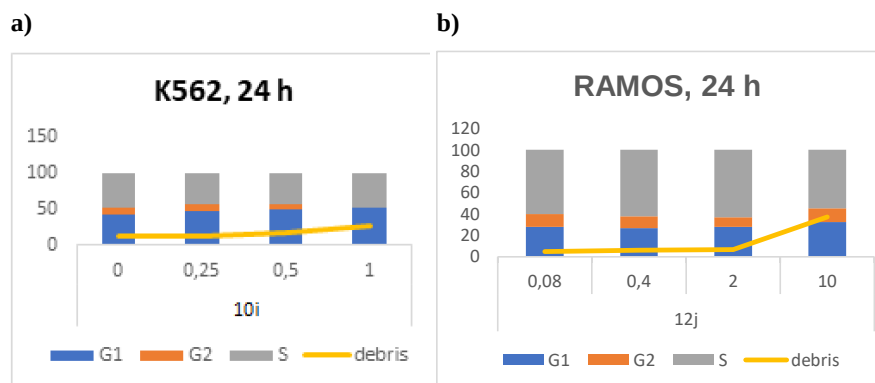


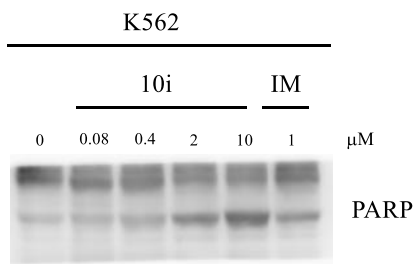
Figura 28: Efecto en el ciclo celular de **a)** compuesto **10i** en K562 y **b)** **12j** en Ramos luego de un tratamiento de 24 h.

5.2.5 Mecanismo de muerte celular

Por último, el mecanismo de muerte celular fue un objetivo de enfoque, donde se determinó que para este fin se determinaría la PARP como un marcador de

apoptosis, debido a que es una proteína, entre otras tantas, altamente estudiada, que participa en el mecanismo apoptótico de muerte celular. Esta determinación de muerte programada se realizó mediante inmunotransferencia de concentración homogénea proteica provenientes de células K562 previamente incubadas con el compuesto **10i** por 4 h (**Figura 29a**). El nuevo derivado de purina indujo eficazmente la escisión de PARP, lo cual, como se mencionó anteriormente, indica que este compuesto genera la activación del proceso apoptótico en esta línea celular, incluso a tiempos cortos de incubación. Para confirmar esto, se llevó a cabo el ensayo de activación de caspasas 3/7. La línea celular K562 se trató con dosis crecientes de **10i** durante 24 h. Cómo era esperable, se indujo la activación de caspasa 3/7, donde incluso a una concentración submicromolar de **10i** produjo una activación de caspasa en la línea celular K562 (**Figura 29b**).

A)



B)

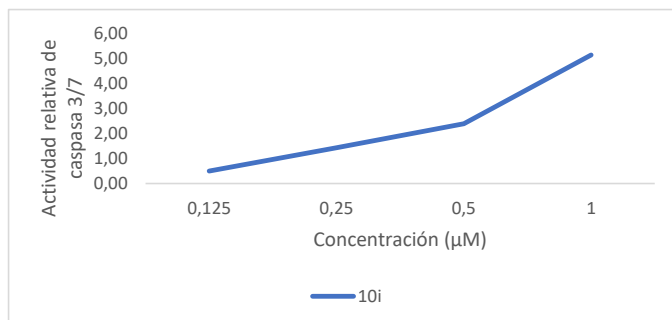


Figura 29: Efecto de **10i** en K562 **a)** escisión de PARP después de 4 h de tratamiento y **b)** actividad relativa de caspasa 3/7 después de 24 h de tratamiento.

5.3 Resultados computacionales

5.3.1 Relación estructura-actividad

Luego, se analizó por medio de 3D-QSAR en cada quinasa, con el fin de caracterizar la información mediante una relación estructura-actividad (REA) (o SAR por sus siglas en ingles “*structure-activity relationship*”) los diferentes valores de actividad en las proteínas observadas previamente, para validar el diseño y cuantificar el efecto de los sustituyentes en el farmacóforo. Aquí, la actividad biológica (IC_{50}) se correlacionó con los potenciales estérico y electrostático de estas purinas. Los resultados se pueden visualizar a través de poliedros coloreados alrededor de algunos fragmentos de los compuestos; estos indican qué cambios en el volumen y las propiedades electrónicas debe realizarse para mejorar la actividad biológica. A continuación, presentamos los resultados obtenidos para cada quinasa.

Para Bcr-Abl, como se puede apreciar en la **Figura 30A y B**, se aprecia el mapa de contornos estérico para la molécula más activa (**V**) y la menos activa (**12k**) respectivamente. Existen 3 poliedros verdes representativos del modelo, ubicados en la zona de la piperazina, en la zona alquilada de la posición N-9 de la purina, y entre la posición *meta*- y *para*- del fragmento de anilina. Por otro lado, el poliedro amarillo a destacar se ubica cerca de la posición N-9 alquilada, pero a una distancia mayor que el poliedro amarillo. Los poliedros verdes indican que es favorable para la actividad biológica la presencia de sustituyentes voluminosos, mientras que los poliedros amarillos indican que es favorable sustituyentes de poco volumen. Lo que sugiere que los sustituyentes de mayor longitud en esa zona no son favorables para la actividad.

En la **Figura 30C y D**, muestra el mapa de contornos electrostático para la molécula más activa (**V**) y la menos activa (**12k**) respectivamente. Se encuentran dos poliedros rojos cerca del fragmento anilínico y en la piperazina. Por otro lado, se puede apreciar la presencia de dos poliedros azules en la posición *orto*- y *para*- del fragmento de anilina. Los poliedros rojos indican que es favorable para la actividad la presencia de grupos electronegativos, mientras que los poliedros azules informan que es favorable para mejorar la actividad biológica que existan grupos electropositivos. La piperazina vendría a favorecer la actividad, mientras que los grupos cloruros (como los compuestos **10l**, **10m** y **10n**) podrían ser sustituidos por otros más electronegativos.

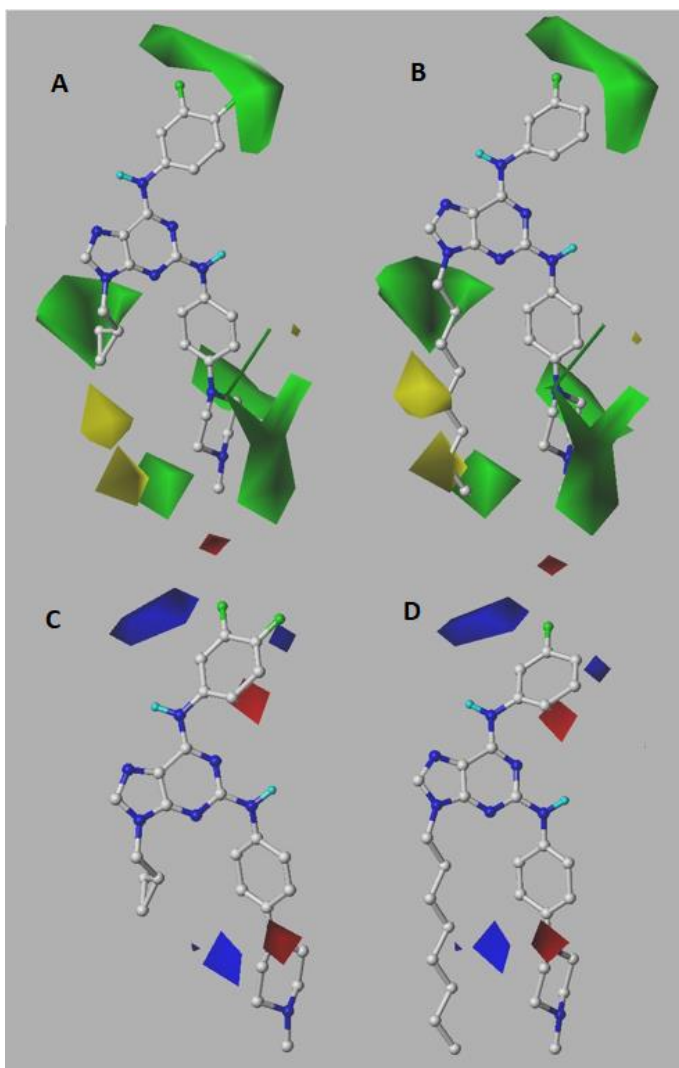


Figura 30: Mapas de contornos estéricos (**A, B**) y electrostáticos (**C, D**) en Bcr-Abl. El compuesto más activo **V** (**A,C**) se compara con el menos activo **12k** (**B,D**).

En cambio, para BTK, en la **Figura 31A y B**, se aprecia el mapa de contornos estérico para la molécula más activa (**24d**) y la menos activa (**16b**), respectivamente. Se pueden apreciar grandes poliedros amarillos cercano a la posición N-9 de la purina, la posición *orto*- y *meta*- del fragmento anilínico y en la piperazina. También, se aprecia un poliedro verde levemente alejado de la posición N-9 alquílica del núcleo de purina. Los poliedros verdes indican que es favorable para la actividad biológica la presencia de sustituyentes voluminosos, mientras que los poliedros amarillos indican que es favorable sustituyentes de poco volumen. Para la molécula más activa, se puede justificar por la presencia de un anillo de benceno enlazado a través de un grupo carbonilo a la posición *para*- del fragmento de anilina. Por otro lado, la ausencia de ciertos sustituyentes en el compuesto **24d** justifica su baja actividad.

En la **Figura 31C y D**, se muestra el mapa de contornos electrostático para la molécula más activa (**24d**) y la menos activa (**16b**), respectivamente. Se puede apreciar un poliedro rojo en la cercanía de la posición *para*- del fragmento de anilina. Por otro lado, se puede observar un poliedro azul en la cercanía de la piperazina. Los poliedros rojos indican que es favorable para la actividad la presencia de grupos electronegativos, mientras que los poliedros azules informan que es favorable para mejorar la actividad biológica que existan grupos electropositivos. Este modelo justifica la buena actividad del compuesto **24d** por su oxígeno carbonílico en la posición *para*- de la anilina muy próximo al poliedro rojo.

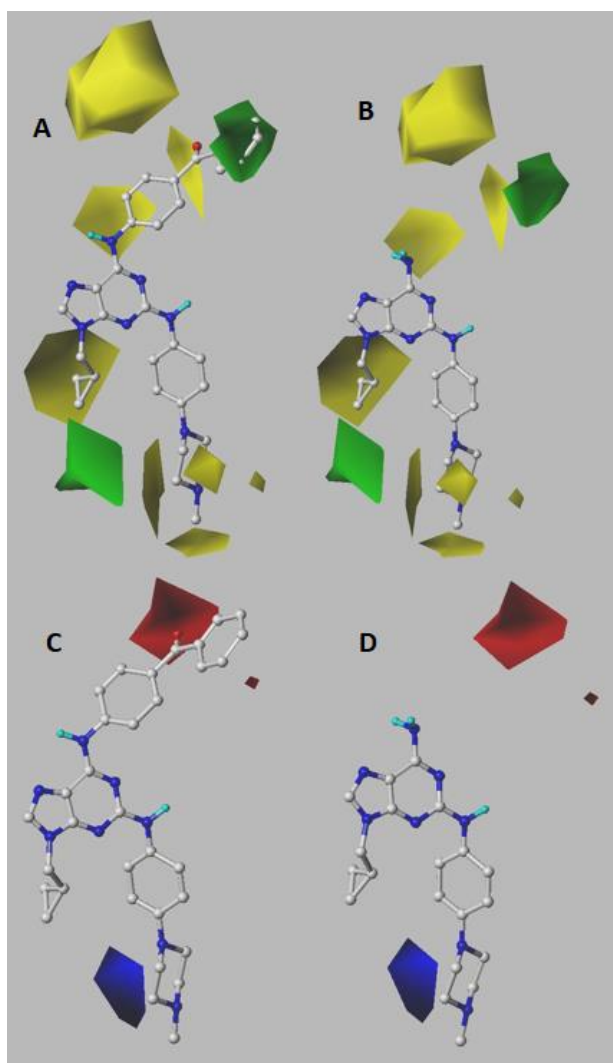


Figura 31: Mapas de contornos estéricos (**A, B**) y electrostáticos (**C, D**) en BTK. El compuesto más activo **24d** (**A,C**) se compara con el menos activo **16b** (**B, D**).

5.3.2 Estudios de acoplamiento molecular

Se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular para estudiar el patrón de unión de derivados de purina seleccionados en los sitios activos de Bcr-Abl y BTK. El protocolo se validó primero ejecutando el acoplamiento del ligando co-cristalizado dasatinib-Bcr-Abl (PDB ID: 2GQG) [54] y el ligando 481-BTK (PDB ID: 4OT5) [55]. La validación de acoplamiento automático reprodujo el modo de unión del ligando co-cristalizado, lo que indica que el protocolo de acoplamiento utilizado es adecuado y demuestra que el programa de acoplamiento logra reproducir las principales interacciones entre los ligandos co-cristalizados y sus respectivas proteínas (**Anexo 8.1.1** y **Anexo 8.1.2**). Según estudios bioquímicos, los compuestos **10i** y **12j** mostraron una potente inhibición contra Bcr-Abl y BTK y, estos también fueron altamente selectivos entre estas quinasas. Por lo tanto, los modos de unión de estas nuevas purinas se determinaron mediante estudios *in silico*, utilizando los protocolos obtenidos con el acoplamiento. Las puntuaciones de afinidad de unión se expresan en kcal/mol en la **Tabla 4**, así como los de los ligandos co-cristalizados.

Tabla 4. Puntuaciones de afinidad de unión (kcal/mol) para las purinas seleccionadas en los sitios activos de la enzima.

Compuesto	MM-GBSA	
	Bcr-Abl	BTK
10i	-74,52	-73,37
12j	-58,47	-86,08
Dasatinib	-71,75	---
Lig-4OT5	---	-89,00

Los resultados del acoplamiento para Bcr-Abl indicaron que **10i** tenía una energía de enlace de $-74,52$ kcal/mol, mientras que **12j** poseía $-58,47$ kcal/mol de energía. Estos valores están de acuerdo con los resultados experimentales y muestran que **10i** es el compuesto más activo en Bcr- Abl en comparación con **12j**. El compuesto **10i** posee una alta afinidad por esta quinasa debido a los puentes de hidrógeno con el residuo M318 e interacciones hidrofóbicas favorables con los aminoácidos L248, G249, Y253 y V256.

Hay interacciones de acoplamiento π - π entre el anillo aromático unido a piperazina con el fenol del residuo Y253 (**Figura 32A**). Por el contrario, **12j** (**Figura 32B**) tiene una cadena alquílica *n*-octilo que interactúa desfavorablemente con los residuos L370 y Y253, provocando así una posición diferente a **10i**. Debido a esto, **12j** solo forma un puente de hidrógeno con M318 a través del fragmento N-H fenilamino en C-2, que significativamente reduce sus interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos L248, G249, Y253 y V256.

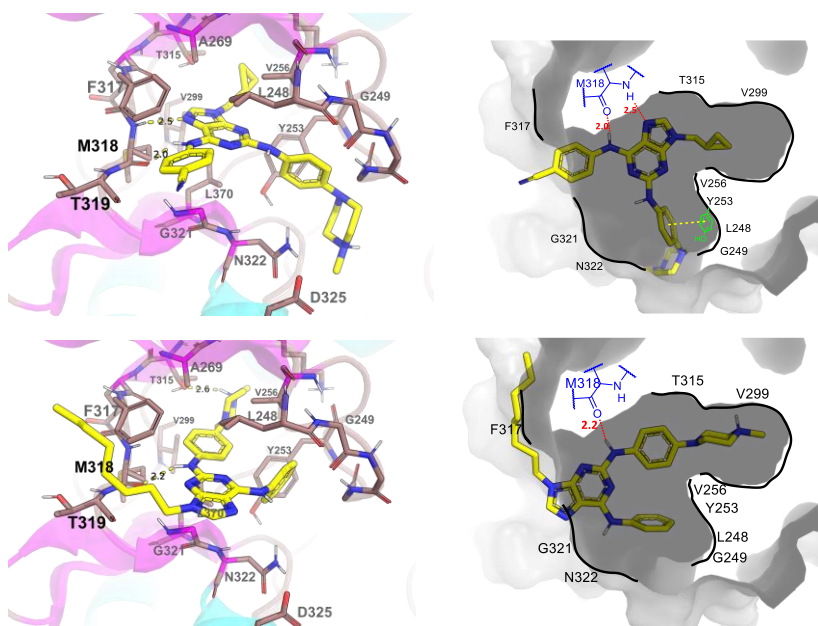


Figura 32. Representaciones de los modos de unión de los compuestos **10i** (A) y **12j** (B) en el sitio activo de Bcr-Abl. La imagen de la derecha es la representación tridimensional del mejor resultado de acoplamiento para cada compuesto. La imagen de la izquierda es una vista superior de un diagrama de interacciones de ligandos con el sitio de unión.

En el caso de BTK, los mejores resultados de acoplamiento mostraron la misma posición para **10i** y **12j** (**Figura 33A-B**); estos compuestos formaron puente de hidrógeno con M477. La energía de unión de estos compuestos coincide con los valores experimentales donde el compuesto **12j** es de los más activos con una energía de enlace de $-86,08$ kcal/mol. La **Figura 33B** muestra que el radical *n*-octilo interactúa favorablemente con el estrecho bolsillo hidrofóbico de la enzima en el sitio activo. Se genera importantes interacciones

con los aminoácidos F540 y L542: ya que, estos residuos están en la parte más interna del bolsillo hidrofóbico. Estas interacciones no se pueden lograr con los radicales alquilo más cortos como los metilciclopropilo de **10i** o isopentilo del **12b** (energía de enlace -73,37 y 67,34 kcal/mol [ver **Anexo 8.2.4**], respectivamente).

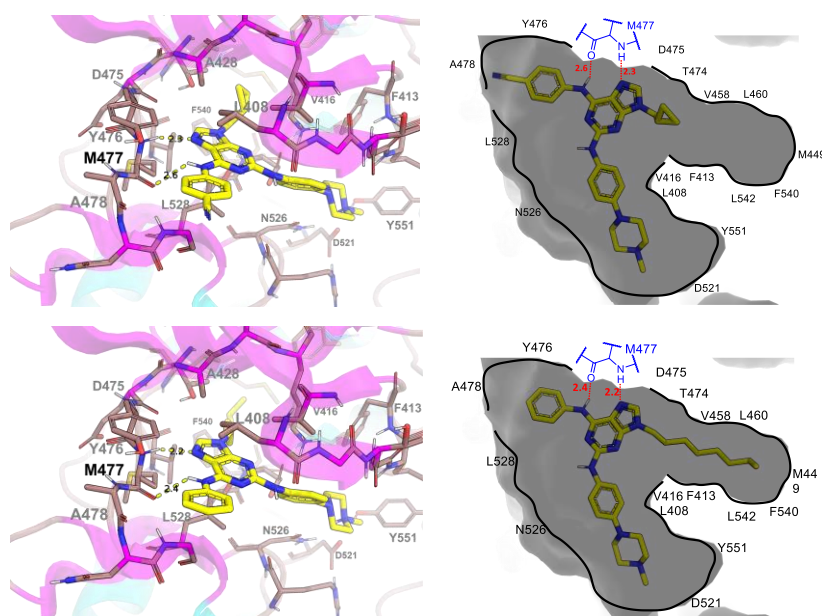


Figura 33. Representaciones de los modos de unión de los compuestos **10i** (A) y **12j** (B) en el sitio activo de BTK. La imagen de la derecha es la representación tridimensional del mejor resultado de acoplamiento para cada compuesto. La imagen de la izquierda es una vista superior de un diagrama de interacciones de ligandos con el sitio de unión.

6. Conclusiones

Se logró sintetizar todos los intermediarios y compuestos finales de las **series I-VI**. Los rendimientos de reacción variaron entre bajos y altos, siendo los fragmentos de anilina con menor perfil nucleofílico los que presentaron los menores rendimientos en la sustitución nucleofílica aromática.

La caracterización de cada compuesto fue posible mediante espectros de ^1H , ^{19}F , ^{13}C , DEPT, HSQC y HMBC, además, espectros de masa de alta y baja resolución fueron realizados para los compuestos finales e intermediarios.

De igual manera, se logró llevar a cabo las mediciones de inhibición enzimática de los compuestos finales en ambas quinasas. Luego, mediante un análisis de relación estructura-actividad, se pudo comprender que para la quinasa Bcr-Abl el efecto estérico de los sustituyentes del fragmento anilínico en C-6 de la purina, pareciese ser el efecto más importante en la actividad inhibitoria que los efectos electrónicos. Para Bcr-Abl, el compuesto **10k** fue el más activo con un valor de $\text{IC}_{50} = 40 \text{ nM}$. Por otro lado, el largo de la cadena alquílica en N-9, sugiere que cadenas cortas de menos de cinco carbonos potencian la actividad y cadenas largas disminuyen la actividad sobre Bcr-Abl. Para la quinasa BTK, la posición del sustituyente del fragmento anilínico en C-6 de la purina, sugiere que en posición *para* se potencia la actividad como se puede observar con los compuestos **10g** vs **10j** (NO_2), **10f** vs **10i** (CN) o **10e** vs **10h** (OCF_3). Además, el tamaño y longitud de la cadena alquílica en N-9 representa un punto importante en la inhibición de esta quinasa, en donde cadenas de largas y voluminosas generaron los mejores resultados, resaltándose **12j** con un $\text{IC}_{50} = 410 \text{ nM}$, y con selectividad sobre esta quinasa sobre Abl y CDK2 con $\text{IC}_{50} > 20\,000 \text{ nM}$. La adición de un grupo carbonilo no mejoró la actividad

sobre las quinasas, pero el grupo metileno como *linker* entre piperazina y anilina mejoró la actividad sobre BTK.

La incorporación de fragmentos presentes en inhibidores comerciales de Bcr-Abl y BTK no resultó en mejores resultados en base a la inhibición de las quinasas. Sin embargo, al explorar bioisómeros de oxígeno en el fragmento de difenil éter, se encontró que el intercambio de oxígeno por metileno potenció la inhibición en BTK, con un $IC_{50} = 150$ nM en el compuesto **24d**.

Se demostró que el N-7 es indispensable en la actividad para las dos quinasas, confirmando la hipótesis de este heteroátomo cumple un rol primordial en el modo de unión de estos compuestos en los sitios activos. Por otro lado, la sustitución por aminas alifáticas en C-6 de la purina, redujo la actividad sobre las quinasas.

Mediante los análisis de 3D-QSAR se logró explicar las diferentes actividades de los compuestos purínicos, donde los factores estéricos y electrónicos fueron características claves en la actividad. Por otro lado, mediante acoplamiento molecular se identificaron las interacciones más importantes en el complejo ligando-receptor, en donde se apreciaron dos puentes de hidrógeno mediante el NH sustituyendo en C-6 y el N-7 del heterociclo con metionina 318 con el compuesto **10i** en Bcr-Abl y, metionina 477 con el compuesto **12j** en BTK.

Los resultados de inmunotransferencia comprueban que los compuestos **10i** y **12j** inhiben efectivamente las vías de señalización Bcr-Abl y BTK en modelos celulares, respectivamente, generando una disminución en las proteínas sustrato involucradas en la cascada de señalización de estas vías. Una de

ellas correspondió a pSTAT5 para el caso del compuesto **10i** en la línea celular K562, proteína directamente involucrada con la proliferación celular, por lo que se evaluó la retención del ciclo celular, encontrándose que a concentraciones bajo 1 μ M el ciclo celular se retiene en G1.

Por último, se evaluaron marcadores de muerte celular como lo son la proteína PARP y la activación de caspasas 3 y 7. Se demostró que el compuesto **10i** aumenta la escisión de PARP, proteína clave en el proceso de apoptosis. Además, se logró observar la activación de caspasas 3 y 7 a partir de 0,25 μ M, por lo cual a partir de estos resultados se puede suponer que el mecanismo de muerte celular por el compuesto **10i** es apoptótico.

7. Bibliografía

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
2. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* **69**, 7–34 (2019).
3. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2018. <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars>.
4. Stein, Gary S. y Luebbbers, K. P. *Cancer: Prevention, Early Detection, Treatment and Recovery*. (John Wiley & Sons, Inc, 2019).
5. Palomo, Iván., Pereira, J. & Palma, J. *HEMATOLOGÍA: Fisiopatología y Diagnóstico. HEMATOLOGÍA: Fisiopatología y Diagnóstico* (Universidad de Talca, 2009).
6. Brown, G., Tsapogas, P. & Ceredig, R. The changing face of hematopoiesis: a spectrum of options is available to stem cells. *Immunol Cell Biol* **96**, 898–911 (2018).
7. Amriah Buang. WHO Klassifikation 2016. *Blood* **2**, 58–71 (2006).
8. Mordechail, Y. ben et al. The biology of. **2**, 35–71 (1973).
9. Nowell, C. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut Zeitschrift für die Gesamte Blutforschung* **8**, 65–66 (1962).
10. O'Hare, T., Deininger, M. W. N., Eide, C. A., Clackson, T. & Druker, B. J. Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Clinical Cancer Research* **17**, 212–221 (2011).
11. Chu, S., Li, A., Singh, H. & Bhatia, R. BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* **67**, 7045–7053 (2007).

12. Xun, Z., Saghi, G., Harvey, L., Malashkevich, V. N. & Kim, P. S. Structure of the bcr-abl oncoprotein oligomerization domain. *Nat Struct Biol* **9**, 117–120 (2002).
13. Naka, K. *et al.* TGF- β -FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* **463**, 676–680 (2010).
14. Markova, B. *et al.* Novel pathway in Bcr-Abl signal transduction involves Akt-independent, PLC- γ 1-driven activation of mTOR/p70S6-kinase pathway. *Oncogene* **29**, 739–751 (2010).
15. Ly, C., Arechiga, A. F., Melo, J. v., Walsh, C. M. & Ong, S. T. Bcr-Abl kinase modulates the translation regulators ribosomal protein S6 and 4E-BP1 in chronic myelogenous leukemia cells via the mammalian target of rapamycin. *Cancer Res* **63**, 5716–5722 (2003).
16. Hoelbl, A. *et al.* Stat5 is indispensable for the maintenance of Bcr/Abl-positive leukaemia. *EMBO Mol Med* **2**, 98–110 (2010).
17. Klejman, A. *et al.* The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO Journal* **21**, 5766–5774 (2002).
18. Yamamoto, M., Kurosu, T., Kakiyama, K., Mizuchi, D. & Miura, O. The two major imatinib resistance mutations E255K and T315I enhance the activity of BCR/ABL fusion kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 1272–1275 (2004).
19. Shah, N. P. *et al.* Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* (1979) **305**, 399–401 (2004).
20. O'Hare, T., Eide, C. A. & Deininger, M. W. N. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* **110**, 2242–2249 (2007).
21. Rossari, F., Minutolo, F. & Orciuolo, E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: From chemical development to clinical efficacy. *J Hematol*

- Oncol* **11**, 1–14 (2018).
22. Tauchi, T. & Ohyashiki, K. The second generation of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors. *Int J Hematol* **83**, 294–300 (2006).
 23. Ernst, T., la Rosée, P., Müller, M. C. & Hochhaus, A. BCR-ABL Mutations in Chronic Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* **25**, 997–1008 (2011).
 24. Lipton, J. H. *et al.* Ponatinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukaemia: An international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **17**, 612–621 (2016).
 25. Soverini, S. *et al.* Next-generation sequencing for BCR-ABL1 kinase domain mutation testing in patients with chronic myeloid leukemia: A position paper. *J Hematol Oncol* **12**, 1–11 (2019).
 26. Wong, S. & Witte, O. N. The BCR-ABL Story: Bench to Bedside and Back. *Annu Rev Immunol* **22**, 247–306 (2004).
 27. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* **94**, 1266–1287 (2019).
 28. Landau, D. A. *et al.* Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* **526**, 525–530 (2015).
 29. Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H. & Stilgenbauer, S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **10**, 37–50 (2010).
 30. Stevenson, F. K., Krysov, S., Davies, A. J., Steele, A. J. & Packham, G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **118**, 4313–4320 (2011).
 31. Niïro, H. & Clark, E. A. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* **2**, 945–956 (2002).
 32. Cooper, M. D. The early history of B cells. *Nat Rev Immunol* **15**, 191–197 (2015).

33. Pal Singh, S., Dammeijer, F. & Hendriks, R. W. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Mol Cancer* **17**, 1–23 (2018).
34. Mohamed, A. J. *et al.* Bruton's tyrosine kinase (Btk): Function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev* **228**, 58–73 (2009).
35. Catovsky, D. *et al.* Prolymphocytic Leukæmia of B and T Cell Type. *The Lancet* **302**, 232–234 (1973).
36. Campbell, R., Chong, G. & Hawkes, E. Novel Indications for Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors, beyond Hematological Malignancies. *J Clin Med* **7**, 62 (2018).
37. Suri, D., Rawat, A. & Singh, S. X-linked Agammaglobulinemia. *Indian J Pediatr* **83**, 331–337 (2016).
38. Crofford, L. J. *et al.* implications for therapy. **12**, 763–773 (2017).
39. Haselmayer, P. *et al.* Efficacy and Pharmacodynamic Modeling of the BTK Inhibitor Evobrutinib in Autoimmune Disease Models. *The Journal of Immunology* **202**, 2888–2906 (2019).
40. Woyach, J. A. *et al.* Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *New England Journal of Medicine* **370**, 2286–2294 (2014).
41. Byrd, J. C. *et al.* Acalabrutinib (ACP-196) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine* **374**, 323–332 (2016).
42. Hamasy, A. *et al.* Substitution scanning identifies a novel, catalytically active ibrutinib-resistant BTK cysteine 481 to threonine (C481T) variant. *Leukemia* **31**, 177–185 (2017).
43. Bond, D. A. & Woyach, J. A. Targeting BTK in CLL: Beyond Ibrutinib. *Curr Hematol Malig Rep* **14**, 197–205 (2019).
44. Caldwell, R. *et al.* Discovery of a novel series of pyridine and pyrimidine carboxamides as potent and selective covalent inhibitors of Btk. *Bioorg*

- Med Chem Lett* **28**, 3419–3424 (2018).
45. Sharma, S. *et al.* Design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for purines as kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* **112**, 298–346 (2016).
 46. Ratzon, E. *et al.* A Small Molecule Inhibitor of Bruton's Tyrosine Kinase Involved in B-Cell Signaling. *ACS Omega* **2**, 4398–4410 (2017).
 47. Munshi, P. N., Lubin, M. & Bertino, J. R. 6-Thioguanine: A Drug With Unrealized Potential for Cancer Therapy. *Oncologist* **19**, 760–765 (2014).
 48. Sera, T. Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **52**, 1812–1813 (2007).
 49. Gandhi, V., Keating, M. J., Bate, G. & Kirkpatrick, P. Nelarabine. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 17–18 (2006).
 50. Welsch, M. E., Snyder, S. A. & Stockwell, B. R. Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* **14**, 347–361 (2010).
 51. Wang, Y. *et al.* Novel N9-arenethenyl purines as potent dual Src/Abl tyrosine kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 4907–4912 (2008).
 52. Shi, Q. *et al.* Purine derivatives as potent Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors for autoimmune diseases. *Bioorg Med Chem Lett* **24**, 2206–2211 (2014).
 53. Bertrand, J. *et al.* New 2,6,9-trisubstituted purine derivatives as Bcr-Abl and Btk inhibitors and as promising agents against leukemia. *Bioorg Chem* **94**, 103361 (2020).
 54. Calderón-Arancibia, J. *et al.* Synthesis and pharmacophore modelling of 2,6,9-trisubstituted purine derivatives and their potential role as apoptosis-inducing agents in cancer cell lines. *Molecules* **20**, 6808–6826

- (2015).
55. Pandey, Anjali. *et al.* Nitrogenous HeteroCyclic Compounds. 66 (2002).
 56. Alexander, M. *et al.* MK2 inhibitors and uses thereof. vol. 21 635 (2014).
 57. Xin, M. *et al.* The discovery of novel N-(2-pyrimidinylamino) benzamide derivatives as potent hedgehog signaling pathway inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **23**, 6777–6783 (2013).
 58. Hartwig, J. F. Approaches to catalyst discovery. New carbon–heteroatom and carbon–carbon bond formation. *Pure and Applied Chemistry* **71**, 1417–1423 (1999).
 59. Czakó, L. K. and B. *Strategic application of Named Reactions in Organic Synthesis*. (Elsevier Academic Press, 2005).
 60. Ludwig, W. Methode zum Ersatz des Sauerstoffatoms der Ketone und Aldehyde durch Wasserstoff. *Justus Liebigs Ann Chem* **394**, 86–108 (1912).
 61. Yamabe, S., Zeng, G., Guan, W. & Sakaki, S. Substrate dependent reaction channels of the Wolff-Kishner reduction reaction: A theoretical study. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **10**, 259–270 (2014).
 62. Tokarski, J. S. *et al.* The structure of dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res* **66**, 5790–5797 (2006).
 63. Lou, Y. *et al.* Structure-based drug design of RN486, a potent and selective Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor, for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Med Chem* **58**, 512–516 (2015).
 64. Jacobson, M. P., Friesner, R. A., Xiang, Z. & Honig, B. On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations. *J Mol Biol* **320**, 597–608 (2002).
 65. Jacobson, M. P. *et al.* A Hierarchical Approach to All-Atom Protein Loop Prediction. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **55**, 351–367

- (2004).
66. Friesner, R. A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J Med Chem* **47**, 1739–1749 (2004).
 67. Friesner, R. A. *et al.* Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem* **49**, 6177–6196 (2006).
 68. Legraverend, M. Recent advances in the synthesis of purine derivatives and their precursors. *Tetrahedron* **64**, 8585–8603 (2008).
 69. Zarate, A. M. Diseño, síntesis, estudios de acoplamiento molecular y evaluación biológica de nuevos compuestos inhibidores de SMO Tesis de Doctorado (Pontificia Universidad Católica, 2019).
 70. Harrison, T. *et al.* Pyrimidopyrimidinones useful as wee-1 kinase inhibitors. 392 (2015).

8. Anexos

8.1 Procedimiento sintético y caracterización de los compuestos químicos

8.1.1 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos **2a–e** y **2a'–e'**

A una solución de 2,6-dicloro-9*H*-purina (**1**, 2000 mg, 1058 mmol), se añade el respectivo haluro de alquilo (1580 mmol) y K_2CO_3 (3360 mg, 3174 mmol) en DMF (20 mL), luego la mezcla se deja en agitación a temperatura ambiente por 12 h. Después de completada la reacción, la mezcla se filtra por pliegues y el líquido se lleva a sequedad en un rotaevaporador a presión reducida. El residuo oleoso se purifica por cromatografía de silica gel utilizando una fase móvil acetona/diclorometano (5:95) para obtener los productos **2a–e** y **2a'–e'**.

2,6-Dicloro-9-(ciclopropilmetil)-9*H*-purina, (2a): Sólido blanco, rendimiento 51 %, pf 88.4 – 89.1 °C. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.22 (s, 1H, CH), 4.10 (d, J = 7.4 Hz, 2H, CH_2), 1.33 (ddd, J = 12.4, 7.8, 4.8 Hz, 1H, CH), 0.72 (q, J = 5.6 Hz, 2H, CH_2), 0.48 (q, J = 5.2 Hz, 2H, CH_2). ^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 153.31, 153.02, 151.81, 145.52, 130.88, 49.48, 11.03, 4.64 (2C). ESI/MS para ($C_9H_8Cl_2N_4$ $[M+H]^+$). Calcd: 243.0. Encontrado: 242.9.

2,6-Dicloro-7-(ciclopropilmetil)-7*H*-purina, (2a'): Sólido blanco, rendimiento 18 %, pf 90.3 – 91.4 °C. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.40 (s, 1H, CH), 4.33 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 1.47 – 1.31 (m, 1H, CH), 0.85 – 0.66 (m, 2H, CH_2), 0.48 (q, J = 5.1 Hz, 2H, CH_2). ^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.63, 153.01, 149.90, 143.77, 121.80, 52.50, 11.56, 4.67 (2C). ESI/MS para ($C_9H_8Cl_2N_4$ $[M+H]^+$). Calcd: 243.0. Encontrado: 242.9.

2,6-Dicloro-9-isopentil-9*H*-purina, (2b): Sólido blanco, rendimiento 48 %,

pf 77-79 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (s, 1H, CH), 4.27 (t, J = 7.6, 2H, CH_2), 1.81 (dt, J = 9.0, 7.1 Hz, 2H, CH_2), 1.68 – 1.52 (m, 1H, CH), 0.99 (d, J = 6.6 Hz, 6H, 3 CH_3). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 153.32, 153.05, 151.87, 145.71, 130.88, 43.14, 38.63, 25.79, 22.33 (2C). ESI/MS para ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). Calcd: 259.1. Encontrado: 259.0.

2,6-Dicloro-7-isopentil-7H-purina, (2b'): Aceite blanco, rendimiento 15 %, pf 77.4 – 79.3 °C. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 8.26 (s, 1H, CH), 4.47–4.43 (m, 2H, CH_2), 1.77 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 1.68–1.57 (m, 1H, CH), 0.96 (d, J = 6.7 Hz, 6H, 2 CH_3). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 163.70, 151.76, 150.47, 143.79, 121.60, 77.16, 46.26, 40.54, 25.79, 22.33 (2C). ESI/MS para ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). Calcd: 259.1. Encontrado: 258.8.

2,6-Dicloro-9-pentil-9H-purina, (2c): Sólido blanco, rendimiento 50 %, pf 39.6 – 41.8 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (s, 1H, CH), 4.24 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 1.94 – 1.85 (m, 2H, CH_2), 1.43 – 1.23 (m, 4H, 2 CH_2), 0.87 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 153.28, 152.94, 151.75, 145.87, 130.83, 44.77, 29.54, 28.73, 22.14, 13.89. ESI/MS para ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). Calcd: 259.1. Encontrado: 259.0.

2,6-Dicloro-7-pentil-7H-purina, (2c'): Aceite amarillo, rendimiento 15 %, pf 76.8 – 78.3 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.21 (s, 1H, CH), 4.47 – 4.37 (m, 2H, CH_2), 1.93 – 1.84 (m, 2H, CH_2), 1.37 – 1.26 (m, 4H, 2 CH_2), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 153.07, 150.25, 143.70, 121.58, 53.45, 47.72, 31.26, 28.44, 22.08, 13.81. ESI/MS para ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). Calcd: 259.1. Encontrado: 259.1.

2,6-Dicloro-9-hexil-9H-purina, (2d): Sólido blanco, rendimiento 45 %, pf 39.4 – 40.1 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.06 (s, 1H, CH), 4.22 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 1.87 (d, J = 5.8 Hz, 2H, CH_2), 1.29 (m, 6H, 3 CH_2), 0.85 (t, J = 6.1 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 153.19, 152.92, 151.75, 145.72, 130.77, 44.68, 31.08, 29.74, 26.22, 22.40, 13.80. ESI/MS para ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_4$). Calcd: 272.1. Encontrado: 272.9.

2,6-Dicloro-7-hexil-7H-purina, (2d'): Aceite amarillo, rendimiento 23 %, pf 77.1 – 79.3 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.26 (s, 1H, CH), 4.45 – 4.39

(m, 2H, CH₂), 1.90 (dt, *J* = 14.7, 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.30 (dt, *J* = 11.4, 8.1 Hz, 6H, 3CH₂), 0.86 (dd, *J* = 9.4, 4.7 Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 158.68, 150.53, 145.29, 140.23, 137.46, 47.81, 31.48, 31.10, 26.04, 22.41, 13.88. ESI/MS para (C₁₁H₁₄Cl₂N₄). Calcd: 272.1. Encontrado: 272.9.

2,6-Dicloro-9-octil-9H-purina, (2e): Sólido blanco, rendimiento 93%, pf 43.5 - 47.3 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (s, 1H), 4.25 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.99 - 1.78 (m, 2H), 1.41 - 1.08 (m, 11H), 0.86 (dd, *J* = 8.1, 5.6 Hz, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 153.32, 153.02, 151.84, 145.85, 130.88, 77.16, 44.81, 31.78, 29.89, 29.14, 29.01, 26.68, 22.68, 14.15. ESI/MS para (C₁₃H₁₈Cl₂N₄ [M+H]⁺). Calcd: 301.1. Encontrado: 300.8.

2,6-Dicloro-7-octil-7H-purina, (2e'): Sólido blanco, rendimiento 5%, pf 64.2 - 65.9 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.23 (s, 1H, CH), 4.45 (t, *J* = 11.9 Hz, 2H, CH₂), 1.99 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 1.28 (m, 10H, 5CH₂), 0.93 - 0.77 (m, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 161.08, 154.91, 147.68, 144.60, 126.64, 44.81, 31.78, 29.89, 29.14, 29.01, 26.68, 22.68, 14.15. ESI/MS para (C₁₃H₁₈Cl₂N₄ [M+H]⁺). Calcd: 301.1. Encontrado: 301.0.

8.1.2 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 3a - 3ad

A una solución de **2a-e** (0.411 mmol), se añade la correspondiente anilina (0.411) y DIPEA (0.15 mL, 0.822 mmol) en *n*-butanol (20 mL), luego la mezcla se deja en agitación a 110 °C por 12 h. Luego de enfriar a temperatura ambiente, la reacción se concentra en rotaevaporador a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía de silica gel utilizando una fase móvil acetona/diclorometano (10:90) para obtener los productos **3a-ad**.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-N-(2-fluorofenil)-9H-purin-6-amina, (3a): Sólido blanco, rendimiento 61 %, pf 135-138 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.58 (dd, *J* = 8.1, 7.2 Hz, 1H, CH), 7.97 (s, 2H, NH, CH), 7.21 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, CH), 7.18 - 7.11 (m, 1H, CH), 7.11 - 7.04 (m, 1H, CH), 4.05 (d, *J* = 7.3

Hz, 2H, CH₂), 1.42 – 1.26 (m, 1H, CH), 0.69 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂), 0.46 (q, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.03, 153.26 (d, ¹*J*_{C-F} = 244.5 Hz, CF), 152.16, 152.04, 151.10, 140.89, 126.62 (d, ²*J*_{C-F} = 9.9 Hz), 124.70 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3.8 Hz, CH), 124.25 (d, ³*J*_{C-F} = 7.6 Hz, CH), 115.14 (d, ²*J*_{C-F} = 19.1 Hz, CH), 48.88, 11.18, 4.51 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -130.50 (s, 1F). ESI/MS para (C₁₅H₁₃ClFN₅ [M+H]⁺): Calcd: 318.1. Encontrado: 318.1.

2-Cloro-*N*-(3-clorofenil)-9-(ciclopropilmetil)-9*H*-purin-6-amina, (3b):

Sólido café, rendimiento 73 %, pf 140-141 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (s, 1H, NH), 7.91 (s, 1H, CH), 7.85 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, CH), 7.66 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H, CH), 7.28 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH), 7.08 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 1H, CH), 4.03 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 1.36 – 1.25 (m, 1H, CH), 0.69 (q, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 153.92, 152.03, 150.93, 140.80, 139.39, 134.63, 130.06, 123.85, 120.15, 119.20, 118.21, 48.74, 11.03, 4.39 (2C). ESI/MS para (C₁₅H₁₃Cl₂N₅ [M+2H+Na-C₄H₇Cl]⁺): Calcd: 234.07. Encontrado: 234.1.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-*N*-(*m*-tolil)-9*H*-purin-6-amina, (3c):

Sólido blanco, rendimiento 80 %, pf 115-117 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (s, 1H, NH), 7.81 (s, 1H, CH), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH), 7.19 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH), 6.87 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, CH), 3.94 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 2.30 (s, 3H, CH₃), 1.23 (dtd, *J* = 15.2, 7.5, 2.7 Hz, 1H, CH), 0.60 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂), 0.36 (q, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.18, 152.46, 150.77, 140.52, 139.02, 138.08, 129.03, 124.99, 121.06, 119.16, 117.66, 48.74, 21.69, 11.13, 4.45 (2C). ESI/MS para (C₁₆H₁₆ClN₅ [M+H]⁺): Calcd: 314.1. Encontrado: 314.0.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-*N*-(3-(trifluorometil)fenil)-9*H*-purin-6-amina, (3d):

Sólido blanco, rendimiento 45 %, pf 125-127 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.40 (s, 1H, NH), 8.06 (s, 1H, CH), 8.05 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH), 7.50 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH), 7.37 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH), 4.04 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.38 – 1.27 (m, 1H, CH), 0.70 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 0.46 (q, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 153.99, 152.02, 151.00,

140.79, 138.80, 131.43 (q, $^2J_{C-F}$ = 32.4 Hz, C-CF₃), 129.64, 123.91 (d, $^1J_{C-F}$ = 272.4 Hz, CF₃), 123.19, 120.31 (q, $^3J_{C-F}$ = 3.7 Hz, CH), 119.07, 116.84 (q, $^3J_{C-F}$ = 4.0 Hz, CH), 48.79, 11.00, 4.38 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -62.79 (s, 3F). ESI/MS para (C₁₆H₁₃ClF₃N₅ [M+H]⁺): Calcd: 368.1. Encontrado: 367.8.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-N-(3-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-6-

amina, (3e): Sólido café, rendimiento 68 %, pf 137-138 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (s, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, CH), 7.85 (s, 1H, CH), 7.66 (dd, J = 8.2, 1.6 Hz, 1H, CH), 7.37 (t, J = 8.2 Hz, 1H, CH), 6.97 (d, J = 8.2 Hz, 1H, CH), 4.04 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.40 – 1.25 (m, 1H, CH), 0.69 (q, J = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, J = 5.1 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.01, 151.95, 150.95, 149.64 (d, $^3J_{C-F}$ = 1.8 Hz, C-OCF₃), 140.75, 139.65, 121.83, 121.28, 120.50 (q, $^1J_{C-F}$ = 257.5 Hz, CF₃), 119.22, 119.00, 118.12, 115.77, 112.78, 48.80, 10.99, 4.30 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -57.68 (s, 3F). ESI/MS para (C₁₆H₁₃ClF₃N₅O [M+H]⁺): Calcd: 384.1. Encontrado: 383.9.

3-((2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-il)amino)benzonitrile, (3f):

Sólido blanco, rendimiento 74 %, pf 145-149 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.62 (s, 1H, NH), 8.22 – 8.16 (m, 1H, CH), 8.00 (dd, J = 8.4, 1.3 Hz, 1H, CH), 7.98 (s, 1H, CH), 7.45 (t, J = 8.0 Hz, 1H, CH), 7.36 (d, J = 7.7 Hz, 1H, CH), 4.05 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.46 – 1.16 (m, 1H, CH), 0.70 (q, J = 5.8 Hz, 2H, CH₂), 0.46 (q, J = 5.0 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.04, 151.85, 151.13, 141.02, 139.34, 130.01, 127.15, 124.23, 123.09, 119.01, 118.76, 113.09, 48.98, 11.09, 4.52 (2C). ESI/MS para (C₁₆H₁₃ClN₆ [M+H]⁺): Calcd: 325.1. Encontrado: 324.9.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-N-(3-nitrofenil)-9H-purin-6-amina, (3g):

Sólido amarillo, rendimiento 66 %, pf 150-151 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.66 (s, 1H, CH), 8.39 (s, 1H, NH), 8.20 (dd, J = 8.2, 1.4 Hz, 1H, CH), 7.98 (s, 1H, CH), 7.95 (dd, J = 8.2, 1.3 Hz, 1H, CH), 7.54 (t, J = 8.2 Hz, 1H, CH), 4.06 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.43 – 1.28 (m, 1H, CH), 0.70 (q, J = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 0.47 (q, J = 5.1 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 153.87,

151.84, 151.24, 148.70, 141.23, 139.43, 129.90, 125.63, 119.26, 118.26, 114.77, 48.86, 11.02, 4.42. ESI/MS para ($C_{15}H_{13}ClN_6O_2$ $[M+H]^+$): Calcd: 345.8. Encontrado: 345.0.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-N-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-6-

amina, (3h): Sólido blanco, rendimiento 48 %, pf 137-139 °C. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.10 (s, 1H, NH), 7.92 (s, 1H, CH), 7.82 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 7.24 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 2CH), 4.04 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 1.40 – 1.26 (m, 1H, CH), 0.70 (q, J = 5.5 Hz, 2H, CH_2), 0.46 (q, J = 5.2 Hz, 2H, CH_2). ^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 154.11, 152.22, 151.03, 145.17 (d, $^3J_{C-F}$ = 1.9 Hz, C-OCF₃), 140.85, 136.99, 122.00 (2C), 121.35 (2C), 120.67 (d, $^1J_{C-F}$ = 256.8 Hz, CF₃), 119.28, 48.88, 11.18, 4.52 (2C). ^{19}F RMN (376 MHz, $CDCl_3$) δ -58.09 (s, 3F). ESI/MS para ($C_{16}H_{13}ClF_3N_5O$ $[M+H]^+$): Calcd: 384.1. Encontrado: 383.8.

4-((2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-il)amino)benzonitrile, (3i):

Sólido blanco, rendimiento 18 %, pf 151-152 °C. 1H RMN (400 MHz, DMSO) δ 10.75 (s, 1H, NH), 8.47 (s, 1H, CH), 8.13 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.82 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 4.05 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 1.38 – 1.29 (m, 1H, CH), 0.59 – 0.53 (m, 2H, CH_2), 0.49 – 0.44 (m, 2H, CH_2). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO) δ 151.95, 151.75, 151.33, 143.51, 143.01, 133.00 (2C), 120.50 (2C), 119.35, 119.30, 104.57, 47.86, 11.20, 3.89 (2C). ESI/MS para ($C_{16}H_{13}ClN_6$ $[M+3H-C_7H_4ClN]^+$): Calcd: 191.12. Encontrado: 191.1.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-N-(4-nitrofenil)-9H-purin-6-amina, (3j):

Sólido amarillo, rendimiento 21 %, pf 155-156 °C. 1H RMN (400 MHz, DMSO) δ 10.85 (s, 1H, NH), 8.41 (s, 1H, CH), 8.15 (dd, J = 9.6, 2.4 Hz, 2H, 2CH), 8.09 (dd, J = 9.6, 2.3 Hz, 2H, 2CH), 3.97 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 1.25 (ddt, J = 10.4, 7.5, 3.7 Hz, 1H, CH), 0.51 – 0.45 (m, 2H, CH_2), 0.38 (q, J = 4.9 Hz, 2H, CH_2). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO) δ 151.82, 151.49, 151.46, 145.56, 143.18, 141.78, 124.62 (2C), 119.93 (2C), 119.47, 47.82, 11.11, 3.83 (2C). ESI/MS para ($C_{15}H_{13}ClN_6O_2$ $[M+3H-C_6H_7ClNO_2]^+$): Calcd: 191.12. Encontrado: 191.1.

Etil 4-((2-cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-il)amino)benzoate, (3k):

Sólido blanco, rendimiento 45 %, pf 130-133 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (s, 1H, NH), 8.06 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.93 (s, 1H, CH), 7.88 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 4.36 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 4.04 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 1.39 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_3), 1.31 (ddt, J = 10.4, 7.5, 4.0 Hz, 1H, CH), 0.69 (q, J = 5.9 Hz, 2H, CH_2), 0.45 (q, J = 5.0 Hz, 2H, CH_2). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 166.29, 153.97, 151.96, 151.18, 142.47, 141.10, 130.99 (2C), 125.49, 119.58 (2C), 119.17, 60.93, 48.88, 14.49, 11.16, 4.51 (2C). ESI/MS para ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{ClN}_5\text{O}_2$ [$\text{M}+\text{H}+2\text{Na}-\text{C}_2\text{H}_5$] $^+$): Calcd: 411.04. Encontrado: 411.0.

2-Cloro-N-(4-cloro-3-fluorofenil)-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-amina, (3l):

Sólido blanco, rendimiento 57 %, pf 140-142 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.31 (s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, CH), 7.91 (d, J = 10.8 Hz, 1H, CH), 7.90 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.40 – 7.30 (m, 2H, 2CH), 4.04 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 1.32 (tdd, J = 7.5, 6.2, 2.7 Hz, 1H, CH), 0.70 (q, J = 5.9 Hz, 2H, CH_2), 0.46 (q, J = 4.9 Hz, 2H, CH_2). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 158.15 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ = 247.1 Hz), 154.00, 151.91, 151.09, 141.00, 138.41 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 10.0 Hz), 130.62, 119.28, 116.22 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 3.4 Hz), 115.32 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 18.0 Hz), 108.72 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 26.4 Hz), 48.92, 11.15, 4.52 (2C). ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -112.99 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{FN}_5$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$): Calcd: 352.1. Encontrado: 352.1.

2-Cloro-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-amina, (3m):

Sólido blanco, rendimiento 86 %, pf 140-143 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (s, 1H, NH), 7.95 (s, 1H, CH), 7.90 (dd, J = 6.4, 2.7 Hz, 1H, CH), 7.66 – 7.58 (m, 1H, CH), 7.14 (t, J = 8.8 Hz, 1H, CH), 4.04 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 1.38 – 1.26 (m, 1H, CH), 0.70 (q, J = 5.5 Hz, 2H, CH_2), 0.46 (q, J = 5.1 Hz, 2H, CH_2). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 154.65 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ = 246.1 Hz, CF), 154.08, 151.93, 150.88, 140.65, 134.77 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 3.3 Hz), 122.39, 121.14 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 18.7 Hz), 120.05 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 6.8 Hz, CH), 118.77, 116.71 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 22.1 Hz, CH), 48.83, 11.01, 4.41 (2C). ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -121.09 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{FN}_5$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$): Calcd: 351.0. Encontrado: 352.0.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-N-(3,4-diclorofenil)-9H-purin-6-amina, (3n):

Sólido café, rendimiento 66 %, pf 124-126 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.34 (s, 1H, NH), 7.95 (d, J = 2.5 Hz, 1H, CH), 7.93 (s, 1H, CH), 7.63 (dt, J = 11.1, 5.5 Hz, 1H, CH), 7.38 (d, J = 8.8 Hz, 1H, CH), 4.03 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.31 (ddd, J = 9.4, 6.1, 3.8 Hz, 1H, CH), 0.69 (q, J = 5.6 Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, J = 5.1 Hz, 1H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.04, 151.86, 151.08, 141.01, 137.86, 132.78, 130.63, 127.05, 121.81, 119.60, 119.10, 48.94, 11.10, 4.52 (2C). ESI/MS para (C₁₅H₁₂Cl₃N₅ [M+H]⁺): Calcd: 368.0. Encontrado: 367.9.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-N-(3-nitro-4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-

purin-6-amina, (3o): Sólido amarillo, rendimiento 38 %, pf 136-138 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9.16 (s, 1H, NH), 8.48 (d, J = 2.7 Hz, 1H, CH), 8.12 (dd, J = 9.1, 2.8 Hz, 1H, CH), 7.98 (s, 1H, CH), 7.39 (dd, J = 9.0, 0.9 Hz, 1H, CH), 4.04 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.38 – 1.28 (m, 1H, CH), 0.68 (q, J = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, J = 5.1 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 153.78, 151.61, 151.40, 142.79, 141.57, 138.25, 136.06 (d, ³J_{C-F} = 2.1 Hz, C-OCF₃), 124.78, 124.23, 120.34 (d, ¹J_{C-F} = 260.2 Hz, CF₃), 119.22, 116.55, 49.00, 11.00, 4.46 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -57.93 (s, 3F). ESI/MS para (C₁₆H₁₂ClF₃N₆O₃ [M+H]⁺): Calcd: 429.1. Encontrado: 428.9.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-N-fenil-9H-purin-6-amina, (3p):

Sólido blanco, rendimiento 85 %, pf 158 - 160 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.11 (s, 1H, N-H), 7.89 (s, 1H, CH), 7.78 (d, J = 8.2 Hz, 2H, 2CH), 7.38 (t, J = 7.7 Hz, 2H, 2CH), 7.13 (t, J = 7.2 Hz, 1H, CH), 4.02 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.39 – 1.24 (m, 1H, CH), 0.68 (q, J = 5.4 Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, J = 5.2 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.18, 152.46, 150.85, 140.56, 138.27, 129.22 (2C), 124.10, 120.38 (2C), 119.25, 48.78, 11.17, 4.49 (2C). ESI/MS para (C₁₅H₁₄ClN₅ [M+H]⁺): Calcd: 300.1. Encontrado: 299.7.

2Cloro-9-(ciclopropilmetil)-N-(3-fluorofenil)-9H-purin-6-amina, (3q):

Sólido blanco, rendimiento 76 %, pf 140 – 142 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (s, 1H, NH), 7.92 (s, 1H, CH), 7.79 (d, J = 11.1 Hz, 1H, CH), 7.41 (d, J = 8.2 Hz, 1H, CH), 7.31 (dd, J = 14.8, 8.0 Hz, 1H, CH), 6.81 (td, J = 8.3, 2.2

Hz, 1H, CH), 4.04 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.32 (qd, $J = 7.6, 3.7$ Hz, 1H, CH), 0.69 (q, $J = 5.4$ Hz, 2H, CH₂), 0.46 (q, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 163.20 (d, $^1J_{C-F} = 244.5$ Hz, CF), 154.08, 152.17, 151.02, 140.84, 139.91 (d, $^3J_{C-F} = 11.0$ Hz), 130.26 (d, $^3J_{C-F} = 9.5$ Hz, CH), 119.31, 115.51 (d, $^4J_{C-F} = 2.9$ Hz, CH), 110.62 (d, $^2J_{C-F} = 21.4$ Hz, CH), 107.63 (d, $^2J_{C-F} = 26.7$ Hz, CH), 48.87, 11.17, 4.51 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -111.18 (s, 1F). ESI/MS para (C₁₅H₁₃ClFN₅ [M+H]⁺): Calcd: 318.1. Encontrado: 317.8.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-N-(3,4-difluorofenil)-9H-purin-6-amina, (3r):

Sólido blanco, rendimiento 77 %. pf 138 – 139 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (s, 1H, NH), 7.90 – 7.85 (m, 1H, CH), 7.36 – 7.28 (m, 1H, CH), 7.14 (q, $J = 9.2$ Hz, 1H, CH), 4.04 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.40 – 1.23 (m, 1H, CH), 0.69 (q, $J = 5.4$ Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.05, 152.11, 151.06, 150.25 (dd, $^1,2J_{C-F} = 247.0, 13.2$ Hz, CF), 146.94 (dd, $^1J_{C-F} = 245.2, 12.8$ Hz, CF), 140.99, 134.79 (dd, $^3,4J_{C-F} = 9.0, 3.1$ Hz), 119.23, 117.42 (d, $^2J_{C-F} = 17.0$ Hz, CH), 115.97 (dd, $^3,4J_{C-F} = 5.8, 3.6$ Hz, CH), 110.07 (d, $^2J_{C-F} = 22.0$ Hz, CH), 48.88, 11.17, 4.51 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -135.31 (d, $^3J_{F-F} = 21.8$ Hz, 1F), -143.20 (d, $^3J_{F-F} = 21.8$ Hz, 1F). ESI/MS para (C₁₅H₁₂ClF₂N₅ [M+H]⁺): Calcd: 336.1. Encontrado: 336.0.

2-Cloro-9-isopentil-N-fenil-9H-purin-6-amina, (3s):

Sólido café, rendimiento 88 %, pf 110.1-113.8 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.96 (s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, CH), 7.78 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2CH), 7.39 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, 2CH), 7.14 (td, $J = 7.6, 0.9$ Hz, 1H, CH), 4.27 – 4.12 (m, 2H, CH₂), 1.79 (dt, $J = 7.4, 5.5$ Hz, 2H, CH₂), 1.69 – 1.53 (m, 1H, CH), 0.99 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, 2CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.41, 154.39, 152.32, 150.80, 140.58, 138.16, 129.27 (2C), 124.22, 120.38 (2C), 42.67, 38.81, 25.79, 22.40 (2C). ESI/MS para (C₁₆H₁₈ClN₅ [M+H]⁺): Calcd: 316.1. Encontrado: 316.1.

2-Cloro-N-(3-fluorofenil)-9-isopentil-9H-purin-6-amina, (3t):

Sólido blanco, rendimiento 50 %, pf 136.2 – 138.7 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.00 (s, 1H, NH), 7.82 (s, 1H, CH) 7.79 (td, $J = 2.2, 2.4$ Hz, 1H, CH), 7.40 (dd,

$J = 8.2, 1.2 \text{ Hz}$, 1H, CH), 7.31 (td, $J = 8.2, 6.5 \text{ Hz}$, 1H, CH), 6.82 (td, $J = 8.2, 2.2 \text{ Hz}$, 1H, CH), 4.28 – 4.17 (m, 2H, CH₂), 1.80 (dd, $J = 14.9, 7.1 \text{ Hz}$, 2H, CH₂), 1.61 (dp, $J = 13.3, 6.7 \text{ Hz}$, 1H, CH), 0.99 (t, $J = 5.1 \text{ Hz}$, 6H, 2CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 163.07 (d, $^1J_{C-F} = 244.6 \text{ Hz}$), 151.83, 150.79, 140.63 (d, $^3J_{C-F} = 8.4 \text{ Hz}$), 139.68, 139.59, 130.16 (d, $^3J_{C-F} = 9.5 \text{ Hz}$), 118.73, 115.38 (d, $^4J_{C-F} = 2.8 \text{ Hz}$), 110.62 (d, $^2J_{C-F} = 19.7 \text{ Hz}$), 107.52 (d, $^2J_{C-F} = 26.6 \text{ Hz}$), 42.59, 38.65, 25.65, 22.25 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -111.11 (s, 1F). ESI/MS para (C₁₆H₁₇ClFN₅ [M+H]⁺): Calcd: 334.1. Encontrado: 334.1

2-Cloro-N-(3,4-difluorofenil)-9-isopentil-9H-purin-6-amina, (3u): Sólido amarillo, rendimiento 67 %, pf 141.3 – 144.1 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.22 (s, 1H, NH), 7.86 (ddd, $J = 12.3, 7.1, 2.6 \text{ Hz}$, 1H, CH), 7.76 (s, 1H, CH), 7.31 – 7.26 (m, 1H, CH), 7.11 (dd, $J = 18.6, 9.0 \text{ Hz}$, 1H, CH), 4.24 – 4.12 (m, 2H, CH₂), 1.77 (dd, $J = 14.9, 7.1 \text{ Hz}$, 2H, CH₂), 1.58 (dhept, $J = 13.4, 6.6 \text{ Hz}$, 1H, CH), 0.97 (d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 6H, 2CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.02, 152.09, 151.04, 150.18 (dd, $^{1,2}J_{C-F} = 246.9, 13.3 \text{ Hz}$), 146.88 (dd, $^{1,2}J_{C-F} = 245.2, 12.8 \text{ Hz}$), 141.18, 134.81 (dd, $^{3,4}J_{C-F} = 8.9, 3.1 \text{ Hz}$), 119.20, 117.36 (d, $^1J_{C-F} = 18.2 \text{ Hz}$), 115.99 (dd, $^{3,4}J_{C-F} = 5.8, 3.6 \text{ Hz}$), 110.06 (d, $^2J_{C-F} = 22.0 \text{ Hz}$), 42.60, 38.76, 25.73, 22.32 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -135.33 (d, $J_{F-F} = 21.8 \text{ Hz}$, 1F), -143.21 (d, $J_{F-F} = 21.8 \text{ Hz}$, 1F). ESI/MS para (C₁₆H₁₆ClF₂N₅ [M+H]⁺): Calcd: 352.8. Encontrado: 352.1.

2-Cloro-9-pentil-N-fenil-9H-purin-6-amina, (3v): Sólido café, rendimiento 72 %, pf 103.5 – 106.3 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (s, 1H, NH), 7.79 (s, 1H, CH), 7.77 (d, $J = 3.0 \text{ Hz}$, 2H, 2CH), 7.39 (t, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 2H, 2CH), 7.13 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 1H, CH), 4.17 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, CH₂), 1.96 – 1.85 (m, 2H, CH₂), 1.40 – 1.25 (m, 4H, 2CH₂), 0.90 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.32, 152.38, 150.85, 140.81, 138.16, 129.27 (2C), 124.19, 120.37 (2C), 119.10, 44.30, 29.82, 28.84, 22.27, 14.01. ESI/MS para (C₁₆H₁₈ClN₅ [M+H]⁺): Calcd: 316.1. Encontrado: 316.4.

2-Cloro-N-(3-fluorofenil)-9-pentil-9H-purin-6-amina, (3w): Sólido amarillo, rendimiento 40 %, pf 118.9 – 123.7 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (s, 1H, NH), 7.85 – 7.76 (m, 2H, 2CH), 7.39 (t, $J = 8.9 \text{ Hz}$, 1H, CH), 7.32 (dd, J

= 8.4, 2.1 Hz, 1H, CH), 6.91 – 6.75 (m, 1H, CH), 4.20 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 2.03 – 1.81 (m, 2H, CH₂), 1.44 – 1.26 (m, 4H, 2CH₂), 0.91 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 163.15 (d, $^1J_{C-F} = 244.6$ Hz), 154.07, 152.13, 151.01, 141.24, 139.83 (d, $^3J_{C-F} = 11.1$ Hz), 130.23 (d, $^3J_{C-F} = 9.5$ Hz), 119.30, 115.53 (d, $^4J_{C-F} = 2.9$ Hz), 110.63 (d, $^2J_{C-F} = 21.5$ Hz), 107.65 (d, $^2J_{C-F} = 26.7$ Hz), 44.27, 29.77, 28.79, 22.22, 13.96. ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -111.12 (s, 1F). ESI/MS para (C₁₆H₁₇ClFN₅ [M+H]⁺): Calcd: 334.1. Encontrado: 334.1.

2-Cloro-*N*-(3,4-difluorofenil)-9-pentil-9*H*-purin-6-amina, (3x): Sólido café, rendimiento 72%, pf 139.1 – 142.7 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.40 (s, 1H, NH), 7.87 (ddd, $J = 12.4, 7.1, 2.6$ Hz, 1H, CH), 7.76 (s, 1H, CH), 7.35 – 7.27 (m, 1H, CH), 7.11 (dd, $J = 18.7, 8.9$ Hz, 1H, CH), 4.16 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.94 – 1.80 (m, 2H, CH₂), 1.43 – 1.21 (m, 4H, 2CH₂), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.04, 152.07, 150.98, 150.16 (dd, $^{1,2}J_{C-F} = 246.8, 13.3$ Hz), 146.83 (dd, $^{1,2}J_{C-F} = 245.1, 12.9$ Hz), 141.18, 134.90 (dd, $^{3,4}J_{C-F} = 8.9, 3.1$ Hz), 119.10, 117.33 (d, $^2J_{C-F} = 17.1$ Hz), 115.92 (dd, $^{3,4}J_{C-F} = 5.8, 3.6$ Hz), 109.96 (d, $^2J_{C-F} = 22.0$ Hz), 44.27, 29.75, 28.77, 22.21, 13.93. ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -135.43 (d, $J = 21.8$ Hz, 1F), -143.34 (d, $J = 21.8$ Hz, 1F). ESI/MS para (C₁₆H₁₆ClF₂N₅ [M+H]⁺): Calcd: 351.1. Encontrado: 351.8.

2-Cloro-9-hexil-*N*-fenil-9*H*-purin-6-amina, (3y): Sólido amarillo, rendimiento 71%, pf 115.1 – 118.9 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (s, 1H, NH), 7.81 (s, 1H, CH), 7.79 (dd, $J = 8.6, 0.9$ Hz, 2H, 2CH), 7.41 – 7.37 (m, 2H, 2CH), 7.13 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, CH), 4.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.96 – 1.81 (m, 2H, CH₂), 1.39 – 1.27 (m, 6H, 3CH₂), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.44, 154.42, 152.27, 150.76, 140.60, 138.15, 129.26 (2C), 124.22, 120.38 (2C), 44.38, 31.31, 30.08, 26.40, 22.59, 14.08. ESI/MS para (C₁₇H₂₀ClN₅ [M+H]⁺): Calcd: 330.1. Encontrado: 330.2.

2-Cloro-*N*-(3-fluorofenil)-9-hexil-9*H*-purin-6-amina, (3z): Sólido amarillo, rendimiento 78 %, pf 129.2 – 133.5 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.27 (s, 1H, NH), 7.66 (dt, $J = 10.1, 2.2$ Hz, 1H, CH), 7.64 (s, 1H, CH), 7.27 (dd, $J =$

8.1, 1.3 Hz, 1H, CH), 7.15 (td, $J = 8.1, 4.1$ Hz, 1H, CH), 6.67 (td, $J = 8.3, 2.3$ Hz, 1H, CH), 4.03 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.73 (dd, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 2H, CH₂), 1.26 – 1.07 (m, 6H, 3CH₂), 0.74 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 163.14 (d, $^1J_{C-F} = 244.4$ Hz), 154.06, 152.13, 150.98, 141.12, 139.93 (d, $^3J_{C-F} = 11.1$ Hz), 130.20 (d, $^3J_{C-F} = 9.5$ Hz), 119.24, 115.51 (d, $^4J_{C-F} = 2.9$ Hz), 110.55 (d, $^2J_{C-F} = 21.4$ Hz), 107.60 (d, $^2J_{C-F} = 26.7$ Hz), 44.27, 31.26, 30.04, 26.36, 22.55, 14.03. ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -111.19 (s, 1F). ESI/MS para (C₁₇H₁₉ClF₅ [M+H]⁺): Calcd: 348.1. Encontrado: 348.1.

2-Cloro-N-(3,4-difluorofenil)-9-hexil-9H-purin-6-amina, (3aa): Sólido café, rendimiento 82%, pf 147.3 – 150.1 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.95 (s, 1H, NH), 7.89 (ddd, $J = 12.3, 7.1, 2.7$ Hz, 1H, CH), 7.78 (s, 1H, CH), 7.31 (dt, $J = 11.6, 3.9$ Hz, 1H, CH), 7.14 (dd, $J = 18.6, 8.9$ Hz, 1H, CH), 4.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.94 – 1.82 (m, 2H, CH₂), 1.36 – 1.24 (m, 6H, 3CH₂), 0.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.05, 152.11, 151.08, 150.27 (dd, $^{1,2}J_{C-F} = 247.1, 13.3$ Hz), 146.96 (dd, $^{1,2}J_{C-F} = 245.3, 12.9$ Hz), 141.33, 134.77 (dd, $^{2,3}J_{C-F} = 9.0, 3.1$ Hz), 119.30, 117.45 (d, $^2J_{C-F} = 18.3$ Hz), 115.93 (dd, $^{3,4}J_{C-F} = 5.8, 3.6$ Hz), 110.05 (d, $^2J_{C-F} = 22.0$ Hz), 44.31, 31.29, 30.09, 26.39, 22.57, 14.05. ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -135.29 (d, $J = 21.8$ Hz, 1F), -143.19 (d, $J = 21.8$ Hz, 1F). ESI/MS para (C₁₇H₁₈ClF₂N₅ [M+H]⁺): Calcd: 366.1. Encontrado: 365.8.

2-Cloro-9-octil-N-fenil-9H-purin-6-amina, (3ab): Sólido amarillo, rendimiento 61%, pf 126.2 – 129.7 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.03 (s, 1H, NH), 7.79 (s, 1H, CH), 7.78 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, 2CH), 7.43 – 7.33 (m, 2H, 2CH), 7.13 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, CH), 4.17 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.88 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.44 – 1.07 (m, 10H, 5CH₂), 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.34, 152.34, 150.80, 140.72, 138.18, 129.25 (2C), 124.18, 120.38 (2C), 118.99, 44.33, 31.83, 30.12, 29.21, 29.11, 26.73, 22.72, 14.19. ESI/MS para (C₁₉H₂₄ClN₅ [M+H]⁺): Calcd: 358.2. Encontrado: 358.2.

2-Cloro-N-(3-fluorofenil)-9-octil-9H-purin-6-amina, (3ac): Sólido amarillo, rendimiento 83%, pf 147.6 – 150.8 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.32 (s,

1H, NH), 7.88 – 7.75 (m, 2H, 2CH), 7.40 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, CH), 7.32 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H, CH), 6.90 – 6.76 (m, 1H, CH), 4.20 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.99 – 1.82 (m, 2H, CH₂), 1.31 (d, $J = 12.0$ Hz, 10H, 5CH₂), 0.89 (t, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 163.14 (d, $^1J_{C-F} = 244.6$ Hz), 154.14, 152.05, 150.95, 141.13, 139.83 (d, $^3J = 11.1$ Hz), 130.22 (d, $^3J_{C-F} = 9.5$ Hz), 119.07, 115.54 (d, $^3J_{C-F} = 2.9$ Hz), 110.63 (d, $^2J_{C-F} = 21.4$ Hz), 107.66 (d, $^2J_{C-F} = 26.7$ Hz), 44.32, 31.78, 30.06, 29.16, 29.06, 26.68, 22.68, 14.14. ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -111.12 (s, 1F). ESI/MS para (C₁₉H₂₃ClFN₅ [M+H]⁺): Calcd: 376.2. Encontrado: 375.8.

2-Cloro-N-(3,4-difluorofenil)-9-octil-9H-purin-6-amina, (3ad): Sólido blanco, rendimiento 71%, pf 168.2 – 171.2 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (s, 1H, NH), 7.89 (ddd, $J = 12.3, 7.1, 2.6$ Hz, 1H, CH), 7.78 (s, 1H, CH), 7.36 – 7.29 (m, 1H, CH), 7.12 (q, $J = 9.2$ Hz, 1H, CH), 4.17 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.96 – 1.79 (m, 2H, CH₂), 1.27 (dd, $J = 18.4, 10.5$ Hz, 10H, 5CH₂), 0.86 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 153.97, 151.94, 150.87, 150.08 (dd, $^{1,2}J_{C-F} = 246.9, 13.3$ Hz), 146.75 (dd, $^{1,2}J_{C-F} = 245.2, 12.5$ Hz), 141.03, 134.77 (d, $^3J_{C-F} = 5.7$ Hz), 118.96, 117.25 (d, $^2J_{C-F} = 18.3$ Hz), 115.78 (dd, $^{3,4}J_{C-F} = 5.7, 3.5$ Hz), 109.84 (d, $^2J_{C-F} = 22.0$ Hz), 44.19, 31.68, 29.96, 29.05, 28.95, 26.58, 22.57, 14.03. ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -135.40 (d, $J = 21.8$ Hz, 1F), -143.32 (d, $J = 21.8$ Hz, 1F). ESI/MS para (C₁₉H₂₂ClF₂N₅ [M+H]⁺): Calcd: 394.2. Encontrado: 394.0.

8.1.3 Síntesis de 1-metil-4-(4-nitrofenil)piperazina, (5)

A una solución de 1-fluoro-4-nitrobenzeno (**4**, 1000 mg, 7.1 mmol), 1-metilpiperazina (708 mg, 7.1 mmol) y K₂CO₃ (2226 mg, 21 mmol) en DMF (20 mL) fueron añadidos, luego la mezcla se deja agitar a temperatura ambiente por 2 h. Luego la reacción se vuelca sobre 400 mL de agua helada y se filtra al vacío, el sólido se deja secar en la estufa a 80 °C por 2 h, para dar un sólido naranja, rendimiento 98 %, pf 105-107 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (d, $J = 9.4$ Hz, 2H, 2CH), 6.80 (d, $J = 9.4$ Hz, 2H, 2CH), 3.48 –

3.37 (m, 4H, 2CH₂), 2.58 – 2.50 (m, 4H, 2CH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 154.91, 138.55, 126.03 (2C), 112.79 (2C), 54.59 (2C), 47.02 (2C), 46.10. ESI/MS para (C₁₁H₁₅N₃O₂ [M+H]⁺). Calcd: 222.1. Encontrado: 221.4.

8.1.4 Síntesis de 4-(4-metilpiperazin-1-il)anilina, (6)

A una solución de **5** (300 mg, 1.35 mmol), Pd-C (30 mg) en etanol (20 mL) fue agregado, la mezcla se dejó agitar bajo reflujo por 1 h. Luego se agrega hidrazina (2.6 mL) por goteo a la mezcla y se deja agitando bajo reflujo por otra hora más. Después que la reacción se completará, se filtra en Celita en caliente y se concentra el líquido para dar un sólido negro, rendimiento 99 %, pf 128-130 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 6.80 (d, J = 9.1 Hz, 2H, 2CH), 6.40 (d, J = 9.1 Hz, 2H, 2CH), 3.53 (s, 2H, NH₂), 3.10 – 2.83 (m, 4H, 2CH₂), 2.66 – 2.54 (m, 4H, 2CH₂), 2.34 (s, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 144.55, 140.23, 118.67 (2C), 116.29 (2C), 55.39 (2C), 50.89 (2C), 46.17. ESI/MS para (C₁₁H₁₇N₃ [M+H]⁺). Calcd: 192.2. Encontrado: 191.9.

8.1.5 Procedimiento general para la síntesis de los nitrocompuestos **8a** y **8b**

A una solución de cloruro de 4-nitrobenzoilo (**7a**, 10.78mmol) o 1-(bromometil)-4-nitrobenceno (**7b**, 10.78mmol), se añaden 1-metilpiperazine (1079 mg, 10.78 mmol) y trietilamina (4.5 mL, 32 mmol) en DMF (50 mL), luego se deja agitar a temperatura ambiente por 2 h. Luego la reacción se vuelca sobre 400 mL de agua helada y se filtra al vacío, el sólido se deja secar en la estufa a 80 °C por 2 h.

(4-metilpiperazin-1-il)(4-nitrofenil)metanona, 8a: sólido naranja, rendimiento 99 %, pf 123-124 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 2CH), 7.56 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 2CH), 3.80 (s, 2H, CH₂), 3.36 (s,

2H, CH₂), 2.49 (s, 2H, CH₂), 2.34 (s, 2H, CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 168.03 (CO), 148.49, 142.09, 128.18 (2C), 124.00 (2C), 77.16, 55.26, 54.66, 47.64, 46.09, 42.26. ESI/MS para (C₁₂H₁₅N₃O₃ [M+H]⁺). Calcd: 250.12. Encontrado: 249.8.

1-metil-4-(4-nitrobencil)piperazina, (8b): sólido rojo, rendimiento %, pf 103-104 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.47 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.56 (s, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.29 (d, J = 7.8 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 147.17, 146.34, 129.46, 123.51, 62.04, 55.01, 53.00, 45.89. ESI/MS para (C₁₂H₁₇N₃O [M+H]⁺). Calcd: 235.1. Encontrado: 235.1.

8.1.6 Procedimiento general para la síntesis de las anilinas 9a y 9b

A una solución de **8a–b** (2.41 mmol), Pd-C (40 mg), hidracina (155 mg, 4.82 mmol) en etanol (50 mL) fueron añadidos, y se dejaron reaccionar bajo agitación y reflujo por 2 h. Después que la reacción se completara, se filtra en caliente sobre Celita y se concentra el líquido en rotaevaporador a presión reducida.

(4-aminofenil)(4-metilpiperazin-1-il)metanona, (9a): sólido rosado, rendimiento 100 %, pf 135-137 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.09 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.45 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.04 (s, 1H), 3.50 (s, 2H), 2.26 (s, 2H), 2.16 (s, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 170.67 (CO), 148.55, 128.98 (2C), 124.04, 113.71 (2C), 54.79 (4C), 45.78. ESI/MS para (C₁₂H₁₇N₃O [M+H]⁺). Calcd: 220.1. Encontrado: 220.1.

4-((4-metilpiperazin-1-il)metil)anilina, (9b): sólido café, rendimiento 100 %, pf 122-124 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.02 (d, J=7.2 Hz, 2H), 6.56 (d, J=6.6 Hz, 2H), 3.55 (NH₂, 2H), 3.33 (s, 2H), 2.39 (m, 8H), 2.21 (s, 3H). ESI/MS para (C₁₂H₁₉N₃ [M+H]⁺). Calcd: 206.2. Encontrado: 206.2.

8.1.7 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos finales 10a-o

A una solución de **3a-o** (0.519 mmol) y **6** (114 mg, 0.57 mmol) en dioxano (2 mL), se agrega Pd(OAc)₂ (24 mg, 0.1 mmol), Xantphos (120 mg, 0.2 mmol) y 2 M K₂CO₃ (aq) (1 mL, 0.2 mmol) y se colocan a agitar a 100 °C en un reactor microondas. Después de enfriar la reacción a temperatura ambiente, la mezcla se filtra en Celita y se lava con 100 mL agua destilada. La mezcla se extrae con acetato de etilo, las fases se separan y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra por pliegues y se concentra el líquido hasta sequedad en rotaevaporador a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía de sílica gel utilizando una fase móvil metanol/diclorometano (10:90) para obtener los productos **10a-o**.

9-(Ciclopropilmetil)-N⁶-(2-fluorofenil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (10a): Sólido verde, rendimiento 61 %, pf 149-152 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.53 (td, J = 8.5, 1.8 Hz, 1H, CH), 7.68 (s, 2H, NH, CH), 7.50 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.12 – 7.03 (m, 2H, 2CH), 7.00 – 6.93 (m, 1H, CH), 6.90 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 6.90 (s, 1H, NH), 3.91 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.21 – 3.12 (m, 4H, 2CH₂), 2.66 – 2.57 (m, 4H, 2CH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃), 1.34 – 1.23 (m, 1H, CH), 0.67 – 0.61 (m, 2H, CH₂), 0.42 (m, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.70, 153.01 (d, ¹J_{C-F} = 243.9 Hz, CF), 151.87, 151.57, 146.81, 138.17, 133.20, 127.49 (d, ²J = 9.8 Hz), 124.09 (d, ⁴J_{C-F} = 3.7 Hz, CH), 122.95 (d, J = 7.5 Hz, CH), 122.22, 121.13 (2C), 117.01 (2C), 115.71, 114.86 (d, ²J_{C-F} = 19.2 Hz, CH), 55.15 (2C), 49.93 (2C), 48.13, 46.03, 11.10, 4.29 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -130.72 (s, 1F). ESI/MS para (C₂₆H₂₉FN₈ [M+H]⁺): Calcd: 473.2572. Encontrado: 473.2576

N⁶-(3-Clorofenil)-9-(ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (10b): Sólido verde, rendimiento 50 %, pf 152-153 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.98 (t, J = 2.0 Hz, 1H, CH), 7.93 (s, 1H,

NH), 7.69 (s, 1H, CH), 7.53 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 7.44 (dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H, CH), 7.19 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, CH), 7.02 (s, 1H, NH), 7.00 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 0.9$ Hz, 1H, CH), 6.95 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2CH), 3.93 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.23 – 3.14 (m, 4H, 2CH₂), 2.67 – 2.57 (m, 4H, 2CH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃), 1.31 (ddt, $J = 14.6, 6.7, 4.6$ Hz, 1H, CH), 0.67 (q, $J = 5.9$ Hz, 2H, CH₂), 0.44 (q, $J = 4.9$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.78, 151.83, 151.48, 146.85, 140.35, 138.03, 134.45, 132.99, 129.70, 122.80, 121.06, 119.93, 117.93, 117.10, 115.27, 55.21, 49.92, 48.14, 46.11, 11.05, 4.30. ESI/MS para (C₂₆H₂₈ClN₈ [M+H]⁺): Calcd: 489.2276. Encontrado: 489.2277.

9-(Ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-N⁶-(*m*-tolil)-9H-purin-2,6-diamina, (10c): Sólido café, rendimiento 66 %, pf 135-137 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (s, 1H, CH), 7.63 (s, 1H, NH), 7.55 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, CH), 7.54 (m, 2H, 2CH), 7.20 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH), 6.94 (s, 1H, NH), 6.93 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, CH), 6.88 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH), 3.94 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.26 – 3.13 (m, 4H, 2CH₂), 2.67 – 2.63 (m, 4H, 2CH₂), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 1.31 (m, 1H, CH), 0.67 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.90, 152.33, 151.36, 146.66, 139.04, 138.80, 137.90, 133.58, 128.78, 124.03, 120.99 (2C), 120.89, 117.54, 117.26 (2C), 115.46, 55.25 (2C), 50.00 (2C), 48.22, 46.08, 21.78, 11.21, 4.41 (2C). ESI/MS para (C₂₇H₃₂N₈ [M+H]⁺): Calcd: 469.2823. Encontrado: 469.2827.

9-(Ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-N⁶-(3-(trifluorometil)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (10d): Sólido café, rendimiento 51 %, pf 134-135 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.19 (s, 1H), 7.97 (s, 1H, NH), 7.91 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, CH), 7.69 (s, 1H, CH), 7.52 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 7.36 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH), 7.27 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, CH), 7.10 (s, 1H, NH), 6.92 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, CH), 3.93 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.22 – 3.13 (m, 4H, 2CH₂), 2.65 – 2.55 (m, 4H, 2CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃), 1.34 – 1.24 (m, 1H, CH), 0.66 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH₂), 0.44 (q, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.83, 151.99, 151.66, 146.94, 139.81, 138.28, 133.12, 131.19 (d, ²J_{C-F} = 32.1 Hz), 129.34, 124.15 (dd, ¹J_{C-F} = 797.4, 525.0

Hz), 123.31, 121.03 (2C), 119.39 (d, $^3J_{C-F} = 3.9$ Hz), 117.13 (2C), 116.70 (d, $^3J_{C-F} = 3.9$ Hz), 115.37, 55.27 (2C), 49.99 (2C), 48.27, 46.16, 11.12, 4.39 (2C). ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -62.48 (s, 3F, CF_3). ESI/MS para ($\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calcd: 523.2540. Encontrado: 523.2549.

9-(Ciclopropilmetil)- N^2 -(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)- N^6 -(3-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (10e): Sólido rojo, rendimiento 63 %, pf 161-162 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (s, 1H, NH), 7.86 (s, 1H, CH), 7.69 (s, 1H, CH), 7.54 (m, 3H, 3CH), 7.27 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, CH), 7.01 (s, 1H, NH), 6.94 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 6.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, CH), 3.93 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.23 – 3.14 (m, 4H, 2 CH_2), 2.67 – 2.58 (m, 4H, 2 CH_2), 2.37 (s, 3H, CH_3), 1.30 (dt, $J = 8.1, 5.1$ Hz, 1H, CH), 0.66 (q, $J = 5.4$ Hz, 2H, CH_2), 0.44 (q, $J = 4.9$ Hz, 2H, CH_2). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 156.82, 151.93, 151.62, 149.66 (d, $^3J_{C-F} = 1.5$ Hz, COCF_3), 146.98, 140.78, 138.23, 133.10, 129.81, 121.08 (2C), 120.64 (d, $^1J_{C-F} = 257.2$ Hz, CF_3), 118.05, 117.10 (2C), 115.41, 114.66, 112.71, 55.29 (2C), 49.97 (2C), 48.28, 46.18, 11.15, 4.40 (2C). ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -57.49 (s, 3F, CF_3). ESI/MS para ($\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_8\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calcd: 539.2489. Encontrado: 539.2498.

3-((9-(Ciclopropilmetil)-2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-purin-6-il)amino)benzonitrile, (10f): Sólido rojo, rendimiento 62 %, pf 159-160 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (s, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, CH), 7.71 (s, 1H, CH), 7.70 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, 1CH), 7.53 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2CH), 7.34 – 7.27 (m, 1H, CH), 7.25 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH), 7.17 (s, 1H, NH), 6.97 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 3.93 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.25 – 3.17 (m, 4H, 2 CH_2), 2.64 – 2.52 (m, 4H, 2 CH_2), 2.35 (s, 3H, CH_3), 1.37 – 1.25 (m, 1H, CH), 0.66 (q, $J = 5.4$ Hz, 2H, CH_2), 0.44 (q, $J = 4.9$ Hz, 2H, CH_2). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 156.82, 151.74, 151.69, 147.12, 140.20, 138.38, 132.80, 129.57, 126.11, 123.84, 122.75, 121.21 (2C), 119.09, 117.04 (2C), 115.28, 112.77, 6, 55.29 (2C), 49.89 (2C), 48.29, 46.22, 11.10, 4.41 (2C). ESI/MS para ($\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calcd: 480.2619. Encontrado: 480.2619.

9-(Ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-N⁶-(3-nitrofenil)-9H-purin-2,6-diamina, (10g): Sólido naranja, rendimiento 40 %, pf 165-166 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.66 (s, 1H, CH), 8.30 (s, 1H, NH), 7.96 (dd, J = 8.1, 1.2 Hz, 1H, CH), 7.83 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H, CH), 7.73 (s, 1H), 7.53 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.38 (t, J = 8.2 Hz, 1H, CH), 7.09 (s, 1H, NH), 6.93 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 3.95 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.25 – 3.16 (m, 4H, 2CH₂), 2.70 – 2.61 (m, 4H, 2CH₂), 2.39 (s, 3H, CH₃), 1.32 (m, 1H, CH), 0.68 (q, J = 5.5 Hz, 2H, CH₂), 0.46 (q, J = 5.0 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.76, 151.86, 151.73, 148.74, 147.01, 140.50, 138.53, 132.98, 129.48, 125.57, 121.24 (2C), 117.32, 117.12 (2C), 115.39, 114.66, 55.22 (2C), 49.90 (2C), 48.35, 46.11, 11.14, 4.44 (2C). ESI/MS para (C₂₆H₂₉N₉O₂ [M+H]⁺): Calcd: 500.2517. Encontrado: 500.2521.

9-(Ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-N⁶-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (10h): Sólido blanco, rendimiento 39 %, pf 170-171 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (s, 1H, NH), 7.74 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 7.69 (s, 1H, CH), 7.53 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.14 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2CH), 6.97 (s, 1H, NH), 6.93 (d, J = 8.9 Hz, 1H, 2CH), 3.94 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.23 – 3.14 (m, 4H, 2CH₂), 2.66 – 2.55 (m, 4H, 2CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃), 1.39 – 1.26 (m, 1H, CH), 0.67 (q, J = 5.6 Hz, 1H, CH₂), 0.45 (q, J = 5.0 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.89, 152.01, 151.63, 147.08, 144.44 (d, ³J_{C-F} = 1.7 Hz), 138.20, 137.93, 133.13, 121.68 (2C), 121.31 (2C), 121.27 (2C), 120.71 (d, ¹J_{C-F} = 256.5 Hz), 116.98 (2C), 115.38, 55.34 (2C), 50.08 (2C), 48.28, 46.27, 11.19, 4.42 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -58.08 (s, 3F). ESI/MS para (C₂₇H₂₉F₃N₈O [M+H]⁺): Calcd: 539.2489. Encontrado: 539.2497.

4-((9-(Ciclopropilmetil)-2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-purin-6-il)amino)benzonitrile, (10i): Sólido blanco, rendimiento 49 %, pf 171-172 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (s, 1H, NH), 7.87 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 2CH), 7.72 (s, 1H, CH), 7.54 (d, J = 6.0 Hz, 2H, 2CH), 7.52 (d, J = 6.2 Hz, 2H, 2CH), 6.98 (s, 1H, NH), 6.95 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 3.95 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.27 – 3.17 (m, 4H, 2CH₂), 2.70 – 2.58 (m, 4H, 2CH₂),

2.38 (s, 3H, CH₃), 1.39 – 1.28 (m, 1H, CH), 0.68 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 0.46 (q, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.84, 151.98, 151.42, 147.34, 143.48, 138.65, 133.19, 132.77 (2C), 121.64 (2C), 119.48 (2C), 116.94 (2C), 115.68, 105.12, 55.28 (2C), 49.94 (2C), 48.36, 46.21, 11.18, 4.45 (2C). ESI/MS para (C₂₇H₂₉N₉ [M+H]⁺): Calcd: 480.2619. Encontrado: 480.2622.

9-(Ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-N⁶-(4-nitrofenil)-9H-purin-2,6-diamina, (10j): Sólido amarillo, rendimiento 60 %, pf 162-163 °C. ¹H RMN (400 MHz, DMSO) δ 10.34 (s, 1H, NH), 9.02 (s, 1H, NH), 8.31 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 8.10 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, 2CH), 8.08 (s, 1H, CH), 7.58 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 2CH), 6.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 3.95 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.13 – 2.98 (m, 4H, 2CH₂), 2.46 – 2.41 (m, 4H, 2CH₂), 2.19 (s, 3H, CH₃), 1.37 – 1.25 (m, 1H), 0.57 – 0.50 (m, 2H, CH₂), 0.47 – 0.42 (m, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO) δ 156.18, 152.01, 150.97, 146.92, 146.11, 140.69, 139.66, 133.11, 124.42 (2C), 120.83 (2C), 119.32 (2C), 115.87 (2C), 115.07, 54.73 (2C), 48.93 (2C), 47.19, 45.75, 11.28, 3.80 (2C). ESI/MS para (C₂₆H₂₉N₉O₂ [M+H]⁺): Calcd: 500.2517. Encontrado: 500.2518.

Etil 4-((9-(ciclopropilmetil)-2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-purin-6-il)amino)benzoato, (10k): Sólido verde, rendimiento 60 %, pf 138-139 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.03 (s, 1H, NH), 7.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2CH), 7.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.71 (s, 1H, CH), 7.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.02 (s, 1H, NH), 6.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.94 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.26 – 3.15 (m, 4H, 2CH₂), 2.68 – 2.55 (m, 4H, 2CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 1.35 – 1.26 (m, H, CH), 0.67 (q, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 166.48 (CO), 156.86, 151.73 (2C), 147.11, 143.55, 138.33, 133.05, 130.77 (2C), 124.36, 121.34 (2C), 118.89 (2C), 117.03 (2C), 115.66, 60.76, 55.30 (2C), 50.03 (2C), 48.29, 46.23, 14.51, 11.18, 4.42 (2). ESI/MS para (C₂₉H₃₄N₈O₂ [M+H]⁺): Calcd: 527.2877. Encontrado: 527.2883.

***N*⁶-(4-Cloro-3-fluorofenil)-9-(ciclopropilmetil)-*N*²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9*H*-purin-2,6-diamina, (10l):** Sólido amarillo, rendimiento 48 %, pf 149-150 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.01 (dd, *J* = 11.5, 2.2 Hz, 1H, CH), 8.00 (s, 1H, NH), 7.69 (s, 1H, CH), 7.52 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.22 (dd, *J* = 17.9, 9.9 Hz, 1H, CH), 7.17 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 1H, CH), 7.01 (s, 1H, NH), 6.96 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 3.93 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.26 – 3.14 (m, 4, 2CH₂), 2.69 – 2.54 (m, 4H, 2CH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃), 1.35 – 1.27 (m, 1H, CH), 0.67 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 158.11 (d, ¹*J*_{C-F} = 246.1 Hz, CF), 156.97, 151.70, 147.31, 139.43 (d, ³*J*_{C-F} = 10.3 Hz), 138.25, 132.84, 130.22, 121.61 (2C), 117.09 (2C), 115.83 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3.3 Hz), 115.37, 113.95 (d, ²*J*_{C-F} = 18.2 Hz), 108.50 (d, ²*J*_{C-F} = 26.4 Hz), 55.34 (2C), 50.03 (2C), 48.30, 46.27, 11.17, 4.43 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -113.80 (s, 1F). ESI/MS para (C₂₆H₂₈ClFN₈ [M+H]⁺): Calcd: 507.2182. Encontrado: 507.2189.

***N*⁶-(3-Cloro-4-fluorofenil)-9-(ciclopropilmetil)-*N*²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9*H*-purin-2,6-diamina, (10m):** Sólido verde, rendimiento 66 %, pf 153-155 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (dd, *J* = 6.6, 2.6 Hz, 1H, CH), 7.93 (s, 1H, NH), 7.69 (s, 1H, CH), 7.51 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.39 (ddd, *J* = 8.9, 3.9, 2.9 Hz, 1H, CH), 7.03 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H, CH), 7.02 (s, 1H, NH), 6.94 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, CH), 3.93 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.24 – 3.16 (m, 4H, 2CH₂), 2.69 – 2.58 (m, 4H, 2CH₂), 2.38 (s, 3H, CH₃), 1.36 – 1.26 (m, 1H, CH), 0.70 – 0.64 (q, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂), 0.44 (q, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.91, 154.08 (d, ¹*J*_{C-F} = 244.3 Hz), 151.92, 151.62, 146.96, 138.18, 135.93 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3.1 Hz), 133.08, 122.17, 121.24 (2C), 120.88 (d, ²*J*_{C-F} = 18.4 Hz), 119.74 (d, ³*J*_{C-F} = 6.6 Hz), 117.20 (2C), 116.43 (d, ²*J*_{C-F} = 21.9 Hz), 115.21, 55.27 (2C), 49.94 (2C), 48.27, 46.15, 11.18, 4.42 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -122.82 (s, 1F). ESI/MS para (C₂₆H₂₈ClFN₈ [M+H]⁺): Calcd: 507.2182. Encontrado: 507.2186.

9-(Ciclopropilmetil)-N⁶-(3,4-diclorofenil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (10n): Sólido verde, rendimiento 49 %, pf 132-133 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.08 (d, J = 2.5 Hz, 1H, CH), 7.92 (s, 1H, NH), 7.69 (s, 1H, CH), 7.51 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.41 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, CH), 7.29 (d, J = 8.7 Hz, 1H, CH), 7.02 (s, 1H, NH), 6.96 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 3.93 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.25 – 3.15 (m, 4H, 2CH₂), 2.68 – 2.57 (m, 4H, 2CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃), 1.31 (tdd, J = 10.3, 7.5, 3.7 Hz, 1H, CH), 0.67 (q, J = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, J = 4.9 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.91, 151.73, 147.11, 138.86, 138.31, 132.93, 132.59, 130.29, 125.80, 121.49, 121.38, 119.26, 117.19, 115.39, 55.32, 49.98, 48.29, 46.23, 11.18, 4.44. ESI/MS para (C₂₆H₂₈Cl₂N₈ [M+H]⁺): Calcd: 523.1887. Encontrado: 523.1887.

9-(Ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-N⁶-(3-nitro-4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (10o): Sólido rojo, rendimiento 39 %, pf 144-145 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.54 (d, J = 2.7 Hz, 1H, CH), 8.50 (s, 1H, NH), 7.81 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H, CH), 7.73 (s, 1H, CH), 7.47 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.26 (dd, J = 8.9, 0.8 Hz, 1H, CH), 7.07 (s, 1H, NH), 6.92 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 3.94 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.24 – 3.12 (m, 4H, 2CH₂), 2.64 – 2.55 (m, 4H, 2CH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃), 1.31 (dq, J = 15.3, 7.6, 5.0 Hz, 1H, CH), 0.68 (q, J = 5.8 Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, J = 5.0 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.92, 152.10, 151.41, 147.50, 143.09, 139.06, 138.75, 135.24 (d, ³J_{C-F} = 2.1 Hz, C-OCF₃), 132.41, 124.19, 123.80, 121.81 (2C), 120.44 (d, ¹J_{C-F} = 260.0 Hz, CF₃), 116.86 (2C), 116.13, 115.31, 55.32 (2C), 49.84 (2C), 48.38, 46.27, 11.11, 4.44 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -57.95 (s, 3F, CF₃). ESI/MS para (C₂₇H₂₈F₃N₉O₃ [M+H]⁺): Calcd: 584.2340. Encontrado: 584.2338.

8.1.8 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos finales 11a–e

A una solución de **3p–r** (0.519 mmol) y **9a–b** (0.519 mmol) en dioxano (2 mL), se agrega Pd(OAc)₂ (24 mg, 0.1 mmol), Xantphos (120 mg, 0.2 mmol) y 2 M K₂CO₃ (aq) (1 mL, 0.2 mmol) y se colocan a agitar a 100 °C en un reactor microondas. Después de enfriar la reacción a temperatura ambiente, la mezcla se filtra en Celita y se lava con 100 mL agua destilada. La mezcla se extrae con acetato de etilo, las fases se separan y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra por pliegues y se concentra el líquido hasta sequedad en rotaevaporador a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía de silica gel utilizando una fase móvil metanol/diclorometano (10:90) para obtener los productos **11a–e**.

(4-((9-(Ciclopropilmetil)-6-(fenilamino)-9H-purin-2-il)amino)fenil)(4-metilpiperazin-1-il)metanona, (11a): Sólido rosado, rendimiento 54 %, pf 164-165 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (s, 1H, NH), 7.74 (s, 1H, CH), 7.72 (d, J = 8.6 Hz, 4H, 4CH), 7.38 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2CH), 7.34 (dd, J = 10.9, 5.2 Hz, 2H, 2CH), 7.32 (s, 1H, NH), 7.09 (t, J = 7.4 Hz, 1H, CH), 3.97 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.67 (s, 4H, 2CH₂), 2.42 (s, 4H, 2CH₂), 2.32 (s, 3H, CH₃), 1.33 (ddd, J = 7.8, 4.6, 2.9 Hz, 1H, CH), 0.68 (q, J = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 0.46 (q, J = 4.9 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 170.63 (C=O), 155.86, 152.39, 151.07, 142.10, 138.83, 138.48, 128.98 (2C), 128.50 (2C), 128.31, 123.61, 120.87 (2C), 118.05 (2C), 115.90, 70.69 (2C), 55.21 (2C), 48.38, 46.18, 11.19, 4.44 (2C). ESI/MS para (C₂₇H₃₀N₈O [M+H]⁺): Calcd: 483.2615. Encontrado: 483.2619.

(4-((9-(Ciclopropilmetil)-6-((3-fluorofenil)amino)-9H-purin-2-il)amino)fenil)(4-metilpiperazin-1-il)metanona, (11b): Sólido amarillo, rendimiento 55 %, pf 150-151 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (s, 1H, NH), 7.86 (d, J = 12.0 Hz, 1H, CH), 7.75 (s, 1H, CH), 7.71 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 2CH), 7.41 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 2CH), 7.40 (s, 1H, NH), 7.23 (m, 2H, 2CH),

6.77 – 6.72 (m, 1H, CH), 3.97 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.67 (s, 4H, 2CH₂), 2.42 (s, 4H, 2CH₂), 2.32 (s, 3H, CH₃), 1.32 (ddd, $J = 15.5, 7.6, 4.9$ Hz, 1H, CH), 0.68 (q, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, $J = 5.1$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 170.57 (C=O), 163.13 (d, $^1J_{C-F} = 243.6$ Hz, CF), 155.81, 152.00, 151.24, 141.88, 140.58 (d, $^3J_{C-F} = 11.2$ Hz), 138.72, 129.94 (d, $^3J_{C-F} = 9.5$ Hz, CH), 128.63, 128.56 (2C), 118.31 (2C), 115.91, 115.55 (d, $^4J_{C-F} = 2.1$ Hz, CH), 109.80 (d, $^2J = 21.9$ Hz, CH), 107.77 (d, $^2J_{C-F} = 26.6$ Hz, CH), 70.55 (2C), 55.22 (2C), 48.41, 46.18, 11.15, 4.44 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -111.89 (s, 1F). ESI/MS para (C₂₇H₂₉FN₈O [M+H]⁺): Calcd: 501.2125. Encontrado: 501.2525.

(4-((9-(Ciclopropilmetil)-6-((3,4-difluorofenil)amino)-9H-purin-2-il)amino)fenil)(4-metilpiperazin-1-il)metanona, (11c): Sólido café, rendimiento 54 %, pf 142-143 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (s, 1H, NH), 7.95 (ddd, $J = 12.6, 7.1, 2.5$ Hz, 1H, CH), 7.75 (s, 1H, CH), 7.70 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2CH), 7.40 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2CH), 7.38 (s, 1H, NH), 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, CH), 7.11 – 6.98 (m, 1H, CH), 3.97 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.69 (s, 4H, 2CH₂), 2.44 (s, 4H, 2CH₂), 2.33 (s, 3H, CH₃), 1.32 (dtd, $J = 14.9, 7.4, 2.5$ Hz, 1H, CH), 0.72 – 0.65 (m, 2H, CH₂), 0.46 (q, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 170.54 (C=O), 155.79, 151.94, 151.25, 148.70 (dd, $^1J_{C-F} = 234.5, ^2J_{C-F} = 13.3$ Hz, CF), 145.93 (dd, $^{1,2}J_{C-F} = 244.4, 19.9$ Hz, CF), 141.85, 138.75, 135.54 (dd, $^{3,4}J = 9.0, 2.8$ Hz), 128.66, 128.55 (2C), 118.31 (2C), 117.11 (d, $^2J_{C-F} = 18.7$ Hz, CH), 115.93 (dd, $^{3,4}J_{C-F} = 5.1, 2.9$ Hz, CH), 115.71, 110.14 (d, $^2J_{C-F} = 21.8$ Hz, CH), 70.47 (2C), 55.17 (2C), 48.43, 46.12, 11.16, 4.45 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -136.26 (d, $^3J_{F-F} = 21.9$ Hz, 1F), -144.31 (d, $^3J_{F-F} = 21.9$ Hz, 1F). ESI/MS para (C₂₇H₂₈F₂N₈O [M+H]⁺): Calcd: 519.2427. Encontrado: 519.2435.

9-(ciclopropilmetil)-N⁶-(3-fluorofenil)-N²-(4-((4-metilpiperazin-1-il)metil)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (11d): Sólido blanco, rendimiento 68 %, pf 132-133 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.23 (s, 1H, NH), 7.79 (dt, $J = 11.4, 1.9$ Hz, 1H, CH), 7.66 (s, 1H, CH), 7.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, 2CH), 7.28 (s, 1H, CH), 7.24 – 7.20 (m, 3H, 2CH, NH), 7.15 (dd, $J = 14.5, 8.0$ Hz, 1H,

CH), 6.67 (td, $J = 8.2, 1.6$ Hz, 1H, CH), 3.89 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.44 (s, 2H, CH₂), 2.46 (s, 8H, 4CH₂), 2.25 (s, 3H, CH₃), 1.26 (dtd, $J = 10.4, 7.5, 2.7$ Hz, 1H, CH), 0.61 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH₂), 0.39 (q, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 163.07 (d, $^1J_{C-F} = 243.5$ Hz, CF), 156.35, 151.96, 151.32, 140.80 (d, $^3J_{C-F} = 11.2$ Hz, CH), 139.33, 138.26, 131.35, 129.88 (2C), 129.79 (d, $^3J_{C-F} = 9.7$ Hz, CH), 119.10 (2C), 115.49, 115.36 (d, $^4J_{C-F} = 2.4$ Hz, CH), 109.48 (d, $^2J_{C-F} = 21.5$ Hz, CH), 107.51 (d, $^2J_{C-F} = 26.6$ Hz, CH), 62.63, 55.05 (2C), 52.84 (2C), 48.28, 45.91, 11.10, 4.37 (2C). ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -111.96 (s, 1F). ESI/MS para (C₂₇H₃₁FN₈O [M+H]⁺): Calcd: 487.2738.

