

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 496 946**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/213** (2006.01)

**A61K 31/7076** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2005 E 05755520 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 1765844**

54 Título: **Derivados de nucleótidos de purina**

30 Prioridad:

**18.06.2004 GB 0413726**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**22.09.2014**

73 Titular/es:

**SOLVELL AS (100.0%)  
Ivar Aasens vei 11  
0373 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**UNDHEIM, KJELL;  
TASKÉN, KJETIL;  
KLAVENESS, JO;  
LANGLI, GEIR y  
BJØRNSTAD, VIDAR**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 496 946 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Derivados de nucleótidos de purina

La invención se refiere nuevos derivados de nucleótidos de purina, a procesos para su preparación, a productos intermedios en su preparación, a composiciones que los contienen, a su uso en medicina y diagnóstico y a métodos de tratamiento y métodos de ensayo que los usan uso, en particular donde el derivado de nucleótido de purina es un fosforotioato monofosfato cíclico de purina sustituido en el carbono 8 del anillo de purina por un sustituyente unido a carbono.

Los monofosfatos cíclicos de purina de origen natural, adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc), son moléculas mensajeras importantes que median los efectos sobre la función celular de hormonas. Por ejemplo, el documento WO 03/104250 desvela el uso de análogos de AMPc en los que en la posición 8 hay N, O S para modificar la actividad de las Epacs (proteínas de intercambio activadas directamente por AMPc).

Se ha propuesto poder usar análogos de dichos nucleótidos cíclicos en el tratamiento de patologías asociadas con función inmunitaria reducida o potenciada. Por tanto un análogo de este tipo es el adenosín monofosforotioato cíclico (AMPSc), o más exactamente adenosín 3',5'- monofosforotioato cíclico, en el que uno de los oxígenos que cuelga del átomo de fósforo se reemplaza por un azufre. Como resultado, el fósforo es un centro quiral y en la configuración Rp (en el átomo de fósforo) el AMPSc es un antagonista de AMPc mientras que en la configuración Sp (en el átomo de fósforo) es un agonista de AMPc. El uso de AMPSc en la configuración Rp como antagonista de AMPc como parte de un tratamiento del VIH se ha propuesto, por ejemplo, en el documento WO98/48809 y el uso de AMPSc como inhibidor de crecimiento neoplásico se ha propuesto en el documento US-A-5843916.

El documento WO98/48809 sugiere en particular el uso de antagonistas de AMPc que inhiben la actividad de la enzima proteína quinasa I (PKAI) dependiente de AMPc y en este sentido sugirió el uso de AMPSc en configuración Rp sustituido por un heteroátomo (por ejemplo, Br o Cl) en el carbono 8 del anillo de purina o por un grupo unido a heteroátomo (por ejemplo, piperidina). Además, Gjertsen et al en J. Biol. Chem. 270;20599- 20607 (1995) demostraron que el AMPSc-Rp 8-cloro y 8-bromo tenían mayor actividad agonista con respecto a la PKAI que el AMPSc-Rp no sustituido en posición 8.

En el comercio de Biolog-Life Science Institute of Bremen, Alemania, se dispone de diversos AMPSc sustituidos en posición 8, en particular Rp-8-Br-AMPSc, Rp-8-Br-MB-AMPSc (MB es un sustituyente monobutirilo en la posición 2' del anillo de ribosa), Rp-8-Cl-AMPSc, Rp-8-CPT-AMPSc (donde CPT = 4-clorofeniltio), Rp-8-HA-AMPSc (donde HA = hexilamino), Rp-8-OH-AMPSc, Rp-8-PIP-AMPSc (donde PIP = piperidino), Rp-8-AEA-AMPSc (donde AEA = 2-aminoetilamino), Rp-8-AHA-AMPSc (donde AHA = 6-aminohexilamino), Rp-8-n3-AMPSc (donde N<sub>3</sub> = azido), y Rp-8-I-AMPSc. Biolog también ofrece compuestos AMPSc en configuración Sp pero de nuevo todos ellos están o no sustituidos en la posición 8 por un heteroátomo o grupo unido a heteroátomo.

El presente tratamiento de infección por VIH es un fuerte cóctel de fármacos contra el VIH; terapia antirretroviral altamente activa (TARAA). La TARAA incluye inhibidores de proteasa y análogos de nucleósidos y no nucleósidos que dirigen el virus y es el componente principal en el tratamiento de pacientes infectados por el VIH. Sin embargo, aunque la TARAA prolonga significativamente la vida de los pacientes infectados por VIH deteniendo el desarrollo del SIDA, la función deteriorada de linfocitos T parece persistir. De hecho, durante la TARAA, se ha observado que la respuesta inmunitaria específica del VIH disminuye en lugar de aumentar. Adicionalmente, la TARAA no erradica el virus, los pacientes presentan recaída virológica después de la retirada del tratamiento y en algunos pacientes el virus desarrolla resistencia al tratamiento. Además, una gran cantidad de pacientes desarrollan intolerancia a los presentes fármacos posiblemente con graves acontecimientos adversos.

Por tanto, hay una necesidad cada vez más reconocida de otras modalidades de tratamiento. El tratamiento basado en inmunomodulación que puede mejorar la función del sistema inmunitario un tanto "destruido" de pacientes infectados por VIH podría hacer que el sistema inmunitario fuese competente expulsando el virus de sus reservas y podría ser una importante terapia adyuvante en pacientes infectados por VIH. Niveles elevados de AMPc y por tanto activación aumentada de PKA de tipo I inhibe significativamente la proliferación de linfocitos T de individuos infectados por VIH independientemente de la TARAA en curso. El uso de un antagonista selectivo de PKA de tipo I mejora la proliferación deteriorada de linfocitos T de pacientes infectados por VIH hasta un 300%. Las observaciones descritas anteriormente sugieren que la PKA de tipo I es una posible diana para terapia inmunomoduladora. Los antagonistas selectivos de PKA de tipo I tales como Rp-8-Br-AMPSc ofrecen una posibilidad para invertir la activación inapropiada de la PKA de tipo I en inmunodeficiencias y por lo tanto restablecen la función de linfocitos T y la sensibilidad inmunitaria. Se ha mostrado que la mayoría de los isómeros AMPSc en configuración Rp actúan como antagonistas de PKA uniéndose competitivamente a los sitios de unión del AMPc de la subunidad R, pero no disocian y activan la enzima.

Adicionalmente, la caracterización de derivados de Rp-AMPSc ha mostrado que algunos compuestos (por ejemplo, Rp-8-Br-AMPSc) actúan como antagonistas selectivos y completos de la isoenzima PKA de tipo I y como agonistas parciales de la isoenzima PKA de tipo II. La mayoría de células y tejidos contienen cantidades altamente significativas de PKA de tipo II ancladas en diversos sitios subcelulares e implicadas en la mediación de una gran cantidad de efectos inducidos por AMPc.

En cambio, aunque la PKA de tipo I está también ampliamente distribuida, se ha observado que es principalmente necesaria y suficiente para la regulación de la función de células inmunitarias. Esto ofrece alguna selectividad tisular/celular, lo que podría favorecer un posible tratamiento basado en un antagonista selectivo de PKA de tipo I.

5 A pesar de que la PKA de tipo I es una interesante diana farmacológica, no se dispone de antagonistas de AMPc farmacéuticamente aceptables. El desarrollo de fármacos inmunoestimuladores que interfieren con la acción del AMPc mejorara la función inmunitaria de linfocitos T y puede llevarse a ensayo preclínico desarrollando antagonistas de AMPc selectivos de PKA de tipo I que contrarresten la acción del AMPc. Los objetivos específicos de la investigación realizada fueron el desarrollo de dichos compuestos y el desarrollo de métodos y modelos de evaluación de compuestos como fármacos inmunomoduladores que invierten la inmunodeficiencia en el VIH.

10 De manera sorprendente se ha descubierto ahora que la afinidad particularmente alta de PKAI (o más exactamente PKA RI $\alpha$ ), es decir, agonismo de AMPc y más especialmente antagonismo, puede realizarse usando AMPSc en el que el carbono 8 de purina está sustituido por un grupo carbilo, es decir, un grupo unido a carbono.

De esta manera, vista desde un aspecto, la invención proporciona un compuesto adenosín 3',5'-monotiofosforotioato cíclico en la configuración Rp, en el que el sustituyente 8 se selecciona entre:

15 - un grupo aralquilo, alcarilo, alquilo, alquilo cíclico, alquenilo o alquinilo unido opcionalmente mediante un grupo carbonilo o tiocarbonilo y opcionalmente sustituido con grupos acilo, halo, hidroxilo, tior, amino, carboxi (u otro oxiácido), ciano, azido, alcoxi, éster, éter o alquiltio, en los que dicho grupos alquilo o análogos insaturados de los mismos contienen hasta 10 átomos de carbono;

20 - grupos arilo opcionalmente sustituidos, tales como benceno, naftaleno y sistemas carboxílicos anulados, y sistemas heterocíclicos anulados incluyendo piridina, di- y triazinas, furano, tiofeno y pirrol, y los azoles, y triazoles, y oxa- y tiadiazoles, y tetrazoles; y

25 - grupos heteroarilo, tales como las azinas de anillo de seis miembros, piridina, las diazinas, triazinas y sistemas carbocíclicos anulados, y sistemas heterocíclicos anulados como se ha definido anteriormente, y sistemas de anillo de cinco miembros, tales como furano, tiofeno y pirrol, los azoles y triazoles, y oxa- y tiadiazoles y tetrazoles y sistemas heterocíclicos y carbocíclicos anulados.

30 Mediante el término derivado en el presente contexto, se hace referencia a un compuesto que está modificado químicamente pero conserva la capacidad de ejercer la actividad de las AMPSc 8 sustituidas en uso, por ejemplo una forma de sal, éster, profármaco (es decir bioprecursor), etc. Cuando el derivado contiene o genera al usarse un componente separado de las AMPSc 8 sustituidas, por ejemplo, un contraión o un grupo protector escindible, preferiblemente este componente es fisiológicamente tolerable.

35 El sustituyente 8, que como se ha indicado se necesita que esté unido en la posición 8 en el anillo adenina mediante un enlace carbono-carbono, puede contener típicamente hasta 25 átomos distintos de hidrógeno, más preferiblemente hasta 20, especialmente hasta 15, particularmente hasta 10. Estos átomos distintos de hidrógeno incluyen al menos un carbono y pueden ser todos carbono; si embargo, preferiblemente al menos uno, por ejemplo hasta 6, de los átomos distintos de hidrógeno pueden ser heteroátomos, por ejemplo halógeno, oxígeno, azufre, nitrógeno o fósforo, especialmente O, N o S. El sustituyente 8 puede ser lineal, ramificado o cíclico o una combinación de dos o más de los mismos y puede ser saturado o insaturado. Especial y preferiblemente, el sustituyente es o contiene un grupo cíclico, en particular un grupo arilo homo o heterocíclico, conteniendo por ejemplo de 5 a 10 átomos en el anillo, de la manera más particular un grupo heteroarilo que contiene 5 átomos en el anillo o un grupo fenilo. En cualquiera de dichos sustituyentes, grupos alquilo o análogos insaturados de los mismos contienen preferiblemente hasta 6 carbonos.

40 Los ejemplos de sustituyentes 8 típicos de acuerdo con la invención incluyen grupos arilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos, por ejemplo, sustituidos con

(i) OR<sup>1</sup>, donde R<sup>1</sup> = H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, grupos arilo o heteroarilo y derivados opcionalmente sustituidos de los mismos,

45 (ii) SR<sup>1</sup>, SOR<sup>1</sup> y SO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, donde R<sup>1</sup> es como se ha definido anteriormente,

(iii) NR<sup>1</sup>R<sup>1</sup> donde cada R<sup>1</sup>, que pueden ser igual o diferente, es como se ha definido anteriormente,

(iv) halógeno,

(v) CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, COR<sup>1</sup> o CONR<sup>1</sup>R<sup>1</sup>, donde cada R<sup>1</sup>, que pueden ser igual o diferente, es como se ha definido anteriormente y

50 (vi) grupos arilo y heteroarilo adicionalmente sustituidos opcionalmente;

derivados carbonilo, tiocarbonilo, iminocarbonilo y ciano, tales como CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, COR<sup>1</sup>, CONR<sup>1</sup>R<sup>1</sup>, C(NR<sup>1</sup>)NR<sup>1</sup>R<sup>1</sup>, CSNR<sup>1</sup>R<sup>1</sup> y CN, donde cada R<sup>1</sup>, que puede ser igual o diferente, es como se ha definido anteriormente; y sustituyentes de carbono no aromáticos que están opcionalmente sustituidos, tales como

alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>,

alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>,

alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, por ejemplo donde la sustitución opcional implica

(a) inserción de dobles y triples enlaces adicionales en grupos alquenilo o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>

5 (b) inserción de grupos oxo para formar cetonas o aldehídos

(c) sustitución con sustituyentes arilo y heteroarilo, sustituidos ellos mismos opcionalmente con halógeno (por ejemplo, F y/o Cl), OR<sup>1</sup>, SR<sup>1</sup>, S-óxidos (por ejemplo, SOR<sup>1</sup> y SO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>), NR<sup>1</sup>R<sup>1</sup>, CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup> o CONR<sup>1</sup>R<sup>1</sup>, donde cada R<sup>1</sup>, que puede ser igual o diferente, es como se ha definido anteriormente.

Los sustituyentes 8 particularmente preferidos incluyen grupos fenilo, furilo y tienilo, especialmente grupos 2-furilo.

10 Cuando el sustituyente 8 es un grupo arilo, este puede, si se desea, estar sustituido con uno o más grupos polares, por ejemplo OR<sup>1</sup>, SR<sup>1</sup>, SOR<sup>1</sup>, SO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, NR<sup>1</sup><sub>2</sub>, halógeno, CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, COR<sup>1</sup>, CONR<sup>1</sup>R<sup>1</sup>, NO<sub>2</sub>, P(OR<sup>1</sup>)<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>OR<sup>1</sup>.

En los AMPSc sustituidos con 8-carbilo de la invención, otras posiciones esqueléticas también pueden, si se desea, estar sustituidas por ejemplo el 2'-oxígeno, el nitrógeno del grupo 6-amino y los oxígenos y azufres pendientes del átomo fosforoso cíclico. A este respecto, los sustituyentes pueden ser sustituyentes como se han definido  
15 anteriormente para la posición 8 o, por ejemplo, sustituyentes conocidos en conjunto con AMPc y AMPSc (por ejemplo, acilo, alquilcarbonilo, arilo, etc.). Se prefiere especialmente la sustitución de sililo del oxígeno 2' en compuestos de acuerdo con la invención que son versiones 2'-protegidas de compuestos activos.

Con la excepción de sustituciones para producir un profármaco, los compuestos de acuerdo con la invención se usan de manera deseable en una forma en la que únicamente está sustituida la posición 8. Sin embargo, se prefieren  
20 particularmente formas de profármaco en las que el oxígeno o azufre pendiente de fósforo está sustituido de manera que enmascara la acidez del grupo fosforoso cíclico. Por tanto, por ejemplo, dichos profármacos están típicamente S-alquilados. Aunque la S-alquilación es una opción preferida, típicamente el grupo introducido puede ser un grupo éster o tioéster (es decir, R-CS-S-R-, R-CO-S-R- o R-CS-O-R-) unido directa o indirectamente a un grupo metileno unido al azufre del ácido fosforotioico. En el caso de una unión indirecta, el engarce contiene preferiblemente una  
25 estructura de electrón deslocalizado, de manera que la escisión del (tio)éster desencadena la desprotección (por ejemplo, usando un grupo protector P-acil-bencilo como en el Esquema 2b más adelante). Como alternativa, pueden usarse formas de profármaco en las que el grupo amino en la posición 6 del anillo adenina o del grupo hidroxilo en el anillo furilo está protegida con un eliminable tras la administración, por ejemplo un grupo protector de éster o éster doble. De manera análoga, el grupo 6-amino puede estar N-protegido con un grupo aciloxialquilo, tal como  
30 pivaliloximetilo o por un grupo alquiloximetilo. En general, en la producción de dichos profármacos, la protección de amina o hidroxilo puede realizarse tanto antes como después la tación, dependiendo de la naturaleza de los grupos protectores de O y N.

Cuando los procesos de preparación requieren la separación de los isómeros Rp y Sp, por ejemplo por cromatografía o  
35 cristalización, pueden ser especialmente útiles compuestos sustituidos en el oxígeno o azufre pendiente de fósforo. De forma similar, pueden preferirse particularmente como intermedios para facilitar la purificación, compuestos en los que la posición 2' está sililada.

A continuación, se describen con particular detalle cuatro esquemas de proceso mediante los que pueden prepararse los compuestos 8-carbilo sustituidos de la invención. En el primero, un fosforamidoato 3'5'-cíclico 8-halogenado se  
40 8-carbonila, después de lo cual el nitrógeno unido al fósforo se reemplaza por azufre en una reacción que conserva la configuración del fósforo quiral; en el segundo y el tercero, una adenosina se 8-carbamoila, después de lo cual se introduce el grupo fosforoso cíclico; y en el cuarto, un 8-halo-AMPSc se 8-carbamoila. El primer y segundo esquemas de proceso se prefieren por razones de flexibilidad (y conservación de la estereoquímica) en el caso del primero y de economía en el caso del segundo. Todos estos esquemas de proceso forman un aspecto adicional de la invención. Visto desde este aspecto, la invención proporciona un proceso para la preparación de un AMPSc 8-carbamoilado  
45 como se ha descrito anteriormente, comprendiendo dicho proceso al menos una de las siguientes etapas:

a) hacer reaccionar adenosín 3',5'-fosforamidoato cíclico 8-carbamoilado 2'-protegido con disulfuro de carbono y desproteger el 2'-hidroxilo;

b) hacer reaccionar una adenosina 8-carbamoilada con SPCl<sub>3</sub> en un disolvente seco;

c) hacer reaccionar una adenosina 8-carbamoilada con un fosfito y a continuación con azufre;

50 d) hacer reaccionar un 8-halo-AMPSc 2'-protegido con un agente de alquilación y, si se requiere, desproteger el 2'-hidroxilo;

e) transformar un AMPSc 8-carbamoilado en una sal del mismo;

- f) hacer reaccionar un AMPSc 8-carbamoilado para efectuar la sustitución de sililo en el oxígeno 2'; y  
 g) separar los isómero  $R_p$  y  $S_p$  de una mezcla isomérica  $R_p/S_p$  de una AMPSc 8-carbamoilado o derivado del mismo.

La carbamoilación en la posición 8 de purina puede realizarse una manera particularmente fácil usando un material funcionalizado en la posición 8. Una funcionalización conveniente en la posición 8 en el heterociclo de purina puede conseguirse mediante la introducción de un átomo de bromo con una bromación simple.

El sustituyente 8-carbilo en los compuestos de la invención puede ser un donador de electrones o un grupo de retirada de electrones según se desee.

La adenosina se broma regioselectivamente en la posición 8 mediante la adición de bromo a una solución acuosa tamponada con NaOAc a temperatura ambiente. El AMPc puede bromarse de una manera similar, pero también está disponible en el mercado. Como alternativa, puede realizarse halogenación en la posición 8 por medio de las especies litiadas correspondientes y la adición de halógeno, en particular se ha usado el método para la bromación y yodación de adenosina. En este caso, el sustrato fue adenosina totalmente protegida con sililo (TBDMS). La litiación en la posición 8 se realizó con nBuLi en condiciones convencionales. Este enfoque puede ofrecer el mejor acceso a derivados de 8-yodo.

Reacciones de carbamoilación:

(i) Tanto a nivel de nucleósido como a nivel de nucleótido cíclico, puede realizarse carbamoilación mediante reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por metal de transición. Los inventores han desarrollado una metodología útil para la preparación de una serie de reacciones catalizadas por paladio.

(ii) A nivel del fosforamidato cíclico intermedio, puede realizarse carbamoilación en la posición 8 de purina mediante reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por metal de transición.

(iii) También puede realizarse carbamoilación a nivel de ácido fofotiónico cíclico. Preferentemente, el ácido fosforotioico existe en forma de un O-éster o un S-éster. Posteriormente, el éster puede escindirarse en el derivado de ácido fosforotioico correspondiente.

En reacciones de acoplamiento cruzado, se ha realizado alquilación simple en condiciones catalíticas de Pd, en reacciones entre 8-Br-adenosina peracetilada y tetraalquil estanoanos. Un método más conveniente para la síntesis de nucleósidos de purina de alquilo inferior está disponible mediante reacción de acoplamiento cruzado catalizada por paladio de nucleósidos de halogenopurina con trialquilaluminios. Se realizaron tanto vinilación como alilación a partir de los estanoanos adecuados usando catalizadores de Pd. La función alquilo se introdujo mediante un derivado de 8-bromo que se acopló con los alquinos terminales usando catalizadores de Pd en presencia de yoduro de Cu (I) en condiciones de Shonogashira.

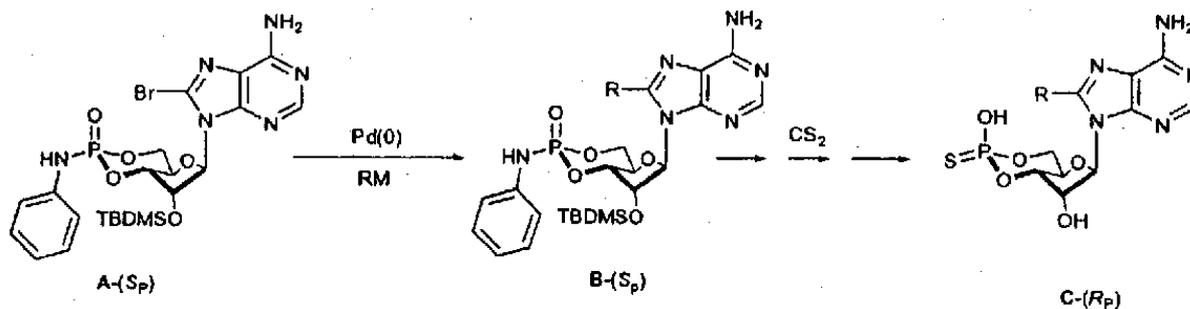
Los siguientes esquemas de reacción son ilustrativos - pueden usarse otros reactivos y productos finales o prepararse de manera análoga.

**Proceso I**

*Intermedios de amidato para tiilación:*

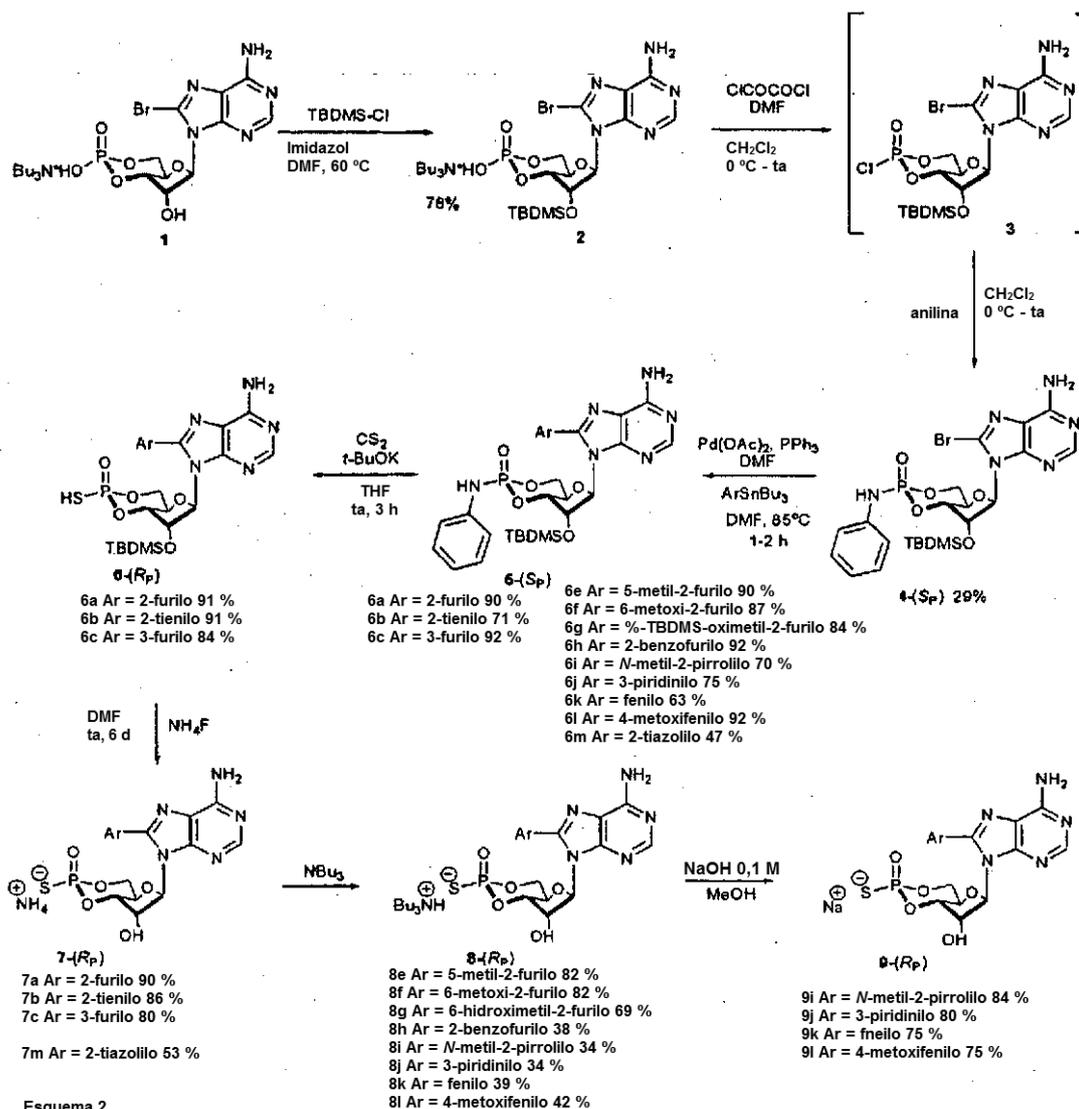
Preparación de ácidos adenosinfosforotioicos ( $R_p$ )-8-sustituídos

Metodología general:

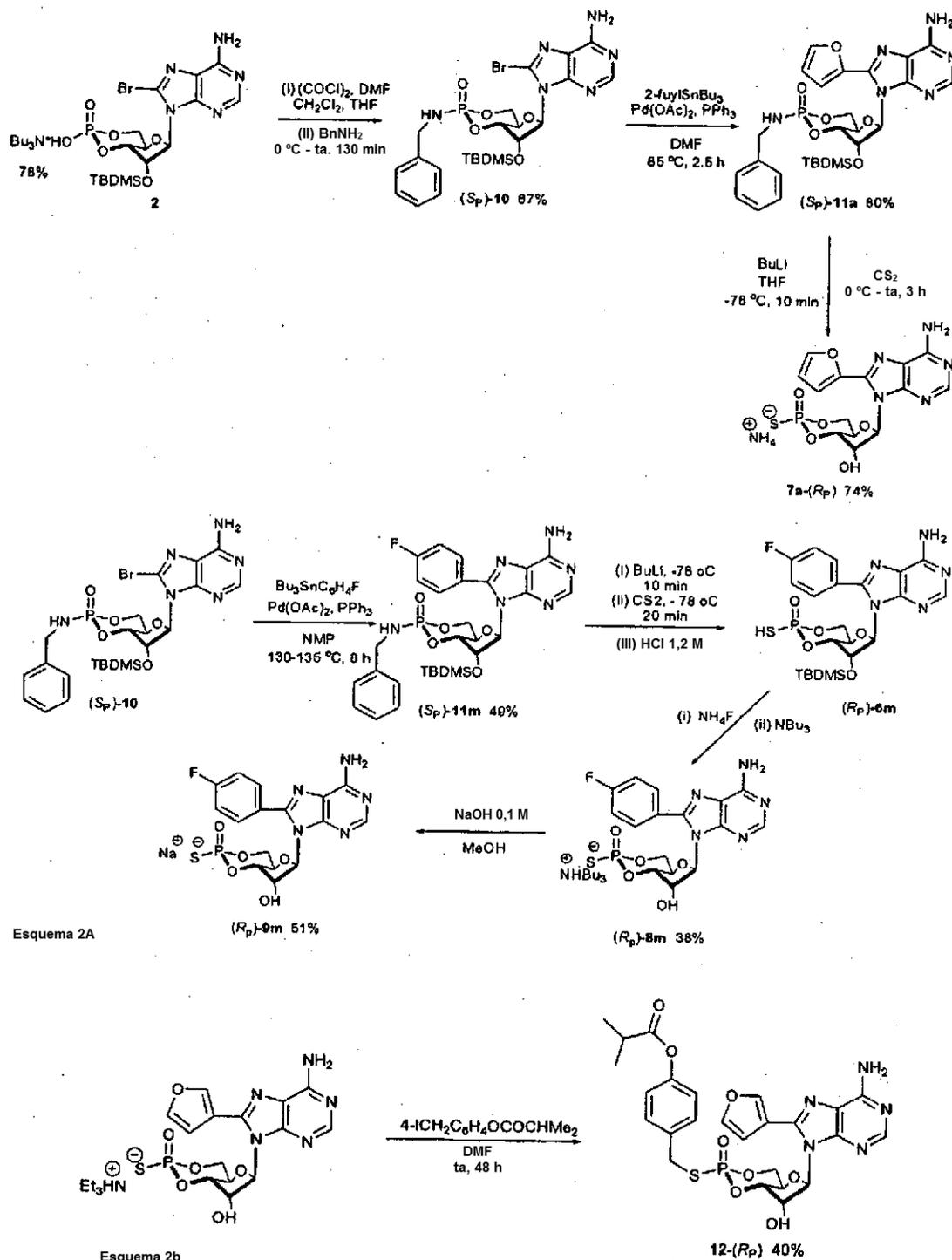


En este método para la síntesis de los fosforotioatos C en el Esquema 1, los intermedios amidatos de AMPc son esencialmente sustratos, AMPc se broma como se ha descrito para adenosina, o el compuesto de bromo se obtiene comercialmente. La bibliografía describe un método para la preparación de una mezcla diastereomérica de fosforamidatos 3',5'-cíclicos (véase Stec, Acc. Chem. Res. 16:411-417 (1983) y Beres et al. J. Org. Chem.

50:1271-1278 (1985)). La etapa inicial implica una reacción de tipo Apple con  $\text{Ph}_3\text{P}/\text{CCl}_4$  para proporcionar los cloruros de fosforilo correspondientes. Aparentemente, existe un pequeño control estereoquímico durante la cloración en el átomo de fósforo. Por tanto, una mezcla diastereomérica de aniluros resulta después de la amidación de los cloruros, (véase Esquema 2). Los amidatos son moléculas neutras que son solubles en una diversidad de disolventes orgánicos y pueden separarse en los diaestereoisómeros puros por procedimientos cromatográficos o por cristalizaciones fraccionadas.



Esquema 2



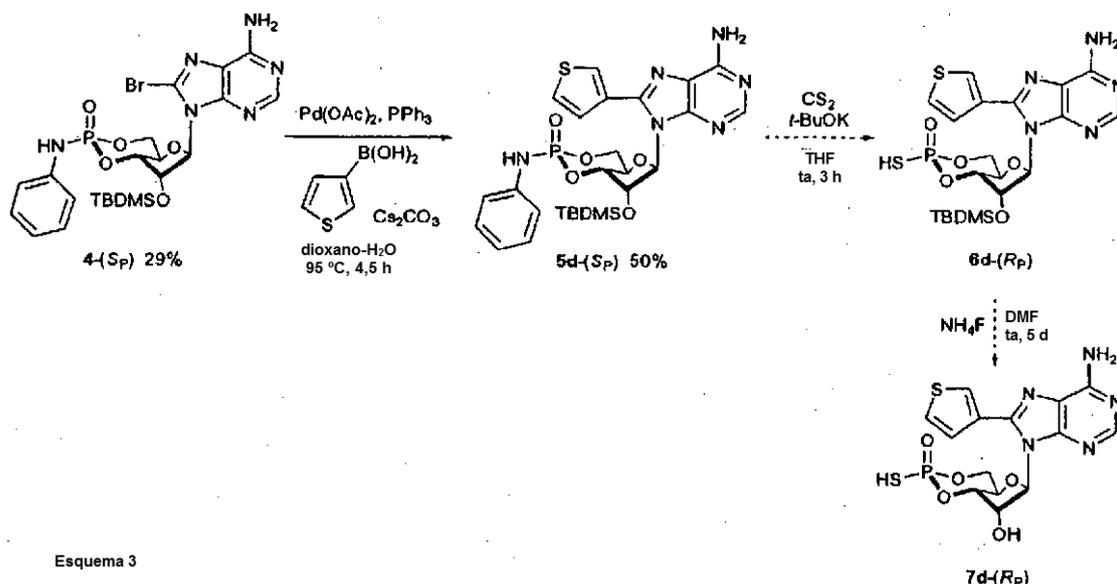
En el procedimiento nuevo e inventivo de los inventores en el Esquema 2, AMPc-8-Br en forma de una sal de amonio 1 está 2'-O-protegido con un grupo sililo voluminoso. TBDMS-Cl es un reactivo conveniente y eficaz para este propósito (TBDMS = *tert*-butil dimetil sililo). Posteriormente, el éter de sililo 2 se clora para formar la estructura 3.

El grupo sililo voluminoso también tiene una segunda función importante en la secuencia sintética. Permite que el producto se precipite eficazmente después de la tación desde una mezcla de reacción acuosa y es útil en la purificación como se describe a continuación. También podrían usarse otros grupos protectores con propiedades similares.

En el método de cloración, se ha usado con éxito cloruro de oxalilo junto con cantidades catalíticas de, o incluso un

exceso de, DMF. El agente de cloración de fósforo real es un derivado de cloro-imino intermedio que se genera *in situ* a partir de cloruro de oxalilo y DMF. El estereómero de cloruro de fosforilo deseado **3** puede aislarse. El producto en bruto, sin embargo, puede usarse en la etapa de amidación posterior.