9-(ciclopropilmetil)-N⁶-(3,4-difluorofenil)-N²-(4-((4-metilpiperazin-1-il)metil)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (11e): Sólido café, rendimiento 64 %, pf 122-126 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.52 (s, 1H, NH), 7.85 (ddd, $J = 12.7, 7.2, 2.5$ Hz, 1H, CH), 7.66 (s, 1H, CH), 7.56 (d, $J = 8.3$ Hz, 3H, 2CH, NH), 7.22 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, 2CH), 7.13 – 7.06 (m, 1H, CH), 6.93 (dd, $J = 18.4, 9.3$ Hz, 1H, CH), 3.89 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂), 3.44 (s, 2H, CH₂), 2.46 (s, 8H, 4CH₂), 2.25 (s, 3H, CH₃), 1.31 – 1.18 (m, 1H, CH), 0.67 – 0.56 (m, 2H, CH₂), 0.42 – 0.33 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 156.32, 151.81, 151.26, 149.83 (dd, $^{1,2}J_{C-F} = 245.6, 13.1$ Hz, CF), 146.02 (dd, $^{1,2}J_{C-F} = 243.6, 12.9$ Hz, CF), 139.25, 138.16, 135.77 (dd, $^{3,4}J_{C-F} = 9.1, 2.9$ Hz, CH), 131.38, 129.76 (2C), 119.13 (2C), 116.73 (d, $^2J_{C-F} = 18.1$ Hz, CH), 115.67 – 115.55 (m, CH), 115.15, 109.73 (d, $^2J_{C-F} = 21.8$ Hz, CH), 62.53, 54.97 (2C), 52.78 (2C), 48.18, 45.84, 10.98, 4.28 (2C). ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -136.48 (d, $^3J_{F-F} = 22.0$ Hz, 1F), -144.88 (d, $^3J_{F-F} = 22.1$ Hz, 1F). ESI/MS para (C₂₇H₃₀F₂N₈O [M+H]⁺): Calcd: 505.2634.

8.1.9 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos finales 12a-l

A una solución de **3s-ad** (0.519 mmol) y **6** (110 mg, 0.57 mmol) en dioxano (2 mL), se agrega Pd(OAc)₂ (24 mg, 0.1 mmol), Xantphos (120 mg, 0.2 mmol) y 2 M K₂CO₃ (aq) (1 mL, 0.2 mmol) y se colocan a agitar a 100 °C en un reactor microondas. Después de enfriar la reacción a temperatura ambiente, la mezcla se filtra en Celita y se lava con 100 mL agua destilada. La mezcla se extrae con acetato de etilo, las fases se separan y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra por pliegues y se concentra el líquido hasta sequedad en rotaevaporador a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía de silica gel utilizando una fase móvil metanol/diclorometano (10:90) para obtener los productos **12a-l**.

9-Isopentil-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-N⁶-fenil-9H-purin-2,6-diamina, (12a): Sólido café, rendimiento 52%, pf 153.1 – 155.2 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.74 (d, J = 7.7 Hz, 2H, 2CH), 7.68 (s, 1H, NH), 7.58 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.57 (s, 1H, CH), 7.32 (t, J = 7.9 Hz, 2H, CH), 7.06 (t, J = 7.4 Hz, 1H, CH), 6.97 (s, 1H, NH), 6.93 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 4.16 – 4.06 (m, 2H, CH₂), 3.24 – 3.15 (m, 4H, 2CH₂), 2.68 – 2.59 (m, 4H, 2CH₂), 2.38 (s, 3H, CH₃), 1.80 (dd, J = 14.8, 7.0 Hz, 2H, CH₂), 1.70 – 1.57 (m, 1H, CH), 1.00 (d, J = 6.6 Hz, 6H, 2CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.80, 152.29, 151.40, 146.79, 139.17, 138.12, 133.55, 128.95 (2C), 123.13, 120.88 (2C), 120.32 (2C), 117.15 (2C), 115.53, 55.33 (2C), 50.17 (2C), 46.22, 41.99, 38.88, 25.74, 22.48 (2C). ESI/MS para (C₂₇H₃₄N₈ [M+H]⁺). Calcd: 471.2979. Encontrado: 471.2981.

N⁶-(3-Fluorofenil)-9-isopentil-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (12b): Sólido café, rendimiento 20 %, pf 162.1 164.9 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (s, 1H, NH), 7.85 (d, J = 11.5 Hz, 1H, CH), 7.57 (s, 1H, CH), 7.56 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 7.23 – 7.14 (m, 3H, 2CH, NH), 6.94 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 6.75 – 6.66 (m, 1H, CH), 4.16 – 4.02 (m, 2H, CH₂), 3.24 – 3.13 (m, 4H, 2CH₂), 2.67 – 2.56 (m, 4H, 2CH₂), 2.37 (s, 3H,

CH₃), 1.78 (dd, $J = 14.8, 7.0$ Hz, 2H, CH₂), 1.62 (tt, $J = 13.3, 6.5$ Hz, 1H, CH), 0.98 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, 2CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 163.12 (d, $^1J_{C-F} = 243.5$ Hz), 156.84, 151.93, 151.55, 146.97, 140.85 (d, $^3J_{C-F} = 11.3$ Hz), 138.34, 133.20, 129.77 (d, $^3J_{C-F} = 9.6$ Hz), 121.21 (2C), 117.13 (2C), 115.43, 115.15 (d, $^4J_{C-F} = 2.5$ Hz), 109.36 (d, $^2J_{C-F} = 21.5$ Hz), 107.42 (d, $^2J_{C-F} = 26.8$ Hz), 55.24 (2C), 50.00 (2C), 46.14, 41.98, 38.79, 25.70, 22.42 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -111.76 (s, 1F). ESI/MS para (C₂₇H₃₃FN₈ [M+H]⁺). Calcd: 489.2885. Encontrado: 489.2887.

N⁶-(3,4-Difluorofenil)-9-isopentil-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (12c): Sólido café, rendimiento 31 %, pf 151.2 – 153.7 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.96 (ddd, $J = 12.7, 7.2, 2.5$ Hz, 1H, CH), 7.67 (s, 1H, NH), 7.54 (s, 1H, CH), 7.51 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 7.11 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, CH), 7.03 (dd, $J = 18.4, 9.0$ Hz, 1H, CH), 6.92 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2CH), 6.90 (s, 1H, NH), 4.13 – 4.04 (m, 2H, CH₂), 3.19 – 3.14 (m, 4H, 2CH₂), 2.63 – 2.55 (m, 4H, CH₂), 2.34 (s, 3H, CH₃), 1.77 (dd, $J = 14.8, 7.0$ Hz, 2H, CH₂), 1.61 (tt, $J = 13.3, 6.7$ Hz, 1H, CH), 0.97 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, 2CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.89, 151.86, 151.62, 150.16 (dd, $^1,2J_{C-F} = 246.0, 13.2$ Hz), 147.21, 146.25 (dd, $^1,2J_{C-F} = 243.8, 13.3$ Hz), 138.39, 135.83 (dd, $^3,4J_{C-F} = 9.0, 2.6$ Hz), 133.02, 121.43 (2C), 117.13 (2C), 117.07 (d, $^2J_{C-F} = 17.6$ Hz), 116.98, 115.32 (d, $^3J_{C-F} = 7.2$ Hz), 109.74 (d, $^2J_{C-F} = 22.2$ Hz), 55.34 (2C), 50.07 (2C), 46.26, 42.05, 38.87, 25.76, 22.48 (2C). ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -136.04 (d, $J = 22.0$ Hz, 1F), -144.94 (d, $J = 22.0$ Hz, 1F). ESI/MS para (C₂₇H₃₂F₂N₈ [M+H]⁺). Calcd: 507.2791. Encontrado: 507.2801.

N²-(4-(4-Metilpiperazin-1-il)fenil)-9-pentil-N⁶-fenil-9H-purin-2,6-diamina, (12d): Sólido café, rendimiento 22 %, pf 138.5 – 141.3°C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, 2CH), 7.68 (s, 1H, NH), 7.58 (s, 1H, CH), 7.56 (d, $J = 3.4$ Hz, 2H, 2CH), 7.36 – 7.29 (m, 2H, 2CH), 7.06 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, CH), 6.94 (s, 1H, NH), 6.92 (d, $J = 3.9$ Hz, 2H, 2CH), 4.09 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.24 – 3.15 (m, 4H, 2CH₂), 2.68 – 2.60 (m, 4H, 2CH₂), 2.39 (s, 3H, CH₃), 1.96 – 1.85 (m, 2H, CH₂), 1.35 (ddd, $J = 12.7, 10.3, 5.1$ Hz, 4H, 2CH₂),

Comentado [1]: pentilo

0.91 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.83, 152.29, 151.43, 146.77, 139.17, 138.26, 133.56, 128.96 (2C), 123.14, 120.94 (2C), 120.34 (2C), 117.19 (2C), 115.52, 55.30 (2C), 50.12 (2C), 46.16, 43.72, 29.68, 28.95, 22.31, 14.06. ESI/MS para (C₂₇H₃₄N₈ [M+H]⁺). Calcd: 471.2979. Encontrado: 471.2982.

N⁶-(3-Fluorofenil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9-pentil-9H-purin-2,6-diamina, (12e): Sólido café, rendimiento 25 %, pf 147.1 - 149.3 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (s, 1H, NH), 7.88 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, CH), 7.56 (s, 1H, CH), 7.55 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, 2CH), 7.25 – 7.19 (m, 2H, 2CH), 7.01 (s, 1H, NH), 6.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 6.75 – 6.69 (m, 1H, CH), 4.07 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.23 – 3.16 (m, 4H, 2CH₂), 2.65 – 2.55 (m, 4H, 2CH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃), 1.97 – 1.83 (m, 2H, CH₂), 1.41 – 1.28 (m, 4H, 2CH₂), 0.90 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 163.18 (d, ¹J_{C-F} = 243.6 Hz), 156.90, 151.95, 151.60, 147.11, 140.87 (d, ³J_{C-F} = 11.3 Hz), 138.44, 133.10, 129.84 (d, ³J_{C-F} = 9.6 Hz), 121.35 (2C), 117.14 (2C), 115.48, 115.13 (d, ⁴J_{C-F} = 2.8 Hz), 109.42 (d, ²J_{C-F} = 21.6 Hz), 107.43 (d, ²J_{C-F} = 26.8 Hz), 55.33 (2C), 50.08 (2C), 46.25, 43.71, 29.64, 28.92, 22.28, 14.04. ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -111.72 (s, 1F). ESI/MS para (C₂₇H₃₃FN₈ [M+H]⁺). Calcd: 489.2885. Encontrado: 489.2886.

N⁶-(3,4-Difluorofenil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9-pentil-9H-purin-2,6-diamina, (12f): Sólido rojo, rendimiento 65 %, pf 172.5 – 174.6 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (ddd, $J = 12.8, 7.3, 2.4$ Hz, 1H, CH), 7.94 (s, 1H, NH), 7.56 (s, 1H, CH), 7.52 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 7.14 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, CH), 7.04 (dd, $J = 18.6, 9.0$ Hz, 1H, CH), 6.98 (s, 1H, NH), 6.95 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2CH), 4.07 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.24 – 3.14 (m, 4H, 2CH₂), 2.65 – 2.57 (m, 4H, 2CH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃), 1.96 – 1.84 (m, 2H, CH₂), 1.45 – 1.27 (m, 4H, 2CH₂), 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.94, 151.86, 151.62, 150.11 (dd, ^{1,2}J_{C-F} = 245.5, 13.1 Hz), 147.22, 146.19 (dd, ^{1,2}J_{C-F} = 243.3, 13.2 Hz), 138.45, 135.90 (dd, ³J_{C-F} = 9.3, 2.9 Hz), 132.98, 121.50 (2C), 117.10 (2C), 117.01 (d, ²J_{C-F} = 19.6 Hz), 115.31 (dd, ^{3,4}J_{C-F} = 5.4, 2.2 Hz), 109.71 (d, ²J_{C-F} = 22.2 Hz), 55.33 (2C), 50.05 (2C),

46.25, 43.74, 29.65, 28.92, 22.29, 14.04. ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -136.13 (d, J = 22.0 Hz, 1F), -145.02 (d, J = 22.1 Hz, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{F}_2\text{N}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). Calcd: 507.2791. Encontrado: 507.2791.

9-Hexil- N^2 -(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)- N^6 -fenil-9H-purin-2,6-diamina, (12g): Sólido café, rendimiento 20 %, pf 155.8 - 160.0 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.81 (s, 1H, NH), 7.75 (d, J = 7.9 Hz, 2H, 2CH), 7.57 (d, J = 7.0 Hz, 2H, 2CH), 7.55 (s, 1H, CH), 7.32 (t, J = 7.8 Hz, 2H, 2CH), 7.06 (t, J = 7.4 Hz, 1H, CH), 6.95 (s, 1H, NH), 6.93 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 4.08 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 3.22 – 3.16 (m, 4H, 2 CH_2), 2.66 – 2.60 (m, 4H, 2 CH_2), 2.38 (s, 3H, CH_3), 1.90 (m, 2H, CH_2), 1.43 – 1.18 (m, 6H, 3 CH_2), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 156.83, 152.27, 151.39, 146.78, 139.20, 138.18, 133.51, 128.93 (2C), 123.12, 120.93 (2C), 120.38 (2C), 117.15 (2C), 115.39, 55.26 (2C), 50.11 (2C), 46.14, 43.75, 31.38, 29.93, 26.48, 22.61, 14.13. ESI/MS para ($\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). Calcd: 485.3136. Encontrado: 485.3135.

N^6 -(3-Fluorofenil)-9-hexil- N^2 -(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (12h): Sólido amarillo, rendimiento 50 %, pf 147.1 – 149.9 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (s, 1H, NH), 7.91 – 7.85 (m, 1H, CH), 7.56 (s, 1H, CH), 7.55 (d, J = 9.9 Hz, 2H, 2CH), 7.21 (m, 2H, 2CH), 7.02 (s, 1H, CH), 6.95 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 6.78 – 6.68 (m, 1H, CH), 4.08 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 3.24 – 3.15 (m, 4H, 2 CH_2), 2.65 – 2.56 (m, 4H, 2 CH_2), 2.37 (s, 3H, CH_3), 1.88 (m, 2H, CH_2), 1.38 – 1.27 (m, 6H, 3 CH_2), 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 163.19 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ = 243.6 Hz), 156.90, 151.96, 151.60, 147.09, 140.87 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 11.3 Hz), 138.45, 133.13, 129.85 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 9.6 Hz), 121.34 (2C), 117.16 (2C), 115.50, 115.13 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 2.6 Hz), 109.43 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 21.6 Hz), 107.43 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 26.8 Hz), 55.33 (2C), 50.08 (2C), 46.25, 43.74, 31.37, 29.92, 26.48, 22.61, 14.12. ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -111.71 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{FN}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). Calcd: 503.3041. Encontrado: 503.3041.

N^6 -(3,4-Difluorofenil)-9-hexil- N^2 -(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (12i): Sólido amarillo, rendimiento 45 %, pf 170.2 – 174.0 °C.

Comentado [2]: hexilo

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.98 (ddd, $J = 12.8, 7.3, 2.5$ Hz, 1H, CH), 7.94 (s, 1H, NH), 7.55 (s, 1H, CH), 7.52 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 7.17 – 7.10 (m, 1H, CH), 7.03 (q, $J = 8.8$ Hz, 1H, CH), 7.02 (s, 1H, NH), 6.94 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2CH), 4.07 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.24 – 3.18 (m, 4H, 2 CH_2), 2.69 – 2.49 (m, 4H, 2 CH_2), 2.37 (s, 3H, CH_3), 1.97 – 1.78 (m, 2H, CH_2), 1.40 – 1.23 (m, 6H, 3 CH_2), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 156.92, 151.86, 151.61, 150.10 (dd, $^{1,2}J_{\text{C-F}} = 245.7, 13.0$ Hz), 147.19, 146.18 (dd, $^{1,2}J_{\text{C-F}} = 243.6, 13.1$ Hz), 138.44, 135.89 (dd, $^{3,4}J_{\text{C-F}} = 9.2, 2.9$ Hz), 133.00, 121.46 (2C), 117.10 (2C), 117.00 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 20.7$ Hz), 115.38, 115.31 (dd, $^{3,4}J_{\text{C-F}} = 5.8, 2.2$ Hz), 109.71 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 22.2$ Hz), 55.32 (2C), 50.03 (2C), 46.24, 43.76, 31.36, 29.92, 26.47, 22.61, 14.11. ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -136.14 (d, $J = 22.0$ Hz, 1F), -145.02 (d, $J = 22.0$ Hz, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{F}_2\text{N}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). Calcd: 521.2947. Encontrado: 521.2949.

N^2 -(4-(4-Metilpiperazin-1-il)fenil)-9-octil- N^6 -fenil-9H-purin-2,6-diamina, (12j): Sólido amarillo, rendimiento 30 %, pf 171.3 – 173.5 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.66 (s, 1H, NH), 7.66 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, 2CH), 7.48 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, 2CH), 7.47 (s, 1H, CH), 7.27 – 7.20 (m, 2H, 2CH), 6.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, CH), 6.91 (s, 1H, NH), 6.85 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2CH), 3.99 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.18 – 3.05 (m, 4H, 2 CH_2), 2.59 – 2.47 (m, 4H, 2 CH_2), 2.28 (s, 3H, CH_3), 1.93 – 1.72 (m, 2H, CH_2), 1.35 – 1.10 (m, 10H, 5 CH_2), 0.79 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 156.82, 152.28, 151.42, 146.83, 139.19, 138.23, 133.47, 128.92 (2C), 123.10, 120.91 (2C), 120.33 (2C), 117.08 (2C), 115.50, 55.35 (2C), 50.18 (2C), 46.26, 43.71, 31.89, 29.99, 29.26, 29.18, 26.83, 22.73, 14.20. ESI/MS para ($\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$). Calcd: 513.3449. Encontrado: 513.3449.

N^6 -(3-Fluorofenil)- N^2 -(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9-octil-9H-purin-2,6-diamina, (12k): Sólido café, rendimiento 20 %, pf 181.2 – 183.6 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (s, 1H, NH), 7.87 (dd, $J = 11.4, 9.6$ Hz, 1H, CH), 7.56 (s, 1H, CH), 7.55 (d, $J = 9.4$ Hz, 2H, 2CH), 7.22 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H, 2CH), 7.05 (s, 1H, NH), 6.95 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2CH), 6.72 (ddd, $J = 9.2, 4.8, 2.2$ Hz, 1H, CH), 4.07 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2), 3.24 – 3.14 (m, 4H, 2 CH_2), 2.69 –

Comentado [3]: octilo

2.53 (m, 4H, 2CH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃), 1.95 – 1.83 (m, 2H, CH₂), 1.41 – 1.19 (m, 10H, 5CH₂), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 163.08 (d, ¹*J*_{C-F} = 243.4 Hz), 156.78, 151.84, 151.49, 146.99, 140.76 (dd, ³*J*_{C-F} = 11.3), 138.34, 132.99, 129.73 (d, ³*J*_{C-F} = 9.6 Hz), 121.20 (2C), 117.01 (2C), 115.38, 115.03 (d, ⁴*J*_{C-F} = 1.0 Hz), 109.31 (d, ²*J*_{C-F} = 21.6 Hz), 107.32 (d, ²*J*_{C-F} = 26.7 Hz), 55.24 (2C), 49.98 (2C), 46.16, 43.62, 31.77, 29.85, 29.14, 29.06, 26.71, 22.61, 14.08. ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -111.72 (s, 1F). ESI/MS para (C₃₀H₃₉FN₈ [M+H]⁺). Calcd: 531.3354. Encontrado: 531.3360.

N⁶-(3,4-Difluorofenil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9-octil-9H-purin-2,6-diamina, (12l): Sólido café, rendimiento 52 %, pf 192.0 – 194.1 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.96 (ddd, *J* = 12.7, 7.2, 2.5 Hz, 1H, CH), 7.67 (s, 1H, NH), 7.54 (s, 1H, CH), 7.51 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.11 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, CH), 7.03 (dd, *J* = 18.4, 9.0 Hz, 1H, CH), 6.92 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 6.90 (s, 1H, NH), 3.18 – 3.05 (m, 4H, 2CH₂), 2.59 – 2.47 (m, 4H, 2CH₂), 2.28 (s, 3H, CH₃), 1.93 – 1.72 (m, 2H, CH₂), 1.35 – 1.10 (m, 10H, 5CH₂), 0.79 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.89, 151.86, 151.62, 150.16 (dd, ^{1,2}*J*_{C-F} = 246.0, 13.2 Hz), 147.21, 146.25 (dd, ^{1,2}*J*_{C-F} = 243.8, 13.3 Hz), 138.39, 135.83 (dd, ^{3,4}*J*_{C-F} = 9.0, 2.6 Hz), 133.02, 121.43 (2C), 117.13 (2C), 117.07 (d, ²*J*_{C-F} = 17.6 Hz), 116.98, 115.32 (d, ³*J*_{C-F} = 7.2 Hz), 109.74 (d, ²*J*_{C-F} = 22.2 Hz), 55.34 (2C), 50.07 (2C), 46.26, 42.05, 31.80, 30.08, 29.18, 29.07, 26.70, 22.69, 14.15. ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -136.37 (d, *J* = 21.8 Hz, 1F), -144.29 (d, *J* = 21.8 Hz, 1F). ESI/MS para (C₃₀H₃₈F₂N₈ [M+H]⁺). Calcd: 549.3260. Encontrado: 549.3267.

8.1.10 Síntesis de 2,4-dicloro-7-(ciclopropilmetil)-7H-pirrol[2,3-*d*]pirimidina, (14)

A una solución de 2,4-dicloro-7H-pirrol[2,3-*d*]pirimidina (**13**, 1000 mg, 5.3 mmol), se añade bromuro de metilciclopropilo (1077 mg, 7.9 mol) y K₂CO₃ (2250 mg, 15.9 mol) en DMF (20 mL), luego la mezcla se deja en agitación a temperatura ambiente por 12 h. Después de completada la reacción, la

mezcla se filtra por pliegues y el líquido se lleva a sequedad en un rotaevaporador a presión reducida. El residuo oleoso se purifica por cromatografía de silica gel utilizando diclorometano como fase móvil para obtener el producto **14** como un sólido blanco, rendimiento 82 %, pf 41.2 – 44.7 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, CH), 6.58 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, CH), 4.07 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.35 – 1.15 (m, 1H, CH), 0.63 (qd, *J* = 6.0, 4.9 Hz, 2H, CH₂), 0.42 (q, *J* = 4.9 Hz, 1H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 152.54, 151.98, 151.78, 129.65, 116.43, 99.93, 49.82, 11.25, 4.24 (2C). ESI/MS para (C₁₀H₉Cl₂N₃ [M+H]⁺). Calcd: 242.0. Encontrado: 241.9.

8.1.11 Procedimiento para la síntesis del 15a

A una solución de **14** (500 mg, 2.04 mmol) y anilina correspondiente (2.07 mmol) en dioxano (8 mL), se agrega Pd(OAc)₂ (23 mg, 0.2 mmol), Xantphos (239 mg, 0.4 mmol) y 2 M K₂CO₃ (aq) (3.1 mL, 6.2 mmol) y se colocan a agitar a 100 °C en un reactor microondas. Después de enfriar la reacción a temperatura ambiente, la mezcla se filtra en Celita y se lava con 100 mL agua destilada. La mezcla se extrae con acetato de etilo, las fases se separan y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra por pliegues y se concentra el líquido hasta sequedad en rotaevaporador a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía de silica gel utilizando diclorometano como fase móvil para obtener **2-cloro-7-(ciclopropilmetil)-N-fenil-7H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina, (15a)**: Sólido amarillo, rendimiento 88 %, pf 81.2 – 84.9 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, 2CH), 7.40 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, 2CH), 7.25 – 7.20 (m, 1H, CH), 7.21 (s, 1H, NH), 6.98 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, CH), 5.88 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, CH), 4.00 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.25 – 1.13 (m, 1H, CH), 0.59 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 0.38 (q, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 155.39, 153.09, 151.85, 138.31, 129.29 (2C), 125.57, 124.62, 123.78 (2C), 101.86, 99.21, 49.23, 11.38, 4.11 (2C). ESI/MS para (C₁₆H₁₅ClN₄ [M+H]⁺). Calcd: 299.11. Encontrado: 299.0.

8.1.12 Procedimiento general para la síntesis del 15b-d

A una solución de **2a** (0.411 mmol), se añade la correspondiente amina (0.411) y DIPEA (0.15 mL, 0.822 mmol) en *n*-butanol (20 mL), luego la mezcla se deja en agitación a 110 °C por 12 h. Luego de enfriar a temperatura ambiente, la reacción se concentra en rotaevaporador a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía de silica gel utilizando una fase móvil acetona/diclorometano (10:90) para obtener los productos **15b-d**.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-amina, (15b): Sólido blanco, rendimiento 90 %, pf 110 – 111 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO) δ 8.19 (s, 1H, NH), 7.72 (s, 2H, NH₂), 3.95 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.27 (ddd, *J* = 15.0, 7.2, 4.5 Hz, 1H, CH), 0.59 – 0.46 (m, 2H, CH₂), 0.46 – 0.36 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO) δ 156.73, 152.89, 150.54, 141.18, 117.72, 47.45, 11.19, 3.71 (2C). ESI/MS para (C₉H₁₀ClN₅ [M+H]⁺). Calcd: 224.07.

2-Cloro-N-ciclohexil-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-amina, (15c): Sólido blanco, rendimiento 80 %, pf 79 – 80 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (s, 1H, CH), 6.12 (s, 1H, NH), 4.03 (s, 1H, CH), 3.85 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.91 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H, CH₂), 1.54 (ddd, *J* = 32.2, 11.4, 6.8 Hz, 3H, 3CH), 1.40 – 0.93 (m, 6H, 6CH), 0.62 – 0.44 (m, 2H, CH₂), 0.28 (q, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 154.38, 149.87, 139.25, 138.04, 118.11, 48.18 (2C), 32.88, 25.31 (2C), 24.52 (2C), 10.93, 4.06 (2C). ESI/MS para (C₁₅H₂₀ClN₅ [M+H]⁺). Calcd: 306.15.

N-bencil-2-cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-amina, (15d): Sólido blanco, rendimiento 90 %, pf 100 – 102 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.63 (s, 1H, NH), 7.32 (dt, *J* = 8.3, 4.7 Hz, 6H, 6CH), 4.85 (s, 2H, CH₂), 3.97 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.46 – 1.09 (m, 1H, CH), 0.76 – 0.59 (m, 2H, CH₂), 0.41 (q, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 155.28, 154.60, 139.86, 138.18, 137.57, 128.80 (2C), 128.02, 127.73 (2C), 118.54, 77.16, 48.62, 11.17, 4.42 (2C). ESI/MS para (C₁₆H₁₆ClN₅ [M+H]⁺). Calcd: 314.12.

8.1.13 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos finales 16a–d

A una solución de **15a–d** (0.34 mmol) y **9** (54 mg, 0.34 mmol) en dioxano (2 mL), se agrega Pd(OAc)₂ (4 mg, 0.017 mmol), Xantphos (39 mg, 0.06 mmol) y 2 M K₂CO₃ (aq) (0.5 mL, 1 mmol) y se colocan a agitar a 100 °C en un reactor microondas. Después de enfriar la reacción a temperatura ambiente, la mezcla se filtra en Celita y se lava con 100 mL agua destilada. La mezcla se extrae con acetato de etilo, las fases se separan y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra por pliegues y se concentra el líquido hasta sequedad en rotaevaporador a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía de silica gel utilizando una fase móvil metanol/diclorometano (10:90) para obtener los productos finales deseados.

7-(Ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-N⁴-fenil-7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-2,4-diamina, (16a): sólido amarillo, rendimiento 43 %, pf 102.3 – 105.5 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (d, J = 7.2 Hz, 2H, 2CH), 7.58 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.34 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.11 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.83 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.09 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 3.95 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 3.24 – 3.12 (m, 4H), 2.72 – 2.58 (m, 4H), 2.38 (s, 3H), 1.32 – 1.20 (m, 1H), 0.60 (q, J = 5.9 Hz, 2H), 0.41 (q, J = 4.8 Hz, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.20, 154.45, 152.53, 146.28, 139.43, 134.18, 128.98 (2C), 123.71, 121.97 (2C), 121.95, 120.31 (2C), 117.30 (2C), 98.28, 97.89, 55.34 (2C), 50.26 (2C), 48.85, 46.19, 11.46, 4.07 (2C). ESI/MS para (C₂₇H₃₁N₇ [M+H]⁺). Calcd: 454.2714. Encontrado: 454.2719.

9-(ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9H-purin-2,6-diamina, (16b): Sólido blanco, rendimiento 54 %, pf 133 – 134 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ. ESI/MS para (C₂₀H₂₇N₈ [M+H]⁺). Calcd: 379.2356.

***N*⁶-ciclohexil-9-(ciclopropilmetil)-*N*²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9*H*-purin-2,6-diamina, (16c):** Sólido negro, rendimiento 60 %, pf 122 – 123 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.64 – 7.44 (m, 3H, 3CH), 7.07 (s, 1H, NH), 6.88 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 5.75 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 4.08 (s, 1H, CH), 3.86 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.23 – 3.07 (m, 4H, 2CH₂), 2.70 – 2.50 (m, 4H, 2CH₂), 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.19 – 2.01 (m, 2H, 2CH), 1.88 – 1.51 (m, 2H, 2CH), 1.51 – 1.07 (m, 7H, 7CH), 0.70 – 0.50 (m, 2H, CH₂), 0.38 (q, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 156.89, 154.16, 146.07, 136.81, 134.14, 119.90, 119.81 (2C), 117.09 (2C), 114.57, 55.16 (2C), 50.10 (2C), 49.41, 47.90, 46.03, 33.25, 30.88, 25.69, 25.04, 11.10, 4.19, 4.14 (2C). ESI/MS para (C₂₆H₃₆N₈ [M+H]⁺). Calcd: 461.3136.

***N*⁶-bencil-9-(ciclopropilmetil)-*N*²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9*H*-purin-2,6-diamina, (16d):** Sólido blanco, rendimiento 63 %, pf 152 – 154 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.51 – 7.41 (m, 3H, 3CH), 7.33 – 7.13 (m, 5H, 5CH), 6.88 – 6.75 (m, 3H, 2CH, NH), 6.25 (s, 1H, NH), 4.73 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, CH₂), 3.81 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.18 – 2.90 (m, 4H, 2CH₂), 2.58 – 2.46 (m, 4H, 2CH₂), 2.28 (s, 3H, CH₃), 1.33 – 1.02 (m, 1H, CH), 0.66 – 0.47 (m, 2H, CH₂), 0.34 (q, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 156.85, 154.79, 151.19, 146.25, 139.06, 137.18, 133.81, 128.53 (2C), 127.63 (2C), 127.20, 119.98 (2C), 117.05 (2C), 114.82, 55.20 (2C), 50.08 (2C), 47.98, 46.09, 44.59, 11.09, 4.22 (2C). ESI/MS para (C₂₇H₃₂N₈ [M+H]⁺). Calcd: 469.2823.

8.1.14 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 17a–h.

A una solución que contiene **4a** o **4b** (500 mg, 2.70 mmol) en DMF (20 mL) se adiciona la respectiva anilina (2.25 mmol) y TEA (4.5 mmol), luego la mezcla se deja en agitación a temperatura ambiente por 2 h. Después de completada la reacción, la mezcla se vierte en 100 mL de agua fría, se filtra al vacío y se lava con agua. El sólido se deja en estufa a 75 °C hasta sequedad para dar los compuestos **17a–h**.

3-Nitro-*N*-fenilbenzamida, (17a): Sólido blanco, rendimiento 69 %, pf 115-116 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.45 (s, 1H, NH), 8.65 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, CH), 8.30 (ddd, *J* = 8.2, 2.3, 0.9 Hz, 1H, CH), 8.26 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H, CH), 7.70 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH), 7.64 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 2CH), 7.26 (dd, *J* = 10.8, 5.1 Hz, 2H, 2CH), 7.01 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 163.51 (CO), 147.86, 138.73, 136.39, 134.25, 130.32, 128.83 (2C), 126.26, 124.33, 122.51, 120.74 (2C). ESI/MS para (C₁₃H₁₀N₂O₃ [M+H]⁺): Calculado: 243.1. Encontrado: 243.3.

***N*-(2-fluorofenil)-3-nitrobenzamida, (17b):** Sólido blanco, rendimiento 100 %, pf 118-120 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.52 (s, 1H, NH), 8.80 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, CH), 8.43 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.84 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH), 7.63 (dd, *J* = 7.8, 6.4 Hz, 1H, CH), 7.39 – 7.17 (m, 3H, 3CH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 163.42 (CO), 155.78 (d, ¹*J*_{C-F} = 247.3 Hz), 147.78, 135.31, 134.21, 130.28, 127.35 (d, ³*J*_{C-F} = 7.8 Hz), 127.16 (d, ⁴*J*_{C-F} = 1.6 Hz), 126.40, 125.21 (d, ²*J*_{C-F} = 12.3 Hz), 124.39 (d, ³*J*_{C-F} = 3.6 Hz), 122.55, 115.92 (d, ²*J*_{C-F} = 19.9 Hz). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -121.00 (s, 1F). ESI/MS para (C₁₃H₉FN₂O₃ [M+H]⁺): Calculado: 261.1. Encontrado: 260.9.

***N*-(3-fluorofenil)-4-nitrobenzamida, (17c):** Sólido blanco, rendimiento 60 %, pf 119-121 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.75 (s, 1H, NH), 8.79 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, CH), 8.43 (t, *J* = 9.8 Hz, 2H, 2CH), 7.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH), 7.80 – 7.71 (m, 1H, CH), 7.58 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, CH), 7.43 (dd, *J* = 15.0, 8.1 Hz, 1H, CH), 6.98 (td, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H, CH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 163.60 (CO), 162.03 (d, ¹*J*_{C-F} = 241.3 Hz), 147.75, 140.43 (d, ³*J*_{C-F} = 11.0 Hz), 135.95, 134.21, 130.34 (d, ³*J*_{C-F} = 9.6 Hz), 130.24, 126.35, 122.44, 116.21 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2.7 Hz), 110.61 (d, ²*J*_{C-F} = 21.1 Hz), 107.24 (d, ²*J*_{C-F} = 26.3 Hz). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -112.09 (s, 1F). ESI/MS para (C₁₃H₉FN₂O₃ [M+H]⁺): Calculado: 261.1. Encontrado: 261.0.

***N*-(4-fluorofenil)-3-nitrobenzamida, (17d):** Sólido amarillo, rendimiento 100 %, pf 119-120 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.63 (s, 1H, NH), 8.79 (s, 1H, CH), 8.43 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H, 2CH), 7.82 (m, 3H, 3CH), 7.23 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2CH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 163.24 (CO), 158.55 (d, ¹*J*_{C-F} =

240.8 Hz), 147.76, 136.12, 135.01 (d, $^4J_{C-F} = 2.7$ Hz), 134.13, 130.20, 126.19, 122.46 (d, $^3J_{C-F} = 8.1$ Hz, 2C), 122.38, 115.30 (d, $^2J_{C-F} = 22.3$ Hz, 2C). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -118.25 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FN}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 261.1. Encontrado: 260.8.

4-Nitro-*N*-fenilbenzamida, (17e): Sólido amarillo, rendimiento 100 %, pf 114-115 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.56 (s, 1H, NH), 8.38 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2CH), 8.19 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2CH), 7.79 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, 2CH), 7.39 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, 2CH), 7.15 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, CH). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 163.87 (CO), 149.13, 140.62, 138.69, 129.19 (2C), 128.70 (2C), 124.16, 123.52 (2C), 120.49 (2C). ESI/MS para ($\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 243.1. Encontrado: 243.1.

***N*-(2-fluorofenil)-4-nitrobenzamida, (17f):** Sólido amarillo, rendimiento 99 %, pf 117-118 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.48 (s, 1H, NH), 8.38 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2CH), 8.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2CH), 7.64 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, CH), 7.34 – 7.29 (m, 2H, 2CH), 7.27 – 7.22 (m, 1H, CH). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 163.93 (CO), 155.73 (d, $^1J_{C-F} = 247.3$ Hz), 149.33, 139.57, 129.32 (2C), 127.37 (d, $^3J_{C-F} = 7.7$ Hz), 127.07 (d, $^4J_{C-F} = 1.4$ Hz), 125.21 (d, $^2J_{C-F} = 12.2$ Hz), 124.39 (d, $^3J_{C-F} = 3.6$ Hz), 123.61 (2C), 115.92 (d, $^1J_{C-F} = 19.8$ Hz). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -121.00 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FN}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 261.1. Encontrado: 261.1.

***N*-(3-fluorofenil)-4-nitrobenzamida, (17g):** Sólido amarillo, rendimiento 65 %, pf 117-118 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.72 (s, 1H, NH), 8.36 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 8.17 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 7.74 (dt, $J = 11.7, 2.2$ Hz, 1H, CH), 7.56 (dd, $J = 8.2, 1.0$ Hz, 1H, CH), 7.40 (td, $J = 8.2, 6.9$ Hz, 1H, CH), 6.96 (tdd, $J = 8.6, 2.6, 0.7$ Hz, 1H, CH). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.15 (CO), 162.03 (d, $^1J_{C-F} = 241.4$ Hz), 149.26, 140.45 (d, $^3J_{C-F} = 11.0$ Hz), 140.23, 130.35 (d, $^3J_{C-F} = 9.4$ Hz), 129.26 (2C), 123.57 (2C), 116.14 (d, $^4J_{C-F} = 2.7$ Hz), 110.63 (d, $^2J_{C-F} = 21.1$ Hz), 107.15 (d, $^2J_{C-F} = 26.3$ Hz). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -112.03 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FN}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 261.1. Encontrado: 260.9.

***N*-(4-fluorofenil)-4-nitrobenzamida, (17h)**: Sólido amarillo, rendimiento 87 %, pf 119-120 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.60 (s, 1H, NH), 8.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 8.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.79 (dt, *J* = 10.5, 4.2 Hz, 2H, 2CH), 7.22 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2CH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 163.77 (CO), 158.55 (d, ¹*J*_{C-F} = 240.8 Hz), 149.17, 140.42, 135.04 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2.7 Hz), 129.17 (2C), 123.54 (2C), 122.36 (d, ³*J*_{C-F} = 7.9 Hz, 2C), 115.30 (d, ²*J*_{C-F} = 22.3 Hz, 2C). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -118.19 (s, 1F). ESI/MS para (C₁₃H₉FN₂O₃ [M+H]⁺): Calculado: 261.1. Encontrado: 261.1.

8.1.15 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 18a–h.

A una solución que contiene **17a – 17h** (3.84 mmol) en etanol (20 mL) se adiciona 10 % p/p Pd-C (70 mg) y se deja en agitación a temperatura ambiente por 10 min a presión reducida para remover el O₂ (g). Luego, se colocan dos globos con hidrógeno y la mezcla se deja agitar por 2 h. Después de completada la reacción, la mezcla se filtra sobre Celita y se lleva a sequedad para obtener las anilinas **18a–h**.

3-Amino-*N*-fenilbenzamida, (18a): Sólido café, rendimiento 99 %, pf 128-130 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.99 (s, 1H, NH), 7.70 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 2CH), 7.30 – 7.23 (m, 2H, 2CH), 7.08 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, CH), 7.05 – 7.03 (m, 1H, CH), 7.01 (td, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 2H, 2CH), 6.69 (dd, *J* = 7.8, 2.2 Hz, 1H, CH), 5.23 (s, 2H, NH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.44, 148.79, 139.40, 136.00, 128.81, 128.57 (2C), 123.44, 120.27 (2C), 116.83, 114.79, 113.02. ESI/MS para (C₁₃H₁₂N₂O [M+H]⁺): Calculado: 213.1. Encontrado: 212.6.

3-Amino-*N*-(2-fluorofenil)benzamida, (18b): Sólido plomo, rendimiento 96 %, pf 128-130 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.84 (s, 1H, NH), 7.63 – 7.49 (m, 1H), 7.31 – 7.04 (m, 1H, CH), 6.79 – 6.69 (m, 6H, 6CH), 5.28 (s, 2H, NH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.13 (CO), 155.76 (d, ¹*J*_{C-F} = 246.7 Hz), 148.82, 134.85, 128.82, 127.00 (d, ⁴*J*_{C-F} = 1.8 Hz), 126.62 (d, ³*J*_{C-F} = 7.7

Hz), 126.02 (d, $^2J_{C-F}$ = 12.2 Hz), 124.19 (d, $^3J_{C-F}$ = 3.6 Hz), 117.02, 115.72 (d, $^2J_{C-F}$ = 19.9 Hz), 114.81, 113.12. ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -121.23 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 231.1. Encontrado: 230.6.

3-Amino-*N*-(3-fluorofenil)benzamida, (18c): Sólido café, rendimiento 100 %, pf 128-130 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.24 (s, 1H, NH), 7.73 (td, J = 12.0, 2.0 Hz, 1H, CH), 7.55 (d, J = 8.9 Hz, 1H, CH), 7.34 (dd, J = 15.1, 8.1 Hz, 1H, CH), 7.14 (t, J = 7.6 Hz, 1H, CH), 7.06 (dd, J = 6.8, 5.0 Hz, 2H, 2CH), 6.88 (td, J = 8.3, 2.2 Hz, 1H, CH), 6.75 (d, J = 6.9 Hz, 1H, CH), 5.31 (s, 2H, NH_2). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.66 (CO), 162.06 (d, $^1J_{C-F}$ = 240.8 Hz), 148.81, 141.18 (d, $^3J_{C-F}$ = 11.1 Hz), 135.61, 130.12 (d, $^3J_{C-F}$ = 9.5 Hz), 128.81, 116.98, 115.81 (d, $^4J_{C-F}$ = 2.7 Hz), 114.74, 112.94, 109.77 (d, $^2J_{C-F}$ = 21.1 Hz), 106.76 (d, $^2J_{C-F}$ = 26.2 Hz). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -112.35 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 231.1. Encontrado: 230.7.

3-Amino-*N*-(4-fluorofenil)benzamida, (18d): Sólido café, rendimiento 100 %, pf 128-130 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.10 (s, 1H, NH), 7.79 (d, J = 5.1 Hz, 1H, CH), 7.74 (d, J = 5.1 Hz, 1H, CH), 7.33 (m, 5H, 5CH), 6.74 (d, J = 7.8 Hz, 1H, CH), 5.29 (s, 2H, NH_2). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.29 (CO), 158.13 (d, $^1J_{C-F}$ = 239.9 Hz), 148.78, 135.78, 135.75 (d, $^4J_{C-F}$ = 3.0 Hz), 128.76, 121.97 (d, $^3J_{C-F}$ = 7.8 Hz, 2C), 116.80, 115.07 (d, $^2J_{C-F}$ = 22.1 Hz, 2C), 114.68, 112.95. ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -119.28 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 231.1. Encontrado: 230.6.

4-Amino-*N*-fenilbenzamida, (18e): Sólido amarillo, rendimiento 98 %, pf 128-130 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.72 (s, 1H, NH), 7.73 (d, J = 7.7 Hz, 2H, 2CH), 7.70 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.32 – 7.24 (m, 2H, 2CH), 7.01 (t, J = 7.4 Hz, 1H, CH), 6.59 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2CH), 5.72 (s, 2H, NH_2). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.29 (CO), 152.12, 139.77, 129.34 (2C), 128.43 (2C), 122.87, 121.12, 120.12 (2C), 112.55 (2C). ESI/MS para ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 213.1. Encontrado: 212.8.

4-Amino-*N*-(2-fluorofenil)benzamida, (18f): Sólido café, rendimiento 100

%, pf 128-130 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.53 (s, 1H, NH), 7.69 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2CH), 7.56 (td, J = 7.7, 2.4 Hz, 1H, CH), 7.25 – 7.10 (m, 3H, 3CH), 6.57 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2CH), 5.73 (s, 2H, NH_2). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.18 (CO), 155.67 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ = 246.1 Hz), 152.32, 129.50 (2C), 126.91 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 1.8 Hz), 126.47 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 12.0 Hz), 126.09 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 7.7 Hz), 124.10 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 3.5 Hz), 120.24, 115.61 (d, 2J = 20.0 Hz), 112.59 (2C). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -121.64 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}$ $[\text{M}]^+$): Calculado: 230.2. Encontrado: 230.7.

4-Amino-*N*-(3-fluorofenil)benzamida, (18g): Sólido café, rendimiento 97 %, pf 128-130 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.92 (s, 1H, NH), 7.78 – 7.74 (m, 1H, CH), 7.70 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 2CH), 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 1H, CH), 7.30 (dd, J = 15.2, 8.1 Hz, 1H, CH), 6.82 (td, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H, CH), 6.59 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2CH), 5.77 (s, 2H, NH_2). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.47 (CO), 162.03 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ = 240.4 Hz), 152.33, 141.60 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 11.2 Hz), 129.92 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 9.5 Hz), 129.42, 120.60, 115.60 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 2.6 Hz), 112.51, 109.13 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 21.1 Hz), 106.56 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 26.3 Hz). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -112.53 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 231.1. Encontrado: 231.3.

4-Amino-*N*-(4-fluorofenil)benzamida, (18h): Sólido café, rendimiento 100 %, pf 128-130 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.80 (s, 1H, NH), 7.81 – 7.74 (m, 2H, 2CH), 7.70 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 2CH), 7.13 (t, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 6.59 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2CH), 5.74 (s, 2H, NH_2). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.21 (CO), 157.86 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ = 239.2 Hz), 152.16, 136.13 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 2.5 Hz), 129.30 (2C), 121.82 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 7.7 Hz, 2C), 120.90, 114.94 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 22.0 Hz, 2C), 112.54 (2C). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -120.00 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}$ $[\text{M}]^+$): Calculado: 230.2. Encontrado: 230.5.

8.1.16 Procedimiento para la síntesis del compuesto 4-benzilanilina, (20).

A una solución que contiene **19** (1 000 mg, 5.07 mmol) en DEG (40 mL) se adiciona hidracina monohidratada (761 mg, 15.21 mmol) y KOH (854 mg, 15.21 mmol) y se deja en agitación a reflujo toda la noche. Completada la reacción, se añade 30 mL de agua y se extrae con cloroformo (30 mL x 3), se seca con sulfato de sodio anhidro y se lleva a hasta sequedad en rotaevaporador a presión reducida para dar un sólido negro, rendimiento 82 %, 120-121 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37 – 7.29 (m, 2H, 2CH), 7.27 – 7.20 (m, 3H, 3CH), 7.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 2CH), 6.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 2CH), 3.93 (s, 2H, CH₂), 3.57 (s, 2H, NH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 144.60, 142.01, 131.21, 129.83 (2C), 128.87 (2C), 128.44 (2C), 125.92, 115.36 (2C), 41.15. ESI/MS para (C₁₃H₁₃N [M]⁺): Calculado: 183.11. Encontrado: 183.3.

8.1.17 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 21a–h.

A una solución de **2a** (300, 1.234 mmol), se añade la correspondiente anilina **18a–h** (1.234 mmol) y DIPEA (0.25 mL, 1.37 mmol) en *n*-butanol (30 mL), luego la mezcla se deja en agitación a 110 °C por 12 h. Luego de enfriar a temperatura ambiente, la reacción se concentra en rotaevaporador a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía de silica gel utilizando una fase móvil acetona/diclorometano (50:50) para obtener los productos **21a–h**.

3-((2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-il)amino)-N-fenilbenzamida, (21a): Sólido café, rendimiento 87 %, pf 115-116°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.47 (s, 1H, NH), 10.24 (s, 1H, NH), 8.39 (s, 1H, CH), 8.37 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, CH), 8.06 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H, CH), 7.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 2CH), 7.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH), 7.51 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH), 7.39 – 7.31

Comentado [4]: precursor purina

(m, 2H, 2CH), 7.09 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, CH), 4.03 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.38 – 1.25 (m, 1H, CH), 0.58 – 0.51 (m, 2H, CH₂), 0.47 – 0.42 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.60 (CO), 152.39, 152.25, 150.94, 142.32, 139.20, 139.05, 135.69, 128.62 (2C), 128.50, 124.23, 123.64, 122.39, 120.86, 120.28 (2C), 118.83, 47.70, 11.19, 3.81 (2C). ESI/MS para (C₂₂H₁₉ClN₆O [M+H]⁺): Calculado: 419.1. Encontrado: 418.8.

3-((2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-il)amino)-N-(2-

fluorofenil)benzamida, (21b): Sólido café, rendimiento 64 %, pf 125-126°C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.46 (s, 1H, NH), 10.05 (s, 1H, NH), 8.40 (s, 1H, CH), 8.37 (s, 1H, CH), 8.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, CH), 7.69 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CH), 7.63 (td, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 1H, CH), 7.50 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH), 7.32 – 7.16 (m, 3H, 3CH), 4.01 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.36 – 1.24 (m, 1H, CH), 0.56 – 0.49 (m, 2H, CH₂), 0.45 – 0.40 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.90 (CO), 156.13 (d, $^1J_{C-F} = 246.9$ Hz), 152.85, 152.73, 151.43, 142.79, 139.58, 135.07, 129.06, 127.33 (d, $^4J_{C-F} = 1.6$ Hz), 127.27 (d, $^3J_{C-F} = 8.8$ Hz), 126.30 (d, $^2J_{C-F} = 12.1$ Hz), 124.98, 124.76 (d, $^3J_{C-F} = 3.5$ Hz), 122.97, 121.48, 119.31, 116.26 (d, $^2J_{C-F} = 19.8$ Hz), 48.18, 11.67, 4.28 (2C). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -121.34 (s, 1F). ESI/MS para (C₂₂H₁₈ClFN₆O [M]⁺): Calculado: 436.1. Encontrado: 436.5.

3-((2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-il)amino)-N-(3-

fluorofenil)benzamida, (21c): Sólido blanco, rendimiento 70 %, pf 125-

126°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.49 (s, 1H, NH), 10.44 (s, 1H, NH), 8.40 (s, 1H, CH), 8.37 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H, CH), 8.08 (dd, $J = 8.1, 1.3$ Hz, 1H, CH), 7.76 (dt, $J = 11.8, 2.2$ Hz, 1H, CH), 7.66 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH), 7.57 (dd, $J = 8.2, 1.0$ Hz, 1H, CH), 7.53 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH), 7.39 (dd, $J = 15.1, 8.2$ Hz, 1H, CH), 6.93 (td, $J = 8.4, 2.4$ Hz, 1H, CH), 4.03 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 1.39 – 1.26 (m, 1H, CH), 0.59 – 0.52 (m, 2H, CH₂), 0.48 – 0.41 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.34 (CO), 162.55 (d, $^1J_{C-F} = 241.0$ Hz), 152.84, 152.70, 151.43, 142.82, 141.44 (d, $^3J_{C-F} = 11.0$ Hz), 139.61, 135.79, 130.73 (d, $^3J_{C-F} = 9.5$ Hz), 129.05, 124.90, 122.87, 121.30, 119.32, 116.37 (d, $^4J_{C-F} = 2.6$ Hz), 110.55 (d, $^2J_{C-F} = 21.0$ Hz), 107.35 (d, $^2J_{C-F} = 26.3$

Hz), 48.18, 11.66, 4.28 (2C). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -112.20 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{ClFN}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 437.1. Encontrado: 436.8.

3-((2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-il)amino)-N-(4-

fluorofenil)benzamida, (21d): Sólido blanco, rendimiento 41 %, pf 125-

126°C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.49 (s, 1H, NH), 10.32 (s, 1H, NH), 8.41 (s, 1H, CH), 8.39 (t, J = 1.8 Hz, 1H, CH), 8.08 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H, CH), 7.81 (dd, J = 9.2, 5.1 Hz, 2H, 2CH), 7.68 (d, J = 7.9 Hz, 1H, CH), 7.53 (t, J = 7.9 Hz, 1H, CH), 7.21 (t, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 4.05 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 1.40 – 1.28 (m, 1H, CH), 0.60 – 0.53 (m, 1H, CH_2), 0.49 – 0.44 (m, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.50 (CO), 158.28 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ = 240.2 Hz), 152.38, 152.24, 150.95, 142.33, 139.09, 135.55 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 2.6 Hz), 135.49, 128.52, 124.28, 122.34, 122.08 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 7.9 Hz, 2C), 120.84, 118.83, 115.19 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 22.2 Hz, 2C), 47.70, 11.19, 3.81 (2C). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -118.91 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{ClFN}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 437.1. Encontrado: 436.9.

4-((2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-il)amino)-N-fenilbenzamida,

(21e): Sólido café, rendimiento 68 %, pf 130-131°C. ^1H NMR (400 MHz,

DMSO) δ 10.58 (s, 1H, NH), 10.11 (s, 1H, NH), 8.42 (s, 1H, CH), 8.03 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.96 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.78 (d, J = 7.8 Hz, 2H, 2CH), 7.33 (t, J = 7.9 Hz, 2H, 2CH), 7.07 (t, J = 7.4 Hz, 1H, CH), 4.03 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 1.38 – 1.25 (m, 1H, CH), 0.58 – 0.52 (m, 2H, CH_2), 0.47 – 0.42 (m, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.97 (CO), 152.11, 152.03, 151.09, 142.57, 142.00, 139.34, 129.17, 128.57 (2C), 128.30 (2C), 123.45, 120.24 (2C), 120.09 (2C), 119.08, 47.74, 11.18, 3.82 (2C). ESI/MS para ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{ClN}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 419.1. Encontrado: 419.0.

4-((2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-il)amino)-N-(2-

fluorofenil)benzamida, (21f): Sólido café, rendimiento 59 %, pf 135-137°C.

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.60 (s, 1H, NH), 9.98 (s, 1H, NH), 8.44 (s, 1H, CH), 8.04 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.99 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.63 (td, J = 7.8, 1.8 Hz, 1H, CH), 7.32 – 7.19 (m, 3H, 3CH), 4.04 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 1.38 – 1.27 (m, 1H, CH), 0.59 – 0.53 (m, 2H, CH_2), 0.46 (q, J = 4.9

Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.84 (CO), 155.72 (d, ¹J_{C-F} = 246.7 Hz), 152.09, 152.02, 151.10, 142.59, 142.25, 128.43, 128.14 (2C), 127.03 (d, ⁴J_{C-F} = 1.6 Hz), 126.69 (d, ³J_{C-F} = 7.6 Hz), 125.93 (d, ²J_{C-F} = 12.1 Hz), 124.24 (d, ³J_{C-F} = 3.6 Hz), 120.08 (2C), 119.10, 115.76 (d, ²J_{C-F} = 19.9 Hz), 47.74, 11.17, 3.82 (2C). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -121.28 (s, 1F). ESI/MS para (C₂₂H₁₈ClFN₆O [M+H]⁺): Calculado: 437.1.

4-((2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-il)amino)-N-(3-fluorofenil)benzamida, (21g): Sólido blanco, rendimiento 38 %, pf 135-137°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.60 (s, 1H, NH), 10.30 (s, 1H, NH), 8.43 (s, 1H, CH), 8.05 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.97 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.78 (dt, J = 11.9, 2.1 Hz, 1H, CH), 7.57 (d, J = 8.2 Hz, 1H, CH), 7.37 (dd, J = 15.2, 8.2 Hz, 1H, CH), 6.90 (td, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H, CH), 4.04 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.36 - 1.29 (m, 1H, CH), 0.58 - 0.52 (m, 2H, CH₂), 0.46 (q, J = 4.8 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.70 (CO), 162.55 (d, ¹J_{C-F} = 240.8 Hz), 152.56, 152.47, 151.58, 143.06, 142.72, 141.62 (d, ³J_{C-F} = 11.1 Hz), 130.64 (d, ³J_{C-F} = 9.5 Hz), 129.21, 128.85 (2C), 120.56 (2C), 119.58, 116.29 (d, ⁴J_{C-F} = 2.5 Hz), 110.31 (d, ²J_{C-F} = 21.1 Hz), 107.26 (d, ²J_{C-F} = 26.3 Hz), 48.21, 11.65, 4.29 (2C). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -112.25 (s, 1F). ESI/MS para (C₂₂H₁₈ClFN₆O [M+H]⁺): Calculado: 437.1. Encontrado: 437.0.

4-((2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-9H-purin-6-il)amino)-N-(4-fluorofenil)benzamida, (21h): Sólido amarillo, rendimiento 65 %, pf 135-137°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.58 (s, 1H, NH), 10.17 (s, 1H, NH), 8.43 (s, 1H, CH), 8.03 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.96 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.80 (dd, J = 9.2, 5.1 Hz, 2H, 2CH), 7.18 (t, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 4.04 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.37 - 1.27 (m, 1H, CH), 0.59 - 0.52 (m, 2H, CH₂), 0.48 - 0.42 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.89 (CO), 158.18 (d, ¹J_{C-F} = 239.9 Hz), 152.10, 152.02, 151.09, 142.57, 142.05, 135.70 (d, ⁴J_{C-F} = 2.5 Hz), 128.97, 128.27 (2C), 122.01 (d, ³J_{C-F} = 7.8 Hz, 2C), 120.10 (2C), 119.09, 115.13 (d, ²J_{C-F} = 22.1 Hz, 2C), 47.74, 11.18, 3.82 (2C). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -119.16 (s, 1F). ESI/MS para (C₂₂H₁₈ClFN₆O [M+H]⁺): Calculado: 437.1.

8.1.18 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 22a–e.

A una solución de **2a** (300, 1.234 mmol), se añade la correspondiente anilina comercial o **20** (1.851 mmol) y DIPEA (0.5 mL, 2.4 mmol) en *n*-butanol (30 mL), luego la mezcla se deja en agitación a 110 °C por 12 h. Luego de enfriar a temperatura ambiente, la reacción se concentra en rotaevaporador a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía de silica gel utilizando una fase móvil acetona/diclorometano (20:80) para obtener los productos **22a–e**.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-N-(4-fenoxifenil)-9H-purin-6-amina, (22a):

Sólido café, rendimiento 69 %, pf 146-147°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (s, 1H, NH), 7.90 (s, 1H, CH), 7.73 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 7.33 (dd, *J* = 8.6, 7.5 Hz, 2H, 2CH), 7.09 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH), 7.04 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, 2CH), 7.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2CH), 4.03 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.33 (tdt, *J* = 7.5, 4.7, 3.7 Hz, 1H, CH), 0.69 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 157.63, 154.23, 153.57, 152.44, 150.83, 140.54, 133.69, 129.86 (2C), 123.26, 122.06 (2C), 119.74 (2C), 119.14, 118.72 (2C), 48.79, 11.19, 4.49 (2C). ESI/MS para (C₂₁H₁₈ClN₅O [M+H]⁺): Calculado: 392.1. Encontrado: 391.1.

2-Cloro-9-(ciclopropilmetil)-N-(4-(4-nitrofenoxi)fenil)-9H-purin-6-amina, (22b):

Sólido amarillo, rendimiento 76 %, pf 149-150°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, 2CH), 7.96 (s, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, CH), 7.85 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.12 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.04 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, 2CH), 4.05 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.34 (dt, *J* = 9.6, 7.5, 3.8 Hz, 1H, CH), 0.70 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 0.47 (q, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 163.68, 154.12, 152.26, 151.00, 150.70, 142.76, 140.84, 135.67, 126.09 (2C), 122.06 (2C), 121.42 (2C), 119.29, 117.05 (2C), 48.87, 11.21, 4.53 (2C). ESI/MS para (C₂₁H₁₇ClN₆O₃ [M+H]⁺): Calculado: 437.1.

Encontrado: 437.0.

***N*¹-(2-cloro-9-(ciclopropilmetil)-9*H*-purin-6-il)-*N*⁴-fenilbenzen-1,4-**

diamina, (22c): Sólido negro, rendimiento 79 %, pf 146-147 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.09 (s, 1H, NH), 8.30 (s, 1H, NH), 8.08 (s, 1H, CH), 7.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.19 (dd, *J* = 8.4, 7.4 Hz, 2H, 2CH), 7.06 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.03 (dd, *J* = 8.5, 0.9 Hz, 2H, 2CH), 6.76 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, CH), 3.99 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.36 – 1.21 (m, 1H, CH), 0.55 – 0.49 (m, 2H, CH₂), 0.45 – 0.40 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 152.50, 152.47, 150.48, 143.92, 141.66, 139.36, 131.27, 129.15 (2C), 122.85 (2C), 119.14, 118.50, 117.39 (2C), 115.99 (2C), 47.61, 11.23, 3.80 (2C). ESI/MS para (C₂₁H₁₉ClN₆ [M+H]⁺): Calculado: 391.1. Encontrado: 390.0.

***4*-(2-cloro-9-(ciclopropilmetil)-9*H*-purin-6-**

il)amino)fenil)(fenil)metanona, (22d): Sólido blanco, rendimiento 47 %, pf 156-157 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.70 (s, 1H, NH), 8.45 (s, 1H, CH), 8.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2CH), 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 2CH), 7.68 – 7.63 (m, 1H, CH), 7.55 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2CH), 4.04 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.43 – 1.24 (m, 1H, CH), 0.59 – 0.52 (m, 2H, CH₂), 0.46 (q, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 194.49 (CO), 152.01, 151.87, 151.20, 143.37, 142.76, 137.59, 132.18, 131.11, 130.81 (2C), 129.38 (2C), 128.46 (2C), 119.83 (2C), 119.25, 47.76, 11.16, 3.82 (2C). ESI/MS para (C₂₂H₁₈ClN₅O [M+H]⁺): Calculado: 404.1. Encontrado: 404.1.

***N*-(4-benzilfenil)-2-cloro-9-(ciclopropilmetil)-9*H*-purin-6-amina, (22e):**

Sólido negro, rendimiento 96 %, pf 146-147 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.21 (s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, CH), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2CH), 7.31 – 7.16 (m, 7H, 7CH), 4.01 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 3.91 (s, 2H, CH₂), 1.36 – 1.24 (m, 1H, CH), 0.57 – 0.51 (m, 2H, CH₂), 0.46 – 0.41 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 154.17, 152.44, 150.79, 141.18, 140.53, 137.06, 136.25, 129.61 (2C), 129.03 (2C), 128.59 (2C), 126.21 (2C), 120.59 (2C), 48.73, 41.48, 11.15, 4.46 (2C). ESI/MS para (C₂₂H₂₀ClN₅ [M+H]⁺): Calculado: 390.1. Encontrado: 391.1.

8.1.19 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos finales 23a–h

A una solución de **21a–h** (0.343 mmol) y **6** (66 mg, 0.343 mmol) en dioxano (2 mL), se agrega Pd(OAc)₂ (20 mg, 0.07 mmol), Xantphos (100 mg, 0.14 mmol) y 2 M K₂CO₃ (aq) (0.4 mL, 0.8 mmol) y se colocan a agitar a 100 °C en un reactor microondas. Después de enfriar la reacción a temperatura ambiente, la mezcla se filtra en Celita y se lava con 100 mL agua destilada. La mezcla se extrae con acetato de etilo, las fases se separan y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra por pliegues y se concentra el líquido hasta sequedad en rotaevaporador a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía de silica gel utilizando una fase móvil metanol/diclorometano (10:90) para obtener los productos **23a–h**.

3-((9-(ciclopropilmetil)-2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-

purin-6-il)amino)-N-fenilbenzamida, (23a): Sólido naranja, rendimiento 93 %, pf 260-262 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.23 (s, 1H, NH), 9.74 (s, 1H, NH), 8.86 (s, 1H, NH), 8.33 (s, 1H, CH), 8.12 (d, J = 7.2 Hz, 1H, CH), 8.02 (s, 1H, CH), 7.80 (d, J = 7.6 Hz, 2H, 2CH), 7.58 (d, J = 9.1 Hz, 3H, 3CH), 7.44 (t, J = 7.9 Hz, 1H, 2CH), 7.38 – 7.30 (m, 2H, 2CH), 7.08 (t, J = 7.4 Hz, 1H, CH), 6.76 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 3.95 (d, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 2.97 – 2.89 (m, 4H, 2CH₂), 2.41 – 2.34 (m, 4H, 2CH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃), 1.33 (dq, J = 15.1, 7.4, 4.9 Hz, 1H, CH), 0.55 (q, J = 4.8 Hz, CH₂), 0.45 (q, J = 4.9 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.91 (CO), 156.20, 151.95, 151.54, 145.55, 139.90, 139.35, 138.97, 135.55, 133.51, 128.57 (2C), 128.36, 124.03, 123.49, 121.52, 120.71, 120.08 (2C), 119.84 (2C), 115.80 (2C), 114.54, 54.72 (2C), 48.92 (2C), 47.02, 45.79, 39.52, 11.35, 3.74 (2C). ESI/MS para (C₃₃H₃₅N₉O [M+H]⁺): Calculado: 574.3037.

3-((9-(Ciclopropilmetil)-2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-

purin-6-il)amino)-N-(2-fluorofenil)benzamida, (23b): Sólido amarillo,

rendimiento 82 %, pf 266-267 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.49 (s, 1H, CH), 8.47 (td, $J = 8.1$ Hz, 1H, CH), 8.20 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, NH), 8.03 (s, 1H, NH), 7.77 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH), 7.70 (s, 1H, CH), 7.57 (d, $J = 8.8$ Hz, 3H, 3CH), 7.39 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH), 7.18 (dd, $J = 11.8, 4.9$ Hz, 1H, CH), 7.13 – 7.04 (m, 3H, 2CH, 1NH), 6.89 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2CH), 3.93 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.18 – 3.08 (m, 4H, 2 CH_2), 2.67 – 2.49 (m, 4H, 2 CH_2), 2.38 (s, 3H, CH_3), 1.31 (tdd, $J = 7.5, 6.2, 3.7$ Hz, 1H, CH), 0.66 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2), 0.45 (q, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 165.32 (CO), 156.53, 152.77 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 242.7$ Hz), 151.90, 151.51, 146.55, 139.79, 138.12, 135.10, 133.24, 129.36, 126.62 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 9.8$ Hz), 124.73 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3.5$ Hz), 124.43 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 7.7$ Hz), 123.34, 121.82, 121.49, 120.59 (2C), 118.45, 116.97 (2C), 115.27, 114.80 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 19.2$ Hz), 55.10 (2C), 49.75 (2C), 48.18, 45.98, 11.05, 4.31 (2C). ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -131.17 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{FN}_9\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 592.2943.

3-((9-(Ciclopropilmetil)-2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-purin-6-il)amino)-N-(3-fluorofenil)benzamida, (23c): Sólido café, rendimiento 64 %, pf 266-267 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.36 (s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, CH), 8.11 (s, 1H, NH), 7.66 (s, 1H, CH), 7.64 (dd, $J = 10.5, 1.2$ Hz, 1H, CH), 7.51 (d, $J = 8.9$ Hz, 3H, 3CH), 7.46 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, CH), 7.29 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH), 7.36 (s, 1H, NH), 7.23 – 7.19 (m, 2H, 2CH), 6.82 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2CH), 6.80 – 6.75 (m, 1H, CH), 3.88 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.15 – 3.03 (m, 4H, 2 CH_2), 2.66 – 2.54 (m, 4H, 2 CH_2), 2.35 (s, 3H, CH_3), 1.37 – 1.18 (m, 1H, CH), 0.65 (q, $J = 5.9$ Hz, 2H, CH_2), 0.42 (q, $J = 4.9$ Hz, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 165.99 (CO), 163.00 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 244.2$ Hz), 156.55, 151.87, 151.64, 146.59, 139.83 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 10.9$ Hz), 139.51, 138.25, 135.34, 133.41, 130.02 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 9.3$ Hz), 129.32, 123.52, 122.04, 120.38 (2C), 118.85, 117.15 (2C), 115.65 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2.8$ Hz), 115.19, 111.05 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21.4$ Hz), 107.74 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 26.3$ Hz), 55.08 (2C), 49.59 (2C), 48.25, 45.94, 11.12, 4.41 (2C). ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -111.60 (s, 1F). ESI/MS para ($\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{FN}_9\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): Calculado: 592.2943.

3-((9-(Ciclopropilmetil)-2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-

purin-6-il)amino)-N-(4-fluorofenil)benzamida, (23d): Sólido amarillo, rendimiento 59 %, pf 278-279 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.59 (s, 1H, NH), 8.20 (s, 1H, NH), 8.18 (s, 1H, CH), 7.63 (d, J = 7.3 Hz, 1H, CH), 7.60 (s, 1H, CH), 7.51 – 7.47 (m, 5H, 4CH, NH), 7.44 (d, J = 8.1 Hz, 1H, CH), 7.16 (t, J = 7.9 Hz, 1H, CH), 6.90 (t, J = 8.6 Hz, 2H, 2CH), 6.80 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2CH), 3.81 (d, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.08 – 3.01 (m, 4H, CH₂), 2.55 – 2.48 (m, 4H, CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃), 1.27 – 1.18 (m, 1H, CH), 0.59 (q, J = 5.6 Hz, 2H, CH₂), 0.36 (q, J = 4.8 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.05 (CO), 159.33 (d, ¹J_{C-F} = 243.3 Hz), 156.49, 151.80, 151.46, 146.57, 139.34, 138.14, 135.33, 134.34 (d, ⁴J_{C-F} = 2.6 Hz), 133.31, 128.98, 123.36, 122.28 (d, ³J_{C-F} = 7.7 Hz, 2C), 121.90, 120.29 (2C), 118.85, 116.91 (2C), 115.38 (d, ²J_{C-F} = 22.3 Hz, 2C), 115.04, 55.16 (2C), 49.77 (2C), 48.12, 46.10, 11.01, 4.33 (2C). ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃) δ -118.14 (s, 1F). ESI/MS para (C₃₃H₃₄FN₉O [M+H]⁺): Calculado: 592.2943.

4-((9-(ciclopropilmetil)-2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-purin-6-il)amino)-N-fenilbenzamida, (23e): Sólido verde, rendimiento 43 %, pf 260-262 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (s, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, NH), 7.77 (q, J = 8.9 Hz, 4H, 4CH), 7.67 (d, J = 5.9 Hz, 2H, 2CH), 7.65 (s, 1H, CH), 7.54 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.34 (t, J = 7.9 Hz, 2H, 2CH), 7.11 (dd, J = 11.8, 4.2 Hz, 1H, CH), 7.09 (s, 1H, NH), 6.93 (d, J = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 3.91 (d, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.23 – 3.16 (m, 4H, 2CH₂), 2.66 – 2.57 (m, 4H, 2CH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃), 1.34 – 1.25 (m, 1H, CH), 0.65 (q, J = 4.9 Hz, CH₂), 0.43 (q, J = 5.0 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 165.47 (CO), 156.79, 151.69, 147.00, 142.66, 138.41, 138.34, 133.16, 129.14 (2C), 128.60, 128.16 (2C), 124.37, 121.24 (2C), 120.36 (2C), 119.25 (2C), 117.05 (2C), 115.57, 77.16, 55.24 (2C), 49.96 (2C), 48.30, 46.14, 11.14, 4.43 (2C). ESI/MS para (C₃₃H₃₅N₉O [M+H]⁺): Calculado: 574.3037.

4-((9-(Ciclopropilmetil)-2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-purin-6-il)amino)-N-(2-fluorofenil)benzamida, (23f): Sólido blanco, rendimiento 64 %, pf 266-267 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.47 (td, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H, CH), 8.10 (s, 1H, NH), 8.06 (d, J = 3.2 Hz, 1H, NH), 7.90 (d,

$J = 8.7$ Hz, 2H, 2CH), 7.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2CH), 7.71 (s, 1H, CH), 7.55 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 7.17 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, CH), 7.14 – 7.03 (m, 2H, 2CH), 7.01 (s, 1H, NH), 6.95 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2CH), 3.95 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.28 – 3.11 (m, 4H, 2CH₂), 2.71 – 2.61 (m, 4H, 2CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃), 1.32 (dq, $J = 15.1, 7.5, 4.9$ Hz, 1H, CH), 0.68 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 165.04 (CO), 156.85, 152.82 (d, $^1J_{C-F} = 242.5$ Hz), 151.75, 151.70, 147.07, 143.07, 138.37, 133.08, 128.25 (2C), 128.17 (d, $^2J_{C-F} = 17.2$ Hz), 126.89 (d, $^3J_{C-F} = 9.9$ Hz), 124.81 (d, $^4J_{C-F} = 3.6$ Hz), 124.33 (d, $^3J_{C-F} = 7.7$ Hz), 121.91, 121.36 (2C), 119.37 (2C), 117.04 (2C), 115.63, 114.89 (d, $^2J_{C-F} = 19.3$ Hz), 55.24 (2C), 49.93 (2C), 48.32, 46.14, 11.19, 4.44 (2C). ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -131.44 (s, 1F). ESI/MS para (C₃₃H₃₄FN₉O [M+H]⁺): Calculado: 592.2943.

4-((9-(Ciclopropilmetil)-2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-purin-6-il)amino)-N-(3-fluorofenil)benzamida, (23g): Sólido amarillo, rendimiento 69 %, pf 266-267 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (s, 1H, NH), 8.01 (s, 1H, NH), 7.82 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2CH), 7.77 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2CH), 7.70 (s, 1H, CH), 7.64 (dd, $J = 11.0, 2.0$ Hz, 1H, CH), 7.53 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 7.33 – 7.26 (m, 2H, 2CH), 7.02 (s, 1H, NH), 6.94 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 6.82 (ddd, $J = 8.2, 3.2, 1.6$ Hz, 1H, CH), 3.93 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.33 – 3.16 (m, 4H, 2CH₂), 2.69 – 2.61 (m, 4H, 2CH₂), 2.39 (s, 3H, CH₃), 1.39 – 1.25 (m, 1H, CH), 0.67 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H, CH₂), 0.44 (q, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 165.47 (CO), 163.18 (d, $^1J_{C-F} = 244.7$ Hz), 156.83, 151.70, 151.66, 146.98, 142.92, 139.96, 138.35, 133.20, 130.18 (d, $^3J_{C-F} = 9.5$ Hz), 128.26 (2C), 128.21 (d, $^3J_{C-F} = 8.6$ Hz), 121.42 (2C), 119.26 (2C), 117.15 (2C), 115.60, 115.52 (d, $^4J_{C-F} = 2.8$ Hz), 111.03 (d, $^2J_{C-F} = 21.5$ Hz), 107.74 (d, $^2J_{C-F} = 26.4$ Hz), 55.19 (2C), 49.88 (2C), 48.34, 46.02, 11.17, 4.46 (2C). ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -111.47 (s, 1F). ESI/MS para (C₃₃H₃₄FN₉O [M+H]⁺): Calculado: 592.2943.

4-((9-(Ciclopropilmetil)-2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-purin-6-il)amino)-N-(4-fluorofenil)benzamida, (23h): Sólido amarillo, rendimiento 93 %, pf 278-279 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.51 (s, 1H,

NH), 8.30 (s, 1H, NH), 7.69 – 7.63 (m, 4H, 4CH), 7.63 (s, 1H, CH), 7.60 (dd, $J = 8.7, 5.0$ Hz, 2H, 2CH), 7.50 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2CH), 7.33 (s, 1H, NH), 6.93 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2CH), 6.88 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 3.85 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH₂), 3.20 – 3.09 (m, 4H, 2CH₂), 2.65 – 2.50 (m, 4H, 2CH₂), 2.32 (s, 3H, CH₃), 1.26 – 1.17 (m, 1H, CH), 0.60 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH₂), 0.38 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 165.69 (CO), 159.28 (d, $^1J_{C-F} = 243.2$ Hz), 156.68, 151.55, 151.46, 146.78, 142.64, 138.12 (2C), 134.57 (d, $^4J_{C-F} = 2.4$ Hz), 133.17, 128.12 (2C), 122.33 (d, $^3J_{C-F} = 7.8$ Hz, 2C), 121.04 (2C), 119.07 (2C), 116.91 (2C), 115.43 (d, $^2J_{C-F} = 22.4$ Hz, 2C), 115.15, 55.13 (2C), 49.85 (2C), 48.19, 46.03, 10.99, 4.34 (2C). ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃) δ -118.31 (s, 1F). ESI/MS para (C₃₃H₃₄FN₉O [M+H]⁺): Calculado: 592.2943.

8.1.20 Procedimiento general para la síntesis de los compuestos finales 24a–e

A una solución de **22a–e** (0.4 mmol) y **6** (73 mg, 0.4 mmol) en dioxano (2 mL), se agrega Pd(OAc)₂ (22 mg, 0.08 mmol), Xantphos (110 mg, 0.16 mmol) y 2 M K₂CO₃ (aq) (0.4 mL, 0.8 mmol) y se colocan a agitar a 100 °C en un reactor microondas. Después de enfriar la reacción a temperatura ambiente, la mezcla se filtra en Celita y se lava con 100 mL agua destilada. La mezcla se extrae con acetato de etilo, las fases se separan y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra por pliegues y se concentra el líquido hasta sequedad en rotaevaporador a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía de silica gel utilizando una fase móvil metanol/diclorometano (10:90) para obtener los productos **24a–e**.

9-(Ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-N⁶-(4-fenoxifenil)-

9H-purina-2,6-diamina, (24a): Sólido café, rendimiento 63 %, pf 295-297 °C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (s, 1H, NH), 7.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, 2CH), 7.69 (s, 1H, CH), 7.54 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 7.32 (dd, $J = 8.4, 7.5$ Hz, 2H,

2CH), 7.07 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, CH), 7.01 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, 2CH), 6.99 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 6.95 (s, 1H, NH), 6.90 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2CH), 3.94 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂), 3.22 – 3.09 (m, 4H, 2CH₂), 2.63 – 2.55 (m, 4H, 2CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃), 1.32 (ddd, $J = 12.6, 7.7, 5.1$ Hz, 1H, CH), 0.67 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H, CH₂), 0.45 (q, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.03, 156.89, 152.61, 152.28, 151.41, 146.77, 137.91, 134.81, 133.41, 129.81 (2C), 122.96 (2C), 122.11 (2C), 120.92 (2C), 119.77 (2C), 118.39 (2C), 117.05, 115.27, 55.27 (2C), 50.04 (2C), 48.25, 46.18, 11.21, 4.42 (2C). ESI/MS para (C₃₂H₃₄N₈O [M+H]⁺): Calculado: 547.2928. Encontrado: Pendiente

9-(Ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-N⁶-(4-nitrofenoxi)fenil)-9H-purina-2,6-diamina, (24b): Sólido amarillo, rendimiento 58 %, pf 301-302 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.82 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.72 (s, 1H, CH), 7.70 (s, 1H, NH), 7.54 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.05 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.03 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.88 (s, 1H, NH), 3.96 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.19 – 3.13 (m, 4H, 2CH₂), 2.60 – 2.54 (m, 4H, 2CH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃), 1.40 – 1.27 (m, 1H, CH), 0.69 (q, $J = 5.9$ Hz, 2H, CH₂), 0.47 (q, $J = 4.9$ Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 163.94, 156.92, 152.08, 151.57, 149.82, 147.06, 142.61, 138.11, 136.74, 133.18, 126.06 (2C), 122.00 (2C), 121.20 (2C), 121.14 (2C), 117.00 (2C), 116.85 (2C), 115.32, 55.29 (2C), 50.10 (2C), 48.30, 46.24, 11.21, 4.44 (2C). ESI/MS para (C₃₂H₃₃N₉O₃ [M+H]⁺): Calculado: 592.2779.

9-(Ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-N⁶-(4-fenilamino)fenil)-9H-purina-2,6-diamina, (24c): Sólido negro, rendimiento 78 %, pf 291-292 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.01 (s, 1H, NH), 7.69 (s, 1H, CH), 7.60 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2CH), 7.57 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, CH), 7.24 – 7.22 (m, 3H, 2CH, NH), 7.05 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2CH), 7.02 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2CH), 6.92 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2CH), 6.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, CH), 3.93 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂), 3.26 – 3.09 (m, 4H, 2CH₂), 2.71 – 2.57 (m, 4H, 2CH₂), 2.38 (s, 3H, CH₃), 1.35 – 1.25 (m, 1H, CH), 0.66 (q, $J = 6.0$ Hz, 2H,

CH₂), 0.44 (q, *J* = 4.8 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 156.85, 152.33, 151.18, 146.47, 144.09, 138.50, 137.65, 133.59, 132.98, 129.32 (2C), 122.08 (2C), 120.70 (2C), 120.15, 119.37 (2C), 117.00 (2C), 116.71 (2C), 115.09, 55.14 (2C), 49.94 (2C), 48.09, 46.03, 11.10, 4.31 (2C). ESI/MS for (C₃₂H₃₅N₉ [M+H]⁺). Calculado: 546.3088.

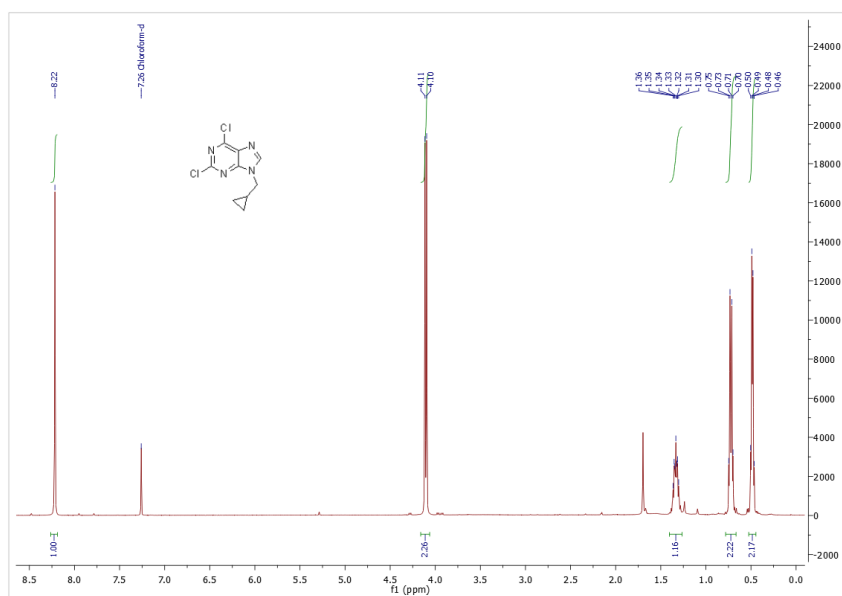
(4-((9-(Ciclopropilmetil)-2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-purin-6-il)amino)fenil)(fenil)metanona, (24d): Sólido café, rendimiento 81 %, pf 275-276 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.51 (s, 1H, NH), 7.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 2CH), 7.74 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, 2CH), 7.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2CH), 7.69 (s, 1H, CH), 7.53 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, CH), 7.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2CH), 7.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2CH), 7.22 (s, 1H, NH), 6.91 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, CH), 3.90 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.18 – 3.09 (m, 3H, 2CH₂), 2.61 – 2.52 (m, 4H, 2CH₂), 2.34 (s, 3H, CH₃), 1.26 (dd, *J* = 13.6, 6.0 Hz, 1H, CH), 0.63 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH₂), 0.42 (q, *J* = 4.8 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 195.59, 156.81, 151.70, 151.59, 146.98, 143.65, 138.32 (2C), 133.00, 131.91 (2C), 131.62 (2C), 131.20, 129.82 (2C), 128.21 (2C), 121.35, 118.76 (2C), 116.90 (2C), 115.48, 55.14 (2C), 49.85 (2C), 48.21, 46.10, 11.06, 4.36 (2C). ESI/MS para (C₃₃H₃₄N₈O [M+H]⁺): Calculado: 559.2928.

N⁶-(4-benzilfenil)-9-(ciclopropilmetil)-N²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9H-purina-2,6-diamina, (24e): Sólido café, rendimiento 57 %, pf 260-262 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (s, 1H, CH), 7.70 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 2CH), 7.64 (s, 1H, NH), 7.59 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 7.37 – 7.29 (m, 3H, 3CH), 7.25 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2CH), 7.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 2CH), 6.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2CH), 6.92 (s, 1H, NH), 4.02 (s, 2H, CH₂), 3.98 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.24 – 3.17 (m, 4H, 2CH₂), 2.67 – 2.61 (m, 4H, 2CH₂), 2.41 (s, 3H, CH₃), 1.36 (dtd, *J* = 15.1, 7.5, 2.6 Hz, 1H, CH), 0.71 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 0.49 (q, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 156.79, 152.27, 151.30, 146.46, 141.43, 137.83, 137.18, 135.92, 133.65, 129.34 (2C), 129.00 (2C), 128.52 (2C), 126.11, 120.73 (2C), 120.64 (2C), 117.19 (2C), 115.34, 55.15 (2C), 49.88 (2C), 48.19, 45.97, 41.44, 11.17, 4.38 (2C). ESI/MS para (C₃₃H₃₆N₈ [M+H]⁺): Calculado: 541.3136.

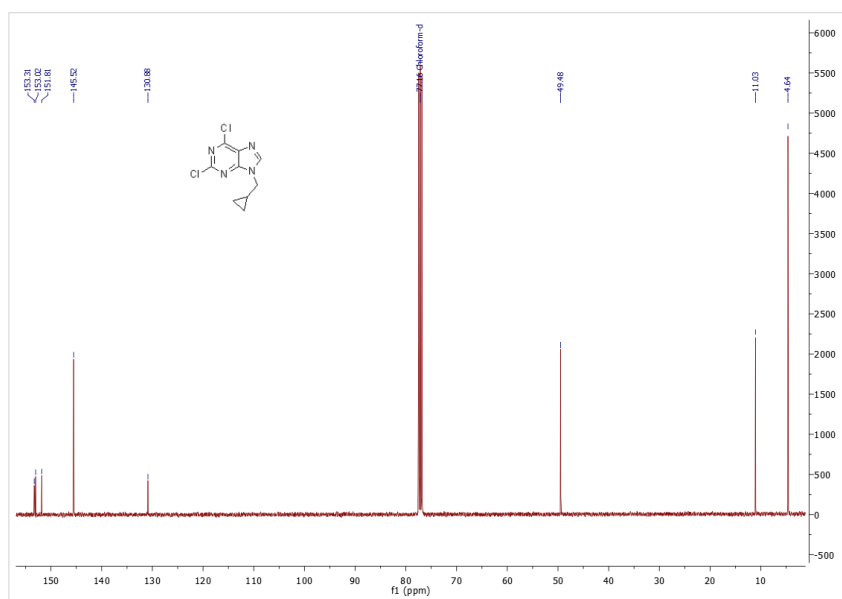
Espectros de ^1H , ^{13}C y ^{19}F RMN

8.1.21 Espectros RMN de los derivados 2a–e

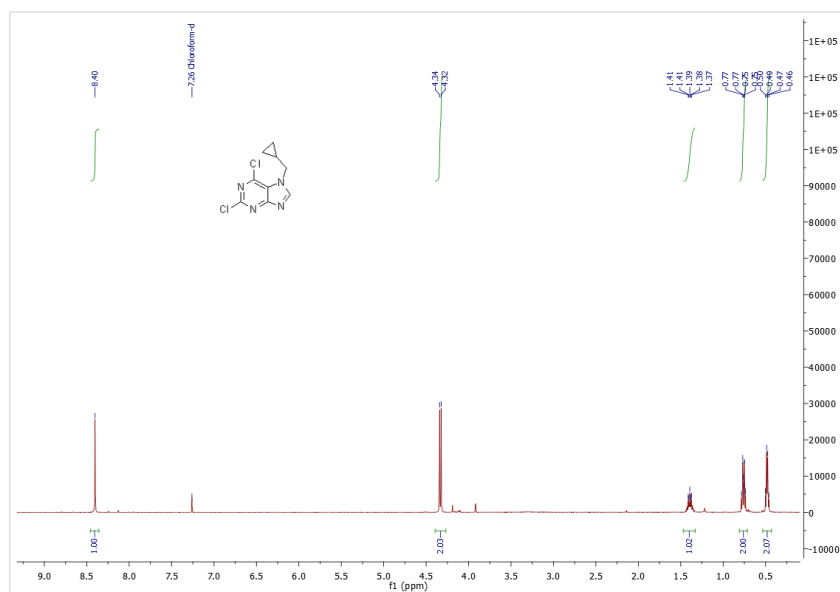
Espectro de ^1H RMN del compuesto 2a



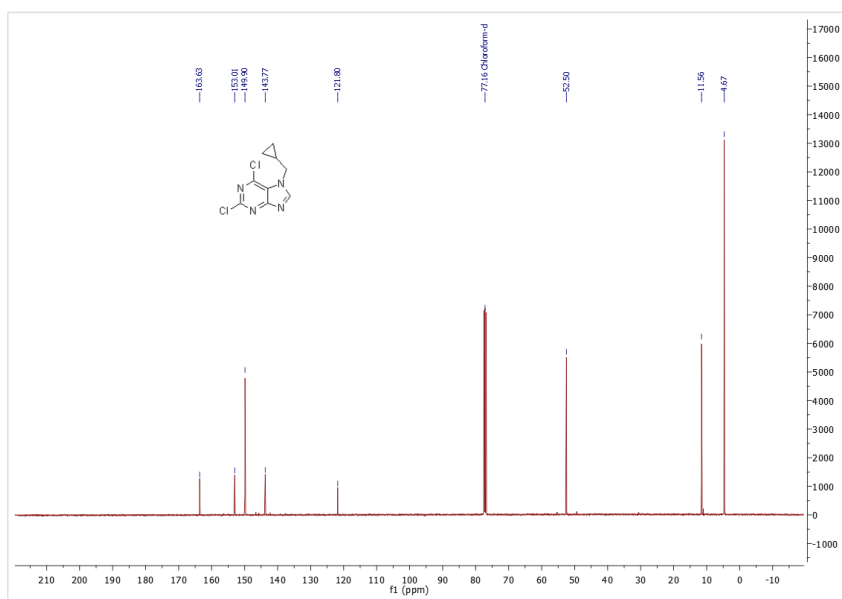
Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **2a**



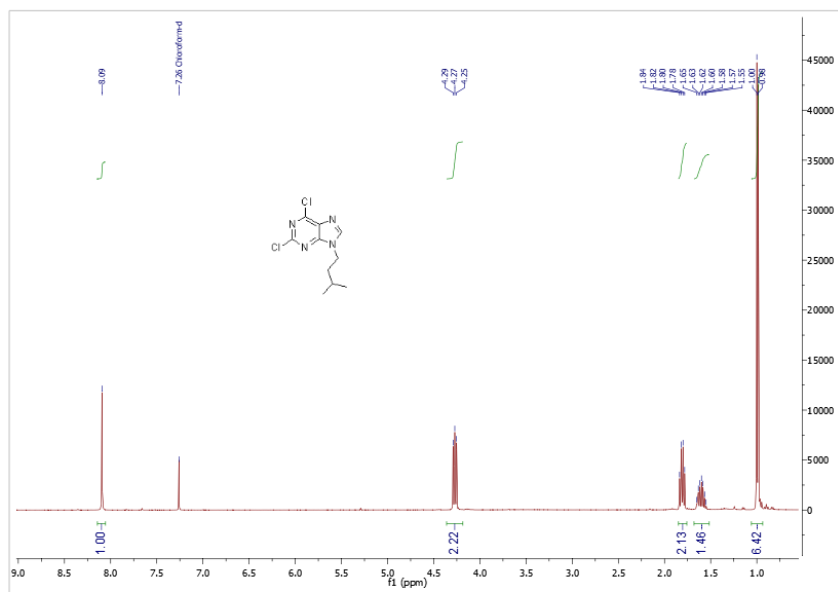
Espectro de ^1H RMN del compuesto **2a'**



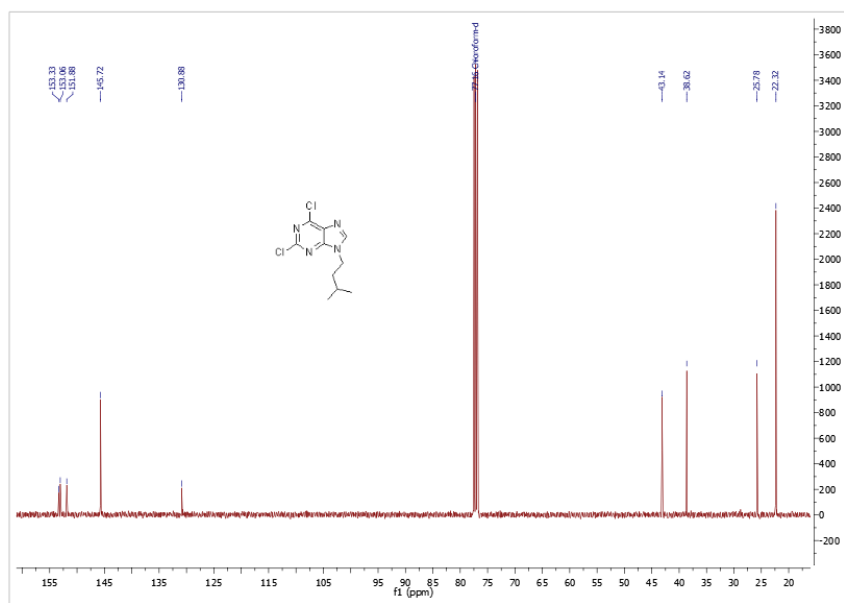
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **2a'**



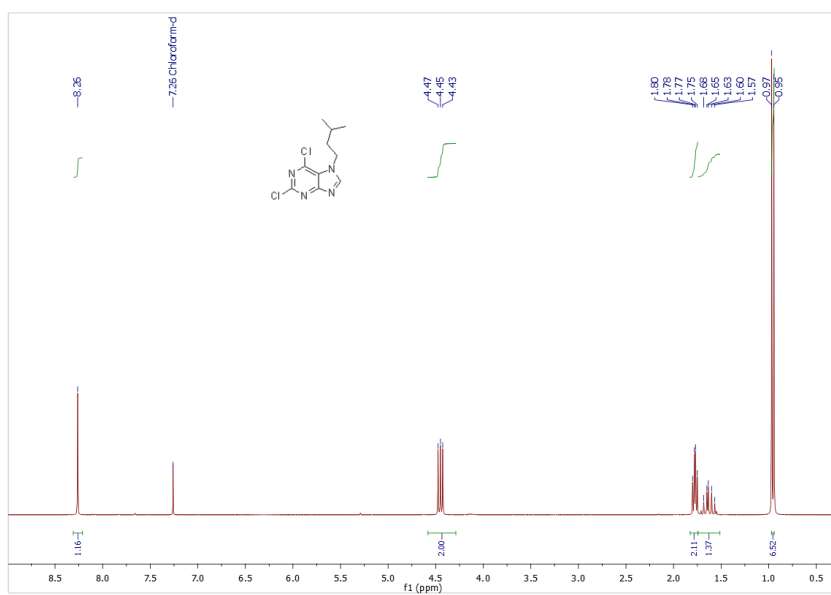
Espectro de ^1H RMN del compuesto **2b**



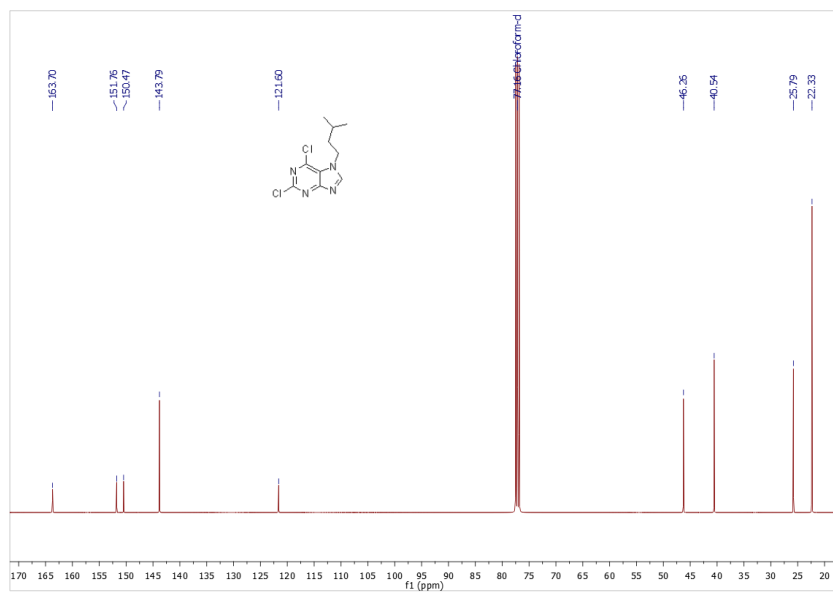
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **2b**



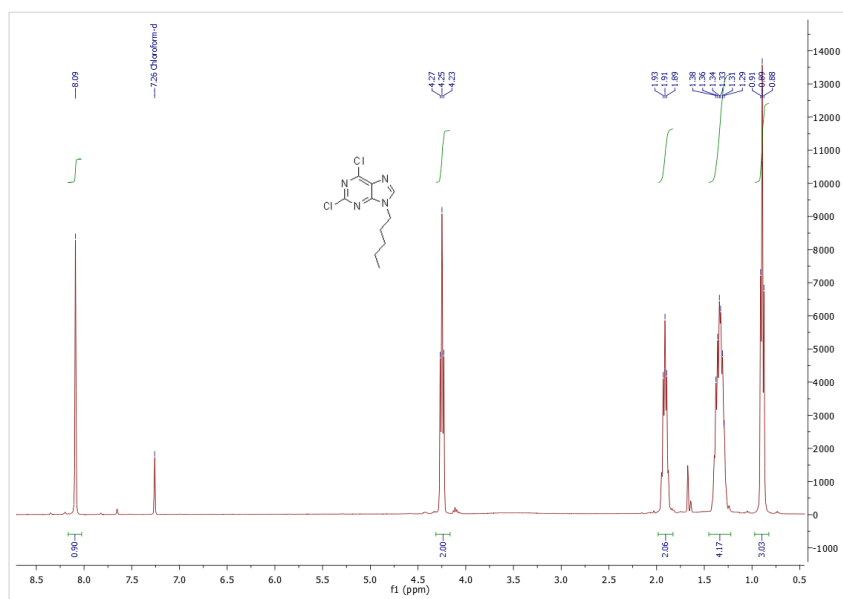
Espectro de ^1H RMN del compuesto **2b'**



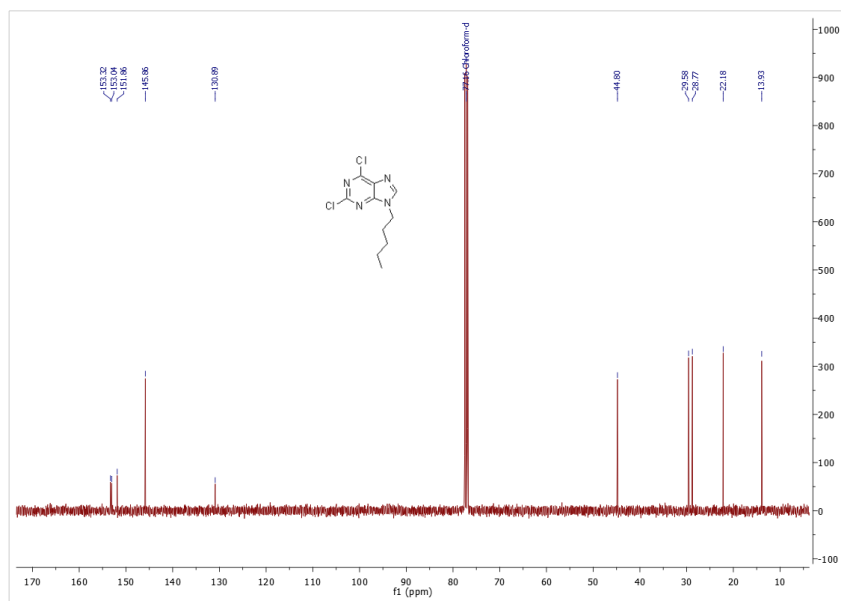
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **2b'**



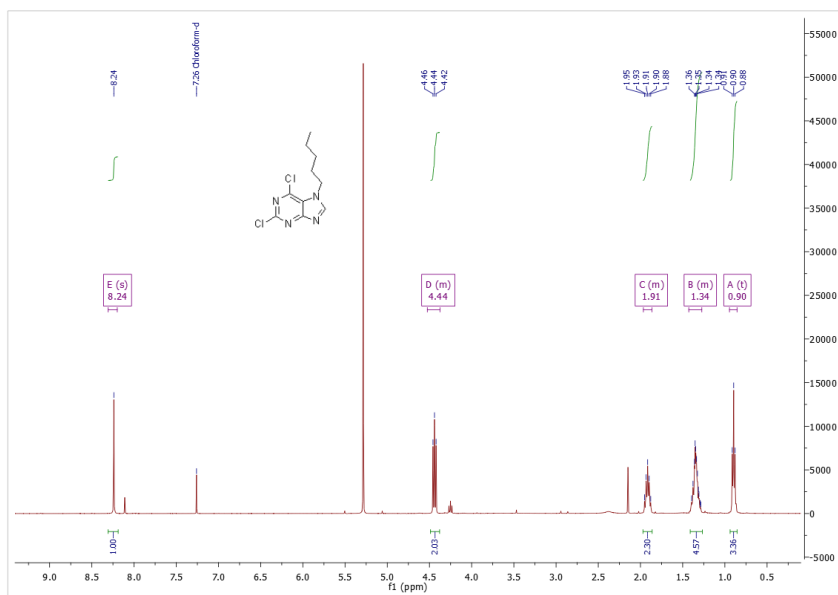
Espectro de ^1H RMN del compuesto **2c**



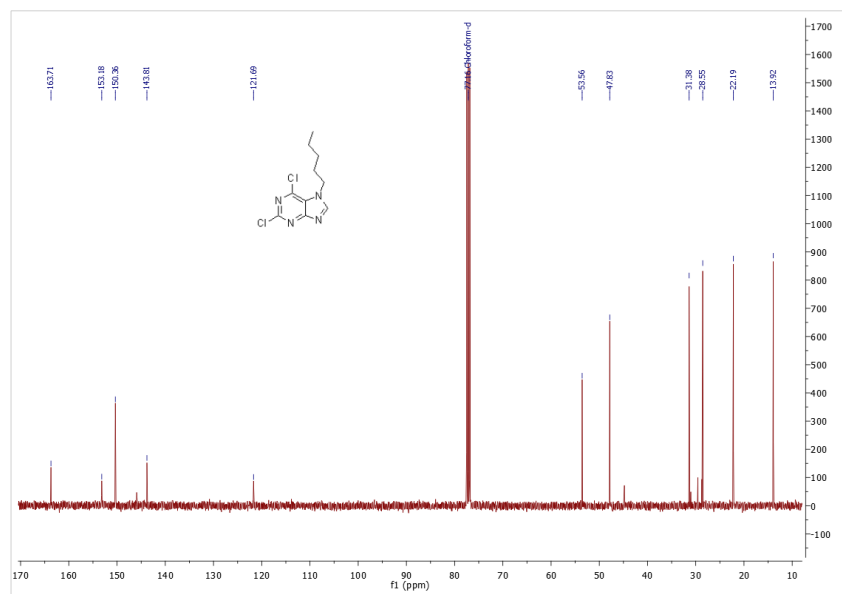
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **2c**



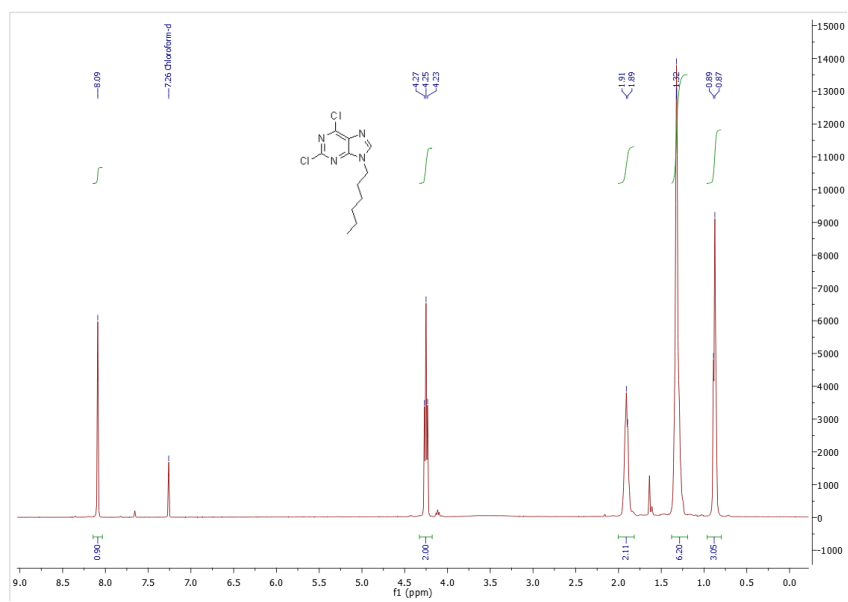
Espectro de ^1H RMN del compuesto **2c'**



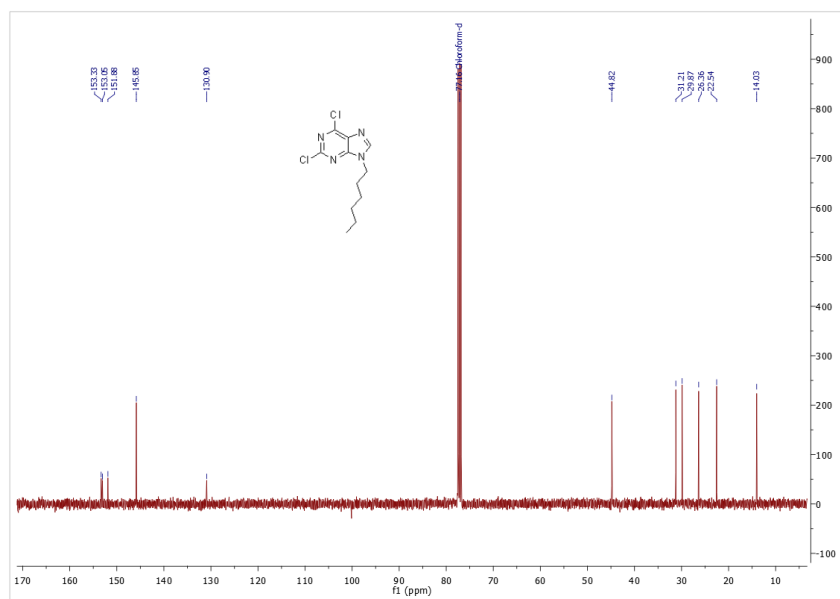
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **2c'**



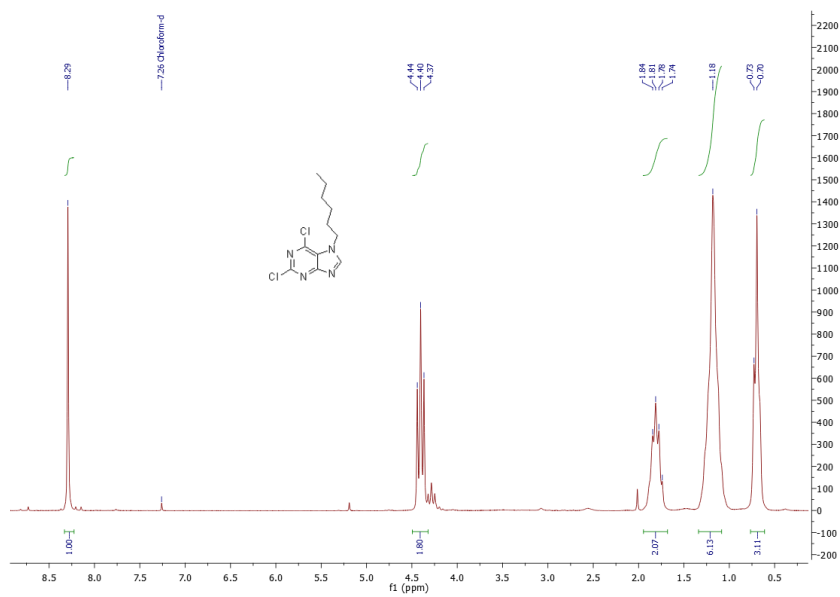
Espectro de ^1H RMN del compuesto **2d**