- 5 Pueden usarse para la aminación diversas aminas primarias o aminas enmascaradas. Las aminas nucleófilas reaccionan fácilmente con el cloruro. Los amidatos, sin embargo, deben ser ácidos suficientemente fuertes para una extracción del hidrógeno restante del grupo amino. Varias aminas aromáticas satisfarían el último requerimiento. Los inventores han seleccionados anilina para su trabajo. La reacción con anilina puede realizarse en diclorometano en frío. En estas condiciones, la reacción es estereoespecífica ya que sólo se obtiene un estereoisómero de amidato **4** de la mezcla de reacción.
- 10 Los amidatos son moléculas neutras que se disuelven fácilmente en varios disolventes orgánicos comunes. Por tanto, estas moléculas son adecuadas para reacciones de carbamoilación en la posición 8. Varios metales de transición catalizarán este proceso. Los inventores han usado extensamente paladio en los sistemas de catalizador. En la mayoría de los casos, se han usado condiciones de Stille con reactivos de estanio en el tratamiento preliminar de los inventores. Los rendimientos de los productos de acoplamiento cruzado son excelentes. Pueden usarse otros reactivos organometálicos, por ejemplo compuestos de cinc y boro. El acoplamiento de un ácido borónico en condiciones de Suzuki se realiza de la misma manera que se muestra en el Esquema 3. Por tanto, estará disponible una diversidad de derivados 8-sustituídos mediante esta metodología.



- 20 Posteriormente, el derivado 8-bromo **4** y los amidatos 8-carbamoilados **5** y **11** en los Esquemas 2, 2a y 3 se titian. Se ha recomendado la tiilación por medio de disulfuro de carbono por desplazamiento de la amina. Los inventores han descubierto que con disulfuro de carbono en THF y *tert*-butóxido potásico como base, la tiación a temperatura ambiente requiere menos de 3 horas. Los fosforotioatos **6** se obtienen con rendimientos excelentes. La sustitución se desarrolla estereoselectivamente con retención de la configuración en el átomo de fósforo. Sin embargo, las asignaciones configuracionales formales se cambian debido a las reglas de prioridad de nomenclatura. Este trabajo conduce a la configuración Rp en las moléculas diana de ácido fosforotioico.

Además de la protección, la presencia de un grupo sililo voluminoso es muy importante para el aislamiento del producto **6** debido a sus solubilidades relativas en los procesos de aislamiento y purificación.

- 30 La desililación del producto **6** se realiza con fluoruro de amonio en una solución de DMF. La desililación se realiza a temperatura ambiente durante 5 días, después de los cuales los productos diana **7** se aíslan con un rendimiento excelente. De este modo, se obtienen productos diana 8-carbamoilados, así como los 8-bromo AMPSc. Cuando sea deseable, los 8-bromo AMPSc pueden ser un sustrato para reacciones de acoplamiento cruzado después de desprotección de O o S en la función ácida como se hace referencia en el **Proceso IV**.

- 35 La formación de los amidatos (**4** en el Esquema 2) de una manera estereoselectiva es una etapa importante en la síntesis indicada en esta sección. El hidrógeno de amidato de anilina es suficientemente ácido para permitir una extracción fácil (por ejemplo, con una base de alcóxido) para la tiación posterior. Sin embargo, también puede conseguirse una tiación eficaz y estereoselectiva cuando se usa una amina alifática o alifática sustituida (por ejemplo, bencilamina) en lugar de anilina para la formación de amidato. En este caso, se usa una base fuerte (por ejemplo, butillitio) para la desprotonación (véase, por ejemplo, el Esquema 2A).

Cuando se usan aminas alifáticas o sustituidas (tales como bencilamina), además, puede realizarse 8-carbamoilación

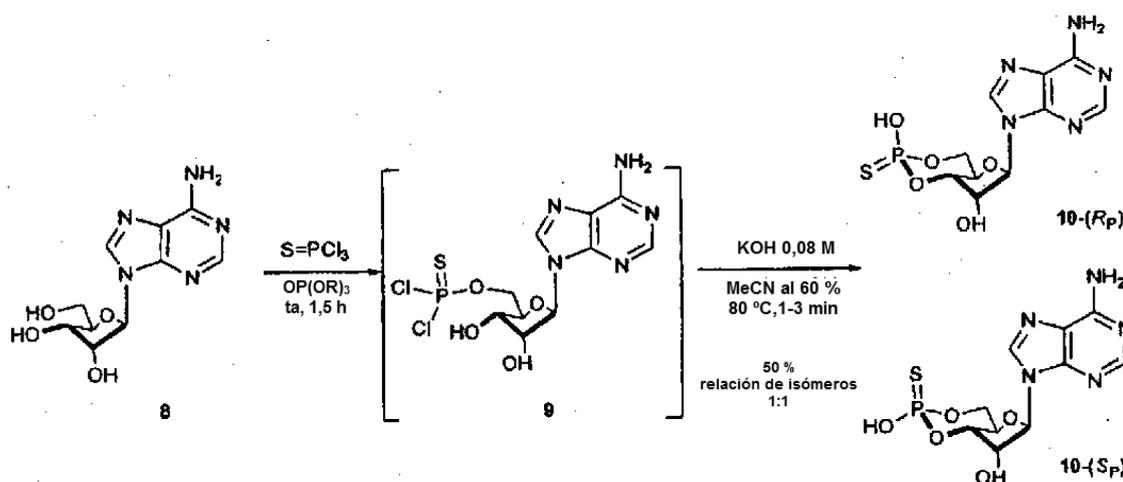
ventajosamente usando compuestos de organocinc, especialmente aquellos en los el grupo orgánico es un heterociclo pequeño, en particular, uno unido en un carbono adyacente a un heteroátomo del anillo, por ejemplo, en conjunto con un catalizador de paladio. En general, cuando debe unirse un grupo cíclico a la posición 8, se prefiere que los átomos adyacentes al sitio de unión del carbono del anillo estén sin sustituir.

## 5 Proceso II

*Tiación mediante reacciones de cierre de anillo:*

Se ha sintetizado (Rp)-AMPSc enzimáticamente a partir del nucleósido 5'-O-(1-tiotrifosfato) correspondiente. No se usaron técnicas enzimáticas en los Ejemplos de más adelante, pero proporcionarían un procedimiento alternativo.

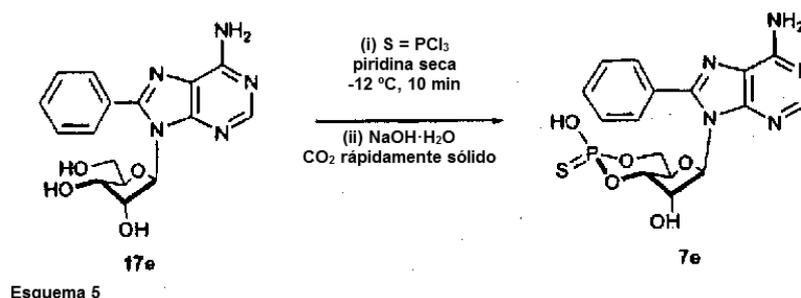
10 En una síntesis química, se trató N-benzoil-adenosina sin protección de O con bis(p-nitrofenil)fosforoclorotioato en piridina. El producto, 5'-bis(p-nitrofenil)fosfortioato de adenosina, se cicló posteriormente en DMF seca con *tert*-butóxido potásico como base. Después de desbloquear con amoníaco acuoso conc., los diastereómeros se separaron por cromatografía.



15 La síntesis de nucleósido-3',5'-fosfortioato cíclico por ciclotiofosforilación de nucleósidos no protegidos se efectúa con tricloruro de tiosfosforilo (Esquema 4). La fosforilación inicial tiene lugar presumiblemente en el grupo 5'-OH en el azúcar. Se recomiendan fosfatos de trialquilo como disolventes. Los productos se han ciclizado directamente a una alta disolución con hidróxido alcalino en acetonitrilo acuoso para dar los nucleósidos-3',5'-fosfortioatos cíclicos AMPc diastereoméricos en una relación 1:1 que tienen que separarse por técnicas cromatográficas. Los diaestereoisómeros del compuesto precursor 10 en el Esquema 4 no portan ningún sustituyente en la posición 8.

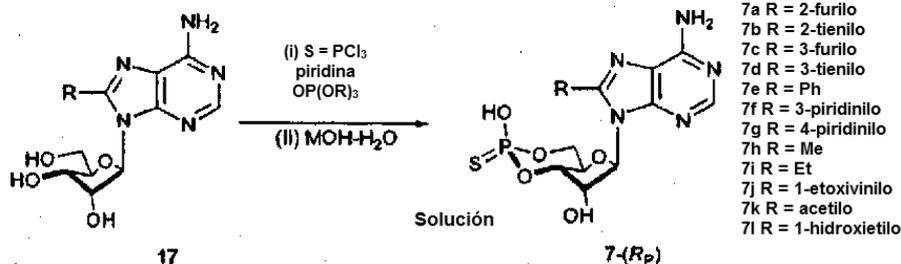
20 En la presente invención, las adenosinas 8 se han convertido en (Rp)-adenosina-8-sustituida-3',5'-fosfortioatos cíclicos 7 como se indica en el Esquema 6. Los inventores han desarrollado un método que libera casi exclusivamente los 3',5'-fosfortioatos cíclicos deseados, pero en forma de una mezcla estereoquímica. La reacción es limpia a este respecto cuando se efectúan tiosfosforilación y ciclación en piridina seca en frío. Pueden aislarse ambos estereoisómeros en un estado puro después de una separación cromatográfica. El derivado de 8-fenilo 7e se preparó mediante esta metodología mostrada en el Esquema 5.

25 Cuando fueran deseables, estarían disponibles derivados de (Sp) AMPSc de una manera similar.



El descubrimiento de que la piridina y disolventes similares deben secarse especialmente representa una invención

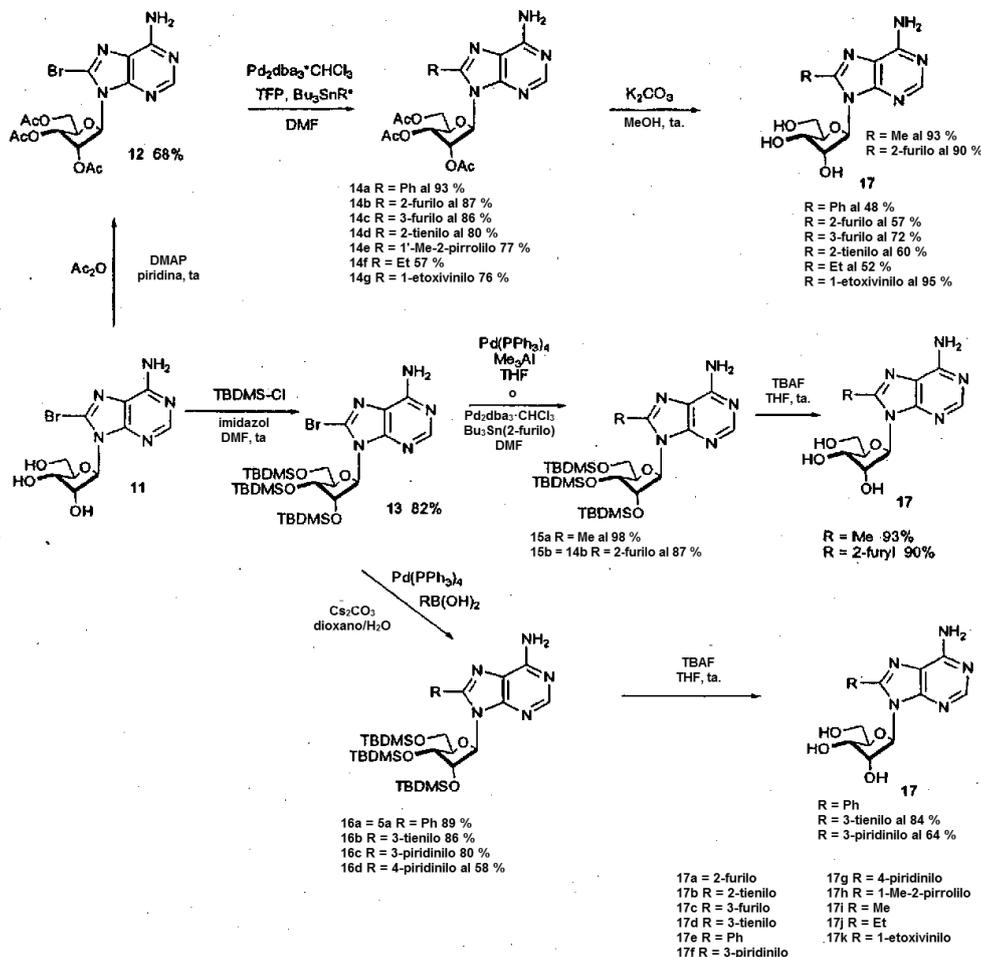
puesto que la reacción de ciclación en estas condiciones se mejora mucho tanto en selectividad como en rendimiento.



Esquema 6

Para el trabajo del **Proceso II** y el **Proceso III**, los inventores han preparado un gran número de nucleósidos 8-carbamoylados. Los intermedios de nucleósido se ciclaron de forma rutinaria usando cloruro de tiosforilo. Las reacciones de carbamoylación de adenosinas se resumen en el Esquema 6.

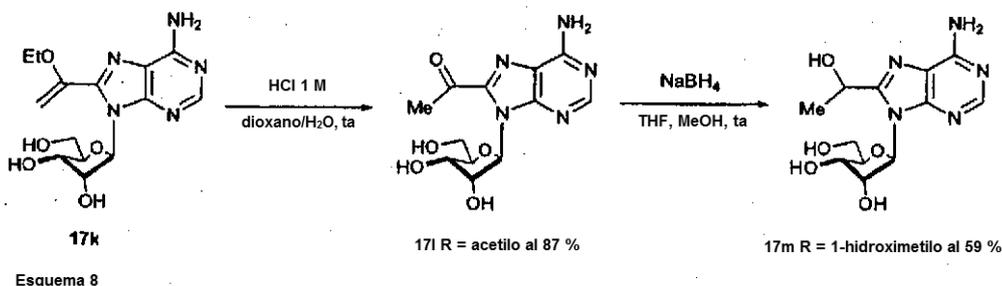
Para la carbamoylación de nucleósidos en el Esquema 7, se usó el derivado 8-bromo **11** de adenosina. La protección de los grupos hidroxilo del azúcar fue tanto por acetilación para proporcionar el sustrato triacetilado **12** como por sililación para proporcionar el sustrato trisililado **13**. Se usaron varios sistemas de catalizadores de Pd para la reacción de acoplamiento cruzado. Las condiciones de reacción tuvieron que variarse. En el Esquema 7 se dan algunas de las mejores condiciones de los inventores para la preparación de los compuestos **14** - **16**. Se usaron condiciones de Stille para la preparación de los productos de acoplamiento cruzado **14**, mientras que se realizó metilación (**15a**) a partir de trimetilaluminio en condiciones de Negishi. También se usaron las mismas condiciones para preparar el derivado del 2-furilo **15b** con el mismo rendimiento que el obtenido en las condiciones de Stille, que proporcionó el mismo compuesto numerado como **14b**.



Bu<sub>3</sub>SnR para R = Et se sustituyó con Et<sub>3</sub>Sn

Esquema 7

También se siguieron correctamente reacciones a partir de ácidos borónicos en las condiciones de Suzuki para formar los compuestos **16** con altos rendimientos. El compuesto de fenilo **16a** se obtuvo con aproximadamente el mismo rendimiento que **14a** en las condiciones de Stille. Posteriormente, se prepararon las adenosinas 8-sustituidas en condiciones hidrolíticas a partir de los ésteres **14**, y mediante destilación con fluoruro de tetrabutilamonio a partir de los silil éteres **15** y **16**. Todas las reacciones se realizaron satisfactoriamente.