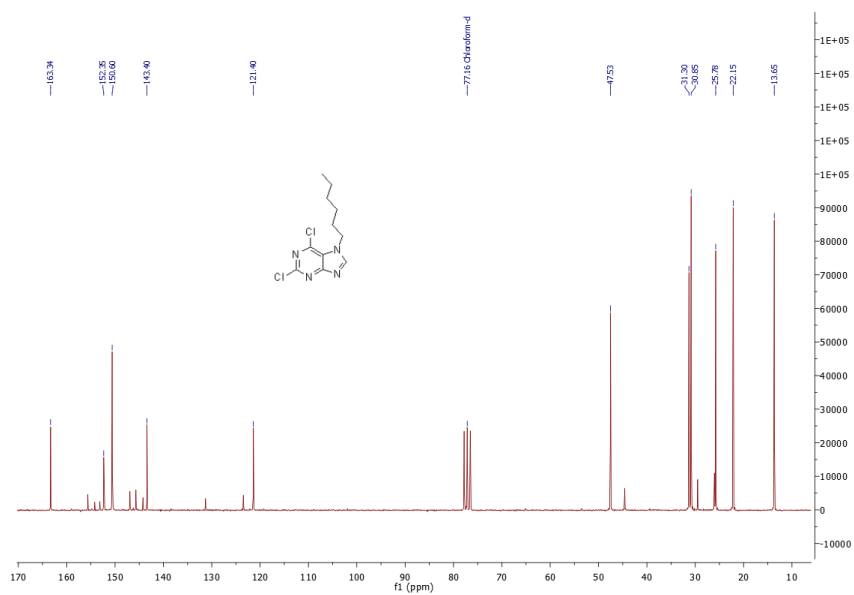
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **2d**



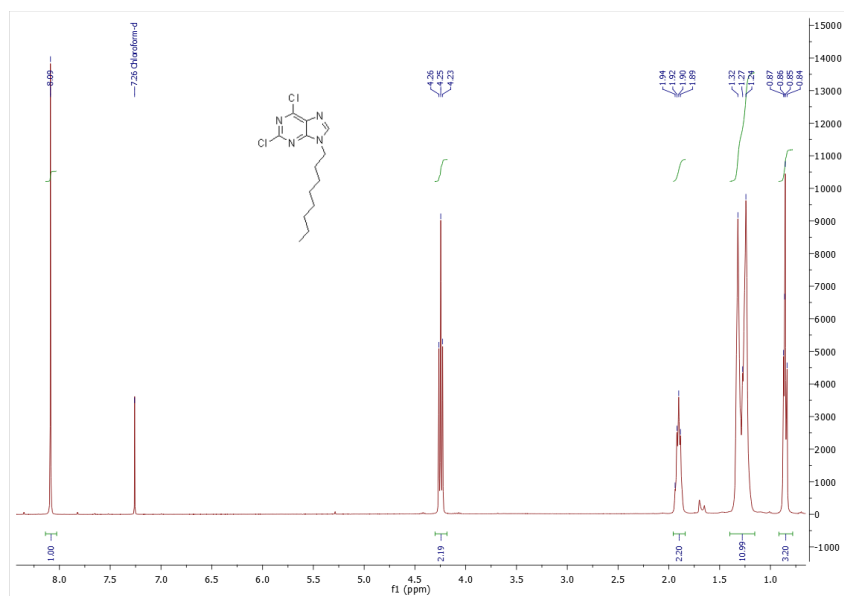
Espectro de ^1H RMN del compuesto **2d'**



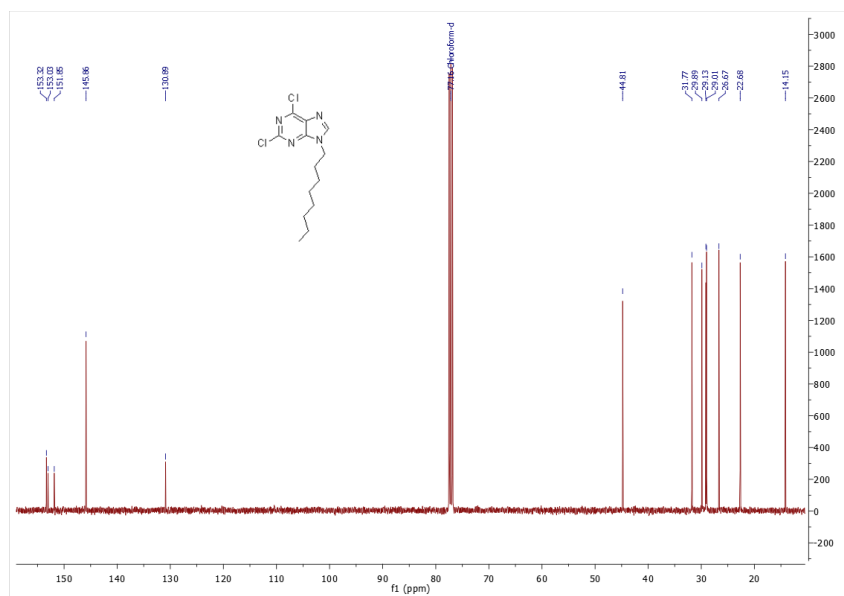
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **2d'**



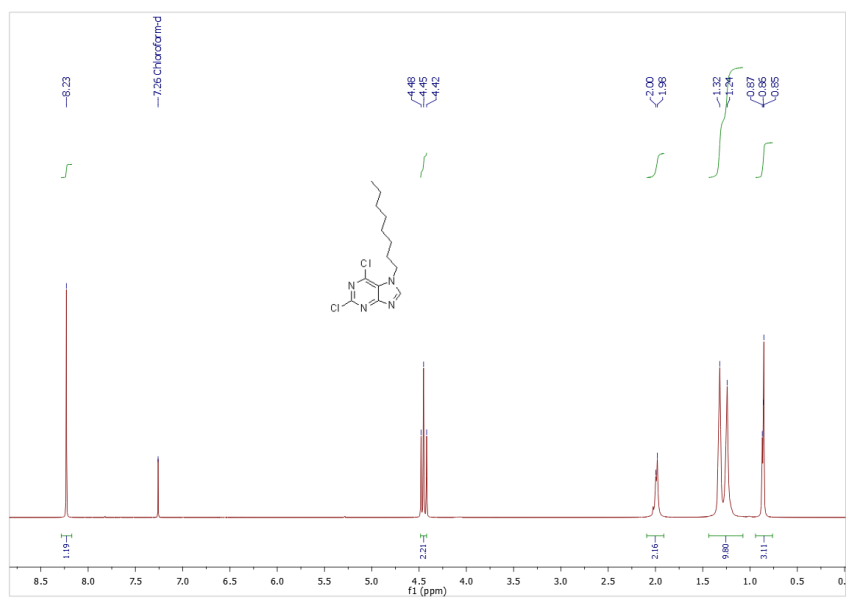
Espectro de ^1H RMN del compuesto **2e**



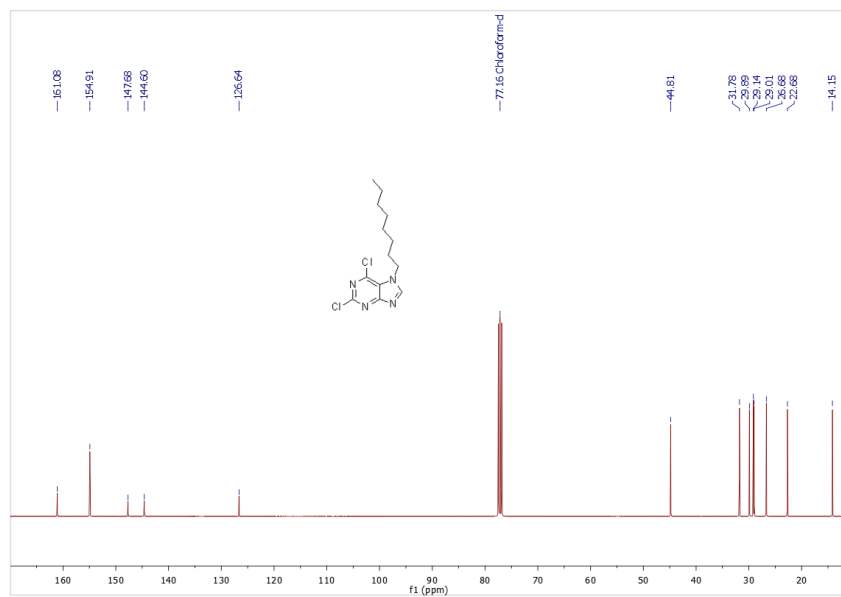
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **2e**



Espectro de ^1H RMN del compuesto **2e'**

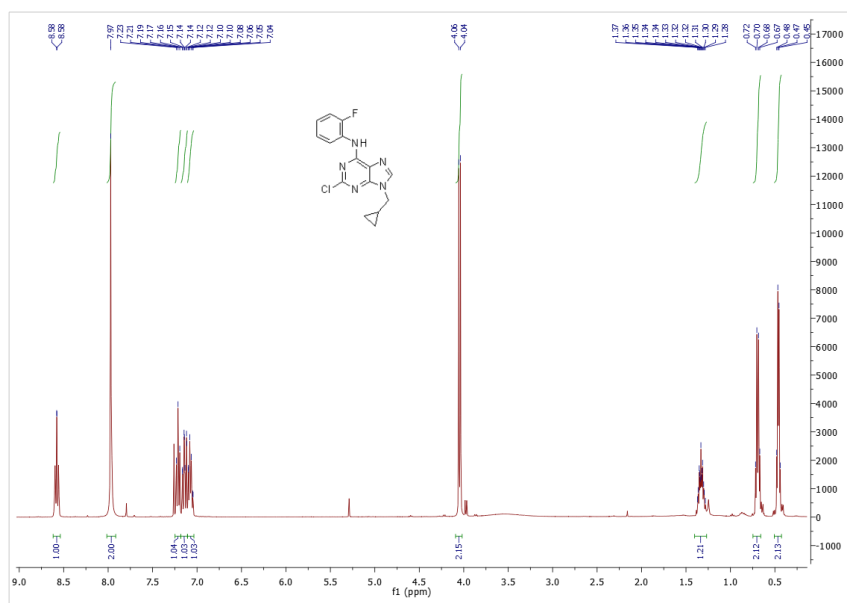


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **2e**

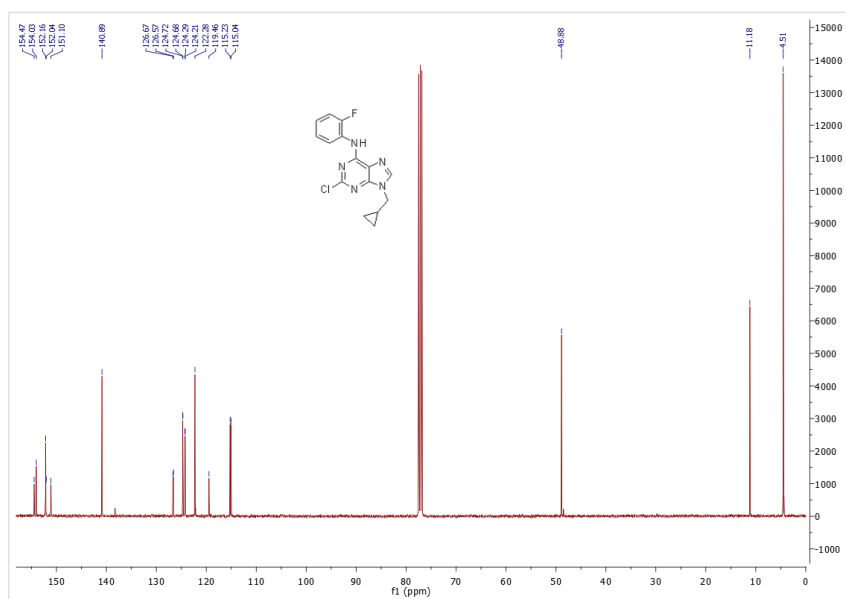


8.1.22 Espectros RMN de los derivados 3a–ad

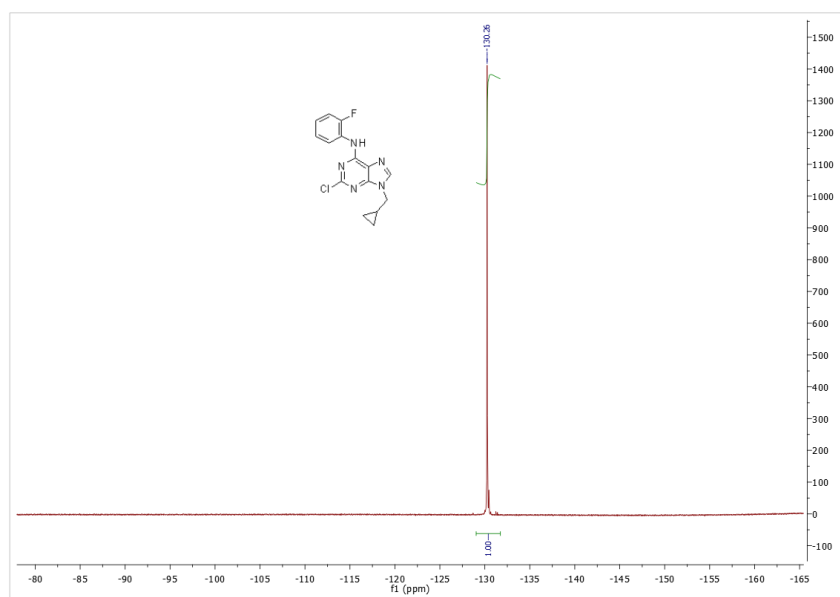
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3a**



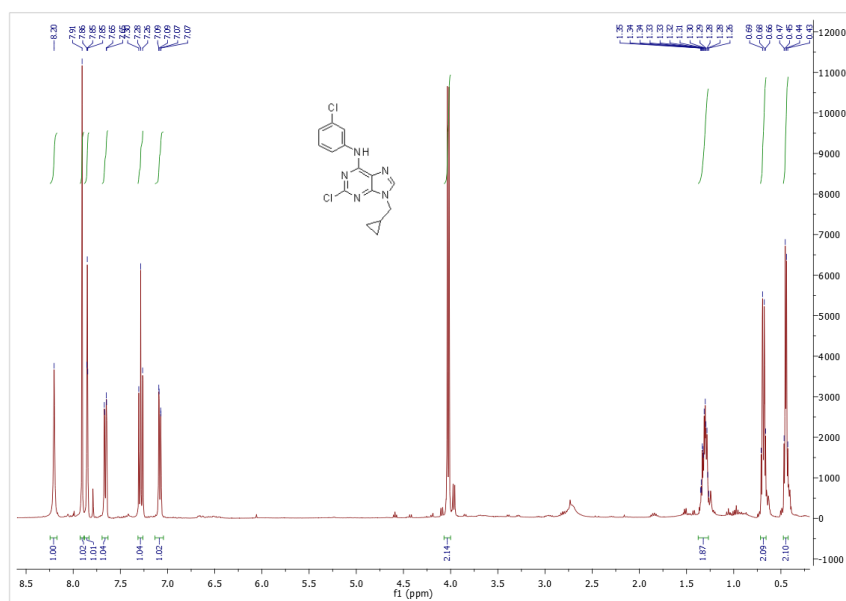
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3a**



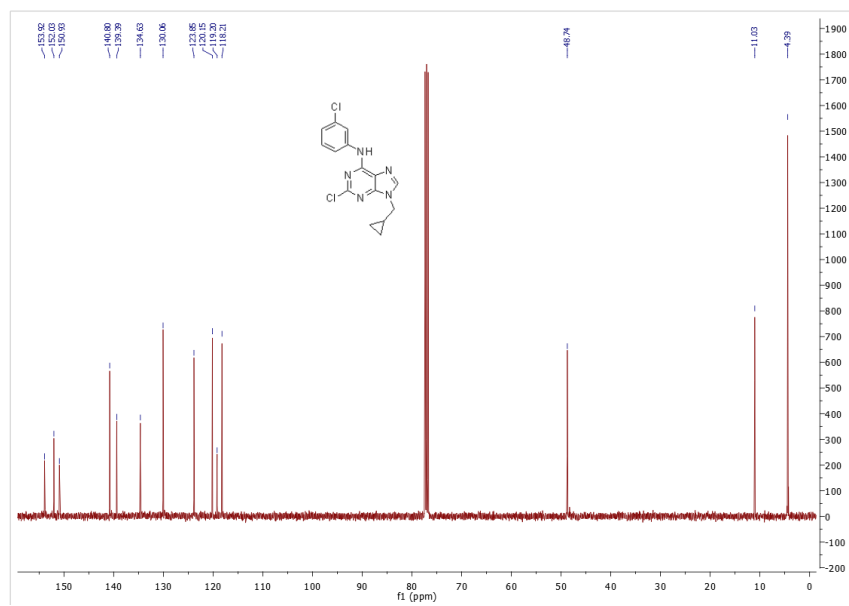
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3a**



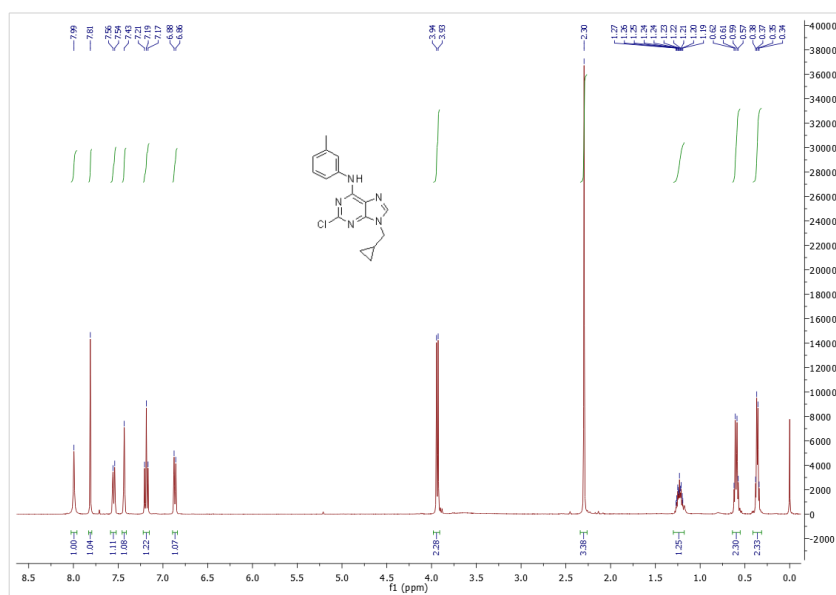
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3b**



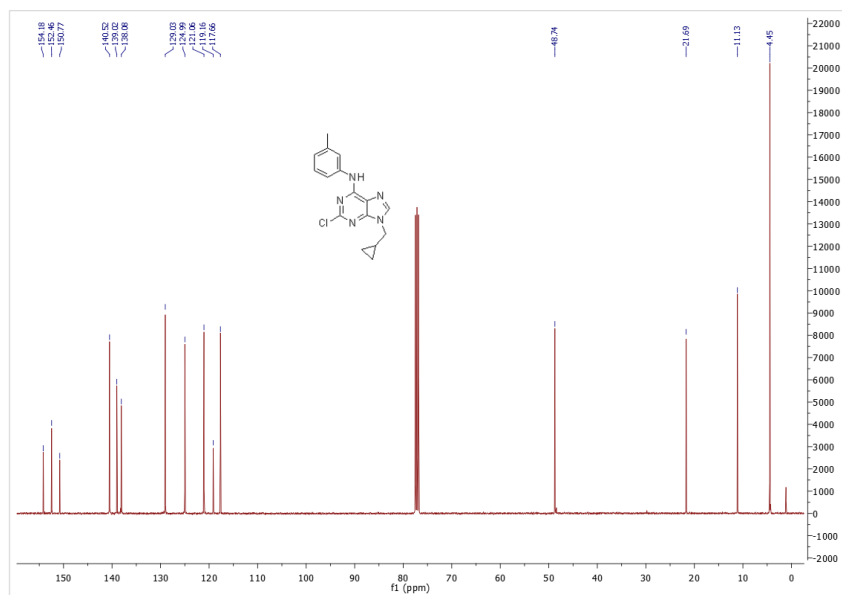
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3b**



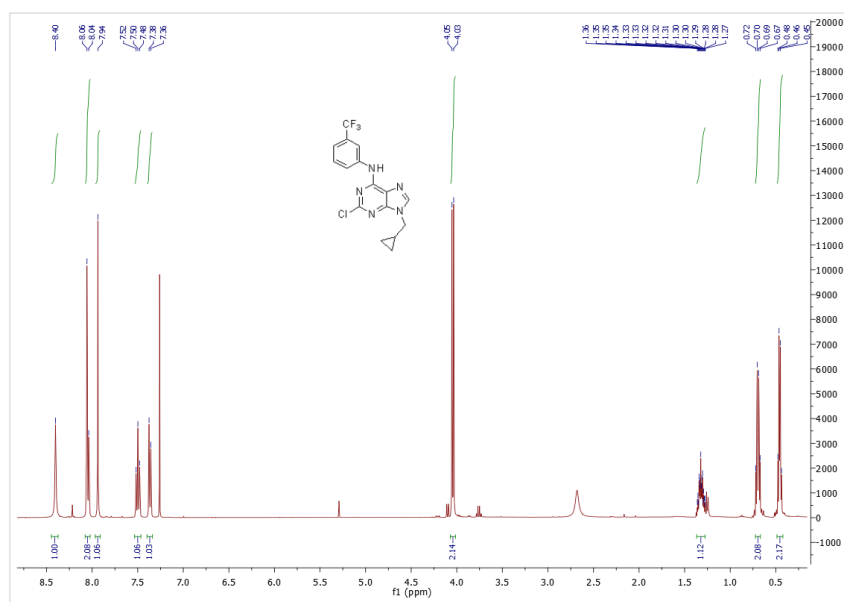
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3c**



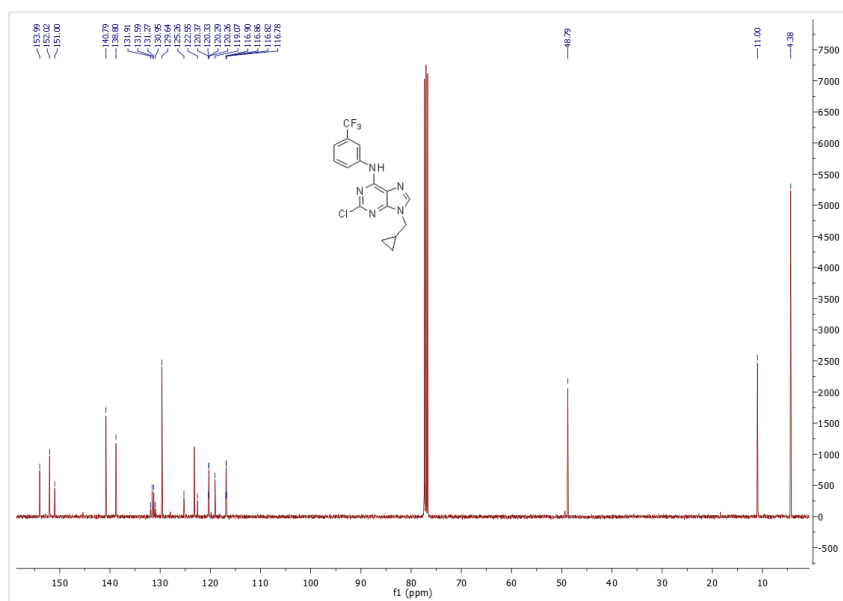
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3c**



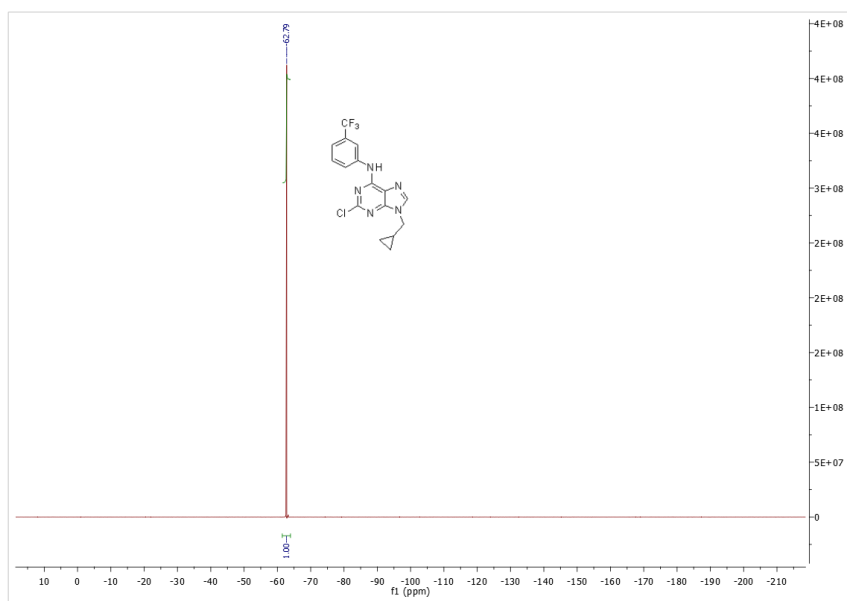
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3d**



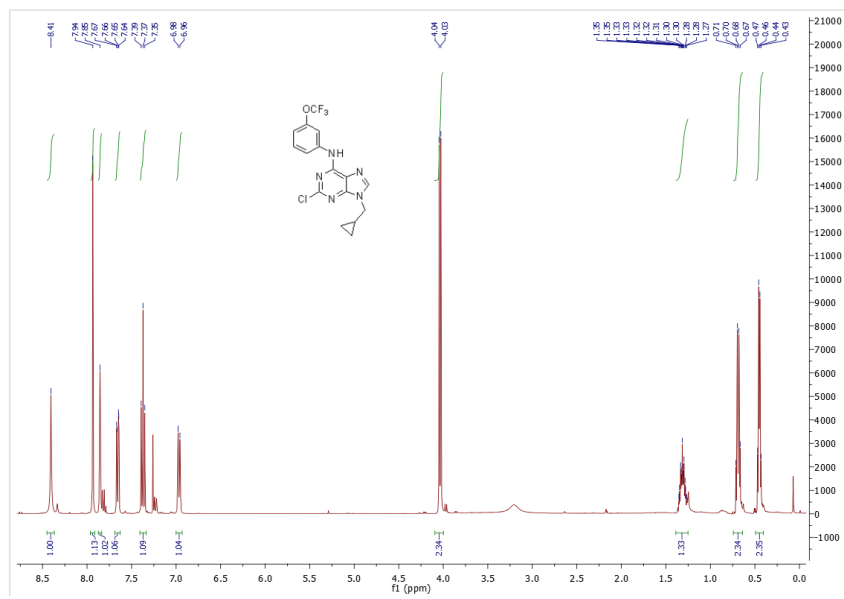
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3d**



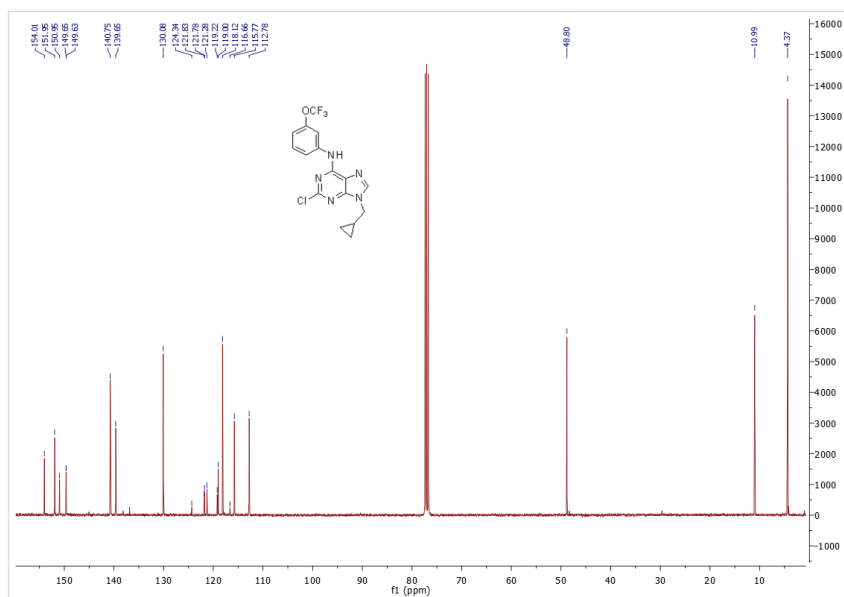
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3d**



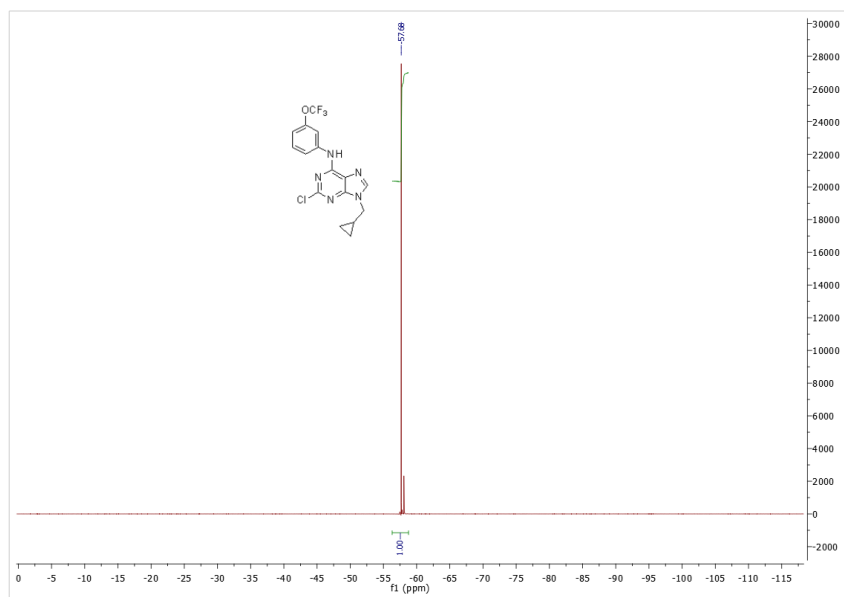
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3e**



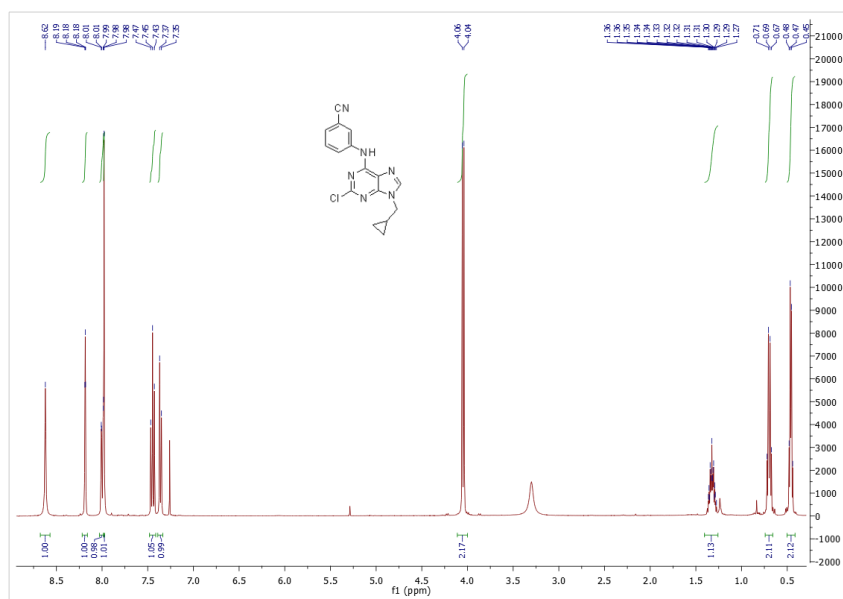
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3e**



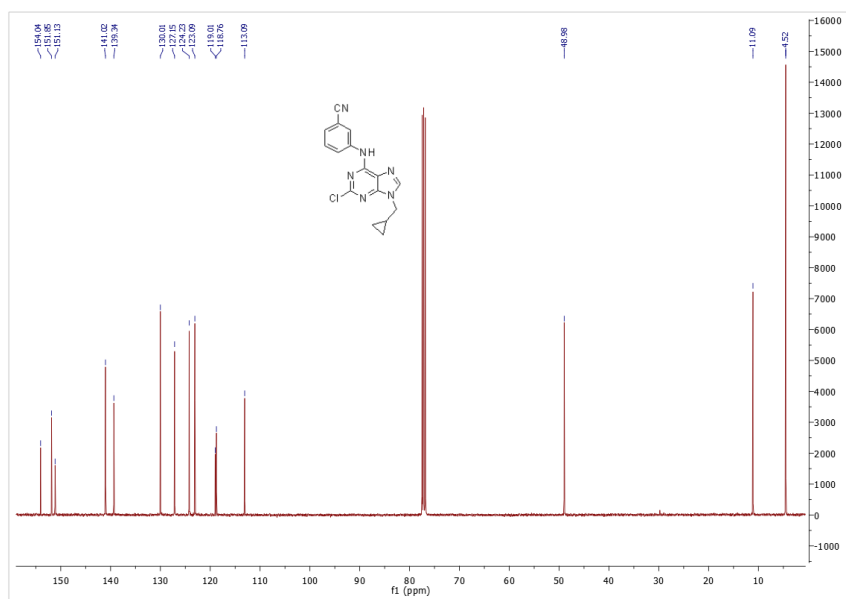
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3e**



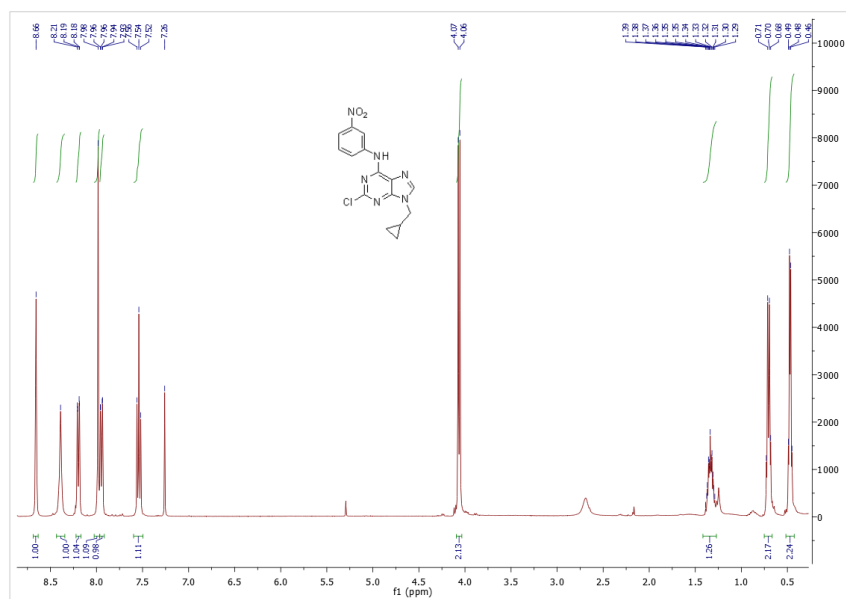
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3f**



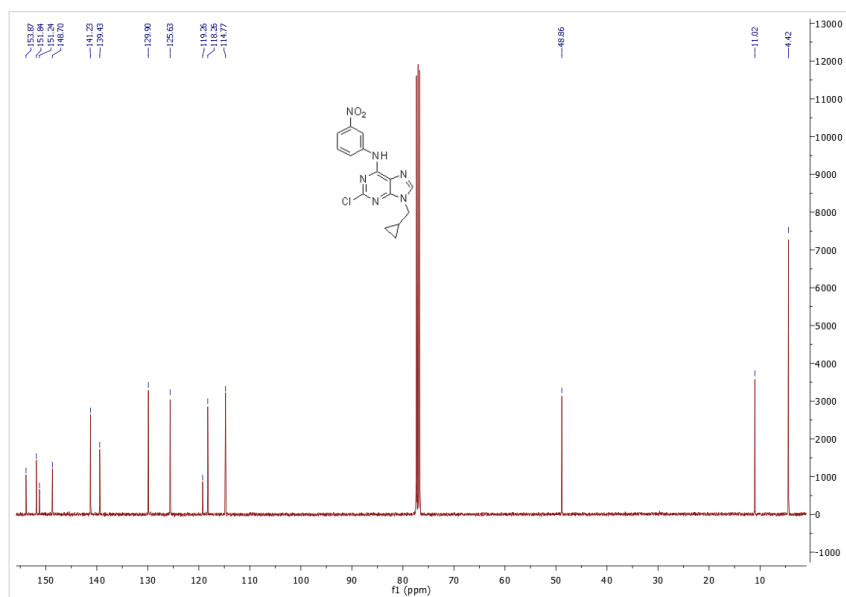
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3f**



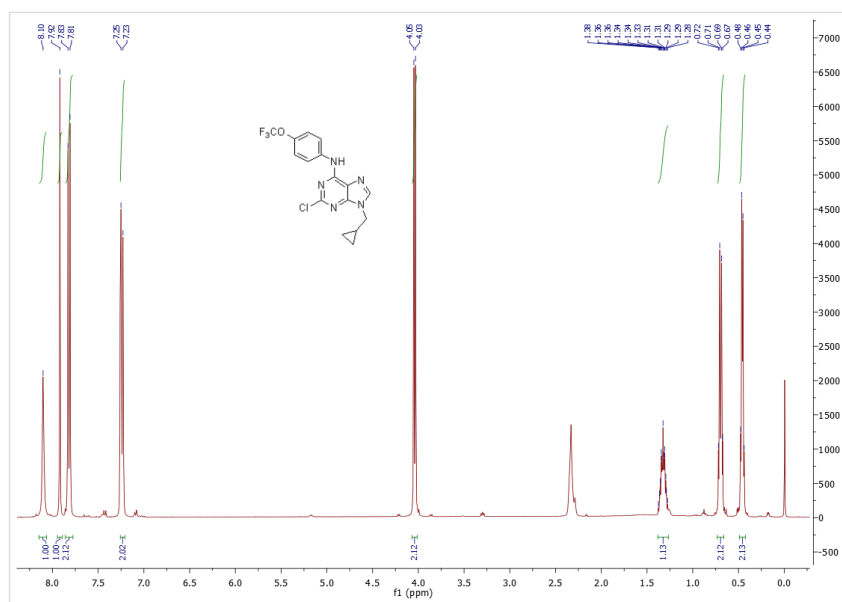
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3g**



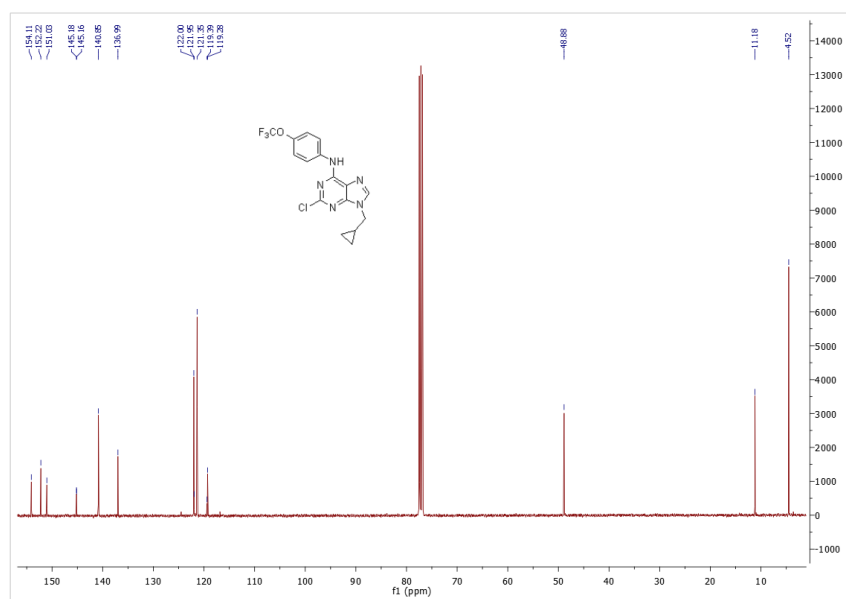
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3g**



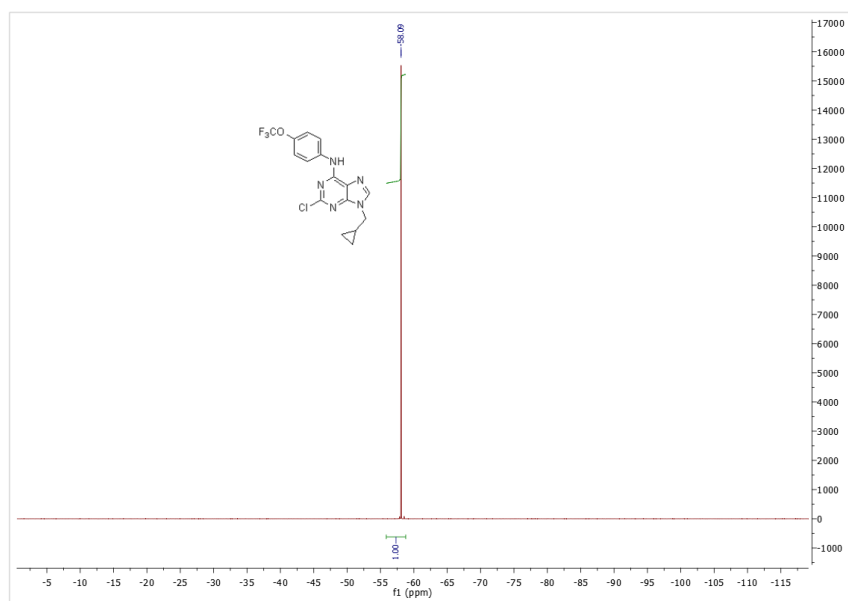
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3h**



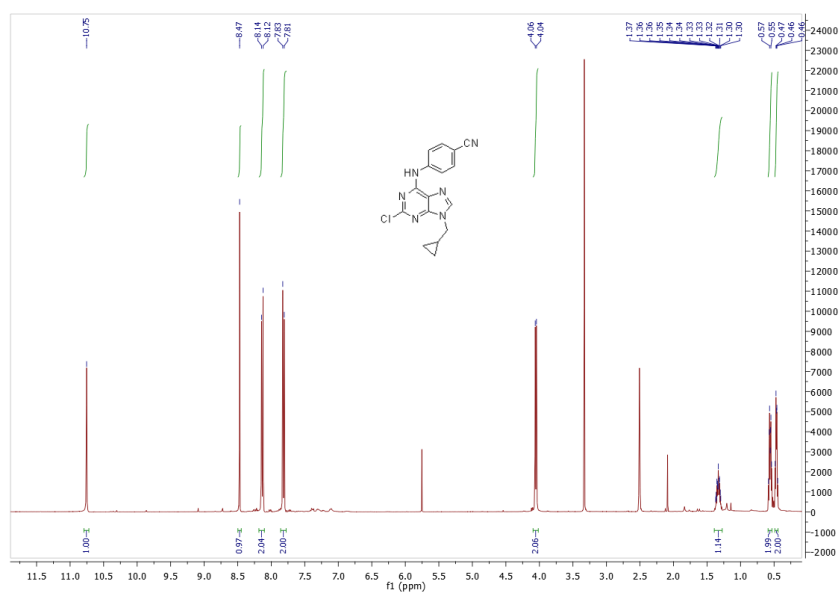
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3h**



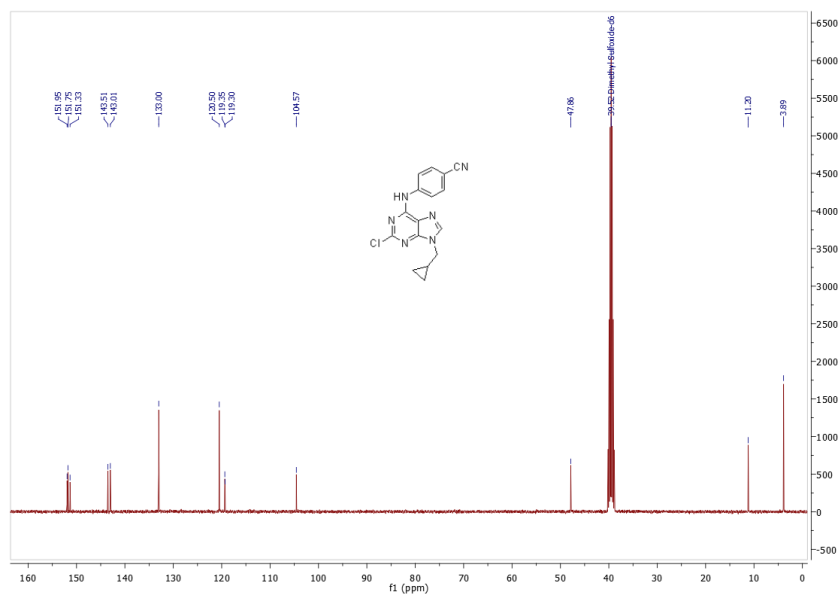
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3h**



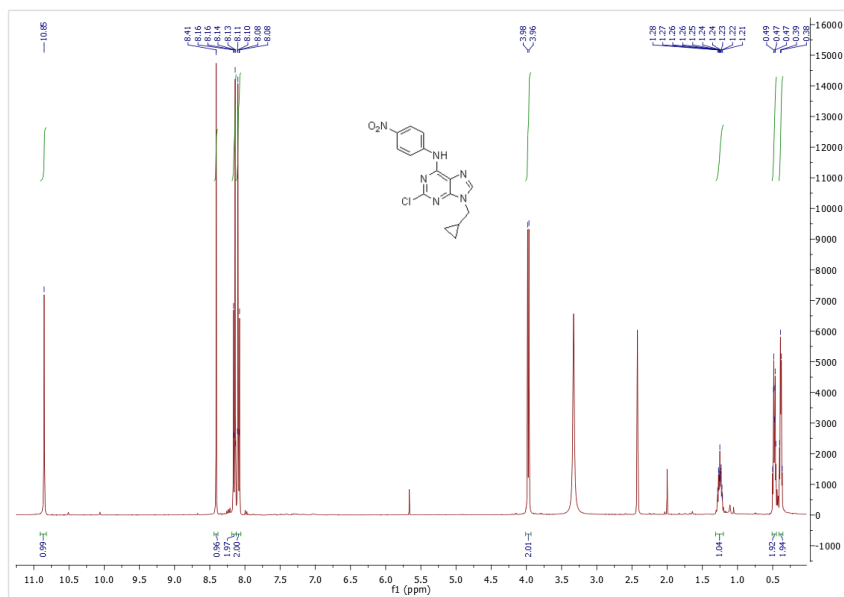
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3i**



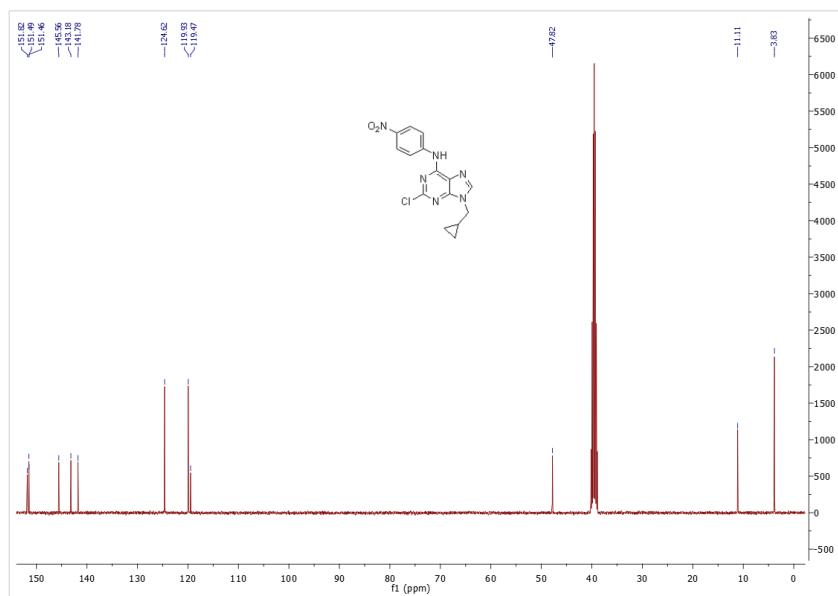
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3i**



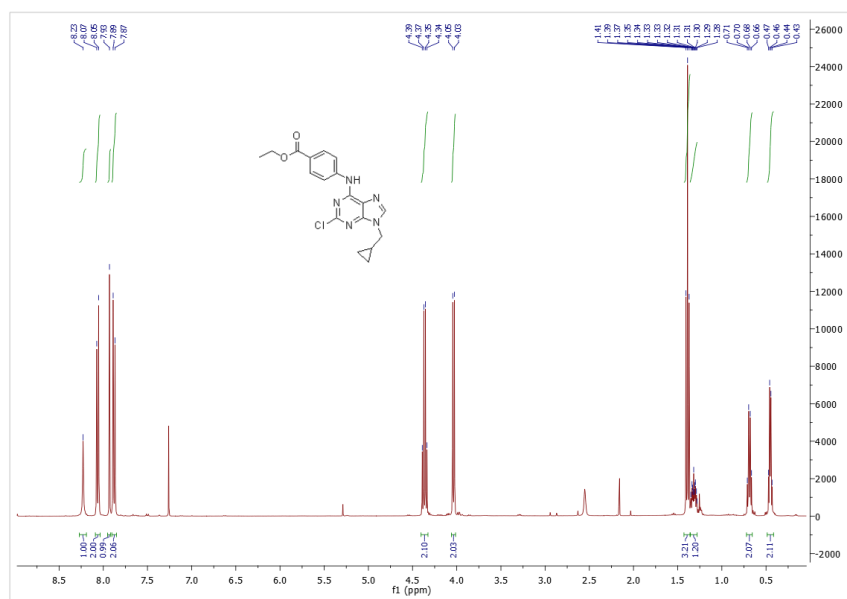
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3j**



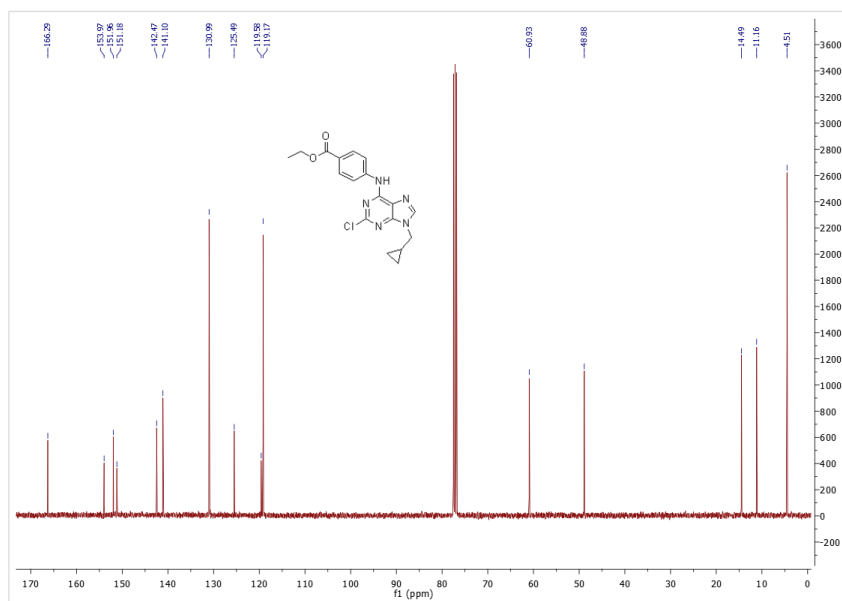
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3j**



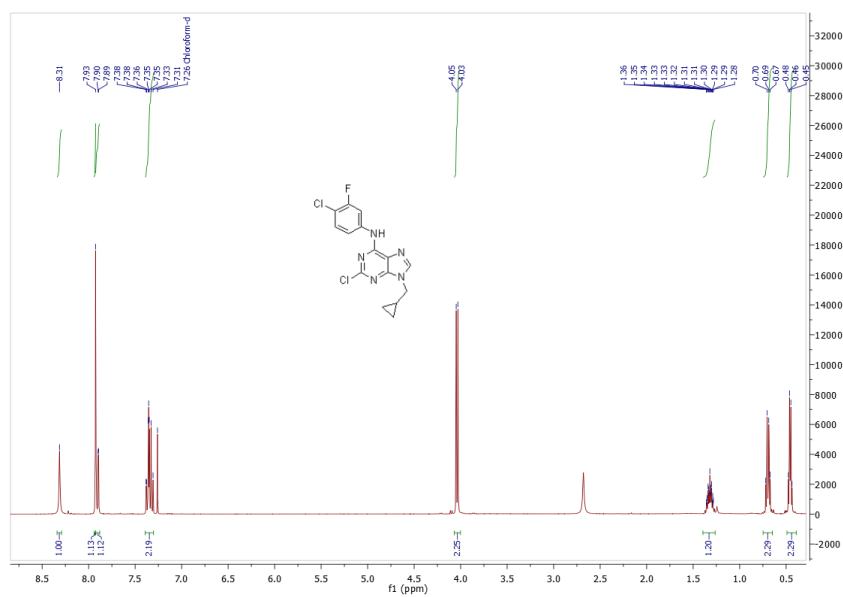
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3k**



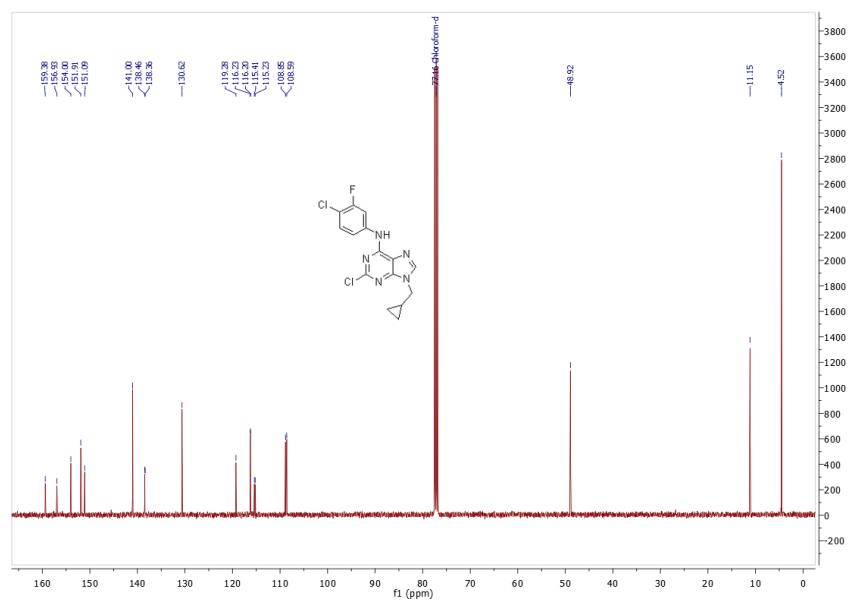
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3k**



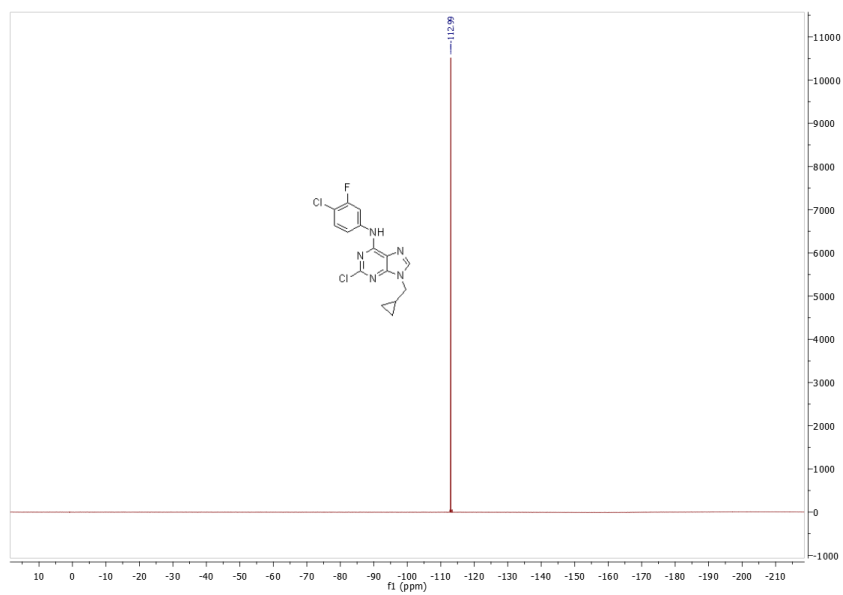
Espectro de ^1H RMN del compuesto **31**



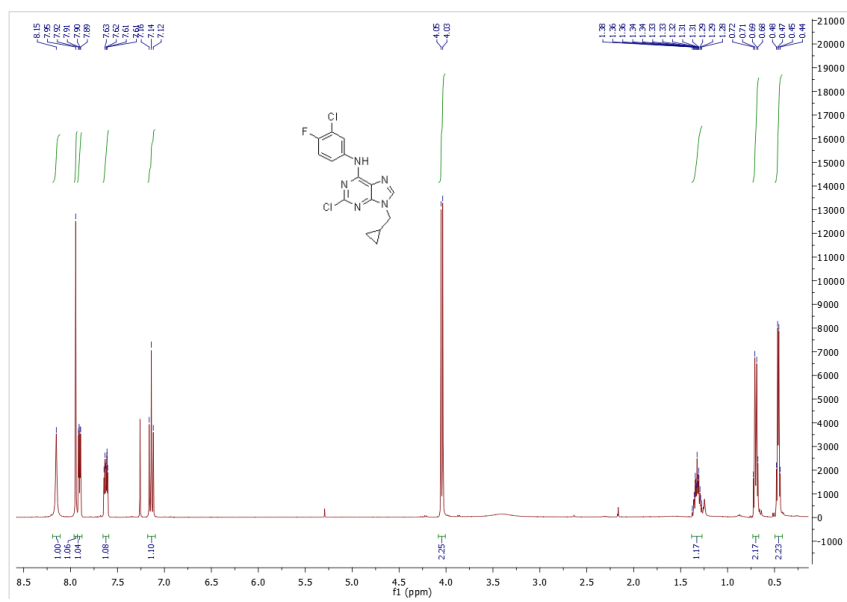
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3I**



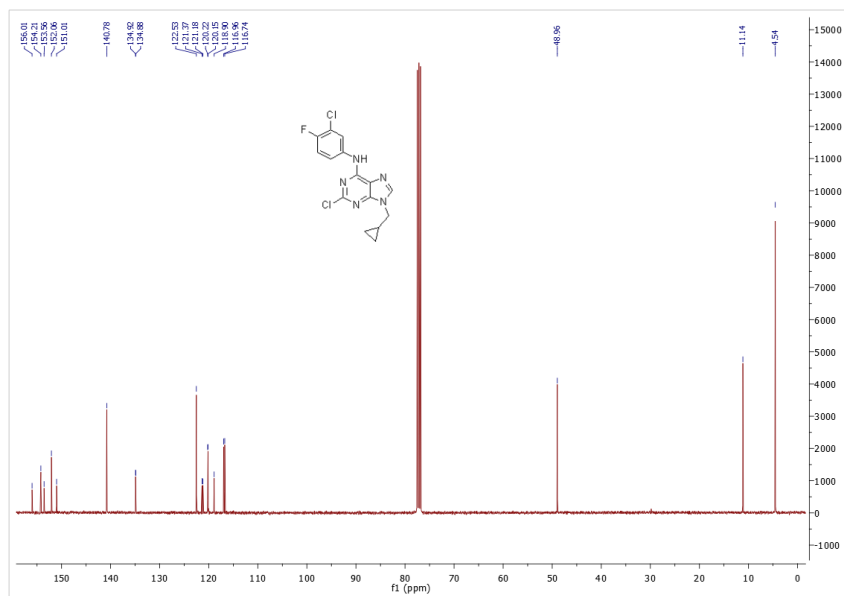
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3I**



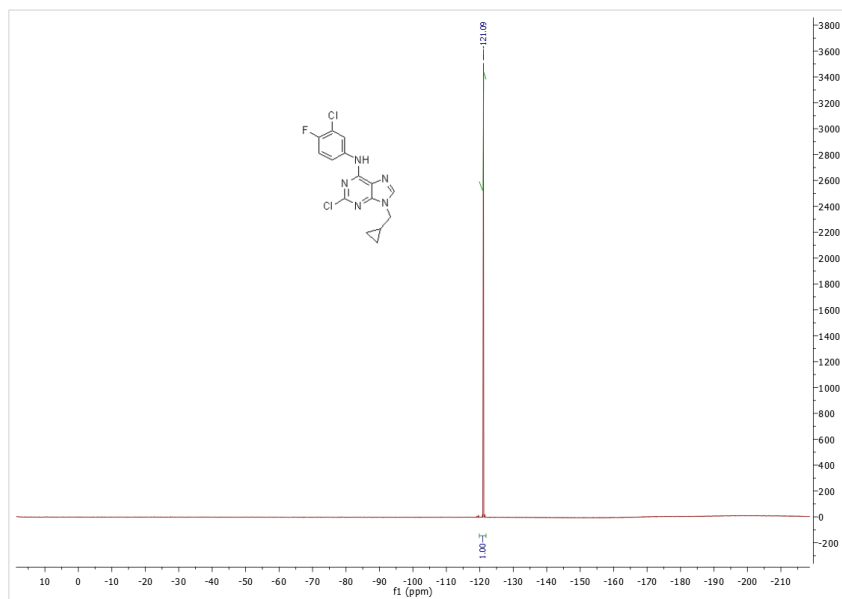
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3m**



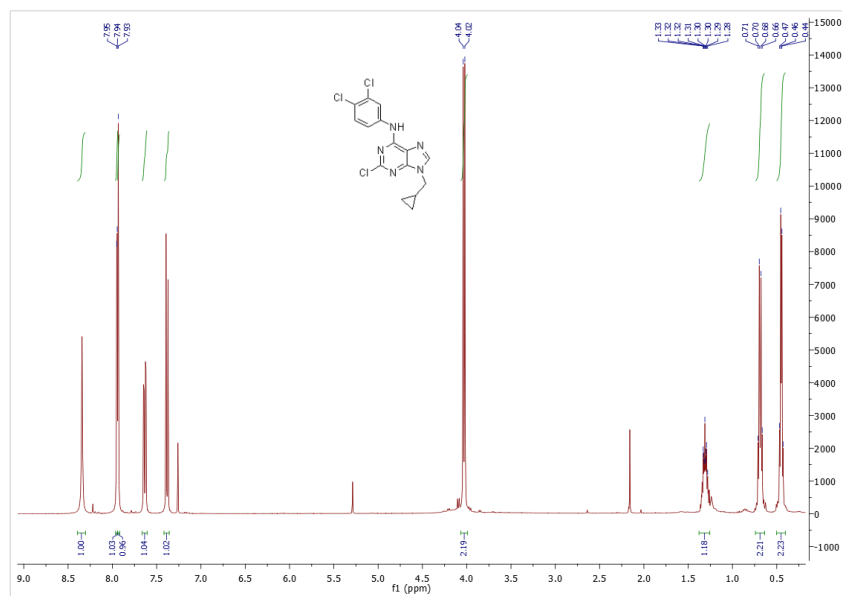
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3m**



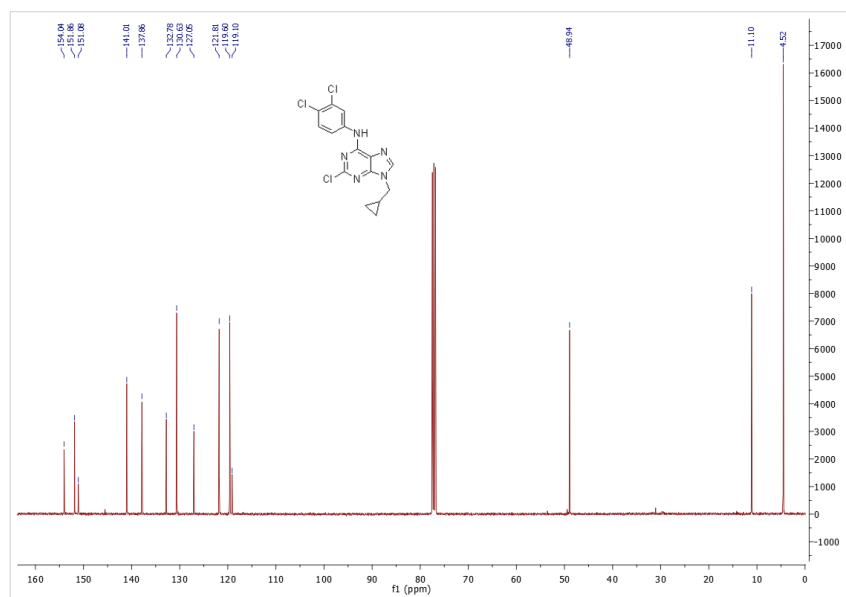
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3m**



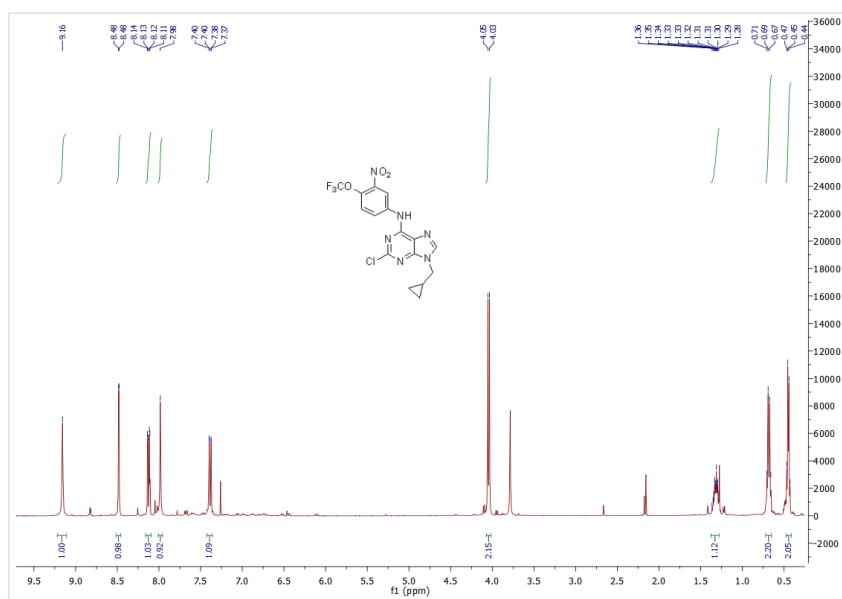
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3n**



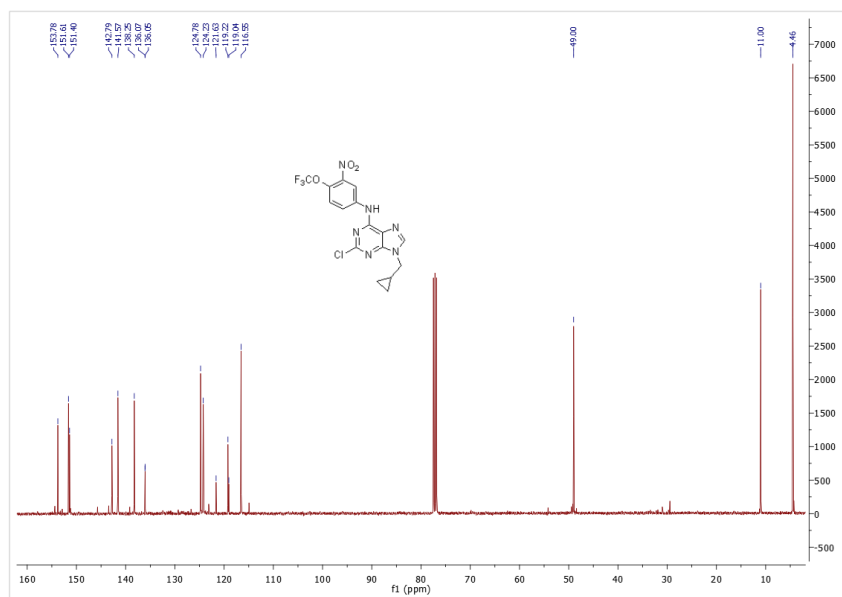
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3n**



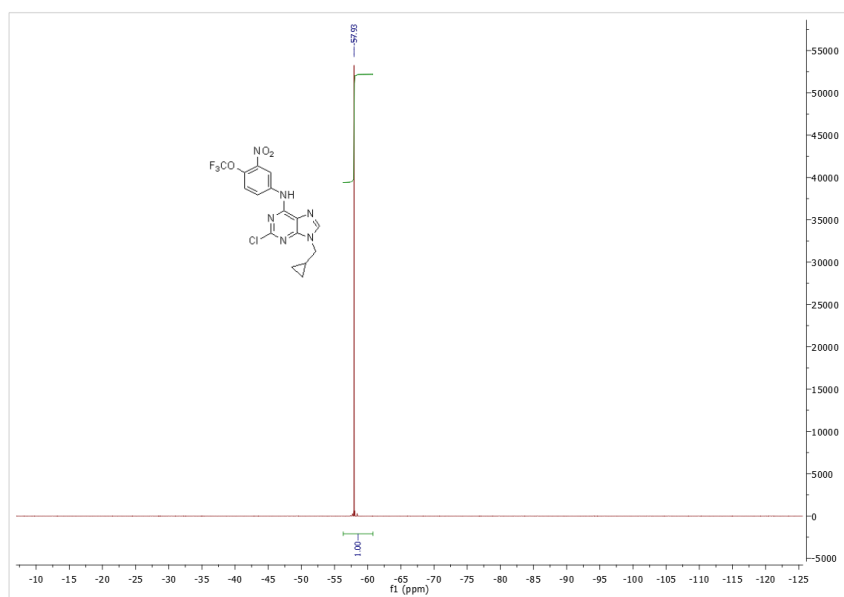
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3o**



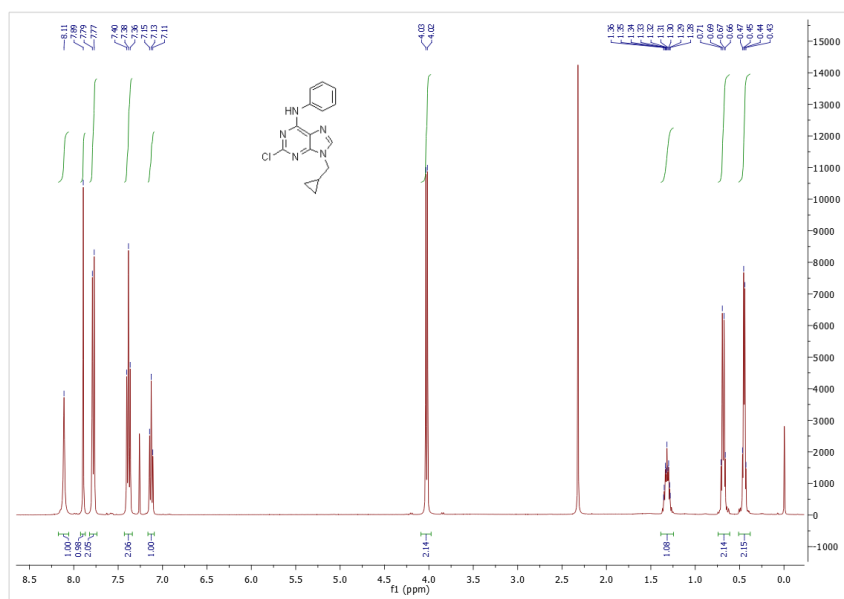
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3o**



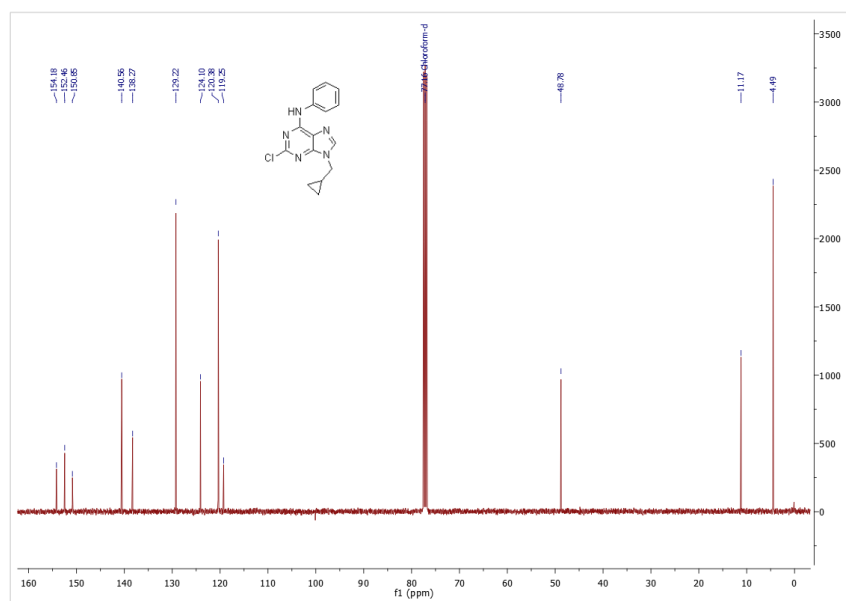
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3o**



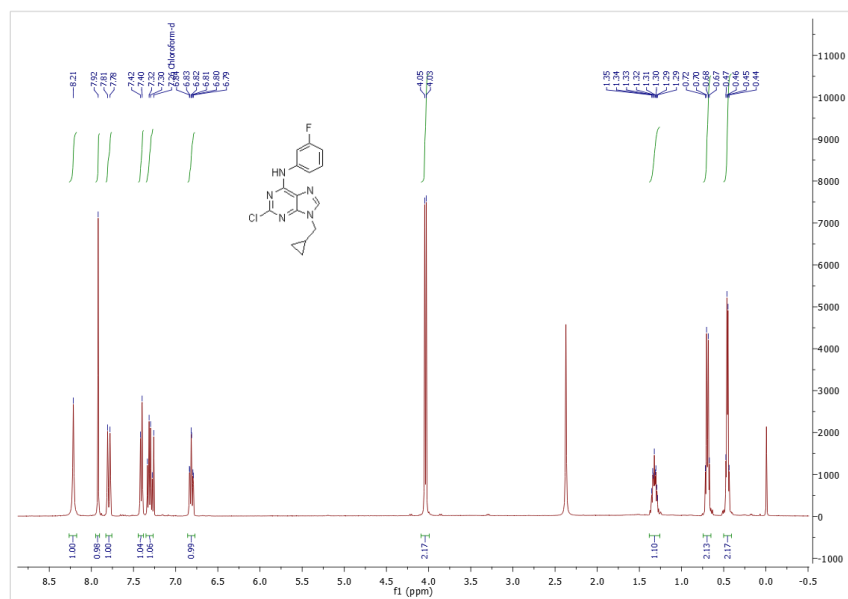
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3p**



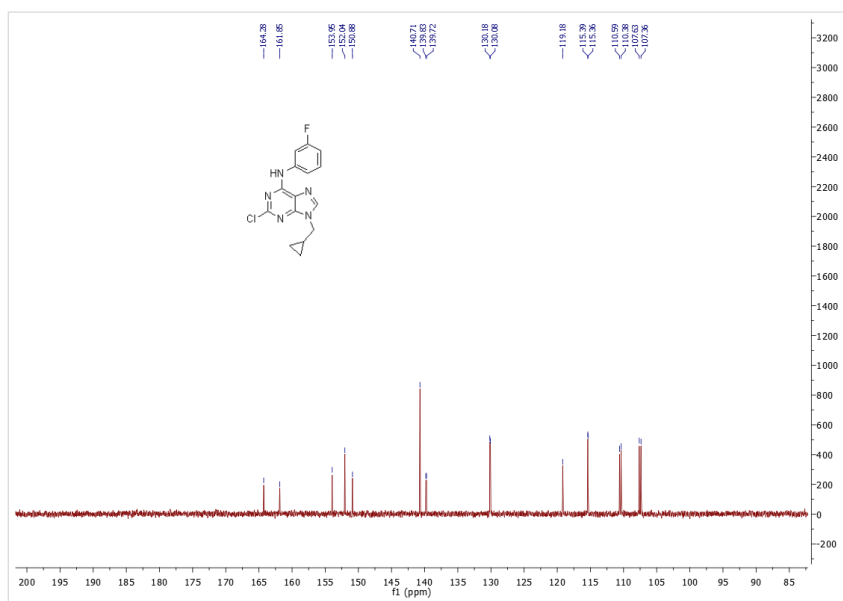
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3p**



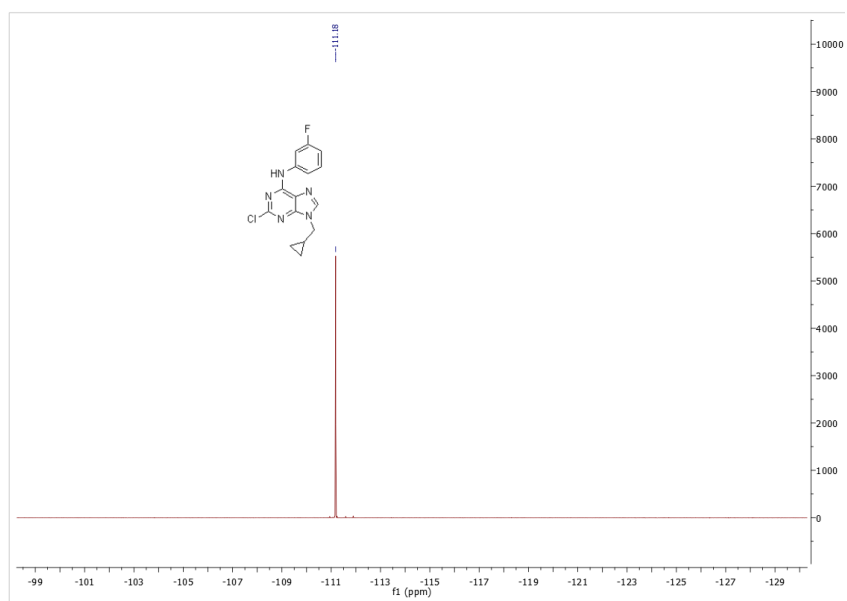
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3q**



Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3q**



Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3q**



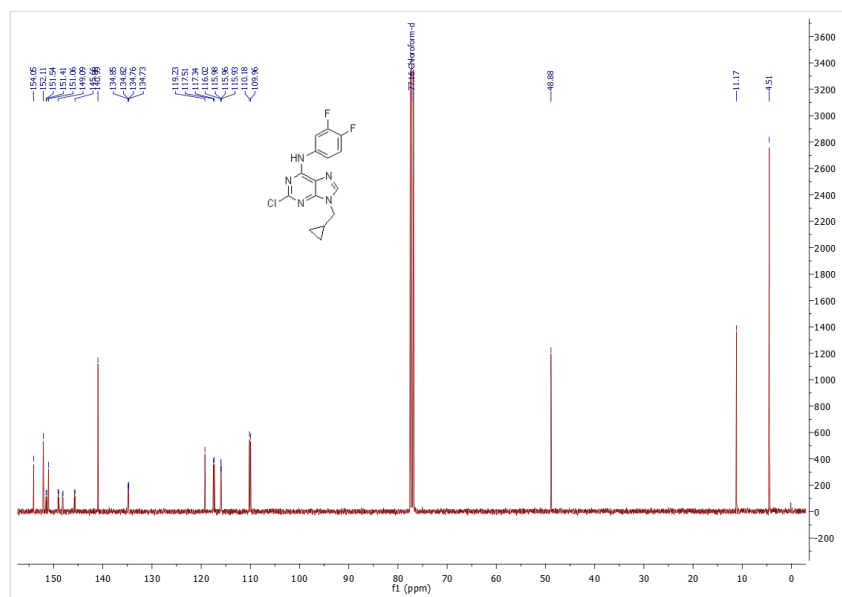
Chemical structure of compound 10: Clc1nc2nc(Nc3ccc(F)c(F)c3)cnc2n1CC4CC4

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10. The x-axis represents the chemical shift in ppm (f1), ranging from 0.0 to 8.5. The y-axis represents intensity, ranging from -1000 to 11000. The spectrum shows several peaks, with integration values provided below the baseline.

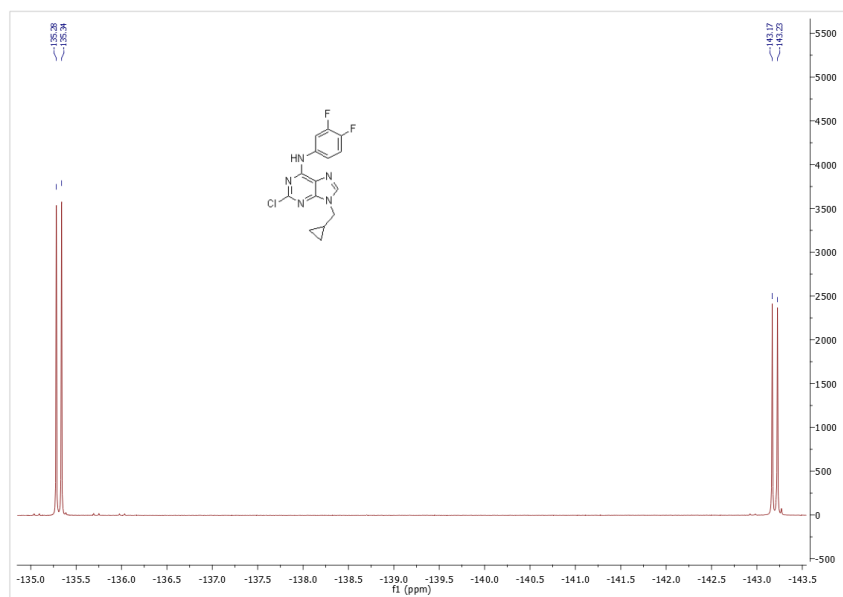
Peak list (ppm): 8.04, 7.91, 7.89, 7.88, 7.86, 7.83, 7.72, 7.71, 7.70, 7.26, 7.20, 7.17, 7.13, 7.10, 4.04, 4.02, 2.16, 2.19, 1.37, 1.36, 1.35, 1.34, 1.33, 1.32, 1.31, 1.29, 1.28, 1.27, 1.26, 1.00, 0.99, 0.87, 0.86, 0.85, 0.84, 0.83, 0.82, 0.81, 0.80, 0.79, 0.78, 0.77, 0.76, 0.75, 0.74, 0.73, 0.72, 0.71, 0.70, 0.69, 0.68, 0.67, 0.66, 0.65, 0.64, 0.63, 0.62, 0.61, 0.60, 0.59, 0.58, 0.57, 0.56, 0.55, 0.54, 0.53, 0.52, 0.51, 0.50, 0.49, 0.48, 0.47, 0.46, 0.45, 0.44, 0.43, 0.42, 0.41, 0.40, 0.39, 0.38, 0.37, 0.36, 0.35, 0.34, 0.33, 0.32, 0.31, 0.30, 0.29, 0.28, 0.27, 0.26, 0.25, 0.24, 0.23, 0.22, 0.21, 0.20, 0.19, 0.18, 0.17, 0.16, 0.15, 0.14, 0.13, 0.12, 0.11, 0.10, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.00.

Integration values (from left to right): 1.00, 1.23, 0.87, 1.07, 1.07, 2.16, 2.19, 2.14, 2.18.

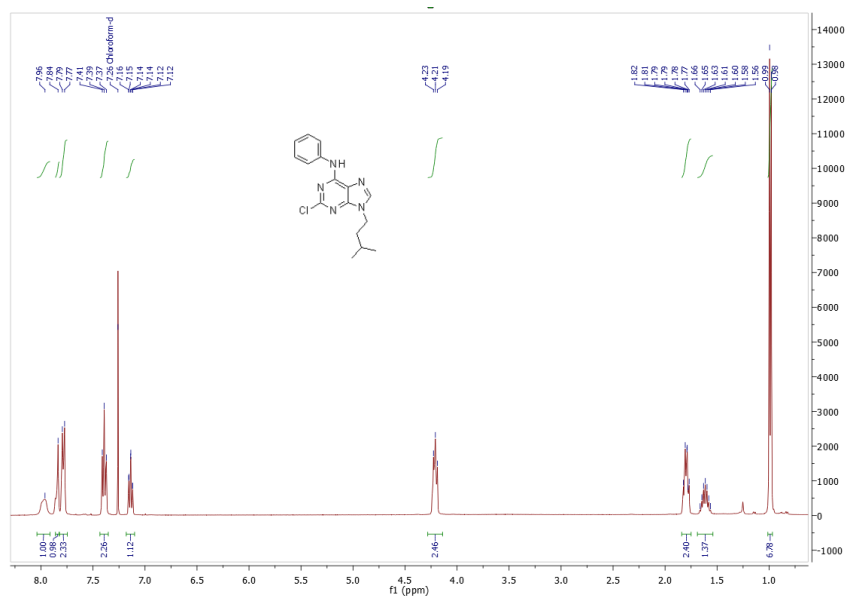
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3r**



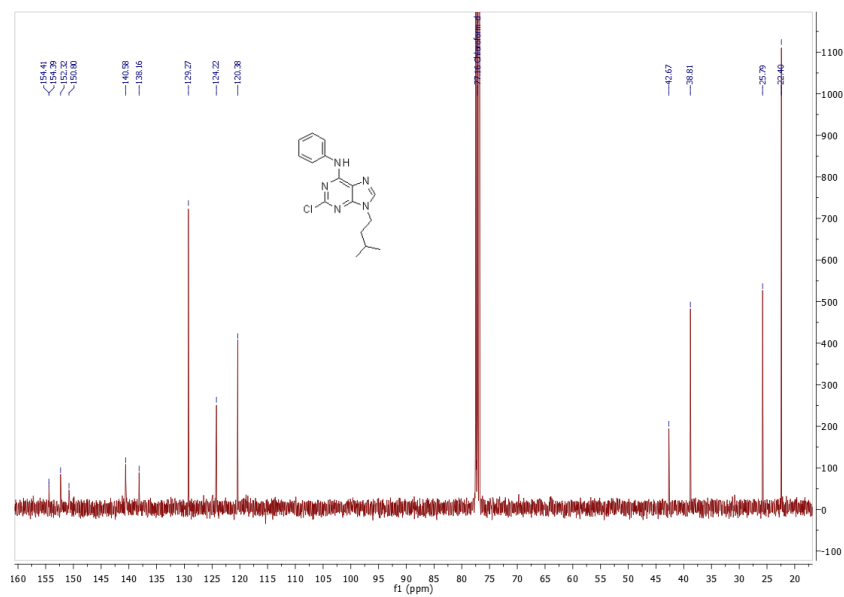
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3r**



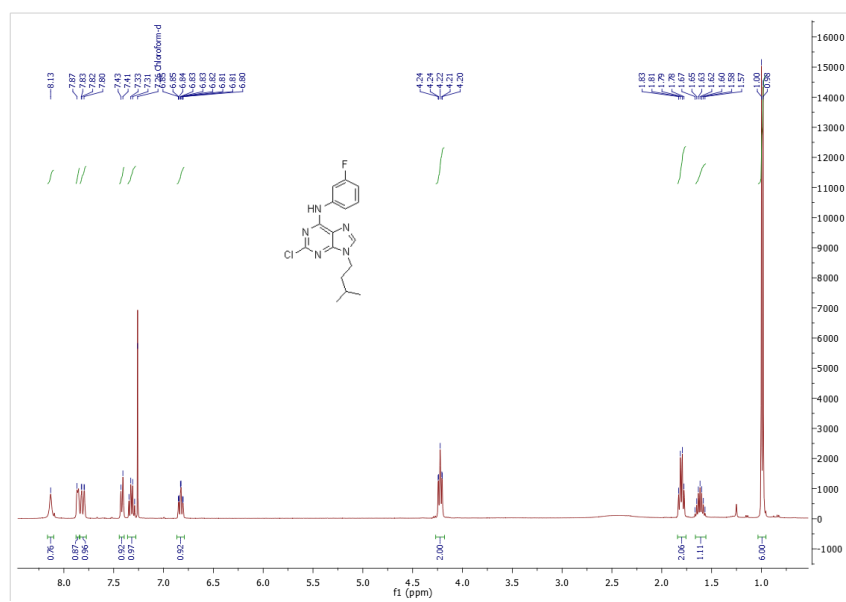
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3s**



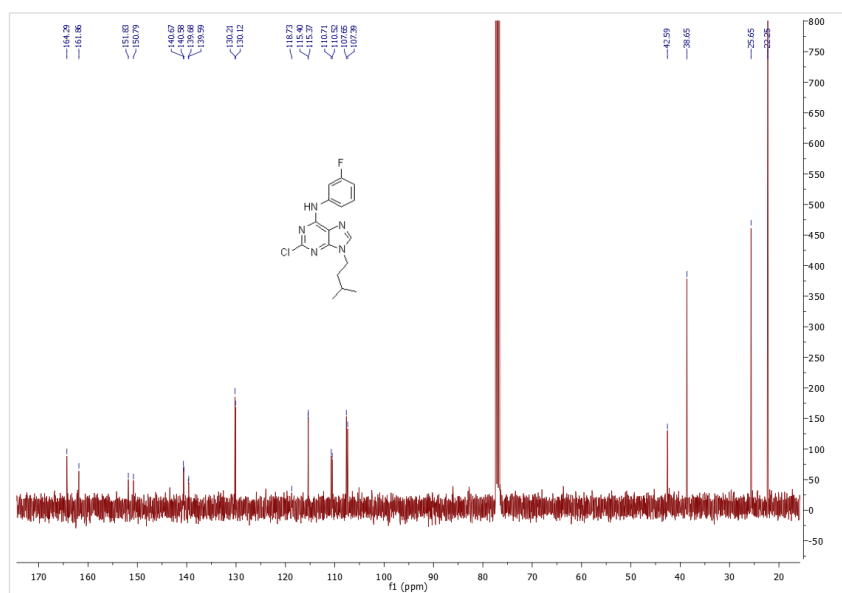
Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **3s**



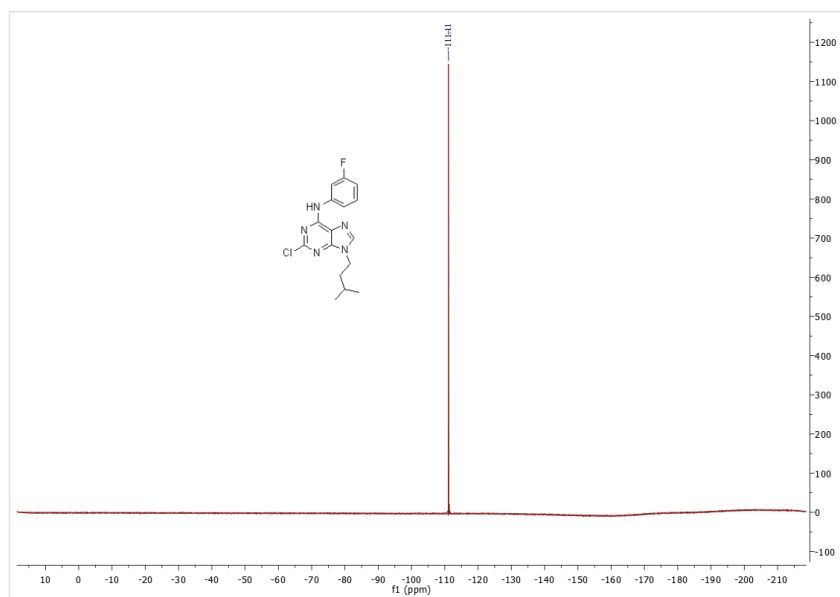
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3t**



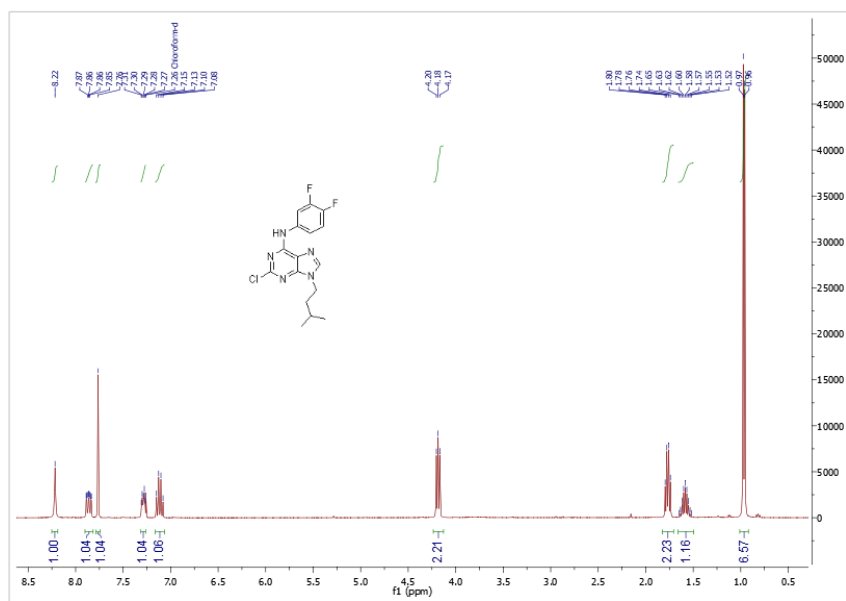
Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **3t**



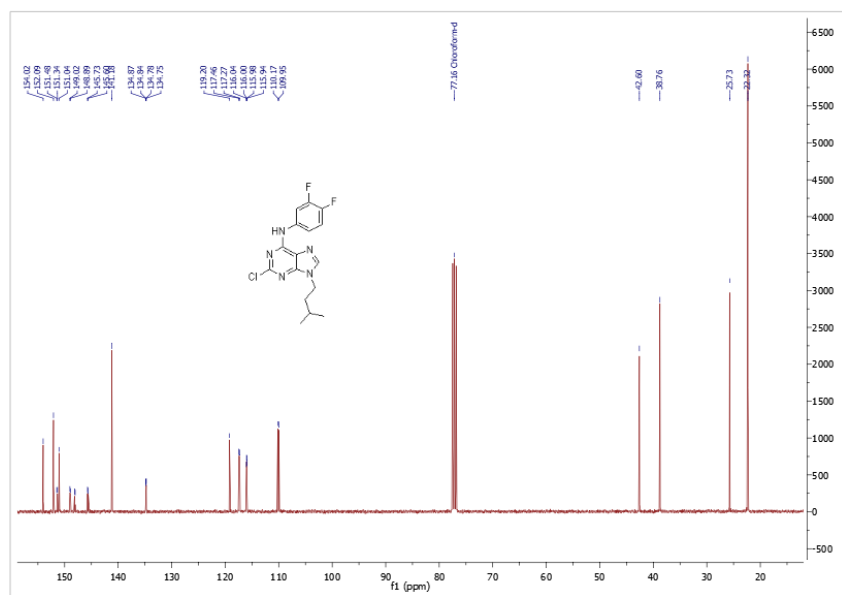
Espectro de ^{19}F -RMN del compuesto **3t**



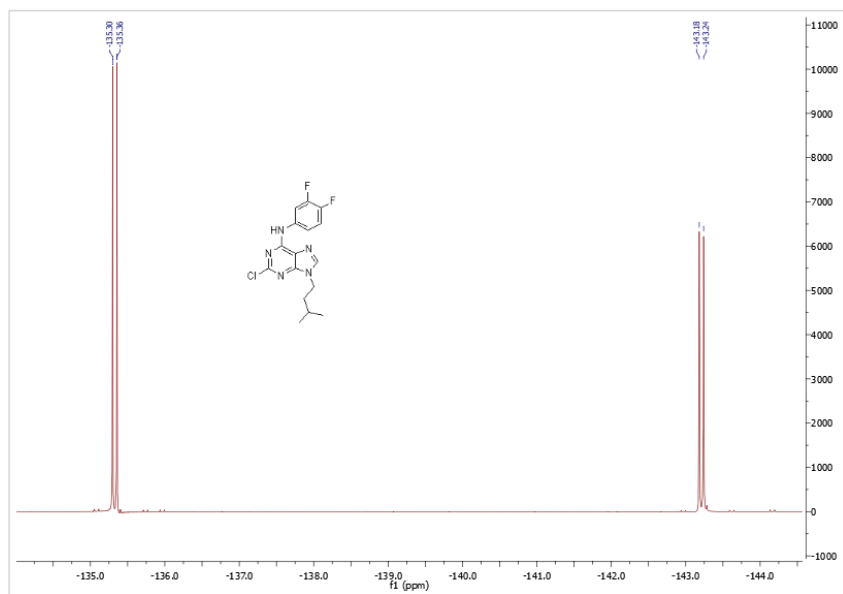
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3u**



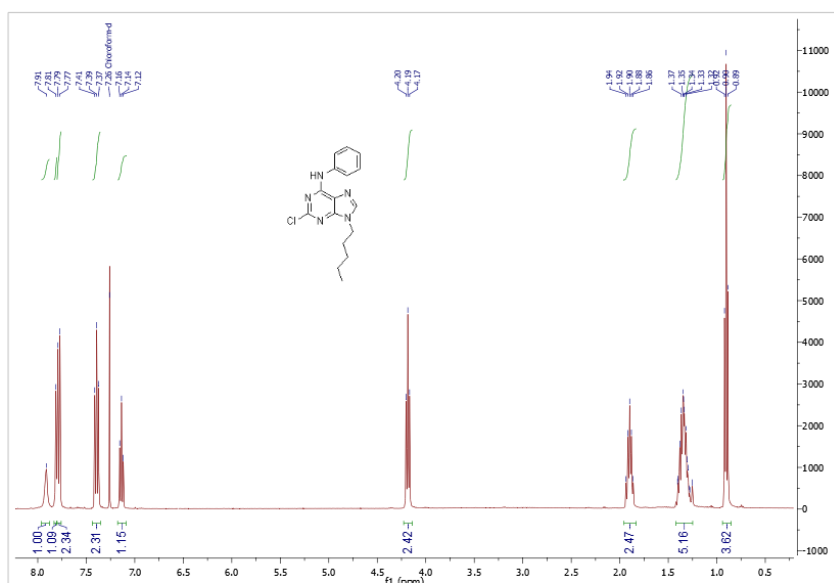
Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **3u**



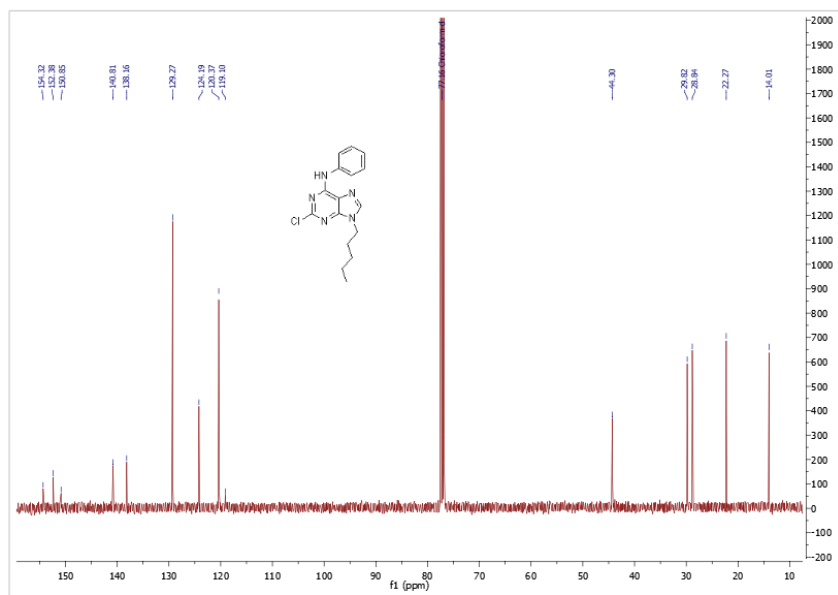
Espectro de ^{19}F -RMN del compuesto **3u**



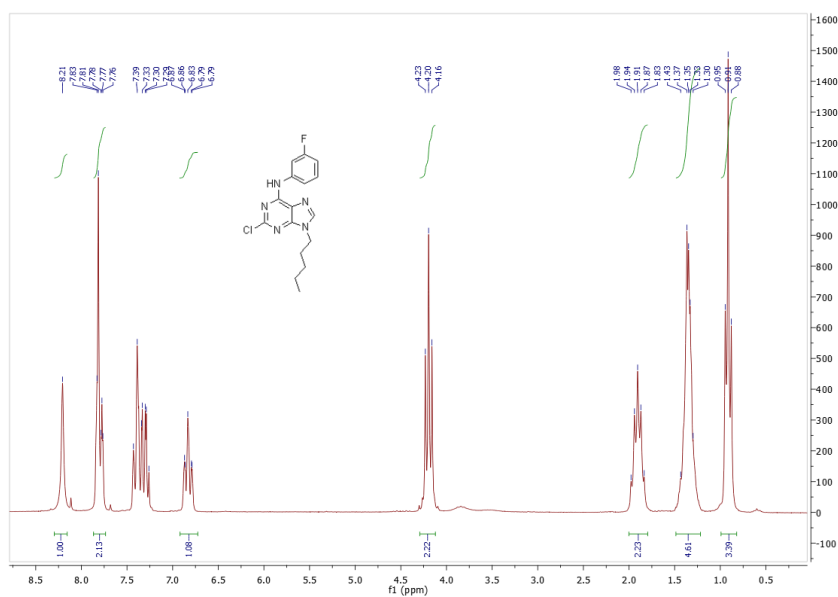
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3v**



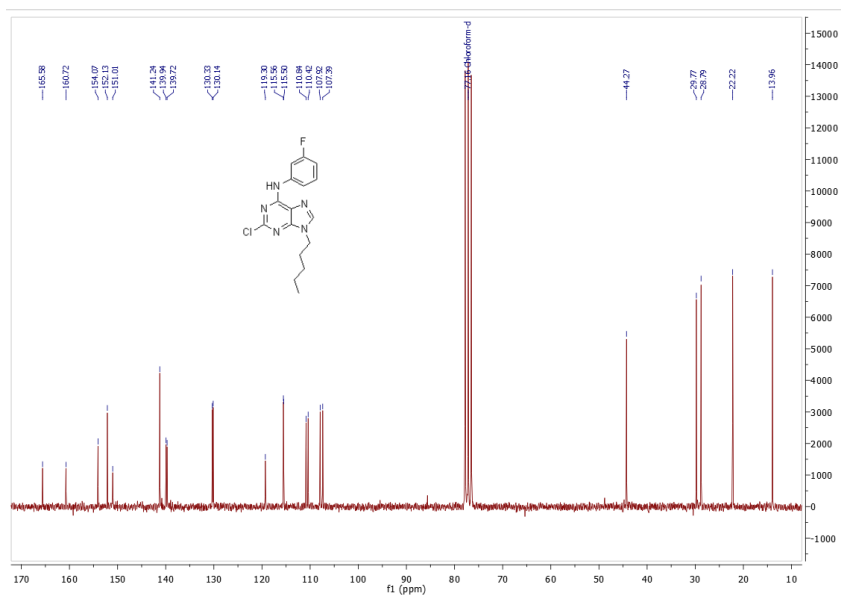
Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **3v**



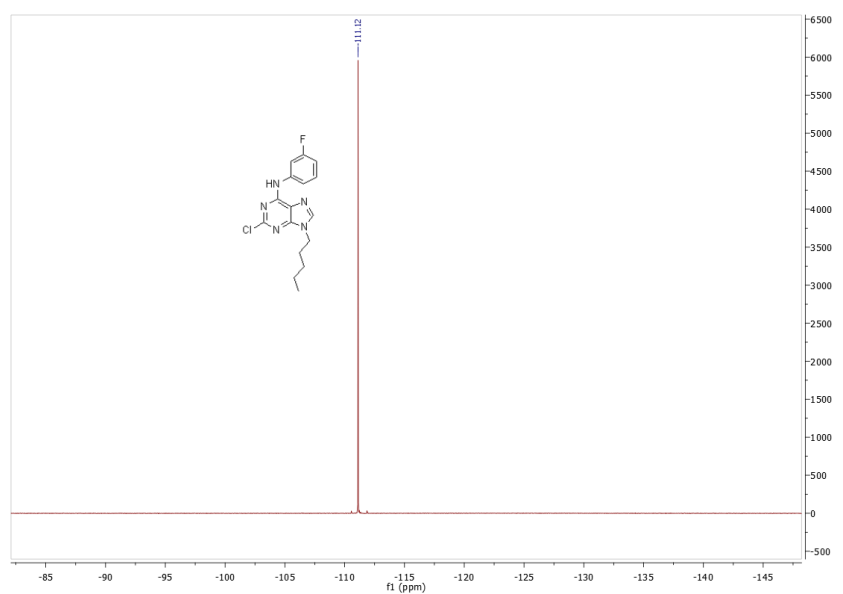
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3w**



Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **3w**



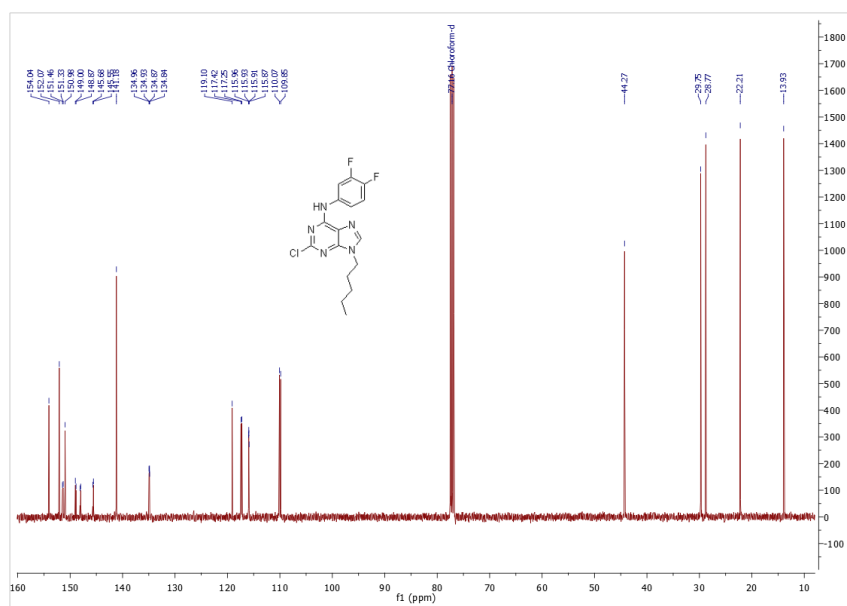
Espectro de ^{19}F -RMN del compuesto **3w**



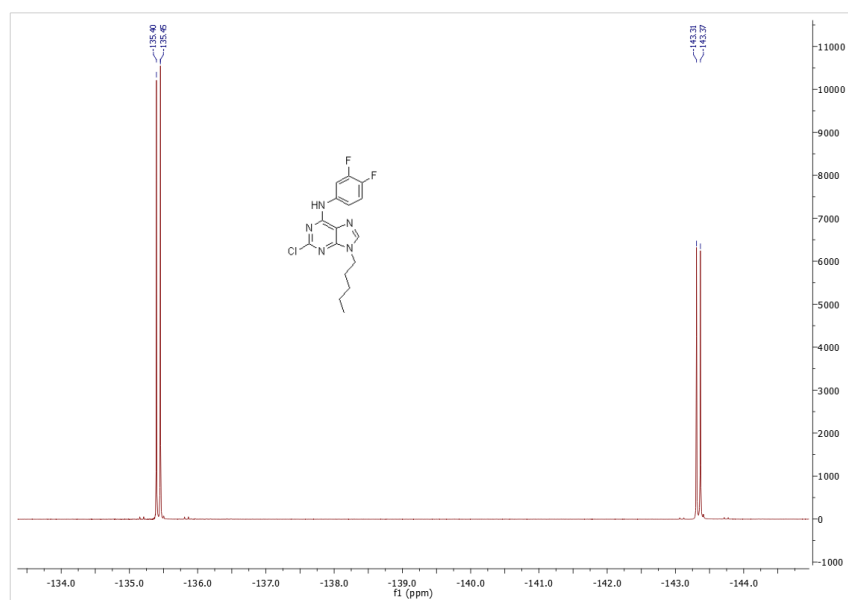
Chemical structure of compound 10: CCCC(O)c1ccc(cc1)c2nc3c(ncn3Cl)nc2

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10. The spectrum shows peaks at 8.40 (s, 1H), 7.89-7.86 (m, 2H), 7.76-7.73 (m, 2H), 7.23-7.20 (m, 2H), 7.12-7.10 (m, 2H), 4.18-4.14 (m, 2H), 3.29 (s, 1H), 1.91-1.89 (m, 2H), 1.85-1.83 (m, 2H), 1.34 (m, 2H), 1.23-1.21 (m, 2H), 1.14-1.12 (m, 2H), and 0.86 (s, 3H). The chemical structure of 10 is shown as an inset.

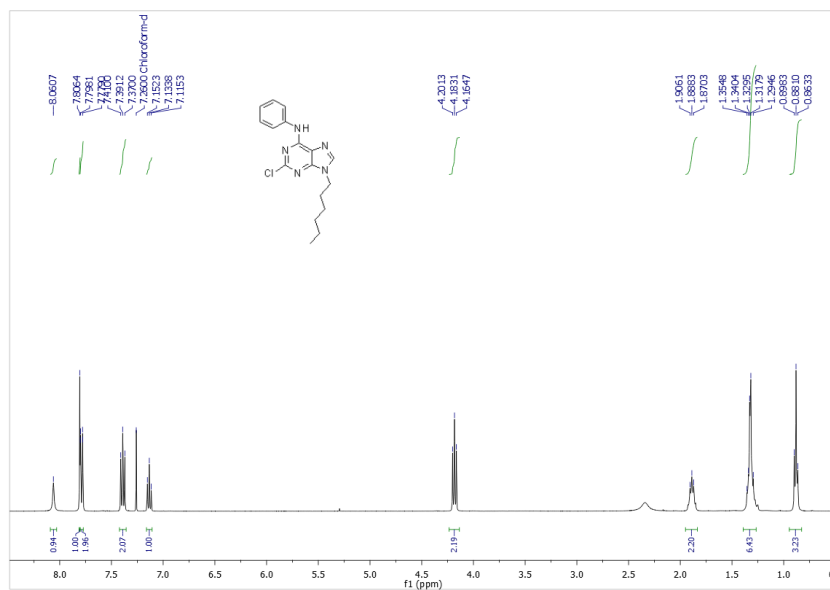
Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **3x**



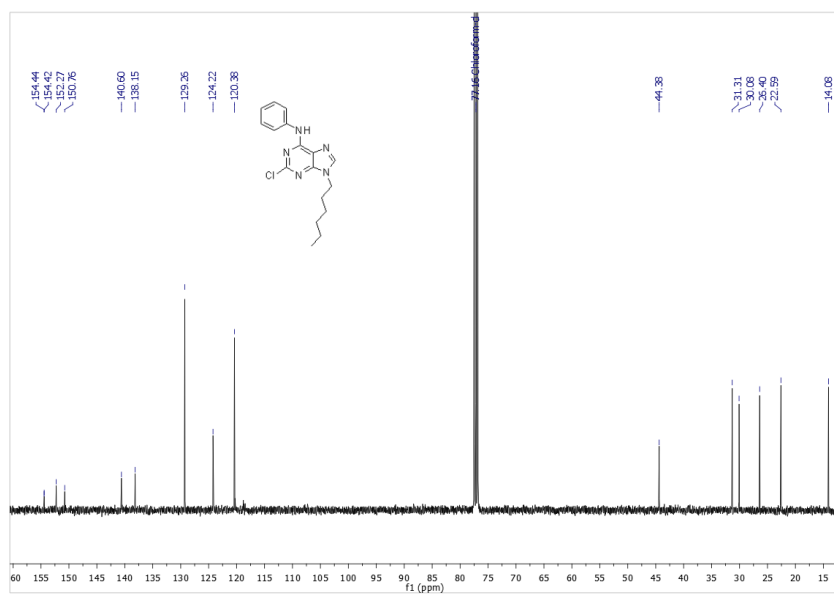
Espectro de ^{19}F -RMN del compuesto **3x**



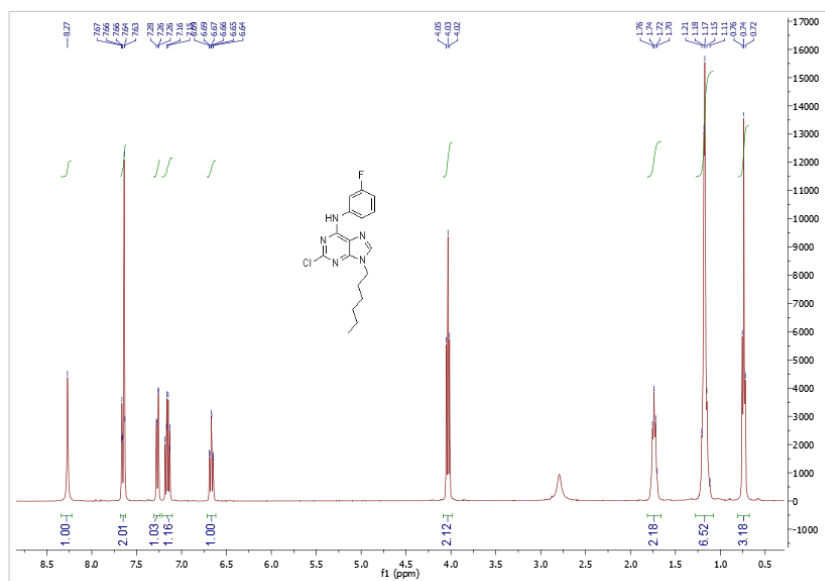
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3y**



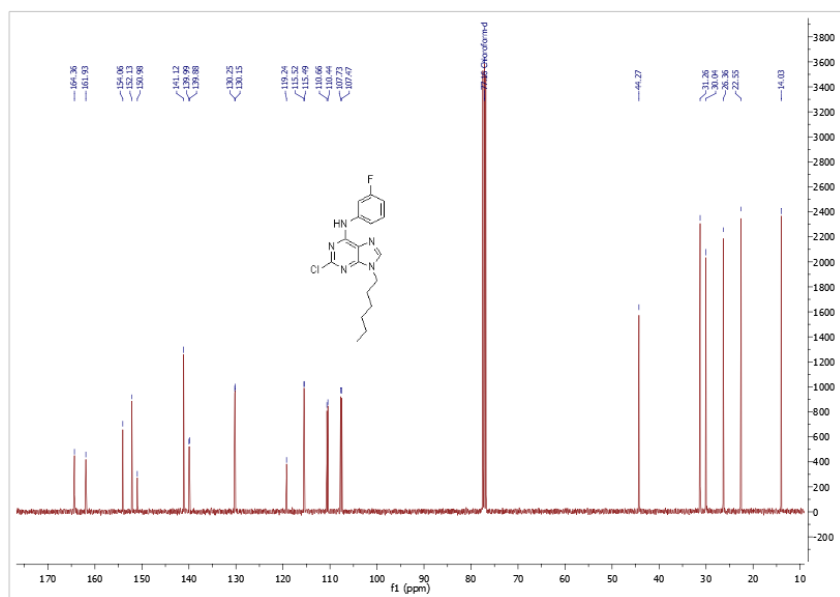
Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **3y**



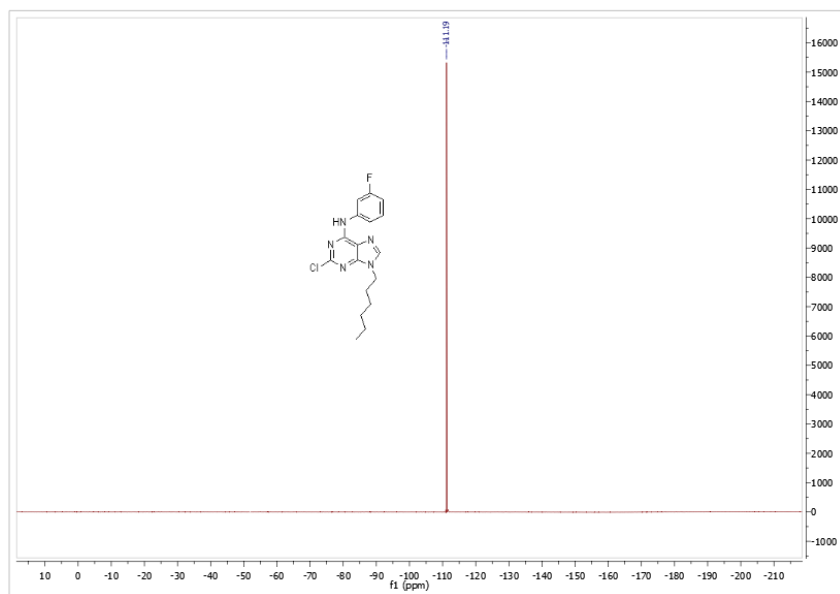
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3z**



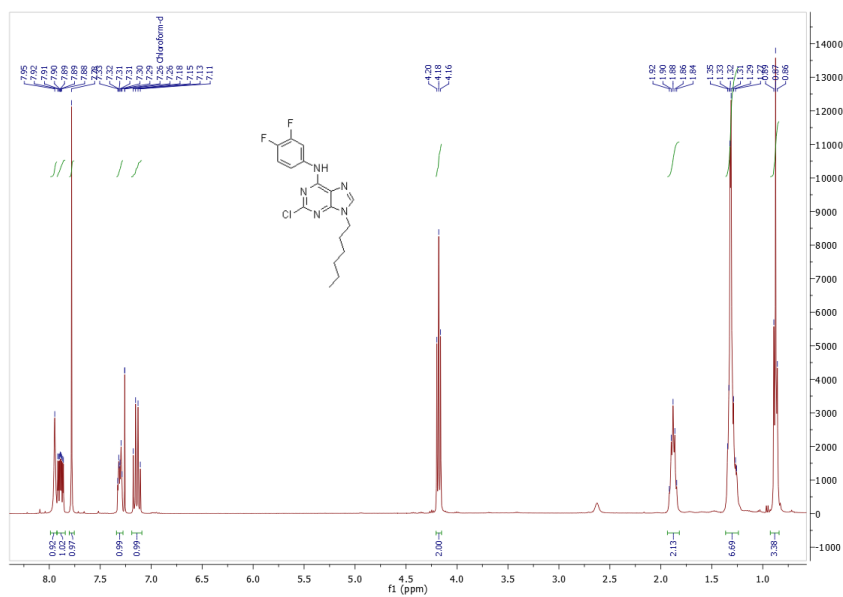
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3z**



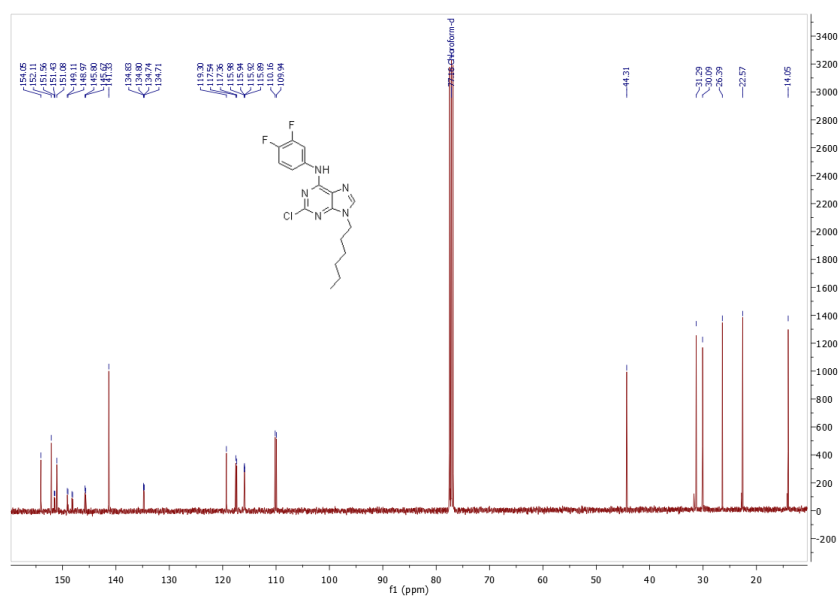
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3z**



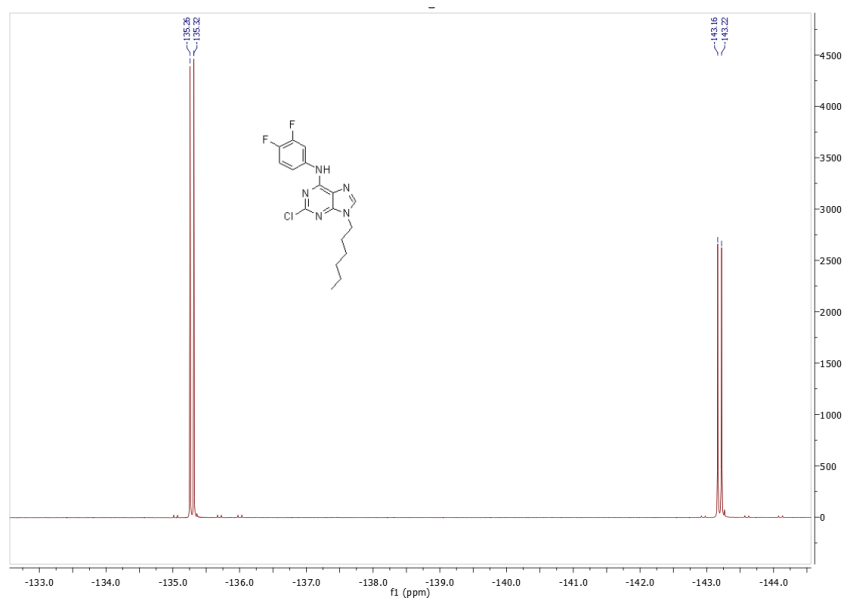
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3aa**

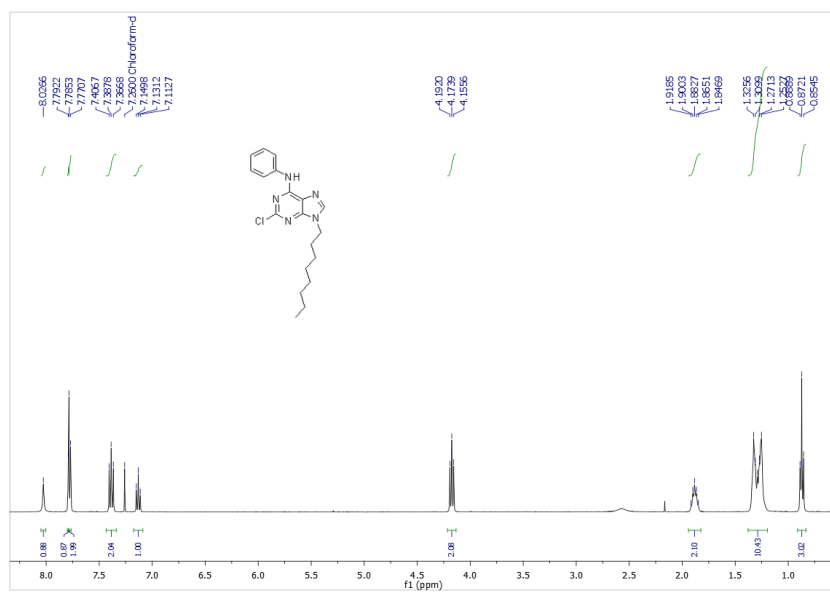


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3aa**

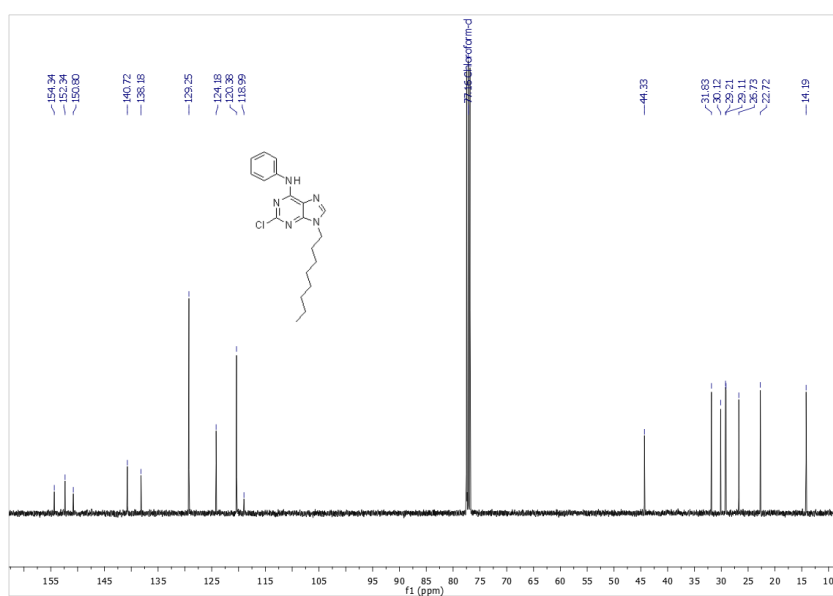


Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3aa**

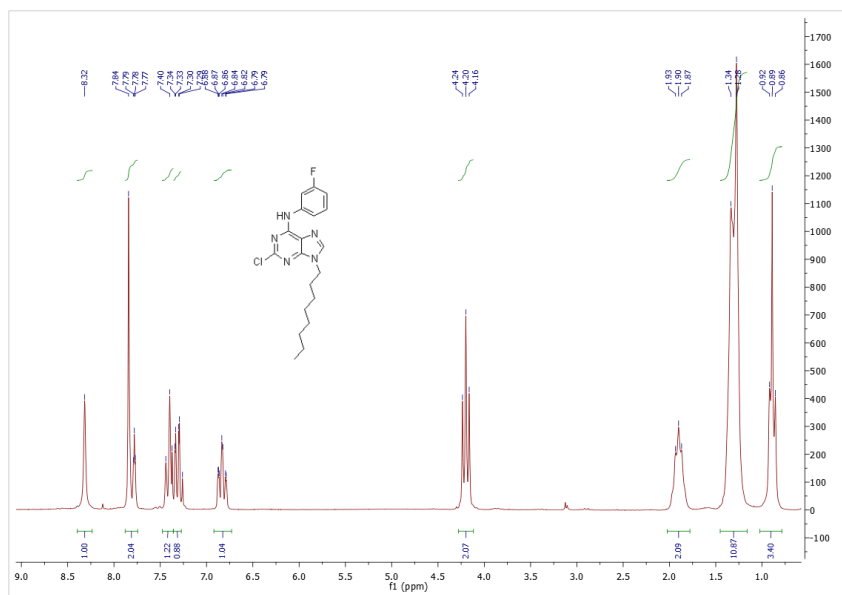




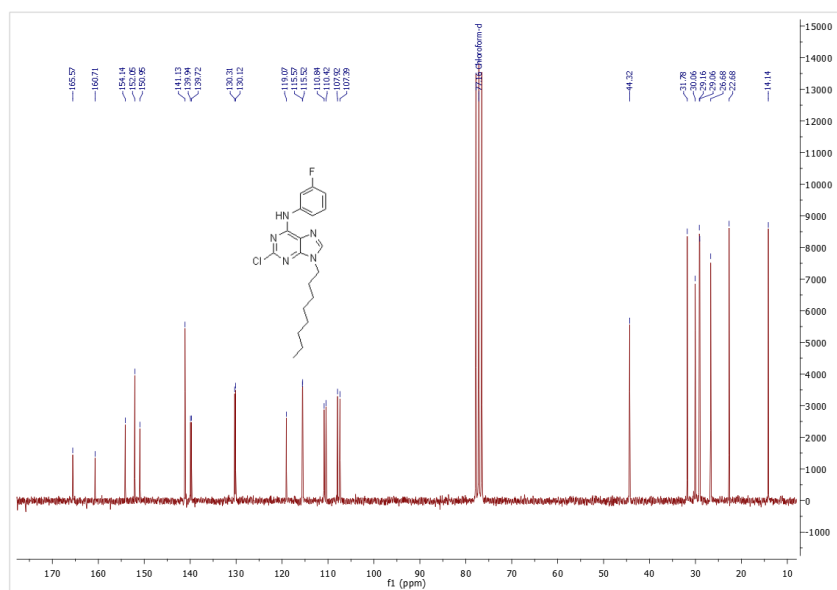
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3ab**



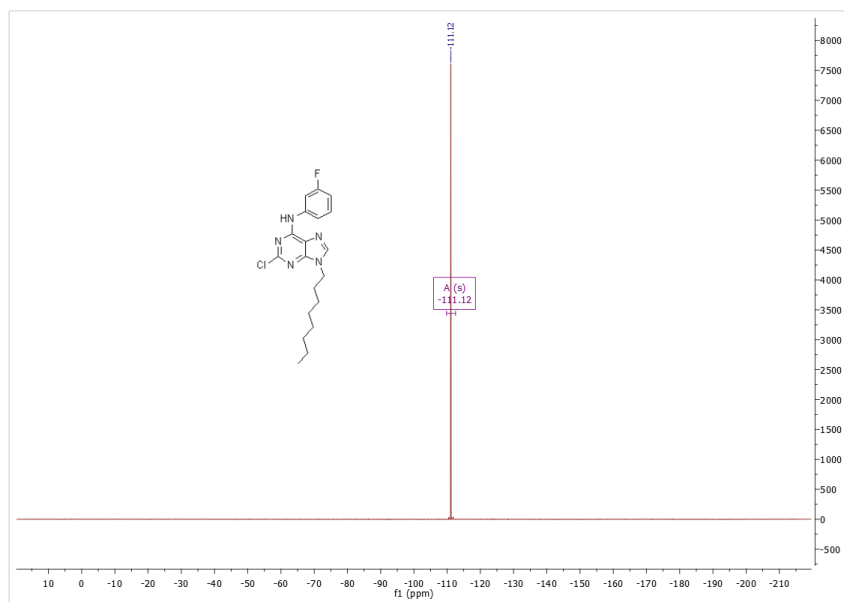
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3ac**



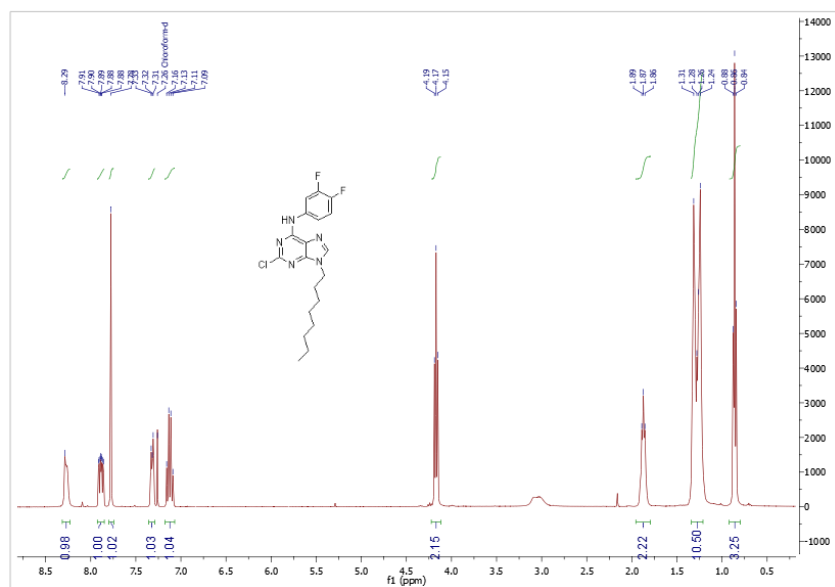
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3ac**



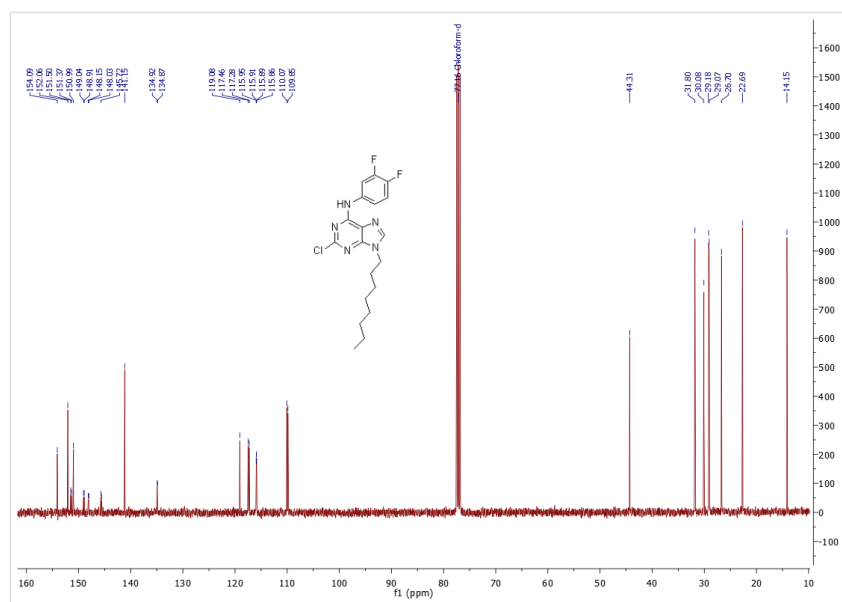
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3ac**



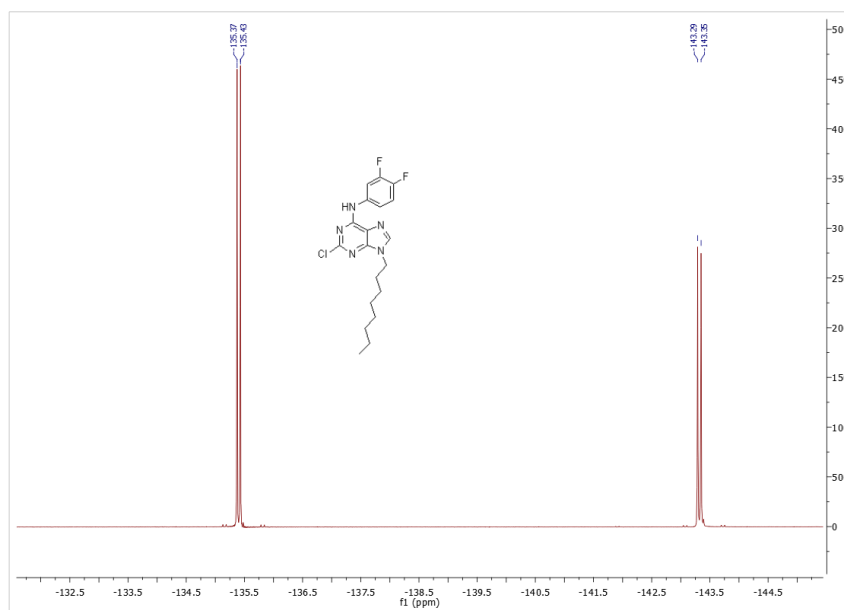
Espectro de ^1H RMN del compuesto **3ad**



Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3ad**

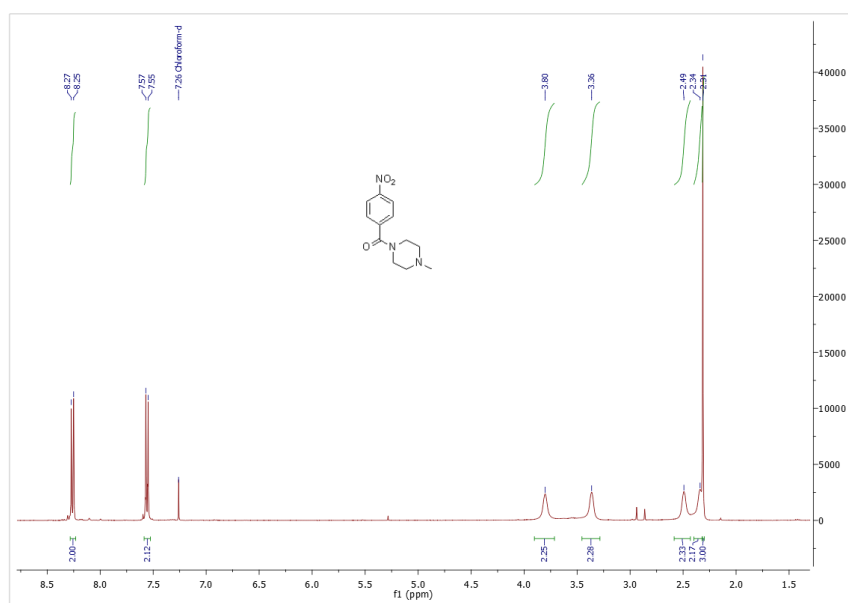


Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **3ad**

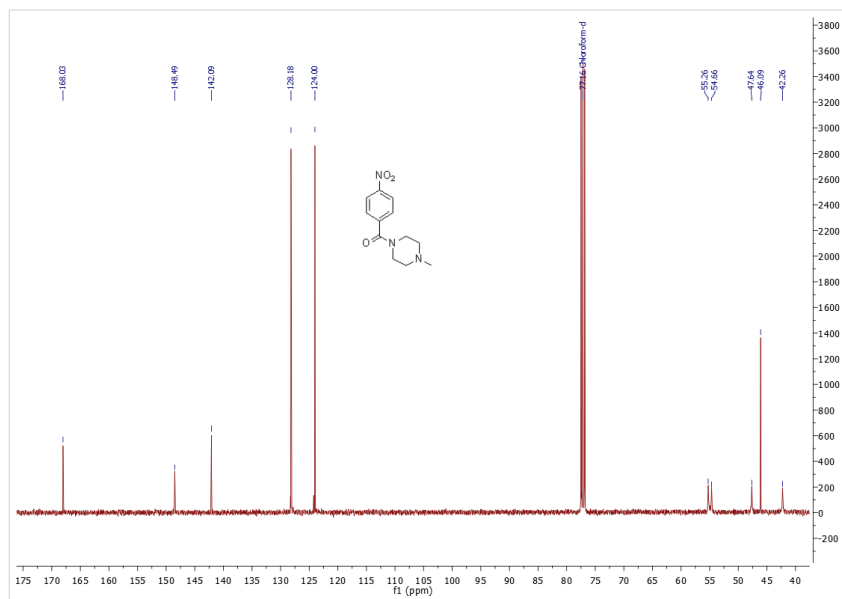


8.1.23 Espectros RMN del derivado 5

Espectro de ^1H RMN del compuesto 5

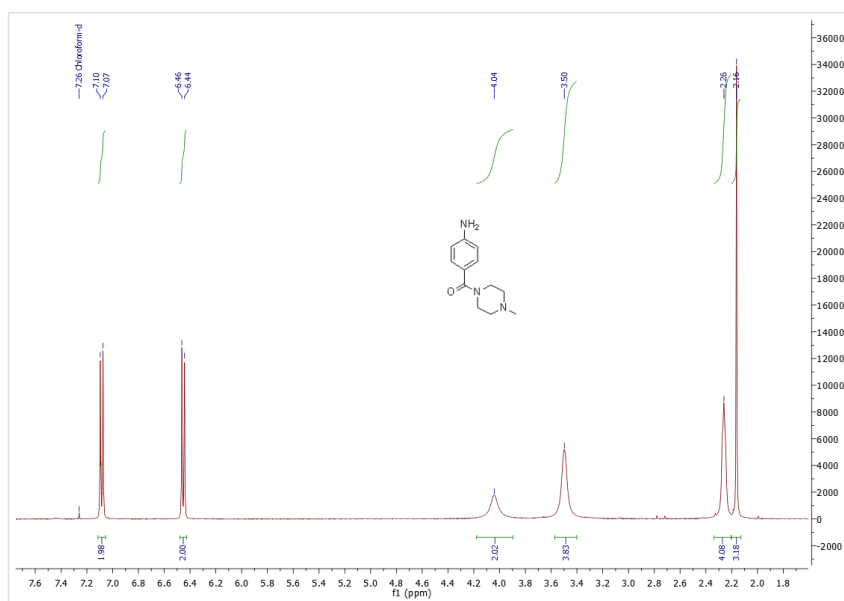


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **5**

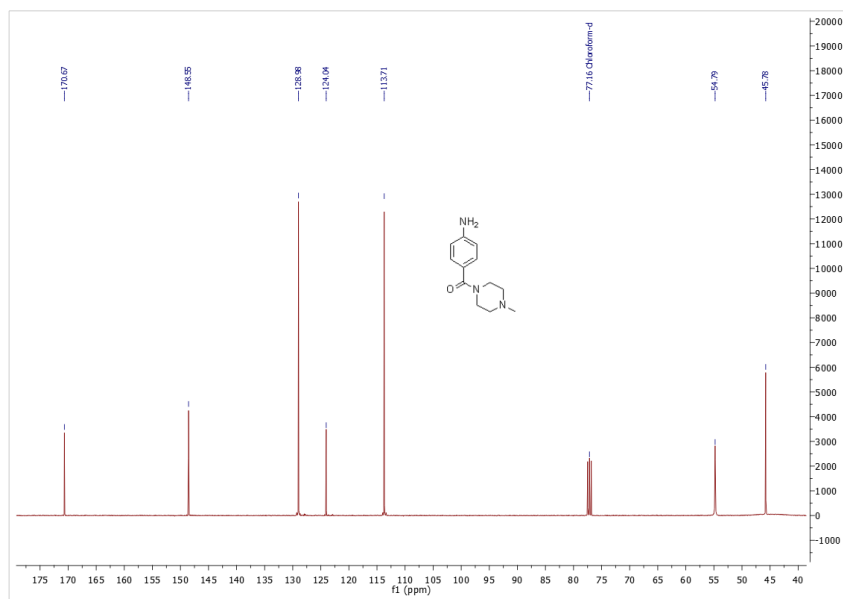


8.1.24 Espectros RMN del derivado 6

Espectro de ^1H RMN del compuesto 6

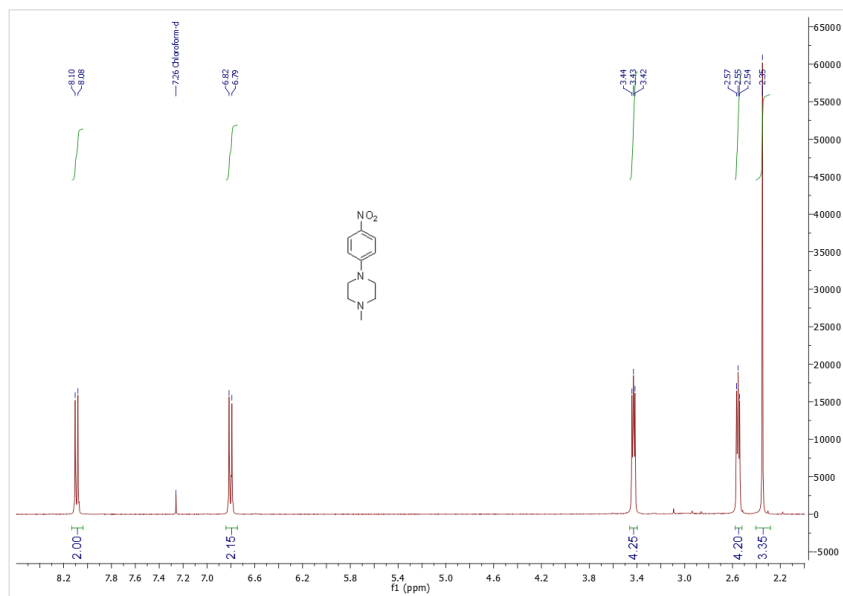


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **6**

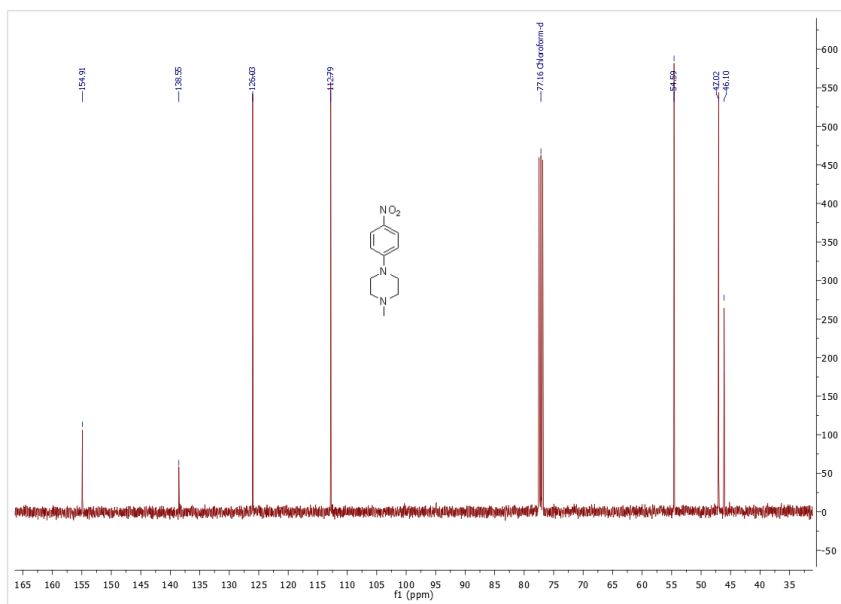


8.1.25 Espectros RMN del derivado 8a–b

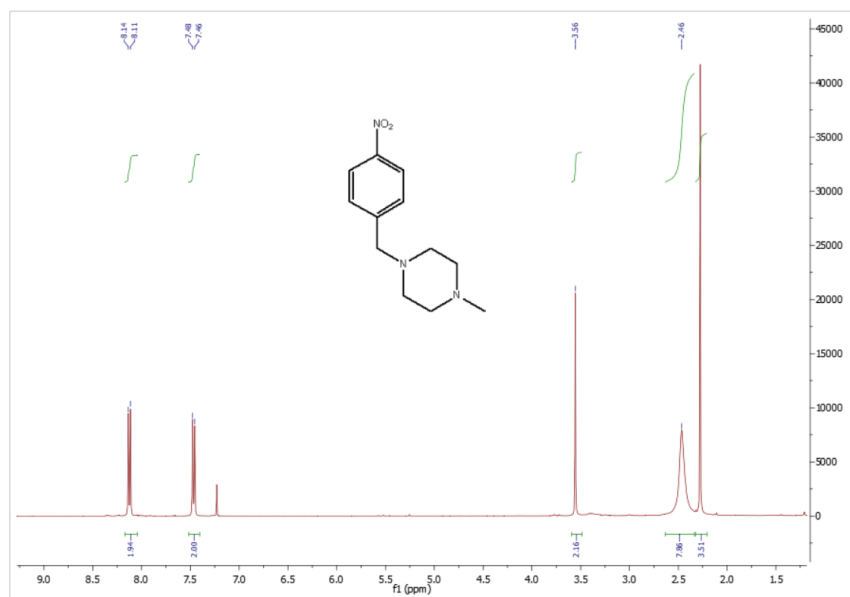
Espectro de ^1H RMN del compuesto **8a**



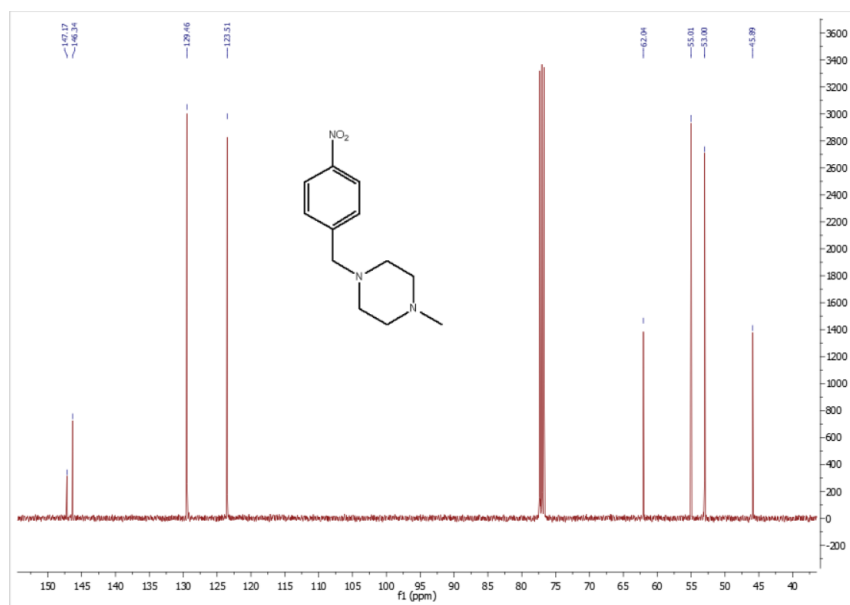
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **8a**



Espectro de ^1H RMN del compuesto **8b**

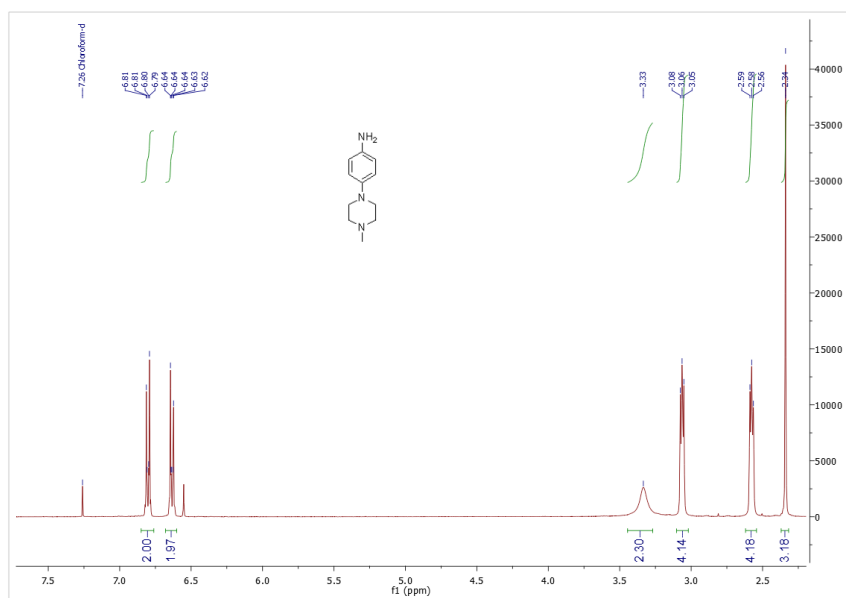


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **8b**

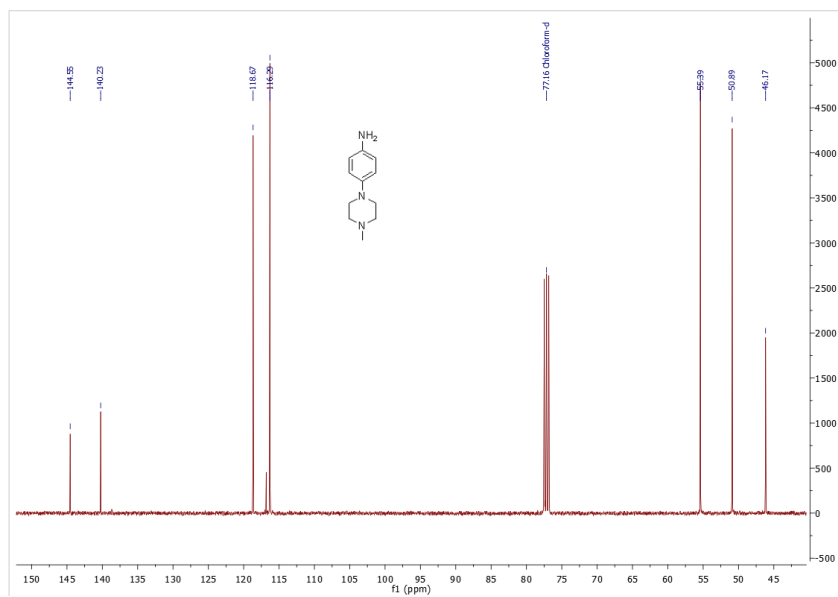


8.1.26 Espectros RMN del derivado 9a–b

Espectro de ^1H RMN del compuesto **9a**

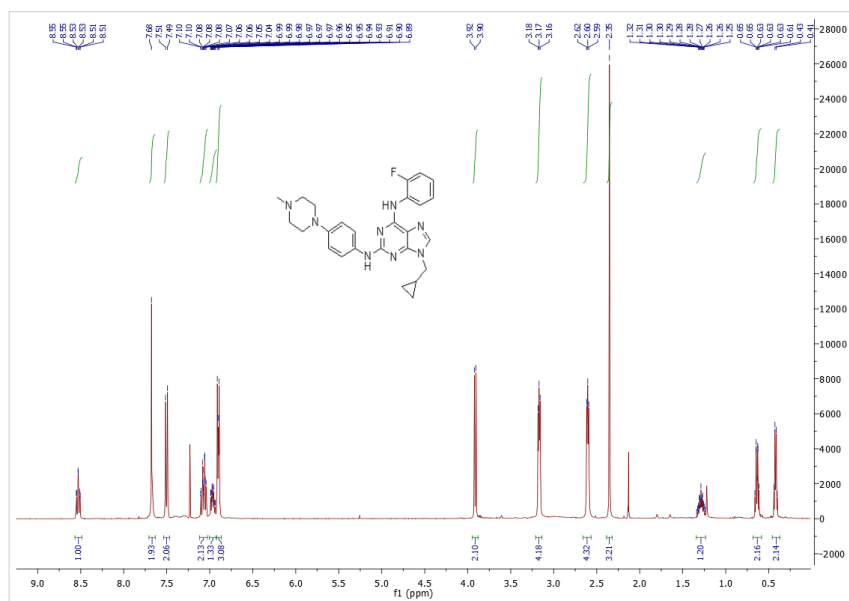


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **9a**

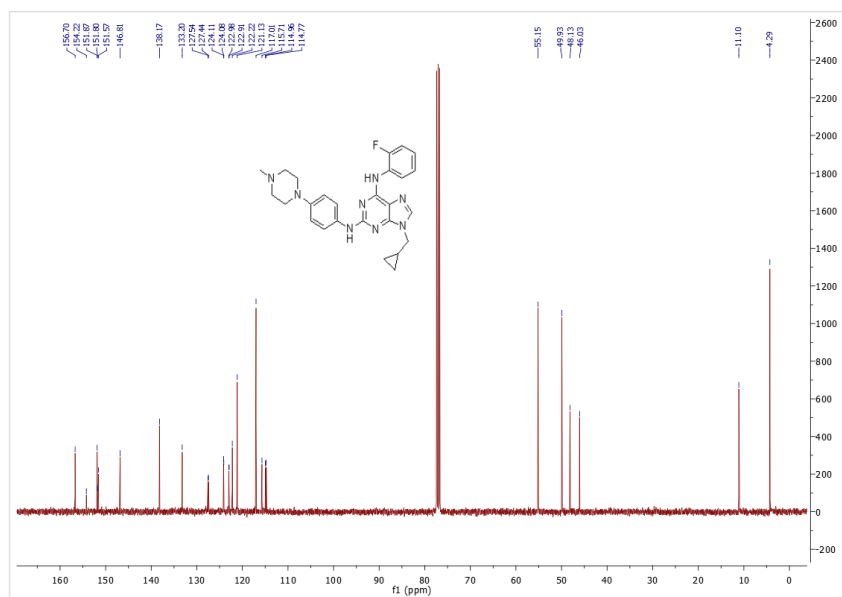


8.1.27 Espectros RMN de los compuestos finales 10a–o

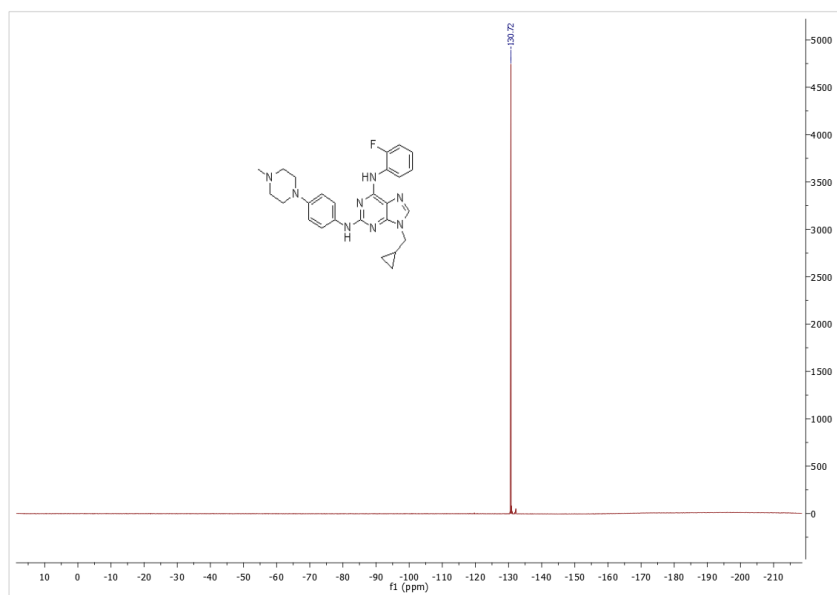
Espectro de ^1H RMN del compuesto **10a**



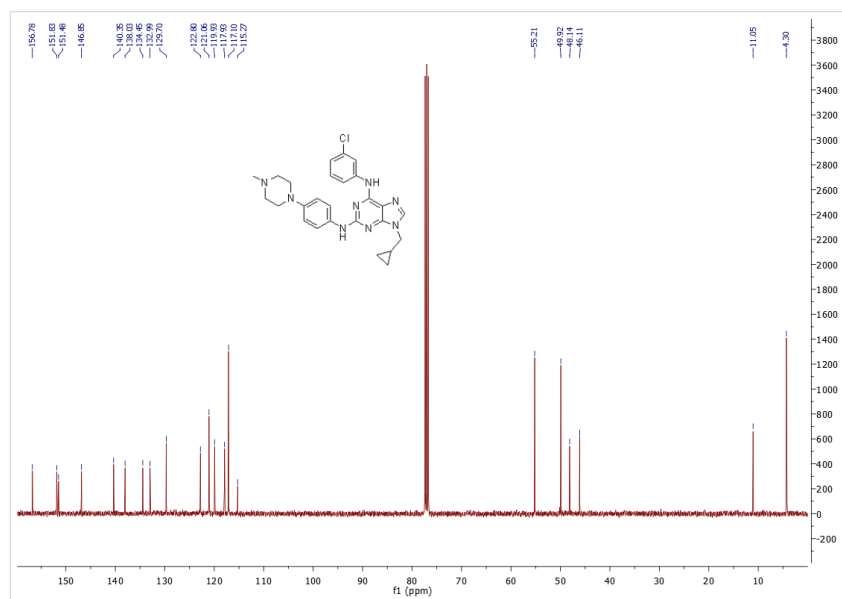
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10a**



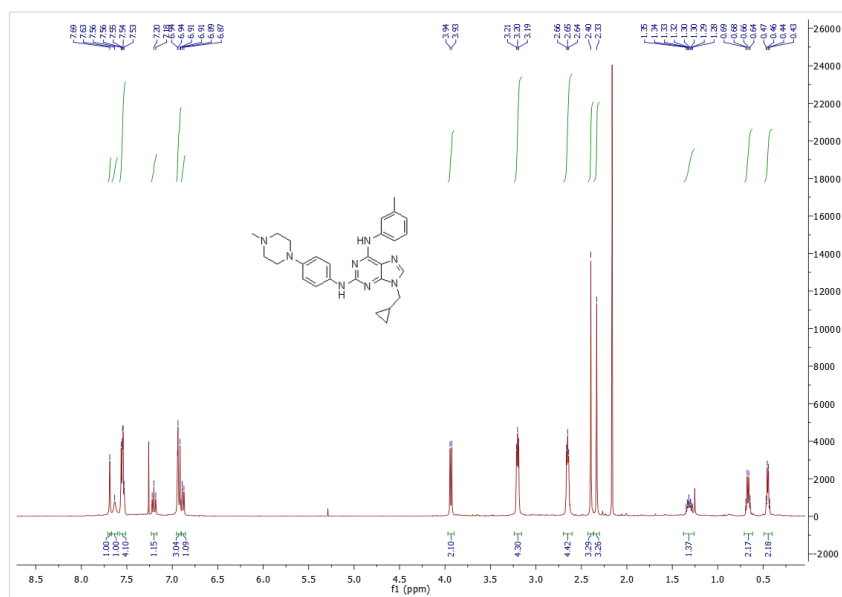
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **10a**



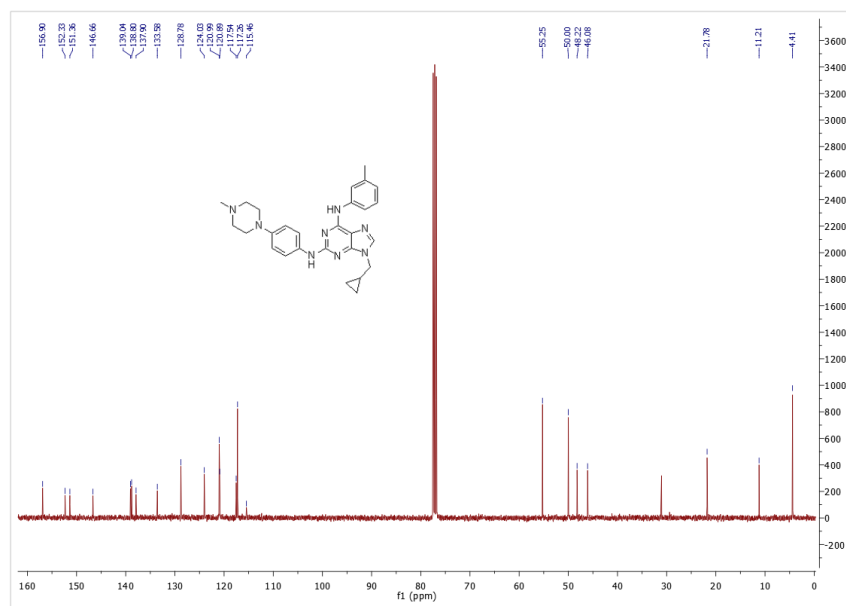
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10b**

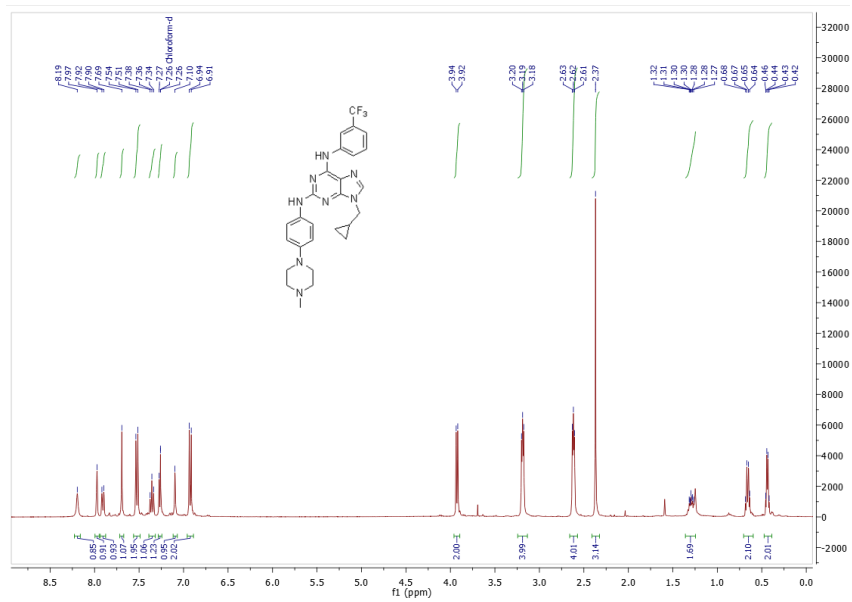


Espectro de ^1H RMN del compuesto **10c**

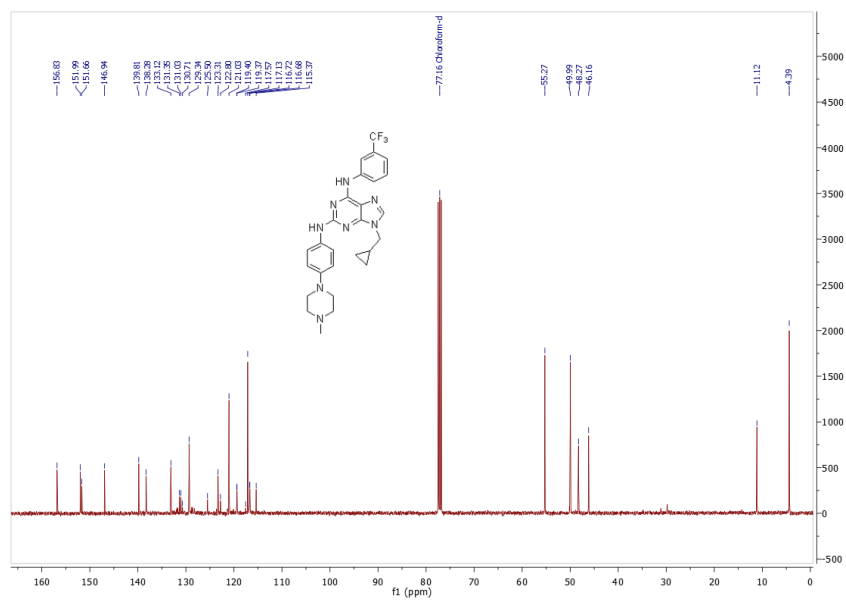


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10c**

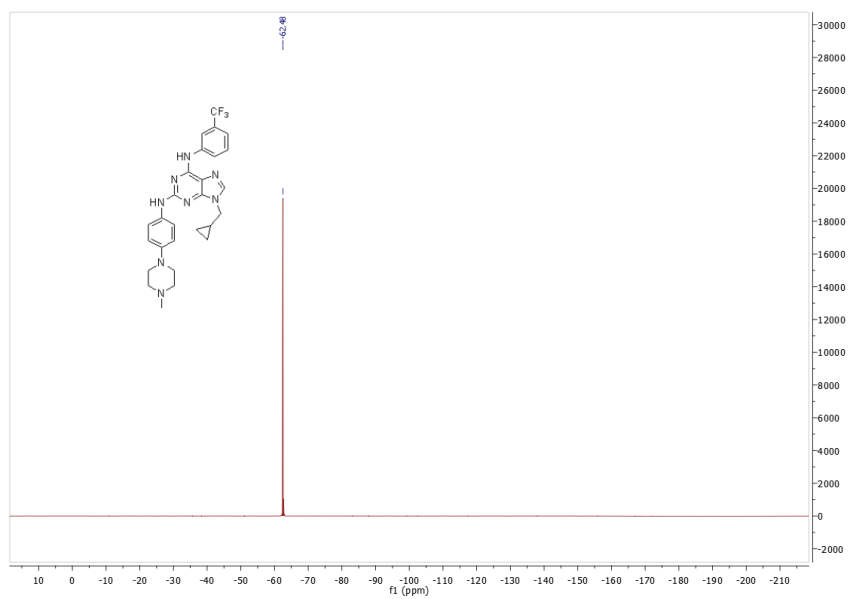




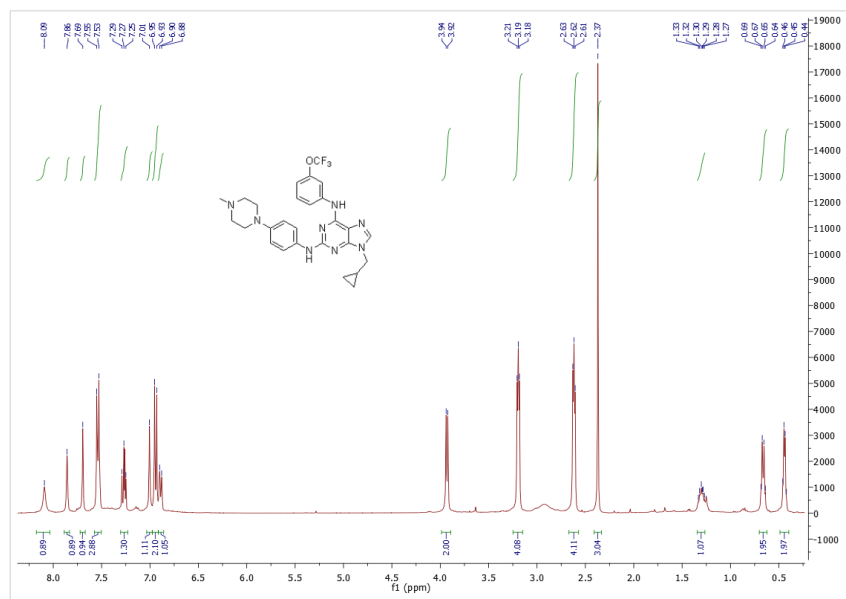
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10d**



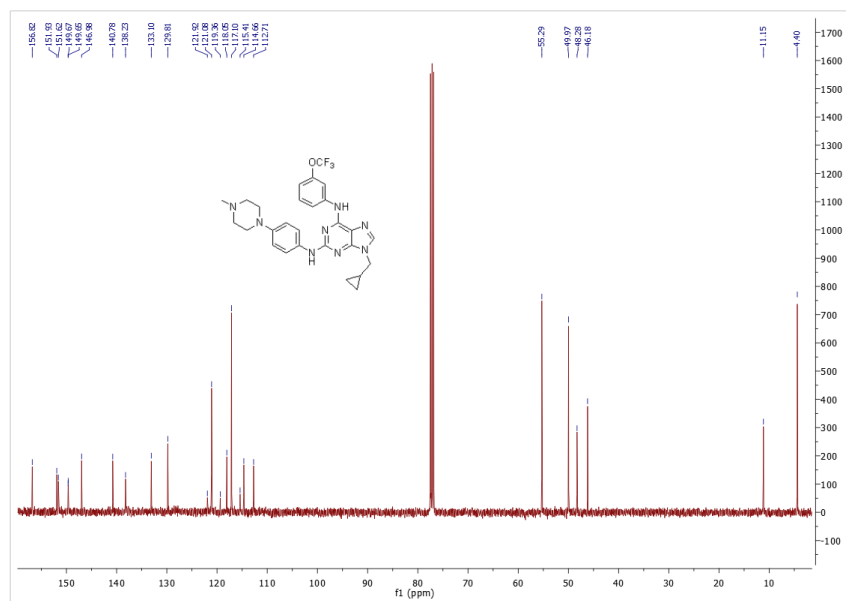
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **10d**



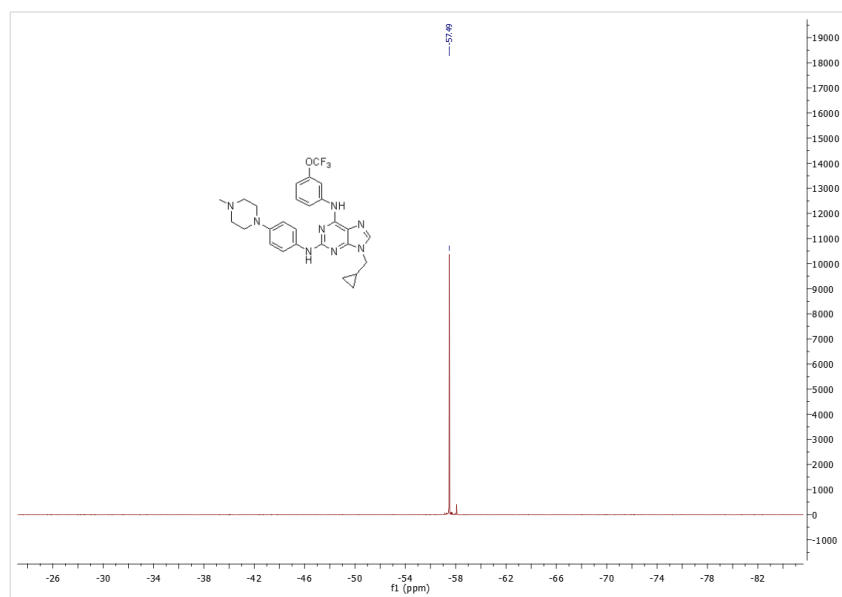
Espectro de ^1H RMN del compuesto **10e**



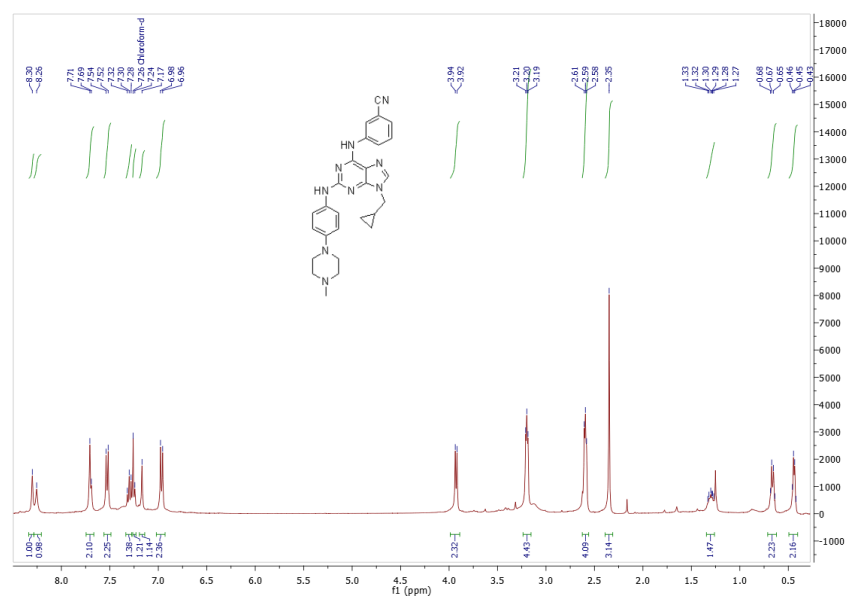
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10e**



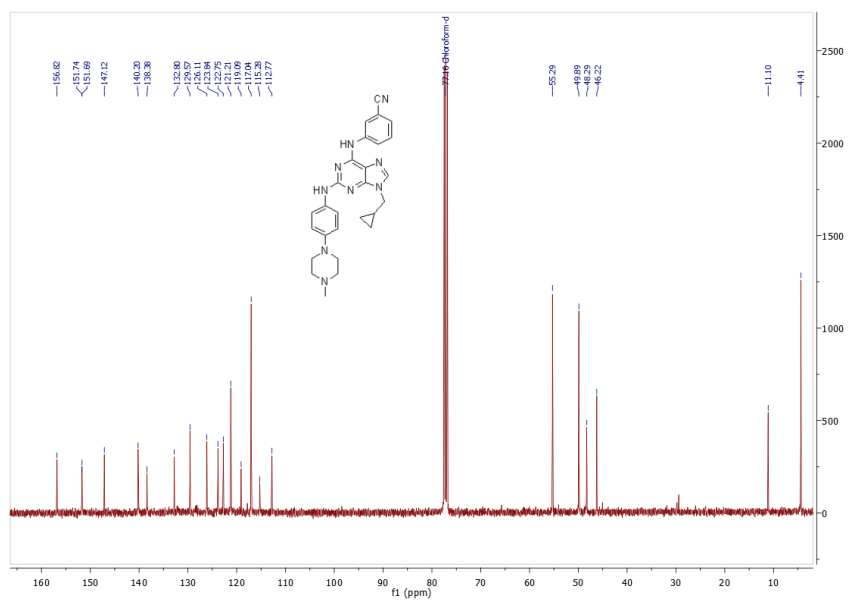
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **10e**



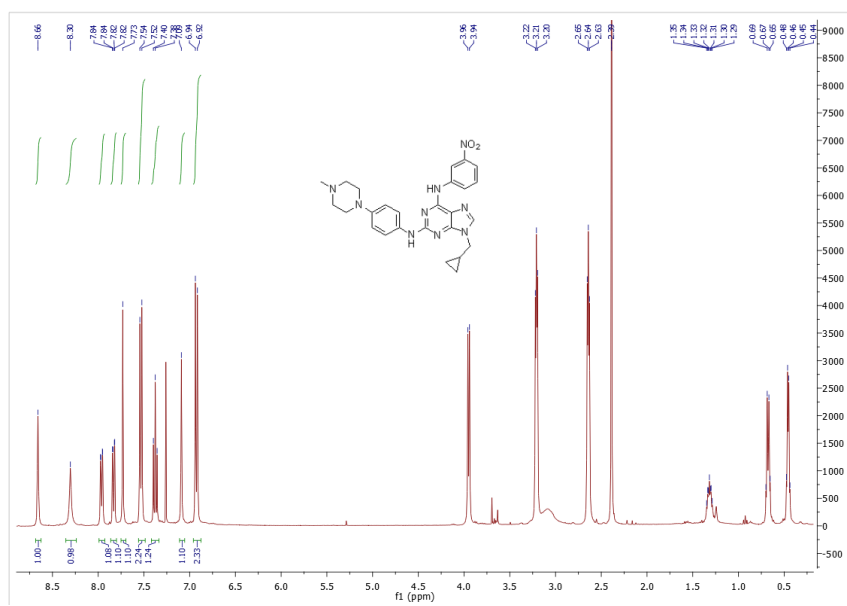
Espectro de ^1H RMN del compuesto **10f**



Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10f**



Espectro de ^1H RMN del compuesto **10g**



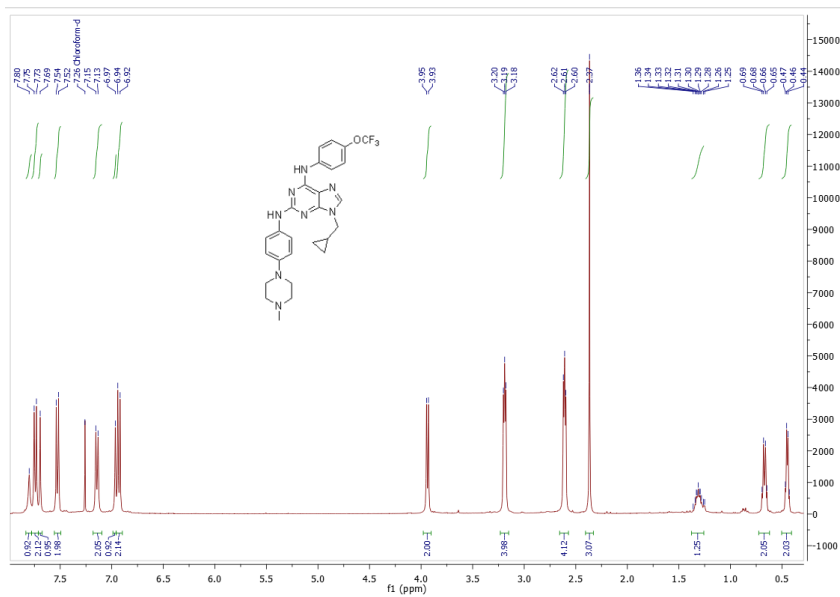
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10g**

Chemical structure of compound **10g** is shown above the spectrum.

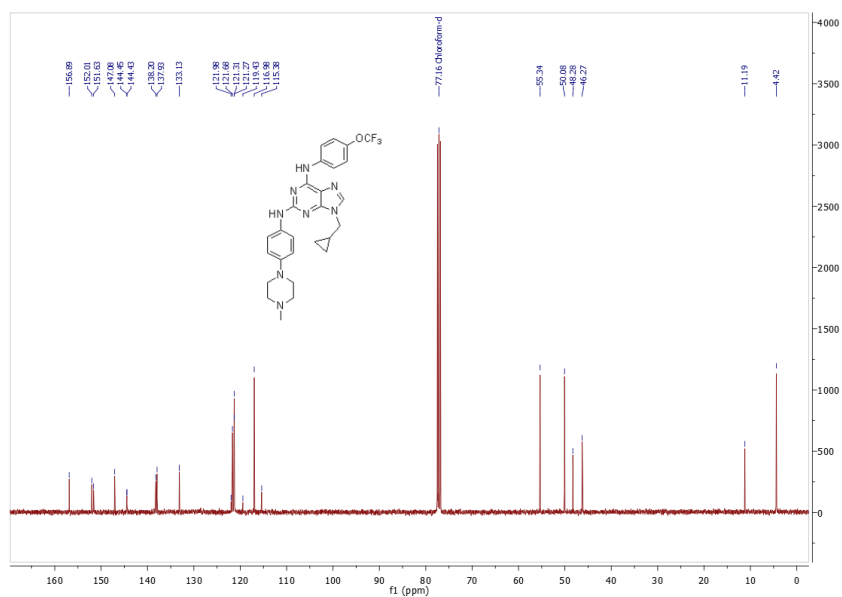
Chemical shift values (ppm) are listed on the left and right sides of the spectrum:

- 156.76
- 151.86
- 151.73
- 149.74
- 147.04
- 146.50
- 138.35
- 132.89
- 129.40
- 128.57
- 121.24
- 117.32
- 117.17
- 115.39
- 114.66
- 55.22
- 49.90
- 48.35
- 46.11
- 11.14
- 4.44

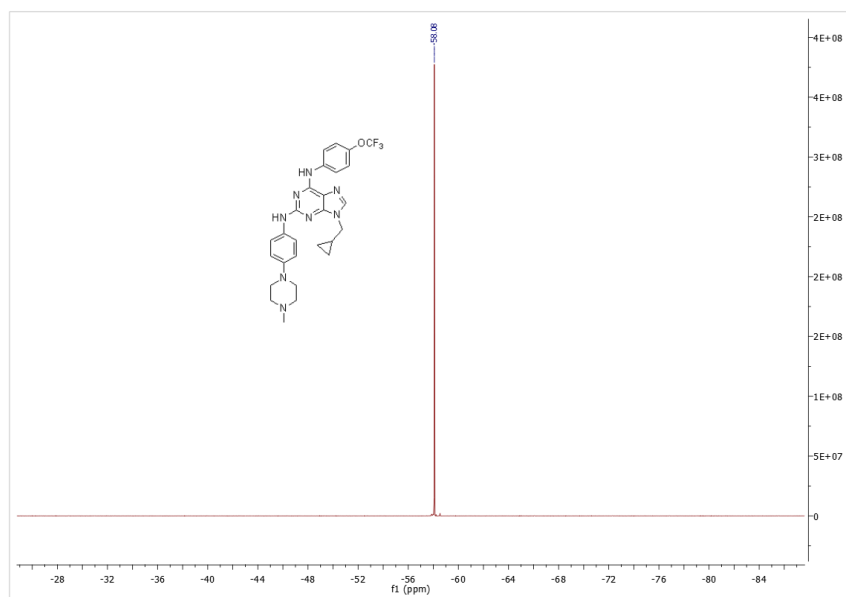
Espectro de ^1H RMN del compuesto **10h**



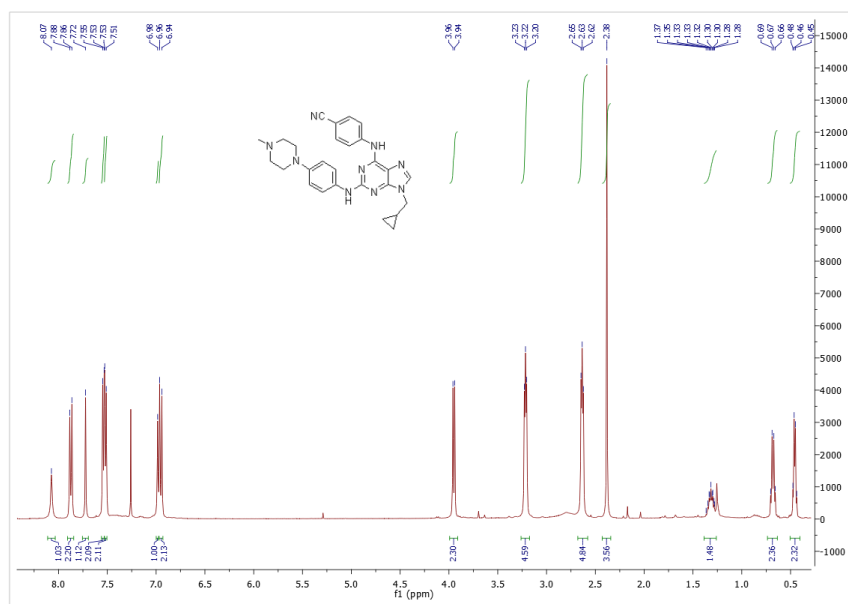
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10h**



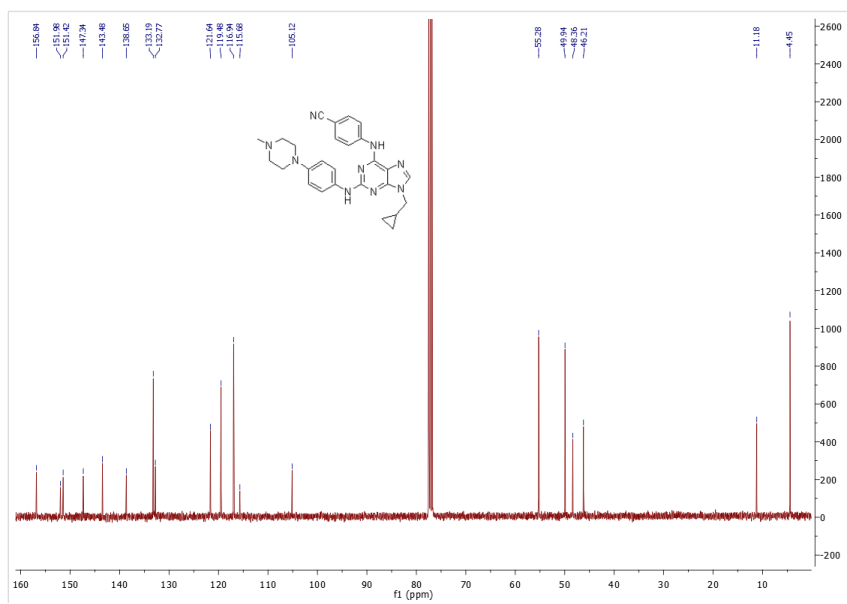
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **10h**



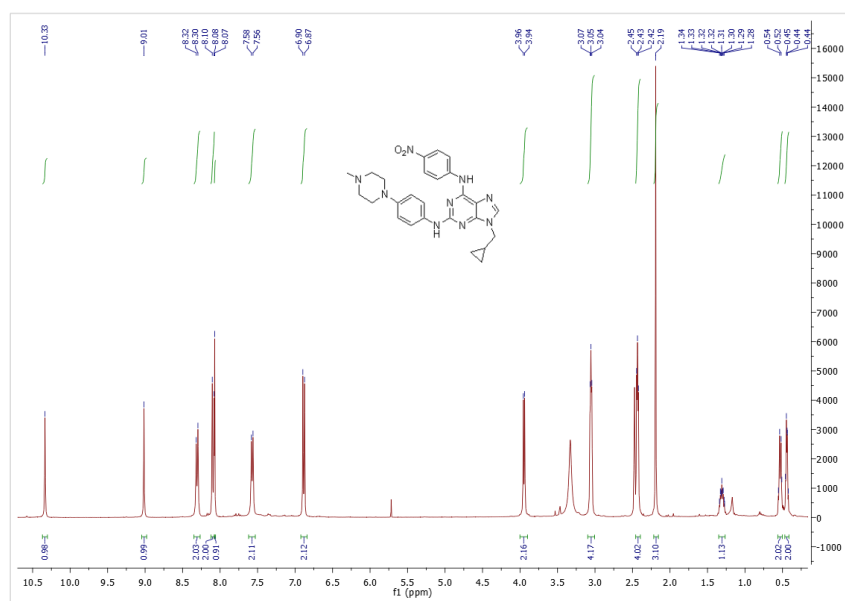
Espectro de ^1H RMN del compuesto **10i**



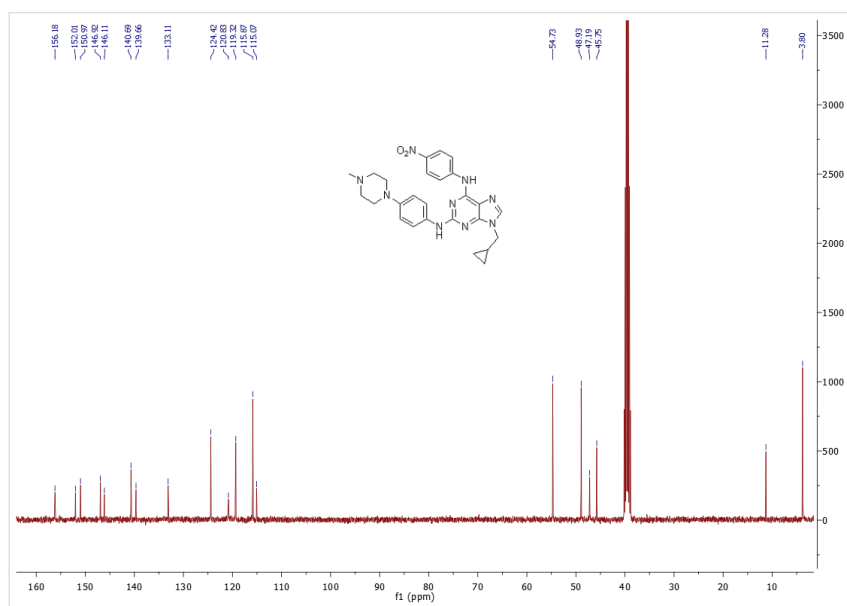
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10i**



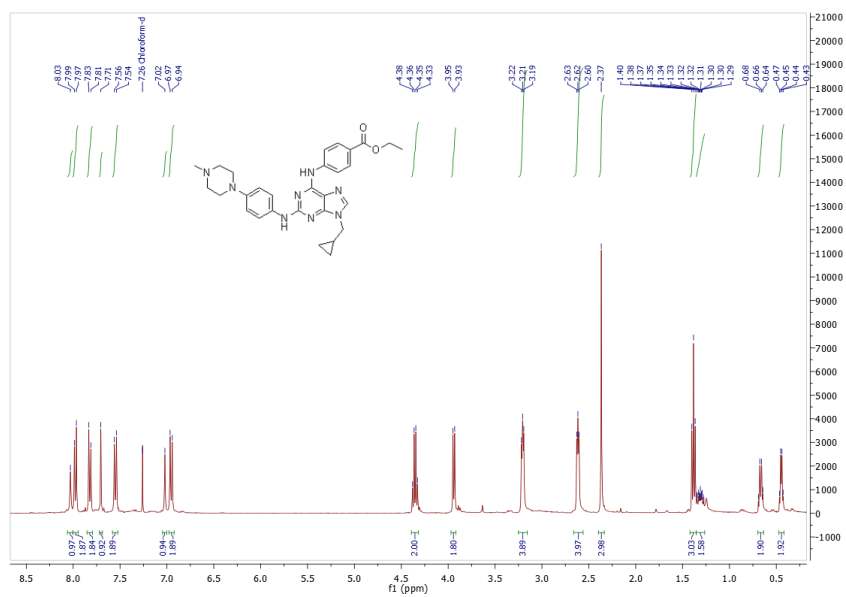
Espectro de ^1H RMN del compuesto **10j**



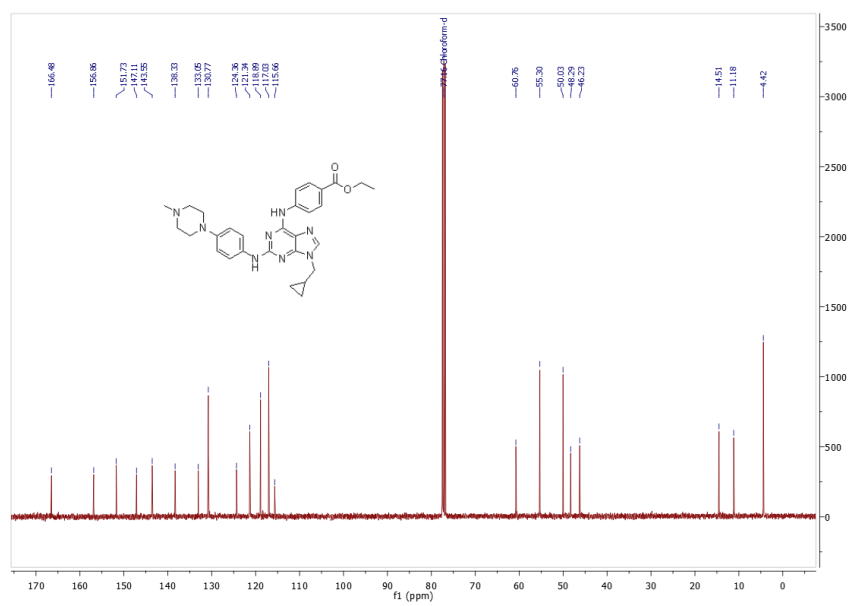
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10j**



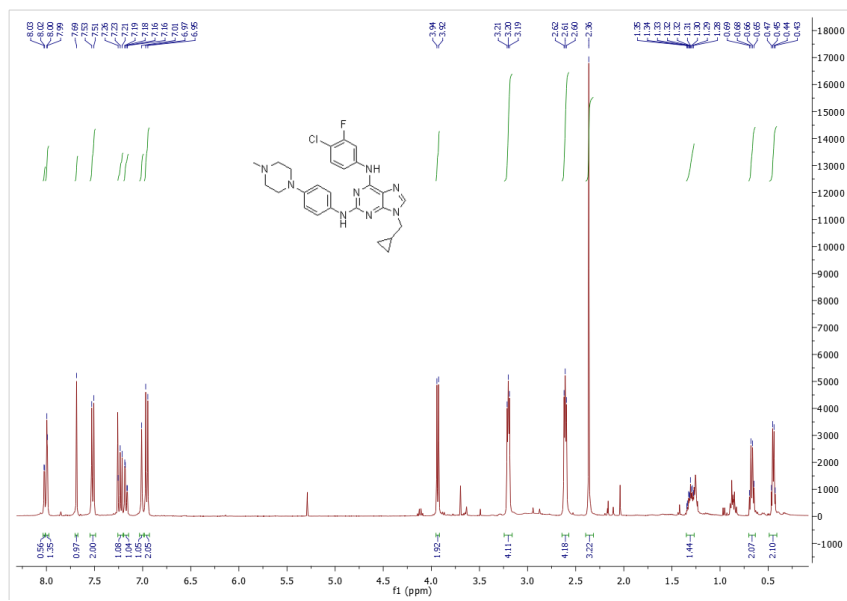
Espectro de ^1H RMN del compuesto **10k**



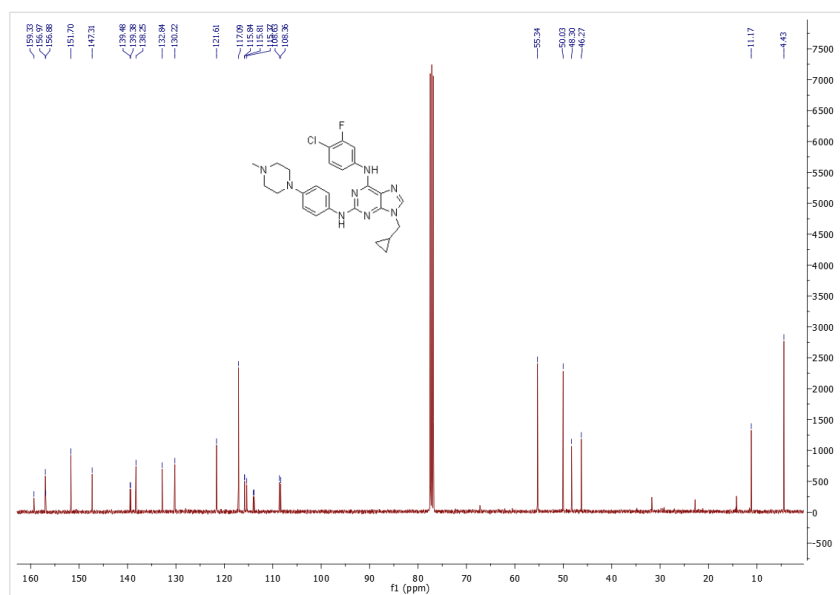
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10k**



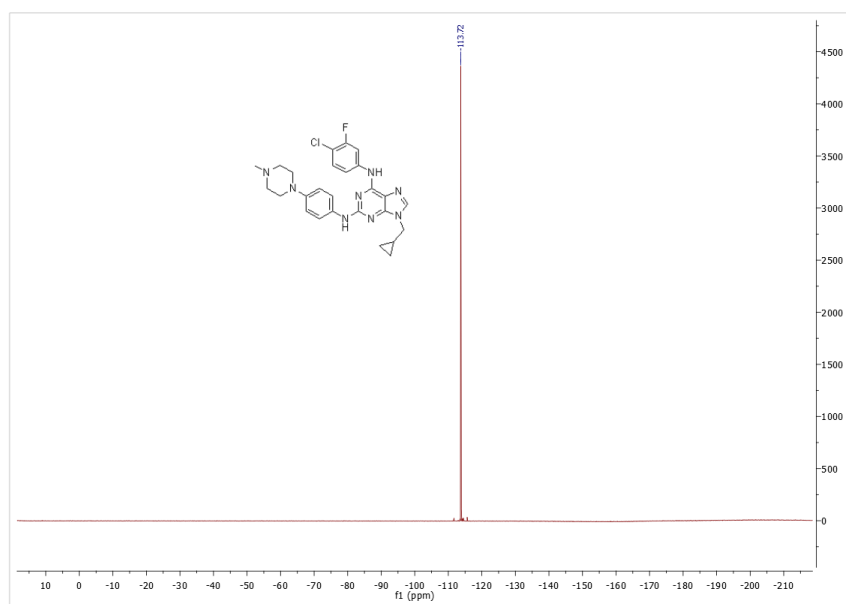
Espectro de ^1H RMN del compuesto **10I**



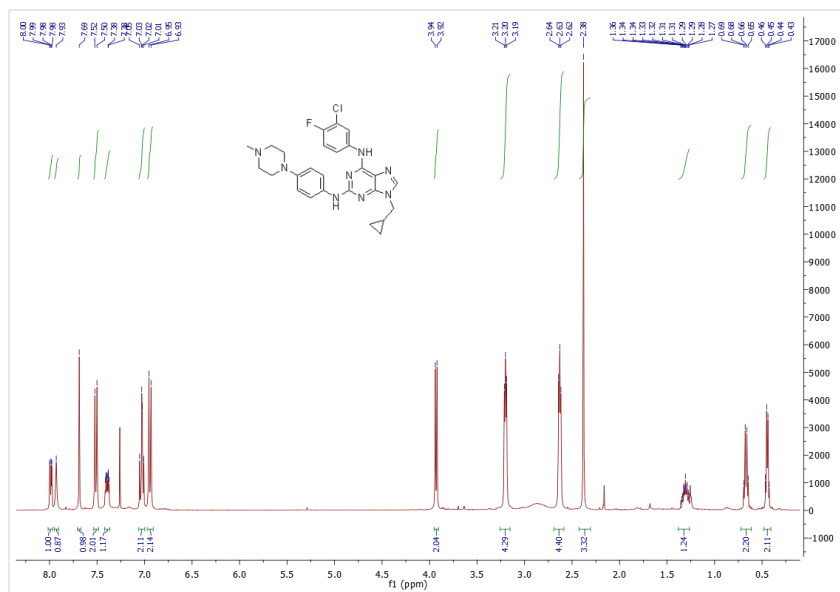
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10I**



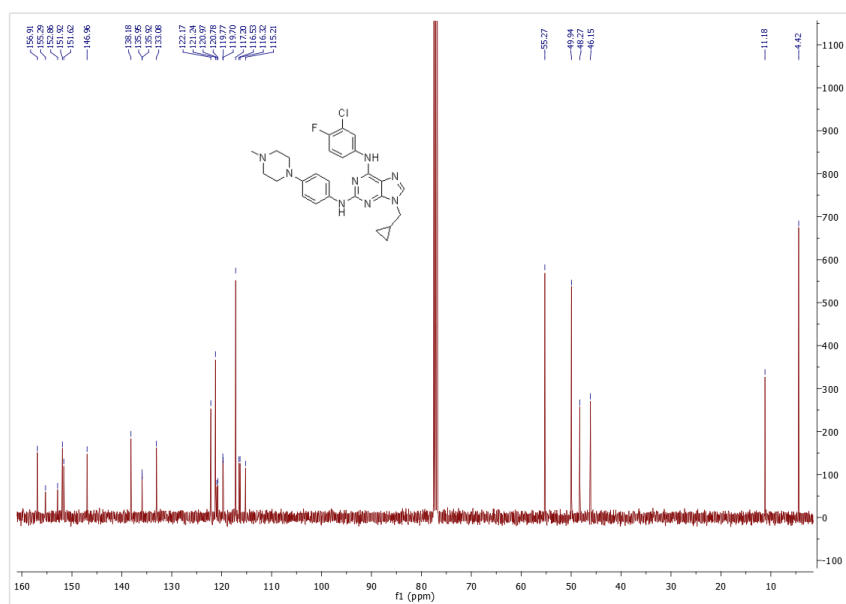
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **10I**



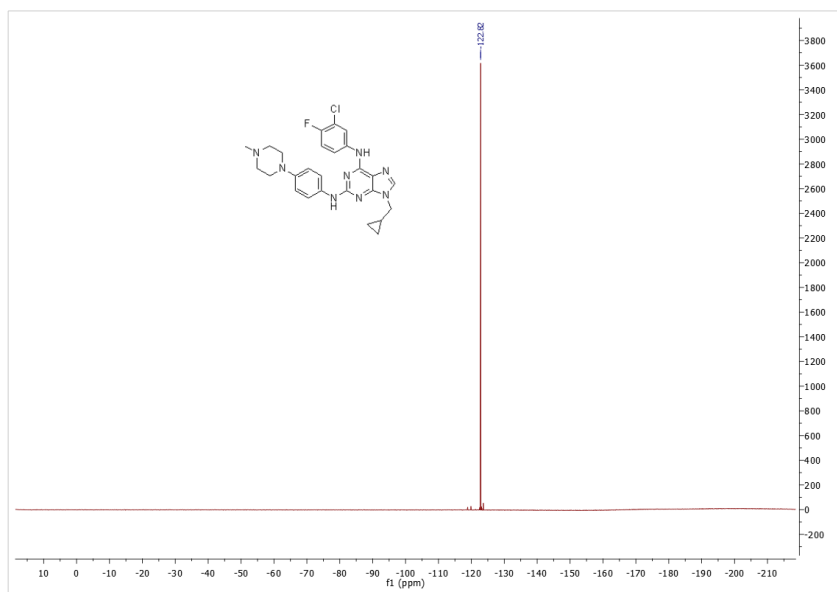
Espectro de ^1H RMN del compuesto **10m**



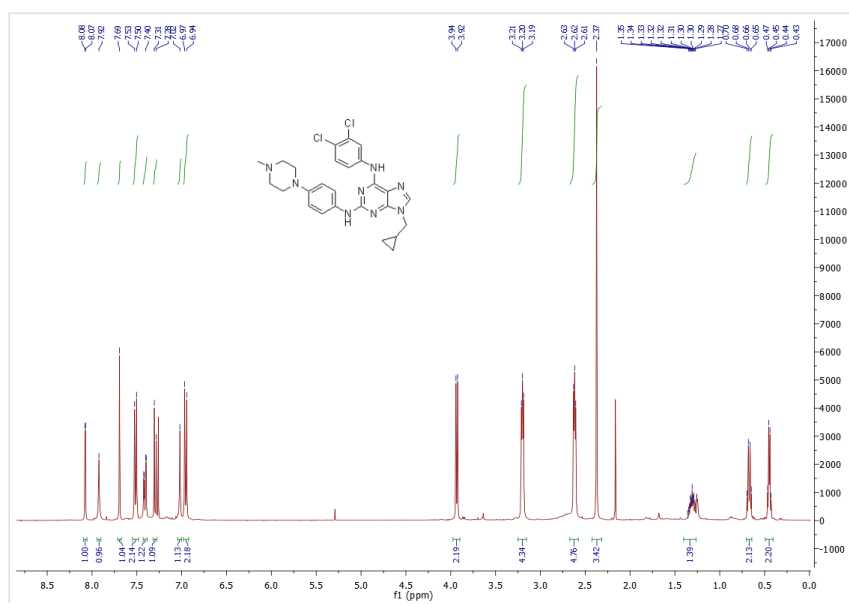
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10m**



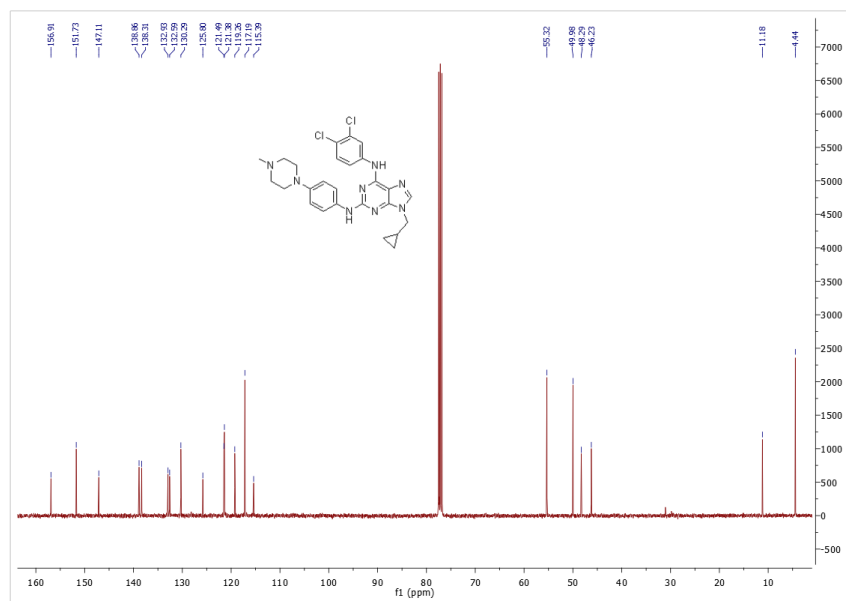
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **10m**



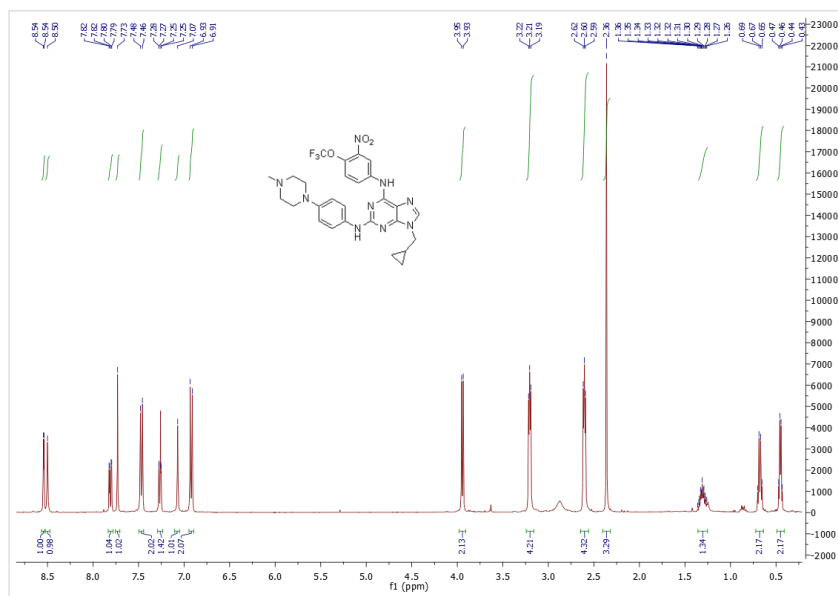
Espectro de ^1H RMN del compuesto **10n**



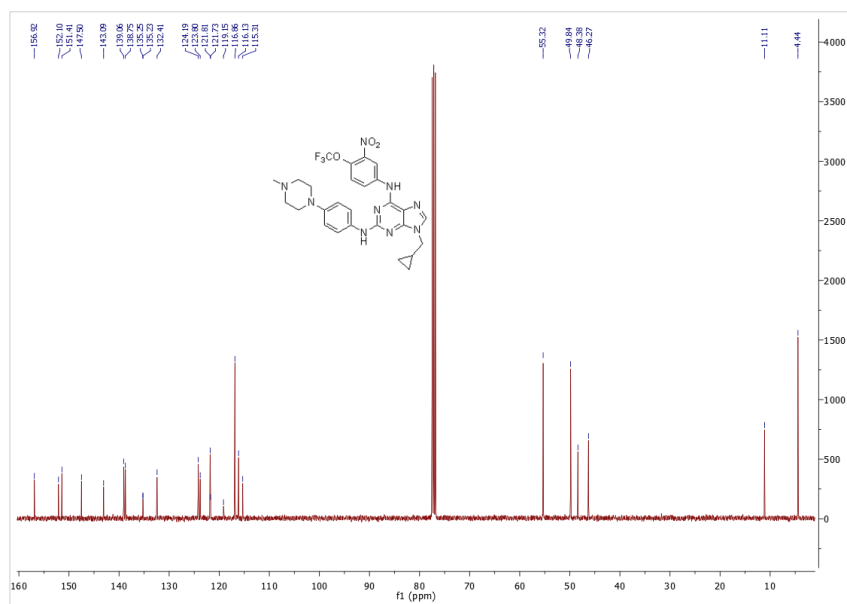
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10n**



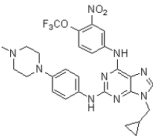
Espectro de ^1H RMN del compuesto **10o**



Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **10o**

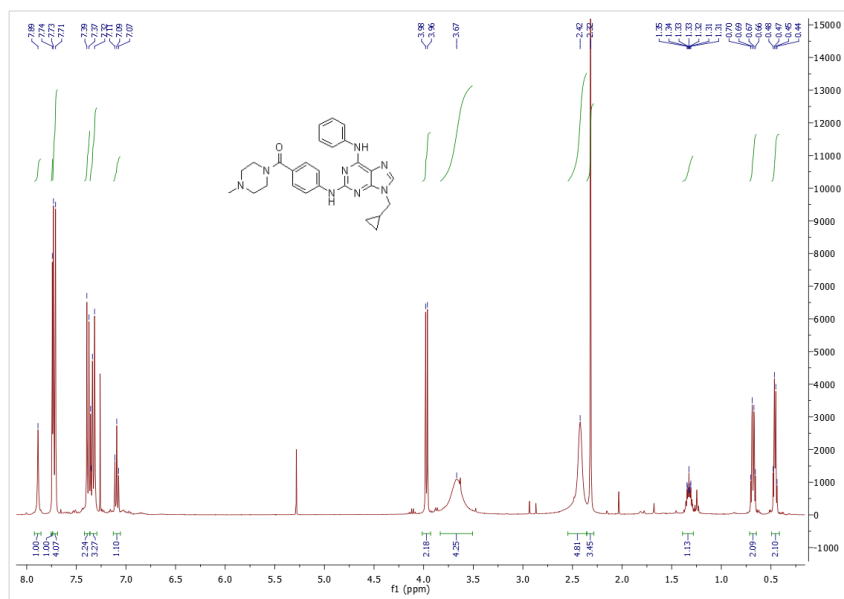


Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **10o**

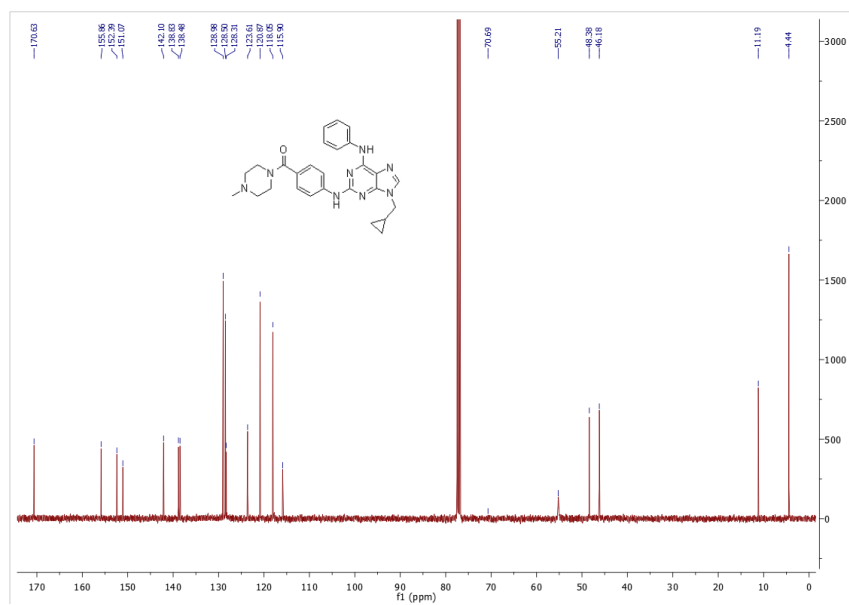


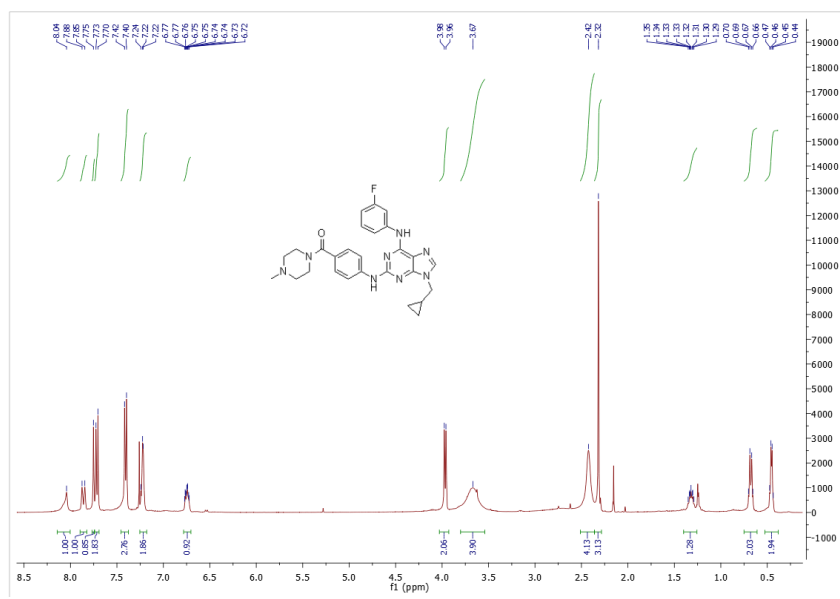
8.1.28 Espectros RMN de los compuestos finales 11a-e