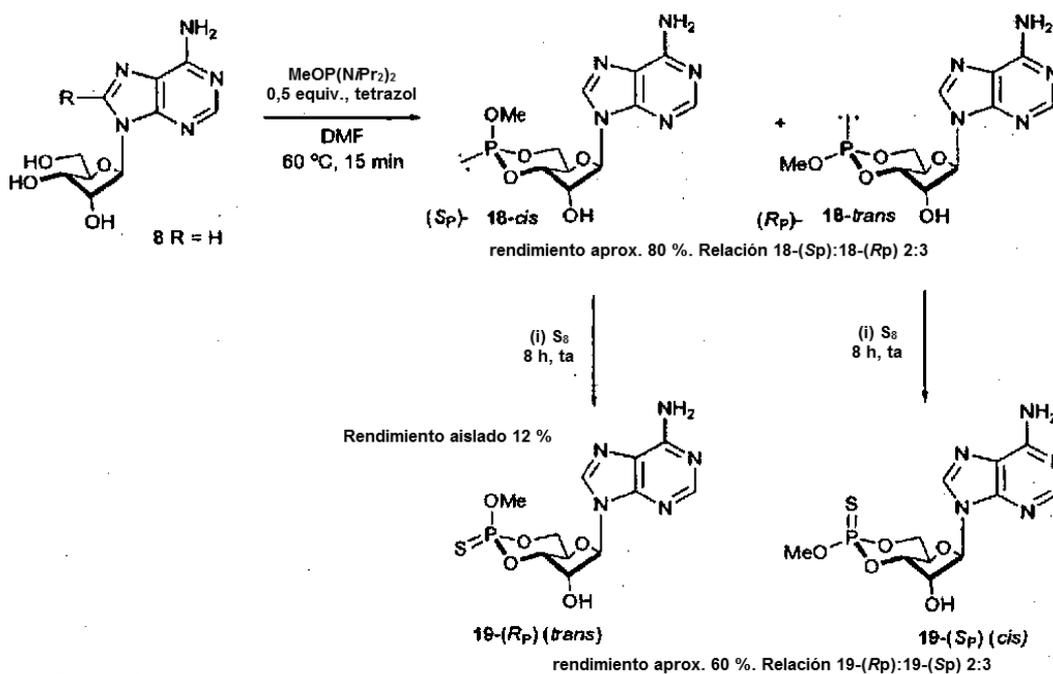


El Esquema 8 muestra la preparación de adenosinas que portan un grupo oxo y un grupo hidroxilo en el carbono α en el sustituyente 8. El material de partida fue la 8-(α-etoxietenil)adenosina **17k** acoplada de forma cruzada. Las condiciones levemente ácidas escindieron la función vinil éter con formación del derivado de acetilo **17l** con alto rendimiento. Una reducción de borohidruro sódico posterior dio el derivado de hidroxilo correspondiente **17m**. No se observó estereoselectividad en el carbono del alcohol epimérico. No se hicieron intentos de separar los estereoisómeros presentes en cantidades iguales.

### Proceso III

Enfoque de Fosfito P (III):

Los nucleósidos 8-carbamoylados **17** y sus derivados en los Esquemas 7 y 8 son sustratos adecuados para el **Proceso III**, así como para el **Proceso II** (véase más arriba). Hasta ahora, los inventores han demostrado el principio para el **Proceso III** mediante la preparación de los ácidos fosfotioicos precursores **19**. Se indican análogos 8-carbamoylados mediante el sustituyente 8-R en el sustrato **9** que se muestra en el Esquema 9.



Se harán reaccionar reactivos de fósforo trivalente par formar fosfito cíclicos. Para asegurar la 3',5'-ciclofosfitilación regioselectiva, se requiere un ataque inicial de un reactivo de fósforo (III) bifuncional sobre el grupo 5'-hidroxi primario. Por tanto, los mejores reactivos tendrían una voluminosidad estérica considerable. De acuerdo con la bibliografía, puede convertirse 2'O-metiladenosina en 2'O-metil-*cis*-adenosina-3',5'-metil monofosfito cíclico en reacciones con bis (N,N-diisopropilamino)metoxifosfina. La reacción se promueve con 1*H*-tetrazol. Se forman ésteres *cis*- y *trans*-ciclofosfito. A temperatura elevada, el diastereómero *trans* se invierte para dar el isómero *cis*.

5 Cada isómero por separado, o en forma de una mezcla, puede posteriormente titiarse con azufre. La adición oxidativa de azufre sucede en el sitio de los pares solitarios de electrones en el átomo de fósforo con retención de la configuración relativa en el átomo de fósforo. La tación oxidativa se realiza en una mezcla estereoisomérica o en un estereoisómero puro. En este último enfoque, se requiere una separación adicional de los estereómeros de ácido fosfórico.

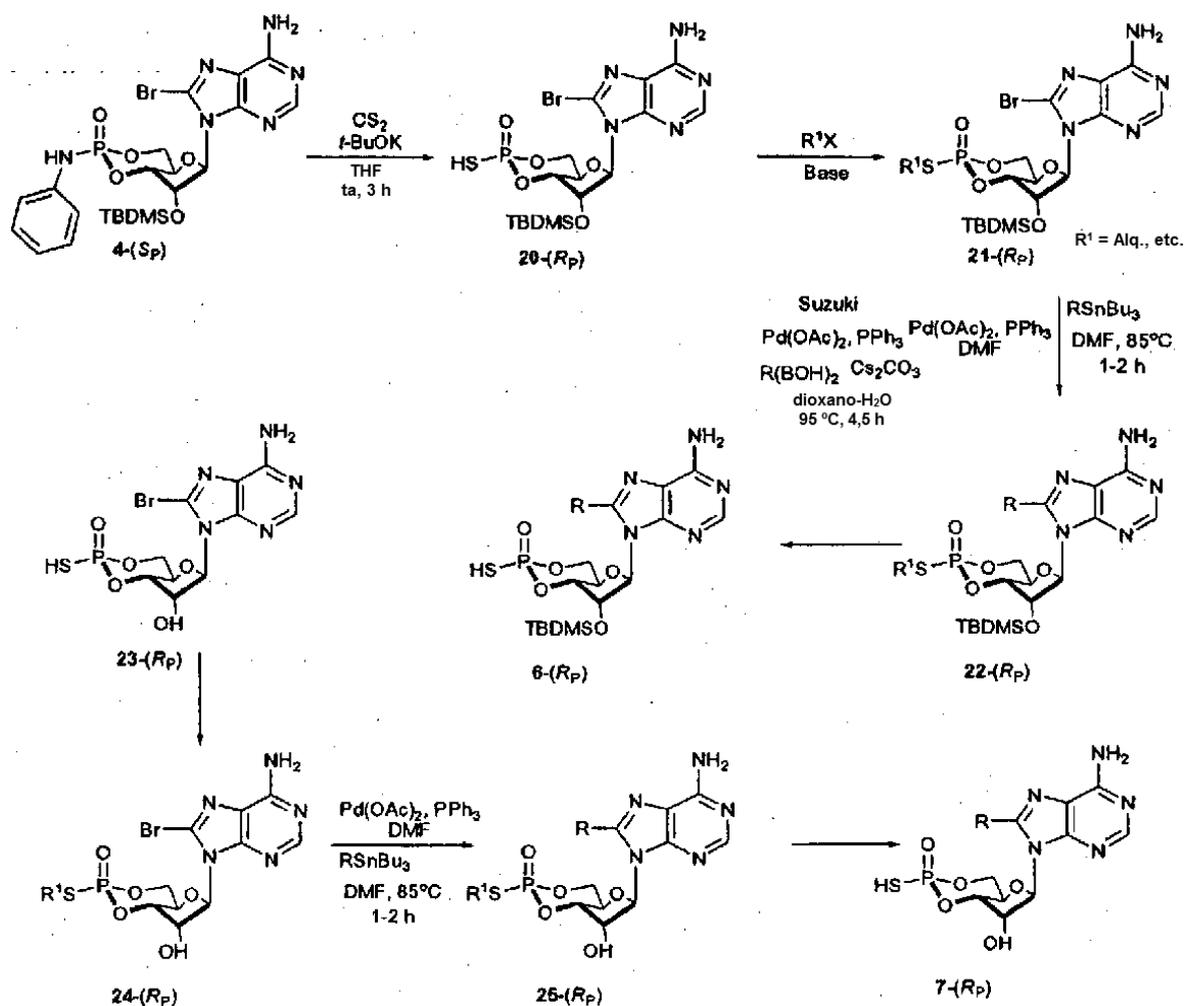
10 Los inventores han descubierto que la fosfitilación puede realizarse bien igualmente en la adenosina no protegida. El primer producto que se formó fue una mezcla de fosfitos *cis* (RMN <sup>31</sup>P δ 123) y *trans* (RMN <sup>31</sup>P δ 129). La mezcla se equilibró hacia el isómero *cis* sin pérdida de material. Se descubrió que más cantidad de 1H-tetrazol aceleraba la transformación isomérica. Posteriormente, cada isómero por separado, o en forma de una mezcla, se titió con azufre. La adición oxidativa de azufre sucede en el sitio de los pares solitarios de electrones en el átomo de fósforo con retención de la configuración relativa en el átomo de fósforo. En el ejemplo descrito en el presente documento, la tación oxidativa se realizó en una mezcla de los diaestereoisómeros de fosfato. En este caso, los diastereómeros de ácido fosforotioico se separaron por cromatografía.

#### Proceso IV

##### 15 Carbamoilaciones

20 Pueden realizarse carbamoilaciones por reacciones de acoplamiento cruzado en el nivel de ácido fosforotioico final como se indica en el Esquema 10. El sustrato porta un grupo saliente en la posición 8 de purina. Se ilustra una secuencia de reacción para el derivado de 2'-OTBDMS-8-bromo **20** que está disponible mediante reacciones que se han mostrado en los esquemas anteriores, tanto como un estereoisómero puro, como en forma de una mezcla de diastereoisómeros que necesita separarse en estereoisómeros puros después de que se haya realizado la reacción de carbamoilación.

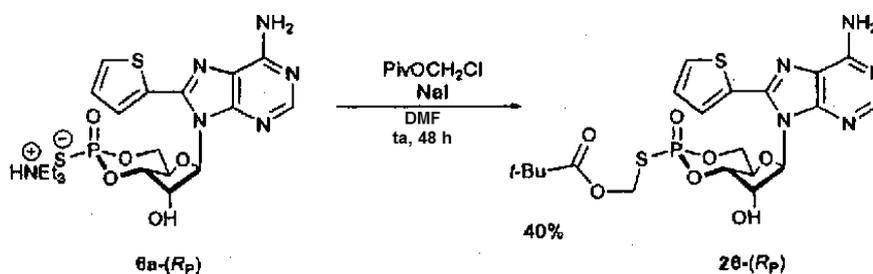
25 Tanto el átomo de S como el de O del ácido tiosfórico se protegen para proporcionar el S-éster **21** o el O-éster correspondiente. Como se muestra en el Esquema 11, el S-éster **21** se acopla de manera cruzada en condiciones de Stille o Suzuki, o se somete a modificaciones alternativas usadas en reacciones de acoplamiento cruzado, para proporcionar el producto 8-carbamoilado **22**. Este último puede desprotegerse para dar el ácido tioico **6**, y además para dar el compuesto diana **7**. Pueden realizarse de forma similar reacciones de acoplamiento en sustratos con un grupo 2'-OH libre, la secuencia **23** → **25**, y además en el compuesto diana **7**.



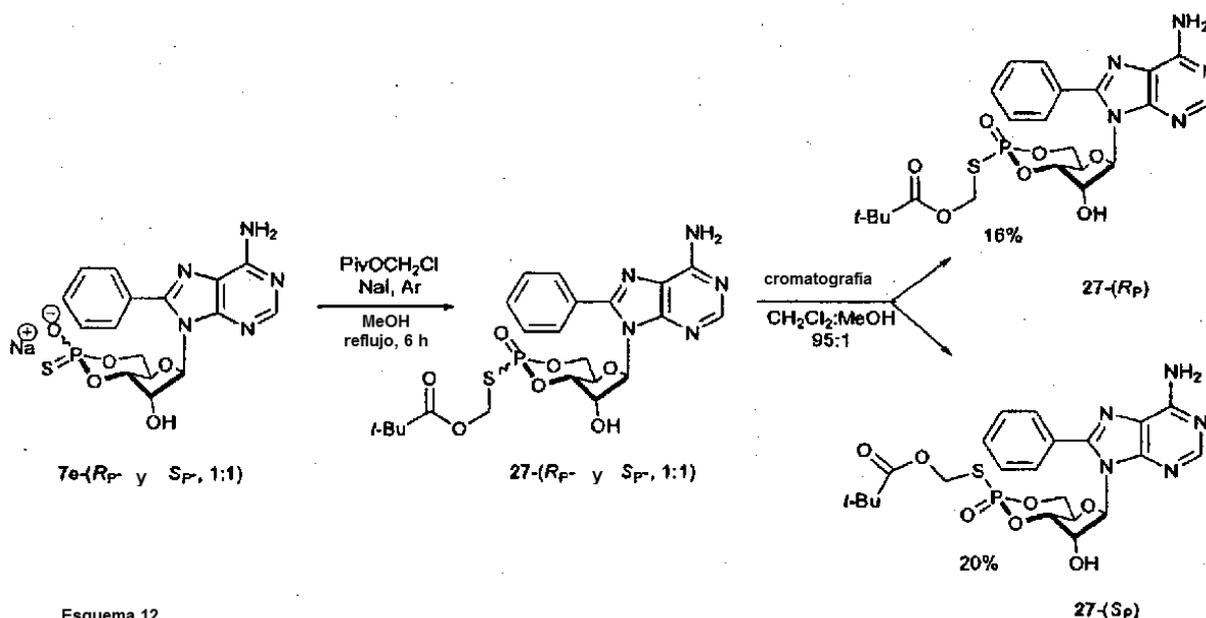
Esquema 10

Como se ha mencionado anteriormente, puede ser deseable usar los compuestos de la invención en forma de un profármaco. Típicamente, tales profármacos pueden producirse por S-alkilación y a continuación se exponen dos esquemas de reacción para S-alkilación como Esquemas 11 y 12. Los Esquemas 11 y 12 describen la reacción del fosforotioato con un haluro de alquilo, o más específicamente un carboxilato de haloalquilo.

5



Esquema 11



Varios de los intermedios en los esquemas de proceso descritos anteriormente son nuevos y forman por sí mismos aspectos adicionales.

- 5 Los compuestos de AMPSc 8-sustituidos hidrófilos de la invención se purifican preferentemente por transformación en sus sales de trialquilamonio solubles (por ejemplo, tributilamonio), seguido de cromatografía ultrarrápida, por ejemplo sobre gel de sílice. Tales sales de alquilamonio pueden prepararse mezclando las sales de amonio con una alquilamina y retirando por evaporación amoniaco. Después, el producto resultante puede, si se desea, transformarse en una forma de sal alternativa, por ejemplo forma de sal sódica, antes de su uso.
- 10 Las condiciones y reactivos usados en estos procesos son únicamente ejemplares. También pueden usarse otros reactivos, disolventes y condiciones de reacción, especialmente cuando estos procesos se realizan industrialmente para producir productos farmacéuticos. Un químico experto con formación en química de desarrollo mejorará de forma rutinaria estos procesos mediante la selección de condiciones, reactivos y disolventes centrándose en: costes, seguridad, riesgo, toxicidad, entorno y aspectos reguladores.
- 15 Por tanto, vista desde un aspecto adicional, la invención proporciona un adenosin fosforamidato 3',5'-cíclico 8-carbamoilado en la configuración Sp. La invención también proporciona un adenosin 3',5'-fosfortioato cíclico 8-carbamoilado-2'-protegido (por ejemplo, sililado) en la configuración Rp. Ambos tienen sustituyentes en 8 como se ha definido anteriormente para el compuesto de AMPSc 8-carbilo sustituido.
- 20 Vista desde otro aspecto, la invención proporciona un 8-halo (y preferiblemente 2'-protegido (por ejemplo, sililado)) adenosin fosforamidato 3',5'-cíclico en la configuración Sp, en el que el grupo amino de fosforamidato comprende un átomo de hidrógeno.
- Visto desde un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un AMPSc 8 carbamoilado como se ha describe en el presente documento junto con transportador o receptor fisiológicamente tolerable.
- 25 La composición de la invención puede tener cualquier forma de administración conveniente, por ejemplo, comprimido, cápsula, polvo, jarabe, pulverización, solución, dispersión, supositorio, etc. El agente activo se administrará con un transportador o excipiente adecuado, por ejemplo, un disolvente (tal como agua para inyecciones), diluyentes, estabilizantes, modificadores de viscosidad, modificadores de pH, aromas, saporíferos, antioxidantes, etc. y la composición puede prepararse de manera convencional.
- 30 Visto desde otro aspecto adicional la invención proporciona un adenosin 3',5'-fosfortioato cíclico 8-carbamoilado como se describe en este documento para uso como un medicamento y un adenosin 3',5'- fosfortioato cíclico 8-carbamoilado como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, inmunodeficiencias e infecciones virales.
- 35 Visto desde un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un AMPSc 8-carbamoilado de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, inmunodeficiencias e infecciones virales, especialmente infección por VIH.

La dosificación del AMPSc 8-carbamoilado o derivado dependerá de la naturaleza de la afección que vaya a tratarse así como del tamaño, sexo y especie del receptor. En general dosis diarias para sujetos humanos en particular serán del orden de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal. La administración es preferentemente por vía oral o iv.

Debido a sus propiedades antagonistas de AMPc, el AMPSc 8-carbamoilado de la invención puede utilizarse en ensayos de unión competitiva para AMPc, por ejemplo, en muestras biológicas. Un ensayo de este tipo se describe en el documento WO 2004/027074. En dichos ensayos, el AMPSc 8-carbamoilado se marca preferentemente (por ejemplo, radiomarcado o marcado con cromóforos) y puede unirse al sustrato convenientemente.

Por tanto visto desde un aspecto adicional, la invención proporciona un método de ensayo para determinar el AMPc en una muestra, generalmente una muestra biológica, cuyo método implica poner en contacto dicha muestra con un análogo de AMPc y un reactivo de unión a AMPc, caracterizado por que dicho análogo es un AMPSc 8-carbamoilado como se describe en este documento.

La invención puede aplicarse a otros nucleótidos de purina distintos de adenosina, en particular guanosina y análogos de guanosina y adenosina incluyendo sus análogos di- y tri-aza, por ejemplo, los análogos di- y tri-aza anulares (por ejemplo imidazopiridinas anuladas, bencimidazol y pirrolopirimidinas y pirrolopiridinas anuladas) tales como 1-deazapurina, 3-deazapurina, 7-deazapurina y 1,3-deazapurina y en aspectos adicionales de la invención las definiciones y enseñanzas experimentales contenidas en este documento pueden aplicarse cambiando lo que haya que cambiar a dichos otros nucleótidos de purina que por supuesto pueden sustituirse en otras posiciones del esqueleto análogamente al AMPSc 8-carbamoilado descrito anteriormente. Dichos fosforotioatos 3'-5' cíclicos de purina no adenosina 8-carbamoilados pueden utilizarse terapéuticamente en aplicaciones aplicables a los nucleótidos particulares, por ejemplo, para el tratamiento de infecciones por virus, inmunodeficiencias y enfermedades neoplásicas.

Los presentes antagonistas/agonistas de AMPc pueden utilizarse en combinación con otros fármacos que tienen un efecto sobre el sistema inmunitario.

Combinaciones de los presentes antagonistas/agonistas de AMPc con otros fármacos pueden ser útiles para el tratamiento de infecciones por VIH y enfermedades neoplásicas.

Un reactivo clave en la preparación de muchos de los compuestos de acuerdo con la invención es 8-Br-AMPc. Hasta ahora, informes en la bibliografía solamente se refieren a preparaciones a pequeña escala (por ejemplo, <100 mg) de este material utilizando diluciones diluidas (0,1 M) de AMPc en un medio de ácido acético/acetato. Intentos para utilizar condiciones de dilución similares en trabajos a gran escala dieron como resultado problemas debido a los grandes volúmenes de disolvente requerido. Se ha descubierto ahora que el procedimiento puede mejorar utilizando soluciones concentradas de AMPc con un tampón concentrado para recuperar el HBr que se produce durante la reacción del AMPc con bromo. Utilizando soluciones de AMPc concentrado, también se consigue un beneficio doble- la proporción del producto 8-Br-AMPc que se precipita según se forma se optimiza (facilitando la recogida del producto) y el material de partida AMPc (H) contribuye al sistema tampón. Por tanto, por ejemplo, el AMPc (H) 0,2 M y el acetato sódico 0,4 M crean un sistema tampón equivalente a NaOAc/AcOH 0,2 M con un pH que durante la brominación permanece estable a aproximadamente 4,7.

El 8-Br-AMPc puede prepararse utilizando un proceso que comprende hacer reaccionar el AMPc con bromo en una solución tamponada (preferentemente acuosa), hacer reaccionar con un agente reductor (por ejemplo, sulfito de sodio) para eliminar el exceso de bromo, recoger el 8-Br-AMPc producido y opcionalmente eliminar el bromo libre del 8-Br-AMPc recogido, en el que el AMPc se usa en forma de solución concentrada (por ejemplo, de 0,15 a 0,6 M, preferiblemente de 0,16 M a 0,3 M, especialmente de 0,17 a 0,25 M) y el tampón (por ejemplo, un tampón acetato) se concentra suficientemente para mantener un pH de solución que está en intervalo de 3,5 a 5,5, especialmente de 4 a 5. En este proceso, preferentemente el bromo se añade lentamente y el agente reductor también se añade después lentamente. Este proceso se ilustra más adelante en el Ejemplo 47.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes.

#### Ejemplo 1

##### Sal tributilamonio de 8-bromo-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)adenosin-3',5'-fosfato cíclico (2)

Se añadió TBDMS-Cl (2,72 g, 18 mmol) a una solución de sal tributilamonio de 8-bromo-AMPc (1) (7,0 g, 11,8 mmol) e imidazol (2,45 g, 36 mmol) en DMF (30 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 50 °C durante 48 h en una atmósfera de argón. El disolvente se retiró a presión reducida, el producto en bruto se suspendió en agua (150 ml) y se añadió HCl 1,2 M (76 ml). El precipitado se retiró por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío. El ácido se suspendió en MeOH (80 ml) y se añadió Bu<sub>3</sub>N (5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, el disolvente se retiró por destilación y el producto se secó al vacío; rendimiento 6,50 g (78 %) de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz): δ 0,01 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,03 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,83 (9H, s, Si-*t*-Bu), 0,87 (9H, t), 1,28 (6H, m), 1,53 (6H, m), 2,79 (6H, m), 3,90 (2H, m), 4,11 (1H, m), 5,02 (2H, m), 7,53 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 8,15 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz): δ -5,3, -4,7, 13,6, 18,0, 19,6, 25,6, 25,7, 51,9, 65,4, 72,3, 72,4, 76,2, 94,3, 119,2, 126,5, 150,0, 153,2, 155,0. RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz): δ -1,36. HRMS (Electronebulización): Iones negativos encontrados: M

520,0427. Calc. 520,0422.

## Ejemplo 2

(Sp)8-Bromadenosin-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (4)

5 Una solución de sal tributilamonio de 8-bromadenosin-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3',5'-fosfato cíclico (**2**) (500 mg, 0,71 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 ml) se añadió gota a gota a una solución de cloruro de oxalilo (0,24 ml, 2,8 mmol) y DMF (1 gota) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min antes de retirar el disolvente al vacío. El producto en bruto se disolvió de nuevo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) y se añadió gota a gota anilina (0,5 ml, 4,26 mmol) a 0 °C, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (3:97 y 5:95) para la elusión; rendimiento 125 mg (29 %) de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>/300 MHz): δ -0,09 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,02 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,79 (9H, s, Si-*t*-Bu), 4,4 (2H, m), 4,65 (1H, m), 5,12 (1H, d), 5,52 (1H, m), 5,92 (1H, s), 6,93 (1H, t), 7,10 (2H, d), 7,20 (2H, t), 7,56 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 8,23 (1H, s, H-2), 8,55 (1H, d, Ar-NH). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz): δ -5,2 - 5,0, 17,8, 24,9, 68,2, 70,4, 72,3, 76,1, 92,9, 117,7, 118,5, 121,8, 128,9, 135,9, 139,5, 149,7, 153,4, 155,1. RMN <sup>31</sup>P (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 81 MHz): δ 2,28.

## Ejemplo 3

15 (Sp)8-(2-Furil)adenosin-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5a)

20 Una solución de Pd(OAc)<sub>2</sub> (99 mg, 0,37 mmol) y PPh<sub>3</sub> (253 mg, 0,81 mmol) en DMF (15 ml) se agitó a 50 °C durante 15 min antes de añadir tri-*n*-butil(2-furil)estano (1,4 ml, 4,4 mmol). Después de esto, se añadió una solución de (Sp)8-bromadenosin-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (**4**) (2,2 g, 3,7 mmol) en DMF (10 ml). La mezcla se agitó a 80 °C durante 1 h. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 3:97 y 5:95 como eluyente; rendimiento 1,93 g (90 %) de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz): δ -0,14 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), -0,11 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,70 (9H, s, Si-*t*-Bu), 4,4 - 4,5 (2H, m), 4,65 (1H, dm), 5,19 (1H, d), 5,65 (1H, m), 6,31 (1H, s), 6,77 (1H, dd), 6,93 (1H, t), 7,1 - 7,2 (5H, m), 7,58 (2H, s a), 8,00 (1H, d), 8,27 (1H, s), 8,56 (1H, d). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz): δ -5,6, -5,0, 17,7, 25,3, 68,3, 70,2, 72,4, 76,3, 93,6, 112,3, 113,9, 118,45, 121,8, 128,9, 139,6, 140,3, 143,2, 145,6, 149,8, 153,4, 156,1. RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz): δ 3,06.

25 HRMS (Electronebulización, TOF EN) - iones positivos: M 585,2023, Calc. 585,2041.

## Ejemplo 4

(Sp)8-(2-Tienil)adenosin-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5b)

30 Una solución de Pd(OAc)<sub>2</sub> (117 mg, 0,44 mmol) y PPh<sub>3</sub> (299 mg, 0,96 mmol) en DMF (15 ml) se agitó a 50 °C durante 30 min antes de añadir tri-*n*-butil(2-tienil)estano (2,2 ml, 6,8 mmol). Después de esto, se añadió una solución de (Sp)8-bromadenosin-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (**4**) (2,72 g, 4,6 mmol) en DMF (10 ml). La mezcla se agitó a 85 °C durante 1 h. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 3:97 y 5:95 como eluyente; rendimiento 1,91 g (71 %) de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz): δ -0,18 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), -0,17 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,63 (9H, s, Si-*t*-Bu), 4,4 - 4,5 (2H, m), 4,69 (1H, dm), 5,23 (1H, d), 5,55 (1H, m), 5,97 (1H, s), 6,93 (1H, t), 7,0 - 7,2 (4H, m), 7,31 (1H, dd), 7,55 (3H, m a), 7,90 (1H, dd), 8,26 (1H, s), 8,56 (1H, d). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 50 MHz): δ -5,6, -5,0, 17,7, 25,3, 68,3, 70,2, 71,9, 76,5, 93,6, 118,3, 118,5, 118,7, 121,8, 128,3, 128,9, 129,4, 129,7, 130,6, 139,5, 143,9, 150,1, 153,3, 155,9. RMN <sup>31</sup>P (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 81 MHz): δ 2,41.

## Ejemplo 5

(Sp)8-(3-Furil)adenosin-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5c)

40 Una solución de Pd(OAc)<sub>2</sub> (133 mg, 0,50 mmol) y PPh<sub>3</sub> (342 mg, 1,1 mmol) en DMF (20 ml) se agitó a 50 °C durante 30 min antes de añadir tri-*n*-butil(3-furil)estano (2,67 g, 7,5 mmol). Después de esto, se añadió una solución de (Sp)8-bromadenosin-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (**4**) (3,00 g, 5,0 mmol) en DMF (10 ml). La mezcla se agitó a 85 °C durante 2 h. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 3:97 y 5:95 como eluyente; rendimiento 2,70 g (92 %) de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz): δ -0,16 (s, 3H, Si-CH<sub>3</sub>), -0,14 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,66 (9H, s, Si-*t*-Bu), 4,4 - 4,5 (2H, m), 4,65 (1H, dm), 5,26 (1H, d), 5,44 (1H, m), 5,86 (1H, s), 6,9 - 7,0 (2H, m), 7,0 - 7,2 (4H, m), 7,48 (2H, s a), 7,96 (1H, t), 8,24 (1H, s), 8,29 (1H, s), 8,57 (1H, d). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 50 MHz): δ -5,5, -5,0, 17,7, 25,3, 68,3, 70,0, 71,8, 76,5, 93,4, 110,4, 114,9, 118,4, 118,5, 118,7, 121,8, 128,9, 139,5, 143,2, 143,5, 145,0, 149,9, 153,1, 155,9. RMN <sup>31</sup>P (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 81 MHz): δ 2,43.

## 50 Ejemplo 6

(Sp)8-(3-Tienil)adenosin-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5d)

Una solución de Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,008 g, 0,03 mmol) y PPh<sub>3</sub> (0,02 g, 0,07 mmol) en dioxano (3 ml), se lavó abundantemente en una atmósfera de argón. La mezcla se agitó a 50 °C durante 25 min, momento en el que la mezcla de reacción se

había vuelto de color rojizo-pardo. Se añadió una solución de (Sp)8-bromadenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (**4**) (0,10 g, 0,17 mmol), ácido 3-tiofenoborónico (0,03 g, 0,25 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,16 g, 0,50 mmol) en agua. La temperatura se elevó a 95 °C, se agitó durante 4,5 h. La solución resultante se enfrió, se diluyó con THF (15 ml) y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado (10 ml). La fase orgánica se separó y se secó con MgSO<sub>4</sub>. El filtrado se evaporó a sequedad a presión reducida y el producto se aisló del material residual después de cromatografía ultrarrápida usando MeOH al 3 % en EtOAc; rendimiento 50 % de un sólido de color castaño. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>); δ -0,18 (6H, s, 2 x SiCH<sub>3</sub>), 0,63 (9H, s, 3 x SiCCH<sub>3</sub>), 4,39 - 4,73 (3H, m), 5,16 (1H, d, *J* = 5,2 Hz), 5,53 - 5,58 (1H, m), 5,86 (1H, s), 6,91 - 7,23 (5H, m, Ph-H), 7,46 (1H, dd, *J* 1,2 Hz, *J'* = 5,0 Hz, H-4"), 7,50 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 7,85 (1H, dd, *J* 2,9 Hz, *J'* = 5,0 Hz, H-5"), 8,04 (1H, dd, *J* 1,2 Hz, *J'* = 2,9 Hz, H-2"), 8,2 6 (1H, s, H-2), 8,56 (1H, d, *J* 8,9 Hz, NH-Ph).

## Ejemplo 7

(R<sub>p</sub>)-8-(2-Furil)adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-ácido fosfotioico cíclico (6a)

Una solución 1,0 M de *t*-BuOK en THF (3,6 ml, 3,6 mmol) se añadió a una solución de (Sp)8-(2-furil)adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (**5a**) (1,51 g, 2,6 mmol) en THF (30 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h a esta temperatura antes de añadir CS<sub>2</sub> (0,47 ml, 7,8 mmol) y la mezcla se agitó durante 3 h más a temperatura ambiente. El volumen del disolvente se redujo a aproximadamente 10 ml antes de añadir hexano (90 ml). Se formó un precipitado y se recogió por filtración, se suspendió en agua (55 ml) y se añadió HCl 1,2 M (9 ml). El producto se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó; rendimiento 1,23 g (91 %) de un sólido de color castaño claro. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz): δ -0,03 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,04 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,79 (9H, s, Si-*t*-Bu), 4,0 - 4,5 (3H, m), 5,06 (1H, d), 5,34 (1H, m), 6,21 (1H, s), 6,79 (1H, c), 7,18 (1H, d), 8,02 (1H, s), 8,2 (2H, s a), 8,33 (1H, s). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz): δ -5,4, -4,6, 17,9, 25,5, 67,7, 71,1, 72,8, 75,9, 93,2, 112,4, 114,4, 119,1, 141,3, 142,8, 146,0, 149,4, 150,2, 153,7. RMN <sup>31</sup>P (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 81 MHz): δ 58,4. HRMS (electronebulización): M 526,1326. Calc. para C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>PSSi: 526,1339.

## Ejemplo 8

(R<sub>p</sub>)-8-(2-Tienil)adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-ácido fosfotioico cíclico (6b)

Una solución 1,0 M de *t*-BuOK en THF (3,8 ml, 3,8 mmol) se añadió a una solución de (Sp)8-(2-tienil)adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-ciclic N-fenilfosforamidato (**5b**) (1,87 g, 3,1 mmol) en THF (35 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h antes de añadir CS<sub>2</sub> (0,57 ml, 9,5 mmol) y la mezcla se agitó durante 3 h más a temperatura ambiente. El volumen del disolvente se redujo a aproximadamente 10 ml antes de añadir hexano (90 ml). Se formó un precipitado y se recogió por filtración, se suspendió en agua (55 ml) y se añadió HCl 1,2 M (10 ml). El producto se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó; rendimiento 1,54 g (91 %) de un sólido de color castaño claro. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz): δ -0,07 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,03 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,73 (9H, s, Si-*t*-Bu), 4,1 - 4,5 (3H, m), 5,13 (1H, d), 5,28 (1H, m), 5,92 (1H, s), 7,31 (1H, c), 7,60 (1H, d), 7,94 (1H, d), 8,37 (1H, s). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz): δ -5,3, -4,5, 17,8, 25,5, 67,5, 71,2, 72,5, 76,0, 93,3, 118,9, 128,4, 128,6, 129,4, 129,8, 131,0, 145,2, 149,8, 153,4. RMN <sup>31</sup>P (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 81 MHz): δ 58,18.

## Ejemplo 9

(R<sub>p</sub>)-8-(3-Furil)adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-ácido fosfotioico cíclico (6c)

Una solución 1,0 M de *t*-BuOK en THF (5,3 ml, 5,3 mmol) se añadió a una solución de (Sp)8-(3-furil)adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (**5c**) (2,58 g, 4,4 mmol) en THF (35 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h antes de añadir CS<sub>2</sub> (0,80 ml, 13,3 mmol) y la mezcla se agitó durante 3 h más a temperatura ambiente. El volumen del disolvente se redujo a aproximadamente 10 ml antes de añadir hexano (90 ml). Se formó un precipitado y se recogió por filtración, se suspendió en agua (55 ml) y se añadió HCl 1,2 M (10 ml). El producto se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó; rendimiento 1,95 g (84 %) de un sólido de color castaño claro. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz): δ -0,057 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,033 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0,76 (9H, s, Si-*t*-Bu), 4,1 - 4,5 (3H, m), 5,13 (1H, d), 5,20 (1H, m), 5,81 (1H, s), 6,90 (1H, d), 7,97 (1H, d), 8,29 (1H, s), 8,37 (1H, s). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz): δ -5,3, -4,5, 17,9, 25,5, 67,5, 71,0, 72,3, 76,0, 93,1, 110,4, 114,6, 118,8, 143,8, 144,7, 145,1, 149,5, 152,0, 153,2. RMN <sup>31</sup>P (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 81 MHz): δ 58,08.