Espectro de ^1H RMN del compuesto **11a**

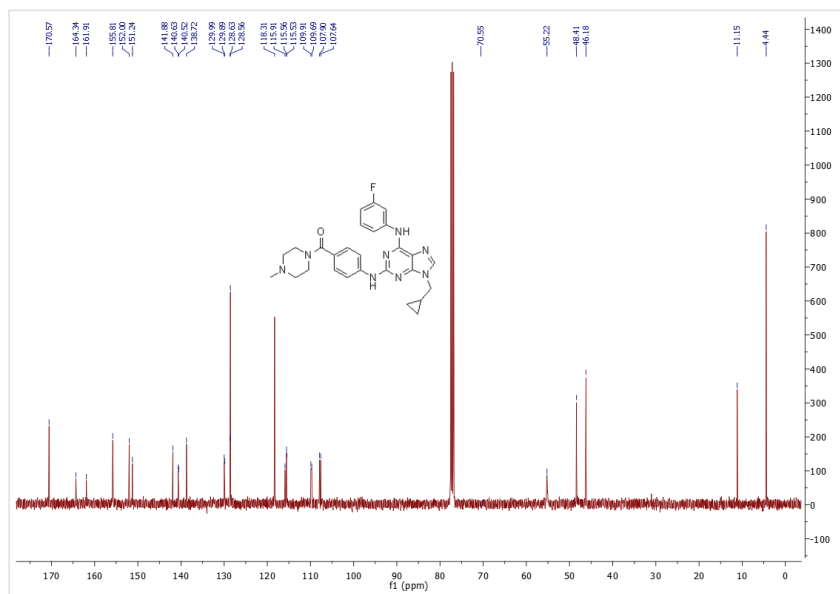


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **11a**

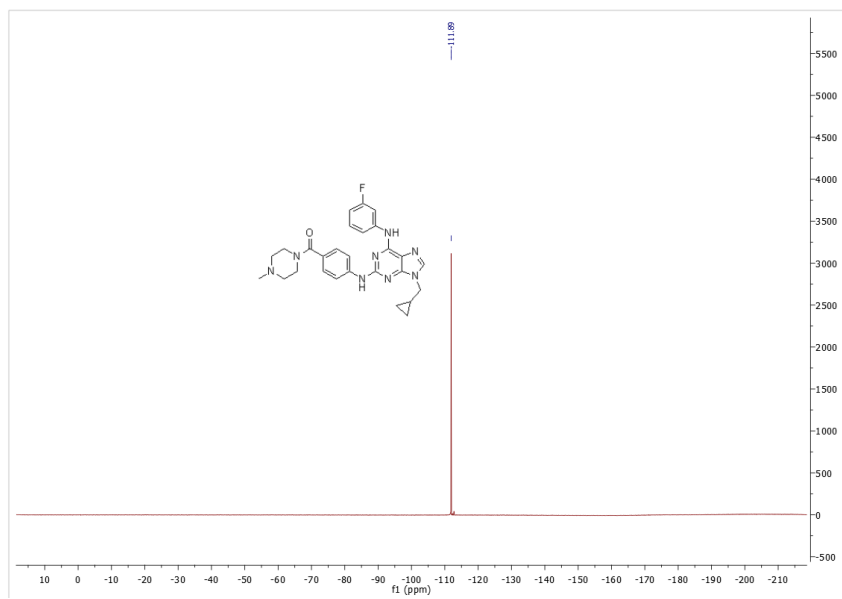




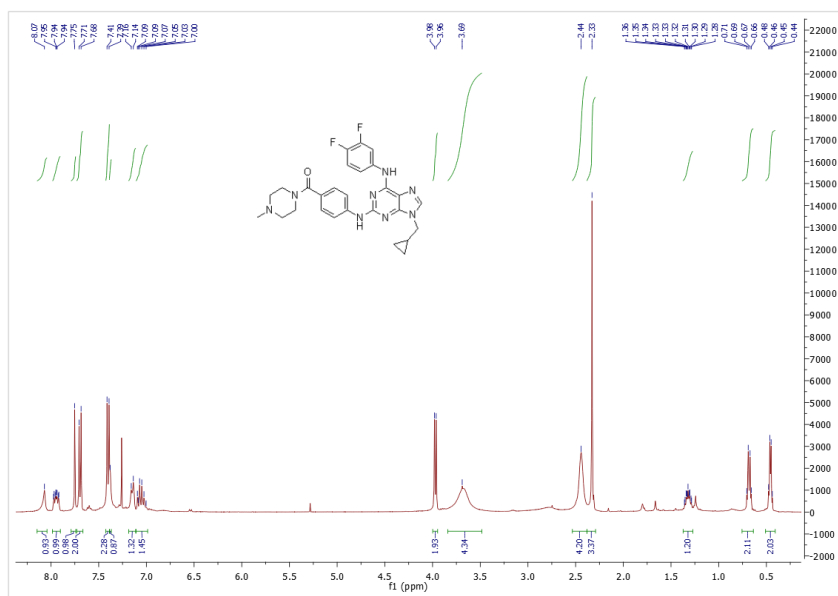
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **11b**



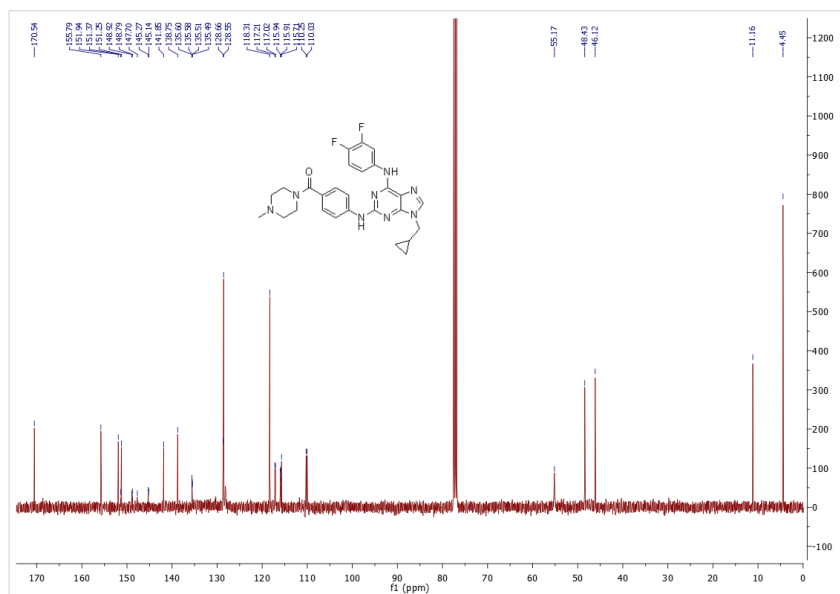
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **11b**



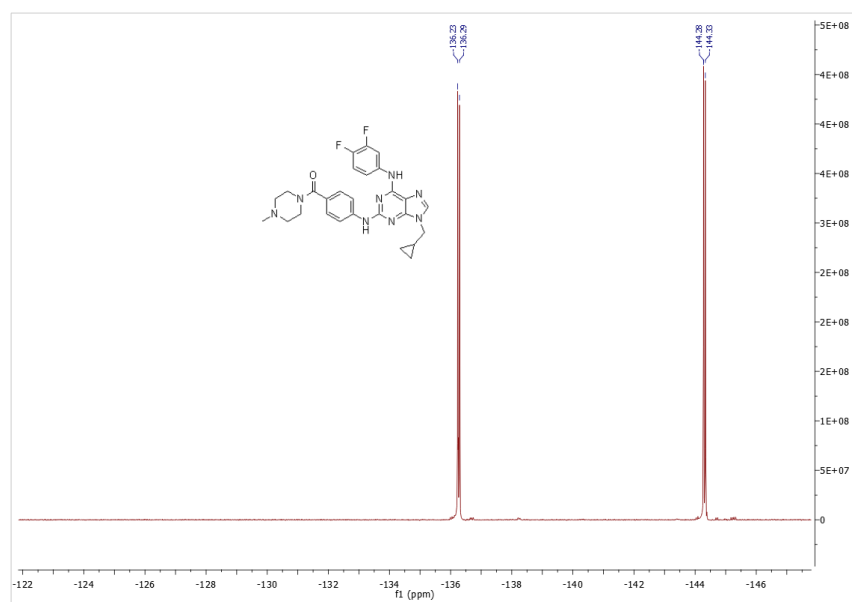
Espectro de ^1H RMN del compuesto **11c**



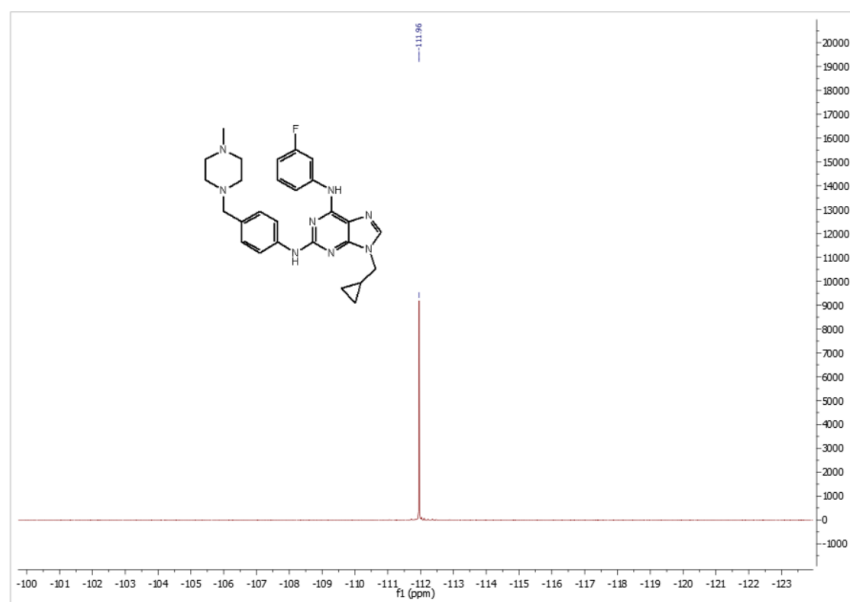
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **11c**



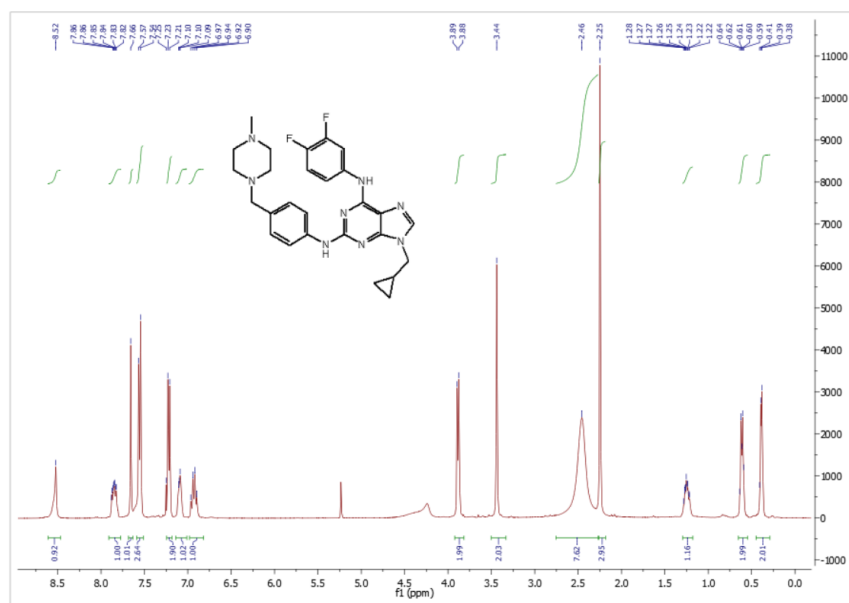
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **11c**



Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **11d**

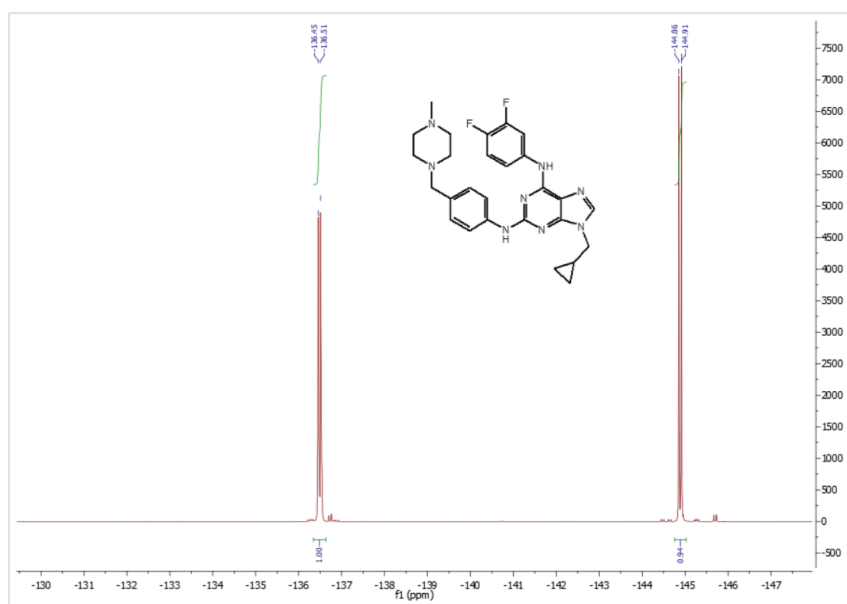


Espectro de ^1H RMN del compuesto **11e**





Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **11e**

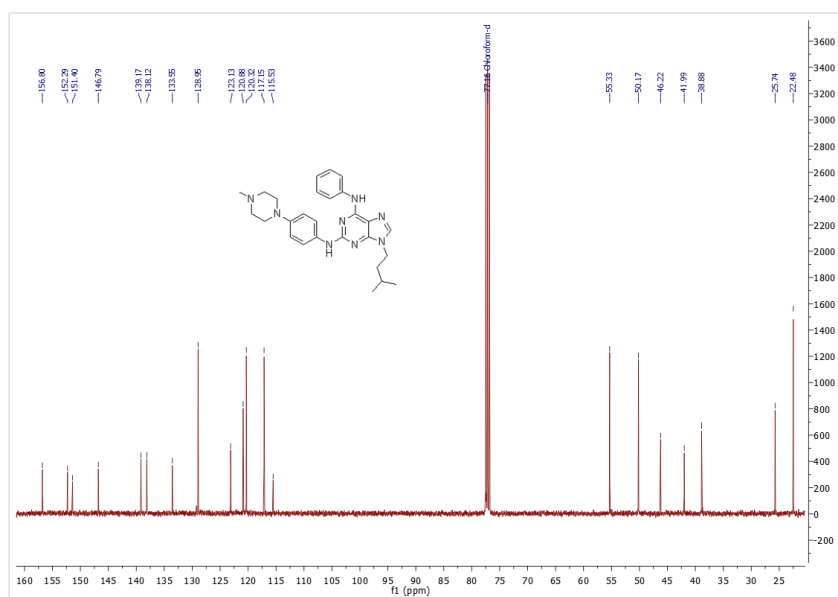


Chemical Structure: 2-((4-(4-methyl-1H-imidazol-2-yl)phenyl)methyl)piperazine

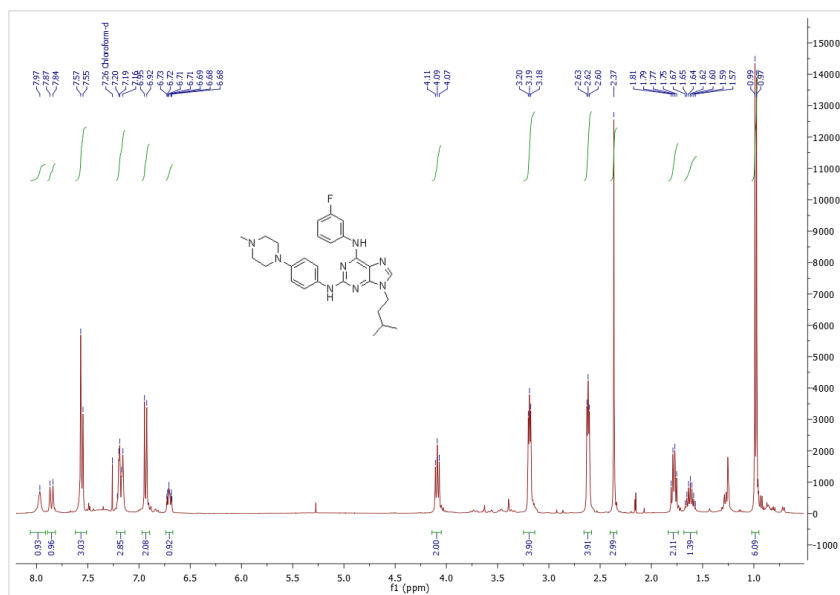
¹H NMR Spectrum (CDCl₃):

Chemical Shift (ppm)	Integration
7.75, 7.68, 7.66, 7.59, 7.54, 7.30, 7.28, 7.06, 6.97, 6.94, 6.91	1.92, 1.80, 3.02, 1.85, 2.05, 1.07, 1.07, 2.09, 2.09
4.13, 4.11, 4.09	2.04
3.20, 3.19, 3.18	4.18
2.64, 2.61, 2.38	4.32
1.83, 1.81, 1.77, 1.69, 1.66, 1.62, 1.61, 1.55	3.00
0.99	6.30

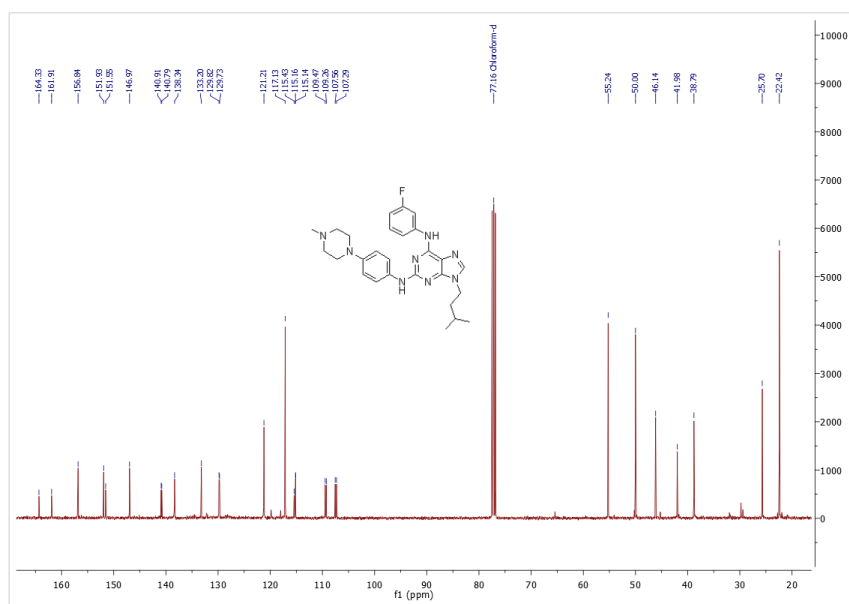
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **12a**



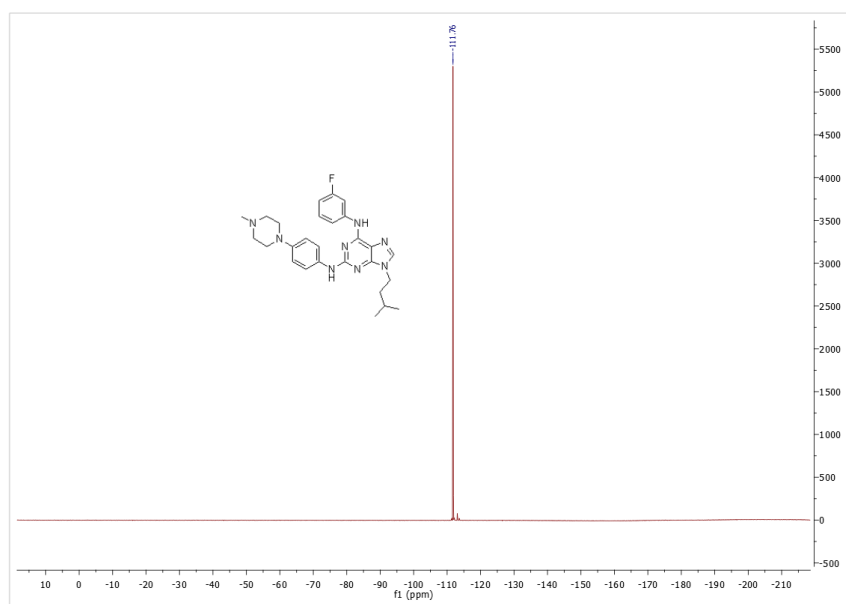
Espectro de ^1H RMN del compuesto **12b**



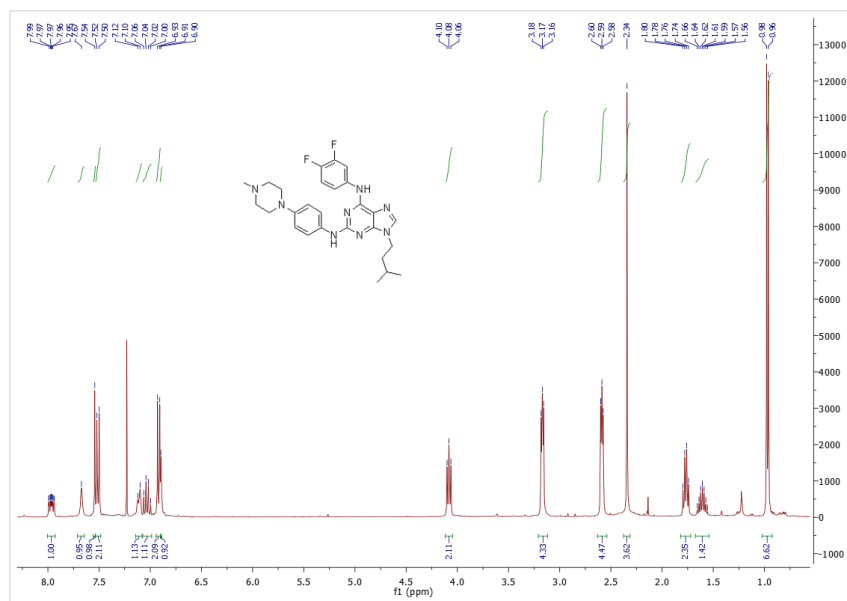
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **12b**



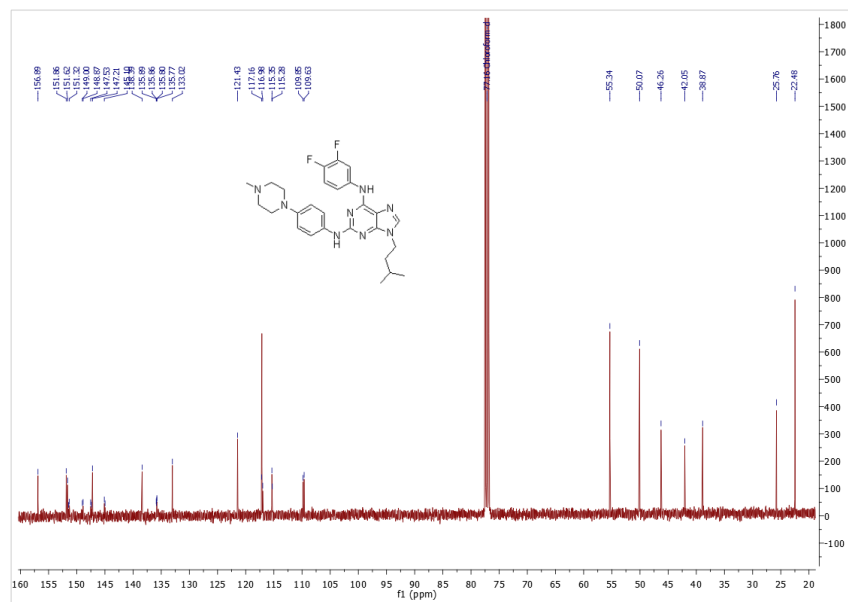
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **12b**



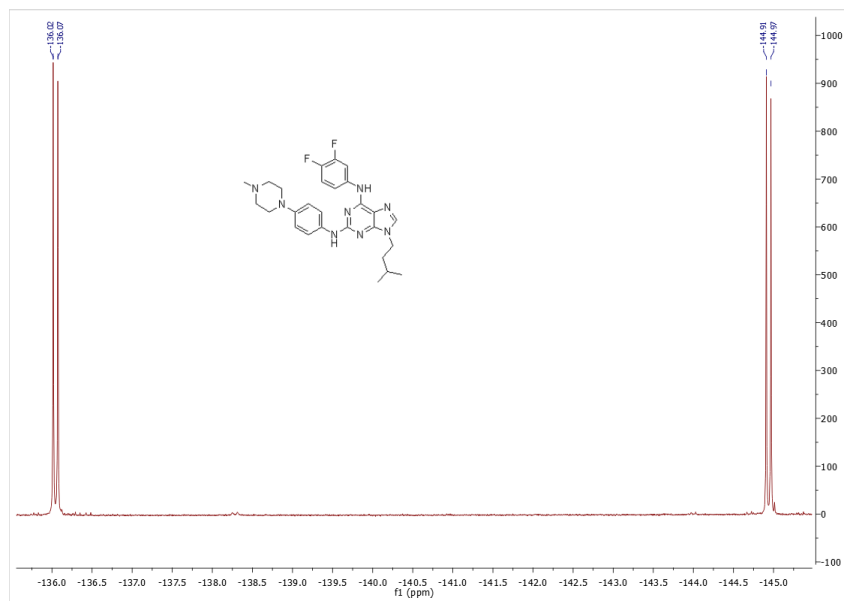
Espectro de ^1H RMN del compuesto **12c**



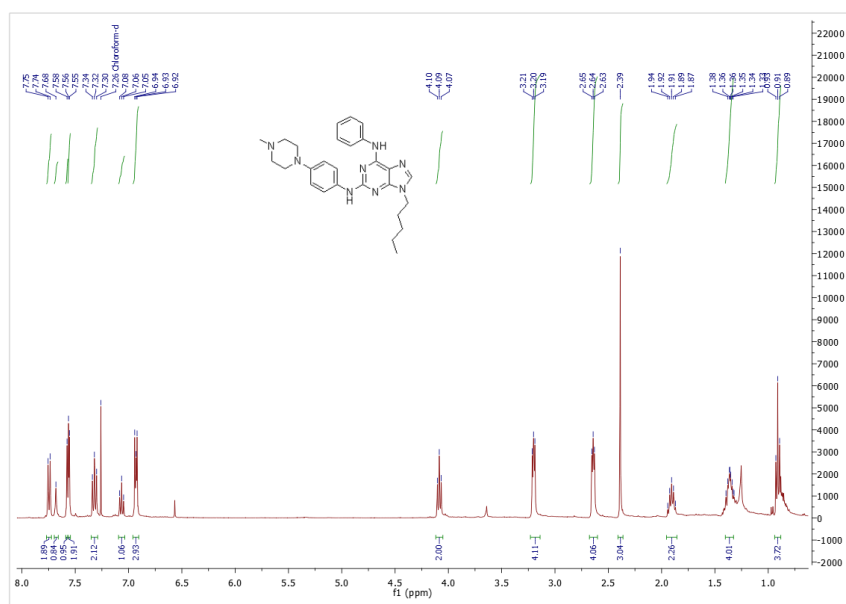
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **12c**



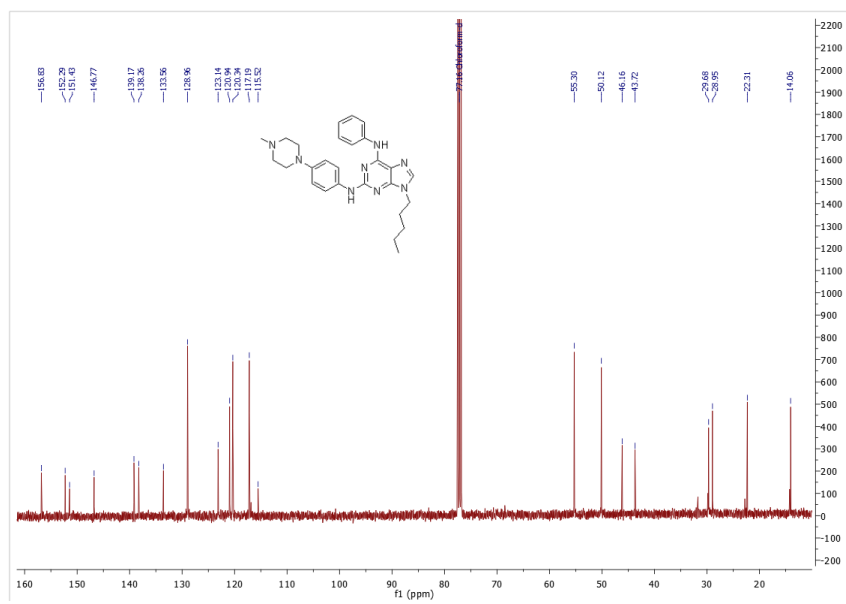
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **12c**



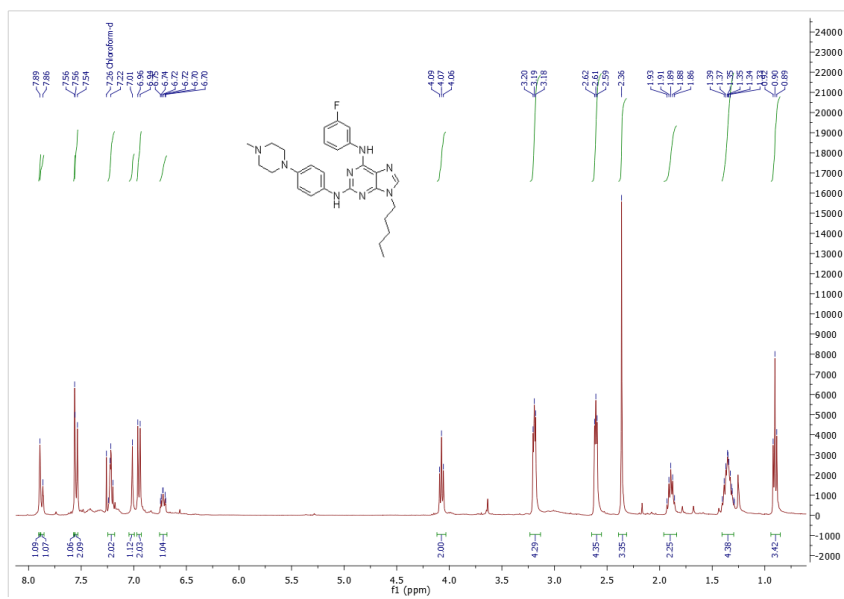
Espectro de ^1H RMN del compuesto **12d**



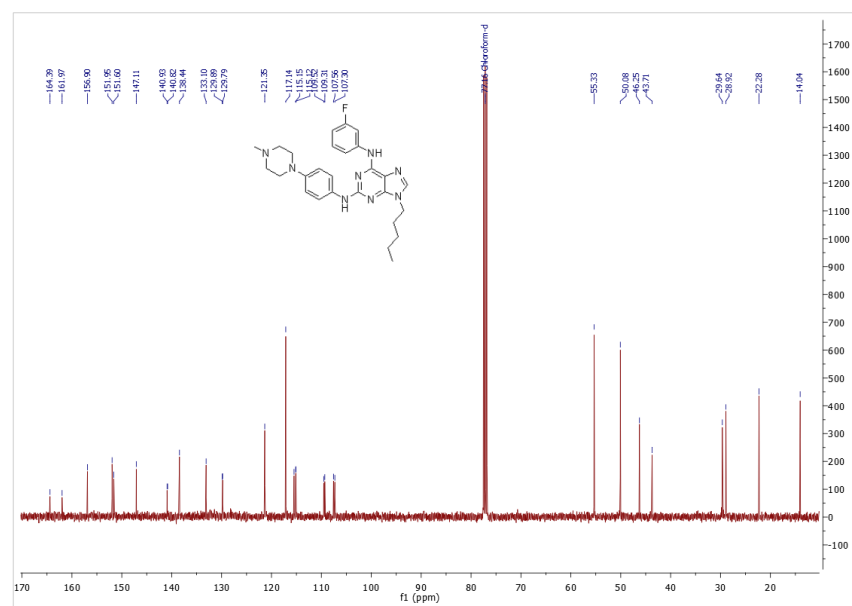
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **12d**



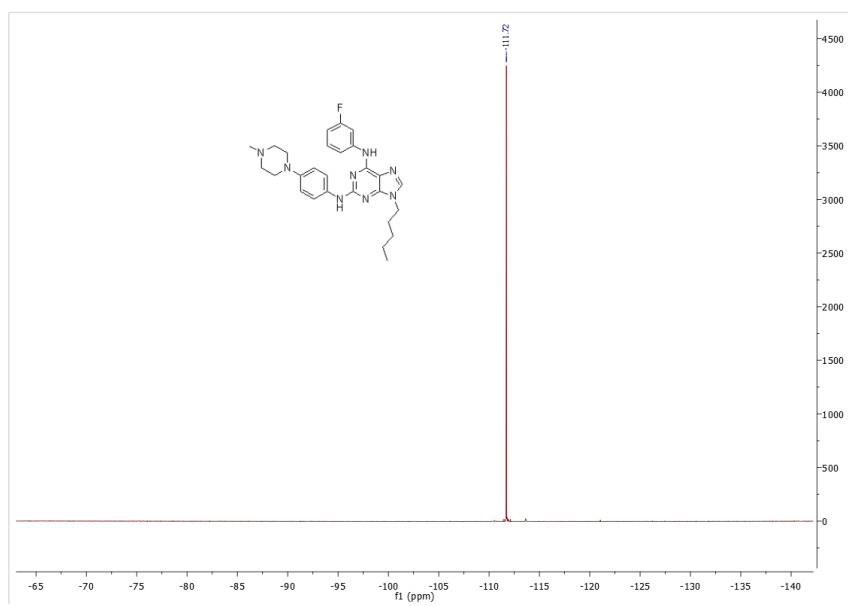
Espectro de ^1H RMN del compuesto **12e**



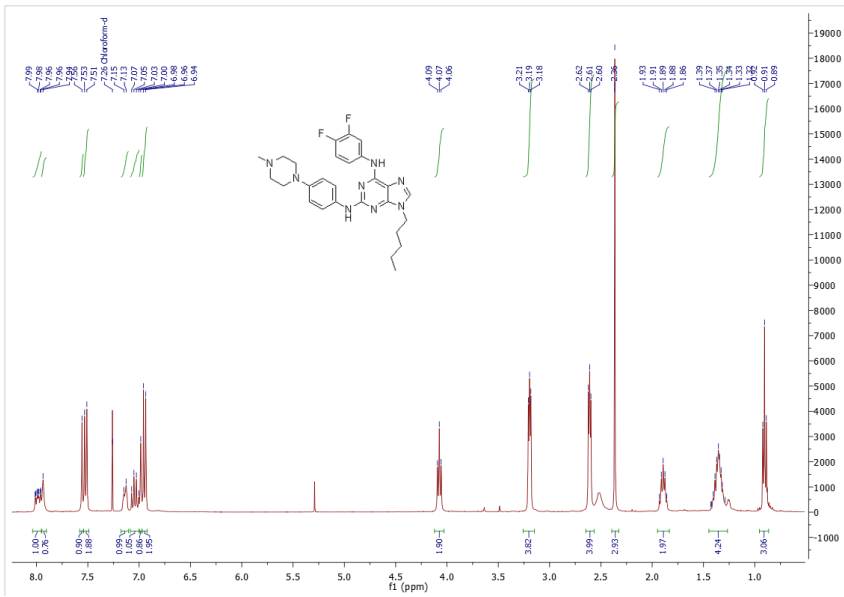
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **12e**



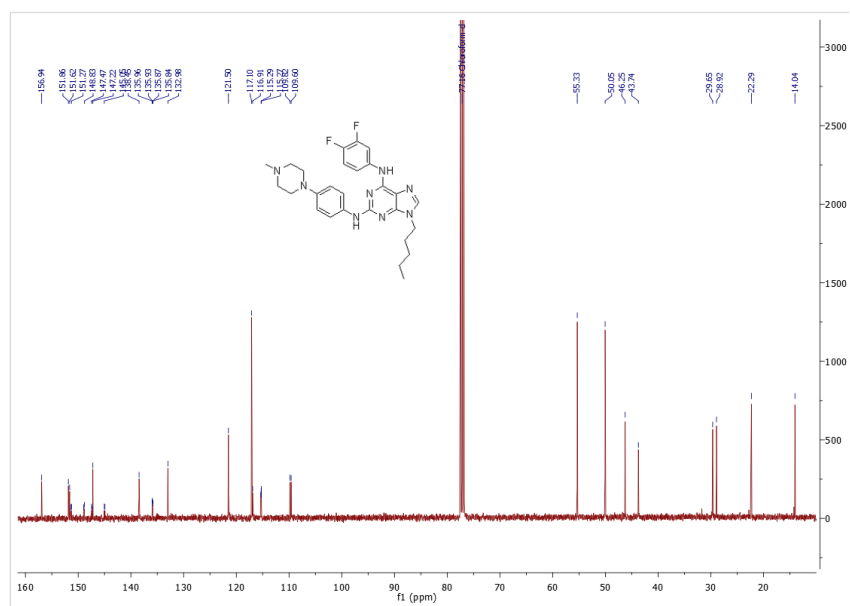
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **12e**



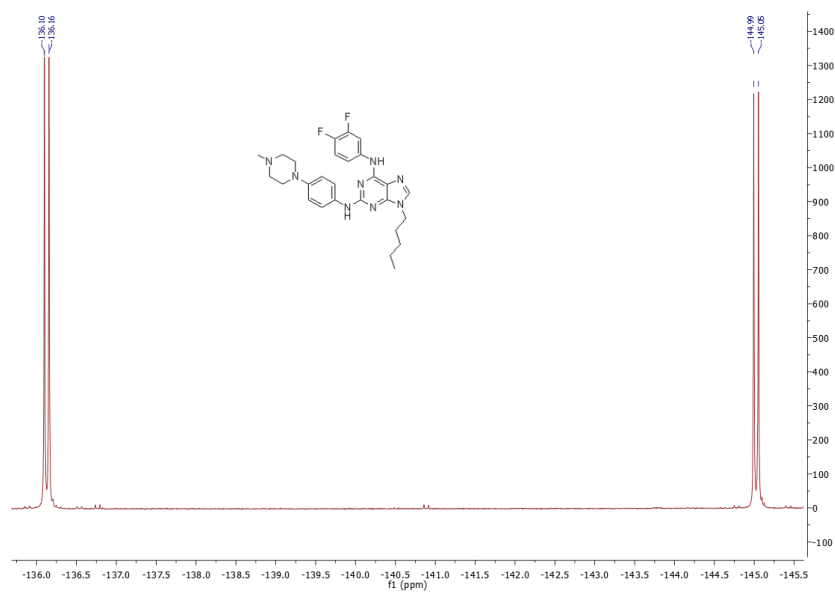
Espectro de ¹H RMN del compuesto **12f**



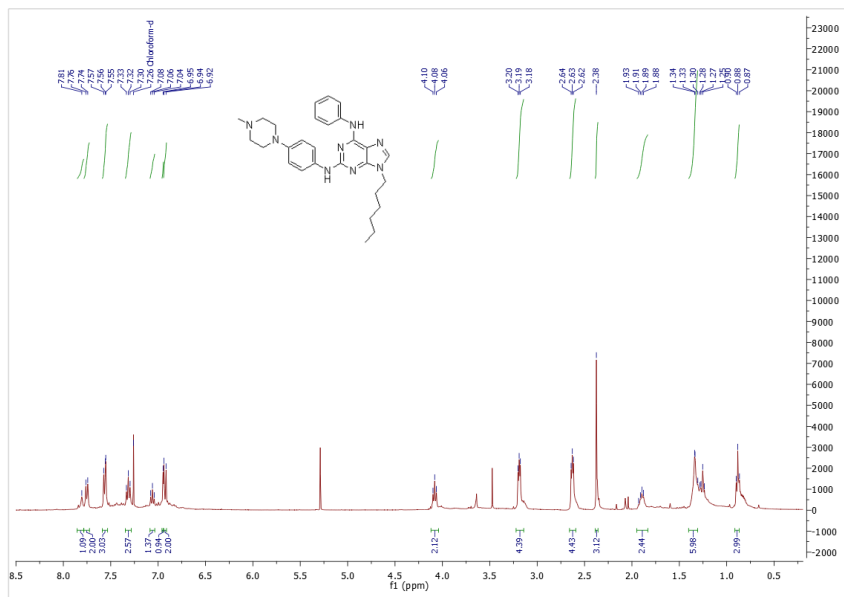
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **12f**



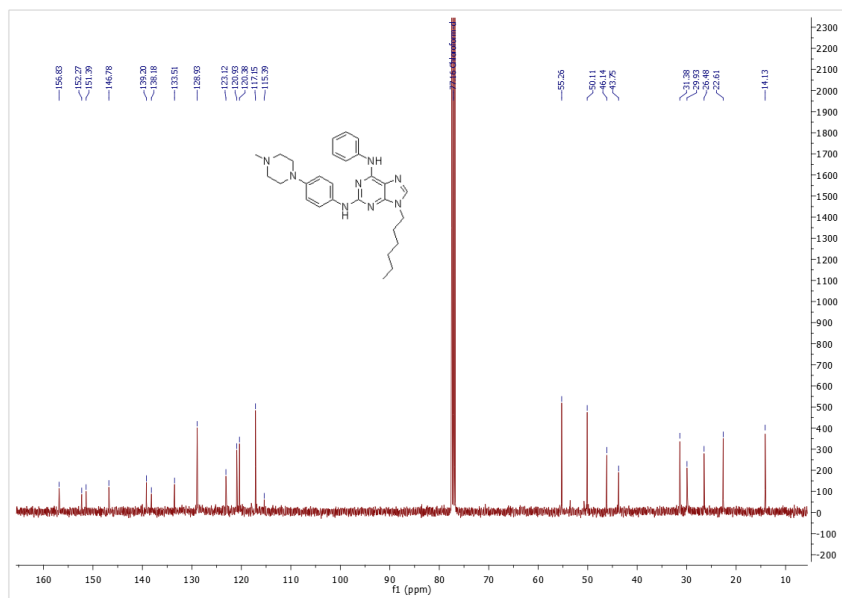
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **12f**



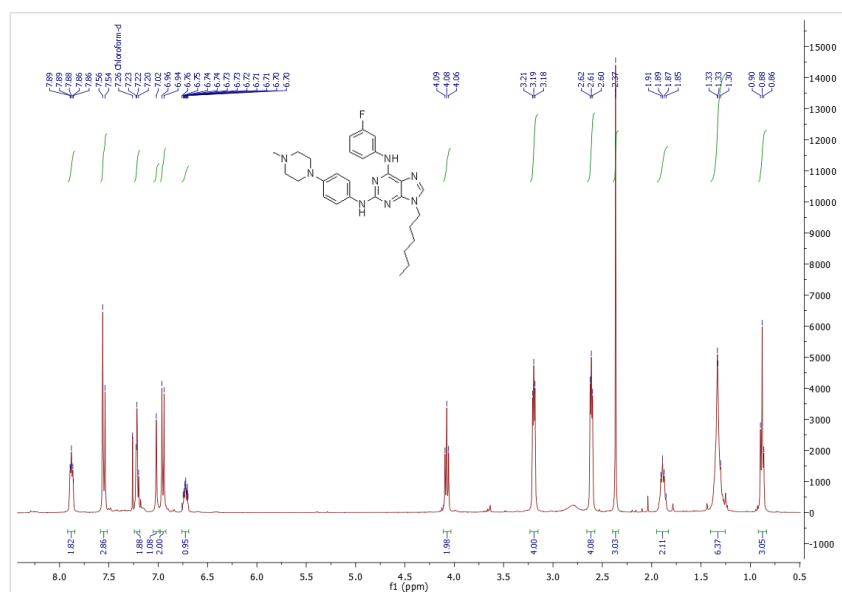
Espectro de ¹H RMN del compuesto **12g**



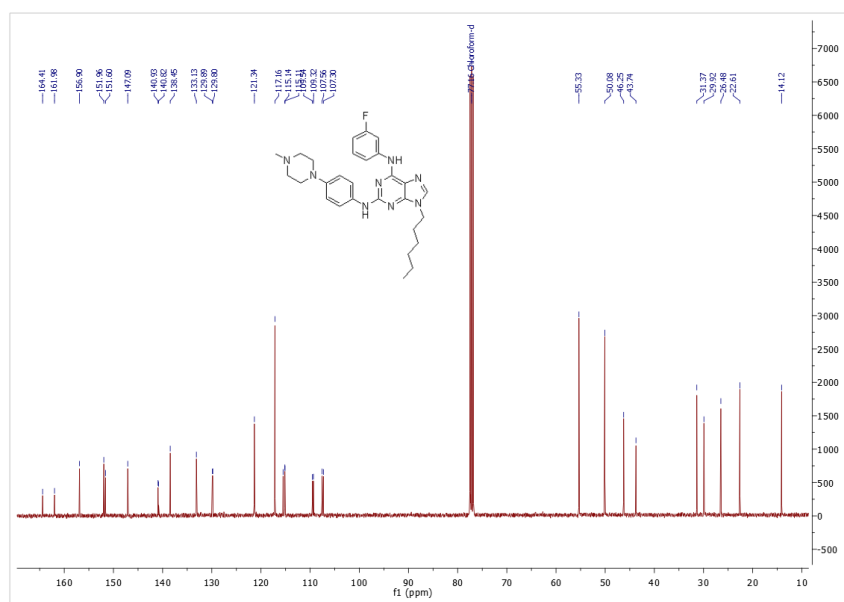
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **12g**



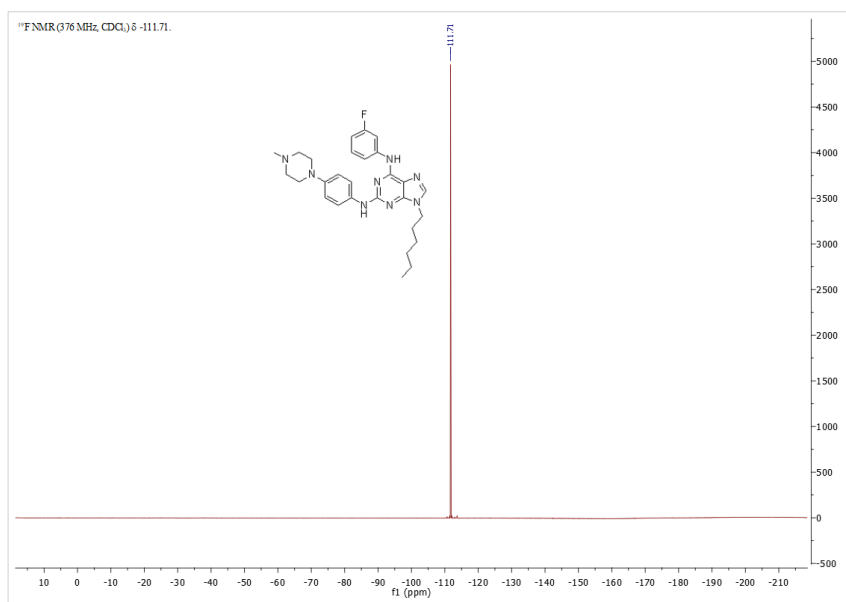
Espectro de ^1H RMN del compuesto **12h**



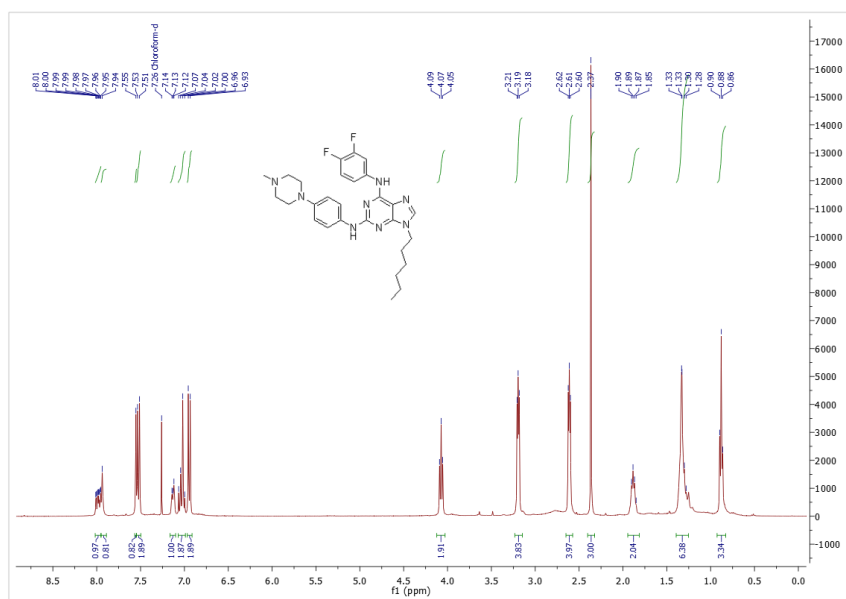
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **12h**



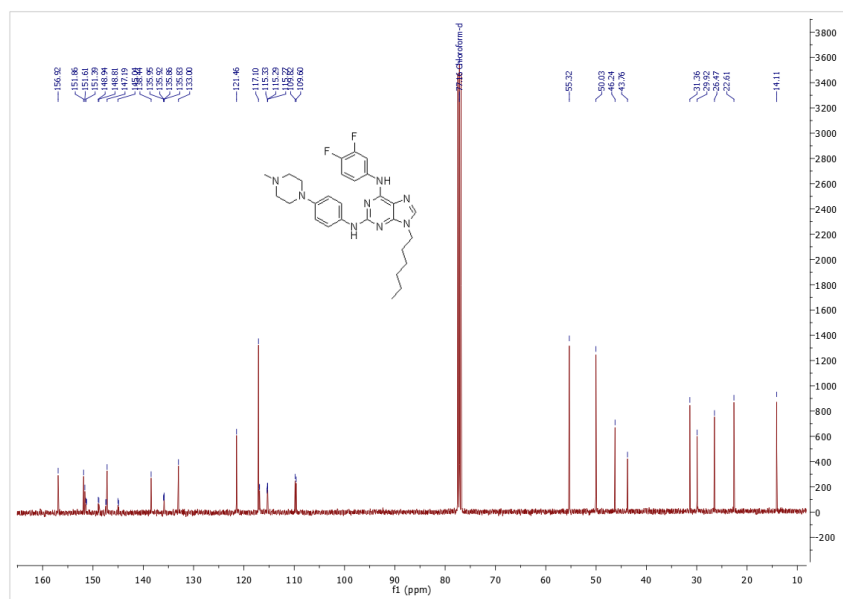
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **12h**



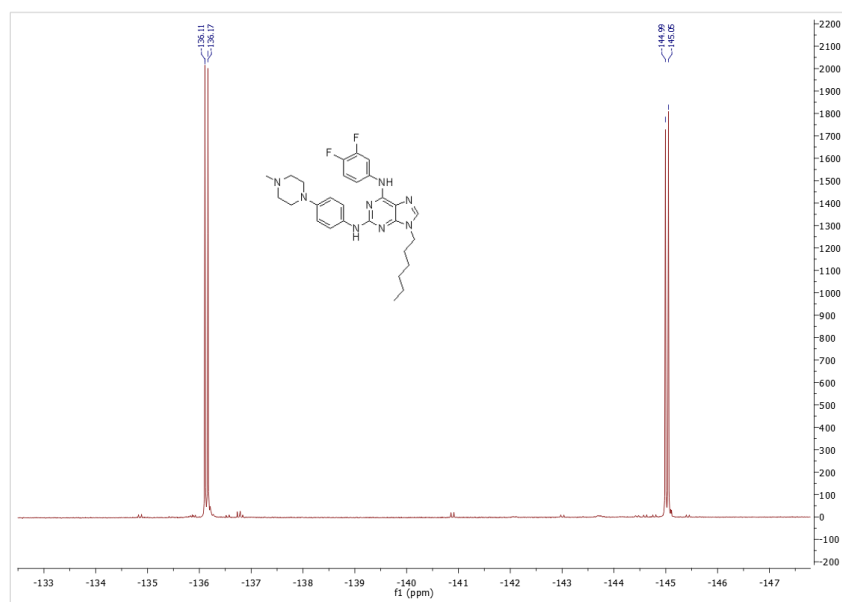
Espectro de ^1H RMN del compuesto **12i**



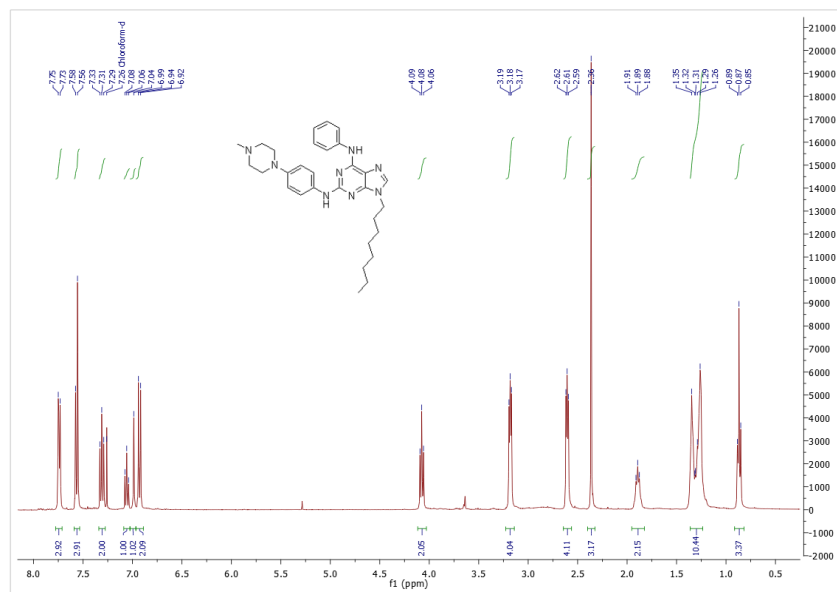
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **12i**



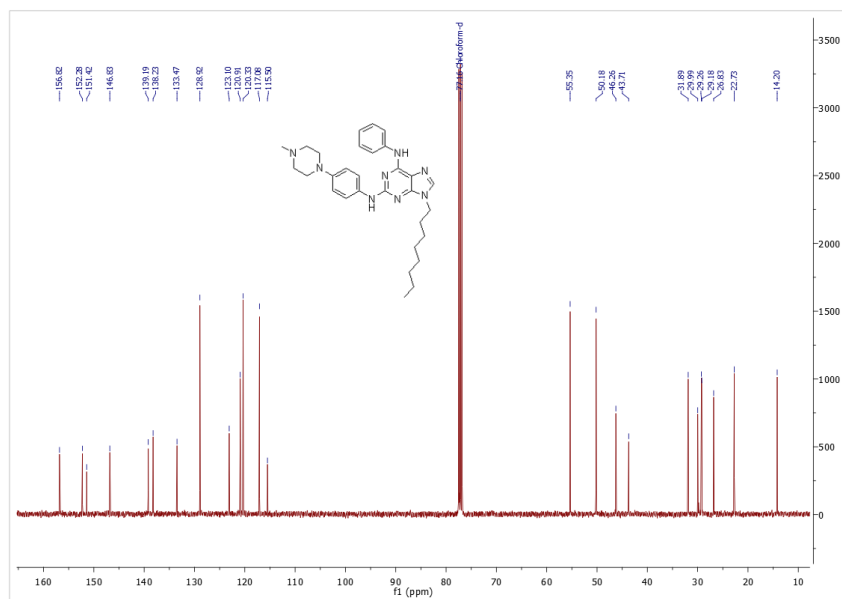
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **12i**



Espectro de ^1H RMN del compuesto **12j**

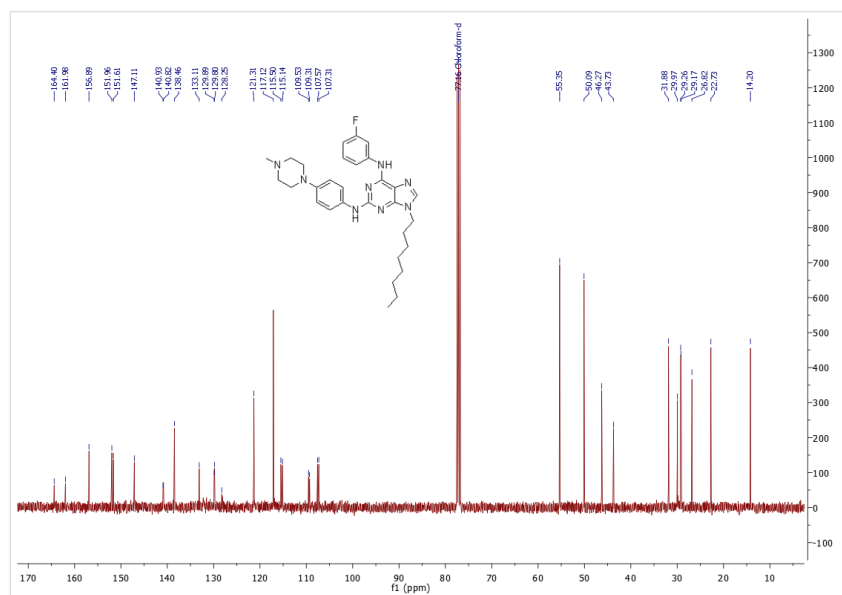


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **12j**

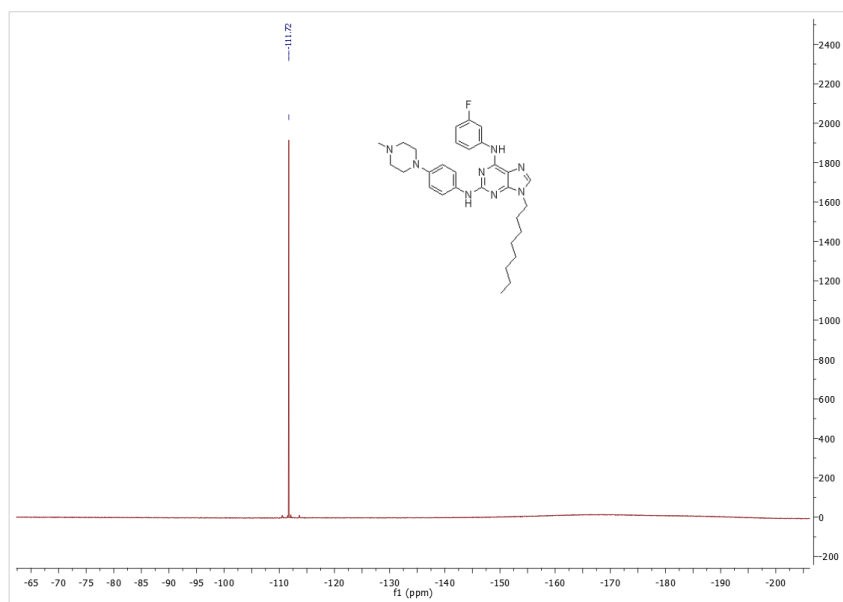


[illegible]

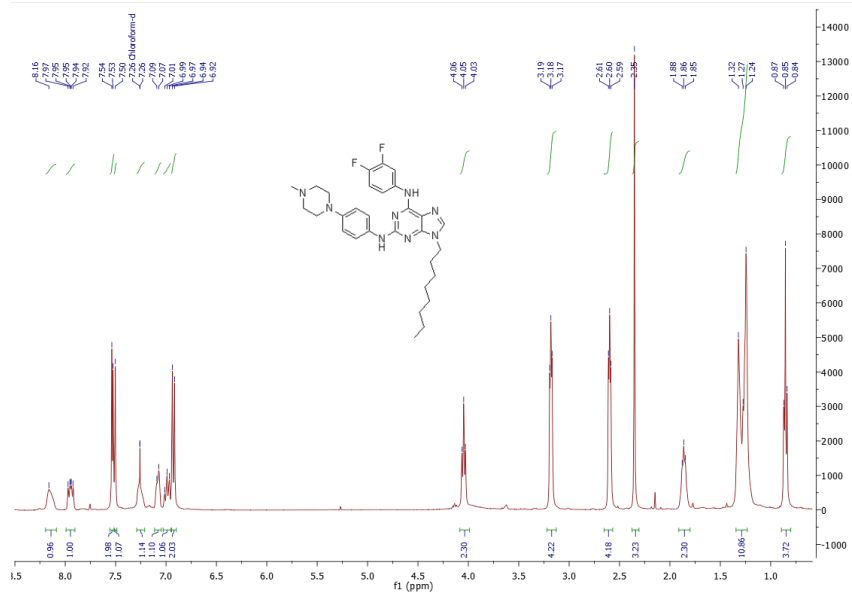
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **12k**



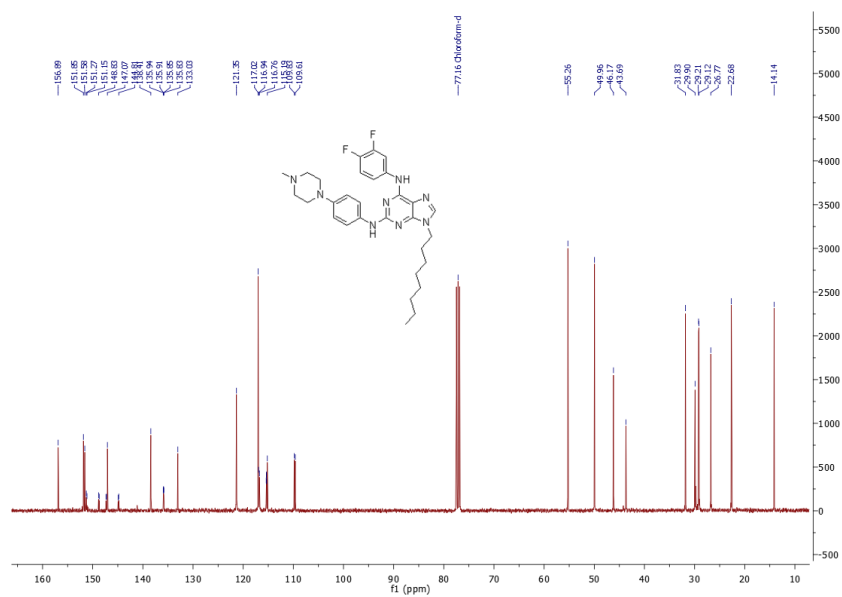
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **12k**



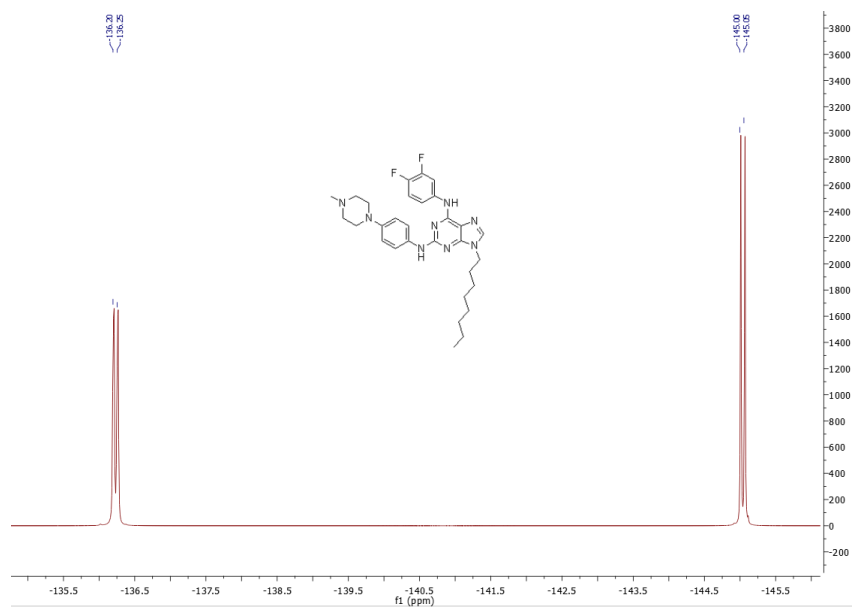
Espectro de ^1H RMN del compuesto **12l**



Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **12I**

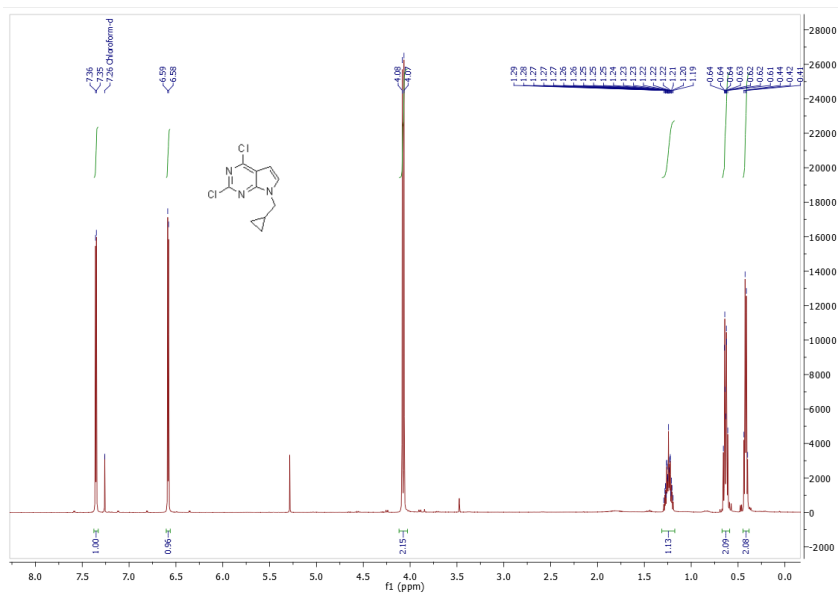


Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **12I**

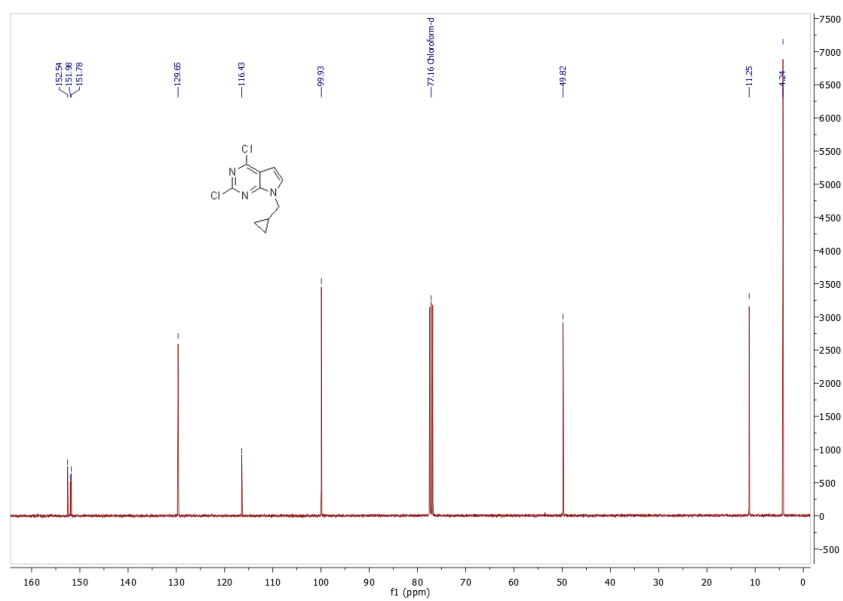


8.1.30 Espectros RMN del derivado 14

Espectro de ^1H RMN del compuesto **14**

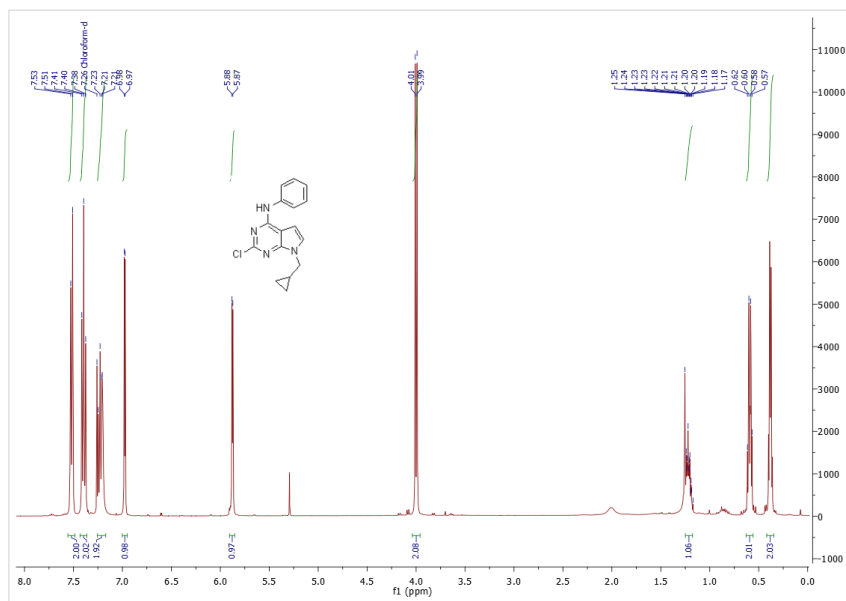


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **14**

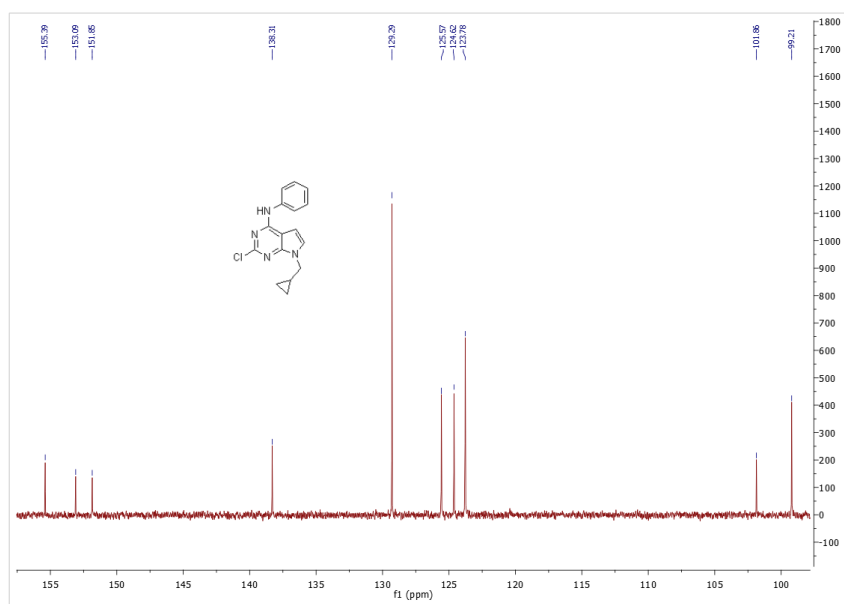


8.1.31 Espectros RMN de los derivados 15a–c

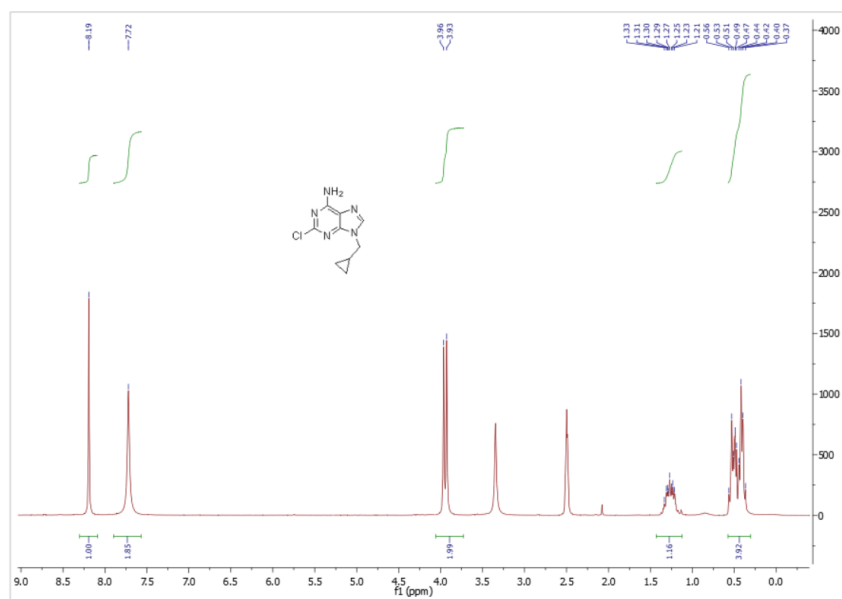
Espectro de ^1H RMN del compuesto **15a**



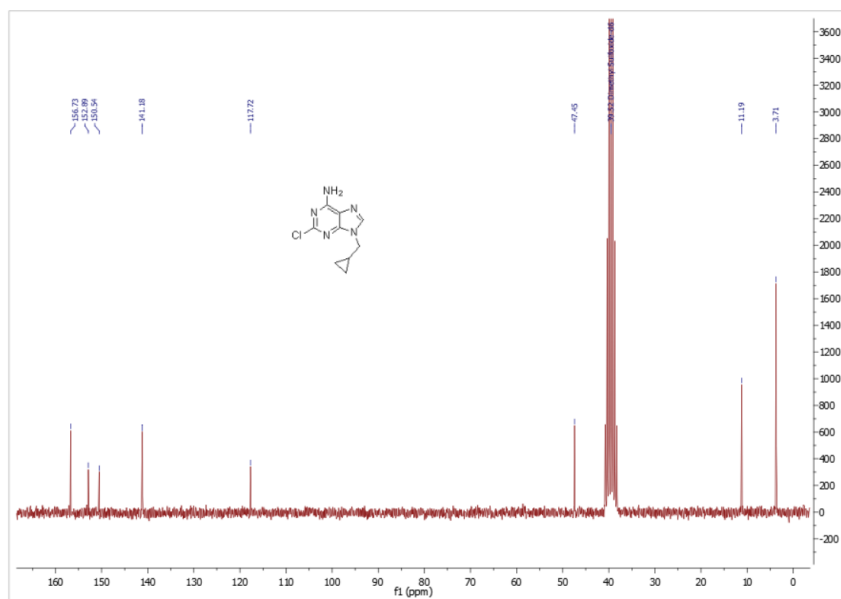
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **15a**



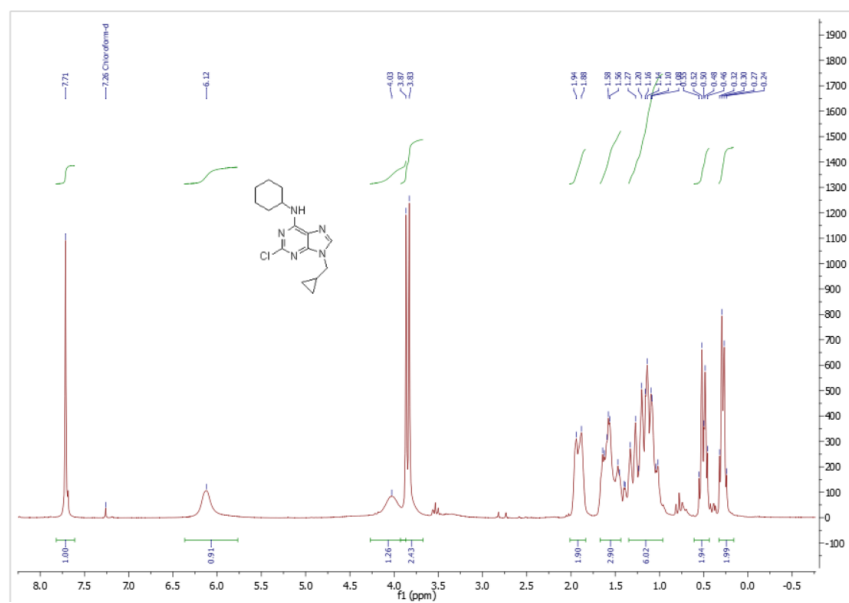
Espectro de ^1H RMN del compuesto **15b**



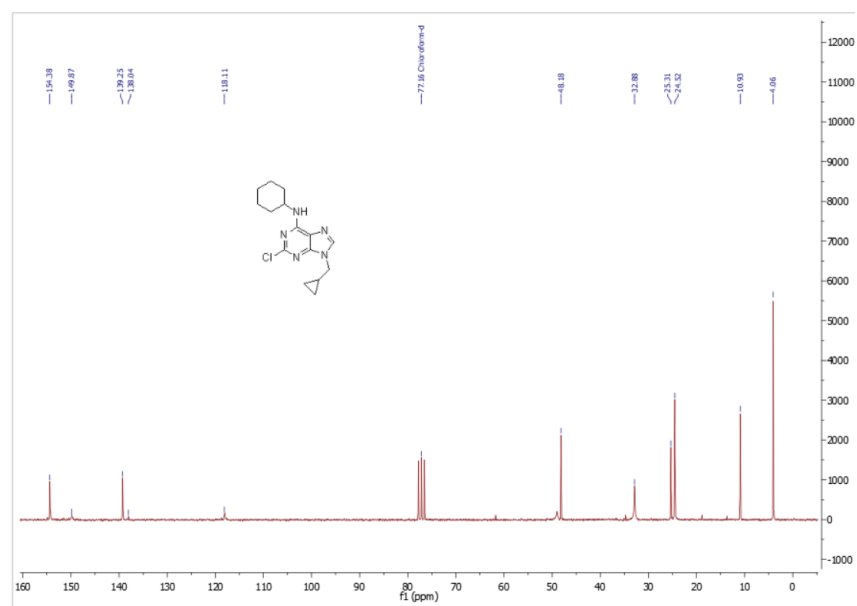
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **15b**



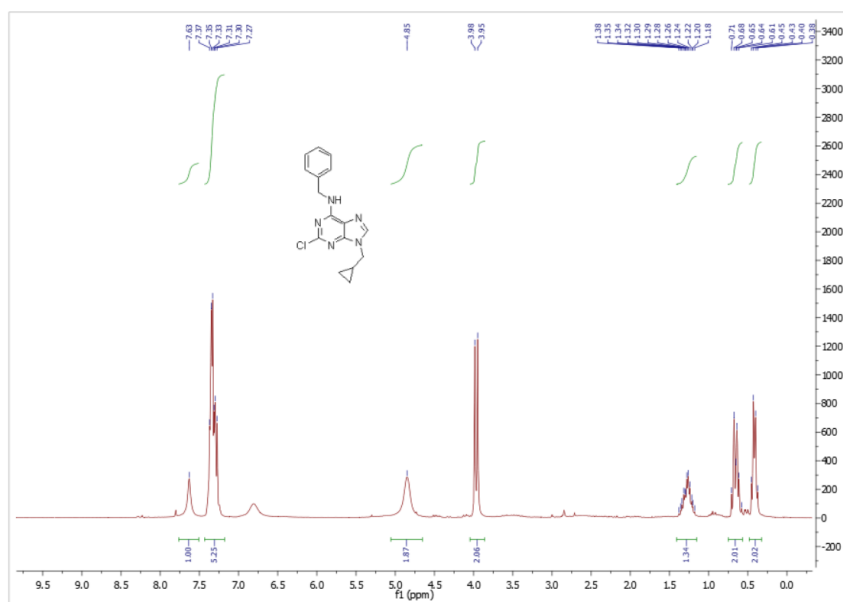
Espectro de ^1H RMN del compuesto **15c**



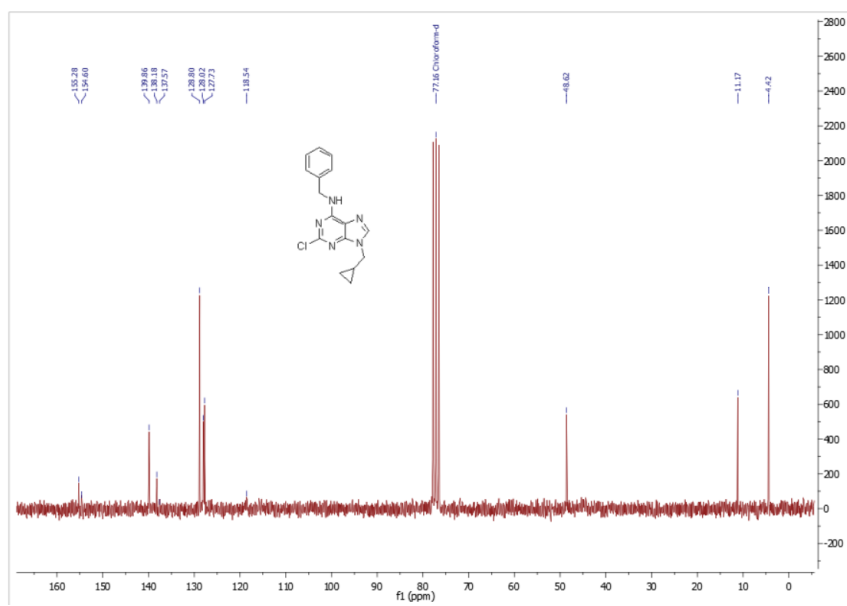
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **15c**



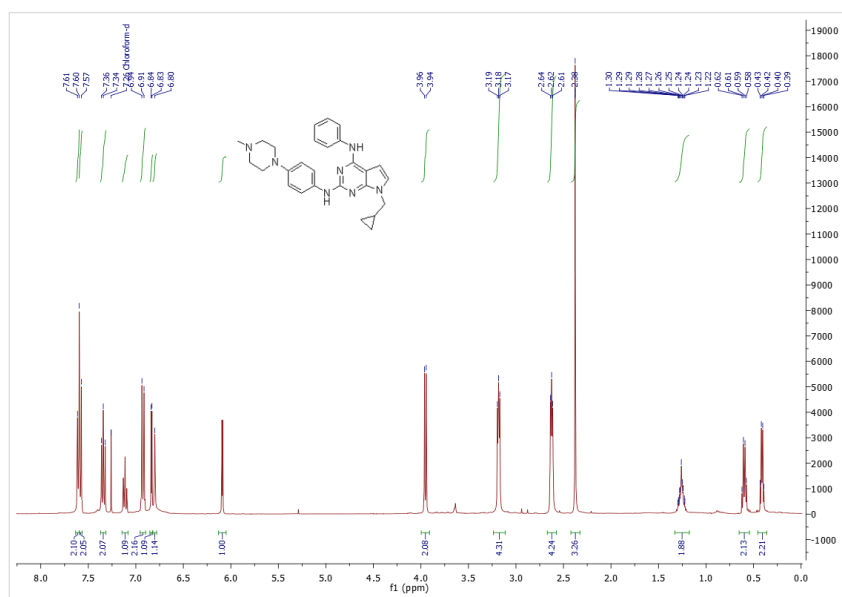
Espectro de ^1H RMN del compuesto **15d**



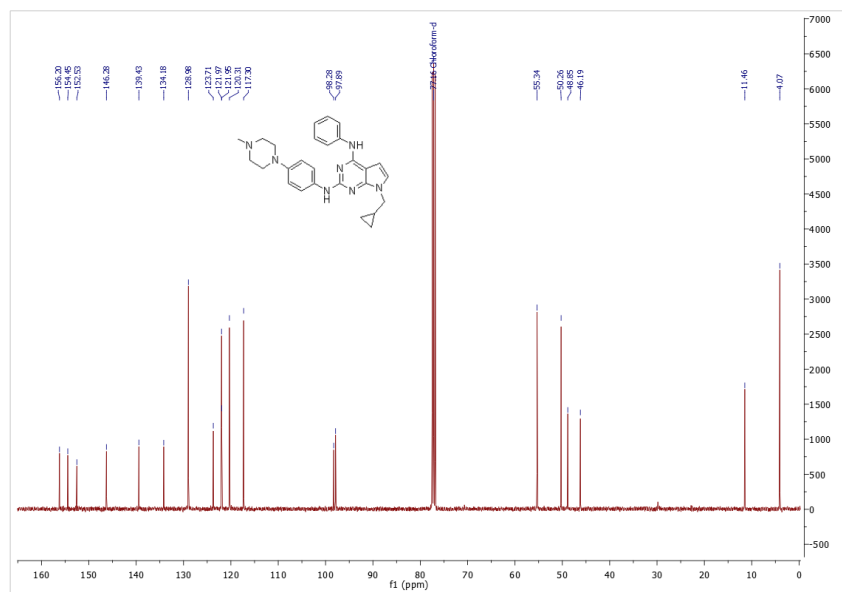
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **15d**



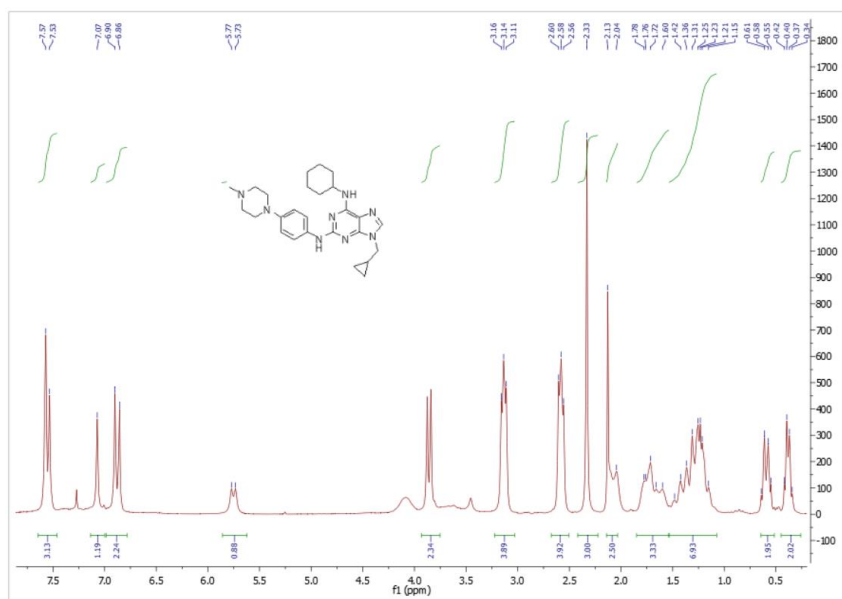
Espectro de ^1H RMN del compuesto **16a**



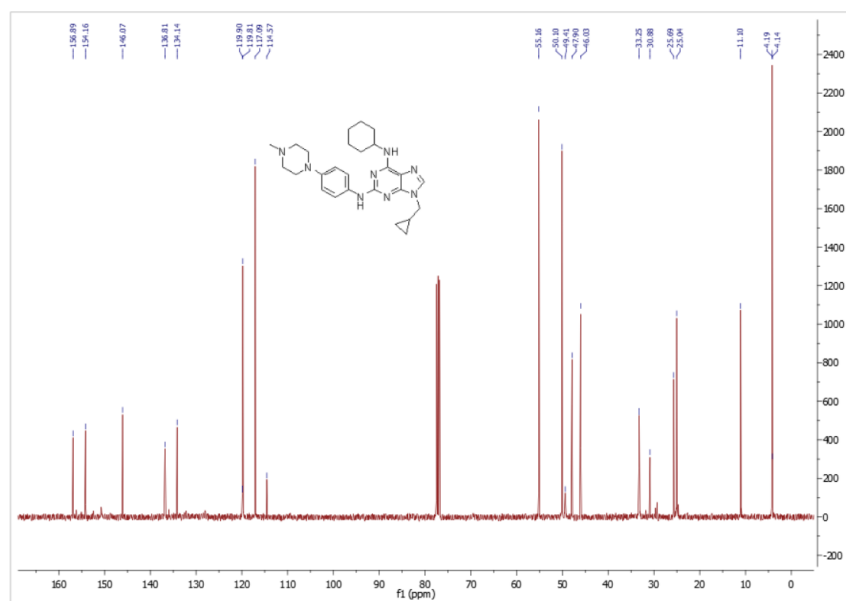
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **16a**



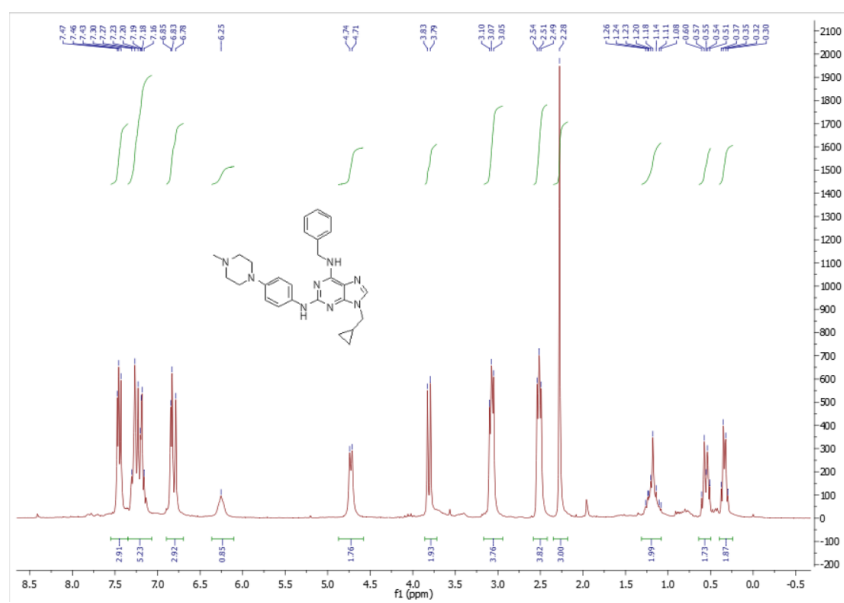
Espectro de ^1H RMN del compuesto **16c**



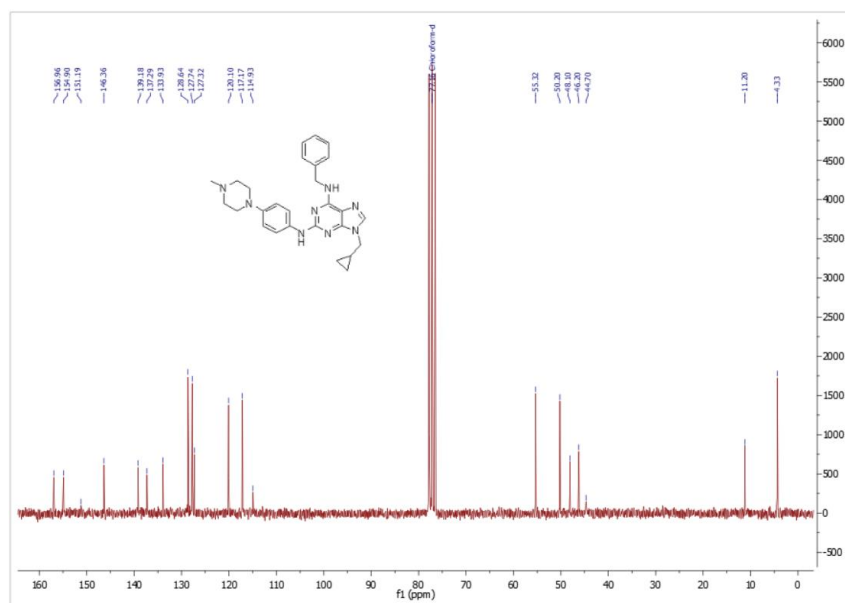
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **16c**



Espectro de ^1H RMN del compuesto **16d**

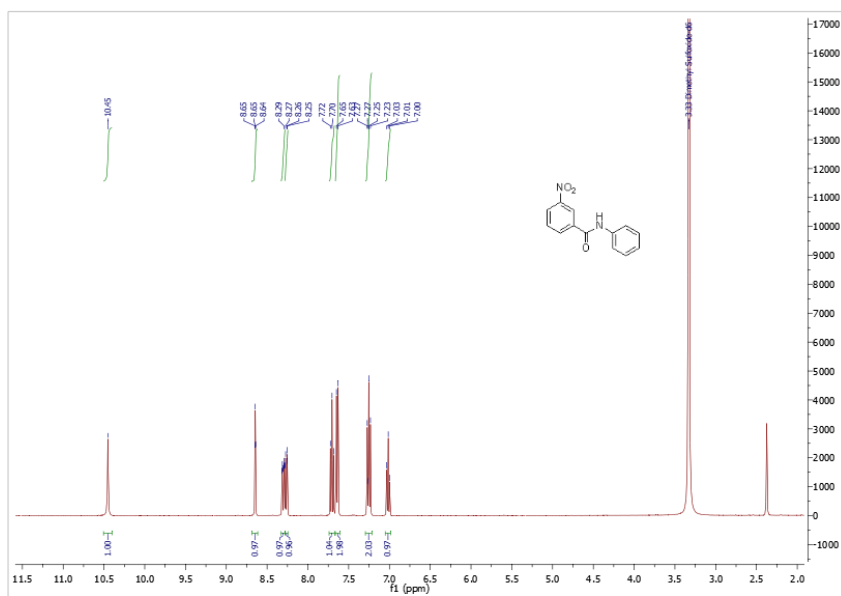


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **16d**

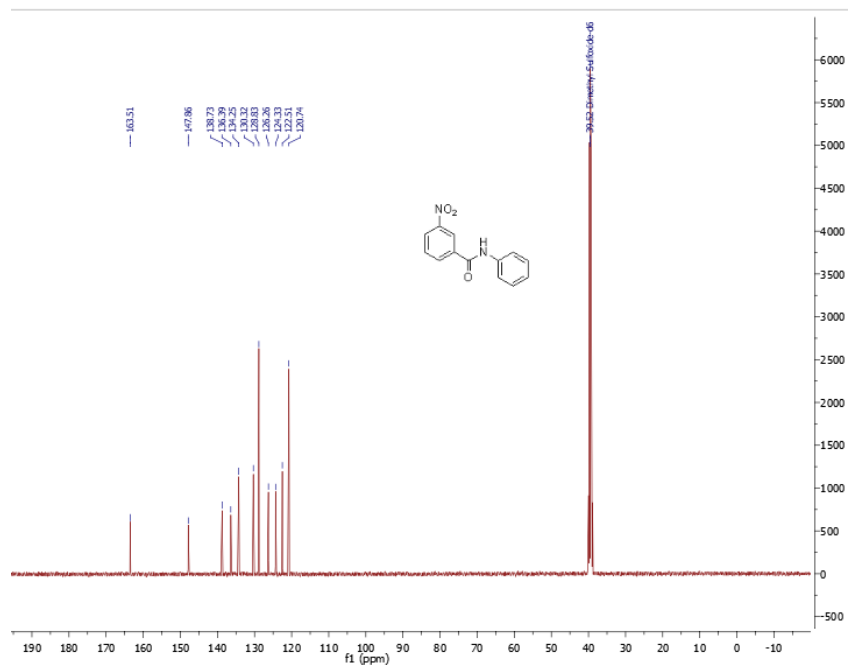


8.1.33 Espectros RMN de los derivados 17a–h

Espectro de ^1H RMN del compuesto **17a**



Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **17a**

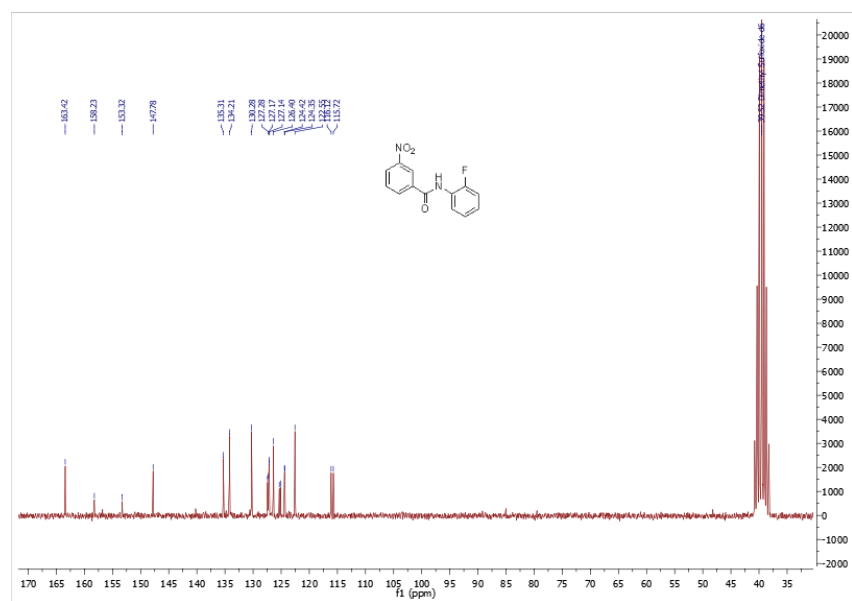


Nc1ccc(cc1)-c2ccc(F)cc2

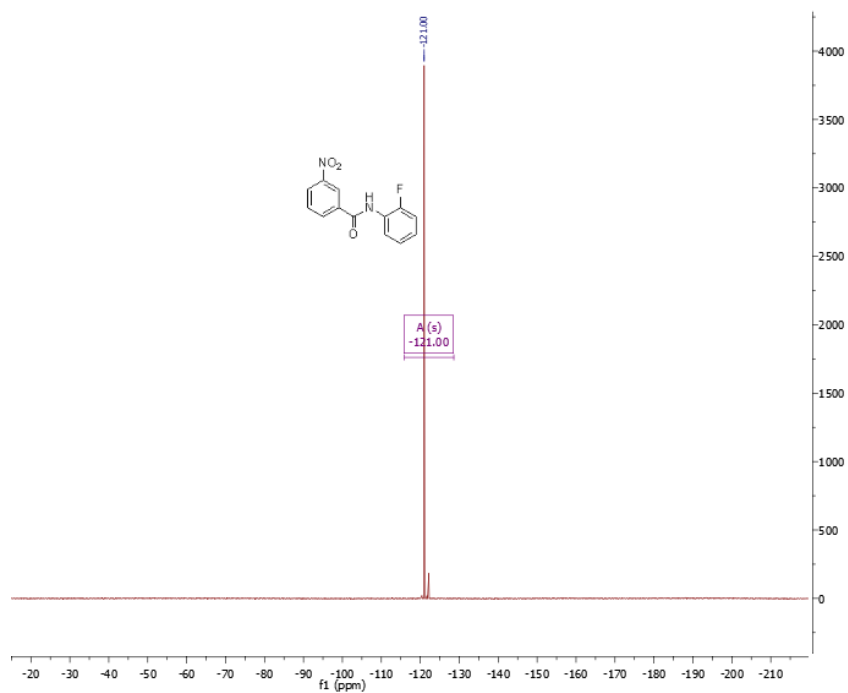
Chemical structure: 4-(2-fluorophenyl)benzamide

¹H NMR spectrum (DMSO-d₆) showing peaks at 10.52, 8.81, 8.80, 8.46, 8.43, 8.39, 7.88, 7.80, 7.63, 7.60, 7.59, 7.51, 7.31, 7.29, 7.28, 7.26, 7.24, 7.23, 7.22, 3.33, and 2.52 ppm. Integration values are 1.00, 1.00, 2.12, 1.00, 1.00, and 3.13.

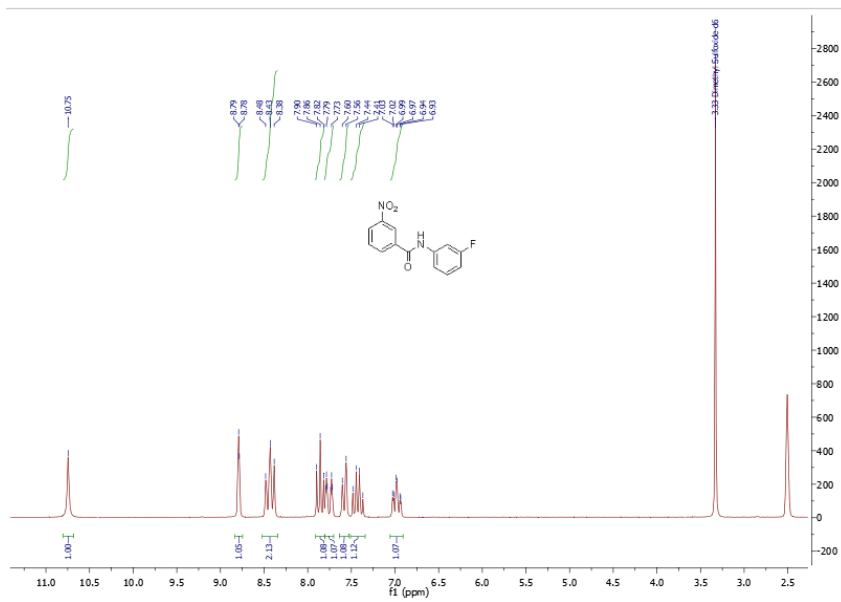
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **17b**



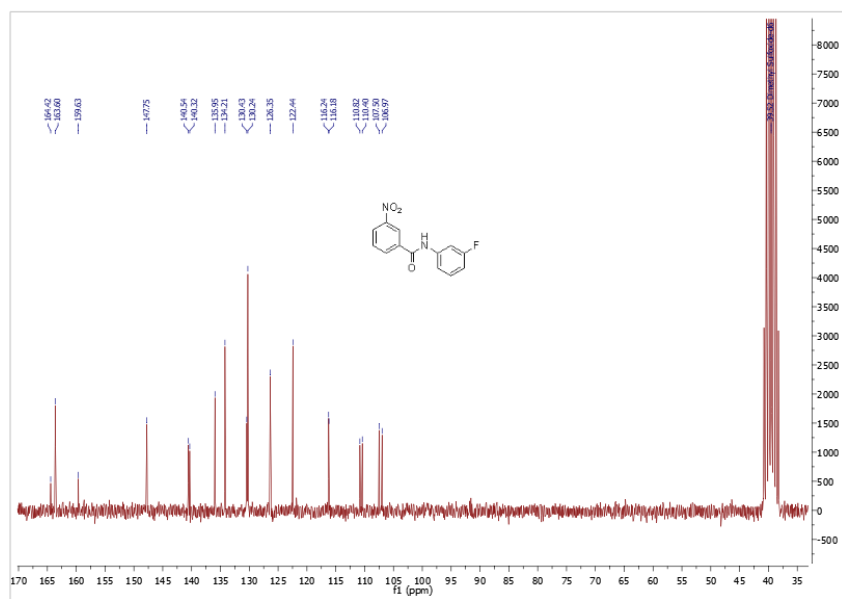
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **17b**



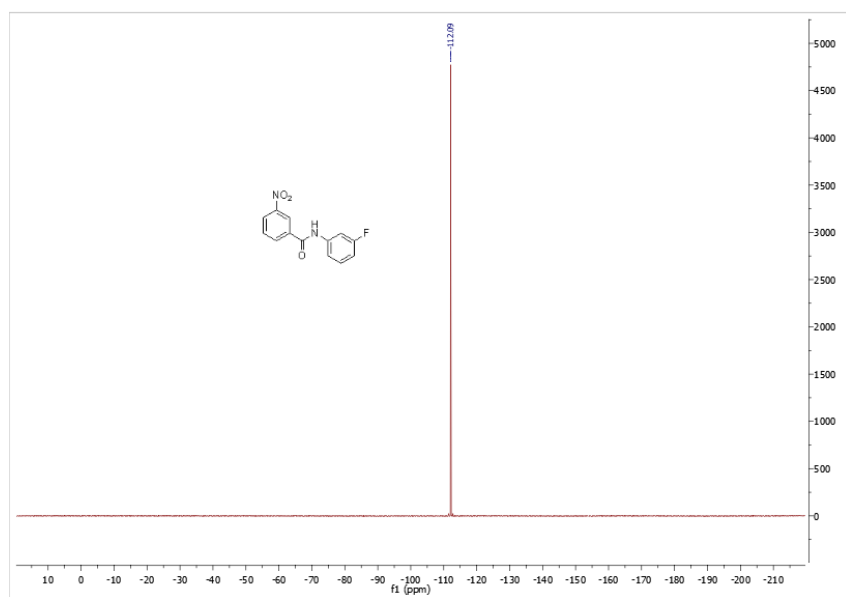
Espectro de ^1H RMN del compuesto **17c**



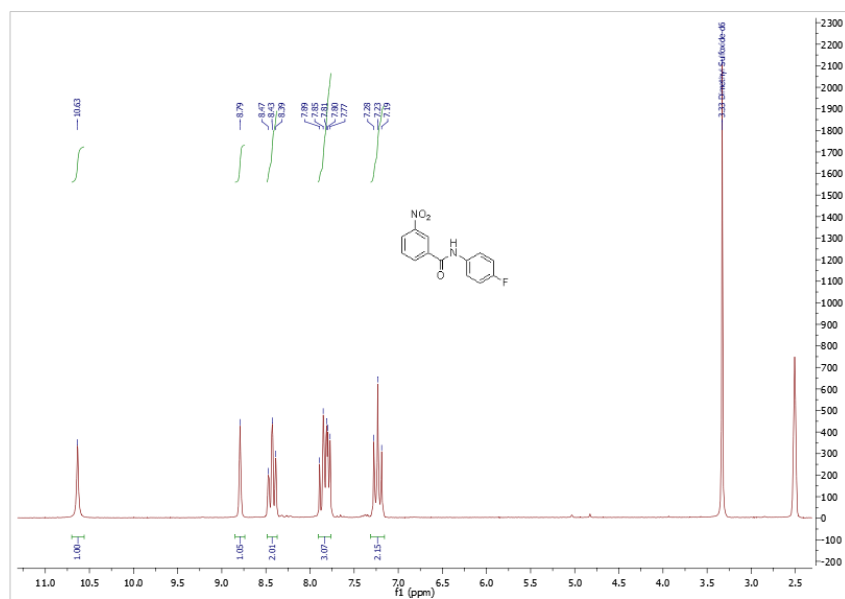
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **17c**



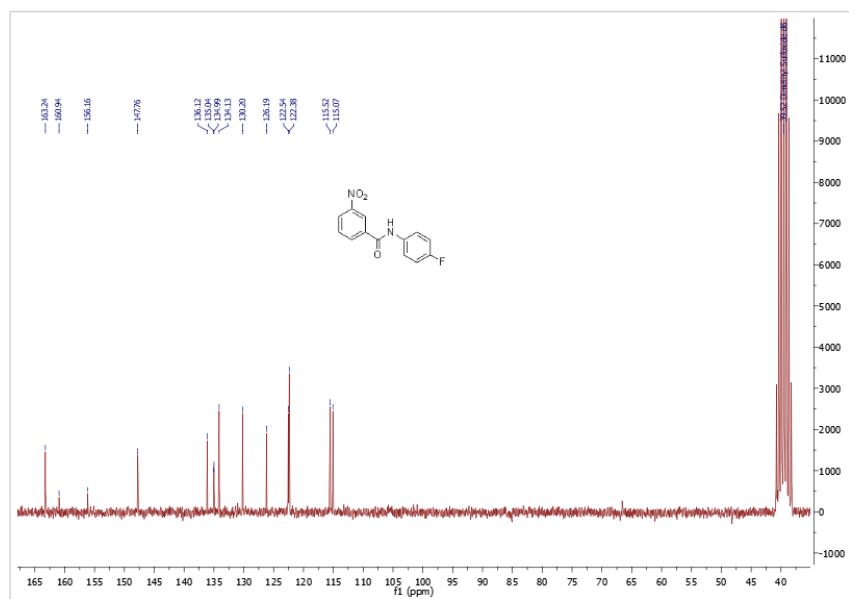
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **17c**



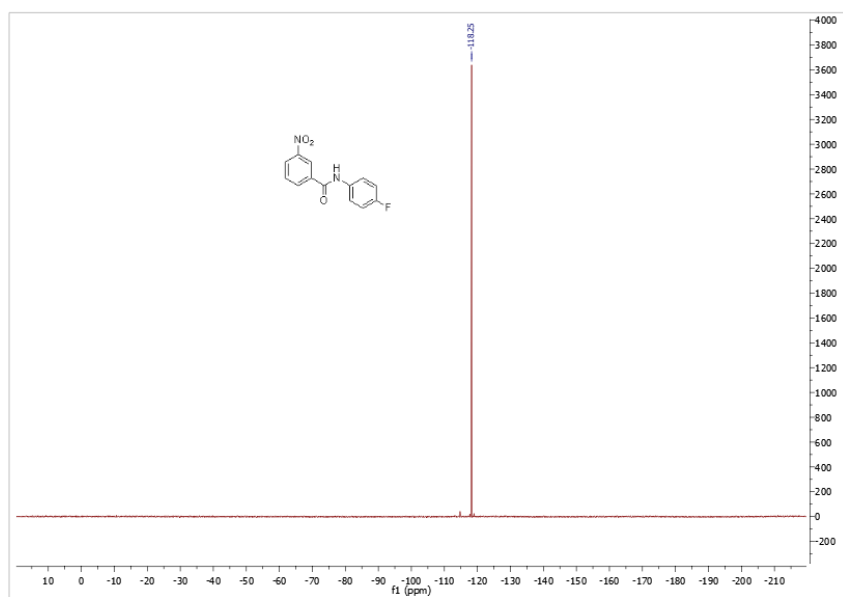
Espectro de ^1H RMN del compuesto **17d**



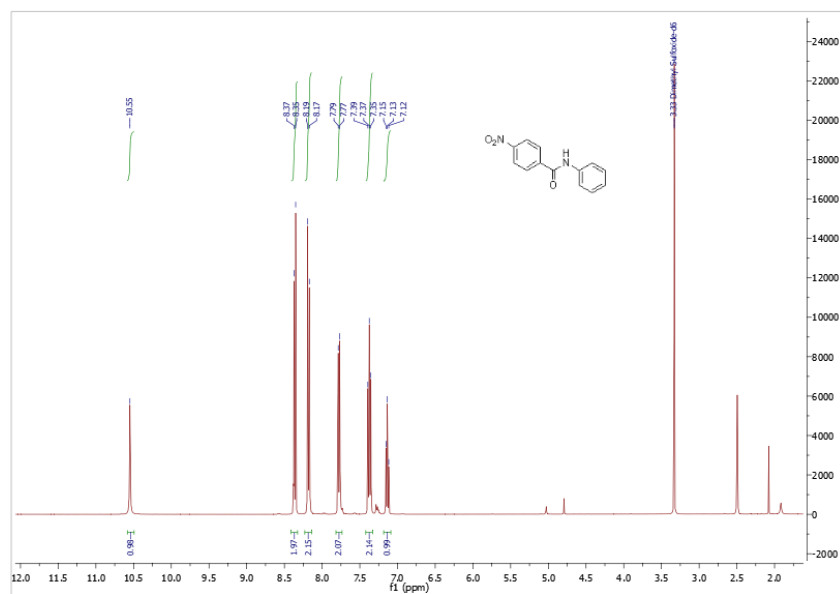
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **17d**



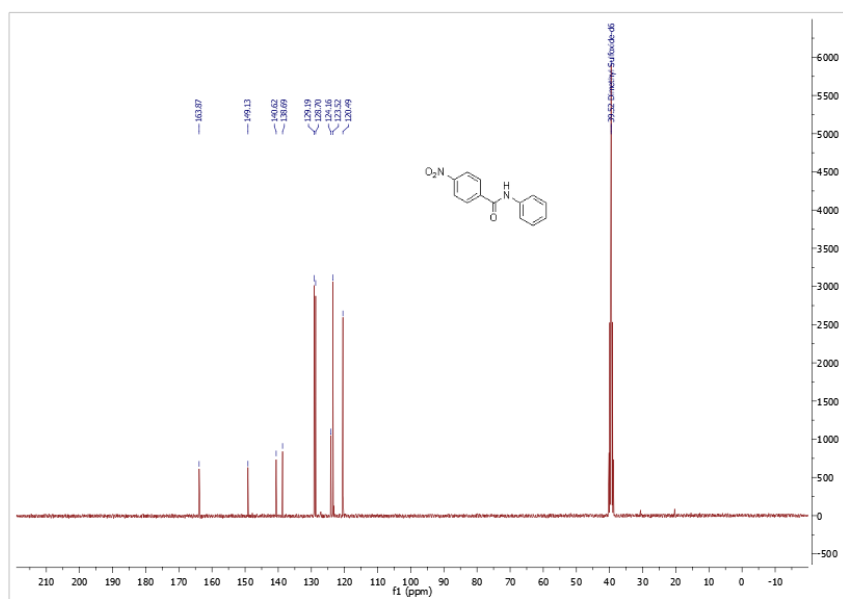
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **17d**



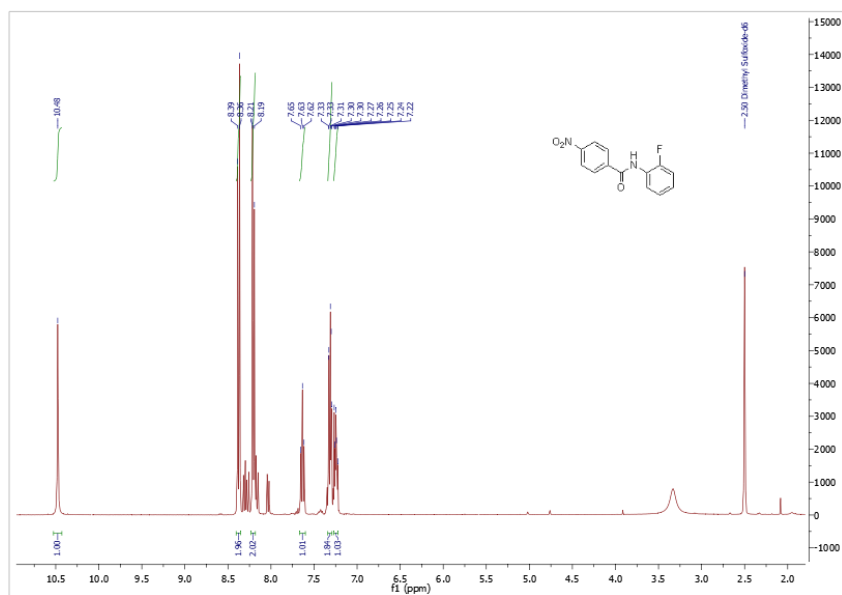
Espectro de ^1H RMN del compuesto **17e**



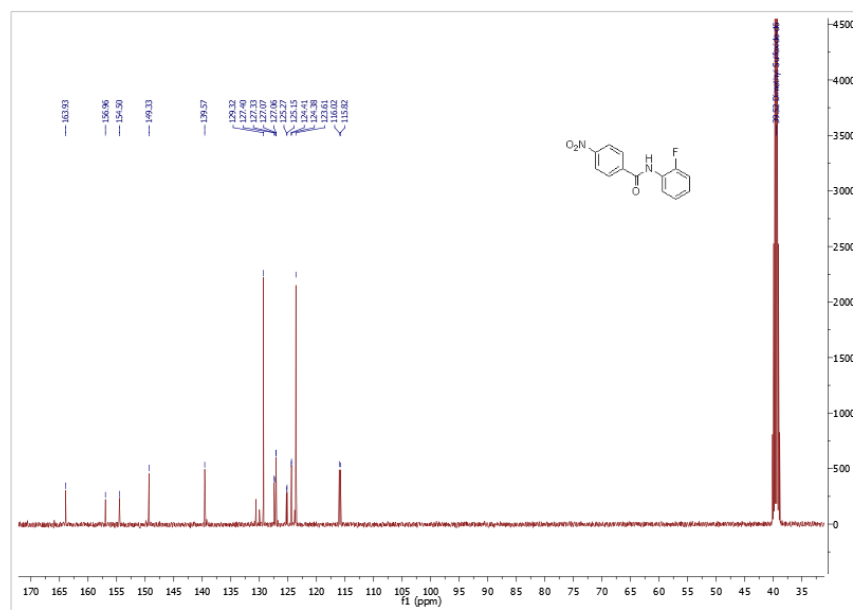
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **17e**



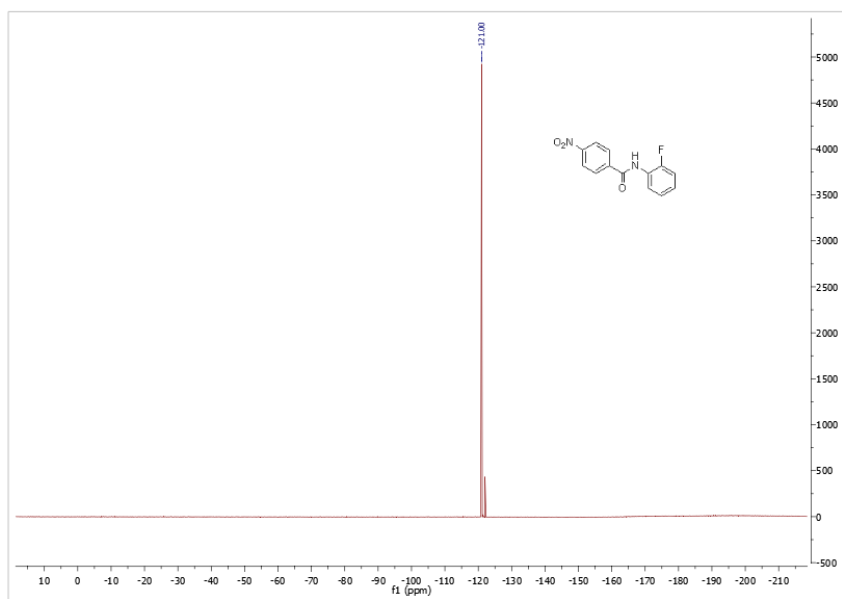
Espectro de ^1H RMN del compuesto **17f**



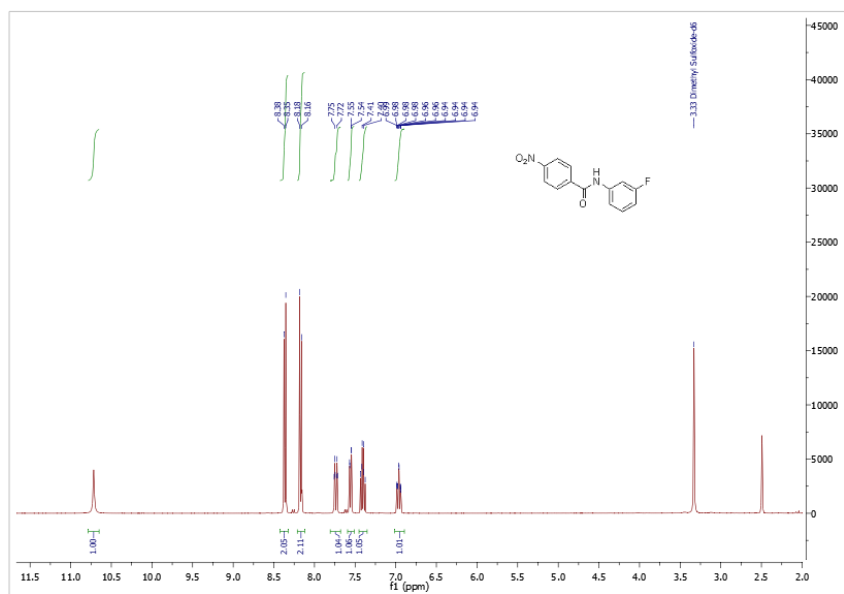
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **17f**



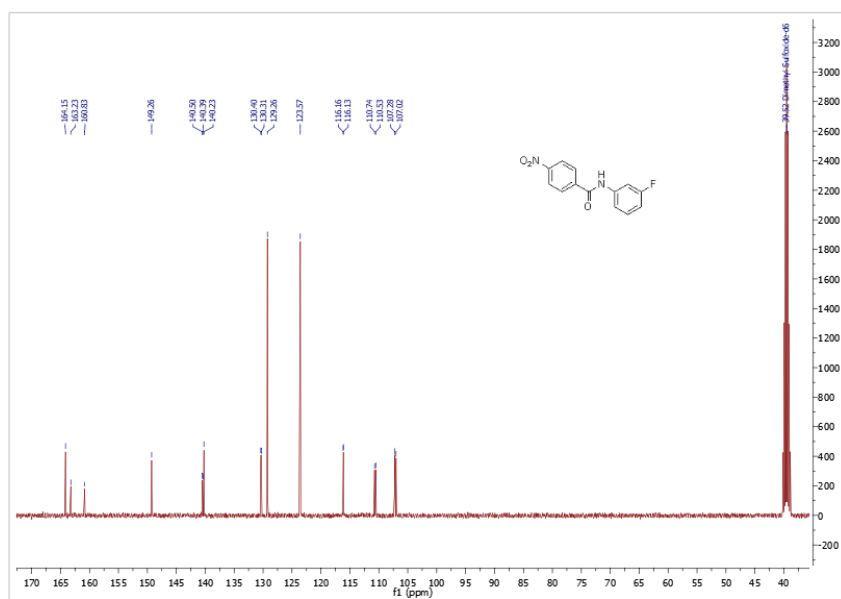
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **17f**



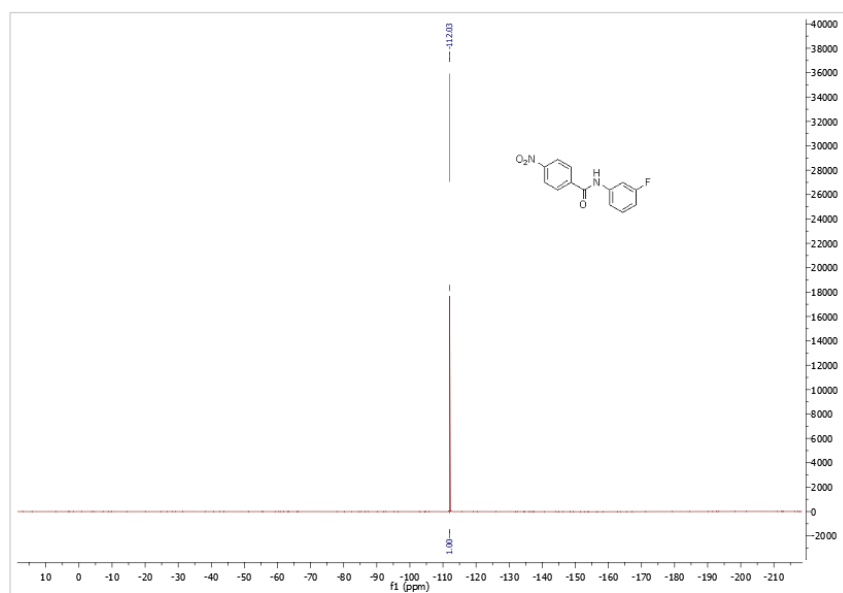
Espectro de ^1H RMN del compuesto **17g**



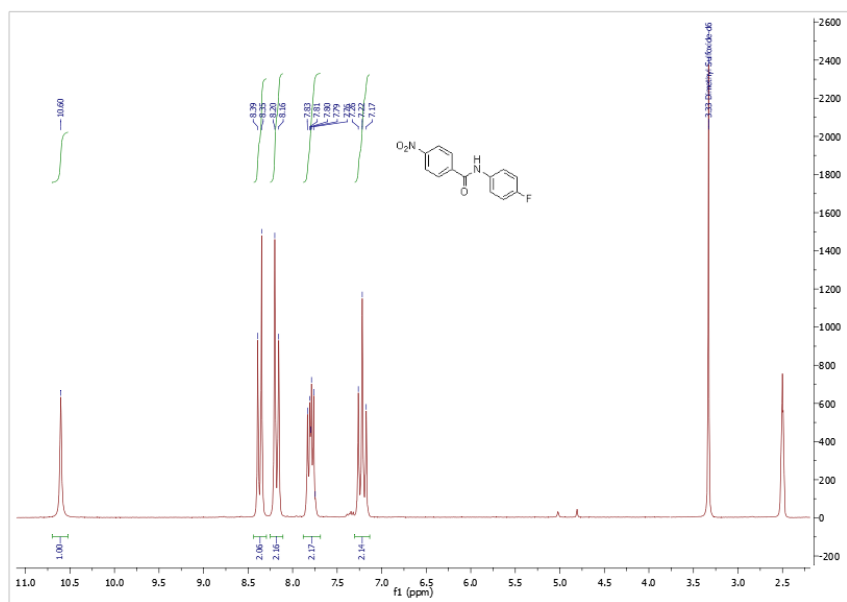
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **17g**



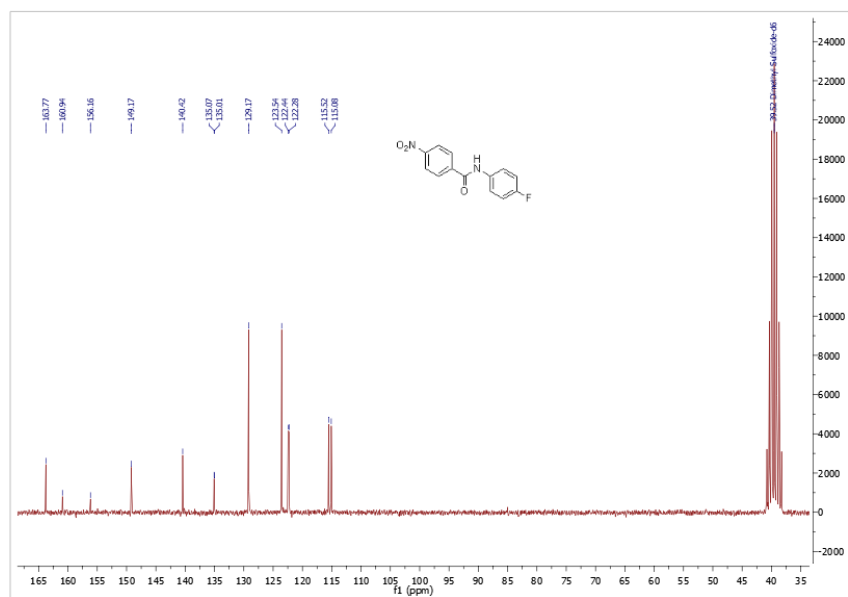
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **17g**



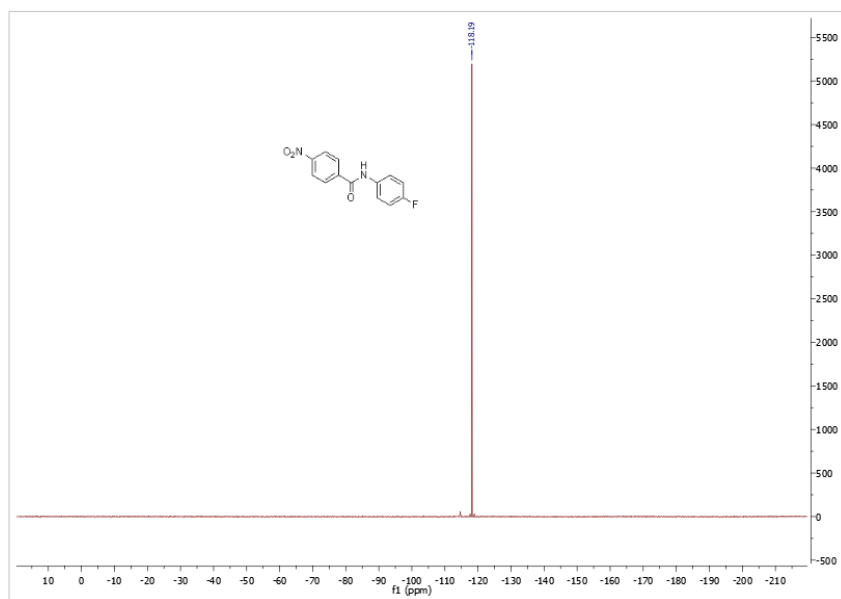
Espectro de ^1H RMN del compuesto **17h**



Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **17h**

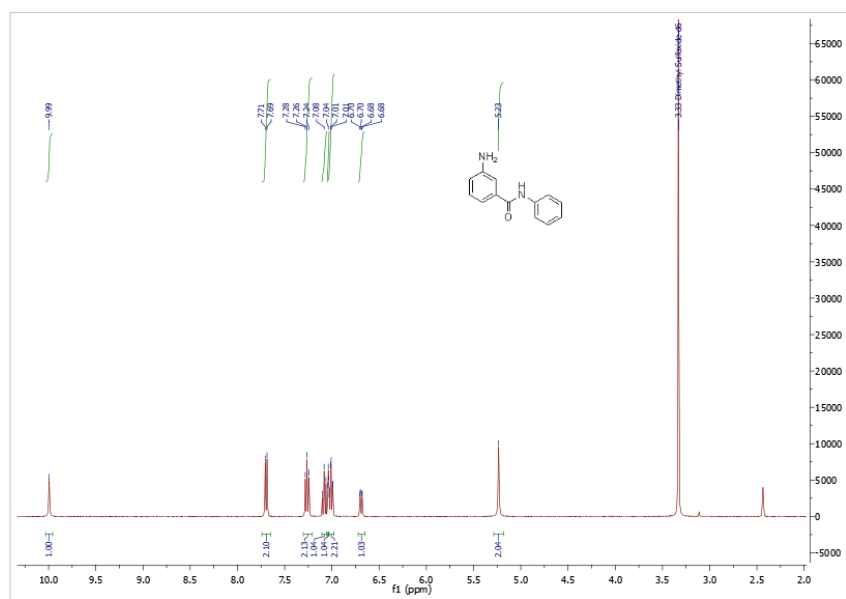


Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **17h**

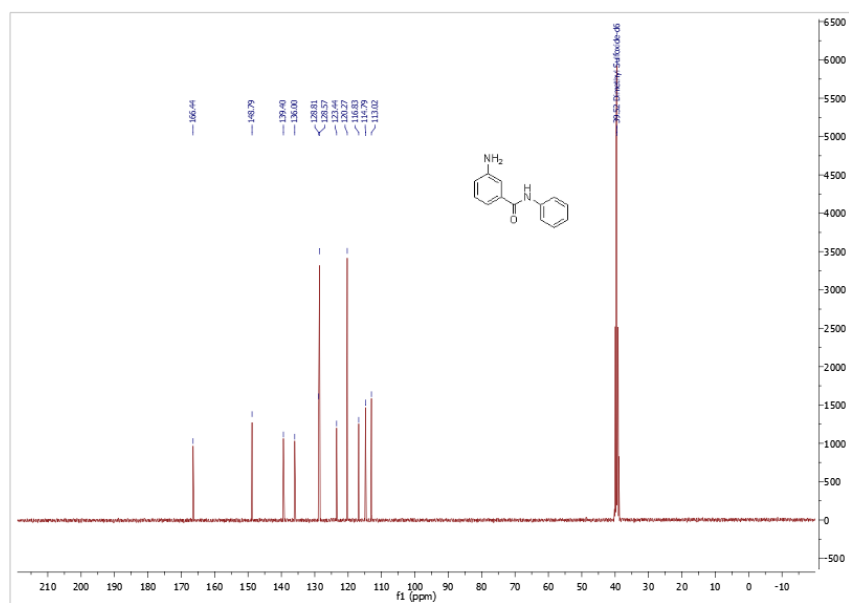


8.1.34 Espectros RMN de los derivados 18a–h

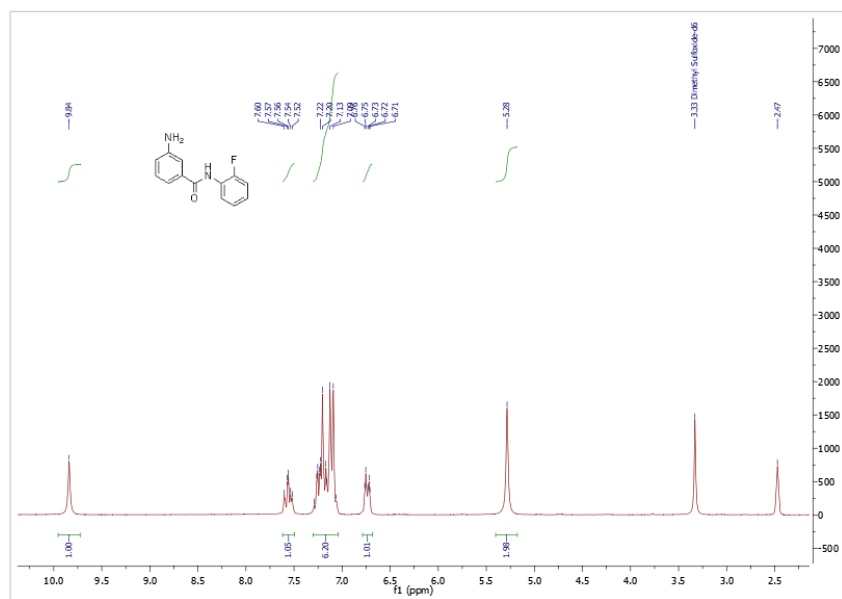
Espectro de ^1H RMN del compuesto **18a**



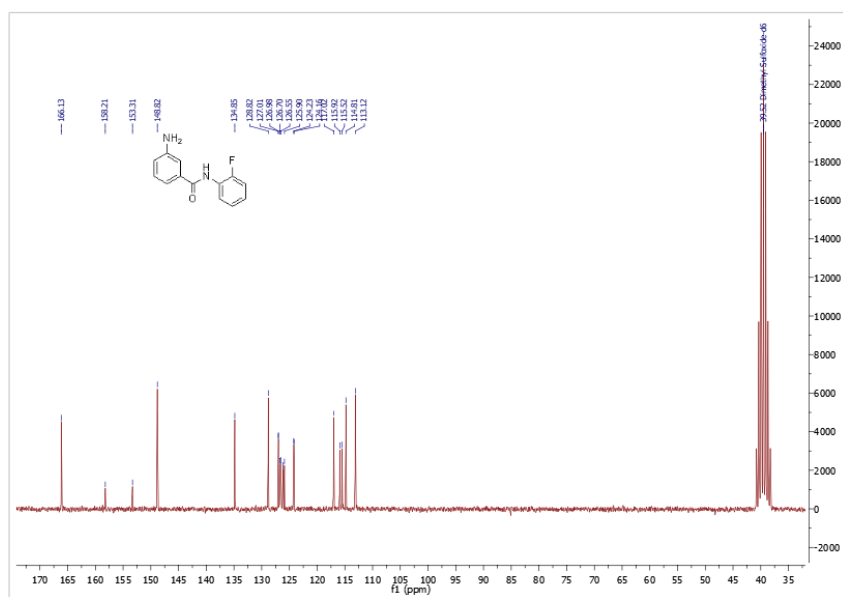
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **18a**



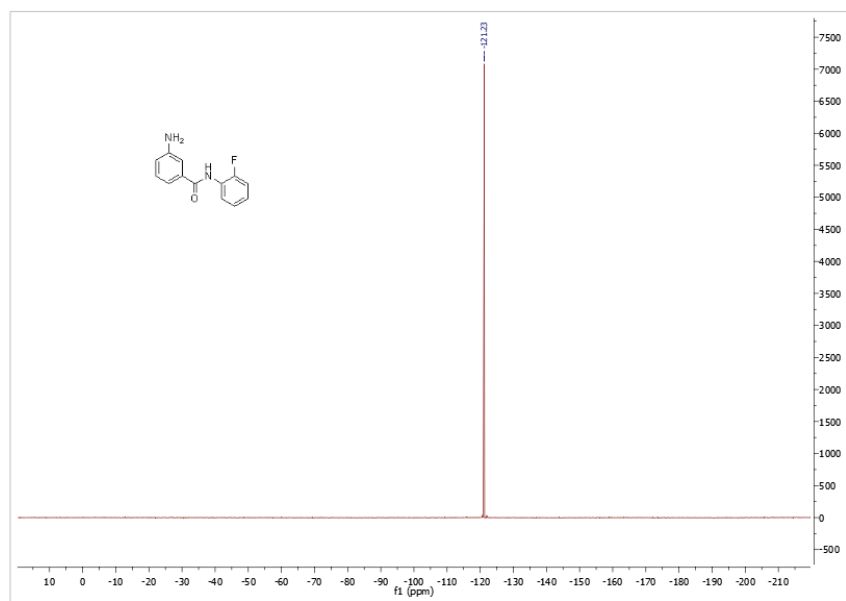
Espectro de ^1H RMN del compuesto **18b**



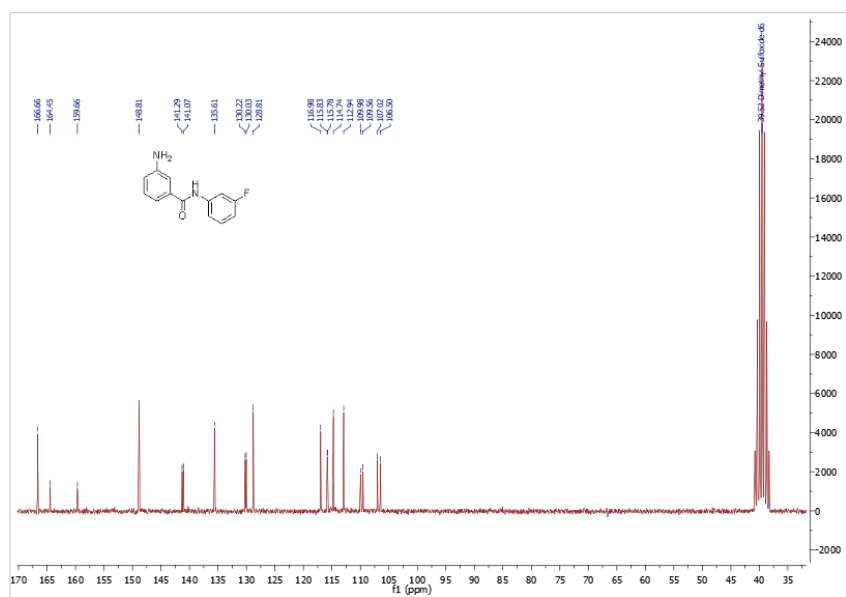
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **18b**



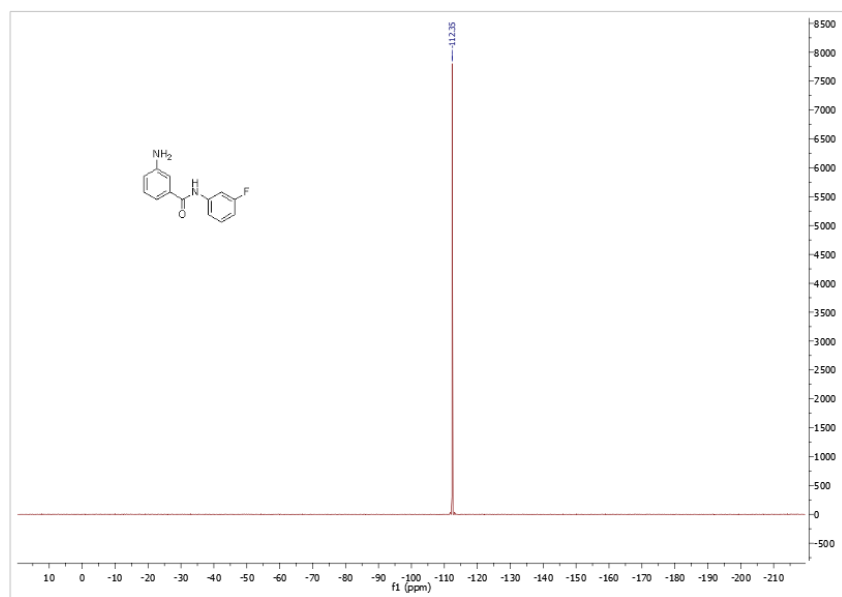
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **18b**



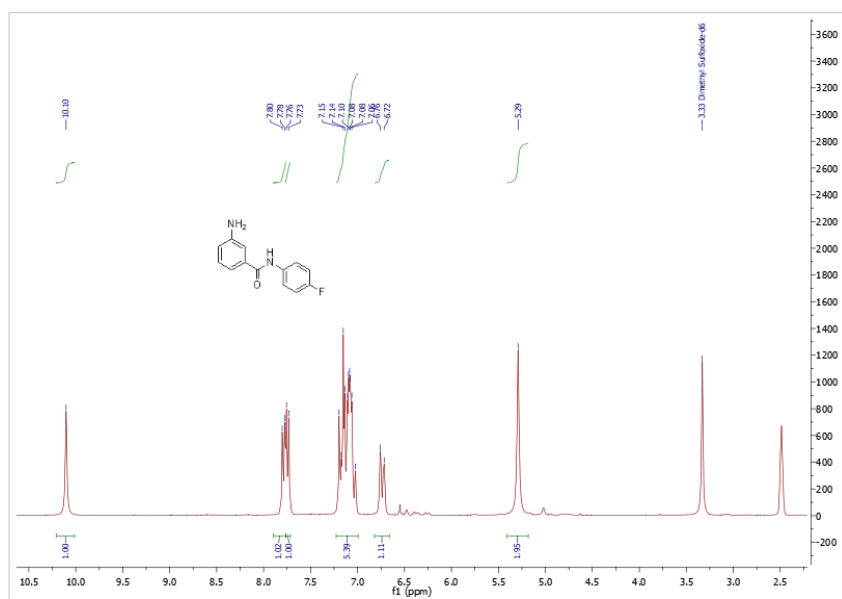
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **18c**



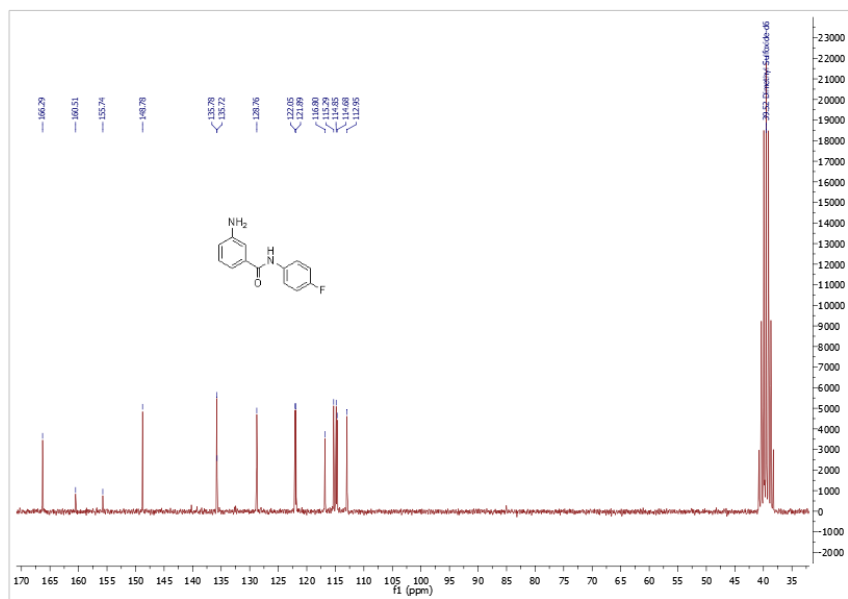
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **18c**



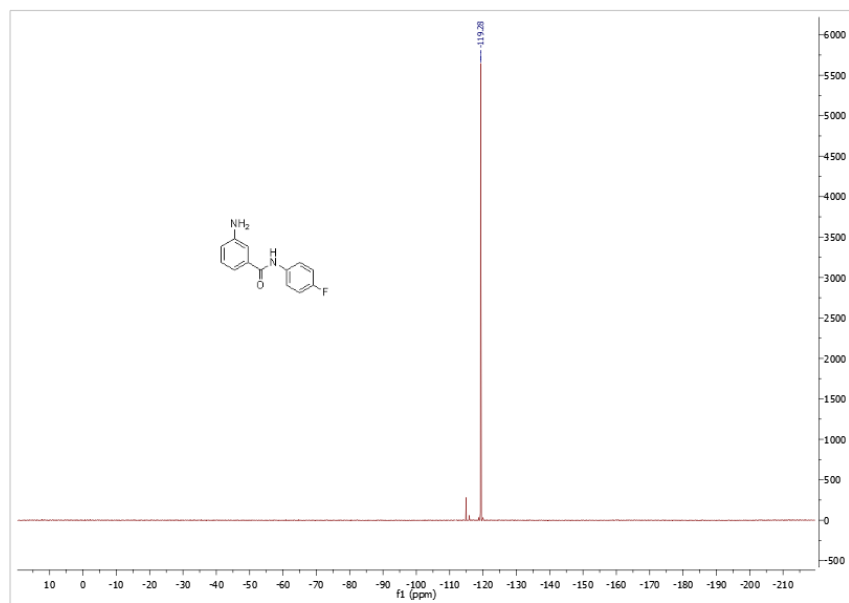
Espectro de ^1H RMN del compuesto **18d**



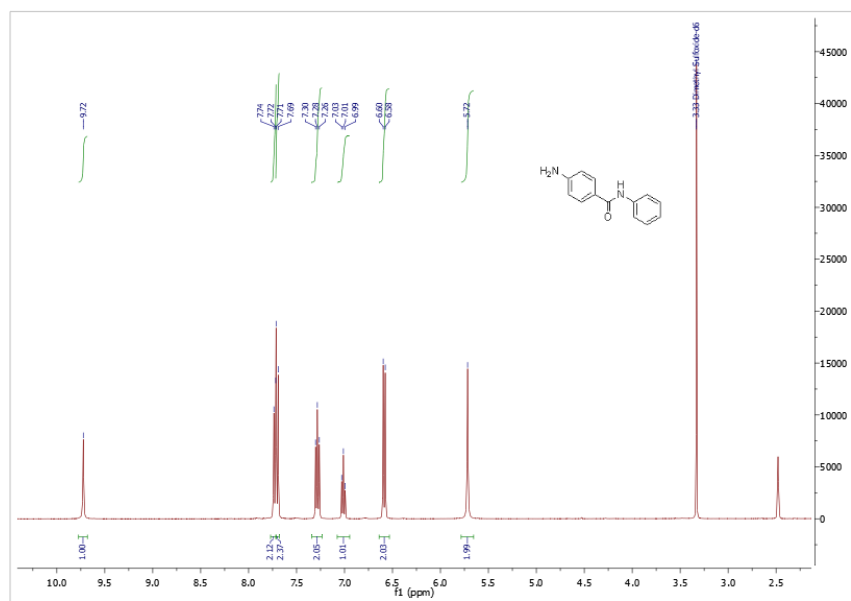
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **18d**



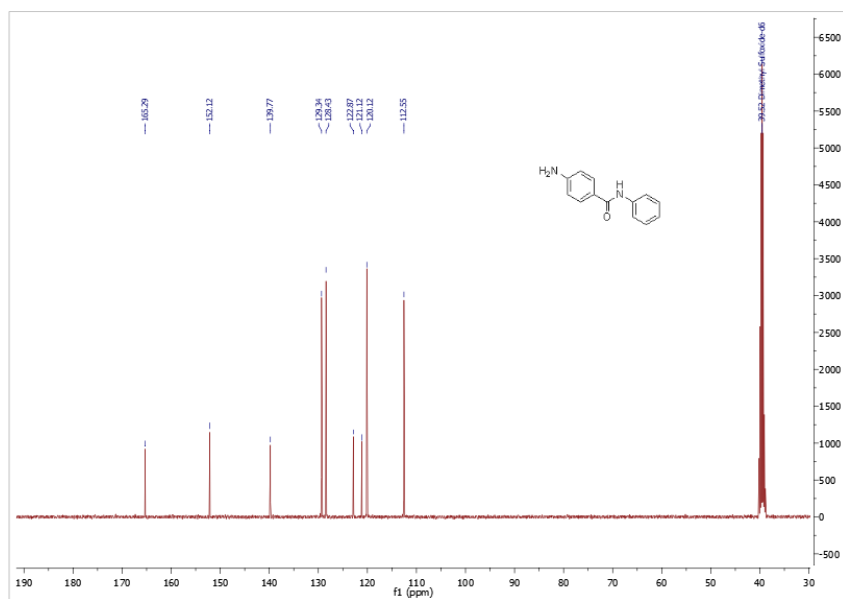
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **18d**



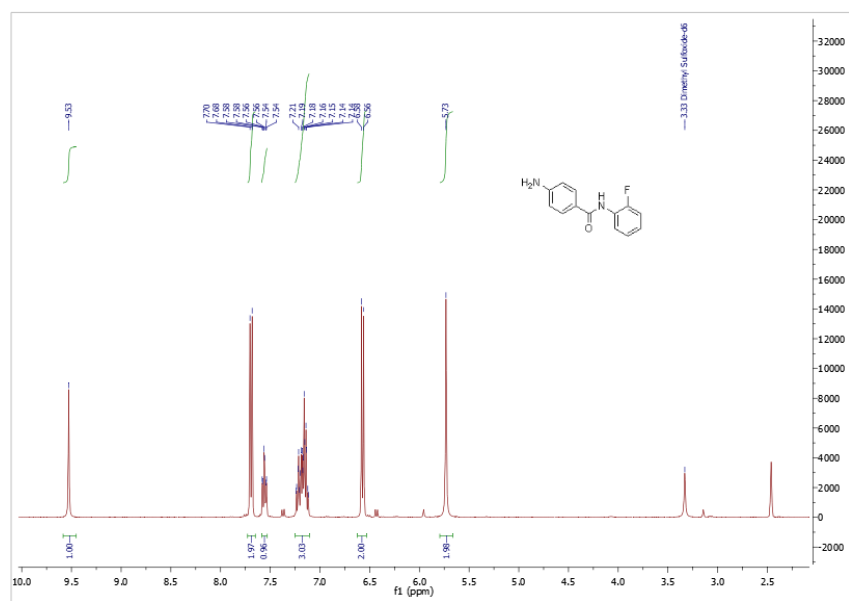
Espectro de ^1H RMN del compuesto **18e**



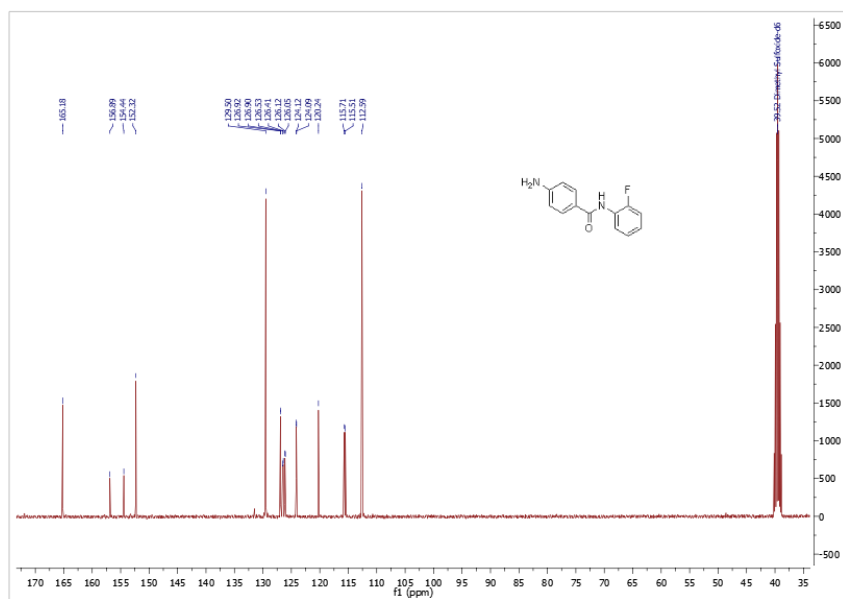
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **18e**



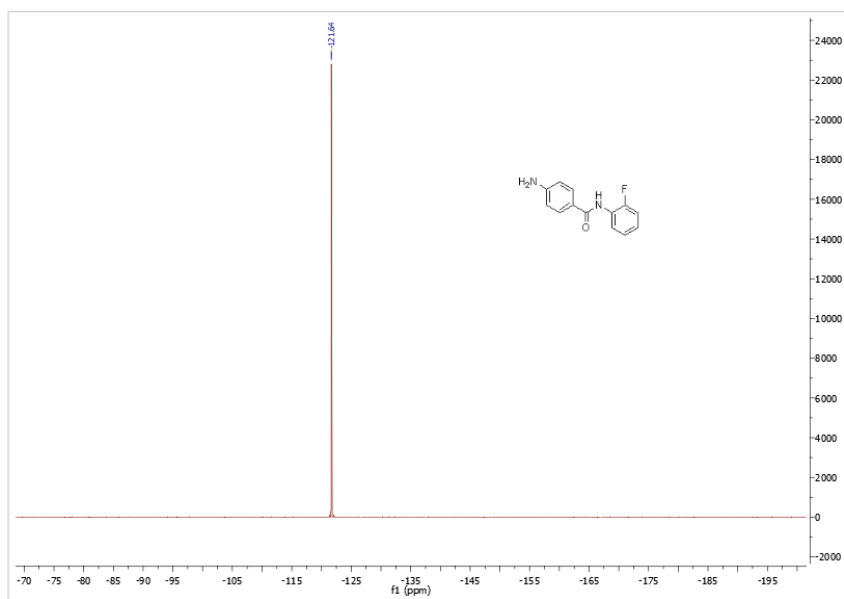
Espectro de ^1H RMN del compuesto **18f**



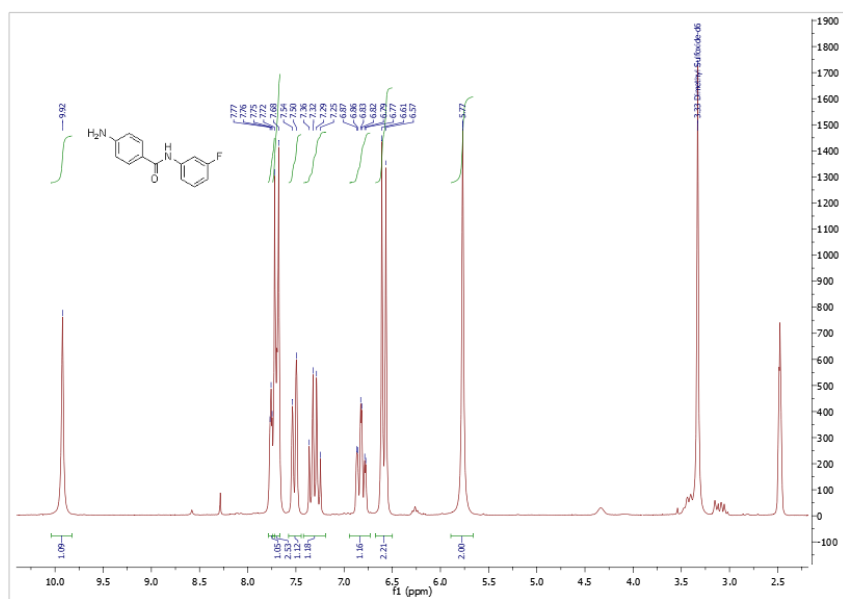
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **18f**



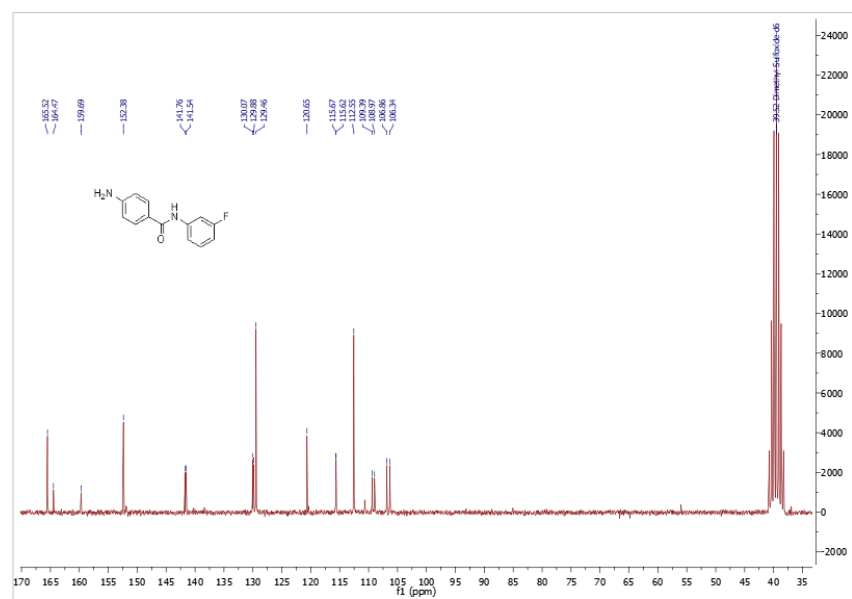
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **18f**



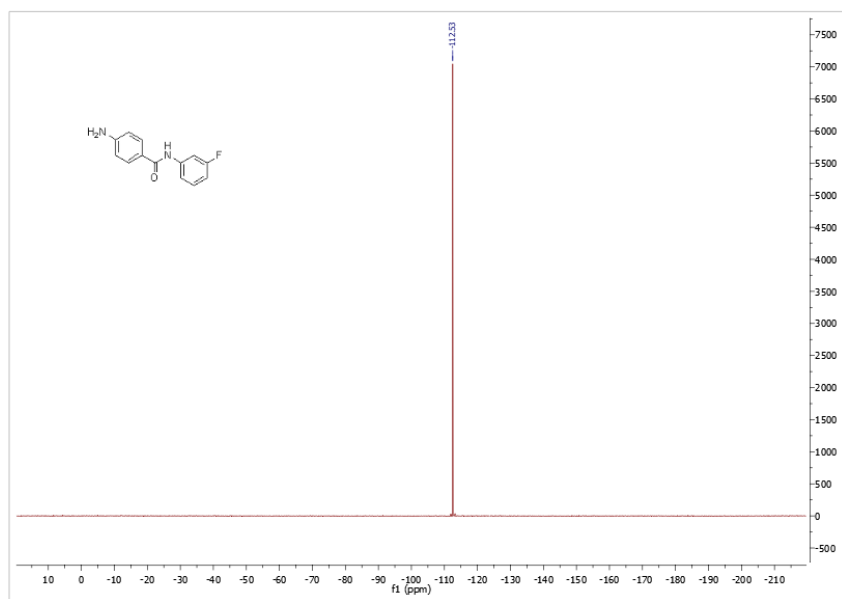
Espectro de ^1H RMN del compuesto **18g**



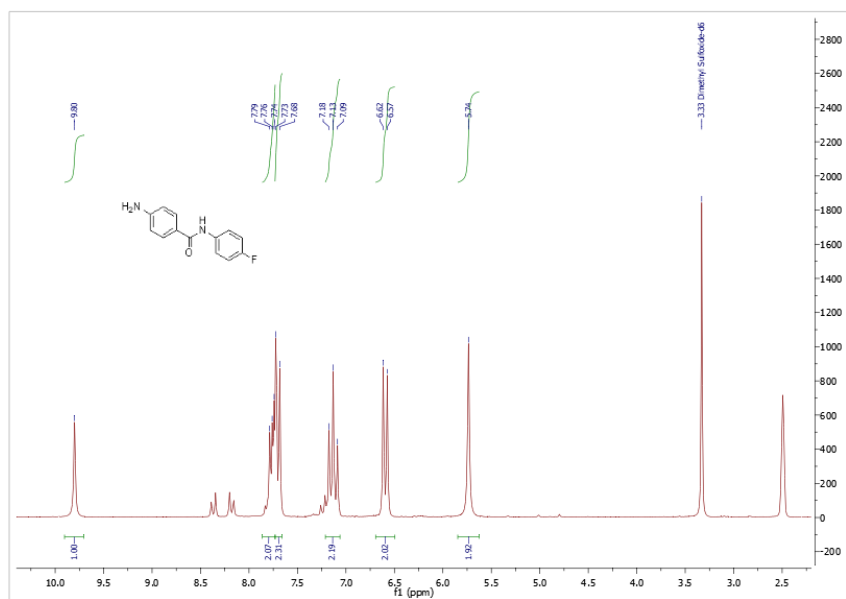
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **18g**



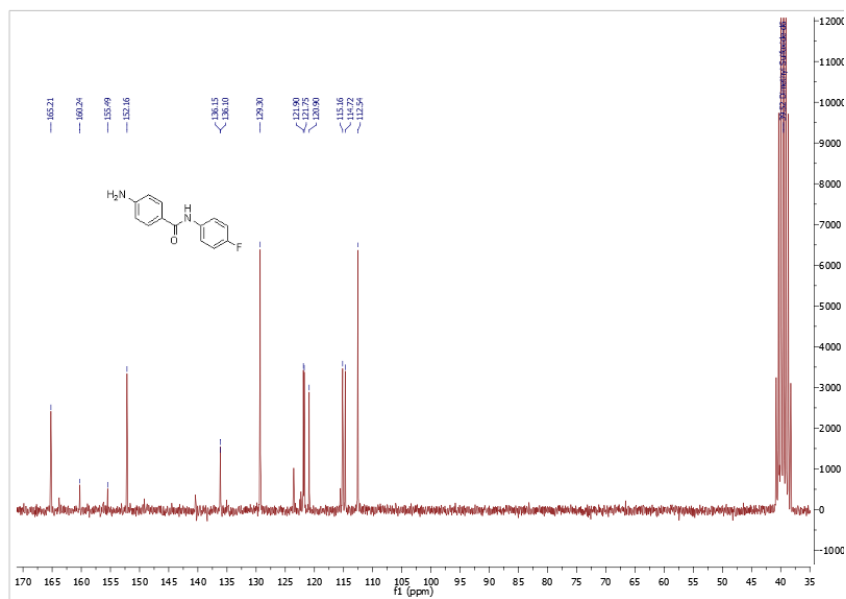
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **18g**



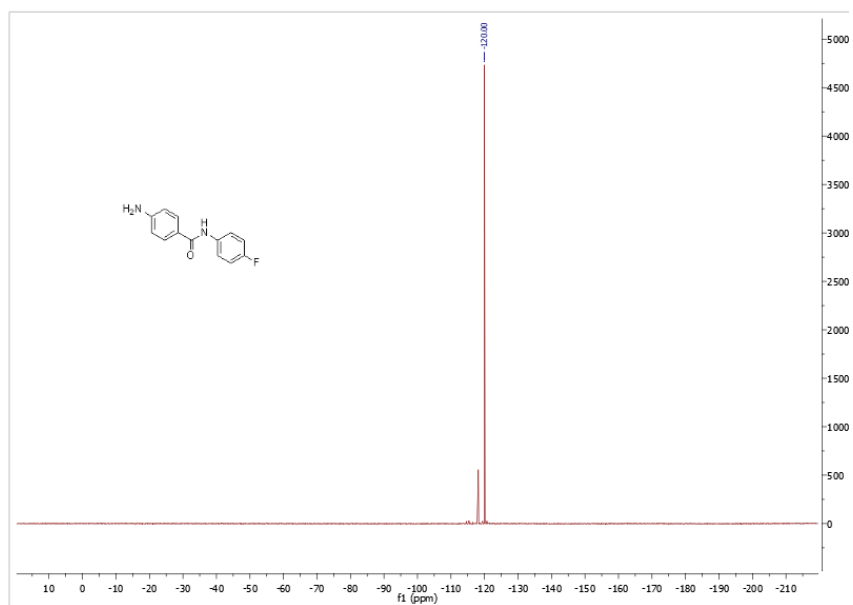
Espectro de ^1H RMN del compuesto **18h**



Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **18h**

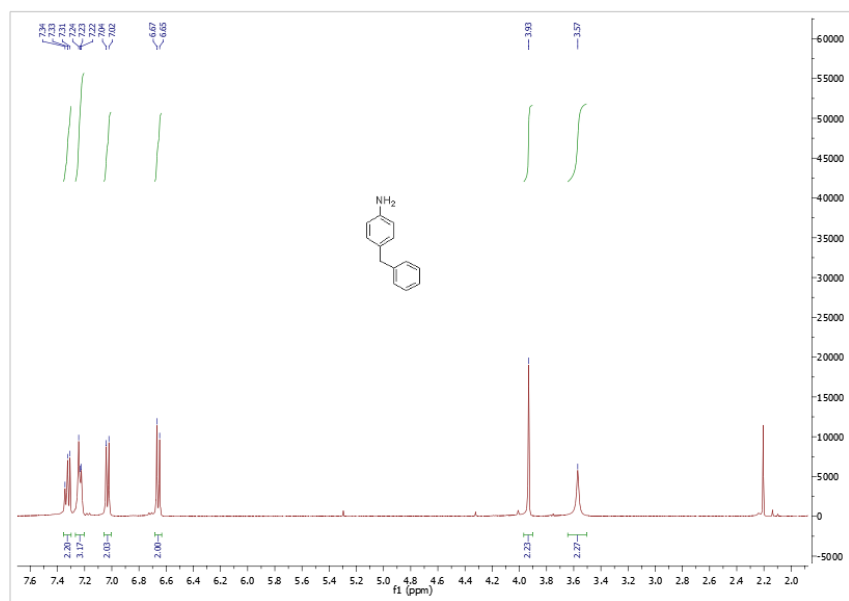


Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **18h**

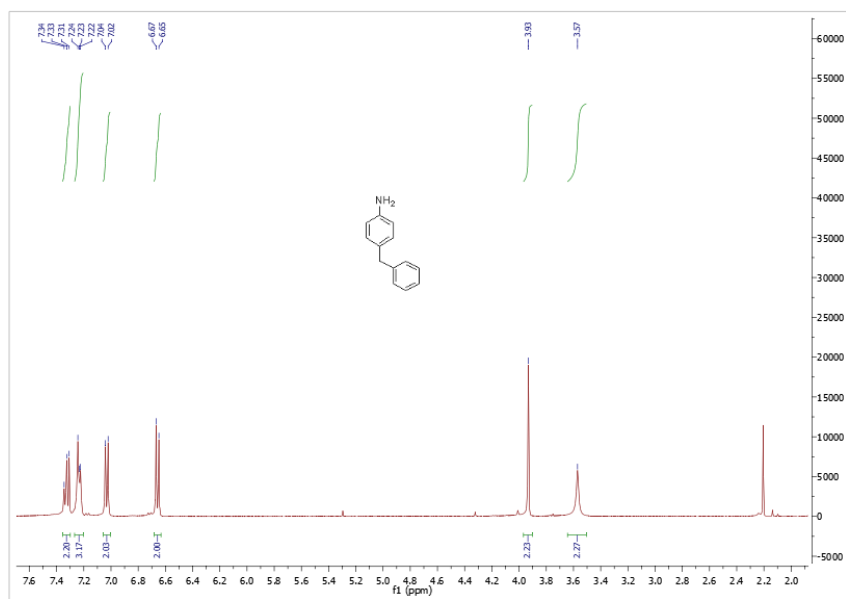


8.1.35 Espectros RMN del derivado 20

Espectro de ^1H RMN del compuesto **20**

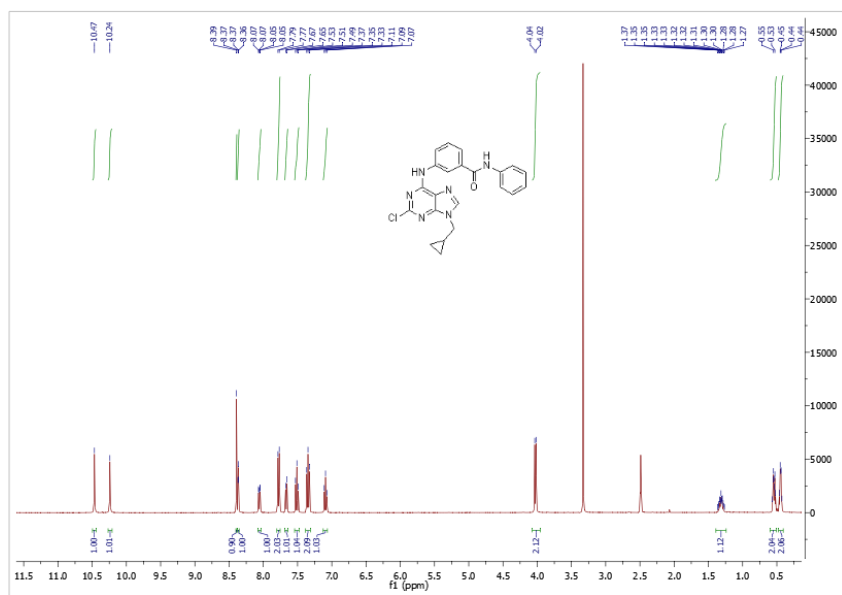


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **20**



8.1.36 Espectros RMN de los derivados 21a–h

Espectro de ^1H RMN del compuesto **21a**



Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **21a**

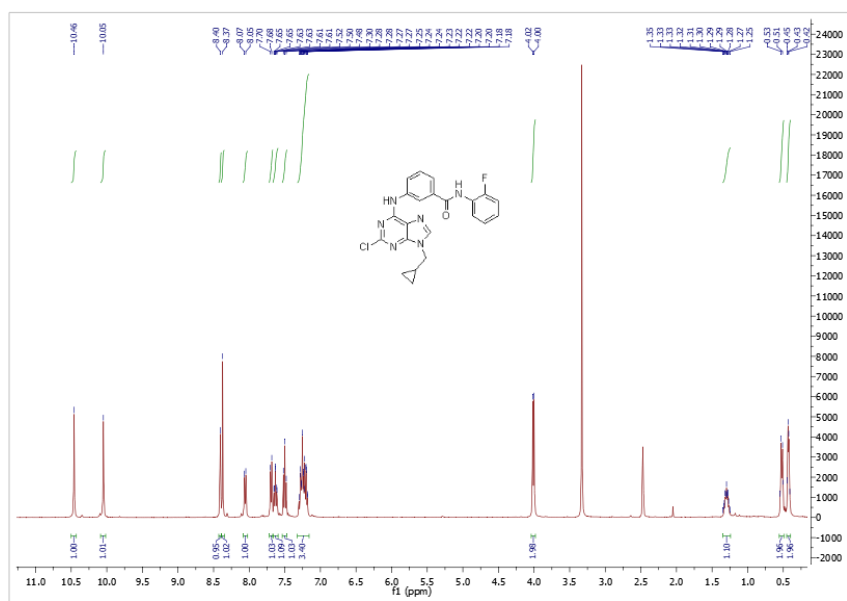
Chemical structure of compound **21a** is shown above the spectrum. The structure is a purine derivative with a chlorine atom at position 6, a cyclopropylmethyl group at position 9, and a benzamide group at position 2.

Chemical structure of compound **21a**: Clc1nc2nc(CCC3CC3)n2c1NC(=O)Nc4ccccc4

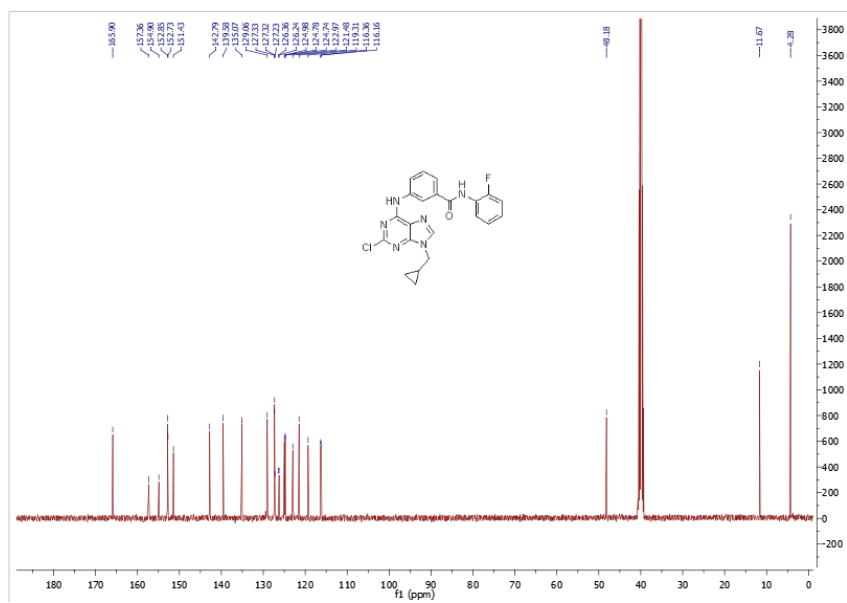
Peak list (ppm):

Chemical Shift (ppm)
155.60
152.39
152.25
150.94
142.32
139.20
137.69
135.69
128.62
128.50
127.64
127.64
123.93
123.93
120.28
120.28
118.63
47.70
11.19
3.81

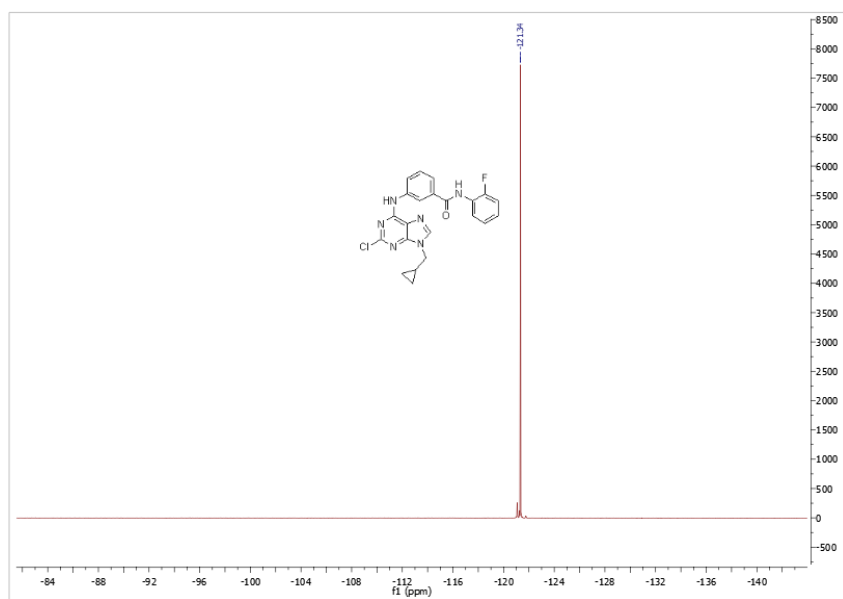
Espectro de ^1H RMN del compuesto **21b**



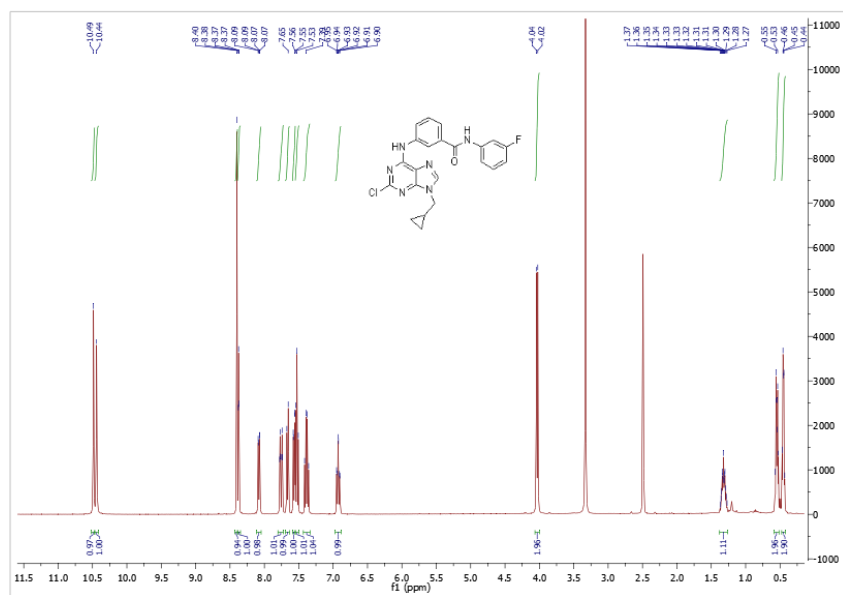
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **21b**



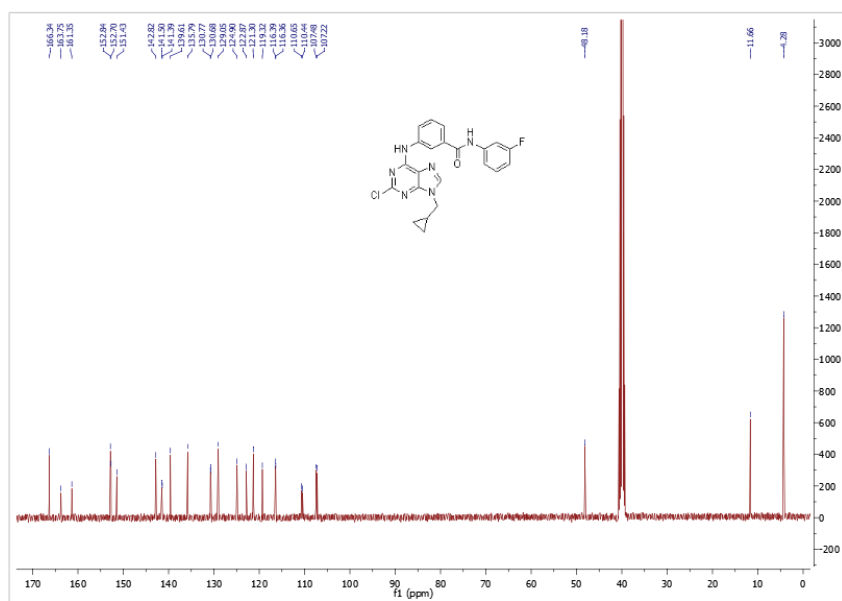
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **21b**



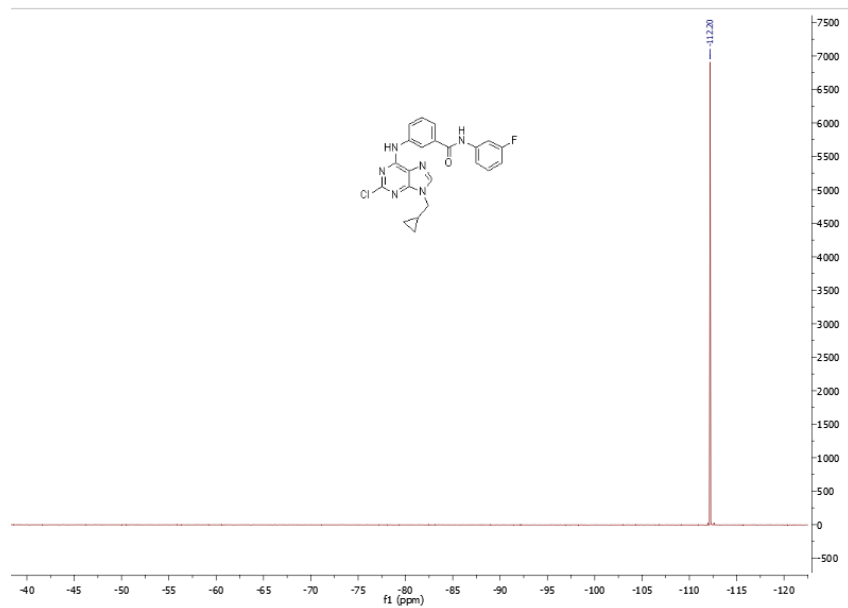
Espectro de ^1H RMN del compuesto **21c**



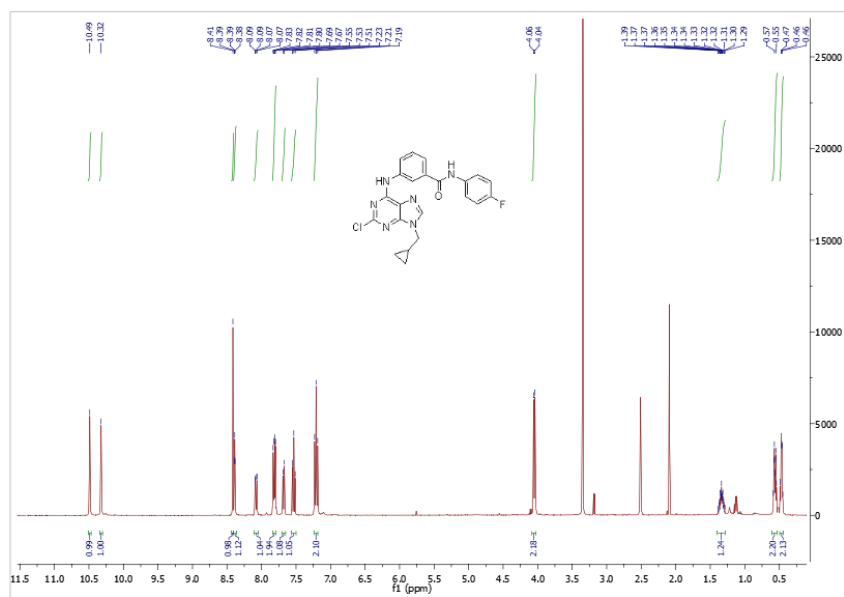
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **21c**



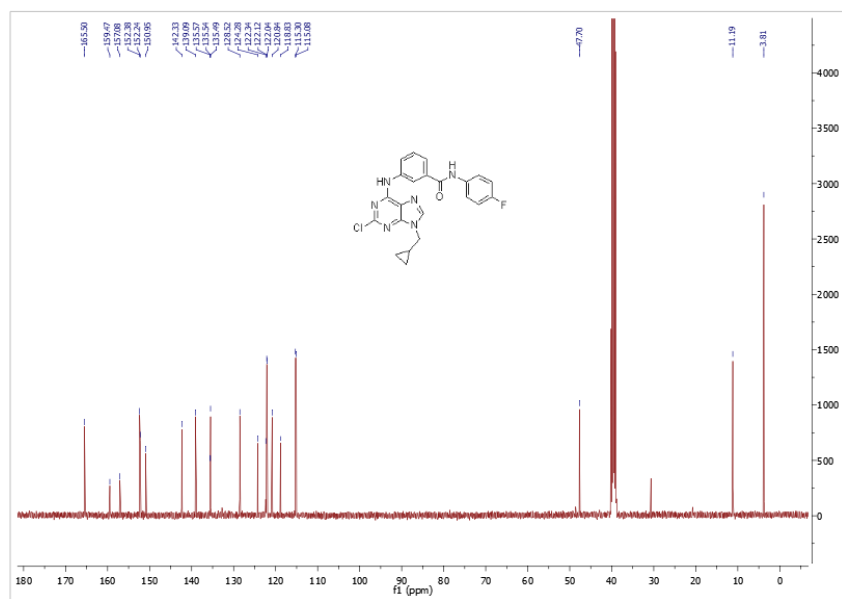
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **21c**



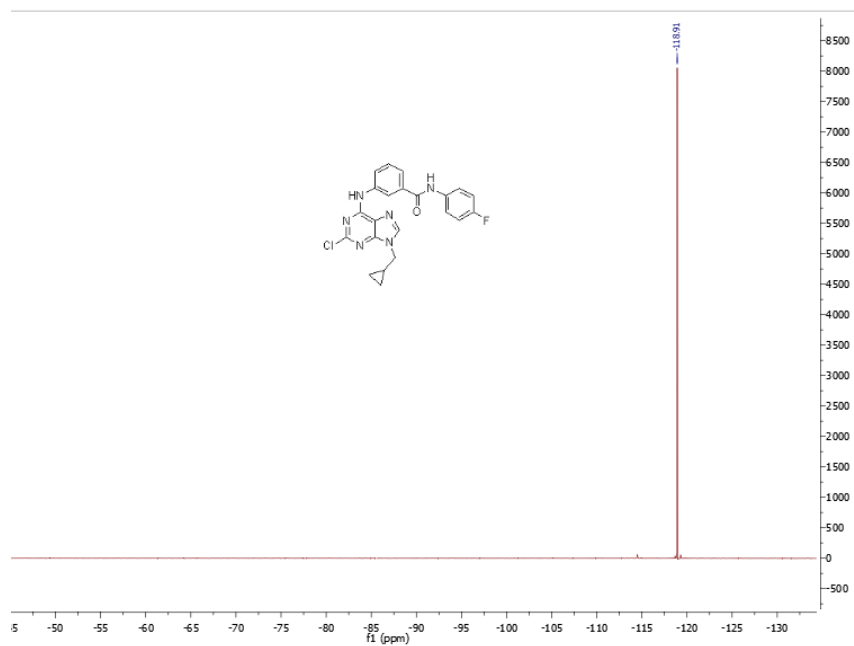
Espectro de ^1H RMN del compuesto **21d**



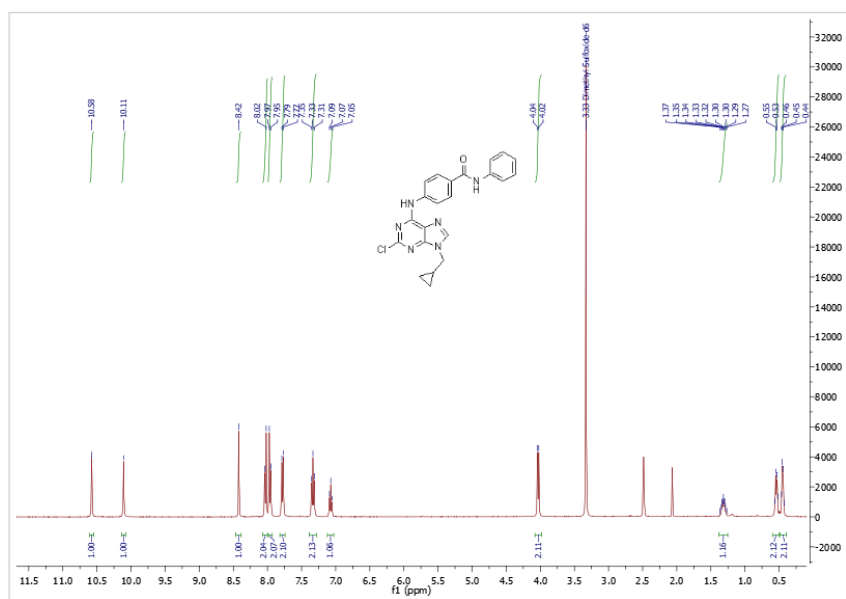
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **21d**



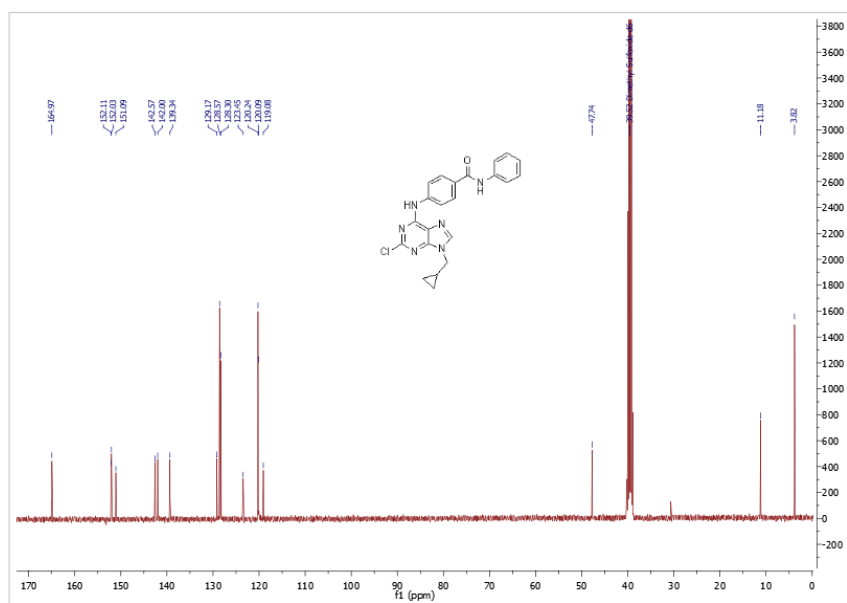
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **21d**



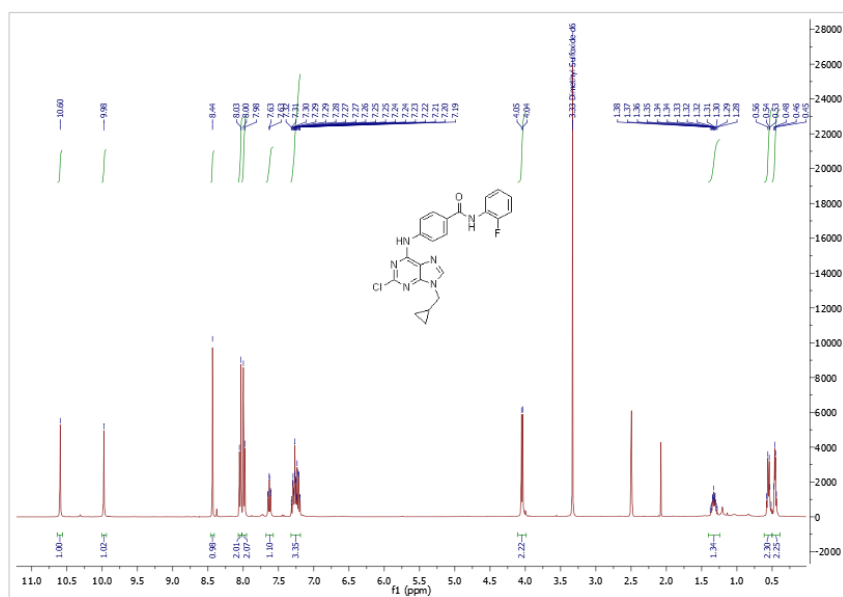
Espectro de ^1H RMN del compuesto **21e**



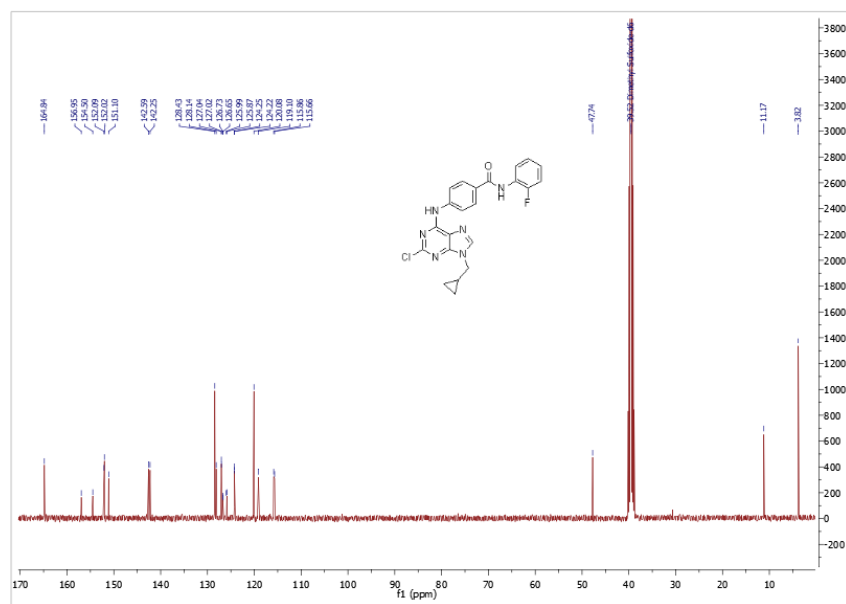
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **21e**



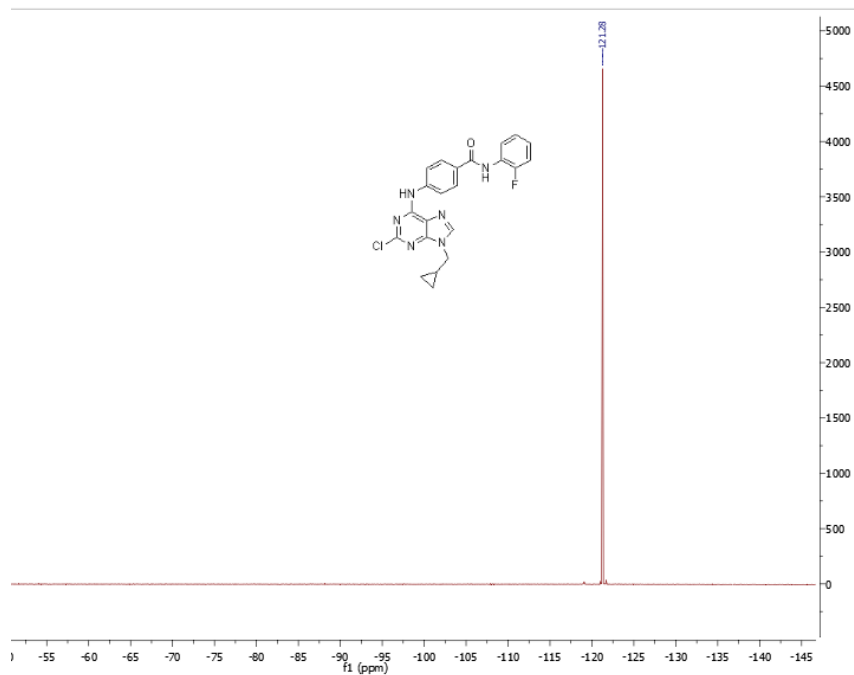
Espectro de ^1H RMN del compuesto **21f**



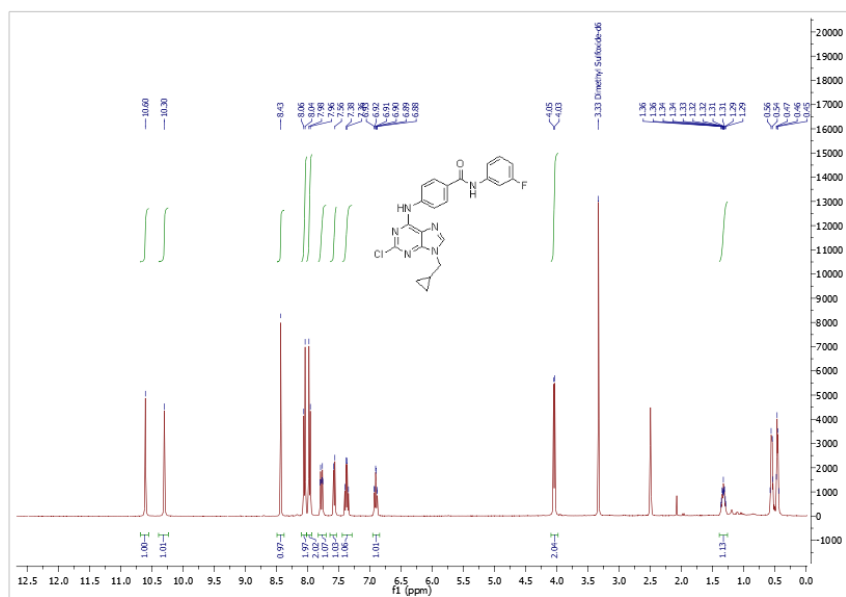
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **21f**



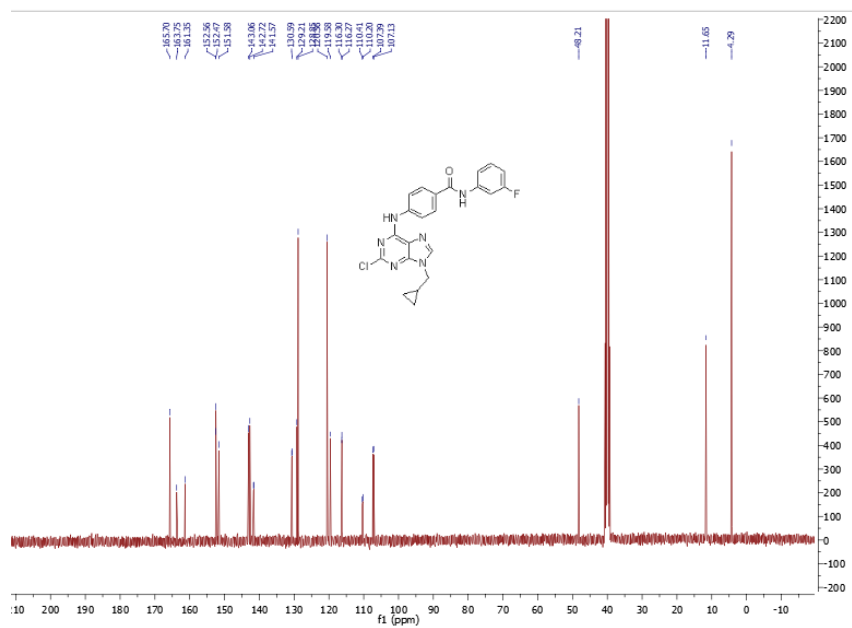
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **21f**



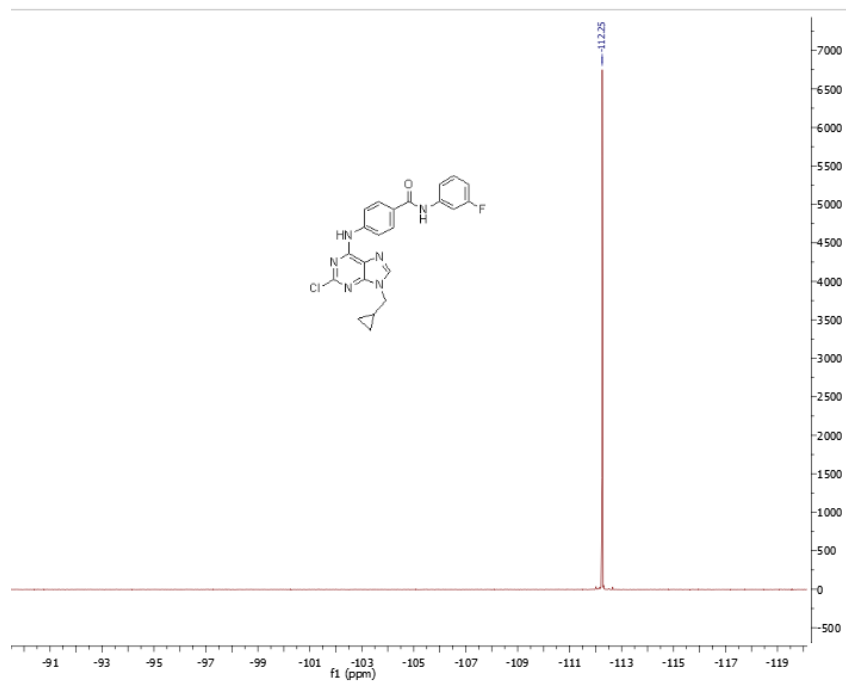
Espectro de ^1H RMN del compuesto **21g**



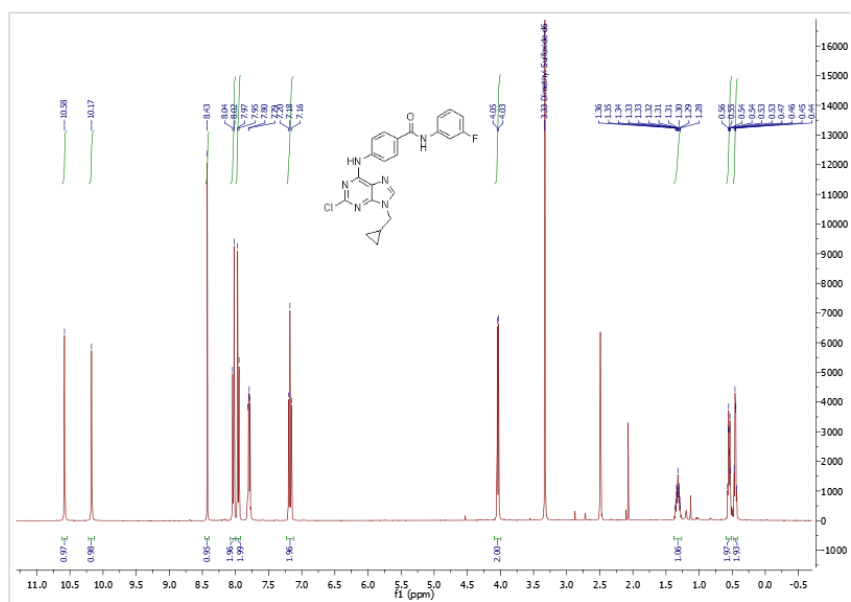
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **21g**



Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **21g**

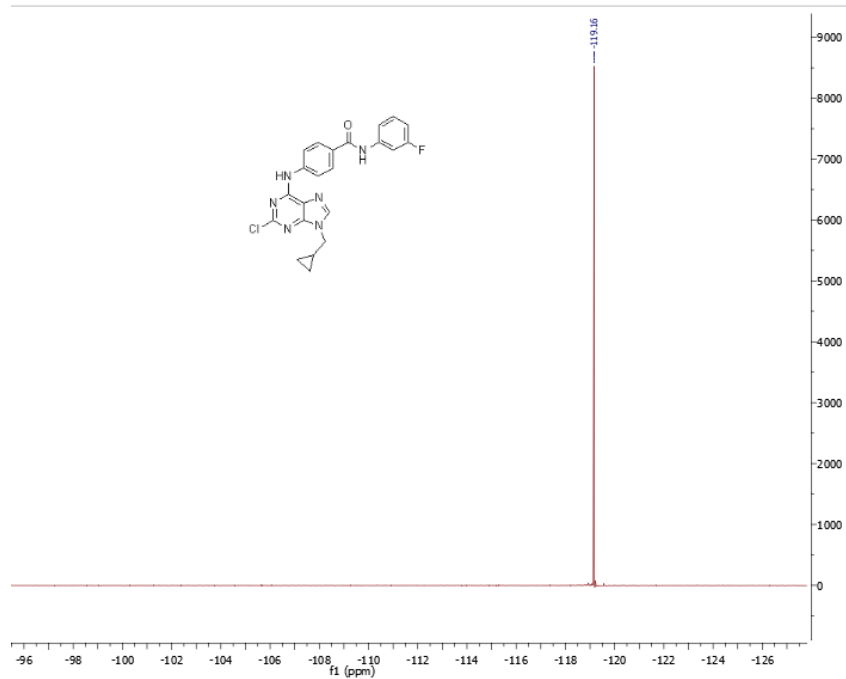


Espectro de ^1H RMN del compuesto **21h**



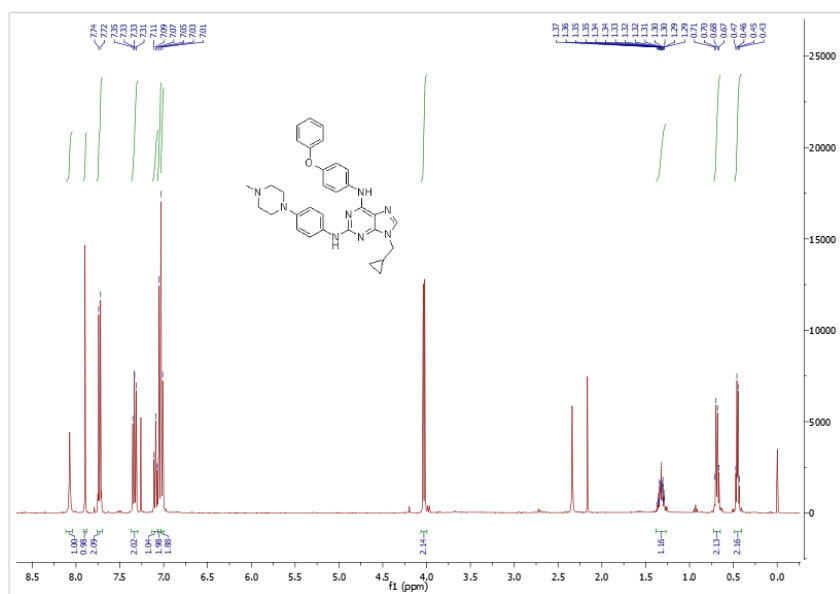


Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **21h**

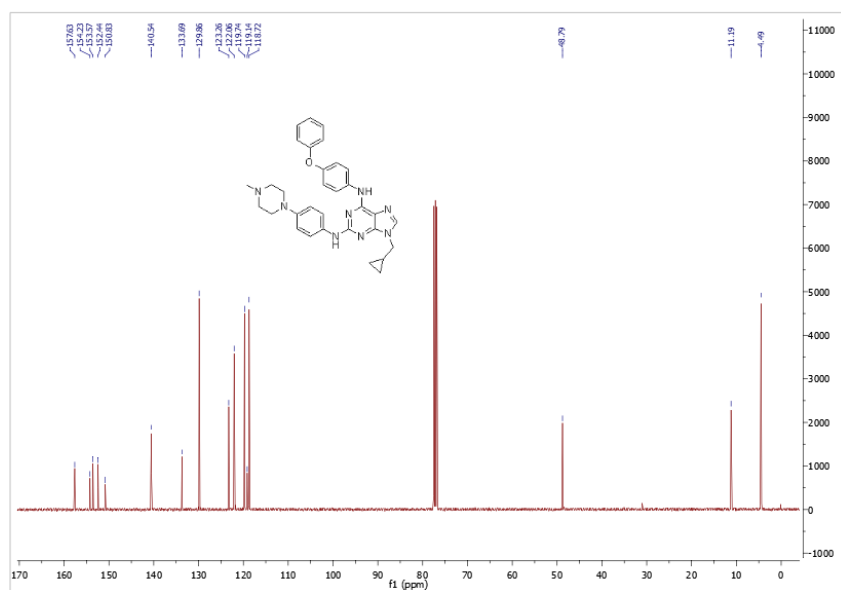


8.1.37 Espectros RMN de los derivados 22a-e

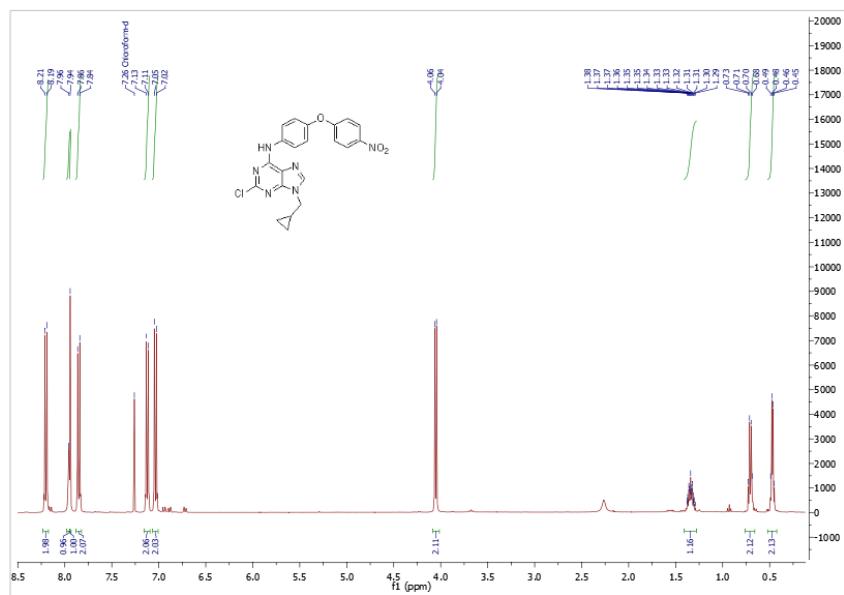
Espectro de ^1H RMN del compuesto **22a**



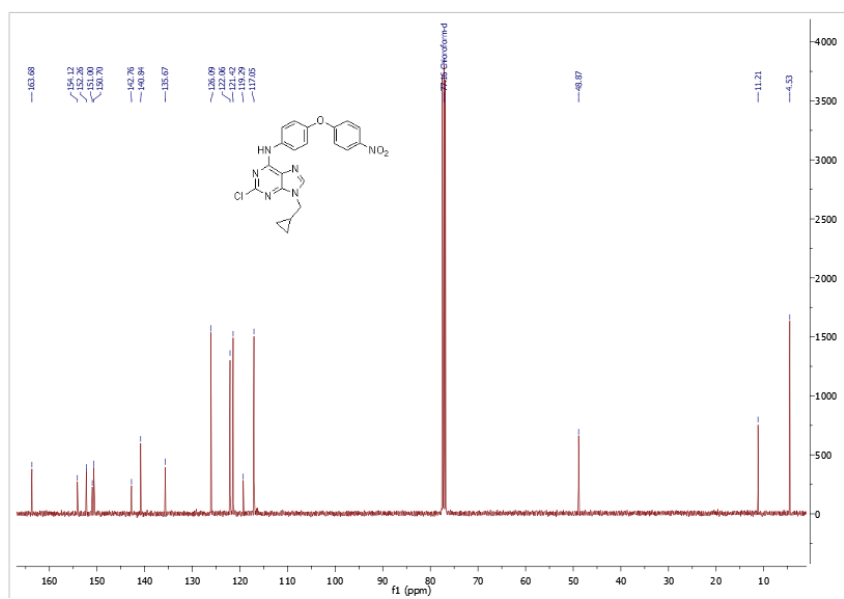
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **22a**



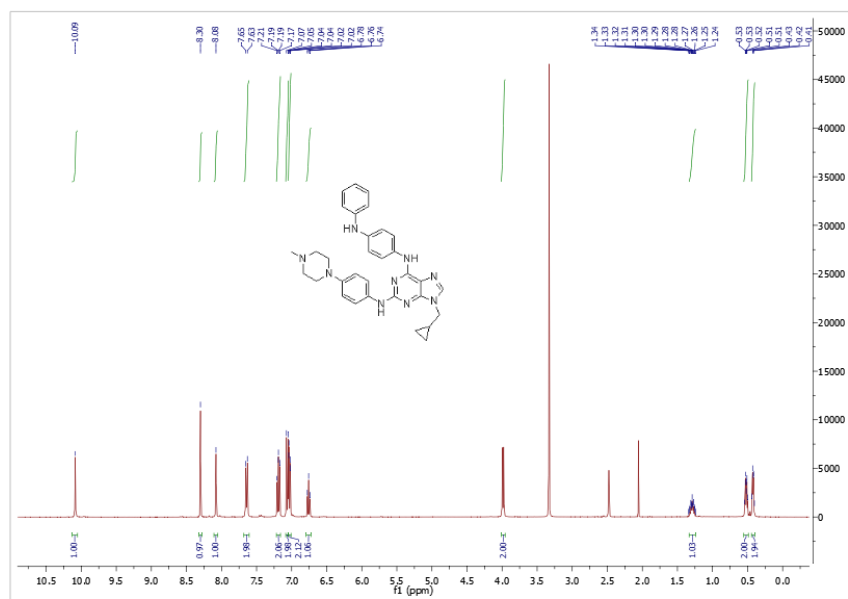
Espectro de ^1H RMN del compuesto **22b**



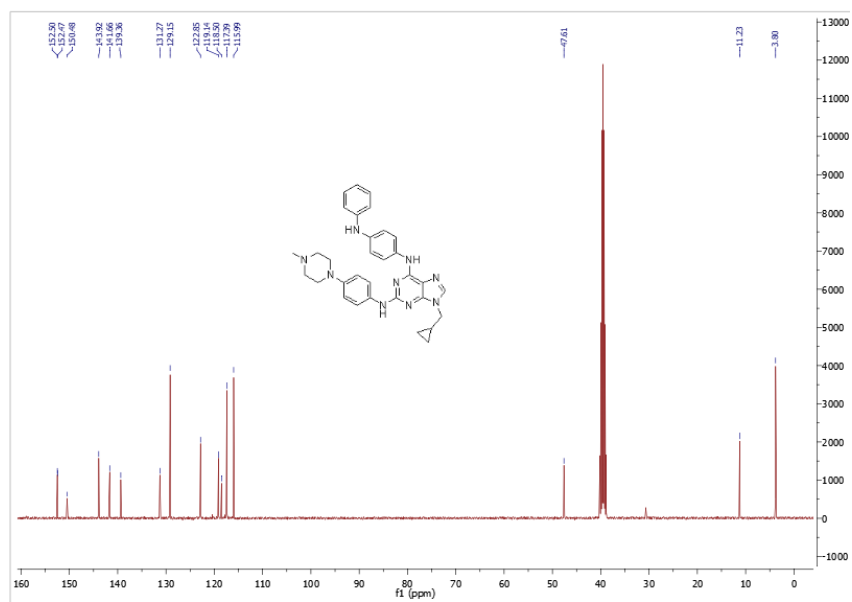
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **22b**



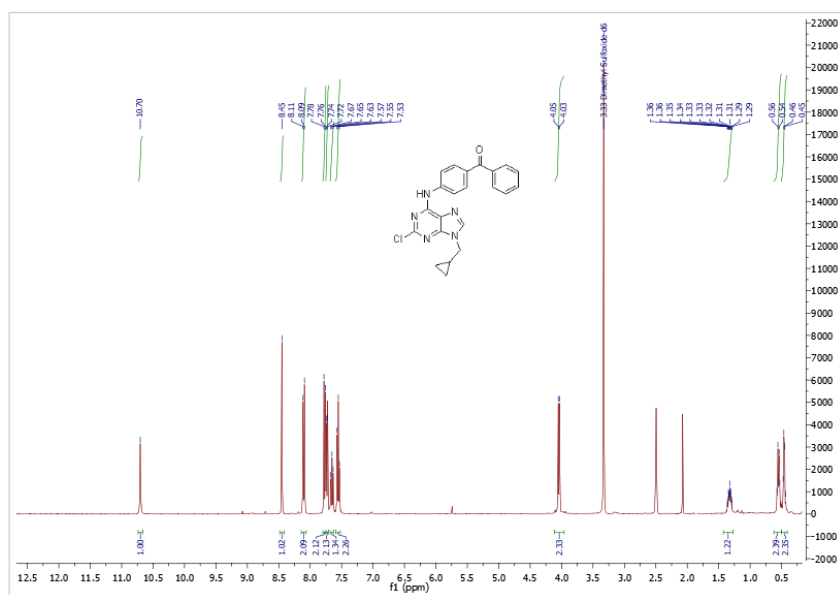
Espectro de ^1H RMN del compuesto **22c**



Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **22c**



Espectro de ^1H RMN del compuesto **22d**

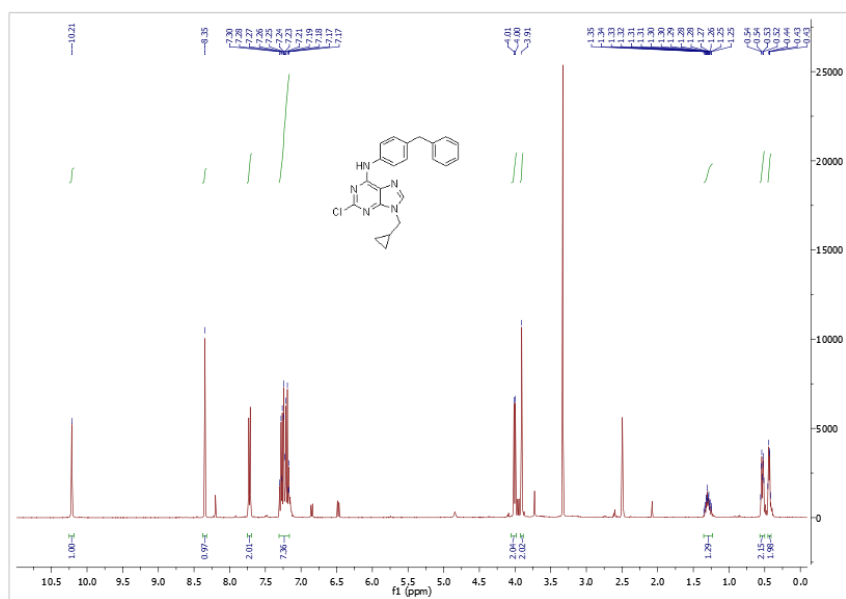


Chemical structure of compound 10b is shown above the spectrum. The structure is a 2-chloro-4-((cyclopropylmethyl)amino)-1H-imidazole-5-carboxamide derivative.