## Ejemplo 10

Sal amonio de (R<sub>p</sub>)-8-(2-Furil)adenosin-3',5'-ácido fosfotioico cíclico (7a)

Una solución de (R<sub>p</sub>)-8-(2-furil)adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-ácido fosfotioico cíclico (**6a**) (1,15 g, 2,7 mmol) y NH<sub>4</sub>F (225 mg, 6,0 mmol) en DMF (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. Posteriormente, se añadió TMSOMe (1 ml) y la agitación continuó durante 24 h. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, el producto en bruto se suspendió en MeOH (10 ml) y se añadió Et<sub>2</sub>O (80 ml). El sólido de color castaño claro se retiró por filtración y se secó; rendimiento 847 mg (90 %). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz): δ 4,0 - 4,2 (4H, m), 5,03 (1H, d), 5,14 (1H, m), 6,02 (1H, s), 6,76 (1H, dd), 7,13 (1H, d), 8,01 (1H, d), 8,21 (1H, s). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz): δ 66,2, 75,3, 76,9, 75,4, 92,8, 112,3, 113,8, 118,9, 141,2, 143,1, 145,8, 149,8, 152,7, 155,6. RMN <sup>31</sup>P (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 81 MHz): δ

54,3. HRMS (Electronebulización, TOF EN)- iones negativos: M 410,0330, Calc. 410,0329,

#### Ejemplo 11

Sal amonio de (R<sub>p</sub>)-8-(2-tienil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (7b)

5 Una solución de (R<sub>p</sub>)-8-(2-tienil) adenosin-2' O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (6b) (1,33 g, 2,5 mmol) y NH<sub>4</sub>F (281 mg, 7,5 mmol) en DMF (15 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. Posteriormente, TMSOMe (1 ml) se añadió y la agitación continuó durante 24 h. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, el producto en bruto se suspendió en MeOH (10 ml) y se añadió Et<sub>2</sub>O (80 ml). El sólido de color castaño claro se retiró por filtración y secó; rendimiento 934 mg (86 %) de un sólido de color castaño claro. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz): δ 4,2 - 4,4 (3H, m), 5,20 (1H, d), 5,5 (1H, m), 6,00 (1H, s), 7,27 (1H, dd), 7,69 (1H, d), 7,75 (1H, d), 8,21 (1H, s).  
10 RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 68,5, 72,6, 73,2, 77,8, 94,2, 120,0, 129,3, 131,1, 131,2, 147,1, 151,8, 154,0, 156,8. RMN <sup>31</sup>P (CD<sub>3</sub>OD, 81 MHz): δ 58,0.

#### Ejemplo 12

Sal amonio de (R<sub>p</sub>)-8-(3-Furil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (7c)

15 Una solución de (R<sub>p</sub>)-8-(3-furil)adenosin-2' O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (6c) (1,9 g, 3,6 mmol) y NH<sub>4</sub>F (404 mg, 10,8 mmol) en DMF (20 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. Posteriormente, se añadió TMSOMe (1 ml) y la agitación continuó durante 24 h. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, el producto en bruto se suspendió en MeOH (10 ml) y se añadió Et<sub>2</sub>O (80 ml). El sólido de color castaño claro se retiró por filtración y se secó; rendimiento 1,38 g (89 %) de un sólido de color castaño claro. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 4,2 - 4,4 (3H, m), 5,24 (1H, d), 5,42 (1H, m), 5,88 (1H, s), 6,89 (1H, d), 7,69 (1H, t), 8,11 (1H, s), 8,18 (1H, s). RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 68,5, 72,4, 73,1, 77,7, 93,9, 111,3, 116,4, 119,9, 144,9, 145,8, 146,7, 151,4, 153,0, 156,2. RMN <sup>31</sup>P (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 81 MHz): δ 54,3.

#### Ejemplo 13

(R<sub>p</sub>)-8-Feniladenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (7e)

25 Se secó 8-feniladenosina (17e) (0,343 g, 1 mmol) mediante destilación azeotrópica repetida con piridina y después se disolvió en piridina (10 ml) que se acababa de destilar de hidruro de calcio en una atmósfera de gas argón con agitación continua. Se añadió cloruro de tiofosforilo (0,169 g, 1 mmol) en THF seco (2 ml) a la solución de piridina anterior en una atmósfera de argón a -12 °C durante 10 min. La mezcla se agitó a -12 °C durante 15 min antes de  
30 añadir la mezcla de reacción a una solución en agitación vigorosa de hidróxido sódico (0,240 g, 6 mmol) en agua (40 ml) a 60 °C y después de esto se vertió rápidamente sobre hielo seco picado. Cuando hubo cesado el desprendimiento de dióxido de carbono, los disolventes se retiraron por destilación a presión reducida. No se dejó durante la destilación que la temperatura del baño excediera 35 °C. El residuo sólido se lavó repetidamente con éter dietílico, se extrajo en metanol (5 ml), la mezcla se filtró y el filtrado se añadió lentamente con agitación vigorosa a THF (100 ml). La filtración a través de Celite y la evaporación del filtrado a presión reducida dejaron un material sólido. El producto fue una  
35 mezcla 1:1 de los diastereoisómeros (R<sub>r</sub>)- y (S<sub>p</sub>)-8-feniladenosin-3',5'-fosforotioicos cíclicos. Los isómeros se separaron cromatográficamente, momento en el que la mezcla se sometió a cromatografía preparativa de fase inversa sobre una columna de gel de sílice funcionalizada C18 usando como eluyente agua:metanol:ácido fórmico 80:20:0,5. Datos físicos para el compuesto del título: EM (Electronebulización; IEN negativa, *m/z*): 863,1 (8 %, 2 M+Na-2 H), 420 (100 %, M-1) 210,1 (35 %). RMN <sup>31</sup>P (CD<sub>3</sub>OD) (sal de sodio): 57,8 ppm. El isómero (S<sub>p</sub>)-8-feniladenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (7e) está disponible de forma similar después de la separación de HPLC.

#### 40 Ejemplo 14

2',3',5'-Tris-(O-acetil)-8-bromoadenosina (12)

45 Se añadió gota a gota anhídrido acético (5,66 ml, 60 mmol) a una solución de 8-bromoadenosina (11) (3,46 g, 10 mmol) en piridina (50 ml), seguido de DMAP (1 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La reacción se interrumpió mediante la adición de metanol (10 ml). La solución se evaporó a sequedad a presión reducida, el material residual se disolvió en acetato de etilo (250 ml), la solución se agitó con NaHCO<sub>3</sub> (100 ml), agua (3 x 50 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y la solución se concentró a presión reducida. El producto fue un sólido; rendimiento 3,21 g, (68 %).

#### Ejemplo 15

2',3',5'-Tris-(O-*terc*-butildimetilsilil)-8-bromoadenosina (13)

50 Se añadió TBDMS-Cl (2,30 g, 15,0 mmol) a una solución de 8-bromoadenosina (11) (1,32 g, 3,82 mmol) e imidazol (2,08 g, 30,5 mmol) en DMF (15 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se añadió NH<sub>4</sub>Cl acuoso saturado (35 ml) y la mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 40 ml). Los extractos orgánicos se lavaron con agua (2 x 15 ml), se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título; rendimiento 2,16 g (82 %).

## Ejemplo 16

## 2',3',5'-Tris-(O-acetil)-8-feniladenosina (14a)

Se disolvieron 2',3',5'-tris-(O-acetil)-8-bromoadenosina (12) (0,89 g, 1,88 mmol), TFP (0,17 g, 0,75 mmol) y Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>·CHCl<sub>3</sub> (0,10 g, 0,10 mmol) en DMF (14 ml) en una atmósfera de argón y la solución se calentó a 50 °C, momento en el que se añadió gota a gota Bu<sub>3</sub>SnPh (0,61 ml, 1,88 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 20 h y se evaporó a sequedad a presión reducida. El producto se aisló del material residual después de cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando EtOAc:MeOH 99:1; rendimiento 0,75 g (85 %). HRMS: M 469,1581. Calc. para C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>: 469,1597. EM (EI): M 469 (M, 12 %), 259 (25), 212 (27), 211 (68), 139 (40), 104 (9), 97 (18), 43 (100).

## Ejemplo 17

## 2',3',5'-Tris-(O-acetil)-8-(2-furil)adenosina (14b)

Se añadió 2-(tributilestanil)furano (12) (1,52 ml, 4,84 mmol) a una solución de 2',3',5'-tris-(O-acetil)-8-bromoadenosina (1,90 g, 4,03 mmol), TFP (0,37 g, 1,61 mmol) y Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>·CDCl<sub>3</sub> (0,21 g, 0,20 mmol) en DMF (30 ml) en una atmósfera de argón a 50 °C. La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante una noche, la solución se evaporó a presión reducida y el material del título se aisló del material residual después de cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando EtOAc:MeOH, 99:1; rendimiento 1,61 g (87 %). HRMS: M 458,1402. Calc. para C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>: 459,1390. EM (EI): 460 (M, 5 %), 459 (21), 259 (19), 202 (25), 201 (100), 174 (9), 157 (6), 139 (35), 97 (19), 43 (59).

## Ejemplo 18

## 2',3',5'-Tris-(O-acetil)-8-(3-furil)adenosina (14c)

Se añadió gota a gota 3-tributilestanilfurano (1,36 g, 3,81 mmol) a temperatura ambiente a una solución de 2',3',5'-tris-(O-acetil)-8-bromoadenosina (12) (1,50 g, 3,18 mmol), TFP (0,30 g, 1,27 mmol) y Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>·CHCl<sub>3</sub> (0,16 g, 0,16 mmol) en DMF (22,5 ml) en una atmósfera de argón a 50 °C. La temperatura se elevó a 110 °C y la mezcla de reacción se agitó durante una noche a esta temperatura. El disolvente se retiró a presión reducida y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando EtOAc:MeOH 99:1; rendimiento 1,25 g (86 %). HRMS: M 459,1384. Calc. para C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>: 459,1390. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ 1,97/2,01/2,08 (9H, s, 3 x COCH<sub>3</sub>), 4,26 - 4,48 (3H, m, H-5', C-4'), 5,97 - 6,02 (2H, m, H-1', H-3'), 6,31 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 6,58 (1H, dd, J 4,4 Hz, J' 5,8 Hz, H-2'), 6,81 - 6,82 (1H, m, furil-H), 7,53 - 7,54 (1H, m, furil-H), 7,93 - 7,94 (1H, m, furil-H), 8,27 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ 20,4/20,46/2,5 (3 x COCH<sub>3</sub>), 62,8 (C-5'), 70,7/71,9/80,1/87,4 (C-2', C-3', C-1', C-4'), 110,7/115,3 (C-4", C-3"), 119,5 (C-5), 143,3/144,0/145,0/150,5/152,7/155,3 (C-2", C-5", C-8, C-6, C-2, C-4), 169,3/169,4/170,5 (3 x COCH<sub>3</sub>). EM (EI): 460 (M, 6 %), 459 (28), 260 (6), 259 (54), 202 (34), 201 (100), 139 (81), 97 (39), 43 (92).

## Ejemplo 19

## 2',3',5'-Tris-(O-acetil)-8-(2-tienil) adenosina (14d)

Se añadió gota a gota 2-(tributilestanil)tiofeno (0,40 ml, 1,27 mmol) a una solución de 2',3',5'-tris-(O-acetil)-8-bromoadenosina (12) (0,50 g, 1,06 mmol), TFP (0,10 g, 0,42 mmol) y Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>·CHCl<sub>3</sub> (0,05 g, 0,05 mmol) en DMF (9 ml) en una atmósfera de argón a 50 °C. La mezcla resultante se calentó a 110 °C con agitación durante una noche. La mezcla se evaporó a sequedad a presión reducida y el compuesto del título se aisló después de cromatografía ultrarrápida del material residual usando EtOAc:MeOH 99:1; rendimiento > 80 %. HRMS: M 475,1158. Calc. para C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S: 475,1162. EM (EI): 476 (M, 3 %), 475 (14), 260 (7), 259 (31), 219 (6), 218 (20), 217 (100), 190 (7), 157 (9), 139 (42), 97 (21).

## Ejemplo 20

## 2',3',5'-Tris-(O-acetil)-8-(1-metil-2-pirrolil)adenosina (14e)

Se enjuagaron 2',2',5'-tris-(O-acetil)-8-bromoadenosina (12) (1,50 g, 3,18 mmol), tris(2-furil)fosfina (0,29 g, 1,27 mmol) y Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>·CHCl<sub>3</sub> (0,16 g, 0,16 mmol) en una atmósfera de argón y se disolvieron en DMF (10 ml). La mezcla se calentó a 50 °C, se añadió 1-metil-2-(tributilestaño)pirrol (1,41 g, 3,81 mmol) y la solución se calentó a 110 °C durante una noche. El disolvente se retiró a presión reducida y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando EtOAc:MeOH 99:1; rendimiento 1,15 g (77 %). HRMS: M 472,1716. Calc. para C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>: 472,1706. RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ 20,4/20,5/20,7 COCH<sub>3</sub>), 35,6 (NCH<sub>3</sub>), 63,0 (C-5'), 70,6/72,2 (C-2', C-3'), 79,7 (C-4'), 87,7 (C-1'), 108,3/114,3 (C-3", C-4"), 119,7/120,2 (C-5, C-2"), 126,9 (C-5"), 144,7 (C-8), 150,3 (C-4), 152,6 (C-2), 155,0 (C-6), 169,3/169,5/170,6 (3 x CO). EM (EI): M 473 (9 %), 472 (40), 215 (17), 214 (100)/213 (35), 139 (21), 97 (10).

## Ejemplo 21

## 2',3',5'-Tris-(O-acetil)-8-etiladenosina (14f)

Se añadió gota a gota  $\text{Et}_4\text{Sn}$  (0,84 ml, 4,24 mmol) a una solución de 2',3',5'-tris-(O-acetil)-8-bromoadenosina (12) (1,0 g, 2,12 mmol) y  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0,24 g, 0,21 mmol) en NMP (25 ml) en una atmósfera de argón a temperatura ambiente. La mezcla se calentó a 130 °C y la mezcla se calentó a esta temperatura durante 20 h. Se añadió EtOAc (100 ml) a la mezcla de reacción fría, la solución se lavó con agua (4 x 50 ml) y NaCl ac. saturado (50 ml). La solución orgánica se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), los disolventes se retiraron por destilación y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 10 % en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; rendimiento 0,51 g (57 %). HRMS: M 421,1585. Calc. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_7$ : 421,1597. RMN  $^1\text{H}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta$  1,36 (3H, t,  $J$  7,5 Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,98/2,03/2,09 (3 x 3H, s,  $\text{COCH}_3$ ), 2,77 - 2,78 (1H, m, H-3' o H-4')/ 2,83 - 2,90 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4,28 - 4,48 (3H, m, H-5', H-4' o H-3'), 5,87 - 5,93 (3H, m,  $\text{NH}_2$ , H-2' o H-1'), 6,25 - 6,29 (1H, m, H-1' o H-2'), 8,22 (1H, s, H-2). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta$  11,7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 20,4/20,5/20,6 (3 x  $\text{COCH}_3$ ), 21,2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 63,0 (C-5'), 70,5/72,3 (C-2', C-3'), 79,9/86,6 (C-4', C-1'), 118,7 (C-5), 150,7/152,2/153,8/154,7 (C-8, C-4, C-2, C-6), 169,4/169,4/170,5 (3 x CO). EM (EI): 421 (11), 362 (23), 259 (53), 192 (33), 164 (53), 163 (45), 139 (86), 97 (42), 43 (100).

## Ejemplo 22

## 2',3',5'-Tris-(O-acetil)-8-(1-etoxivinil)adenosina (14 g)

Se añadió gota a gota (1-etoxivinil)tributylestaño (0,60 ml, 1,78 mmol) a una solución de 2',3',5'-tris-(O-acetil)-8-bromoadenosina (12) (0,70 g, 1,48 mmol), TFP (0,14 g, 0,59 mmol) y  $\text{Pd}_2\text{dba}_3\cdot\text{CHCl}_3$  (0,08 g, 0,07 mmol) DMF (14 ml) en una atmósfera de argón a 50 °C. La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 17 h. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando EtOAc:MeOH 99:1; rendimiento 0,52 g (76 %) de un sólido de color blanco.

## Ejemplo 23

2',3',5' -Tris- (O-*terc*-butildimetilsilil)-8-metiladenosina (15a)

Se añadió gota a gota  $\text{AlMe}_3$  (2 M en tolueno, 0,44 ml, 0,87 mmol) a una solución de 8-bromo-2',3',5'-tris-(O-*terc*-butildimetilsilil)adenosina (13) (0,30 g, 0,44 mmol) y  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0,03 g, 0,02 mmol) en THF (5 ml) en una atmósfera de argón. La mezcla se calentó a 70 °C durante 4 h, momento en el que el análisis de TLC mostró que la reacción se había completado. La solución se evaporó a presión reducida y el producto se aisló después de cromatografía ultrarrápida del material residual sobre gel de sílice usando MeOH al 10 % en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; rendimiento 0,27 g (> 98 %).

## Ejemplo 24

2',3',5'-Tris-(O-*terc*-butildimetilsilil)-8-(2-furil)adenosina (15b)

Una solución de 8-bromo-2',3',5'-tris-O-(*terc*-butildimetilsilil)adenosina (13) (3,44 g, 5,0 mmol),  $\text{Pd}_2\text{dba}_3\cdot\text{CHCl}_3$  (65 mg, 0,063 mmol), tri(2-furil)fosfina (115 mg, 0,5 mmol) y 2-tributylestaniulfurano (1,9 ml, 6,0 mmol) en NMP (25 ml) se calentó a 80 °C durante 25 h. Se añadió EtOAc (300 ml) a la mezcla de reacción fría, la solución se agitó con agua (3 x 50 ml), la solución orgánica se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se evaporó y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando EtOAc:hexano, inicialmente 1:4, después 1:2. El producto fue un sólido de color blanco; rendimiento 2,94 g (87 %). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  -0,39 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si}$ ), -0,11 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si}$ ), -0,07 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si}$ ), -0,02 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si}$ ), 0,13 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si}$ ), 0,71 (9H, s, *t*-Bu-Si), 0,80 (9H, s, *t*-Bu-Si), 0,92 (9H, s, *t*-Bu-Si), 3,70 (1H, c), 4,0 - 4,1 (2H, m), 4,62 (1H, dd), 5,60 (1H, dd), 6,20 (1H, d), 6,5 (3H, m), 7,08 (1H, d), 7,60 (1H, d), 8,24 (1H, s, H-2). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz):  $\delta$  -5,6, -5,5, -5,2, -4,7, -4,60 y -4,58 ( $\text{SiCH}_3$ ), 17,8, 18,0 y 18,2 (C en *t*-Bu), 25,6, 25,7 y 25,8 ( $\text{CH}_3$  en *t*-Bu), 62,3, 72,0, 72,2, 85,1, 89,1, 111,7, 113,8, 120,0, 143,3, 143,4, 144,7, 150,6, 152,4, 155,6,

## Ejemplo 25

2',3',5'-Tris-(O-*terc*-butildimetilsilil)-8-feniladenosina (16a)

Se añadieron ácido fenilborónico (0,09 g, 0,76 mmol) y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (0,49 g, 1,53 mmol) a una solución de 2',3',5'-tris-(O-*terc*-butildimetilsilil)-8-bromoadenosina (13) (0,35 g, 0,51 mmol) y  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0,06 g, 0,05 mmol) en dioxano (5 ml) en una atmósfera de argón a temperatura ambiente. La mezcla se calentó a 100 °C, se añadió agua hasta que se hubo disuelto todo el  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  y la solución se calentó a reflujo durante una noche. Se añadió EtOAc (15 ml) a la mezcla de reacción fría que posteriormente se agitó con agua (10 ml). La solución orgánica se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se evaporó y el compuesto del título se aisló del material residual después de cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando EtOAc:MeOH 99:1; rendimiento 0,31 g (89 %). RMN  $^1\text{H}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta$  -0,42/-0,12/0,04/0,05/0,09/0,11 (18H, s, 3 x  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0,69/0,87/0,88 (27H, s, 3 x  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 3,75 (1H, dd,  $J$  4,7 Hz,  $J'$  10,6 Hz, H-5'), 3,98 - 4,02 (1H, m, H-4'), 4,12 (1H, dd,  $J$  8,2 Hz,  $J'$  10,6 Hz, H-5'), 4,51 (1H, dd,  $J$  2,1 Hz,  $J'$  4,3 Hz, H-3'), 5,61 (1H, dd,  $J$  4,3 Hz,  $J'$  6,6 Hz, H-2'), 5,96 (1H, d,  $J$  6,6 Hz, H-1'), 6,06 (2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 7,46 - 7,51 (3H, m, H-3", H-4", H-5"), 7,76 - 7,79 (2H, m, H-2", H-6"), 8,35 (1, s, H-2). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta$  -5,5/-5,4/-5,3/-4,7/-4,4 (3 x  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ )/ 17,8/18,0/18,3 (3 x  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 25,7/25,8/25,9 (3 x  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 61,7 (C-5'), 71,7/72,5 (C-2', C-3'), 85,5/88,6 (C-4', C-1'), 119,9 (C-5), 128,7/129,1/129,8/130,3 (fenilo), 150,9/151,9/153,1/155,1 (C-6, C-8, C-2, C-4).

55

## Ejemplo 26

2',3',5'-Tris-(*O*-*terc*-butildimetilsilil)-8-(3-tienil)adenosina (16b)

Se añadieron ácido 3-tiofenborónico (0,14 g, 1,09 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,71 g, 2,18 mmol) a una solución de 2',3',5'-tris-(*O*-*terc*-butildimetilsilil)-8-bromoadenosina (13) (0,50 g, 0,73 mmol) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,08 g, 0,07 mmol) en dioxano (7 ml) en una atmósfera de argón. La mezcla se calentó a 100 °C y se añadió agua (1 ml) para disolver todo el Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La solución se calentó a reflujo durante una noche, se enfrió a temperatura ambiente y se añadió EtOAc (20 ml). La solución se agitó con agua (15 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó a presión reducida. El producto se aisló del material residual después de cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice EtOAc:MeOH 99:1; rendimiento 0,43 g (86 %). HRMS: M 691,3425. Calc. para C<sub>32</sub>H<sub>57</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>SSi<sub>3</sub>: 691,3439. RMN <sup>1</sup>H: (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); δ -0,39/-0,11/-0,01/0,002/0,12/0,13/0,70/0,84/0,91 (45 H, s, 3 x Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3,74 (1H, dd, J 4,0 Hz, J' 10,2 Hz, H-5'), 4,00 - 4,11 (2H, m, H-5', H-4'), 4,60 (1H, dd, J 2,7 Hz, J' 4,3 Hz, H-3'), 5,58 (1H, dd, J 4,3 Hz, J' 6,0 Hz, H-2'), 5,88 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 6,03 (1H, d, J 6,0 Hz, H-1'), 7,43 (1H, dd, J 2,9 Hz, J' 5,0 Hz, H-5"), 7,54 (1H, dd, J 1,2 Hz, J' 5,0 Hz, H-4"), 7,90 (1H, dd, J 1,2 Hz, J' 2,9 Hz, H-2"). RMN <sup>13</sup>C: (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz); δ -5,5/-5,4/-5,2/-4,7/-4,6/-4,5 (6 x SiCH<sub>3</sub>), 17,9/18,0/18,3 (3 x SiCCH<sub>3</sub>), 25,7/25,8/25,8 (9 x SiCCH<sub>3</sub>), 62,5 (C-5'), 72,0/72,3 (C-2', C-3'), 85,2/88,7 (C-1', C-4'), 119,8 (C-5), 126,6/127,9/128,4/130,0 (C-2", C-3", C-4", C-5"), 148,6/150,8/152,2/155,2 (C-8, C-4, C-2, C-6). EM (EI): 691 (M, 0,6 %), 636 (26), 624 (100), 374 (25), 147 (15), 89 (21), 73 (91).

## Ejemplo 27

2',3',5'-Tris-O-(*terc*-butildimetilsilil)-8-(3-piridinil)adenosina (16c)

Se añadieron ácido piridin-3-borónico (0,59 g, 0,48 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,11 g, 9,57 mmol) a una solución de 2',3',5'-tris-O-(*terc*-butildimetilsilil)-8-bromoadenosina (13) (2,20 g, 3,19 mmol) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,37 g, 0,32 mmol) en dioxano (50 ml) en una atmósfera de argón. Se añadió agua (10 ml) para disolver toda el Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La solución se calentó a reflujo durante una noche. Se añadió EtOAc (200 ml) a la mezcla de reacción fría, la solución resultante se agitó con agua (100 ml), la solución orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>), se evaporó y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando EtOAc:MeOH 99:1; rendimiento 1,76 g (80 %). HR-IEN: M+H 687,3900. Calc. para C<sub>33</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>3</sub> + H: 687,3900. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ -0,41/-0,12/0,01/0,02/0,09/0,11 (18 H, s, 3 x Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,67/0,85/0,86 (27 H, s, 3 x SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3,71 - 4,12 (3H, m, H-5', H-3' o H-4'), 4,53 - 4,55 (1H, m, H-4' o H-3'), 5,61 - 5,65 (1H, m, H-2'), 5,81 (1H, d, J 6,3 Hz, H-1'), 6,02 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 7,38 - 7,42 (1H, m, H-5'), 8,09 - 8,12 (1H, m, H-4"), 8,30 (1H, s, H-2), 8,73 - 8,75 (1H, m, H-6"), 9,04 - 9,05 (1H, m, H-2"). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ -5,5/-5,4/-5,3/-4,7/-4,6/-4,5 (3 x Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 17,2/18,0/18,3 (3 x SiC), 25,6/25,8/25,8 (3 x SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 62,5 (C-5'), 71,7/72,4 (C-2', C-3'), 85,5/88,9 (C-4', C-1'), 120,1/123,1/125,7/136,9/14 9,9/150,4/151,0/151,1/152,6/15 5,6 (C-5, C-5", C-3", C-4", C-6, C-8, C-6", C-2", C-2, C-4).

## Ejemplo 28

2',3',5'-Tris-(*O*-*terc*-butildimetilsilil)-8-(4-piridinil)adenosina (16d)

Una solución de ácido piridin-4-borónico (0,27 g, 2,18 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,42 g, 4,35 mmol) en agua (11 ml) se añadió a una solución de 2',3',5'-tris-(*O*-*terc*-butildimetilsilil)-8-bromoadenosina (13) (1,0 g, 1,45 mmol) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,17 g, 0,15 mmol) en dioxano (25 ml) y la mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante una noche. Se añadió EtOAc (80 ml) a la mezcla de reacción fría y la mezcla resultante se agitó con agua (50 ml). La solución fría (MgSO<sub>4</sub>) se evaporó y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando EtOAc:MeOH 99:1; rendimiento 0,58 g (58 %). HR-IEN: M+H 687,3883. Calc. para C<sub>33</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>3</sub> + H: 687,3900. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ -0,43/-0,12/0,02/0,04/0,09/0,11 (18 H, s, 3 x Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,67/0,86/0,87 (27 H, s, 3 x SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3,72 - 3,76 (1H, m, H-5'), 4,02 - 4,13 (2H, m, H-4' o H-3' y H-5'), 4,49 - 4,51 (1H, m, H-3" o H-4'), 5,61 - 5,65 (1H, m, H-2'), 5,92 (1H, d, J 6,6 Hz, H-1'), 6,08 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 7,71 - 7,73 (2H, m, H-2" y H-6"), 8,30 (1H, s, H-2), 8,75 - 8,77 (2H, m, H-3" y H-5"). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ -5,5/-5,4/-5,3/-4,7/-4,5 (3 x Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 17,8/17,9/18,3 (3 x SiC), 25,6/25,7/25,8 (3 x SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 62,5 (C-5'), 71,6/72,4 (C-2', C-3'), 85,7/88,6 (C-4', C-1'), 120,1/123,7/136,9/150,3/151,1/152,9/155,7 (C-5, C-5", C-3", C-6, C-8, C-6", C-2", C-2, C-4, C-1").

## Ejemplo 29

## 8-(2-Furil)adenosina (17a) (hidrólisis de éster)

Una solución de 2',3',5'-tris-(*O*-acetil)-8-(2-furil)adenosina (14b) (1,39 g, 3,03 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,14 g, 1,01 mmol) en MeOH (50 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió Gel de Sílice a la solución, la suspensión se agitó y se evaporó a sequedad y el material residual se aplicó sobre la parte superior de una columna con gel de sílice para cromatografía ultrarrápida. La columna se desarrolló con MeOH al 15 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; rendimiento 0,68 g (67 %).

## Ejemplo 30

## 8-(2-Furil)adenosina (17a) (desililación)

Una solución de 2',3',5'-tris-(*O*-*terc*-butildimetilsilil)-8-(2-furil)adenosina (15b) (2,78 g, 4,1 mmol) y TBAF x 3 H<sub>2</sub>O (5,30 g, 16,8 mmol) en THF (70 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se retiró por destilación y el producto se purificó por cromatografía ultrarrápida usando MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:9, y el producto se trituró con una pequeña cantidad de MeOH; rendimiento 1,24 g (90 %) de un sólido de color castaño claro. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz): δ 3,5 (1H, m), 3,70 (1H, dt), 3,99 (1H, m), 4,20 (1H, m), 5,0 - 5,2 (2H, m), 5,45 (1H, d), 6,76 (1H, c), 7,13 (1H, dd), 7,56 (2H, s a, NH<sub>2</sub>), 8,00 (1H, d), 8,14 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 50 MHz): δ 62,2, 71,0, 71,6, 86,7, 89,3, 112,1, 113,9, 119,4, 141,5, 143,2, 145,5, 149,6, 152,3, 156,2.

## Ejemplo 31

## 8-(2-Tienil)adenosina (17b)

Una solución de 2',3',5'-tris-(*O*-acetil)-8-(2-tienil)adenosina (14d) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH se agitó a temperatura ambiente durante una noche, se evaporó a sequedad a presión reducida y el compuesto del título se aisló del material residual después de cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 10 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; rendimiento > 60 %. HRMS: M 349,0832. Calc. para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S: 349,0845. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>); δ 3,51 - 3,73 (2H, m, H-5'), 3,98 - 3,99 (1H, m, H-4'), 4,19 - 4,20 (1H, m, H-3'), 5,16 - 5,21 (2H, m, H-2', 3'-OH), 5,53 (1H, d, J 6,3 Hz, 2'-OH), 5,80 (1H, dd, J 3,4 Hz, J' 8,9 Hz, 5'-OH), 6,00 (1H, d, J 7,0 Hz, H-1'), 7,28 (1H, dd, J 3,7 Hz, 5,0 Hz, H-4''), 7,51 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 7,65 (1H, dd, J 0,9 Hz, J' 3,7 Hz, H-3''), 7,86 (1H, dd, J 0,9 Hz, J' 5,0 Hz, H-5''), 8,14 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>); δ 62,2 (C-5'), 71,1 / 71,4 (C-2', C-3'), 86,77 (C-4'), 89,2 (C-1'), 119,2 (C-5), 128,2/129,9/130,0 (C-3'', C-4'', C-5''), 130,7 (C-2''), 145,0 (C-8), 150,0 (C-4), 152,2 (C-2), 156,0 (C-6). EM (EI): 350 (M, 0,3 %), 349 (4), 260 (6), 219 (6), 218 (20), 217 (100), 190 (14), 110 (10).

## Ejemplo 32

## 8-(3-Furil)adenosina (17c)

Una solución de 2',3',5'-tris-(*O*-acetil)-8-(3-furil)adenosina (14c) (0,95 g, 2,07 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,10 g, 0,69 mmol) en MeOH (35 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió gel de sílice, la suspensión se agitó y el disolvente se retiró por evaporación a presión reducida. El material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 15 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; rendimiento 0,50 g (72 %). HR-IEN: M+H 350,0902. Calc. para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S + H: 350,0917. M+Na: 372,0747. Calc. para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S + Na: 372,0736. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>); δ 3,53 - 3,60 (2H, m, C-5'), 3,99 - 4,00 (1H, m, H-4'), 4,19 - 4,22 (1H, m, H-3'), 5,06 - 5,13 (1H, m, H-2'), 5,24 (1H, d, J 4,6 Hz, 3'-OH), 5,52 (1H, d, J 6,6 Hz, 2'-OH), 5,87 - 5,94 (2H, m, 5'-OH, H-1'), 6,94 (1H, d, J 1,2 Hz, H-4''), 7,48 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 7,92/8,14 (2H, s, H-1'', H-5''), 8,24 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>); δ 62,2 (H-5'), 71,1/71,7/86,9/89,0 (C-2', C-3', C-4', C-1'), 111,1/115,6 (C-4'', C-3''), 119,2 (C-5), 143,6/144,2/144,5/149,7/151,9/156,0 (C-2'', C-5'', C-6, C-8, C-2, C-4).