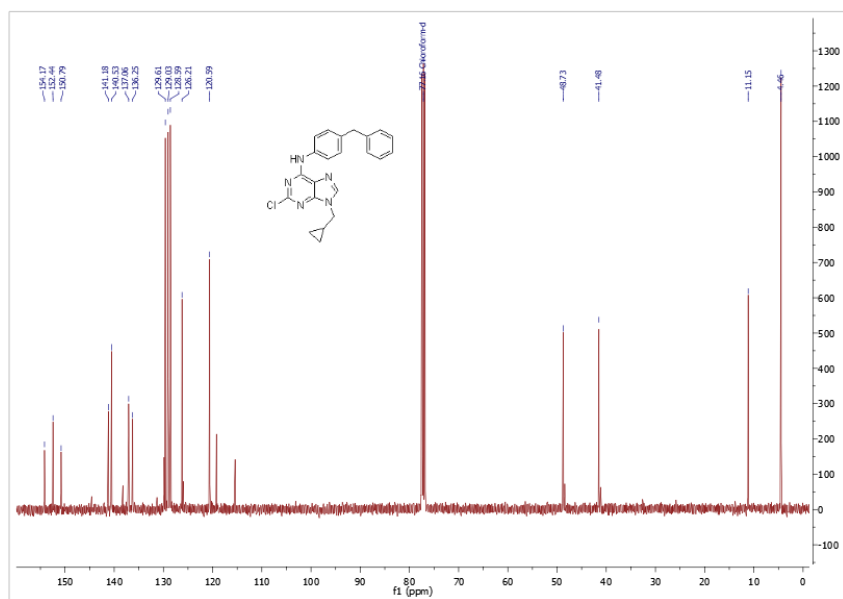
¹³C NMR spectrum (CDCl₃) peaks (ppm):

- 194.69
- 152.01
- 151.87
- 151.52
- 151.37
- 142.76
- 142.76
- 132.18
- 132.11
- 132.01
- 128.38
- 128.26
- 119.03
- 119.25
- 47.76
- 39.82 (triplet)
- 11.16
- 3.82

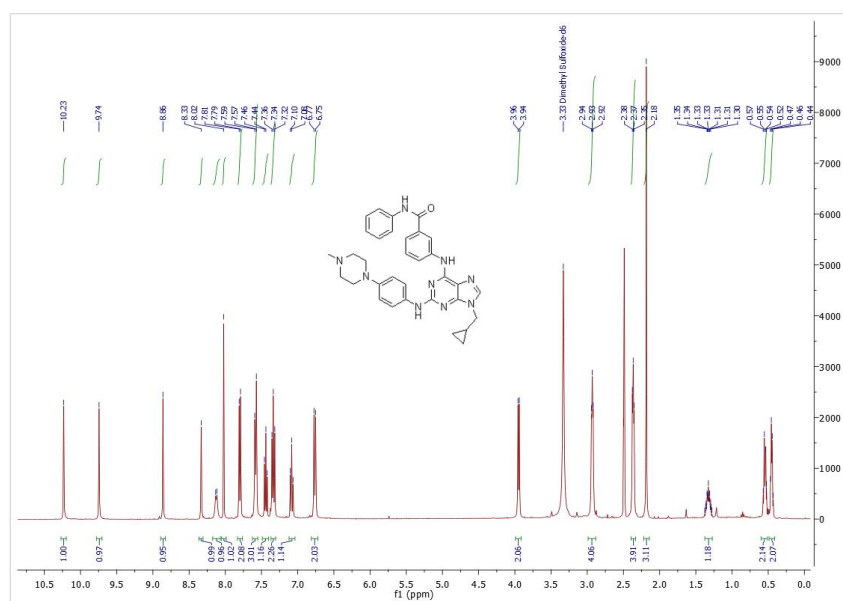
Espectro de ^1H RMN del compuesto **22e**



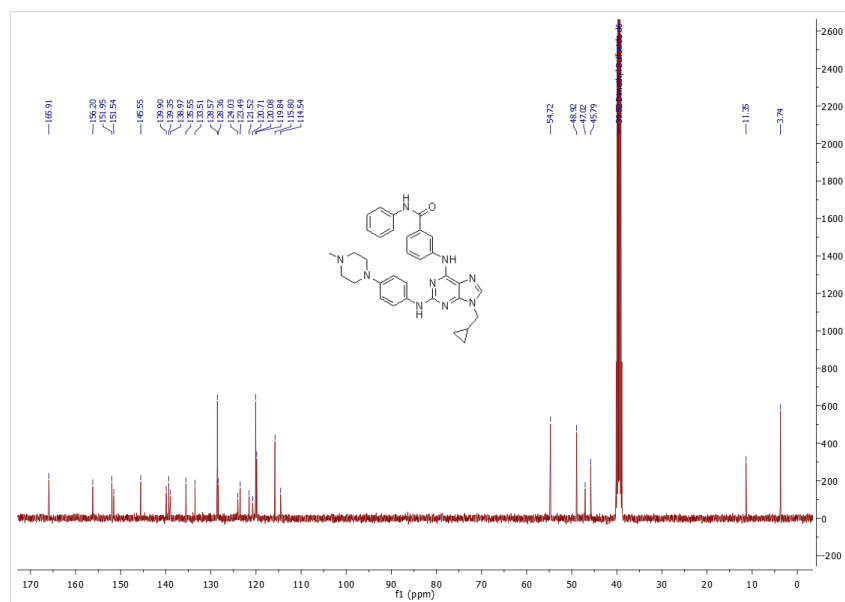
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **22e**

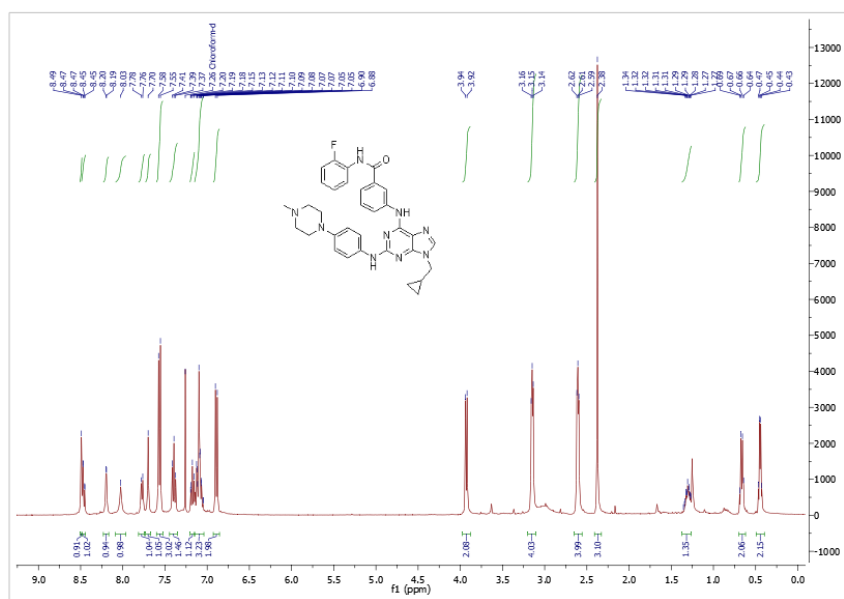


Espectro de ^1H RMN del compuesto **23a**



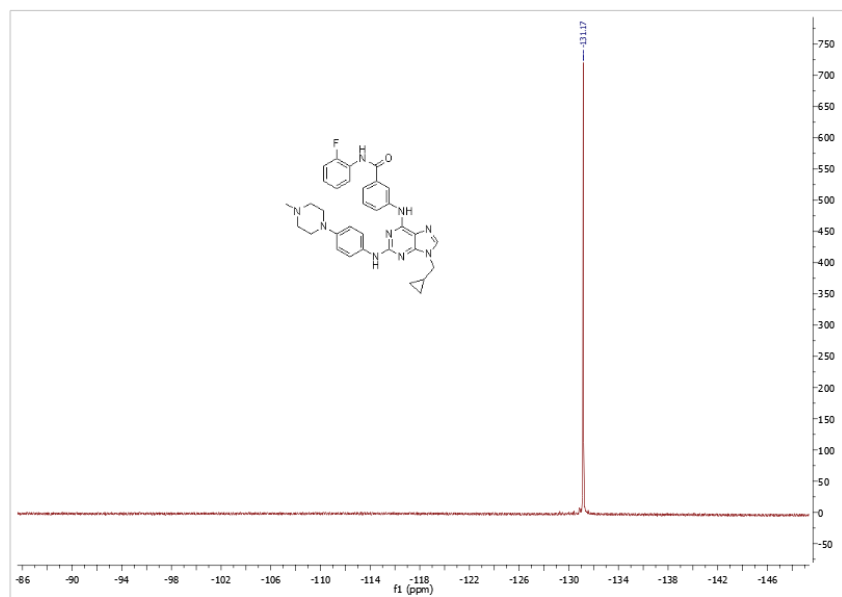
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **23a**







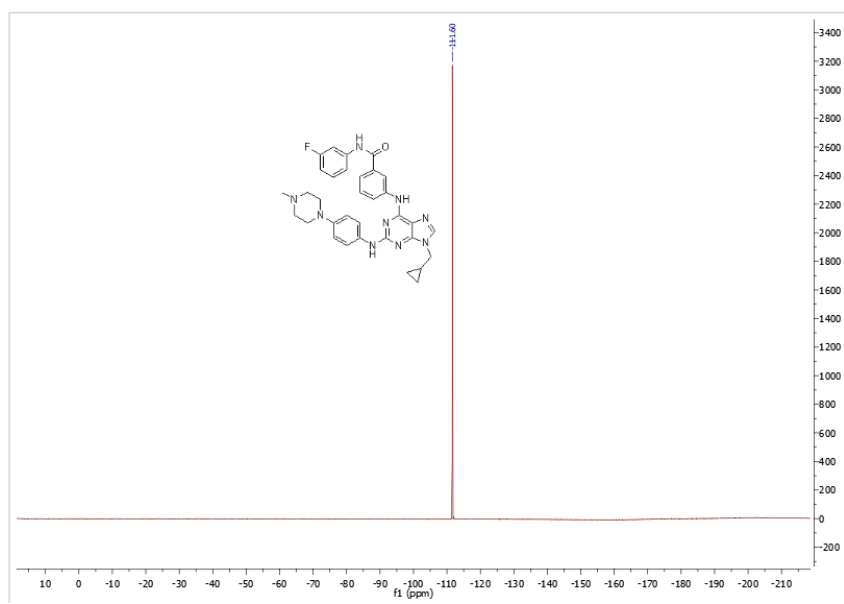
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **23b**



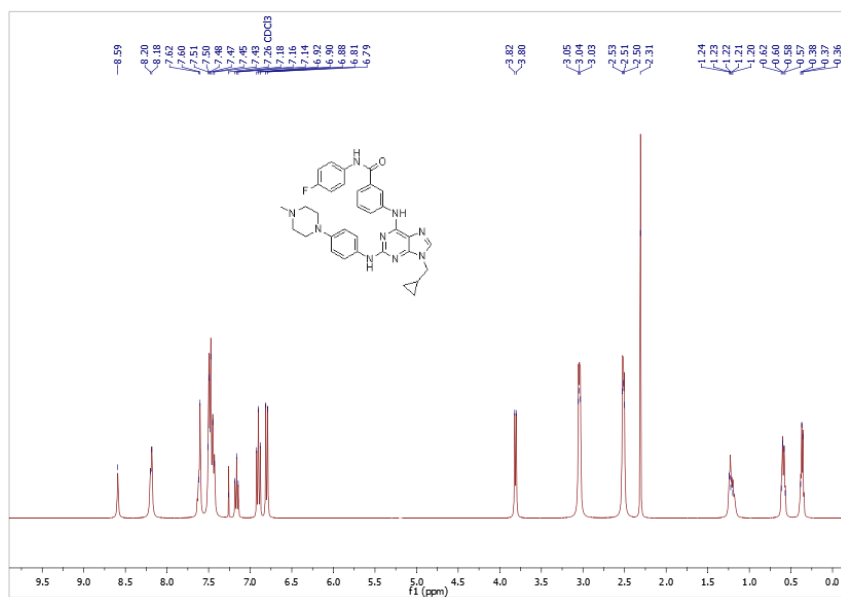


[illegible]

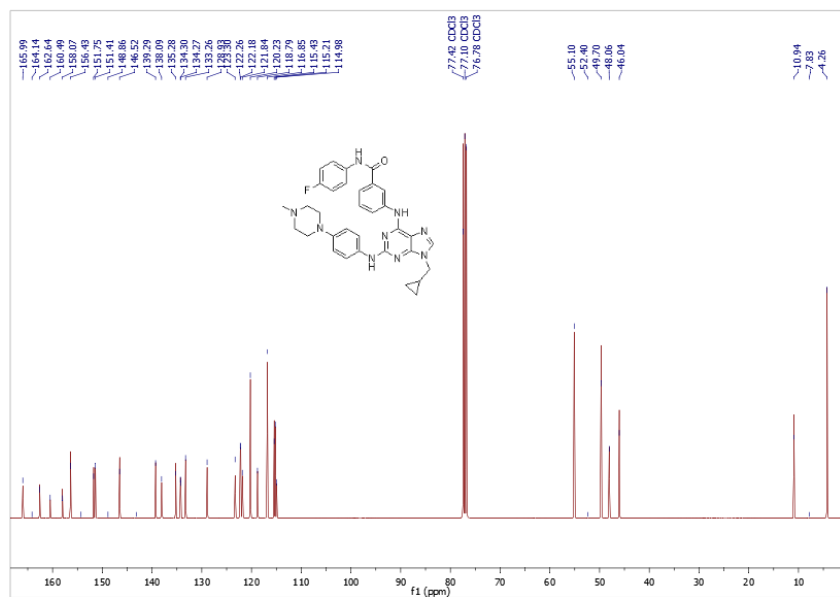
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **23c**



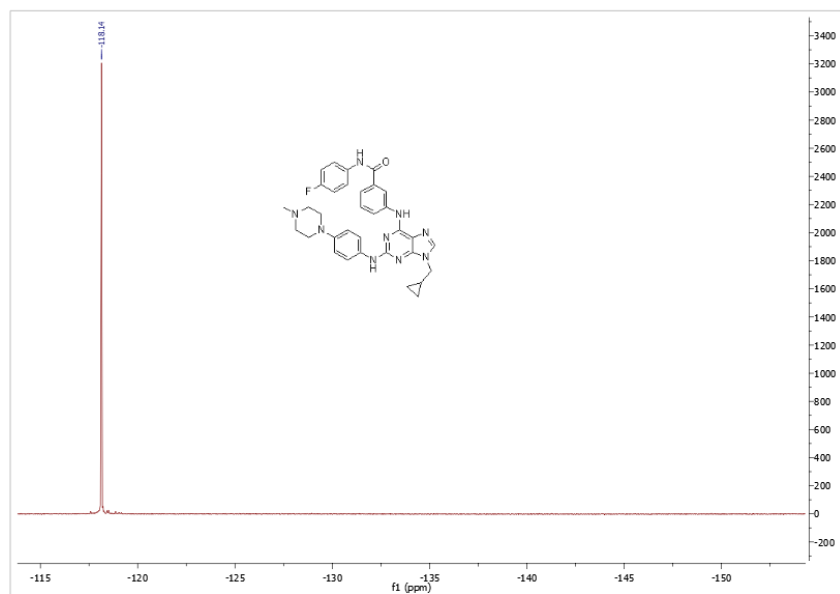
Espectro de ^1H RMN del compuesto **23d**



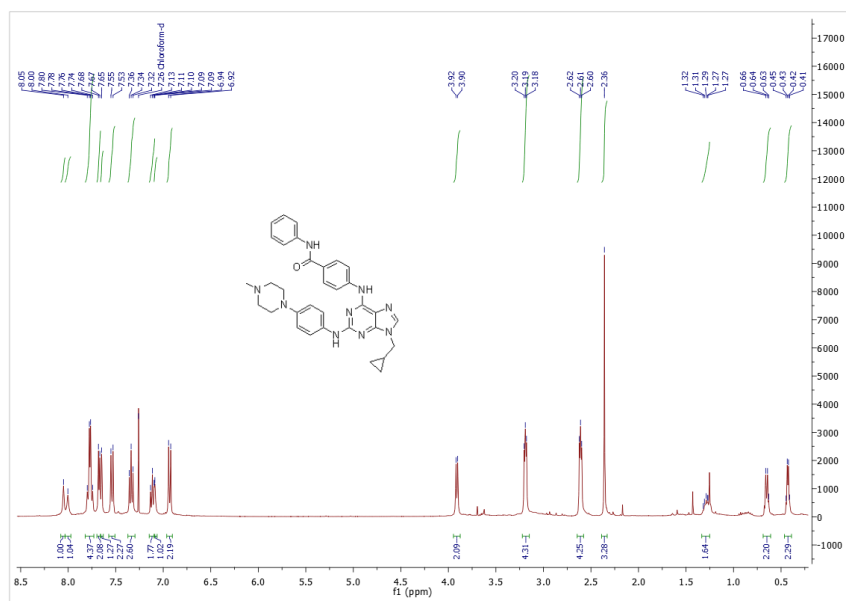
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **23d**



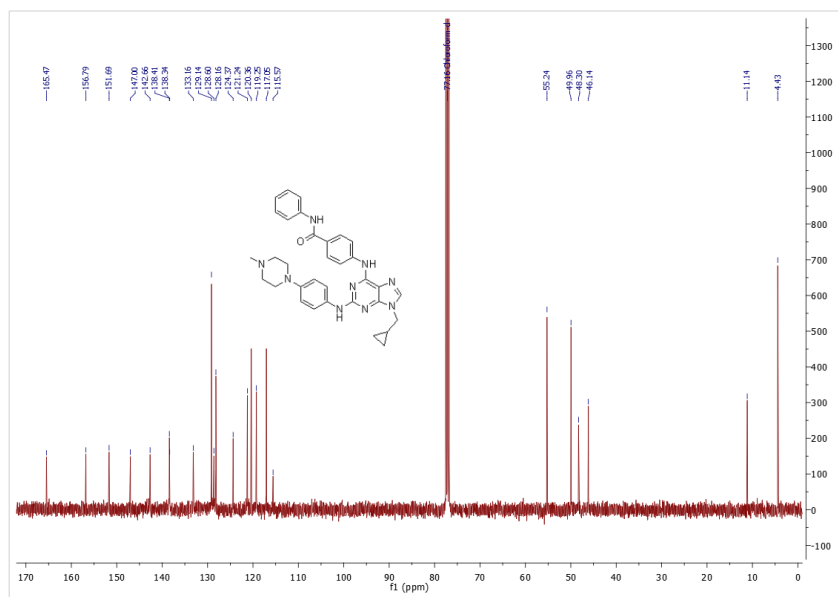
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **23d**



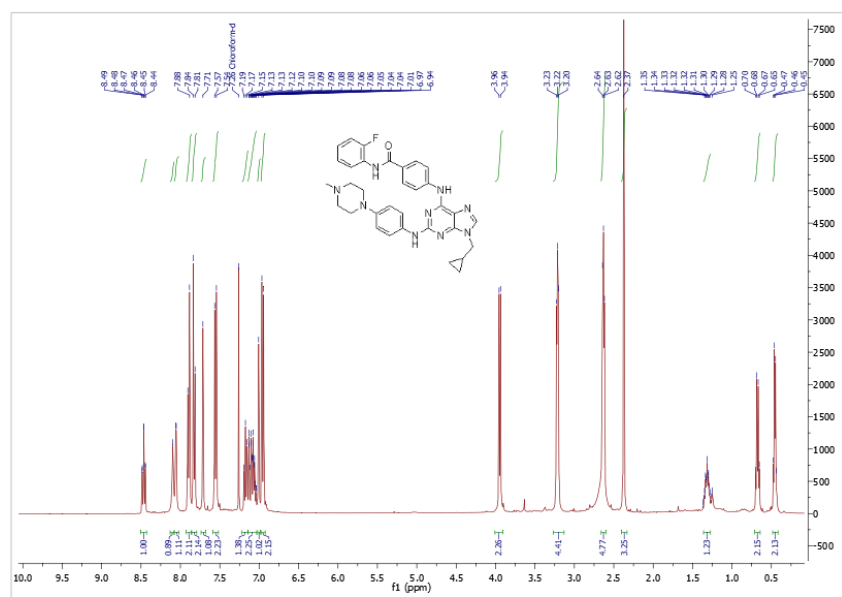
Espectro de ^1H RMN del compuesto **23e**



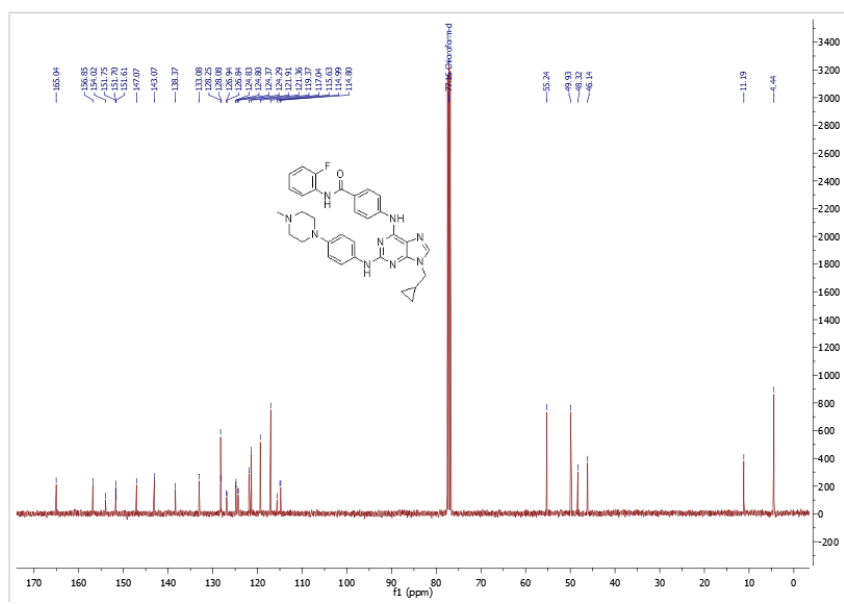
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **23e**

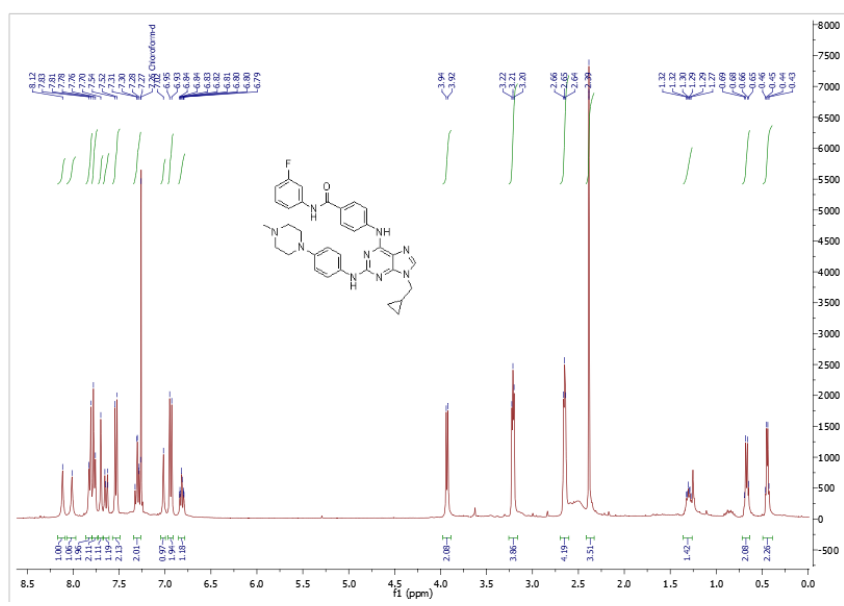


Espectro de ^1H RMN del compuesto **23f**

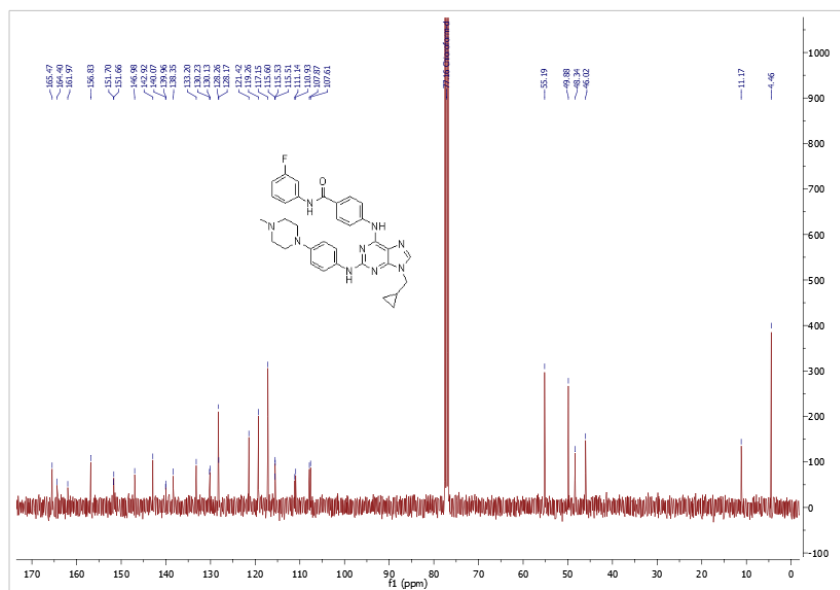


Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **23f**

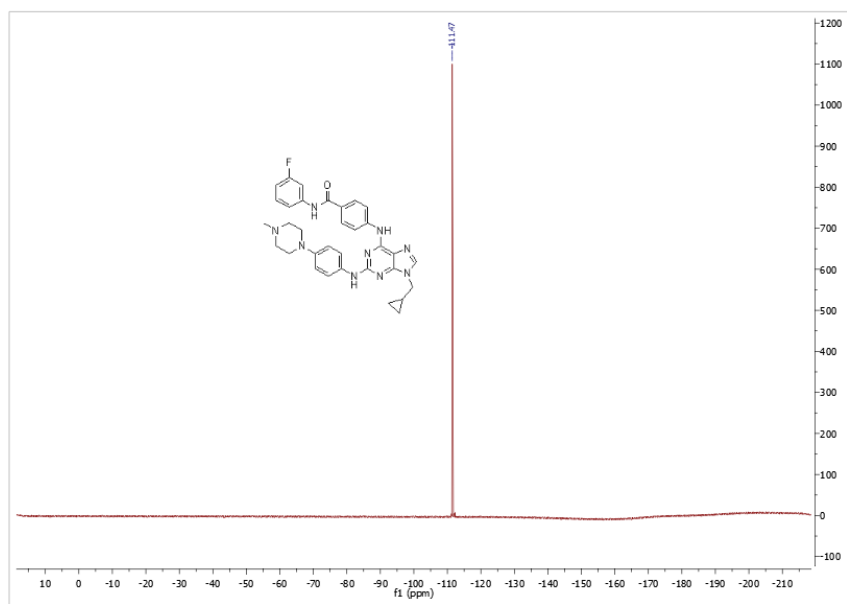




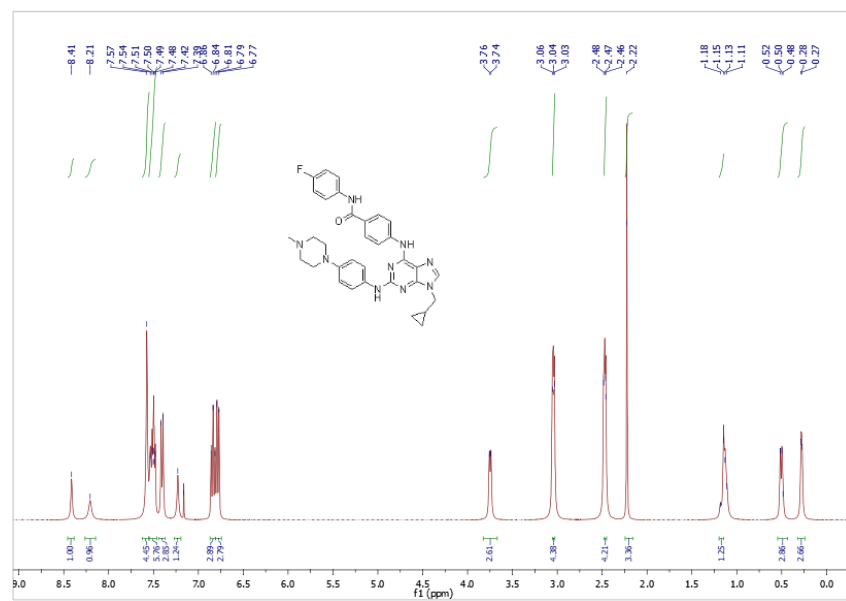
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **23g**



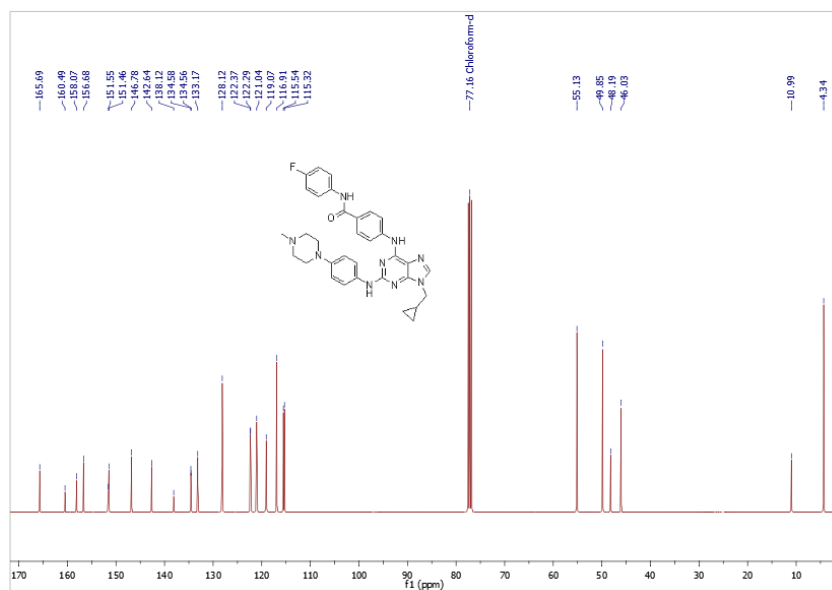
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **23g**



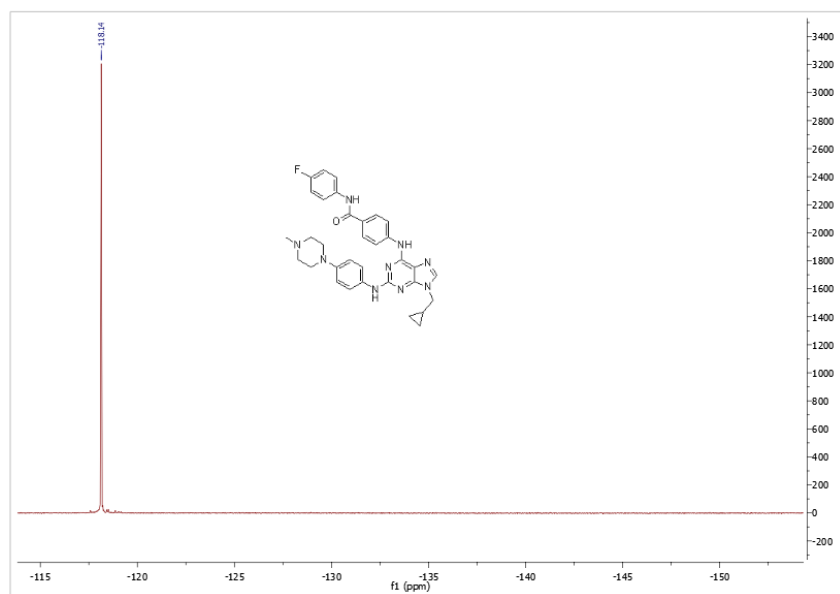
Espectro de ^1H RMN del compuesto **23h**



Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **23h**



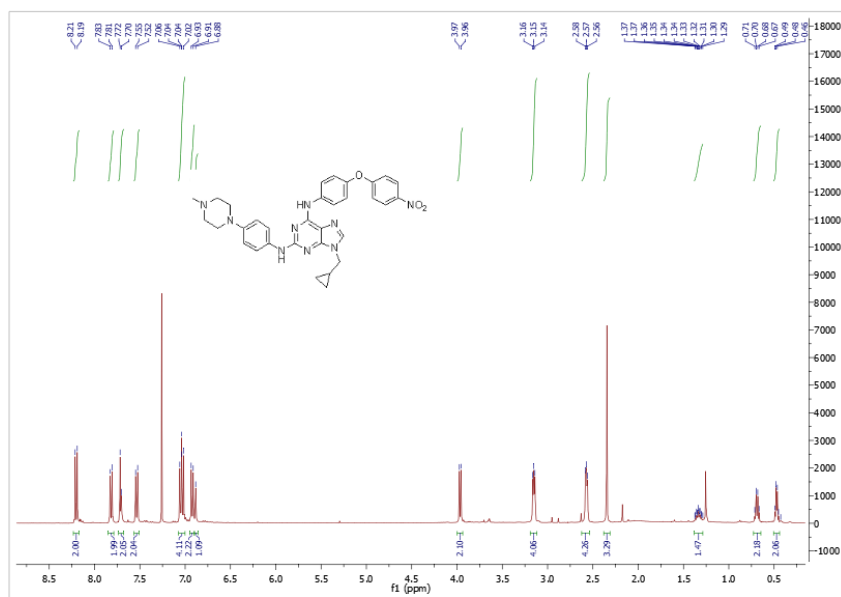
Espectro de ^{19}F RMN del compuesto **23h**



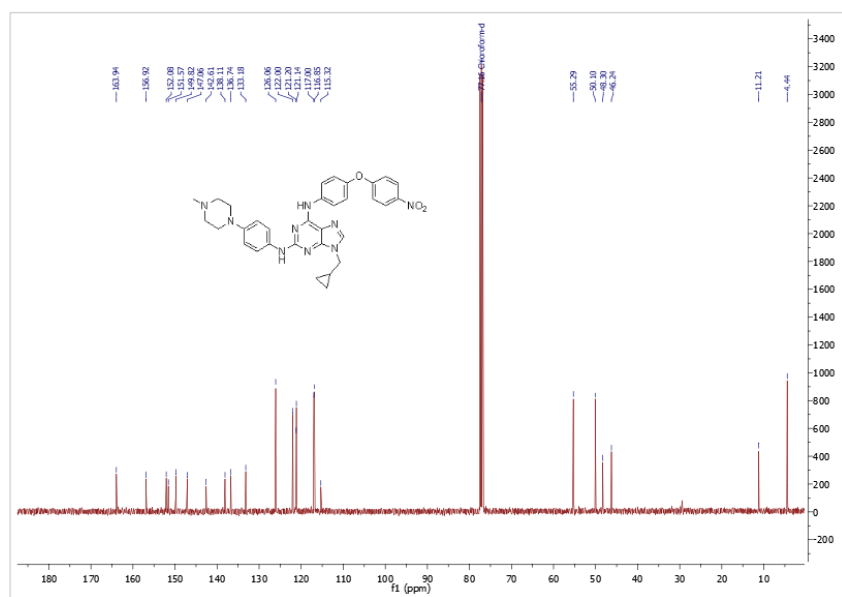
Chemical structure of compound 10 is shown above the spectrum. The structure is a 1,2,4-triazole derivative with a 4-(4-methoxyphenyl)phenyl group at position 4, a 4-(4-methoxyphenyl)phenyl group at position 5, and a 4-(4-methoxyphenyl)phenyl group at position 6.

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10. The spectrum shows peaks from 0 to 8 ppm. The chemical shifts (ppm) and integrations are listed below the spectrum:

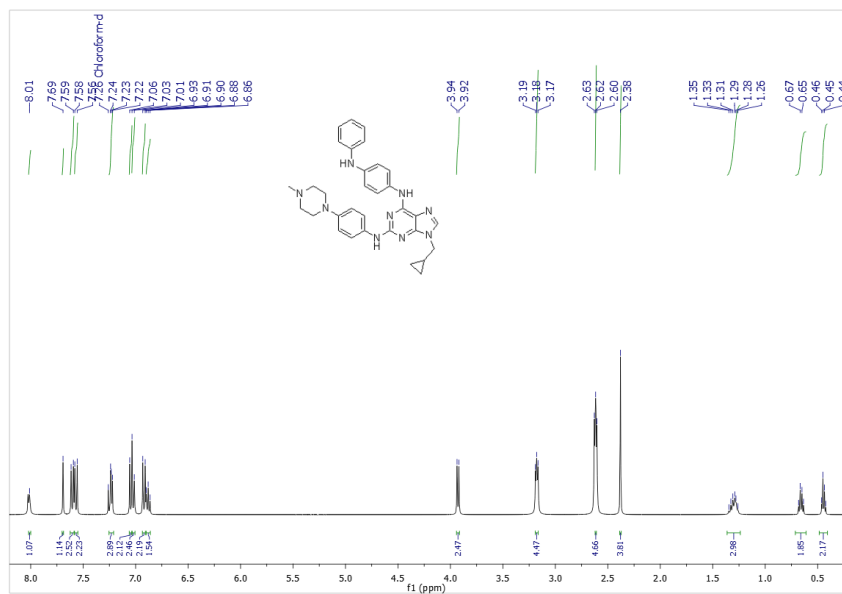
- 7.71, 7.69, 7.68, 7.67, 7.66, 7.65, 7.64, 7.63, 7.62, 7.61, 7.60, 7.59, 7.58, 7.57, 7.56, 7.55, 7.54, 7.53, 7.52, 7.51, 7.50, 7.49, 7.48, 7.47, 7.46, 7.45, 7.44, 7.43, 7.42, 7.41, 7.40, 7.39, 7.38, 7.37, 7.36, 7.35, 7.34, 7.33, 7.32, 7.31, 7.30, 7.29, 7.28, 7.27, 7.26, 7.25, 7.24, 7.23, 7.22, 7.21, 7.20, 7.19, 7.18, 7.17, 7.16, 7.15, 7.14, 7.13, 7.12, 7.11, 7.10, 7.09, 7.08, 7.07, 7.06, 7.05, 7.04, 7.03, 7.02, 7.01, 7.00, 6.99, 6.98, 6.97, 6.96, 6.95, 6.94, 6.93, 6.92, 6.91, 6.90, 6.89, 6.88, 6.87, 6.86, 6.85, 6.84, 6.83, 6.82, 6.81, 6.80, 6.79, 6.78, 6.77, 6.76, 6.75, 6.74, 6.73, 6.72, 6.71, 6.70, 6.69, 6.68, 6.67, 6.66, 6.65, 6.64, 6.63, 6.62, 6.61, 6.60, 6.59, 6.58, 6.57, 6.56, 6.55, 6.54, 6.53, 6.52, 6.51, 6.50, 6.49, 6.48, 6.47, 6.46, 6.45, 6.44, 6.43, 6.42, 6.41, 6.40, 6.39, 6.38, 6.37, 6.36, 6.35, 6.34, 6.33, 6.32, 6.31, 6.30, 6.29, 6.28, 6.27, 6.26, 6.25, 6.24, 6.23, 6.22, 6.21, 6.20, 6.19, 6.18, 6.17, 6.16, 6.15, 6.14, 6.13, 6.12, 6.11, 6.10, 6.09, 6.08, 6.07, 6.06, 6.05, 6.04, 6.03, 6.02, 6.01, 6.00, 5.99, 5.98, 5.97, 5.96, 5.95, 5.94, 5.93, 5.92, 5.91, 5.90, 5.89, 5.88, 5.87, 5.86, 5.85, 5.84, 5.83, 5.82, 5.81, 5.80, 5.79, 5.78, 5.77, 5.76, 5.75, 5.74, 5.73, 5.72, 5.71, 5.70, 5.69, 5.68, 5.67, 5.66, 5.65, 5.64, 5.63, 5.62, 5.61, 5.60, 5.59, 5.58, 5.57, 5.56, 5.55, 5.54, 5.53, 5.52, 5.51, 5.50, 5.49, 5.48, 5.47, 5.46, 5.45, 5.44, 5.43, 5.42, 5.41, 5.40, 5.39, 5.38, 5.37, 5.36, 5.35, 5.34, 5.33, 5.32, 5.31, 5.30, 5.29, 5.28, 5.27, 5.26, 5.25, 5.24, 5.23, 5.22, 5.21, 5.20, 5.19, 5.18, 5.17, 5.16, 5.15, 5.14, 5.13, 5.12, 5.11, 5.10, 5.09, 5.08, 5.07, 5.06, 5.05, 5.04, 5.03, 5.02, 5.01, 5.00, 4.99, 4.98, 4.97, 4.96, 4.95, 4.94, 4.93, 4.92, 4.91, 4.90, 4.89, 4.88, 4.87, 4.86, 4.85, 4.84, 4.83, 4.82, 4.81, 4.80, 4.79, 4.78, 4.77, 4.76, 4.75, 4.74, 4.73, 4.72, 4.71, 4.70, 4.69, 4.68, 4.67, 4.66, 4.65, 4.64, 4.63, 4.62, 4.61, 4.60, 4.59, 4.58, 4.57, 4.56, 4.55, 4.54, 4.53, 4.52, 4.51, 4.50, 4.49, 4.48, 4.47, 4.46, 4.45, 4.44, 4.43, 4.42, 4.41, 4.40, 4.39, 4.38, 4.37, 4.36, 4.35, 4.34, 4.33, 4.32, 4.31, 4.30, 4.29, 4.28, 4.27, 4.26, 4.25, 4.24, 4.23, 4.22, 4.21, 4.20, 4.19, 4.18, 4.17, 4.16, 4.15, 4.14, 4.13, 4.12, 4.11, 4.10, 4.09, 4.08, 4.07, 4.06, 4.05, 4.04, 4.03, 4.02, 4.01, 4.00, 3.99, 3.98, 3.97, 3.96, 3.95, 3.94, 3.93, 3.92, 3.91, 3.90, 3.89, 3.88, 3.87, 3.86, 3.85, 3.84, 3.83, 3.82, 3.81, 3.80, 3.79, 3.78, 3.77, 3.76, 3.75, 3.74, 3.73, 3.72, 3.71, 3.70, 3.69, 3.68, 3.67, 3.66, 3.65, 3.64, 3.63, 3.62, 3.61, 3.60, 3.59, 3.58, 3.57, 3.56, 3.55, 3.54, 3.53, 3.52, 3.51, 3.50, 3.49, 3.48, 3.47, 3.46, 3.45, 3.44, 3.43, 3.42, 3.41, 3.40, 3.39, 3.38, 3.37, 3.36, 3.35, 3.34, 3.33, 3.32, 3.31, 3.30, 3.29, 3.28, 3.27, 3.26, 3.25, 3.24, 3.23, 3.22, 3.21, 3.20, 3.19, 3.18, 3.17, 3.16, 3.15, 3.14, 3.13, 3.12, 3.11, 3.10, 3.09, 3.08, 3.07, 3.06, 3.05, 3.04, 3.03, 3.02, 3.01, 3.00, 2.99, 2.98, 2.97, 2.96, 2.95, 2.94, 2.93, 2.92, 2.91, 2.90, 2.89, 2.88, 2.87, 2.86, 2.85, 2.84, 2.83, 2.82, 2.81, 2.80, 2.79, 2.78, 2.77, 2.76, 2.75, 2.74, 2.73, 2.72, 2.71, 2.70, 2.69, 2.68, 2.67, 2.66, 2.65, 2.64, 2.63, 2.62, 2.61, 2.60, 2.59, 2.58, 2.57, 2.56, 2.55, 2.54, 2.53, 2.52, 2.51, 2.50, 2.49, 2.48, 2.47, 2.46, 2.45, 2.44, 2.43, 2.42, 2.41, 2.40, 2.39, 2.38, 2.37, 2.36, 2.35, 2.34, 2.33, 2.32, 2.31, 2.30, 2.29, 2.28, 2.27, 2.26, 2.25, 2.24, 2.23, 2.22, 2.21, 2.20, 2.19, 2.18, 2.17, 2.16, 2.15, 2.14, 2.13, 2.12, 2.11, 2.10, 2.09, 2.08, 2.07, 2.06, 2.05, 2.04, 2.03, 2.02, 2.01, 2.00, 1.99, 1.98, 1.97, 1.96, 1.95, 1.94, 1.93, 1.92, 1.91, 1.90, 1.89, 1.88, 1.87, 1.86, 1.85, 1.84, 1.83, 1.82, 1.81, 1.80, 1.79, 1.78, 1.77, 1.76, 1.75, 1.74, 1.73, 1.72, 1.71, 1.70, 1.69, 1.68, 1.67, 1.66, 1.65, 1.64, 1.63, 1.62, 1.61, 1.60, 1.59, 1.58, 1.57, 1.56, 1.55, 1.54, 1.53, 1.52, 1.51, 1.50, 1.49, 1.48, 1.47, 1.46, 1.45, 1.44, 1.43, 1.42, 1.41, 1.40, 1.39, 1.38, 1.37, 1.36,



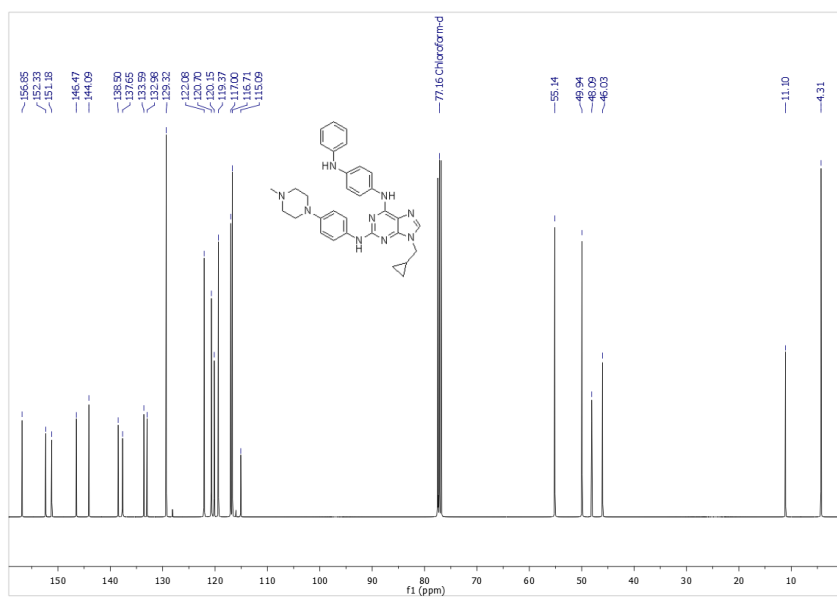
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **24b**



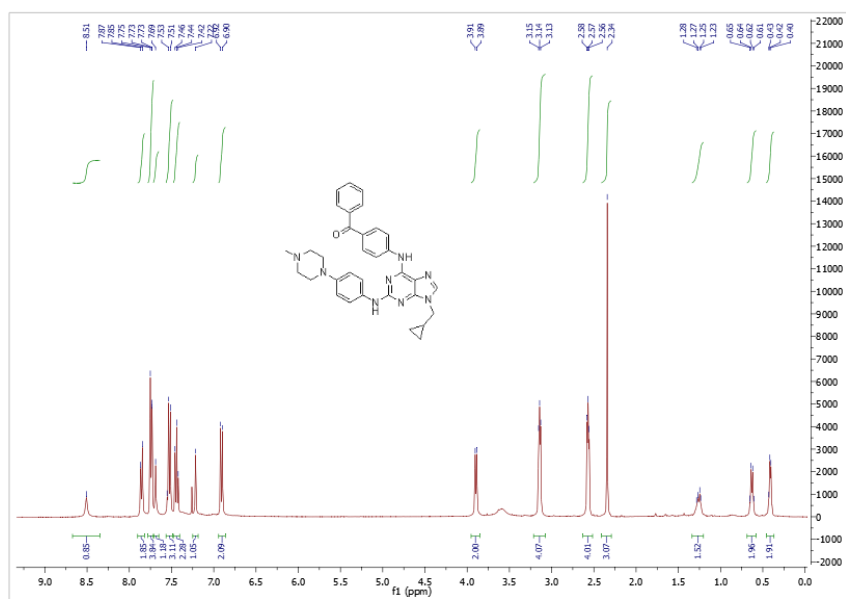
Espectro de ^1H RMN del compuesto **24c**



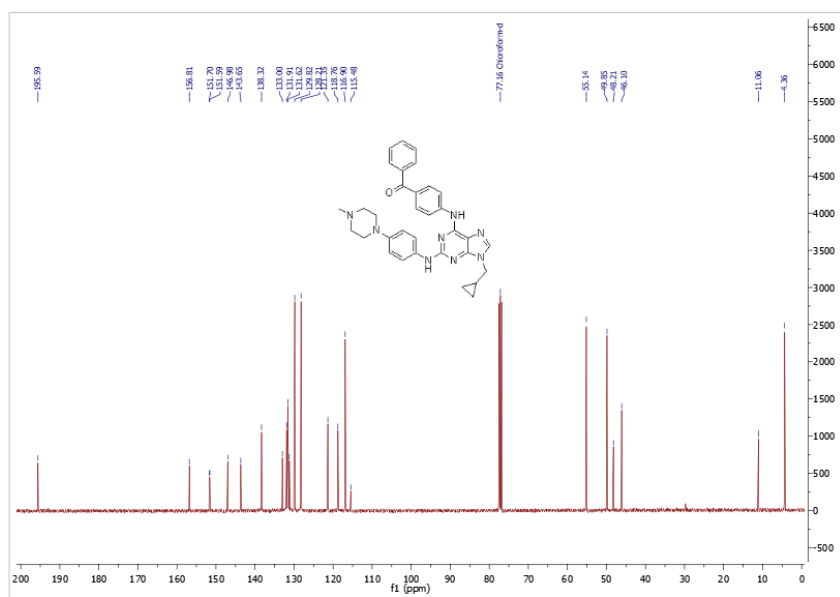
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **24c**



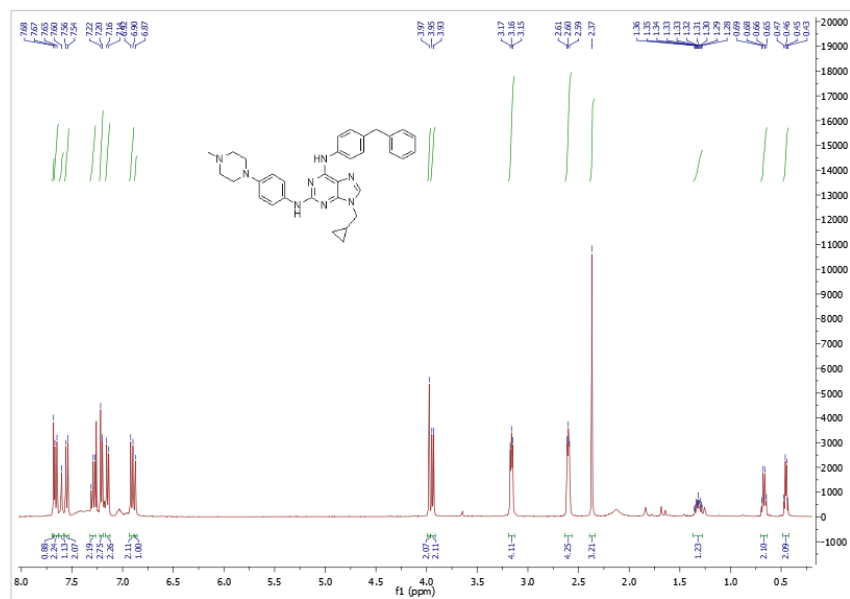
Espectro de ^1H RMN del compuesto **24d**



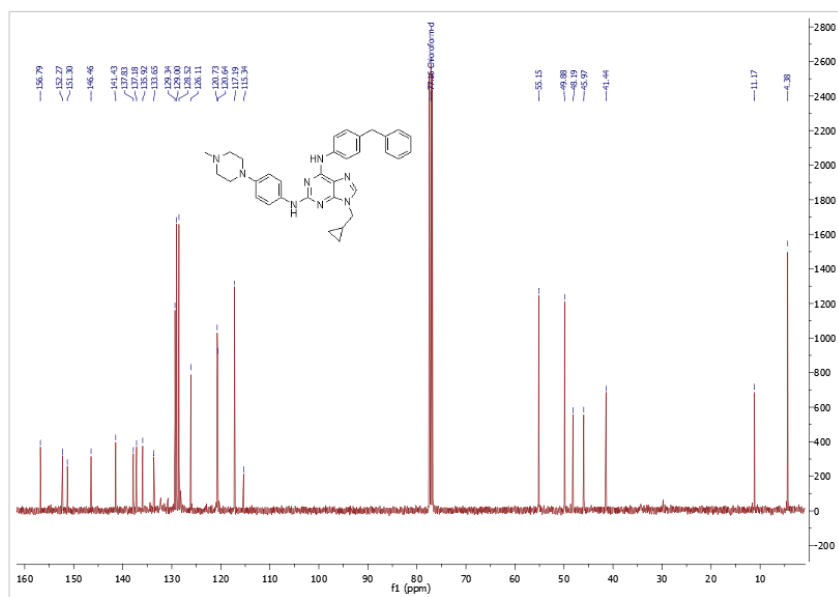
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **24d**



Espectro de ^1H RMN del compuesto **24e**



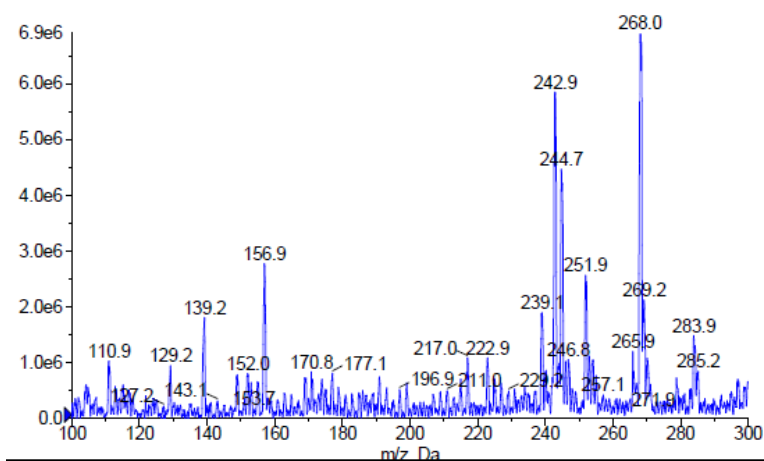
Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **24e**



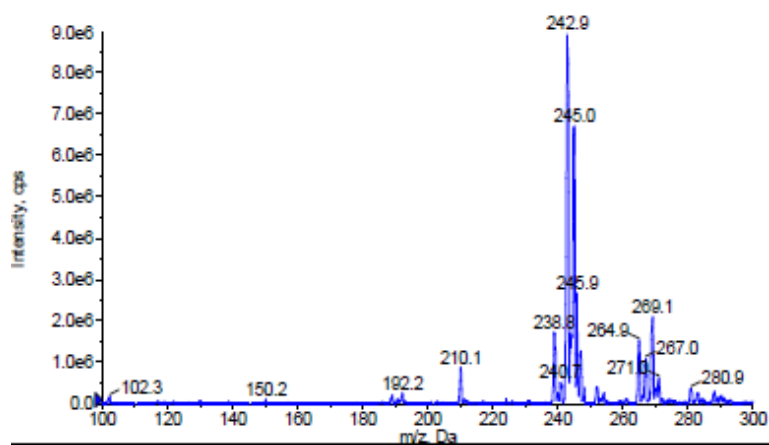
8.2 Espectros de masa

8.2.1 Espectros de masa de los derivados 2a–e

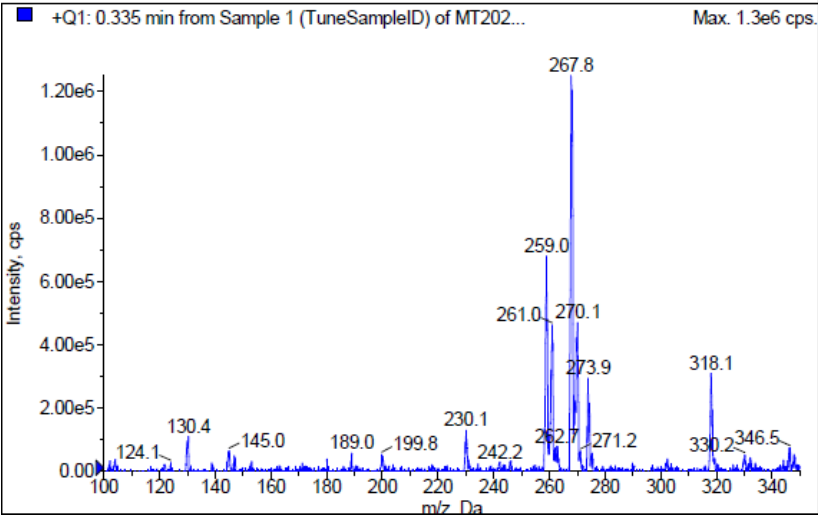
Espectro de masa del compuesto **2a**



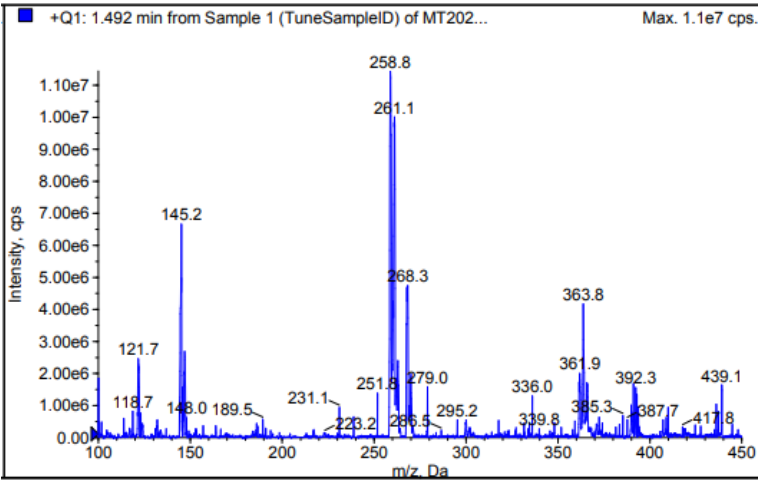
Espectro de masa del compuesto **2a'**



Espectro de masa del compuesto **2b**

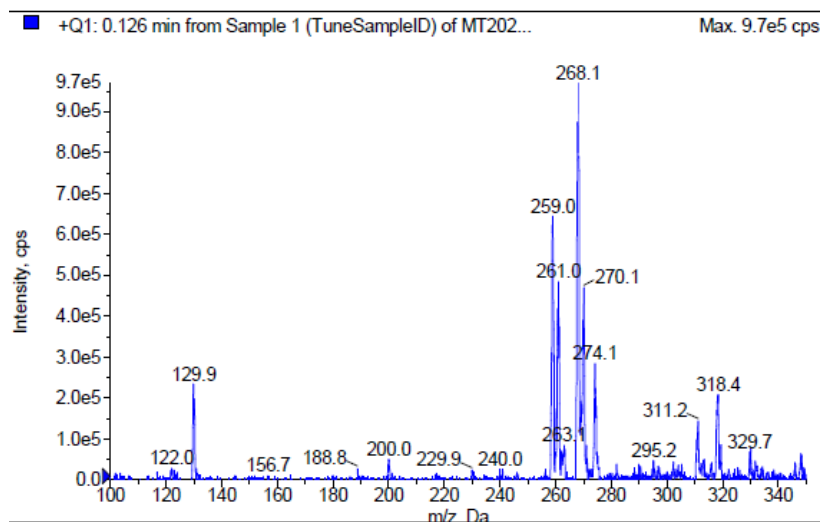


Espectro de masa del compuesto **2b**

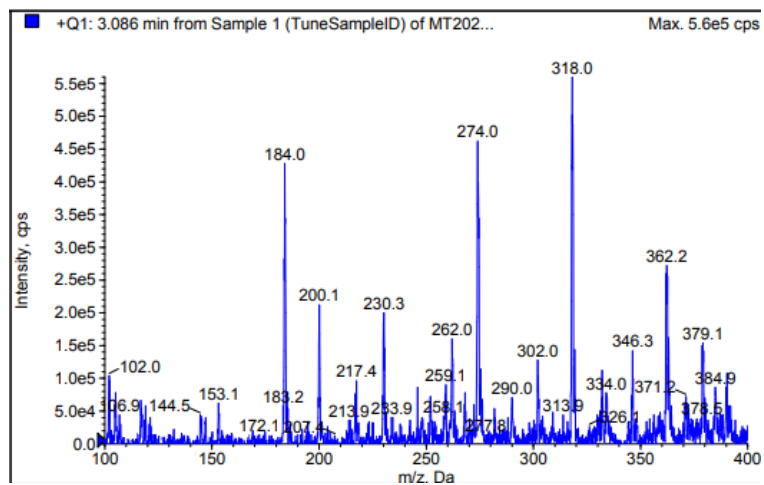


Comentado [5]: Sacarlo del paper (isómero isopentilo)

Espectro de masa del compuesto **2c**

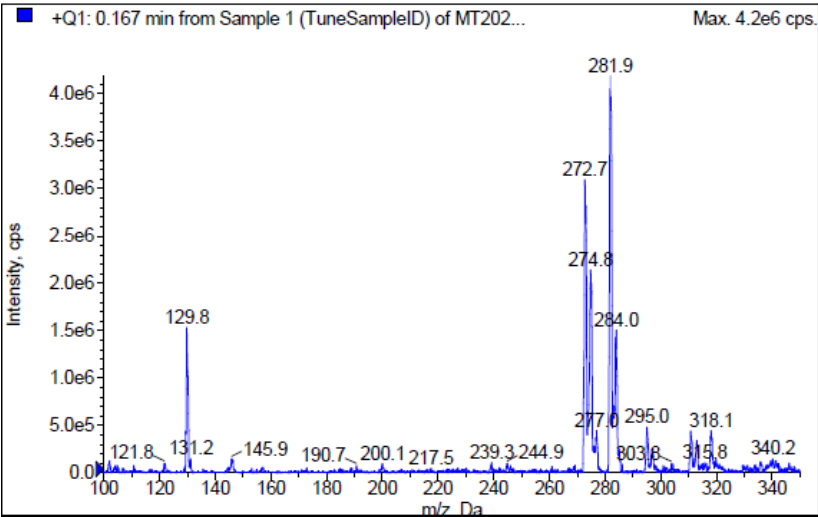


Espectro de masa del compuesto **2c'**

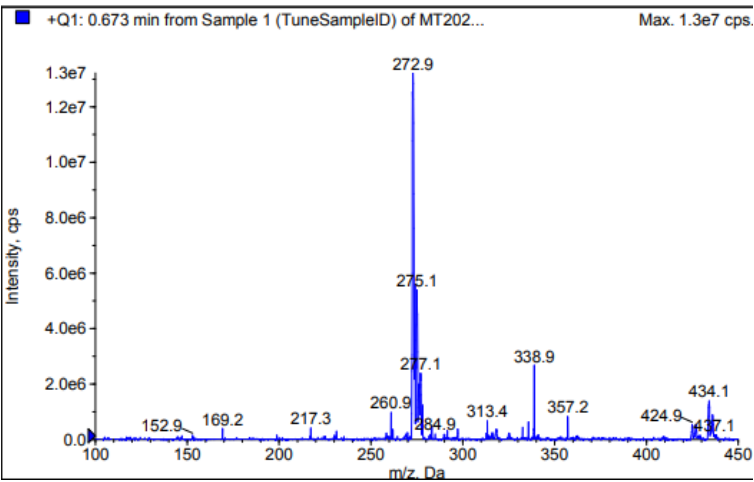


Comentado [6]: Sacarlo del paper (isómero pentilo)

Espectro de masa del compuesto **2d**

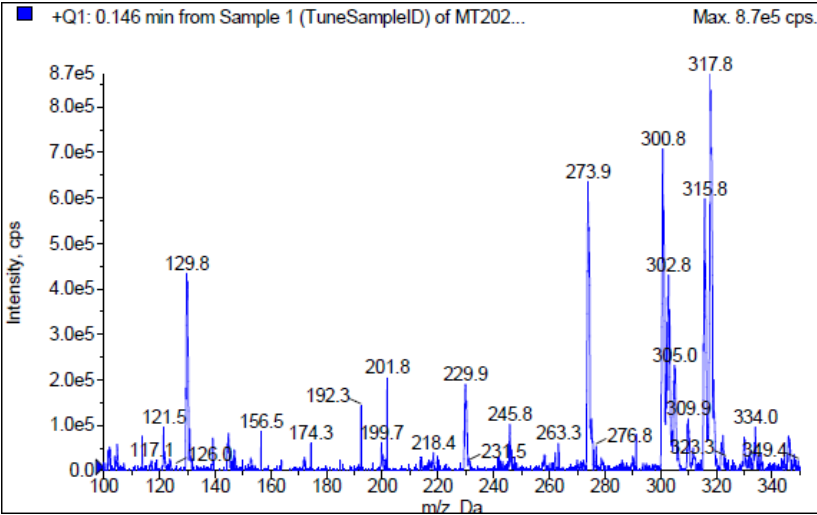


Espectro de masa del compuesto **2d'**

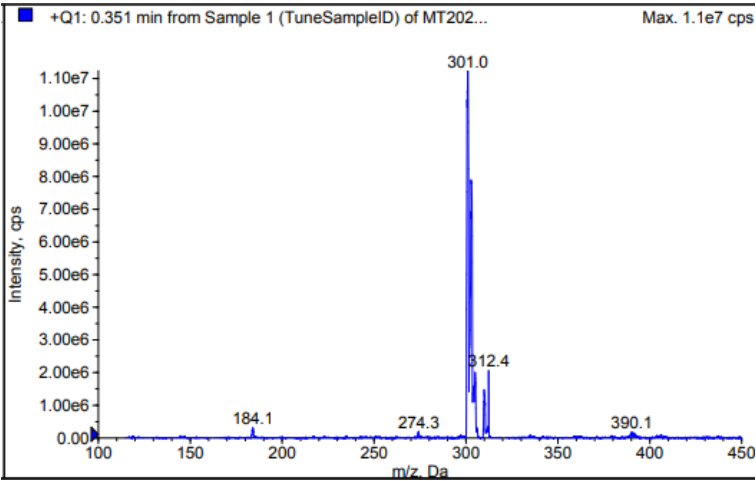


Comentado [7]: Sacarlo del paper (isómero hexilo)

Espectro de masa del compuesto **2e**



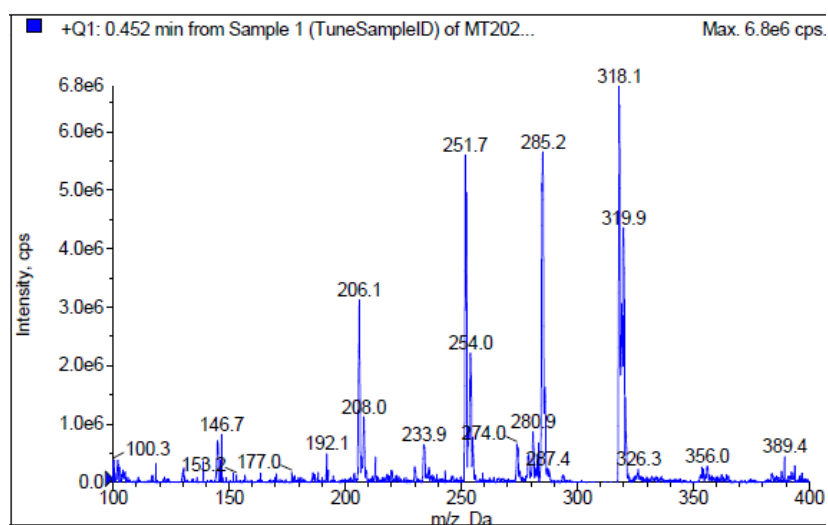
Espectro de masa del compuesto **2e'**



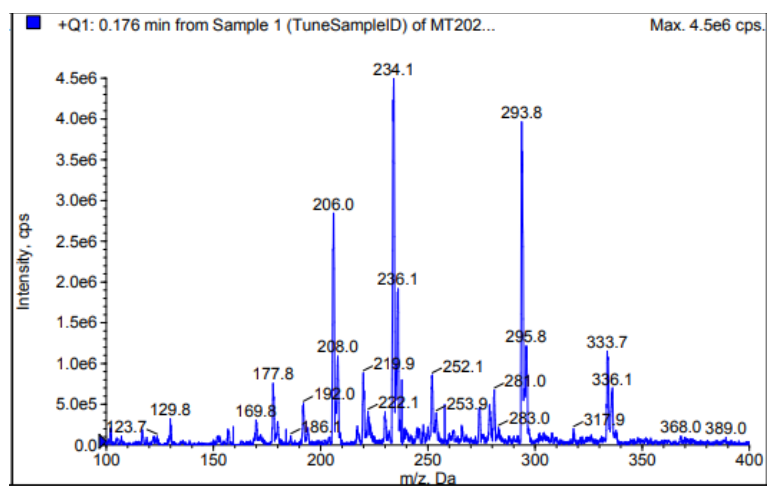
Comentado [8]: Rehacer con el octilo en 9H, así saldrán otros peaks

8.2.2 Espectros de masa de los derivados 3a–ad

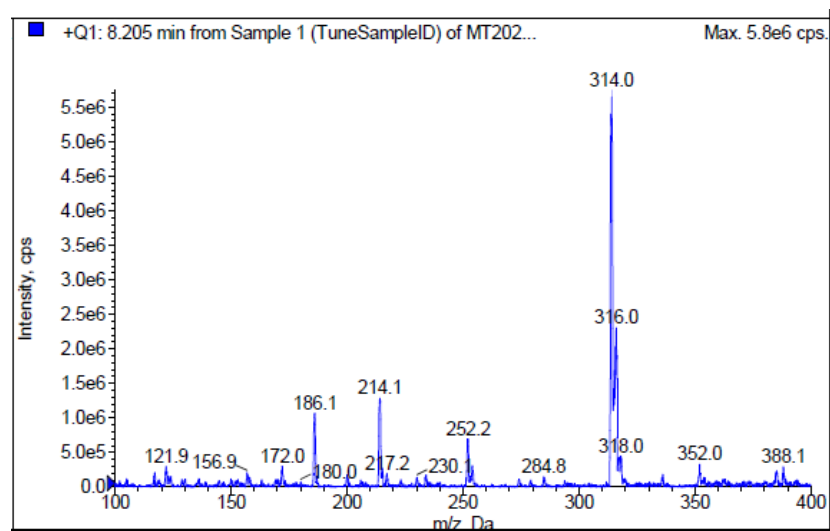
Espectro de masa del compuesto **3a**



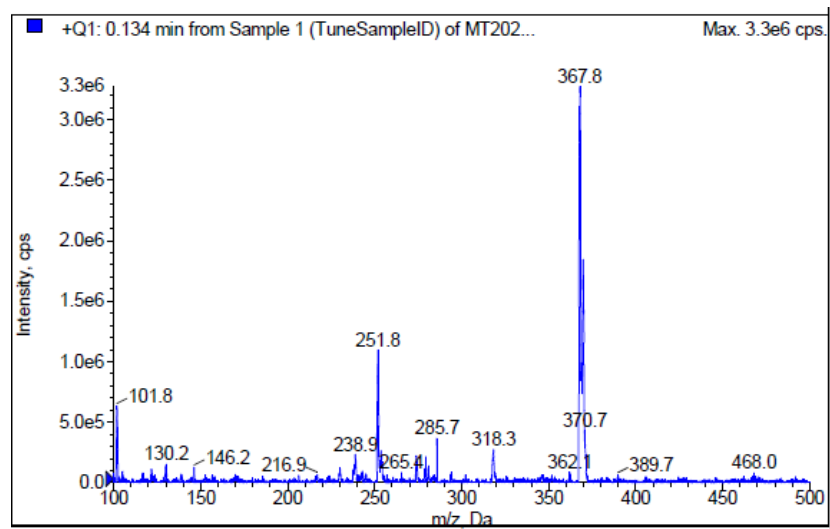
Espectro de masa del compuesto **3b**



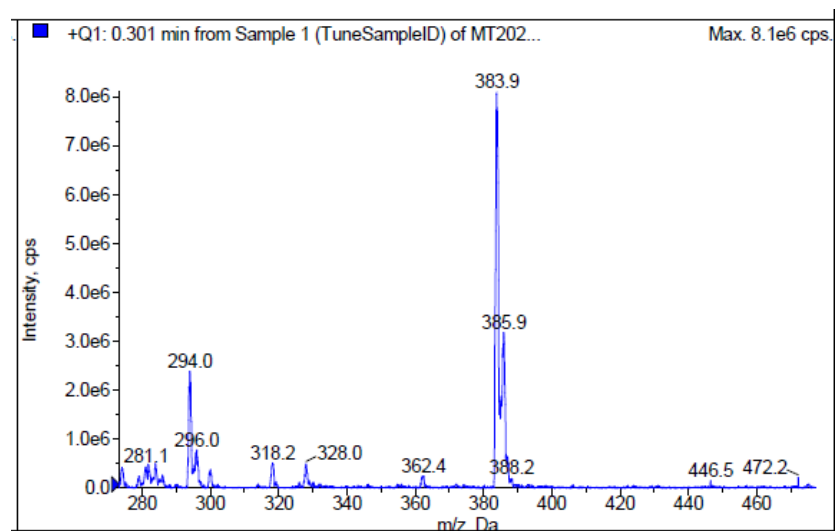
Espectro de masa del compuesto **3c**



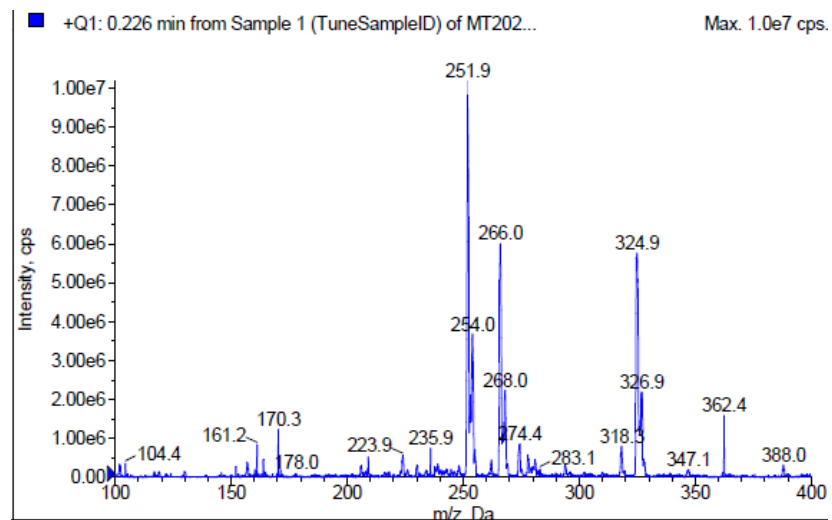
Espectro de masa del compuesto **3d**



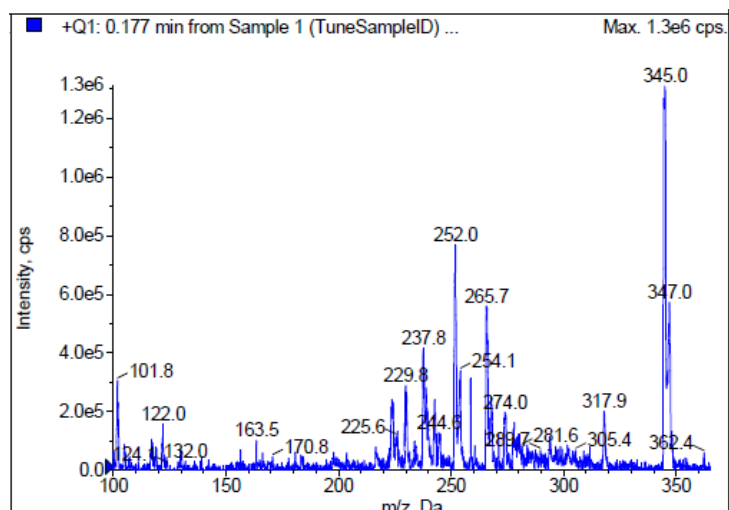
Espectro de masa del compuesto **3e**



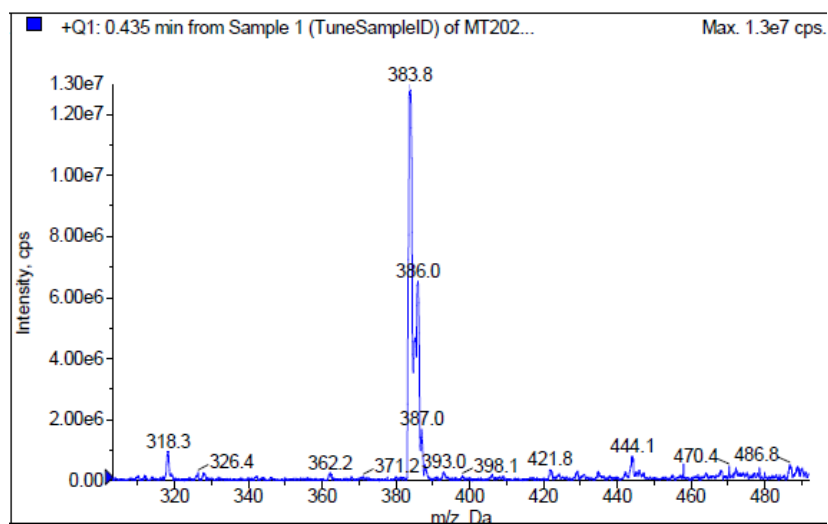
Espectro de masa del compuesto **3f**



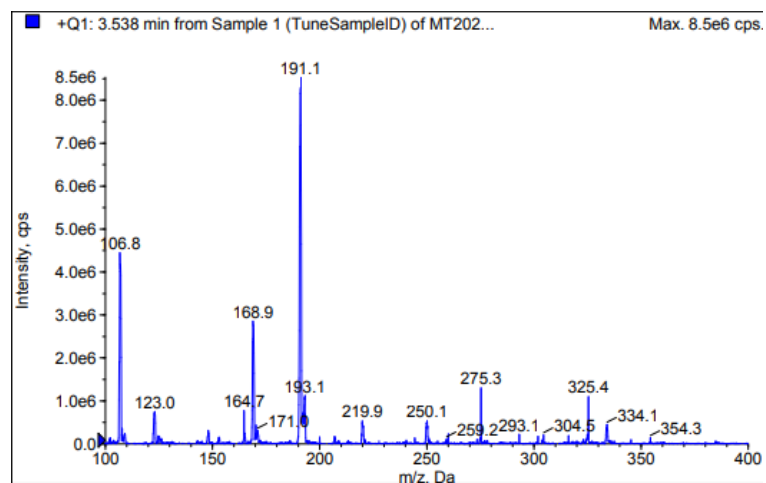
Espectro de masa del compuesto **3g**



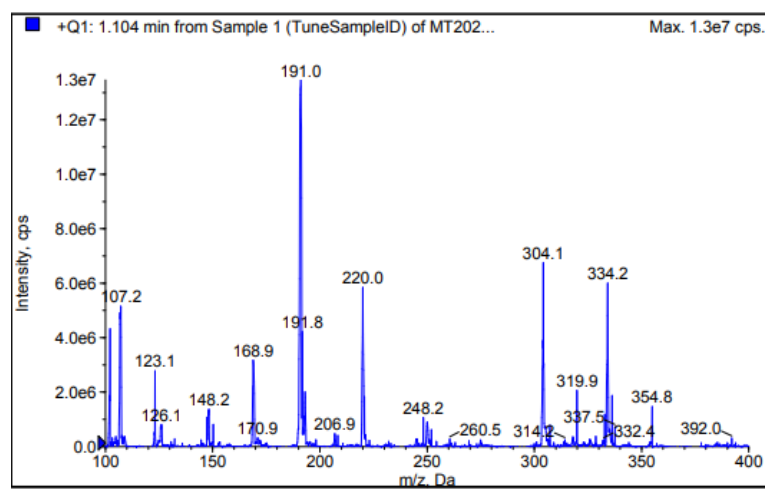
Espectro de masa del compuesto **3h**



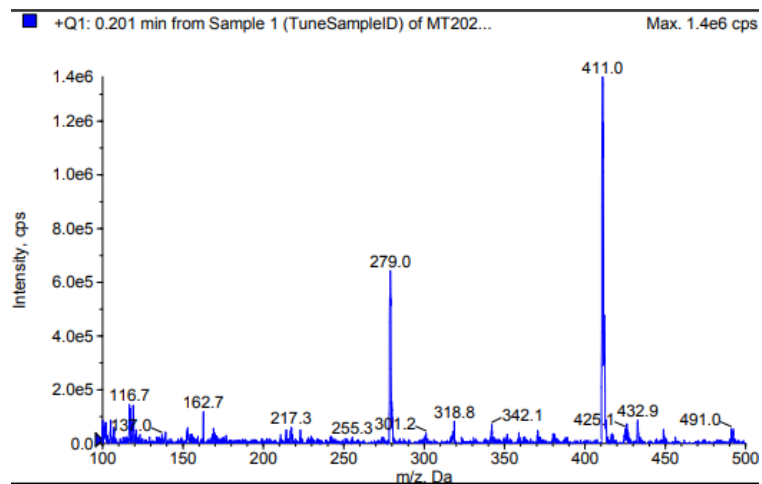
Espectro de masa del compuesto **3i**



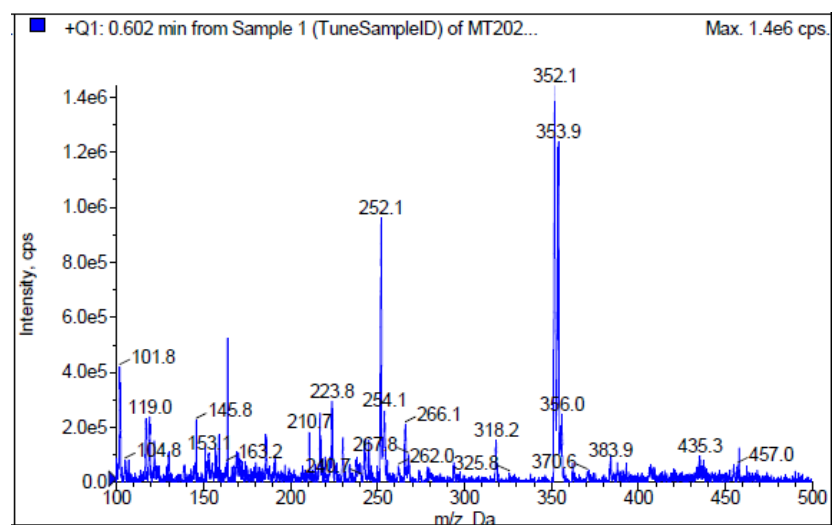
Espectro de masa del compuesto **3j**



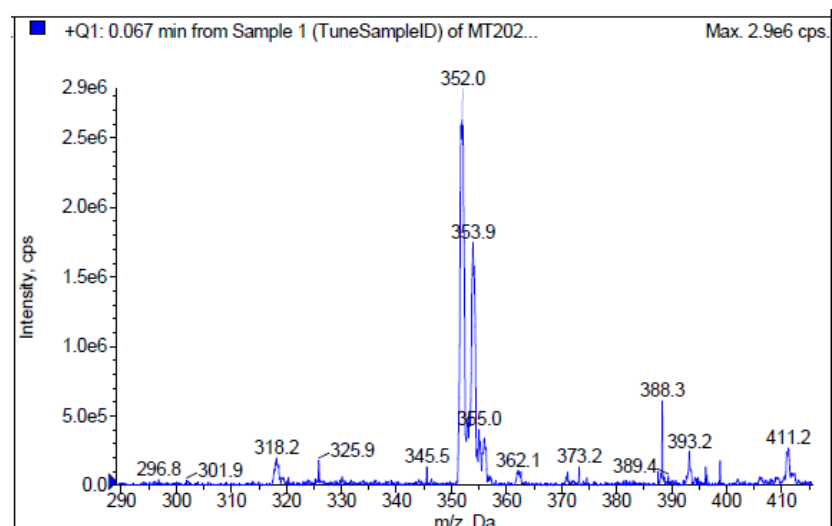
Espectro de masa del compuesto **3k**



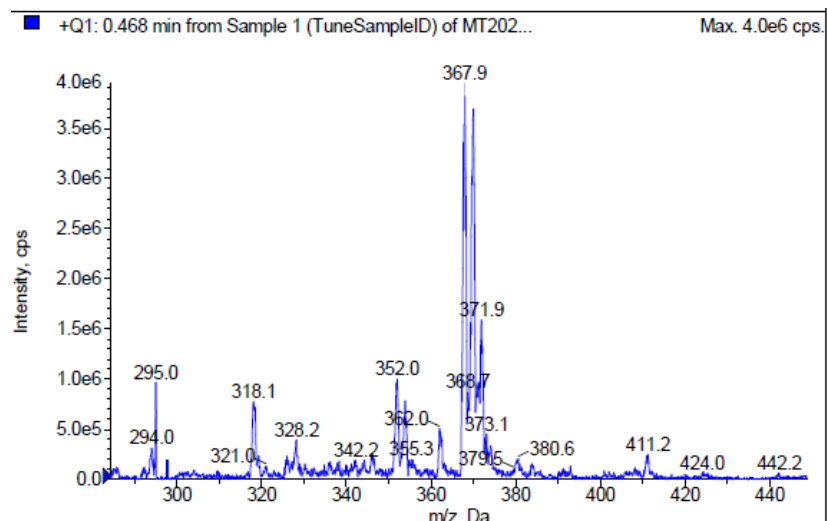
Espectro de masa del compuesto **3l**



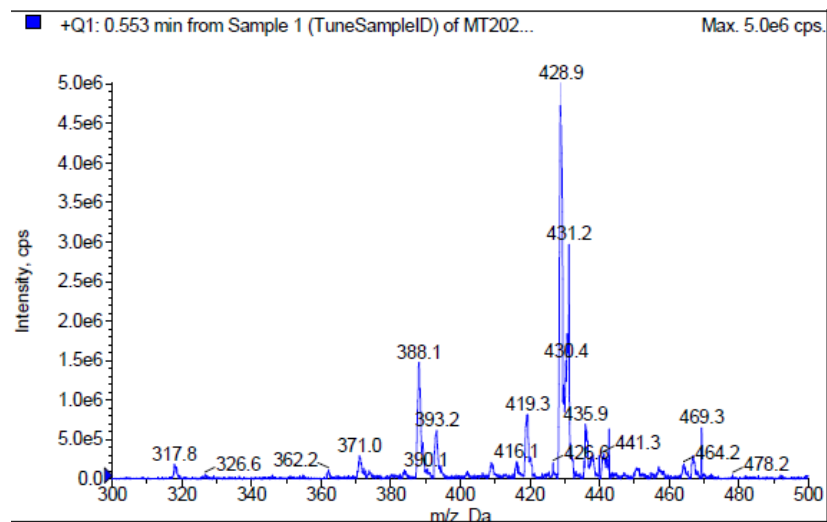
Espectro de masa del compuesto **3m**



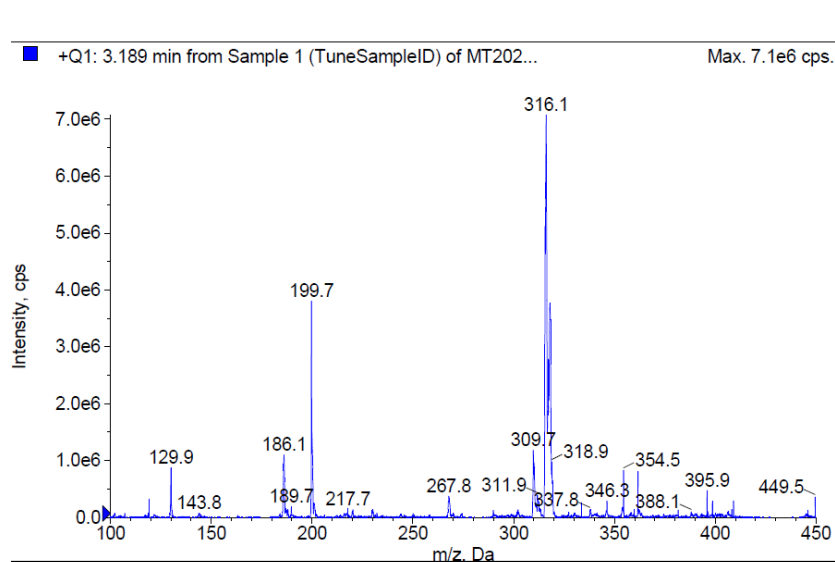
Espectro de masa del compuesto **3n**



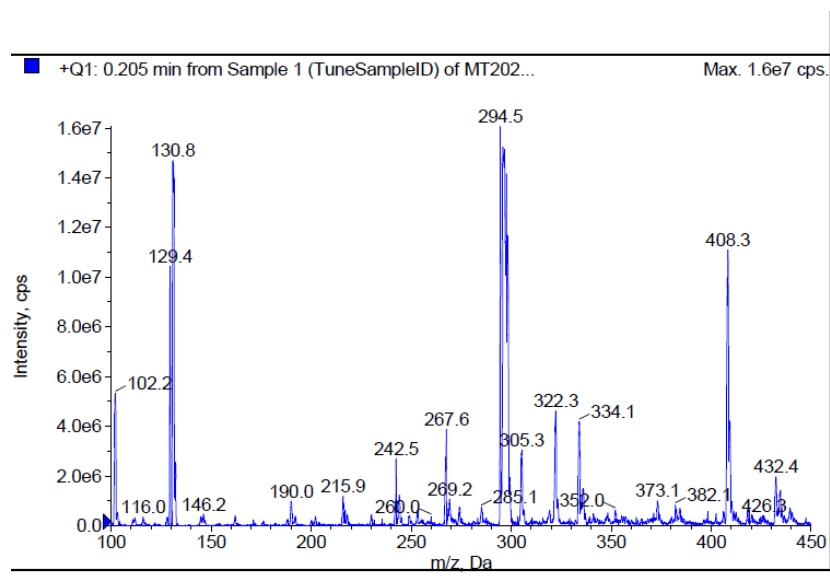
Espectro de masa del compuesto **3o**



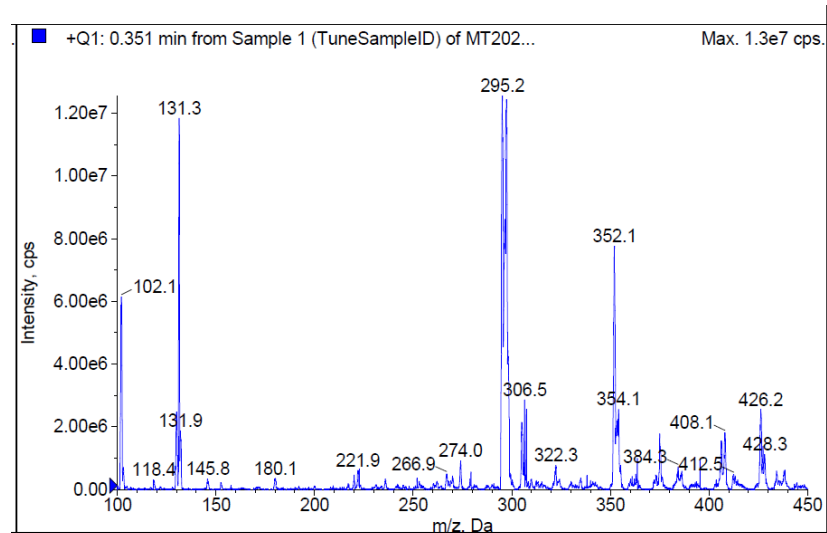
Espectro de masa del compuesto **3p**



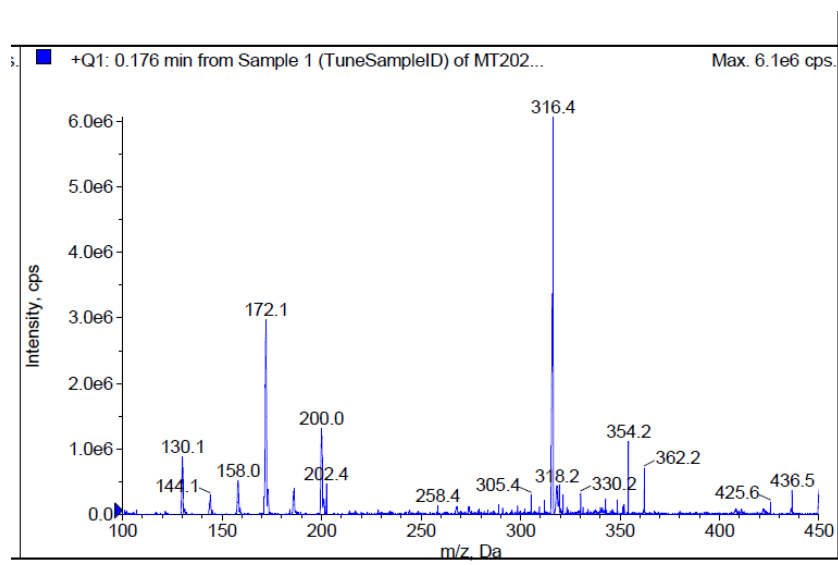
Espectro de masa del compuesto **3q**



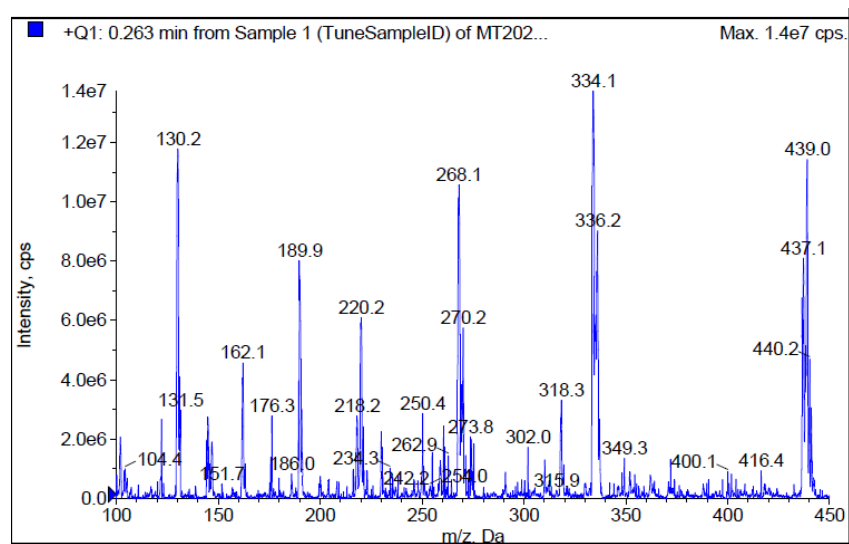
Espectro de masa del compuesto **3r**



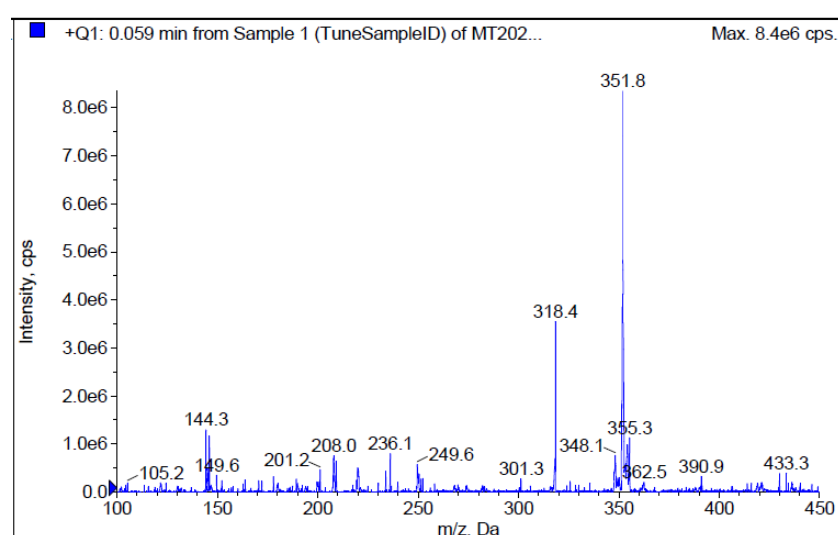
Espectro de masa del compuesto **3s**



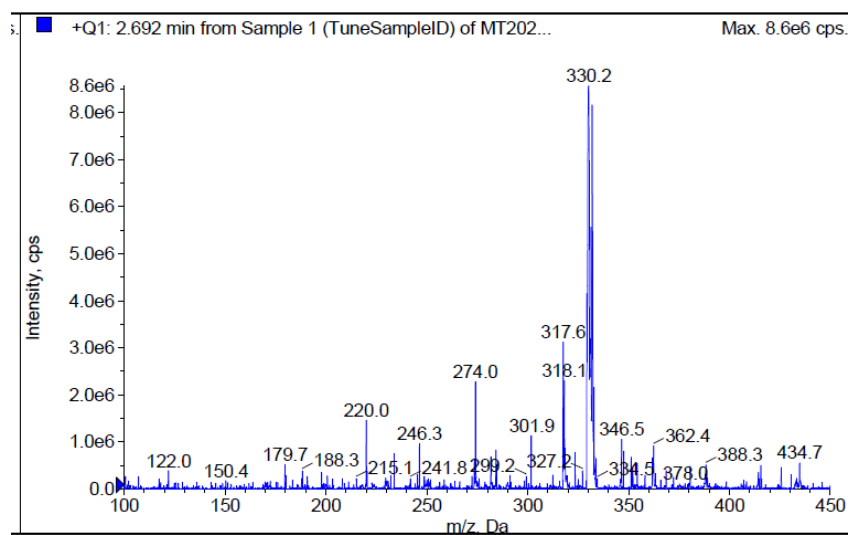
Espectro de masa del compuesto **3t**



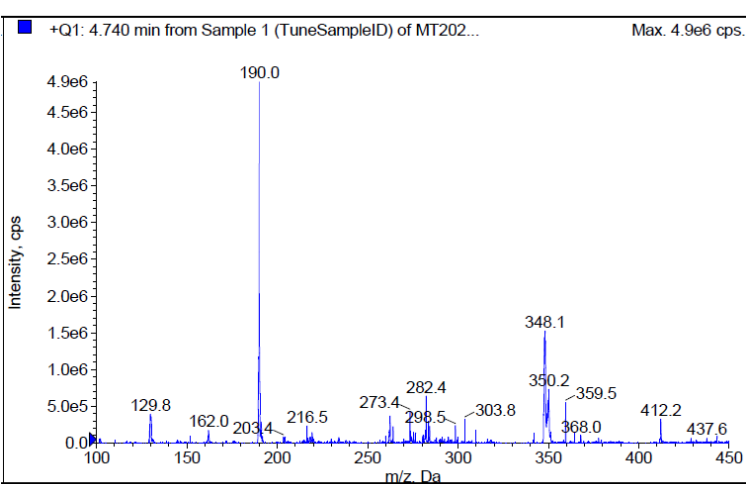
Espectro de masa del compuesto **3u**



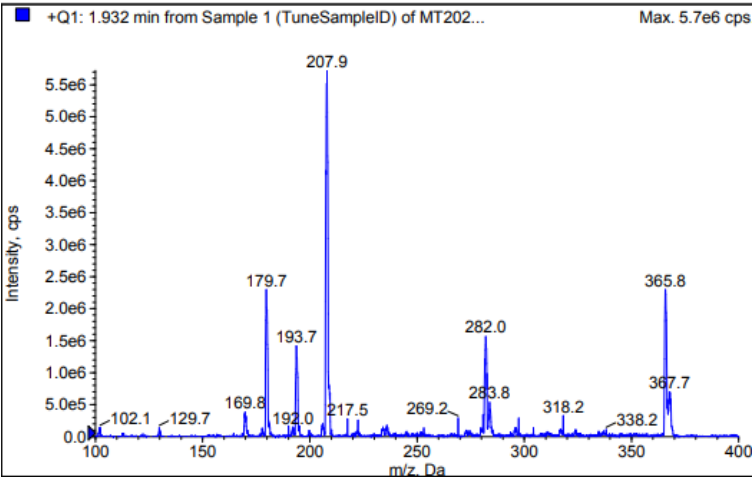
Espectro de masa del compuesto **3v**



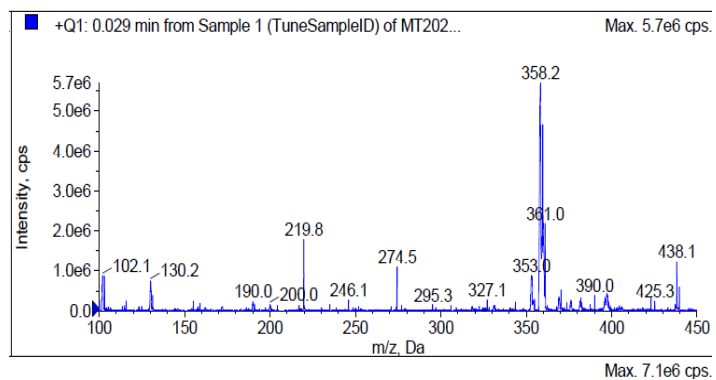
Espectro de masa del compuesto **3w**



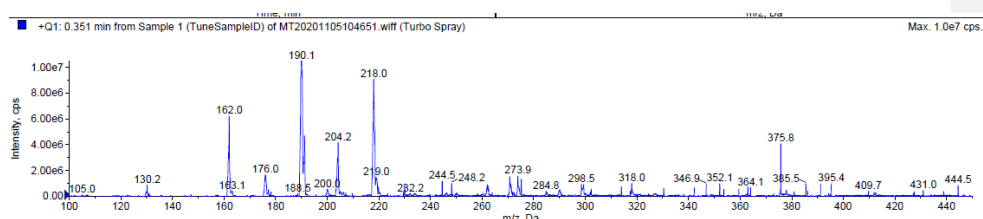
Espectro de masa del compuesto **3x**



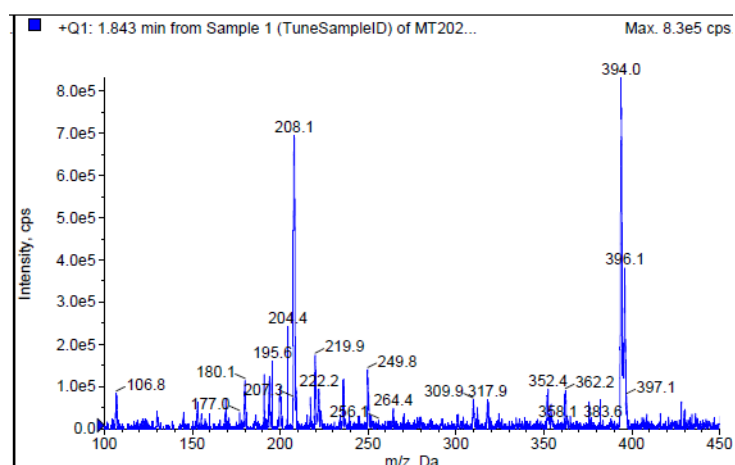
Espectro de masa del compuesto **3y**



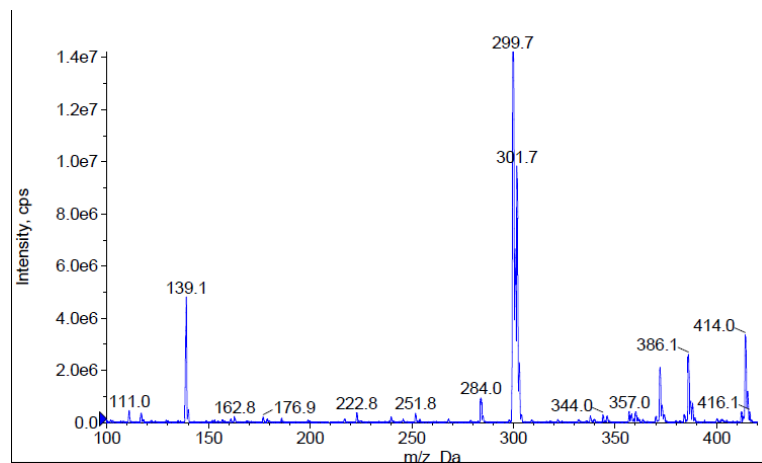
Espectro de masa del compuesto **3z**



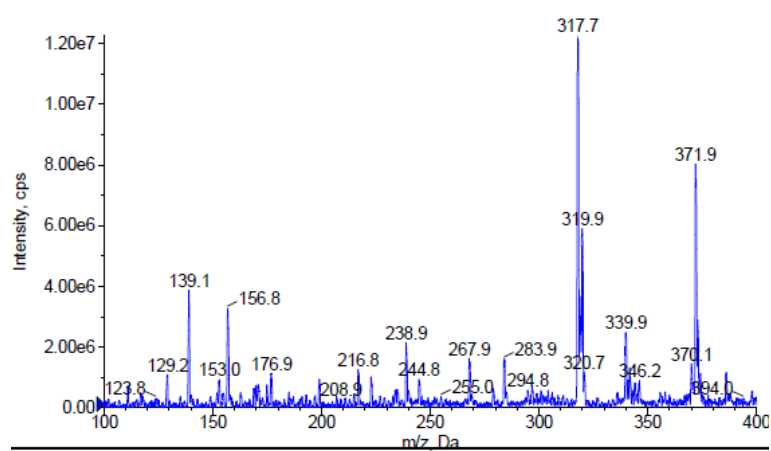
Espectro de masa del compuesto **3aa**



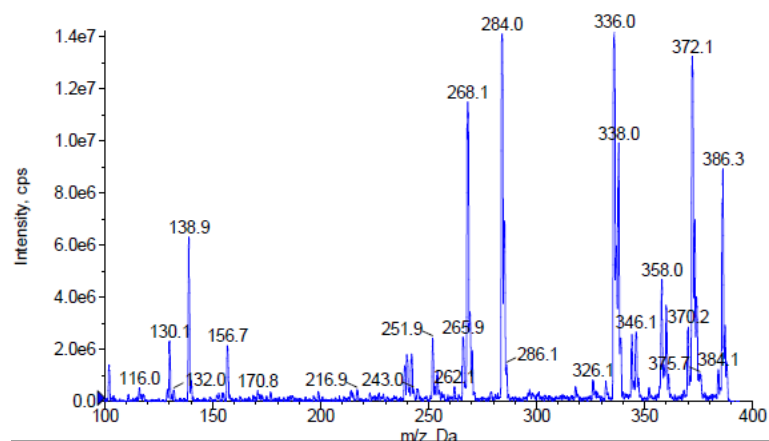
Espectro de masa del compuesto **3ab**



Espectro de masa del compuesto **3ac**

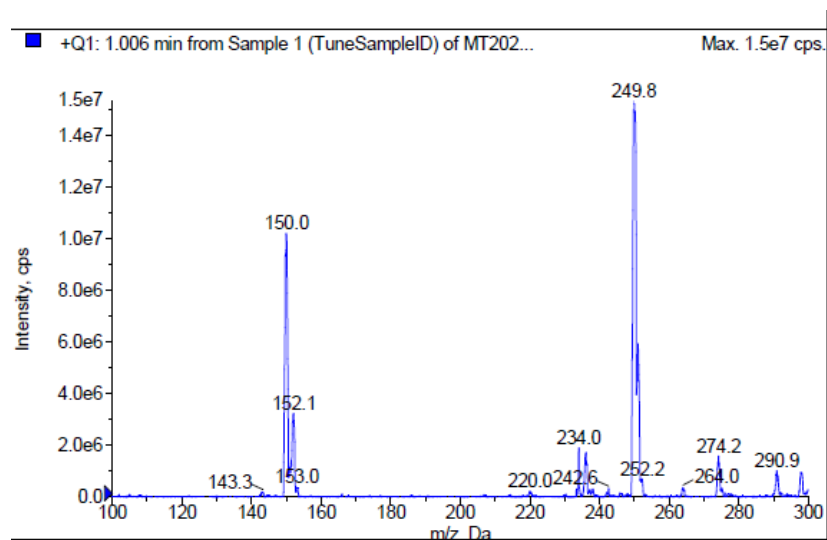


Espectro de masa del compuesto **3ad**



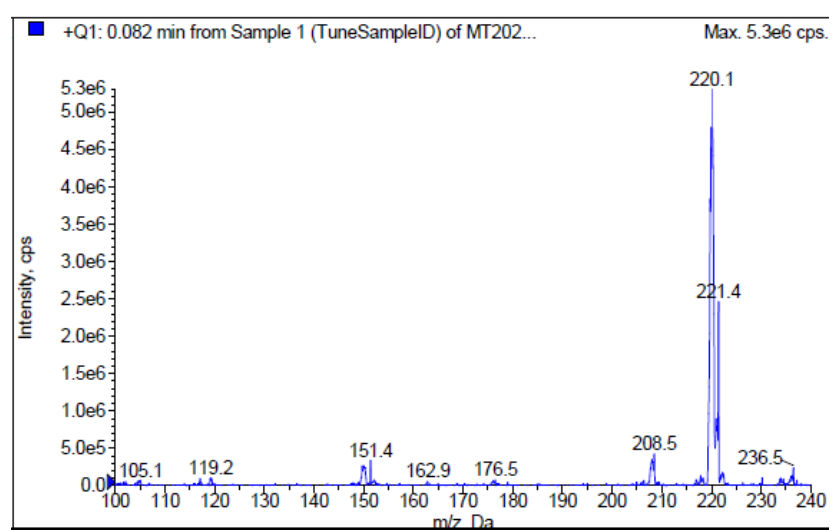
8.2.3 Espectro de masa del derivado 5

Espectro de masa del compuesto 5



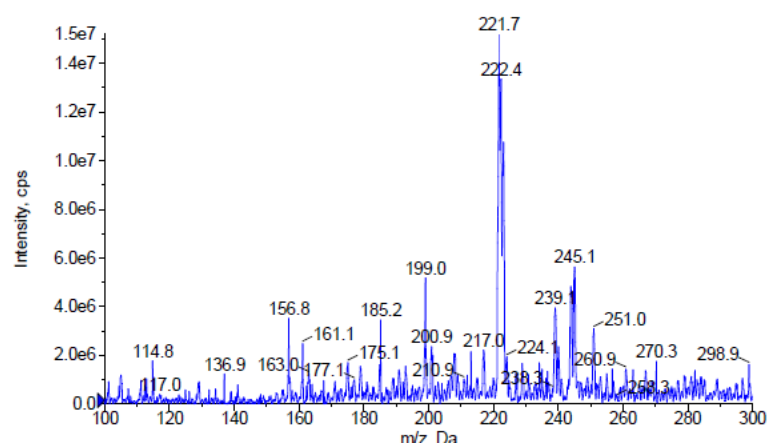
8.2.4 Espectros de masa del derivado 6

Espectro de masa del compuesto 6



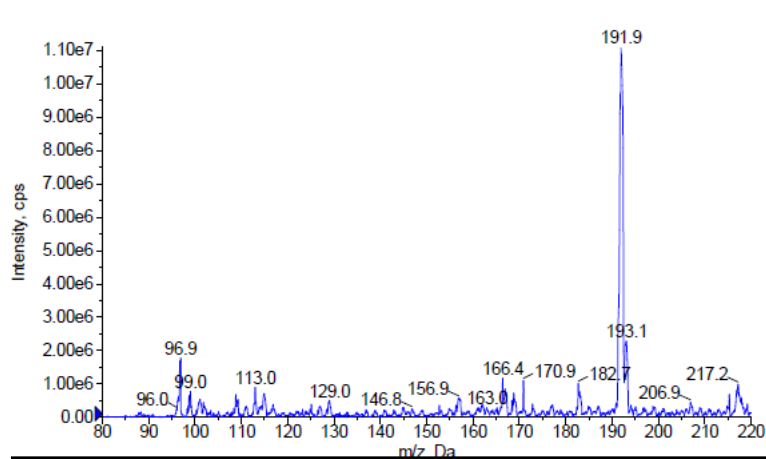
8.2.5 Espectros de masa del derivado 8

Espectro de masa del compuesto 8



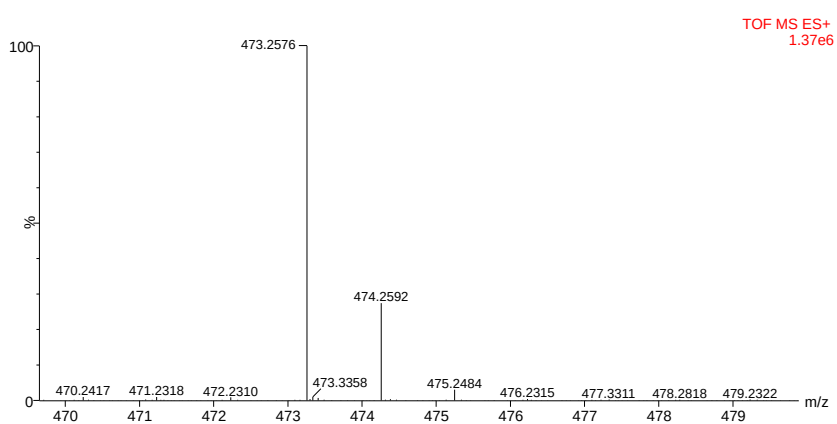
8.2.6 Espectros de masa del derivado 9

Espectro de masa del compuesto 9

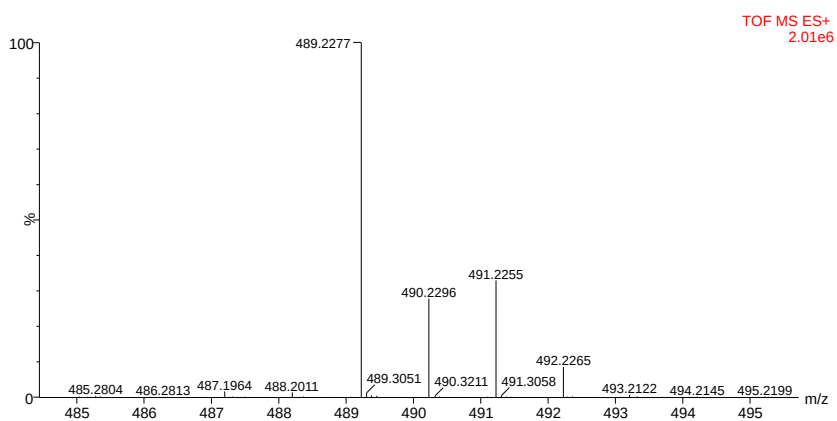


8.2.7 Espectros de masa de los compuestos finales 10a–o

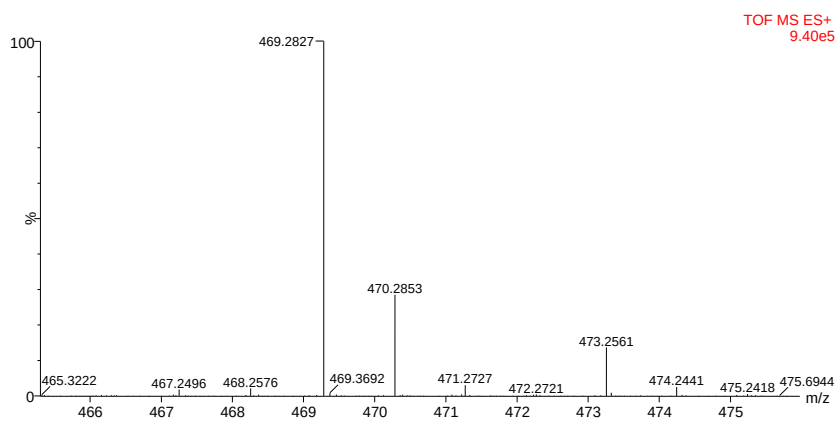
Espectro de masa del compuesto **10a**



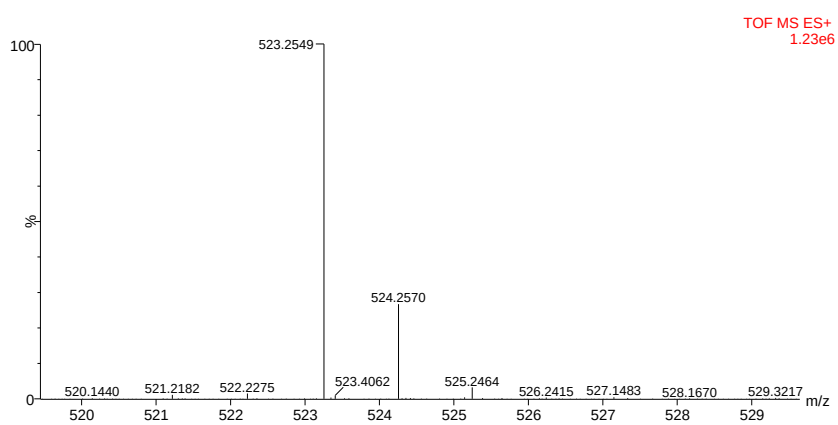
Espectro de masa del compuesto **10b**



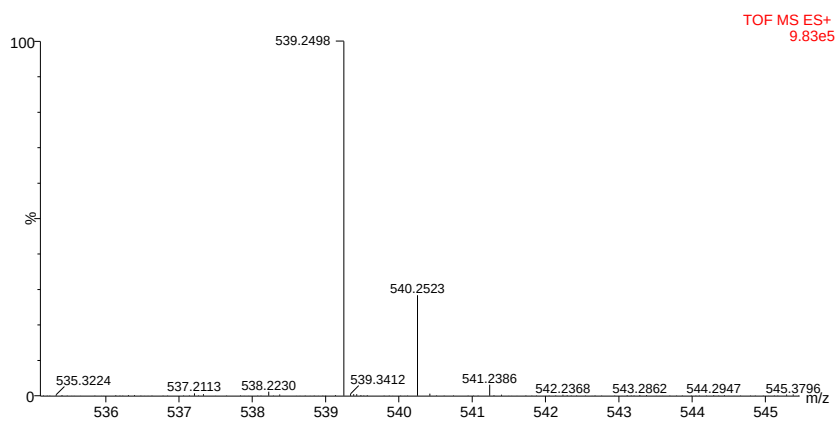
Espectro de masa del compuesto **10c**



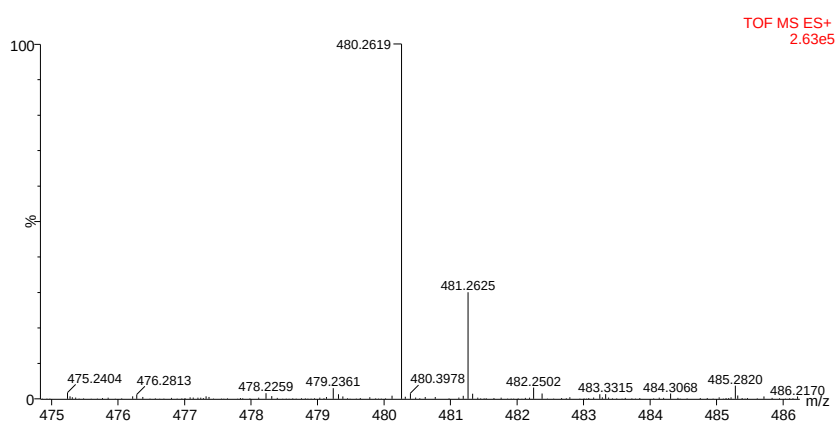
Espectro de masa del compuesto **10d**



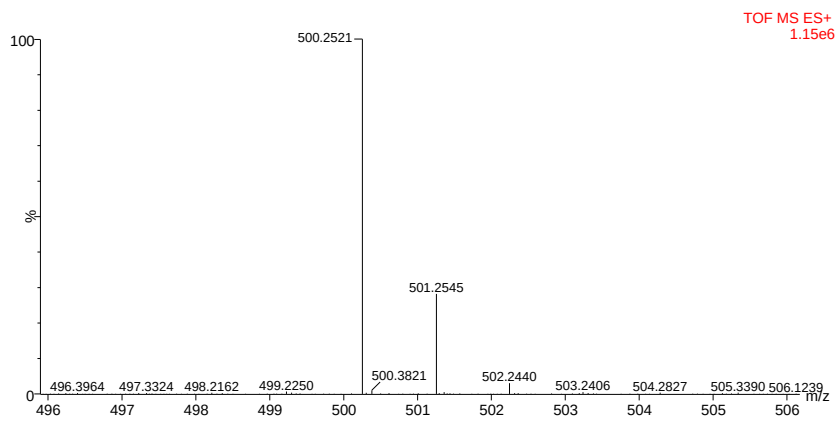
Espectro de masa del compuesto **10e**



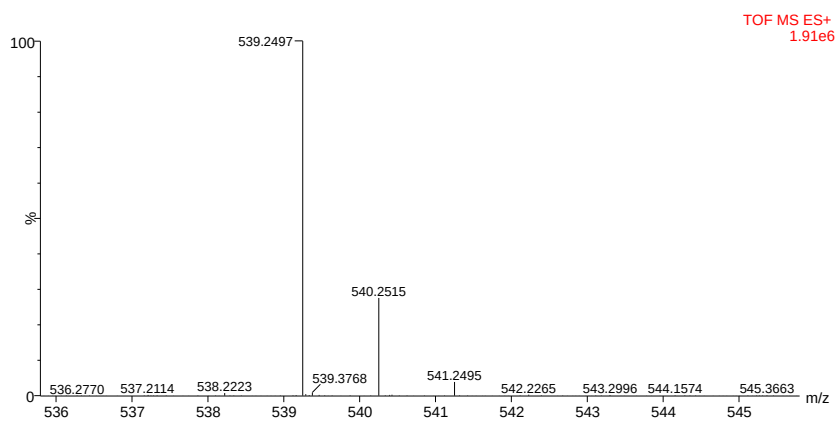
Espectro de masa del compuesto **10f**



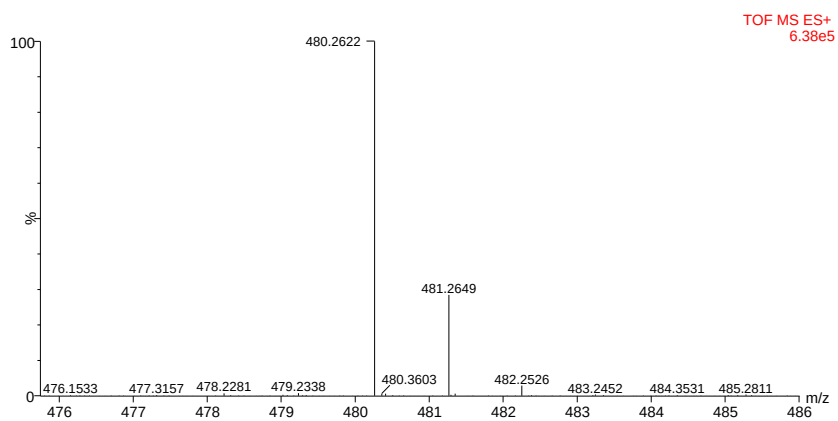
Espectro de masa del compuesto **10g**



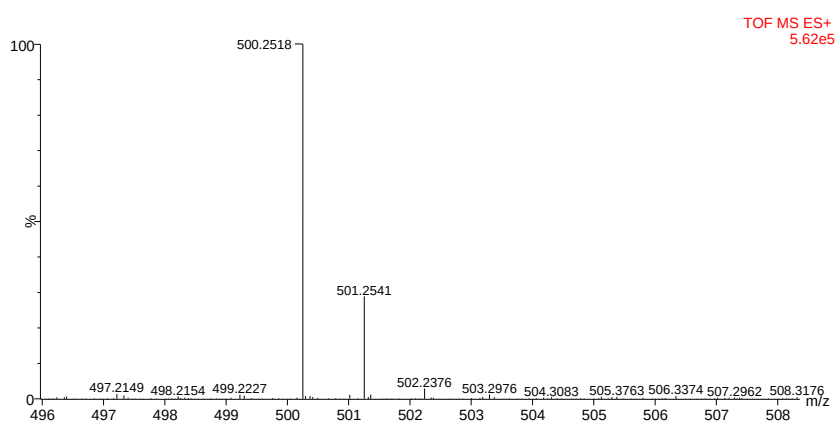
Espectro de masa del compuesto **10h**



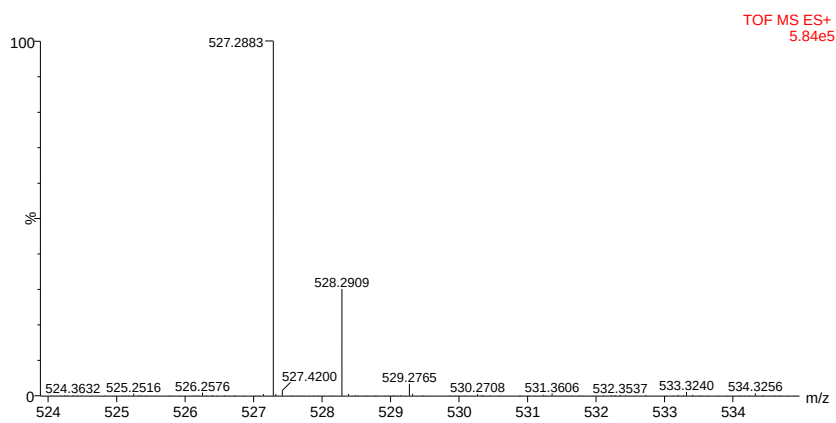
Espectro de masa del compuesto **10i**



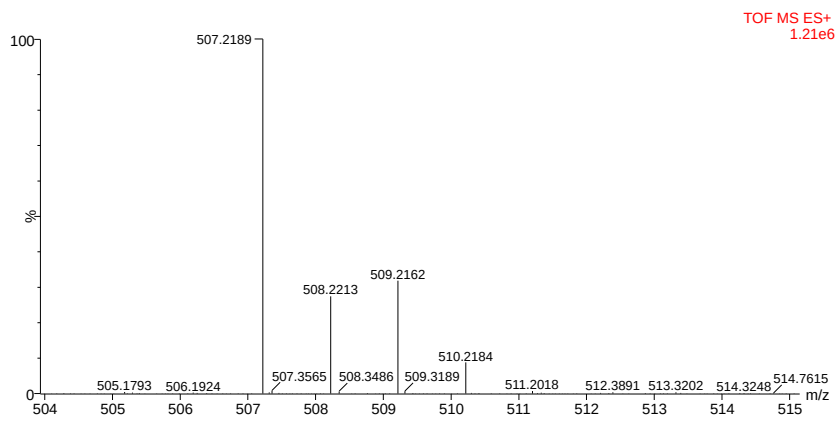
Espectro de masa del compuesto **10j**



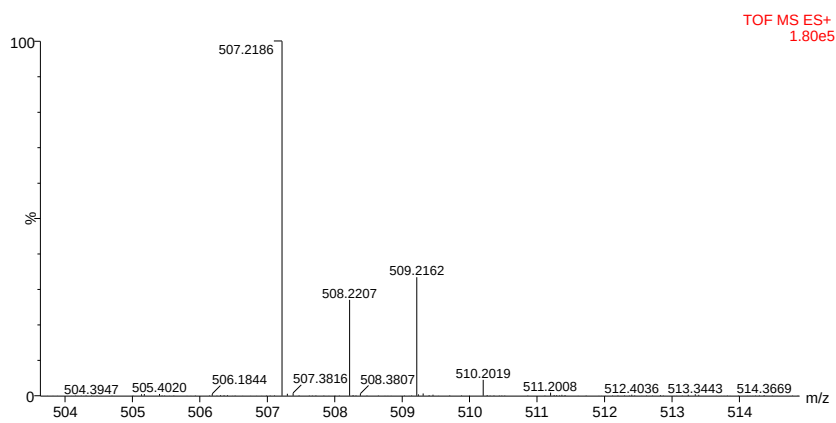
Espectro de masa del compuesto **10k**



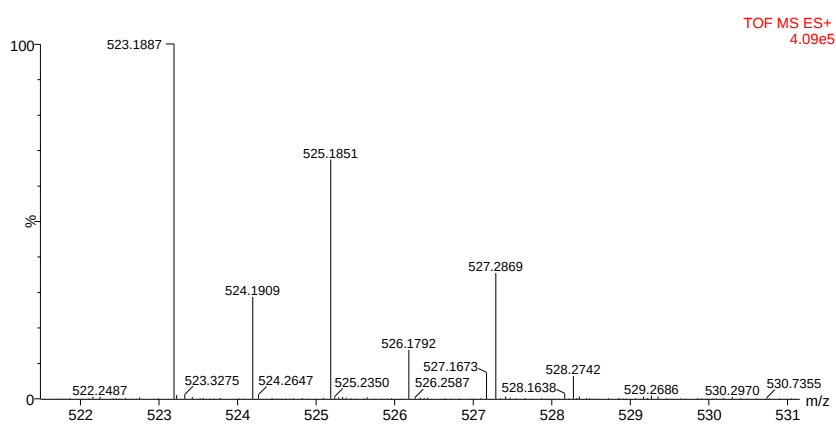
Espectro de masa del compuesto **10l**



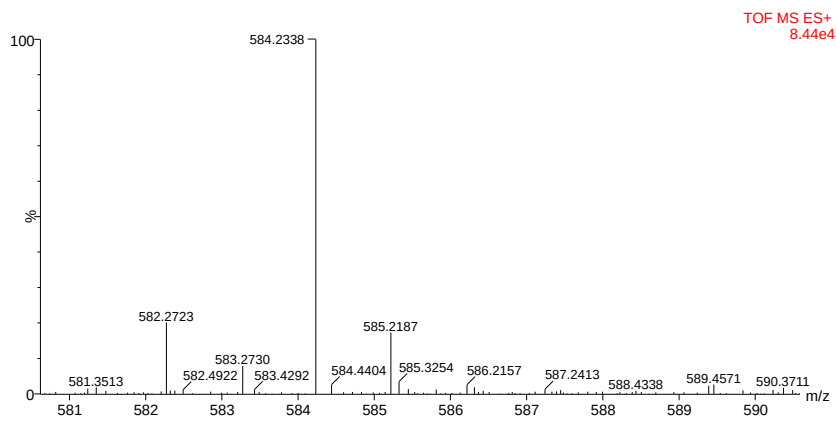
Espectro de masa del compuesto **10m**



Espectro de masa del compuesto **10n**

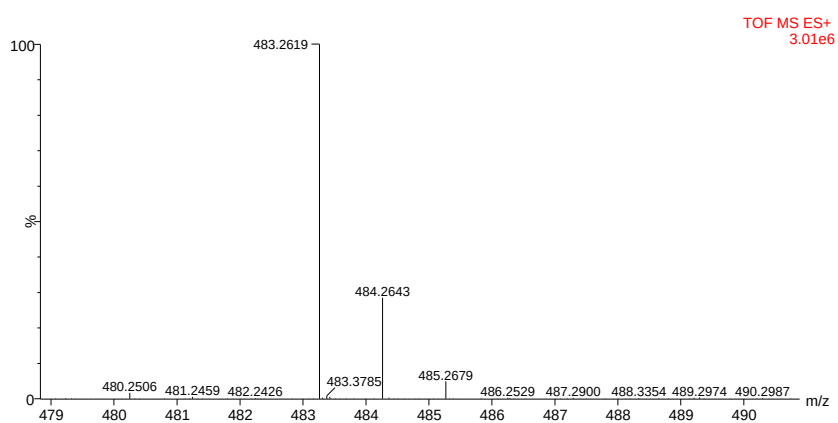


Espectro de masa del compuesto **10o**

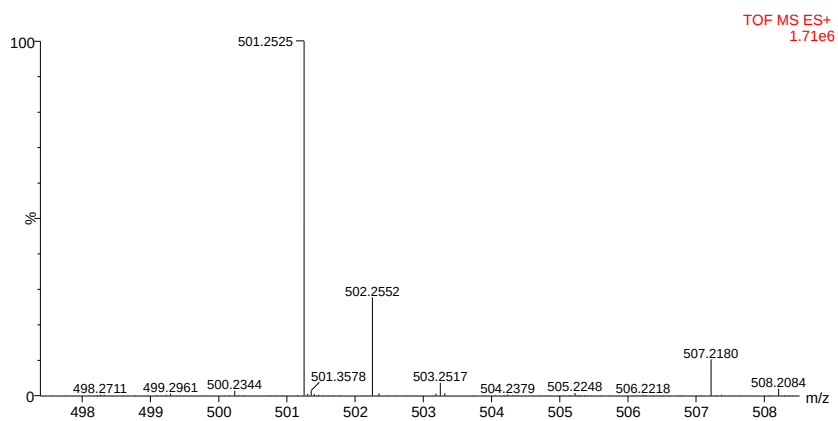


8.2.8 Espectros de masa de los compuestos finales 11a-11d

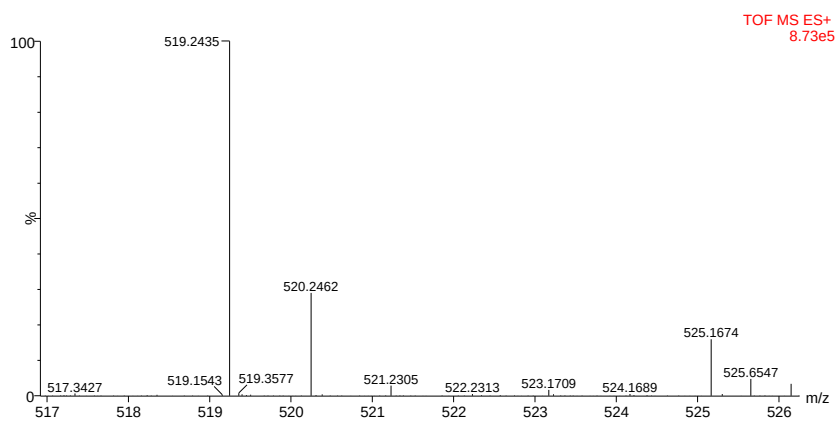
Espectro de masa del compuesto **11a**



Espectro de masa del compuesto **11b**

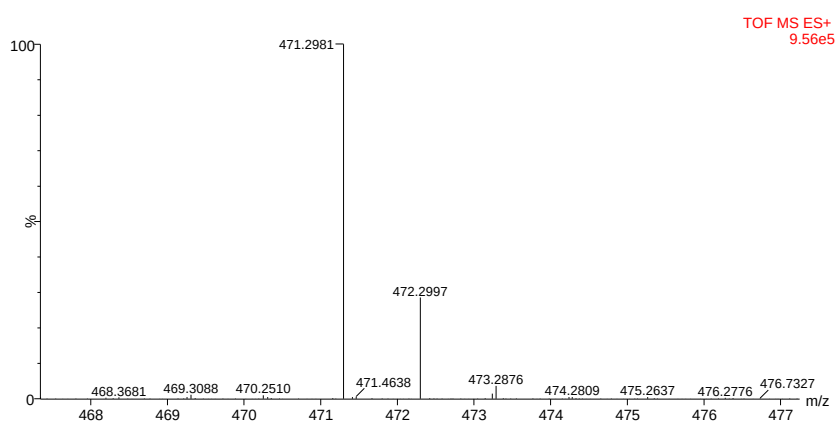


Espectro de masa del compuesto **11c**

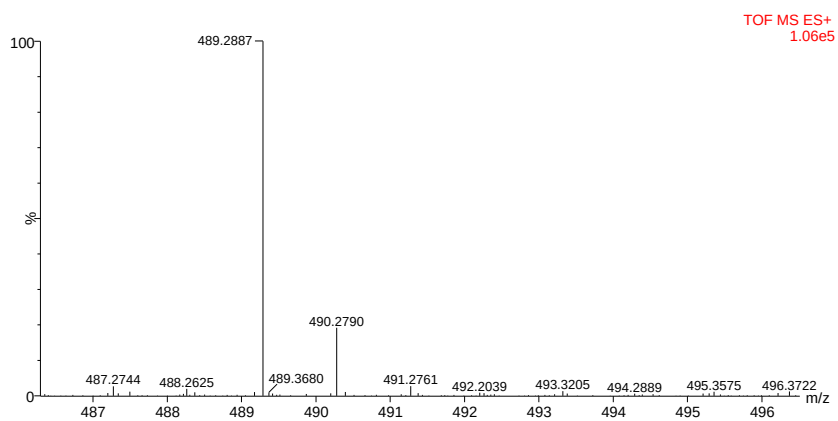


8.2.9 Espectros de masa de los compuestos finales 12a-12l

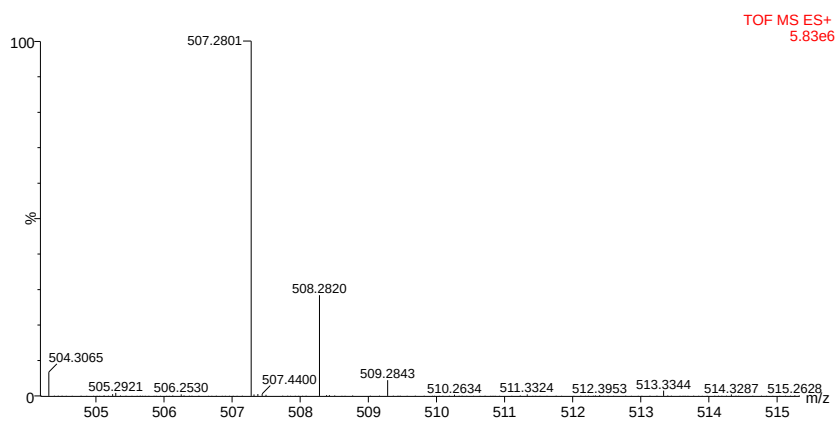
Espectro de masa del compuesto **12a**



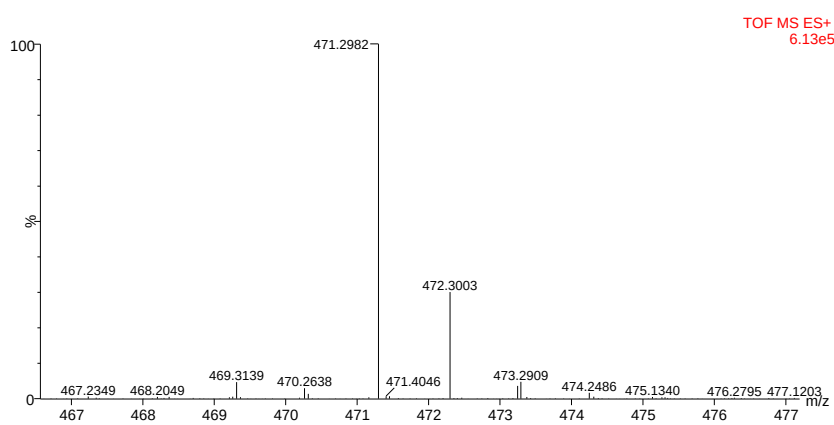
Espectro de masa del compuesto **12b**



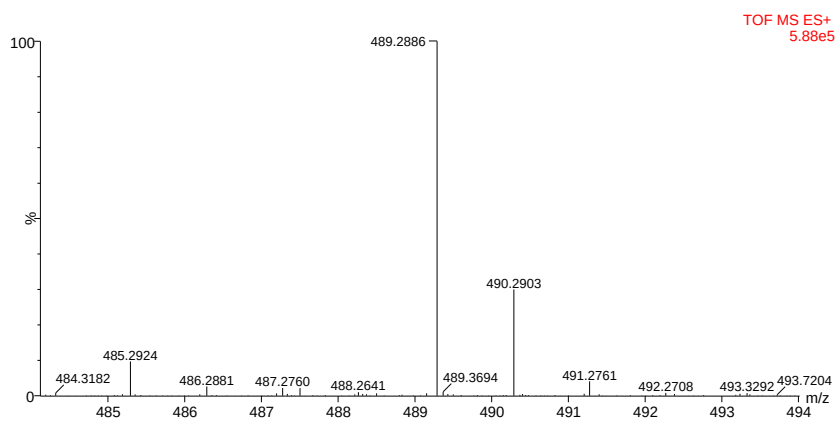
Espectro de masa del compuesto **12c**



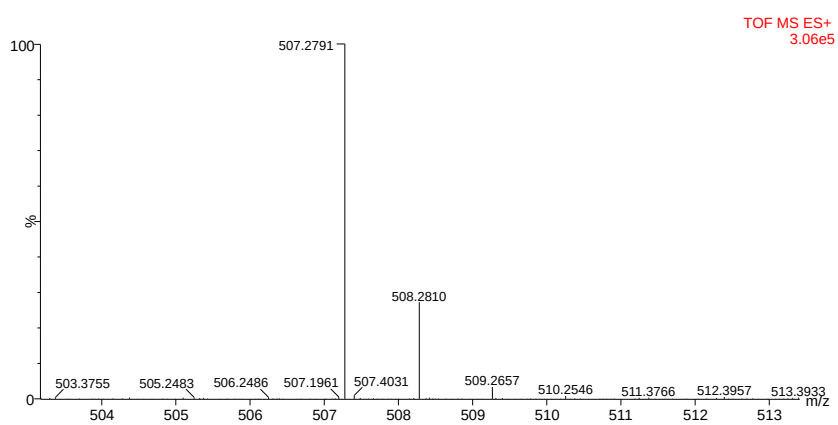
Espectro de masa del compuesto **12d**



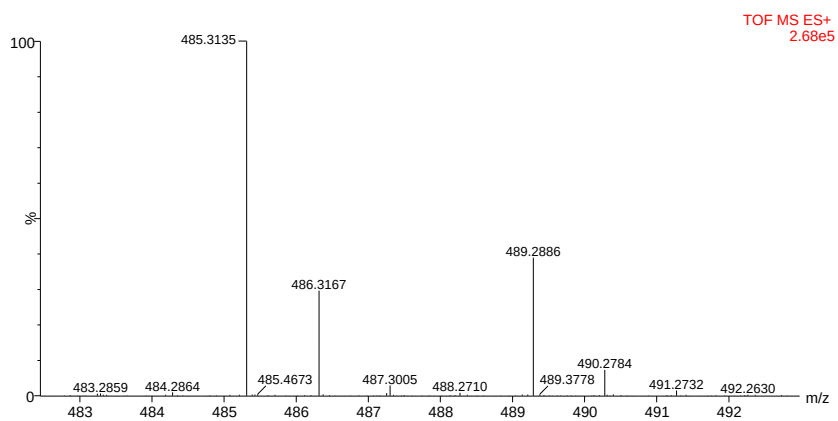
Espectro de masa del compuesto **12e**



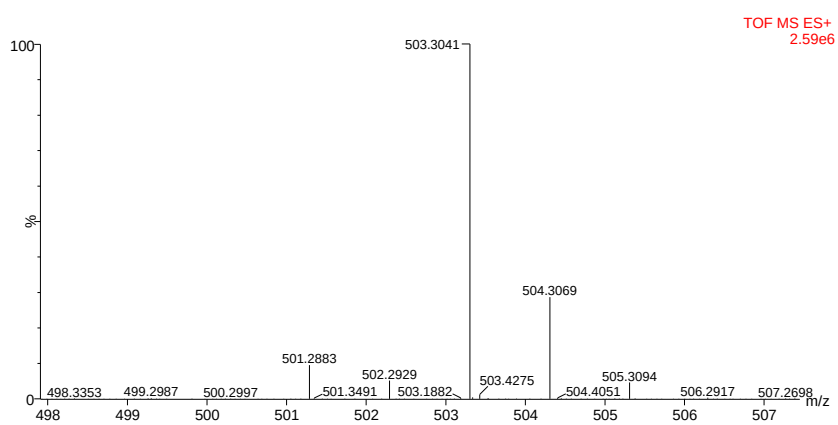
Espectro de masa del compuesto **12f**



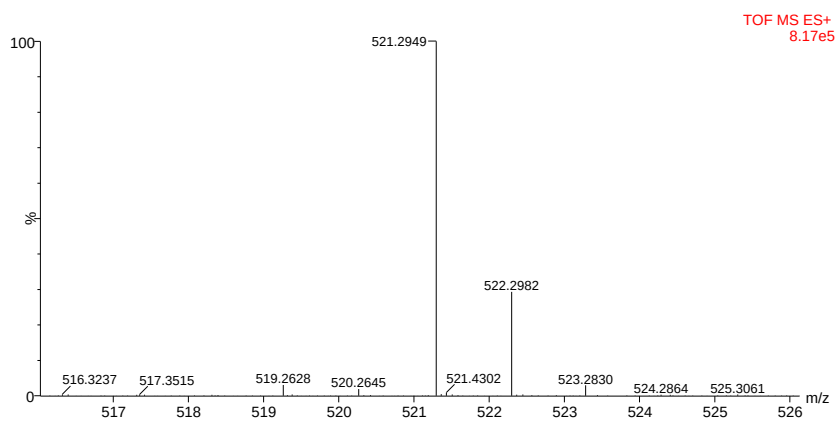
Espectro de masa del compuesto **12g**



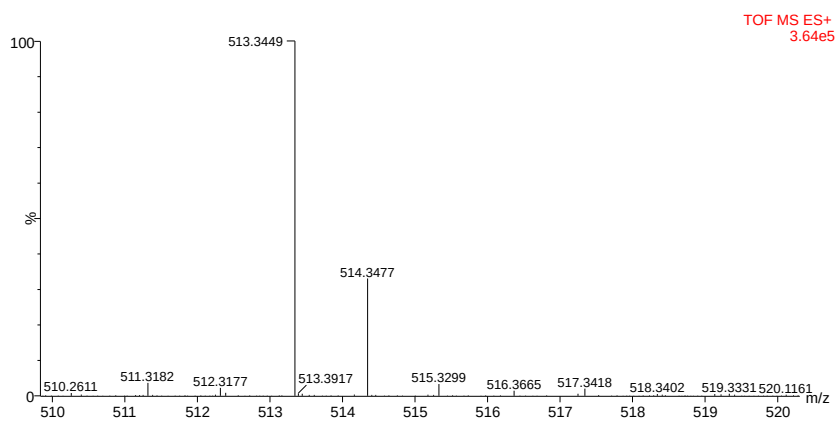
Espectro de masa del compuesto **12h**



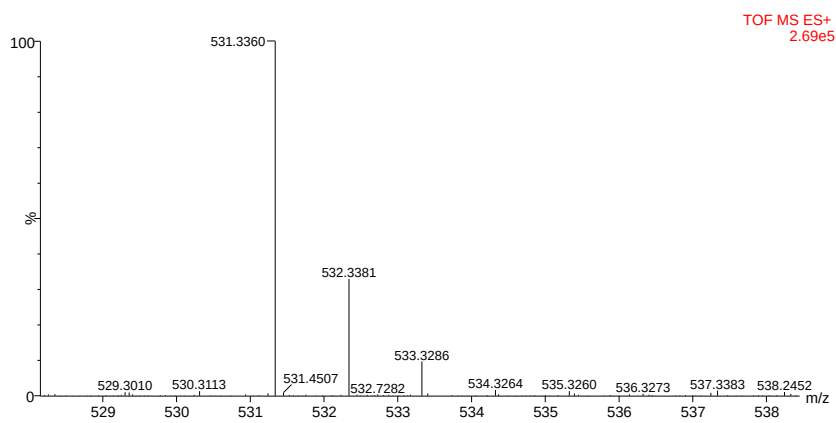
Espectro de masa del compuesto **12i**



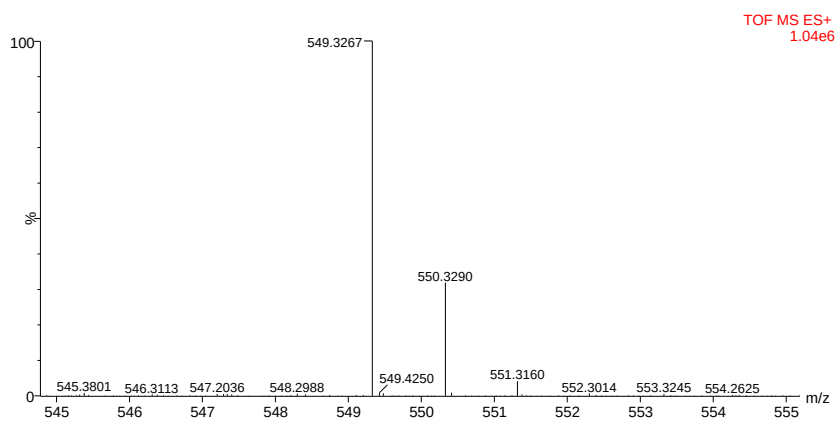
Espectro de masa del compuesto **12j**



Espectro de masa del compuesto **12k**

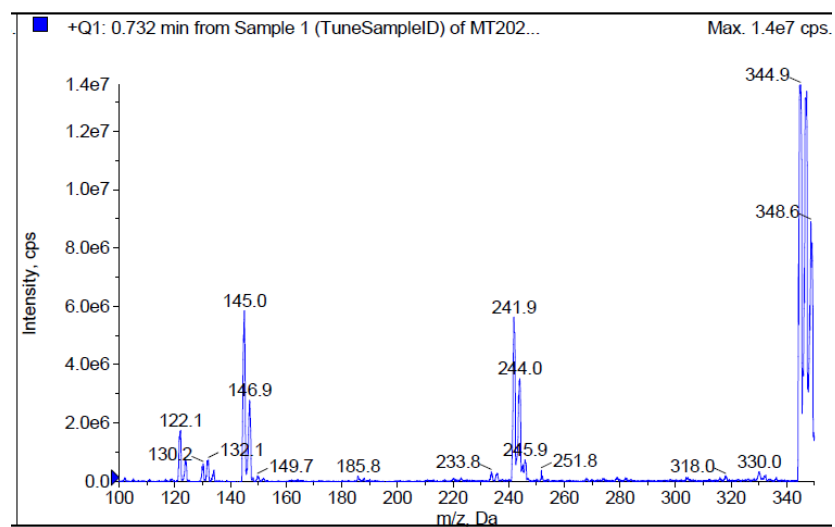


Espectro de masa del compuesto **12l**



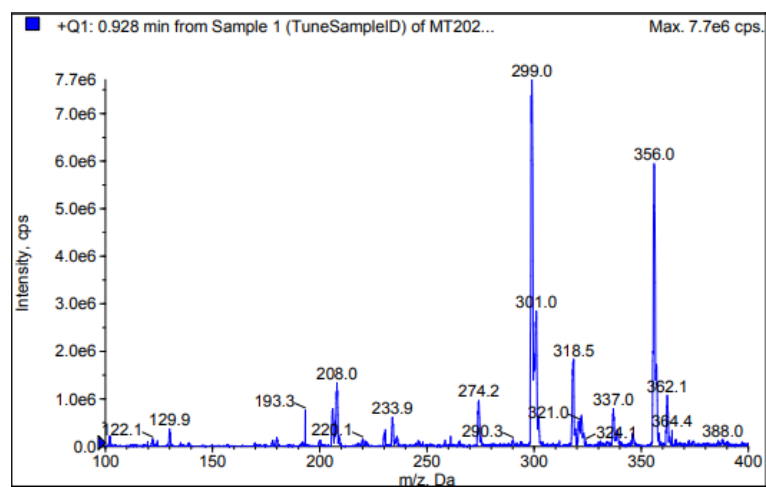
8.2.10 Espectro de masa del derivado 14

Espectro de masa del compuesto **14**

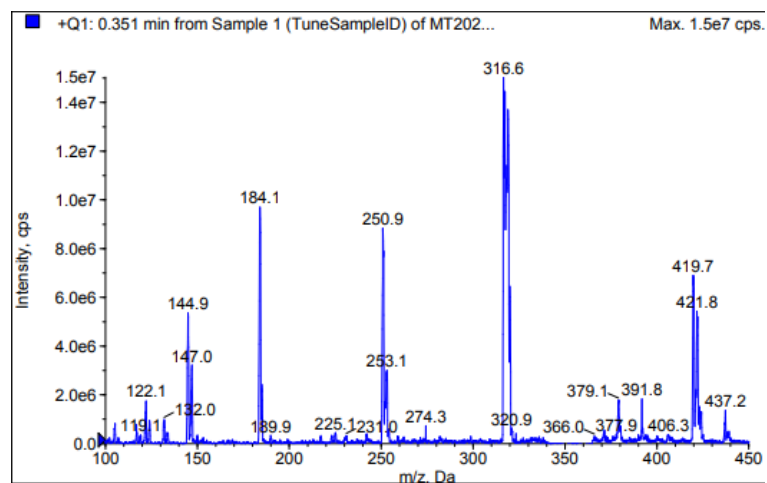


8.2.11 Espectro de masa de los derivados 15a-15c

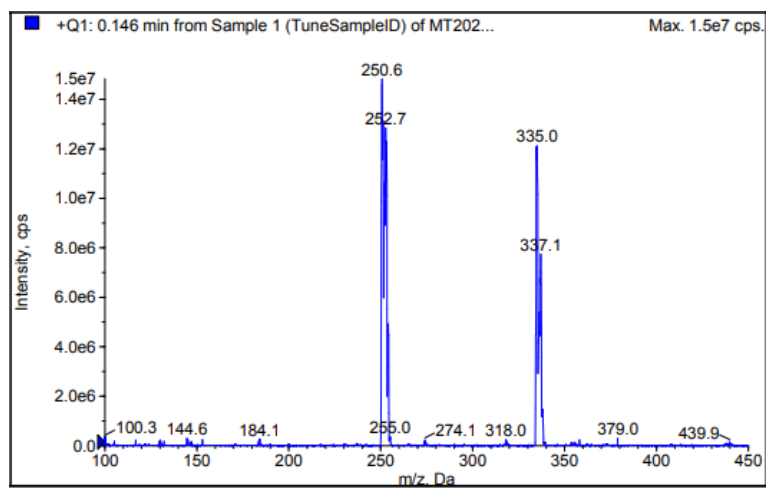
Espectro de masa del compuesto **15a**



Espectro de masa del compuesto **15b**

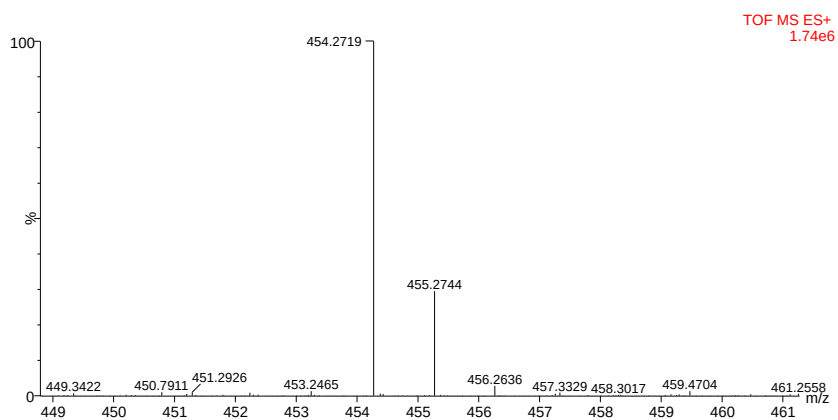


Espectro de masa del compuesto **15c**



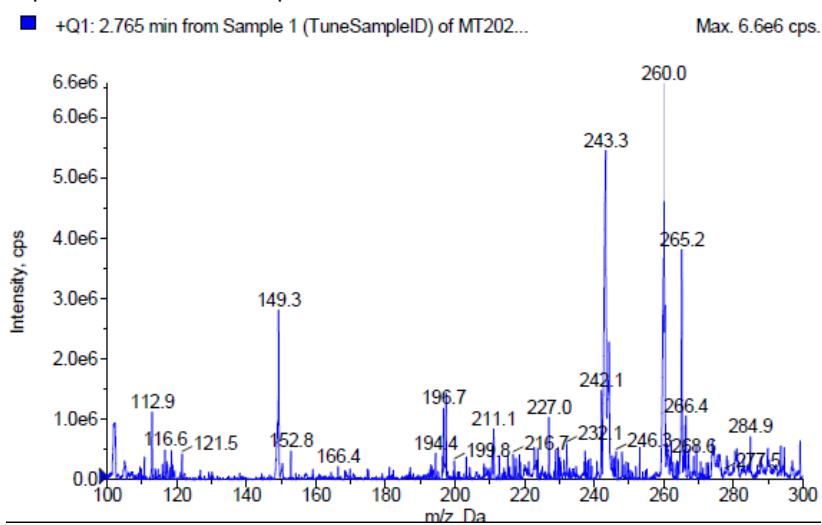
8.2.12 Espectro de masa de los compuestos finales 16a-16c

Espectro de masa del compuesto **16a**

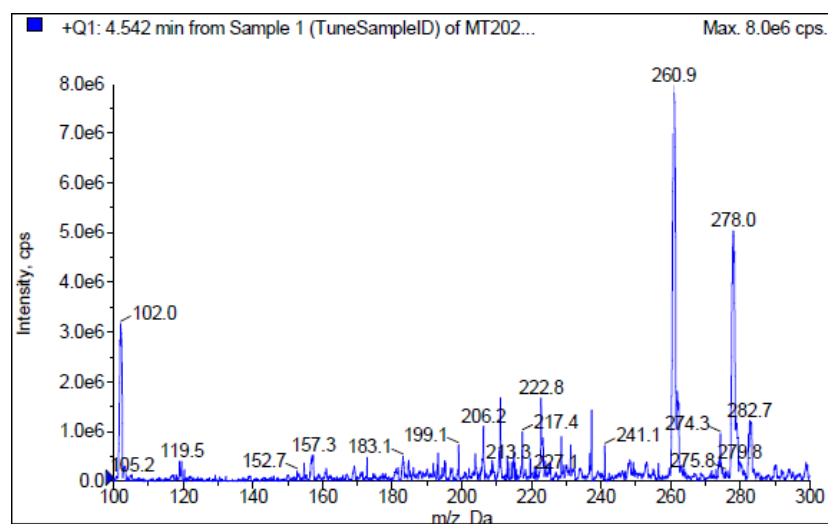


8.2.13 Espectro de masa de los derivados 17a-17h

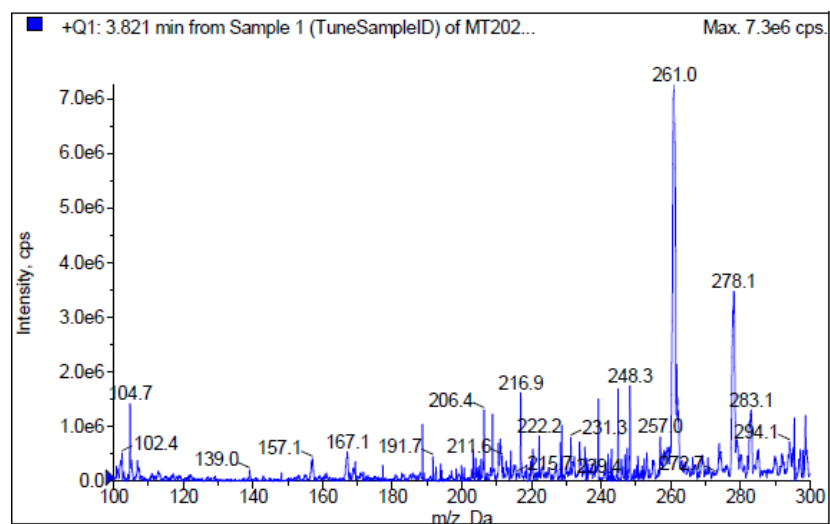
Espectro de masa del compuesto **17a**



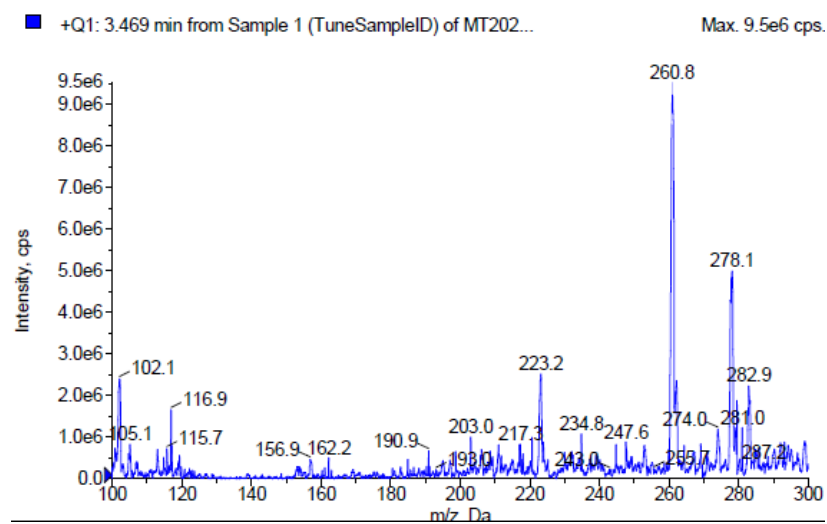
Espectro de masa del compuesto **17b**



Espectro de masa del compuesto **17c**



Espectro de masa del compuesto **17d**



■ +Q1: 0.268 min from Sample 1 (TuneSampleID) of MT202...

Max. 8.6e6 cps.

Intensity, cps

m/z Da

m/z Da	Intensity, cps
100.9	~1.0e6
126.7	~0.5e6
130.3	~1.5e6
135.7	~0.5e6
154.8	~0.5e6
157.0	~1.5e6
181.3	~1.0e6
191.2	~1.0e6
193.4	~0.5e6
206.0	~1.5e6
210.7	~2.0e6
214.7	~0.5e6
232.6	~1.0e6
241.3	~0.5e6
243.0	~2.5e6
251.0	~0.5e6
259.2	~1.0e6
260.0	~1.5e6
277.1	~1.5e6
282.9	8.6e6
284.4	~1.5e6
288.2	~0.5e6
292.1	~0.5e6
299.8	~6.0e6

■ +Q1: 3.871 min from Sample 1 (TuneSampleID) of MT202...

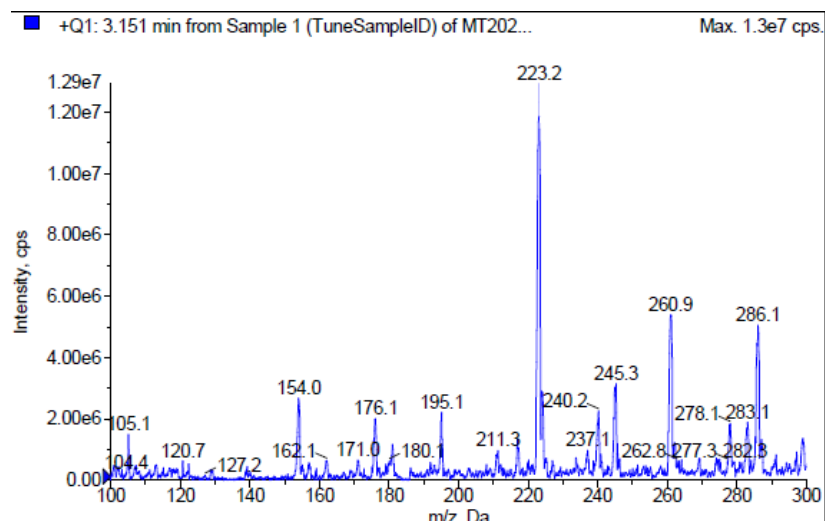
Max. 6.6e6 cps.

Intensity, cps

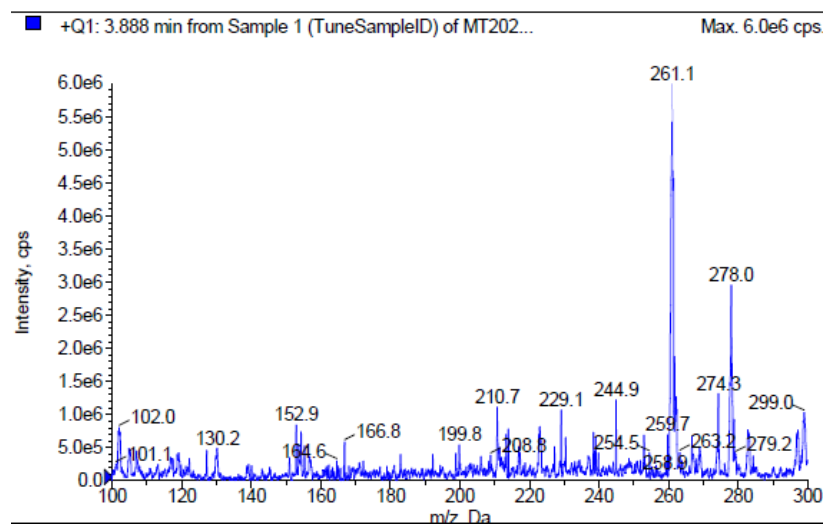
m/z Da

m/z Da	Intensity, cps
102.1	6.6e6
105.1	1.0e6
119.1	1.0e6
154.3	1.0e6
181.2	1.0e6
208.2	1.0e6
222.9	2.0e6
239.0	3.0e6
261.1	6.0e6
277.8	4.0e6
282.9	1.0e6

Espectro de masa del compuesto **17g**

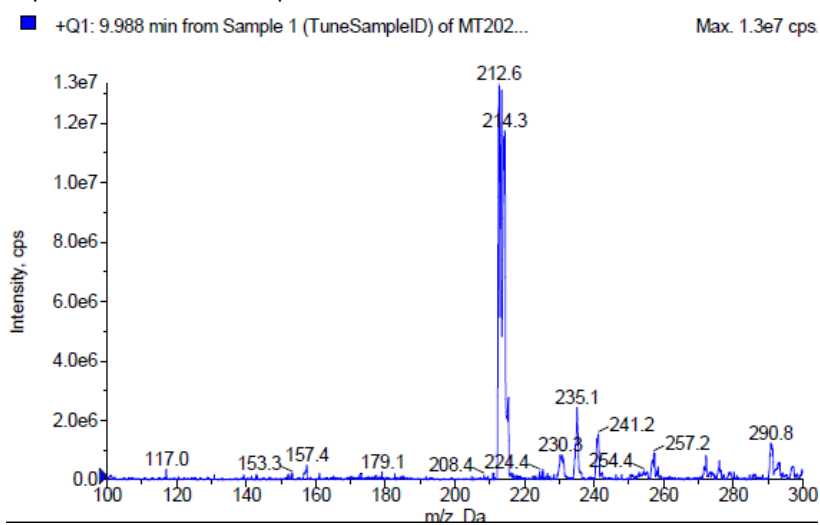


Espectro de masa del compuesto **17h**

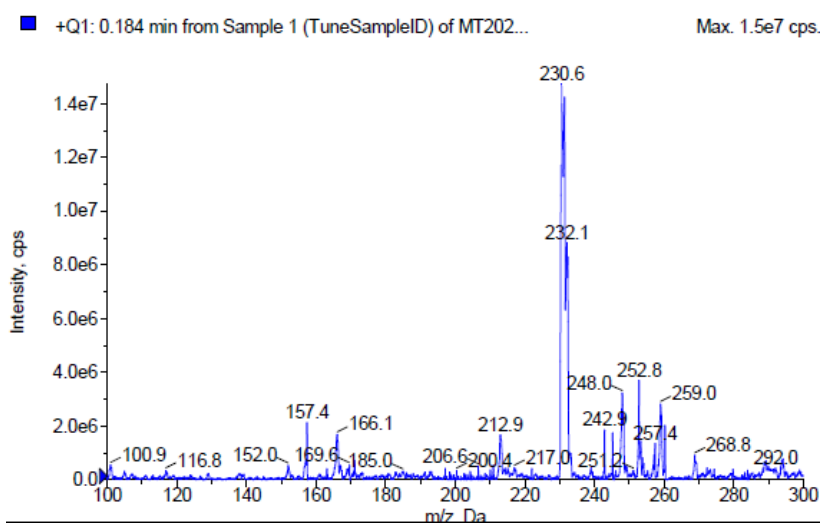


8.2.14 Espectro de masa de los derivados 18a-18h

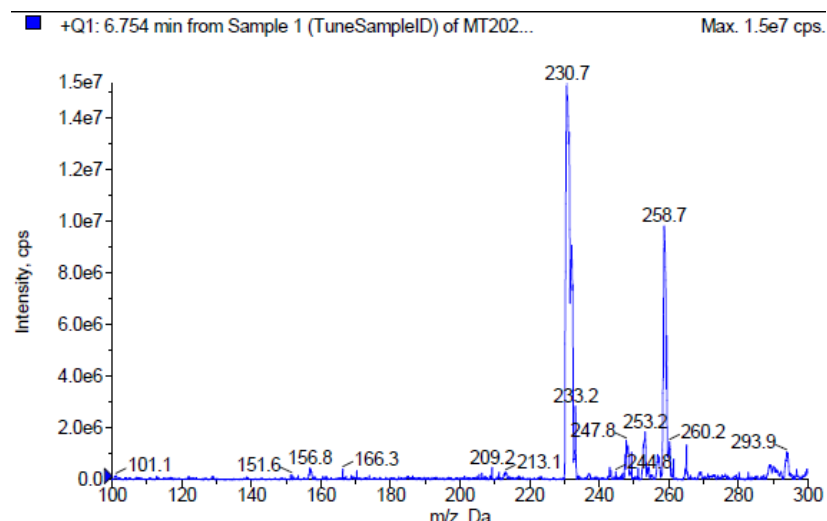
Espectro de masa del compuesto **18a**



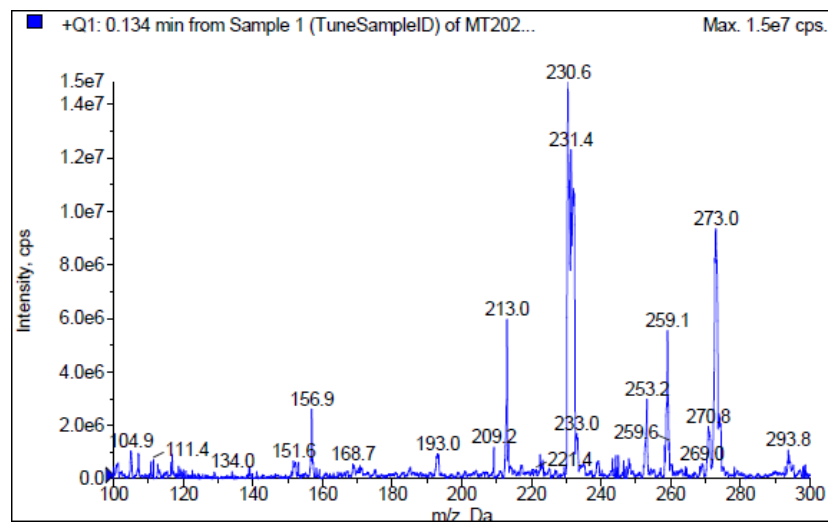
Espectro de masa del compuesto **18b**



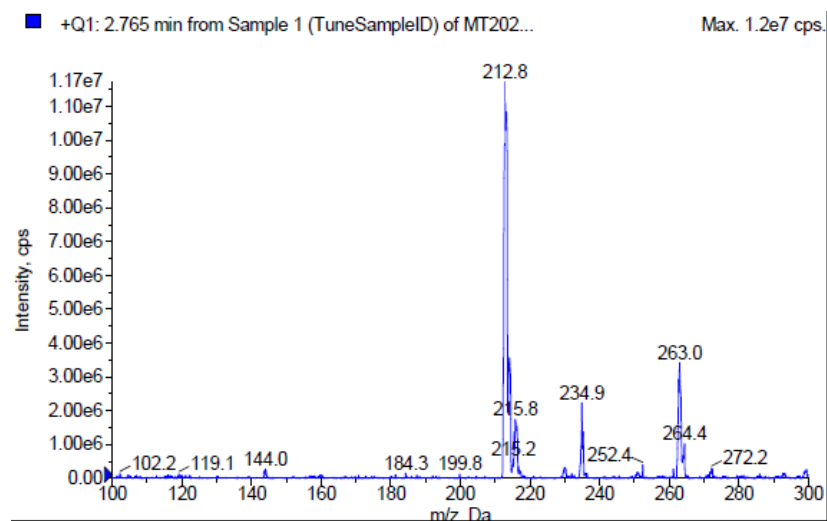
Espectro de masa del compuesto **18c**



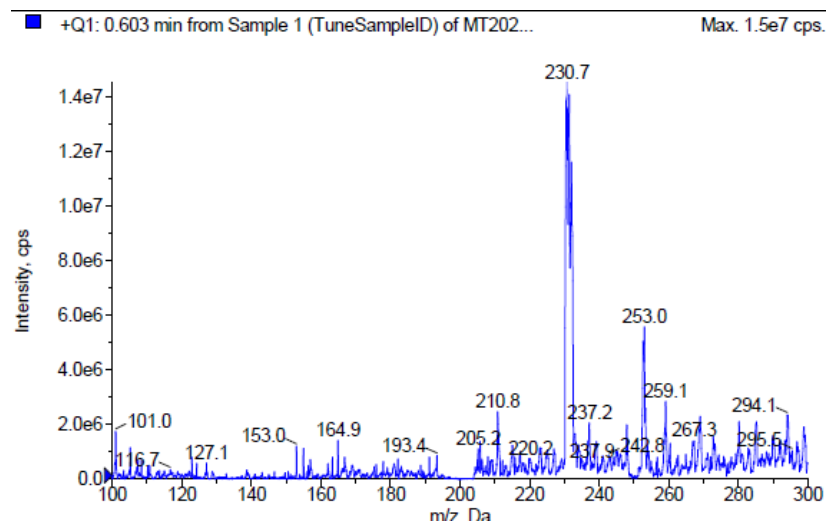
Espectro de masa del compuesto **18d**



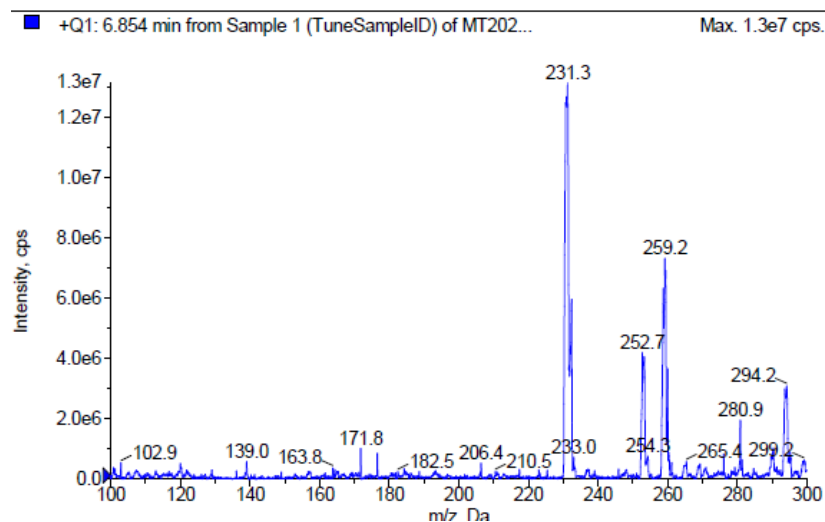
Espectro de masa del compuesto **18e**



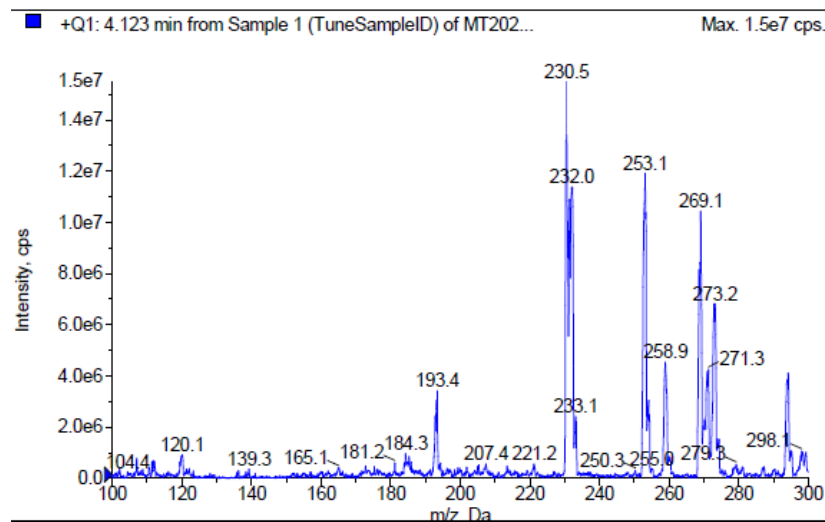
Espectro de masa del compuesto **18f**



Espectro de masa del compuesto **18g**

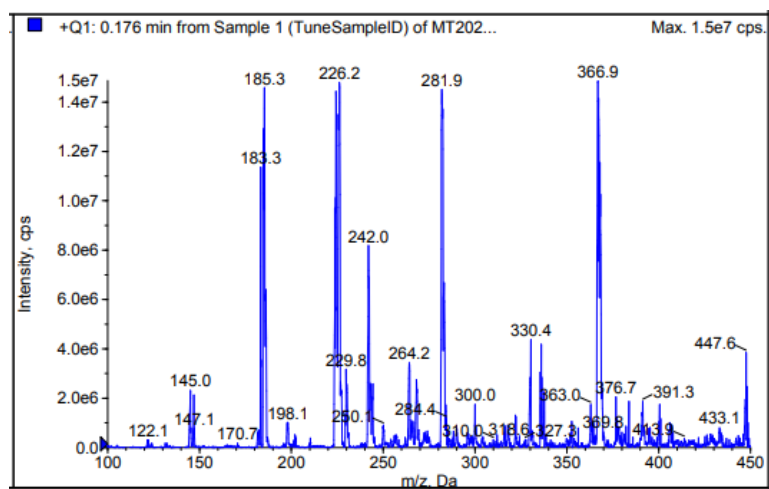


Espectro de masa del compuesto **18h**



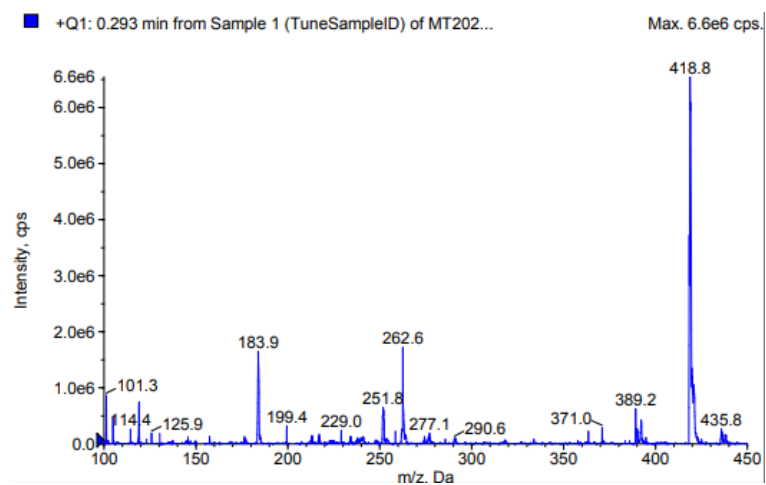
8.2.15 Espectros de masa del derivado 20

Espectro de masa del compuesto **20**

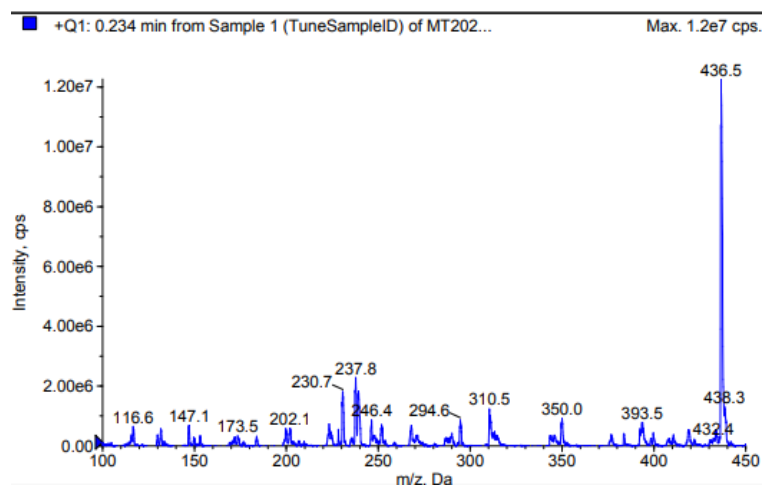


8.2.16 Espectro de masa de los derivados 21a-21h

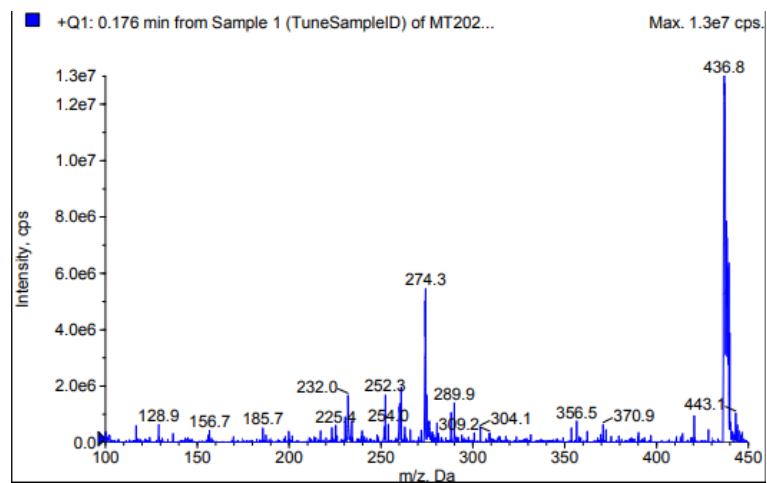
Espectro de masa del compuesto **21a**



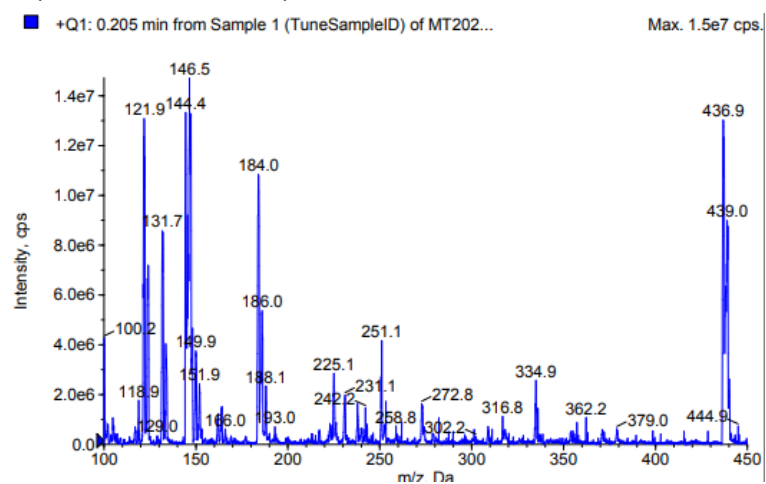
Espectro de masa del compuesto **21b**



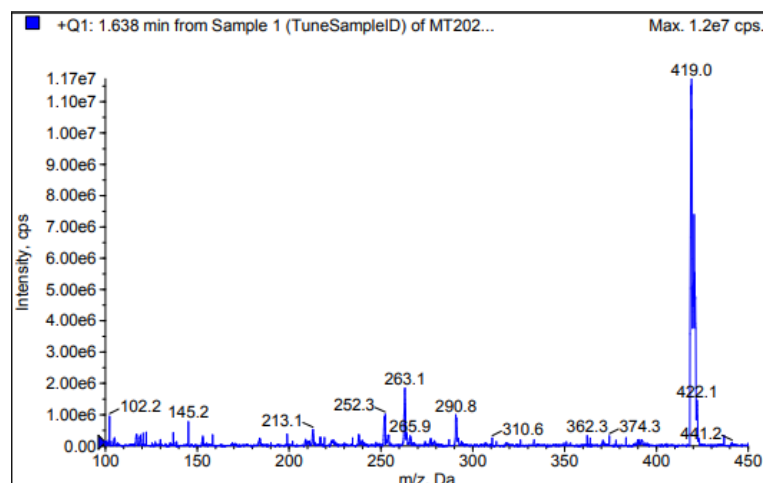
Espectro de masa del compuesto **21c**



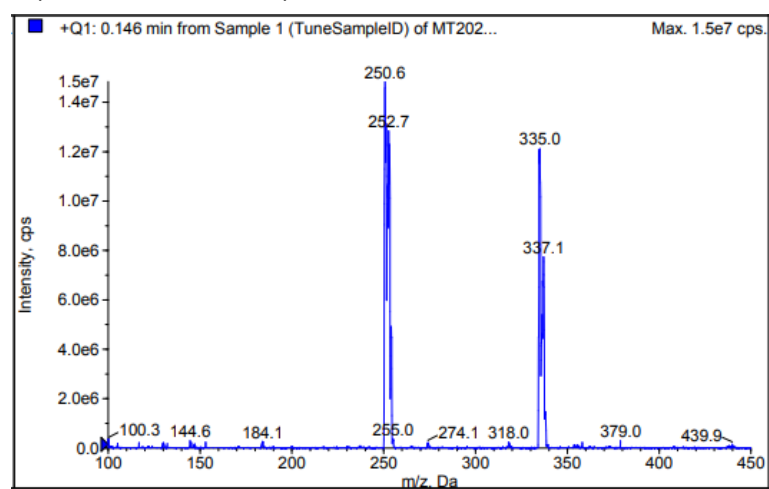
Espectro de masa del compuesto **21d**



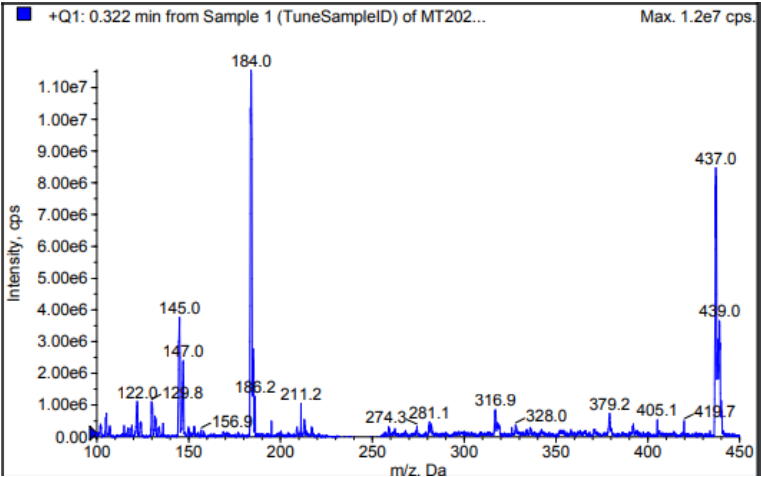
Espectro de masa del compuesto **21e**



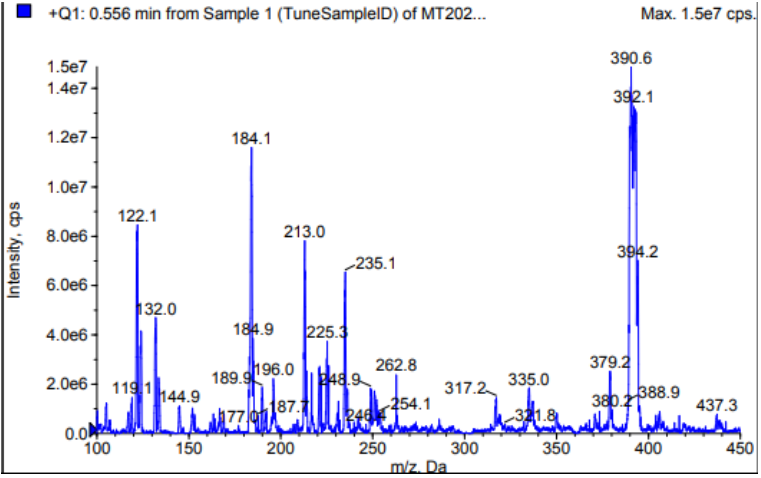
Espectro de masa del compuesto **21f**



Espectro de masa del compuesto **21g**

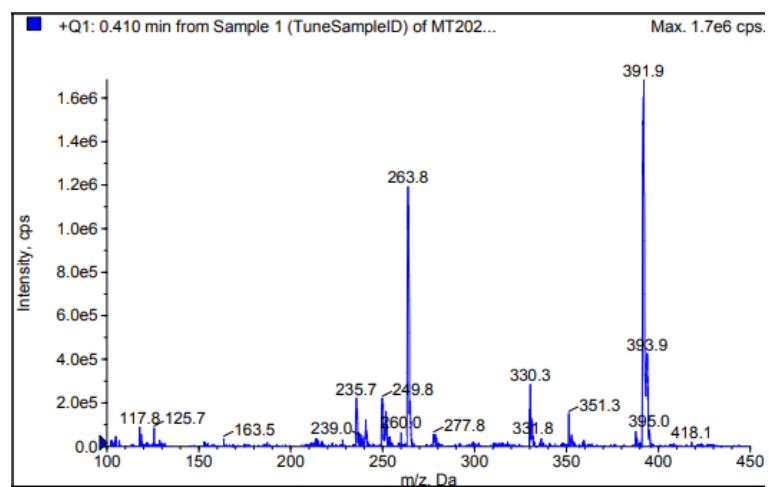


Espectro de masa del compuesto **21h**

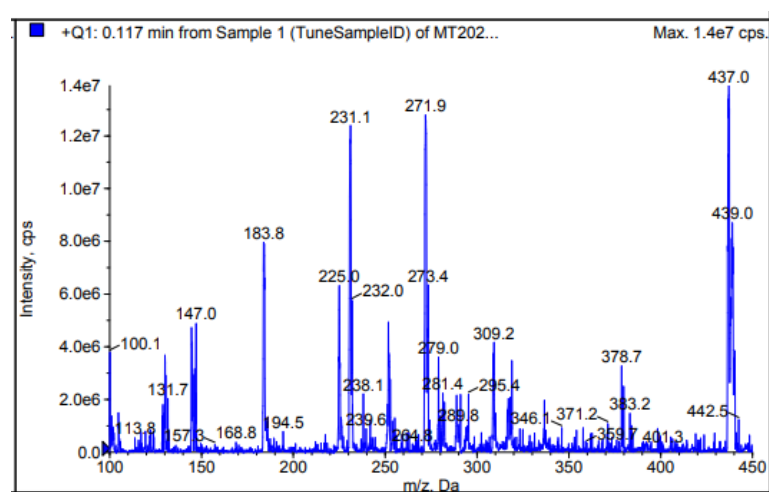


8.2.17 Espectro de masa de los derivados 22a-22e

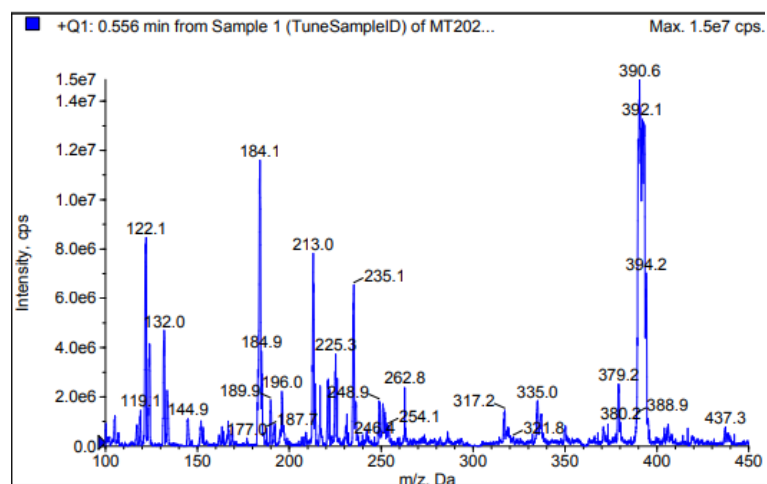
Espectro de masa del compuesto **22a**



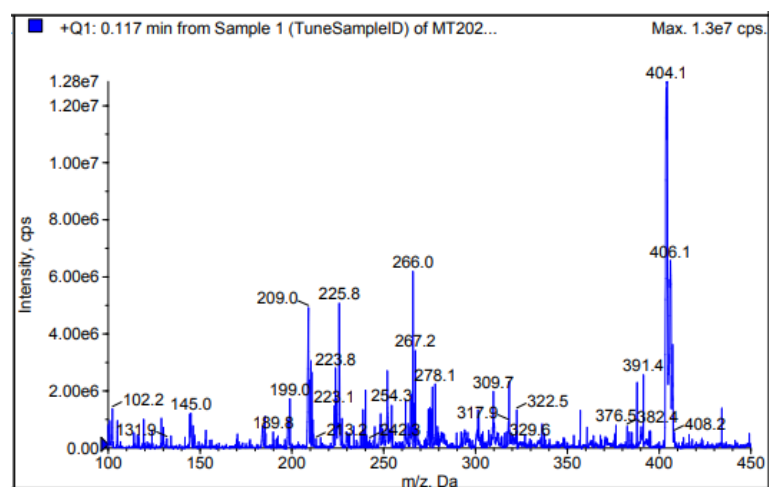
Espectro de masa del compuesto **22b**



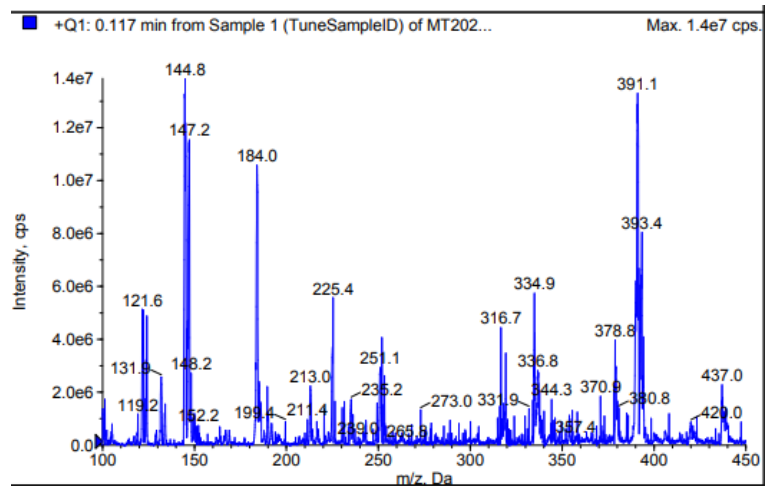
Espectro de masa del compuesto **22c**



Espectro de masa del compuesto **22d**



Espectro de masa del compuesto **22e**



8.3 Procedimientos bio-informaticos

8.3.1 3D-QSAR

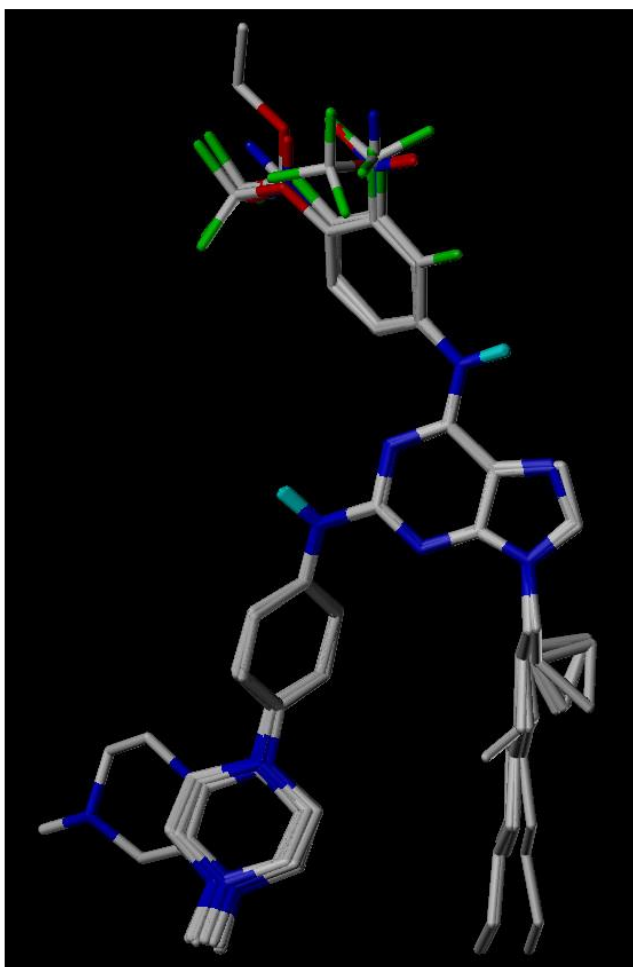


Figura S1: Estructuras superpuestas de todos los compuestos usados para el modelo CoMFA.

Tabla S1. Parámetros estadísticos para análisis CoMMFA en Bcr-Abl y BTK.

CoMFA	N	SEE	r ²	F	q ²	r ² _{test}	S	E
Bcr-Abl	5	0.40	0.90	34.82	0.90	0.885	0.61	0.38
BTK		2	2	9	1		5	5

^aN = El número óptimo de componentes; SEE es el error estándar de estimación del análisis no-CV; r²_{nvc} es el cuadrado del coeficiente no-CV; F es el valor de la prueba F; q² = el cuadrado del coeficiente de validación cruzada (CV) LOO; r²_{test} = el coeficiente de regresión para el conjunto de prueba; S, y E, son las contribuciones estérica y electrostática, respectivamente.

Tabla S2. Resumen de parámetros de validación externa para modelos CoMFA.

Condición	Parametros	Valor limite	Bcr-Abl	BTK
1	q ²	> 0,5	0,901	0,874
2	r ²	> 0,6	0,885	0,625
3a	r ² ₀	Cerca de valor de r ²	0,999	0,999
3b	r' ² ₀	Cerca de valor de r ²	0,999	0,999
4a	k	0,84 < k < 1,15	1,019	0,949
4b	k'	0,84 < k' < 1,15	0,980	1,053

q² es el mismo parámetro que se enumera en la tabla S2; r² es el coeficiente de regresión para el conjunto de prueba; r₀² y k son el coeficiente de correlación entre las actividades experimentales y predichas para el conjunto de prueba y la respectiva pendiente de regresión; y r'₀² y k' son el coeficiente de correlación entre las actividades previstas y experimentales para el conjunto de prueba y la respectiva pendiente de regresión.

CoMFA ABL				CoMFA BTK		
Molécula						
	Experim ental	Predicci ón	Resi du al	Experim ental	Predic ción	Resi du al
	pIC ₅₀	pIC ₅₀		pIC ₅₀	pIC ₅₀	
1	5.3774	5.797	-0.419	4.8328	5.088	-0.256
2	7.1427	7.064	0.079	5.8459	6.03	-0.184
3	6.983	6.802	0.181	5.8877	5.631	0.257
4	6.9066	6.593	0.314	5.8943	5.569	0.325
5	5.7508	6.115	-0.364	4.6445	4.716	-0.072
6	5.9402	5.781	0.16	5.3854	5.292	0.094
7	6.7761	6.477	0.299	5.8668	5.583	0.283
8	6.4067	6.59	-0.18	6.2192	6.169	0.05
9	6.89	6.991	-0.101	6.0276	6.177	-0.149
10	7.0047	7.211	-0.206	6.040	6.071	-0.031
11	6.8788	6.795	0.084	5.9359	5.776	0.16
12	6.5662	6.742	-0.176	5.6211	5.595	0.026
13	6.3951	6.905	-0.51	5.4089	5.731	-0.322
14	6.699	6.183	0.516	6.0577	5.858	0.2
15	6.3612	6.935	-0.57	5.2983	5.372	-0.073
16	5.9169	6.181	-0.264	5.2213	5.487	-0.266
17	6.246	5.964	0.282	5.7637	5.566	0.198
18	6.0259	6.05	-0.02	5.5634	5.491	0.073
19	4.0733	4.149	-0.076	6.2364	6.056	0.181
20	4.000	3.946	0.054	6.0121	5.926	0.086
21	4.301	5.084	-0.783	5.423	5.636	-0.213
22	5.911	5.941	-0.03	6.3747	5.853	0.52
23	5.7501	5.249	0.501	5.6533	5.444	0.209
24	5.8667	5.858	0.01	6.0313	6.045	-0.014
25	5.008	4.802	0.206	6.0388	6.228	-0.189
26	4.000	4.151	-0.151	6.3915	5.96	0.43
27	4.4689	4.357	0.112	6.3391	6.369	-0.03
28	4.000	4.643	-0.643	6.4942	6.448	0.046
29	6.1898	5.744	0.446	6.4455	6.001	0.44
30	5.6426	5.237	0.406	5.724	5.675	0.05
31	4.2057	3.992	0.214	4.699	4.677	0.022

^aCompuestos de prueba están en cursiva.

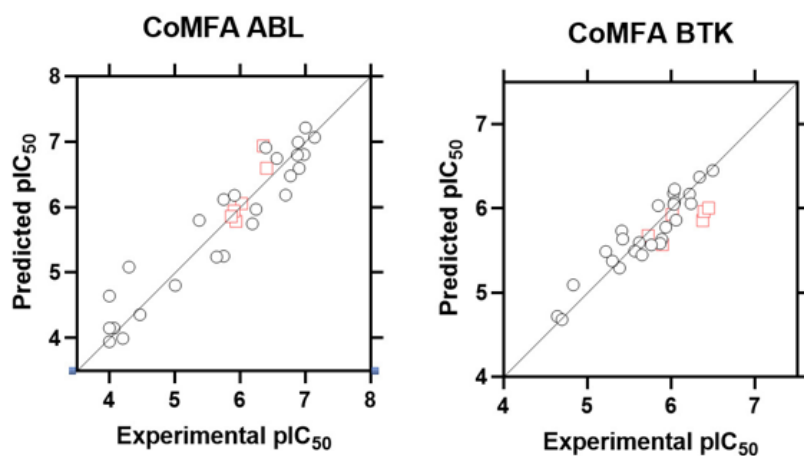


Figura S2. Gráficos de pIC₅₀ experimental frente a pIC₅₀ previsto para CoMFA en Bcr-Abl y BTK. En círculos negros el conjunto de entrenamiento. En cuadrados rojos el conjunto de prueba.

8.4 Protocolo de acoplamiento molecular

8.4.1 Preparación del ligando co-cristalizado

Para los estudios de acoplamiento, la molécula (compuestos inhibidores) que se cocrystalizó con las quinasas se extrajo y preparó para el acoplamiento mediante la adición de átomos de hidrógeno, la protonación de la amina de las piperazinas y la adición de cargas mediante la herramienta LigPrep implementada en el software Schrödinger (versión 2021-1).¹

8.4.2 Preparación de los ligandos sintetizados

Los ligandos sintetizados se modelaron con el software Maestro, se agregaron los hidrógenos y se asignaron cargas parciales utilizando el campo de fuerza OPLS4 con la herramienta LigPrep.¹ Luego, se generó el estado de ionización con el módulo Epik.¹

8.4.3 Preparación de la proteína

Todas las quinasas cristalinas se importaron al software Maestro desde la base de datos PDB (www.rcsb.org (consultado el 5 de marzo de 2021)). Para cada complejo cristalino, se eliminaron todas las moléculas de agua, sal y disolvente orgánico. Posteriormente, se utilizó el software Protein Preparation Wizard de Schrödinger para más preparaciones de las proteínas.¹ A continuación, se asignaron órdenes de enlace y se agregaron átomos de hidrógeno; además, se optimizó la red de enlaces de hidrógeno y se determinó el estado de protonación de la proteína a pH 7,0 utilizando el módulo PROPKA. Finalmente, se llevó a cabo un paso de minimización de energía restringida usando el campo de fuerza OPLS4 para cada sistema.¹

8.4.4 Preparación de la grilla y el acoplamiento molecular

La grilla para cada estructura de proteína se generó utilizando el módulo Receptor Grid Generation implementado en Schrödinger Suite. En este paso, el centro del ligando co-cristalizado para cada estructura cristalina correspondía al centroide de la caja de cuadrícula. A continuación, se calculó el acoplamiento molecular utilizando Glide en el modo de precisión estándar (puntuación SP) volviendo a acoplar el ligando co-cristalizado con el sitio de unión de su proteína cristalizada. Finalmente, las mejores poses se filtraron con modo de precisión extra (XP-score) donde el mejor resultado fue el más cercano a la pose del ligando cocrystalizado.²

Se añadió un paso adicional a los ligandos sintetizados (**10i** y **12j**). Las mejores poses con puntaje XP se refinaron con el método MM-GBSA, considerando la flexibilidad de los aminoácidos cercanos de las poses de ligandos acoplados a una distancia de 6 Å (**Figura S3**).

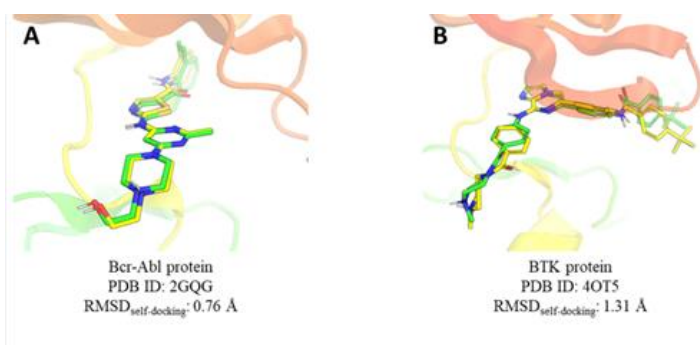


Figura S3. Los ligandos co-cristalizados con su modo de unión determinado experimentalmente se muestran en verde, mientras que la posición de acoplamiento de los ligandos de nuestro protocolo de acoplamiento automático se muestra en amarillo.

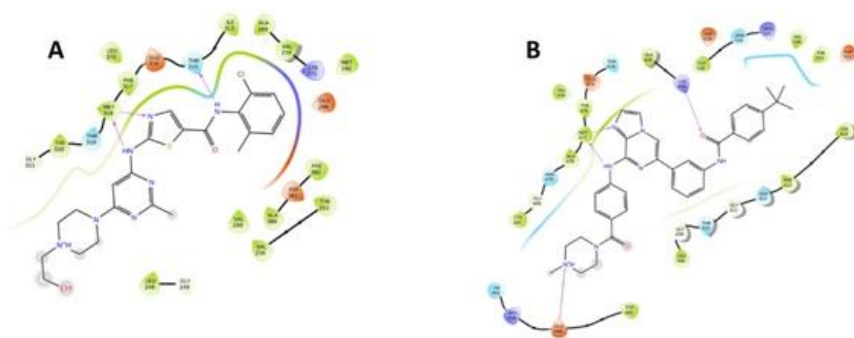


Figura S4. Esquemas de las interacciones esenciales reproducidas por las poses de acoplamiento. Los puentes de hidrógeno importantes son con los aminoácidos M318 y M477 para Abl (A) y BTK (B), respectivamente.

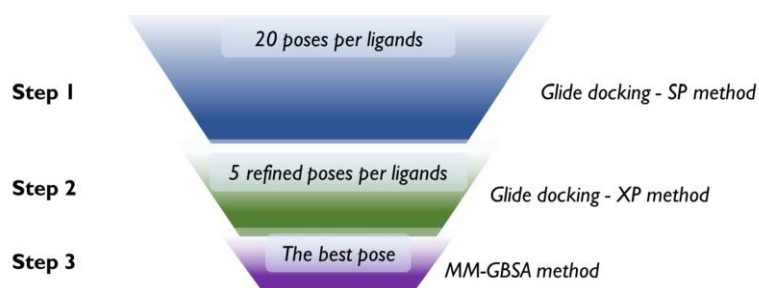


Figura S5. Protocolo de acoplamiento molecular para los ligandos sintetizados.

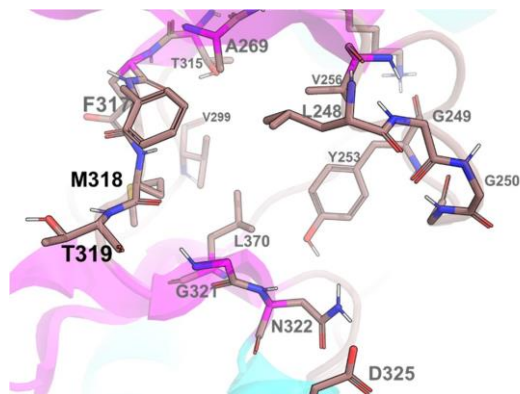


Figura S6. Representación gráfica del sitio activo de Bcr-Abl

Tabla S4. Principales aportes energéticos por residuos en el sitio activo de Bcr-Abl con los ligandos sintetizados.

Valor XP y Puente de hidrogeno (P.D.H). Contribución de energías Van der Waals.

Comp.	Valor XP (kcal/mol)	Valor P.D.H (kcal/mol)	L248	G249	A250	Y253	V256
10i	-8.51	-1.61	-5.32	-2.14	-0.37	-4.30	-2.91
12j	-5.63	-1.00	-4.97	-1.81	-0.28	-2.72	-2.01

Comp.	Valor XP (kcal/mol)	Valor P.D.H (kcal/mol)	A269	F317	T319	L370	G321
10i	-8.51	-1.61	-0.97	0.64	-2.18	-2.30	-2.52
12j	-5.63	-1.00	-1.43	-2.95	-2.72	-2.26	-2.49

Comp.	Valor XP (kcal/mol)	Valor P.D.H (kcal/mol)	N322	D325
10i	-8.51	-1.61	-2.34	-0.41
12j	-5.63	-1.00	-1.32	-0.13

Tabla S5. Primer calculo MM-GBSA de los complejos acoplados

Comp.	ΔG Bind	ΔG Coul.	ΔG H-bond	ΔG Lipo	ΔG Solv GB	ΔG vdW
10i	-74.52	-45.32	0.37	-24.02	50.1	-54.57
12j	-58.47	-37.74	0.71	-32.41	59.61	-50.57

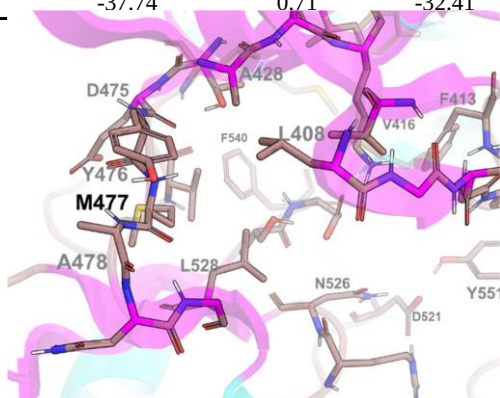


Figure S7. Representación gráfica del sitio activo de BTK.

Table S6. Principales aportes energéticos por residuos en el sitio activo de BTK con los ligandos sintetizados.

Valor XP P.d.H Contribución de energias van der Waals

(kcal/mol)

Comp.	(kcal/mol)	M477	L408	F413	V416	A428	Y476	A478	D521	N526	L528	F540	L542	Y551
10i	-6.82	-0.60	-6.22	-1.19	-4.18	-2.65	-3.57	-1.80	-0.71	-2.41	-4.20	-0.12	-0.27	-0.86
12j	-6.01	-0.76	-5.85	-1.27	-3.50	-1.63	-3.36	-1.70	-0.80	-2.66	-4.78	-2.26	-1.72	-1.08

Table S7. Primer calculo MM-GBSA de los complejos acoplados (ligando-BTK).

Comp.	ΔG Bind	ΔG Coul.	ΔG H.-bond	ΔG Lipo	ΔG Solv GB	ΔG vdW
10i	-73.37	-31.75	-0.63	-20.4	41.58	-66.42
12j	-86.08	-33.12	-1.00	-27.66	45.3	-74.19

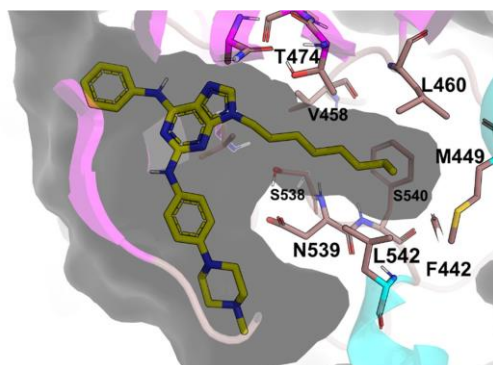


Figura S8. Representación gráfica del bolsillo hidrofóbico de la proteína BTK y estructura **12j** en amarillo.

Tabla S8. Principales aportes energéticos por residuos del bolsillo hidrofóbico de BTK con ligandos sintetizados.

Contribuciones Van der Waals (kcal/mol)

Comp.	T474	V458	L460	M449	F442	N539	S538	F540	L542
10i	-2.32	-1.25	-0.13	-0.02	-0.02	-2.87	-0.98	-0.12	-0.27
12j	-2.62	-2.41	-1.70	-0.87	-0.12	-4.82	-2.30	-2.26	-1.72

ΔG Bind: MM-GBSA free energy of binding.

ΔG Coul: Coulomb energy of the complex.

ΔG H.-bond: Hydrogen-bonding energy correction of the complex.

ΔG Solv GB: Generalized Born electrostatic solvation energy of the complex.

ΔG Lipo: Lipophilic energy of the complex.

ΔG vdW: van der Waals energy of the complex.



FACULTAD DE QUÍMICA
Y DE FARMACIA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

8.5 Referencias de anexo

- (1) Schrödinger Release 2021-1: Protein Preparation Wizard; Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
- (2) Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T.A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (21), 6177–6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>.