## Ejemplo 33

## 8-(3-Tienil)adenosina (17d)

Una solución de 2',3',5'-tris-(*O*-*terc*-butildimetilsilil)-8-(3-tienil)adenosina (16b) (1,21 g, 1,75 mmol) y TBAF (1,83 g, 6,99 mmol) en THF (67 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se retiró por destilación y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 10 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; rendimiento 0,51 g (84 %). HR-IEN: M+H 350,0902. Calc. para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S + H: 350,0917. M+Na 372,0747. Calc. para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S + Na: 372,0736. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, DMSO); δ 3,51 - 3,73 (2H, m, H-5'), 3,96 - 3,97 (1H, m, H-4'), 4,17 - 4,21 (1H, m, H-3'), 5,11 - 5,18 (1H, m, H-2'), 5,20 (1H, d, J 4,4 Hz, 3'-OH), 5,54 (1H, d, J 6,4 Hz, 2'-OH), 5,85 - 5,90 (2H, m, 5'-OH o H-1'), 7,47 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 7,52 (1H, dd, J 1,2 Hz, J' 5,0 Hz, H-4''), 7,78 (1H, dd, J 2,9 Hz, J' 5,0 Hz, H-5''), 8,05 (1H, dd, J 1,2 Hz, J' 2,9 Hz, H-2''), 8,14 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>); 62,3 (C-5'), 71,1/71,5 (C-2', C-3'), 86,8/87,0 (C-4'', C-1'), 119,0 (C-5), 127,5/128,3/128,4/130,0 (C-2'', C-3'', C-4'', C-5''), 146,7/149,6/152,0/156,1 (C-8, C-4, C-2, C-6).

## Ejemplo 34

## 8-Feniladenosina (17e)

Una solución de 2',3',5'-tris-(*O*-acetil)-8-feniladenosina (14a) (0,73 g, 1,56 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,07 g, 0,52 mmol) en MeOH (23 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se añadió gel de sílice (aprox. 2 g). La suspensión se agitó y se evaporó a sequedad a presión reducida. El material residual se añadió sobre la parte superior de una columna de cromatografía ultrarrápida del gel de sílice y la columna se desarrolló con MeOH al 10 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; rendimiento 0,48 g (91 %). HRMS: M 343,1287. Calc. para C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: 343,1281. EM (EI): 343 (M, 1 %), 254 (9), 240 (7), 212 (25), 211 (100), 184 (12), 104 (12).

## Ejemplo 35

## 8-(3-Piridinil)adenosina (17f)

Una solución de 2',3',5'-tris-*O*-(*terc*-butildimetilsilil)-8-(3-piridinil)adenosina (16c) (0,56 g, 0,82 mmol) y TBAF (0,85 g,

3,26 mmol) en THF (31 ml) en una atmósfera de argón se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se retiró por destilación y el material residual se disolvió en MeOH (10 ml). La solución se dejó a 0 °C durante una noche y el compuesto del título se aisló por filtración. RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DMSO); δ 62,27 (C-5'), 71,13/71,62 (C-2', C-3'), 86,95/89,27 (C-4, C-1), 119,33/123,69/125,71/137,20/148,20/149,80/149,85/150,88/152,33/156,34 (C-5, C-5", C-3", C-4", C-6, C-8, C-6", C-2", C-2, C-4). EM (EI): 344 (M, 2 %), 255 (5), 241 (5), 213 (22), 212 (100), 211 (5)185 (12), 104 (12).

## Ejemplo 36

## 8-(4-Piridinil) adenosina (17g)

Se añadió TBAF (7,39 ml, 1 M, 7,39 mmol) a una solución de 2',3',5'-tris-(*O*-*terc*-butildimetilsilil)-8-(4-piridinil)adenosina (16d) (1,27 g, 1,85 mmol) en THF (28 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La solución se evaporó a sequedad a presión reducida y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 15 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; rendimiento 0,46 g (72 %). HR-IEN: M+H 345,1313. Calc. para C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> + H: 345,1305. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, DMSO); δ 3,51 - 3,60 (2H, m, H-5'), 3,97 - 3,98 (1H, m, H-4' o H-3'), 4,15 - 4,19 (1H, m, H-3' o H-4'), 5,13 - 5,19 (1H, m, H-2') 5,22 (1H, d, *J* 4,4 Hz, 3'-OH), 5,54 (1H, d, *J* 6,5 Hz, 2'-OH), 5,75 (1H, d, *J* 7,3 Hz, H-1'), 5,74 - 5,81 (1H, m, 5'-OH), 7,66 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 7,74 - 7,76 (2H, m, H-2'' y H-6''), 8,19 (1H, s, H-2), 8,80 - 8,82 (2H, m, H-3'' y H-5''). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DMSO); δ 62,2 (C-5'), 71,0/71,4 (C-2', C-3'), 87,0/89,1 (C-4', C-1'), 119,4 (C-5), 123,8 (C-2'', C-6''), 150,3 (C-3' y C-5'), 136,9/148,4/150,0/152,7/156,5 (C-6, C-8, C-2, C-4, C-1'').

## Ejemplo 37

## 8-(1-Metil-2-pirrolil)adenosina (17h)

Una solución de 2',3',5'-tris-(*O*-acetil)-8-(1-metil-2-pirrolil)adenosina (14e) (1,04 g, 2,20 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,10 g, 0,73 mmol) en MeOH (37 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche, la solución se evaporó a presión reducida y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 15 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; rendimiento 0,64 g (84 %). HRMS: M 346,1371. Calc. para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: 346,1390. RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DMSO); δ 35,1 (NCH<sub>3</sub>), 62,4 (C-5'), 71,2/71,4 (C-2', C-3'), 86,6/89,0 (C-4', C-1'), 107,71/113,9 (C-3'', C-4''), 119,2/120,4 (C-5, C-2''), 126,8 (C-5''), 144,1 (C-8), 149,2 (C-4), 151,7 (C-2), 155,9 (C-6). EM (EI): M<sup>+</sup> 346 (5 %), 215 (11), 214 (100), 213 (60), 129 (12), 128 (8), 115 (35), 97 (9), 69 (12).

## Ejemplo 38

## 8-Metiladenosina (17i)

Una solución de 8-bromo-2',3',5'-tris-(*O*-*terc*-butildimetilsilil)adenosina (15a) (1,41 g, 2,26 mmol) y TBAF (2,37 g, 9,05 mmol) en THF (30 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se retiró por destilación y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 15 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; rendimiento 0,59 g (93 %).

## Ejemplo 39

## 8-Etiladenosina (17j)

Una solución de 2',3',5'-tris-(*O*-acetil)-8-etiladenosina (14f) (0,63 g, 1,5 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,07 g, 0,50 mmol) en MeOH (19 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Se añadió gel de sílice, la suspensión se agitó y el disolvente se retiró por evaporación a presión reducida. El material residual se aplicó en la parte superior de una columna de cromatografía ultrarrápida del gel de sílice y la columna se desarrolló con MeOH al 15 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; rendimiento 0,23 g, 52 %.

## Ejemplo 40

## 8-(1-Etoxivinil)adenosina (17k)

Una solución de 2',3',5'-tris-(*O*-acetil)-8-(1-etoxivinil) adenosina (14g) (0,53 g, 1,15 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,05 g, 0,38 mmol) en MeOH (17 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 24 h, momento en el que el análisis de TLC mostró conversión completa. Se añadió gel de sílice a la solución, la suspensión se agitó y se evaporó a sequedad a presión reducida. El material residual se aplicó en la parte superior de una columna de cromatografía ultrarrápida del gel de sílice que se desarrolló con MeOH al 10 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; rendimiento 0,37 g (> 95 %). HRMS: M 337,1395. Calc. para C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: 337,1386. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>); δ 1,31 (3H, t, *J* 6,9 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,53 - 3,71 (2H, m, H-5')/3,94 (2H, *J* 13,9 Hz, *J'* 6,9 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,90 - 3,98 (1H, m, H-4'), 4,19 - 4,22 (1H, m, H-3'), 4,76 - 4,79 (2H, m, CCH<sub>2</sub>), 5,0 - 5,02 (1H, m), 5,1 (1H, d, 4,15 Hz), 5,29 (1H, d, *J* 6,3 Hz), 5,71 - 5,75 (1H, m, H-2'), 5,97 (1H, d, *J* 6,8 Hz, H-1'), 7,51 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 8,12 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DM2 (C-1', C-4', CCH<sub>2</sub>), 118,5 (C-5), 146,7/149,3/150,6/152,4/156,5 (C-6, C-8, C-2, C-4, CCH<sub>2</sub>). EM (EI): 337 (M, 8 %), 308 (18), 278 (17), 234 (21), 205 (96), 190 (100), 178 (47), 161 (80), 135 (16).

## Ejemplo 41

## 8-Acetiladenosina (171)

Se añadió HCl 1 M (10 ml) a una solución de 8-etoxiviniladenosina (17k) (1,48 g, 4,37 mmol) en THF (40 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso a pH neutro y la mezcla se aplicó directamente sobre una columna de cromatografía ultrarrápida gel de sílice que se desarrolló con MeOH al 15 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; rendimiento 1,17 g (87 %). RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>); δ 2,72 (3H, s, COCH<sub>3</sub>), 3,52 - 3,71 (2H, m, H-5'), 3,94 - 3,96 (1H, m, H-4' el. H-3'), 4,10 - 4,23 (1H, m, H-3' o H-4'), 4,94 (1H, m, H-2'), 5,11 (1H, d, J 4,4 Hz, 3'-OH), 5,24 (1H, d, J 6,1 Hz, 2'-OH), 5,56 - 5,59 (1H, m, 5'-OH), 6,76 (1H, d, J 6,5 Hz, H-1'), 7,87 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 8,21 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>); δ 27,9 (CH<sub>3</sub>), 62,3 (C-5'), 70,9/72,0 (C-2', C-3'), 86,3/89,3 (C-4', C-1'), 118,7 (C-5), 143,7/150,5/154,7/157,7 (C-6, C-8, C-2, C-4), 191,7 (CO).

## Ejemplo 42

## 8-(1-Hidroxietil) adenosina (17m)

Se añadió NaBH<sub>4</sub> (0,19 g, 5,05 mmol) a una solución de 8-acetiladenosina (17l) (0,78 g, 2,52 mmol) en THF (35 ml) y MeOH (4 ml) en una atmósfera de argón y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla se trató gota a gota con HCl 1 M hasta pH neutro y la mezcla se aplicó en la parte superior de una columna de cromatografía ultrarrápida que se desarrolló con MeOH al 30 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; rendimiento 0,46 g (59 %). El producto fue una mezcla de los dos epímeros de alcohol, relación 1:1.

## Ejemplo 43

O-éster metílico de (R<sub>p</sub>)-adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (19)

Una solución de adenosina (9) (0,106 g, 0,4 mmol) en DMF seca (7 ml) se añadió a tetrazol 0,5 M (0,45 ml, 0,2 mmol) en acetonitrilo y la solución se calentó en una atmósfera de argón a 60 °C. Después, se añadió lentamente bis(N,N-diisopropilamino)metoxifosfina (0,105 g, 0,4 mmol) y la mezcla de reacción se dejó a esta temperatura durante 15 min. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió azufre (0,013 g, 0,4 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 h. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida. El sólido residual fue una mezcla de (R<sub>p</sub>)-adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico y su isómero (S<sub>p</sub>) en la relación 2:3. Los isómeros se separaron por HPLC preparativa sobre gel de sílice funcional C18 de fase inversa. El rendimiento aislado del compuesto del título fue 0,018 g (12 %). RMN <sup>31</sup>P (DMSO-d<sub>6</sub>): 66,4 ppm. RMN <sup>1</sup>H: 3,83 (d, J 10 Hz, 3H, HMe) 4,2 - 5,0 (6H, m, H-2", H-3', H 4 x, H-5', OH), 6,14 (1H, s, H-D, 8,34 (1H, s, H-2), 8,88 (1H, s, H-8).

## Ejemplo 44

30 S-metil pivalato de (R<sub>p</sub>)-8-(2-tienil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (26)

Se disolvió sal amonio de (R<sub>p</sub>)-8-(2-tienil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (7b) (0,2 mmol) en metanol (5 ml) y se añadió trietilamina (0,3 mmol). La evaporación de la mezcla de reacción al vacío dejó la sal trietilamonio de (R<sub>p</sub>)-8-(2-tienil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico. Parte de este producto (74 mg, 0,14 mmol) y NaI (20 mg, 0,11 mmol) se disolvieron en DMF (3 ml) en una atmósfera de argón y se añadió pivalato de clorometilo (20 mg, 0,11 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, inicialmente 3:97 y después 5:95; rendimiento 30 mg (40 %) de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz): δ 1,22 (9H, s), 4,5 - 4,8 (3H, m), 5,26 (1H, d), 5,45 (1H, d), 5,49 (1H, s), 5,57 (1H, d), 5,7 - 5,8 (1H, m), 6,11 (1H, s), 7,26 (1H, dd), 7,65 (1H, dd), 7,75 (1H, dd), 8,22 (1H, s). RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz): δ 27,3.

## 40 Ejemplo 45

S-Metil pivalato de (R<sub>p</sub>)- y (S<sub>p</sub>)-8-feniladenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (27)

Una mezcla diastereomérica en bruto 1:1 de (R<sub>p</sub>)- y (S<sub>p</sub>)-8-feniladenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (7e) en forma de su sal sódica (150 mg, 0,34 mmol) se disolvió en metanol (5 ml), se añadió yoduro sódico (51 mg, 0,34 mmol), seguido de pivalato de clorometilo (61 mg, 0,41 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en una atmósfera de argón y se calentó a reflujo durante 6 h. La mezcla se evaporó a sequedad a presión reducida y el residuo sólido se extrajo varias veces con diclorometano. Los extractos se recogieron y se evaporaron para producir un sólido de color parduzco (142 mg). A partir de la RMN de fósforo fue evidente que el producto en bruto consistió únicamente en los compuestos del título con aproximadamente una relación 1:1. Después, los diaestereoisómeros se separaron por cromatografía ultrarrápida de gel de sílice usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 95:1.

50 S-Metil pivalato de (R<sub>p</sub>)-8-feniladenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (27)

El producto sólido se aisló con un rendimiento del 16 % (28 mg). RMN <sup>31</sup>P (CD<sub>3</sub>OD): 27,5 ppm. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): δ 1,30 (9H, s), 3,01 (2H, c), 3,36 (2H, c), 5,28 (1H, d), 5,54 (1H, d), 5,60 (1H, d), 6,05 (1H, s), 7,2 - 7,5 (5H, m), 8,40 (1H, s).

S-Metil pivalato de (Sp)8-feniladenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (27)

El producto sólido se aisló con un rendimiento del 20 % (36 mg). RMN <sup>31</sup>P (CD<sub>3</sub>OD): 24,0 ppm. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): δ 1,32 (9H, s, ), 2,89 (2H, c), 3,46 (2H, c), 5,13 (1H, d) 5,30 (1H, d)/ 5,40 (1H, d), 6,21 (1H, s), 7,2 - 7,5 (5H, m), 8,38 (1H, s).

#### 5 Ejemplo 46

Actividad enzimática PKA I $\alpha$

En un ensayo colorimétrico de Cook acoplado se ensayó la fuerza del AMPSc Rp-8-carbamoilado para determinar la actividad enzimática de la PKA de tipo I $\alpha$  con respecto al Rp-8-Br-AMPSc. El resultado se indica en la Tabla 1 siguiente:

10

Tabla 1

Compuesto	Fuerza
Rp 8-(2-furil)-AMPSc	4,24
Rp 8-(2-tienil)-AMPSc	3,01
Rp 8-(3-furil)-AMPSc	2,23
Rp 8-(3-tienil)-AMPSc	1, 83
Rp 8- (fenil)-AMPSc	1,28
Rp 8-bromo-AMPSc	1,00

#### Ejemplo 47

8-Bromoadenosin-3',5'-ácido fosfórico cíclico (1)

15

Se añadió bromo (15,4 ml, 0,3 0 mol) con agitación a una solución de AMPc (98,8 g, 0,3 0 mol) y acetato sódico trihidrato (81,6 g, 0,60 mol) en agua (1,5 l) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de 24 h, se añadió lentamente sulfito sódico hasta la desaparición del color rojo oscuro. El precipitado se recogió por filtración, el sólido se lavó con agua, alcohol isopropílico y éter dietílico antes de secarse a presión reducida. El producto se dispersó en agua (500 ml) y se disolvió mediante adición lenta de bicarbonato sódico (1 equiv.). Cuando se hubo disuelto todo el material, se añadieron pequeñas porciones de sulfito sódico para retirar el color rojo oscuro de la solución. La precipitación del producto se efectuó mediante la adición gota a gota de ácido bromhídrico 1,0 M con agitación vigorosa. El precipitado se recogió, se lavó con agua, alcohol isopropílico, éter dietílico y el polvo de color amarillo claro se secó a alto vacío; rendimiento 92,0 g (76 %). La RMN <sup>1</sup>H estuvo de acuerdo con la bibliografía.

20

#### Ejemplo 48

(Sp)8-Bromoadenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (4)

25

Se puso DMF seca (0,289 g, 3,96 mmol) en THF seco (20 ml) en una atmósfera de gas argón y se enfrió a 0 °C antes de añadir lentamente cloruro de oxalilo en diclorometano (2 ml, 2 M, 4 mmol). El baño de refrigeración se retiró y la suspensión se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 30 min, la mezcla de reacción se enfrió a -7 °C y se añadió a una solución de 8-bromoadenosin-20-TBDMS-3,5-monofosfato cíclico de tributilamonio (1) (2,55 g, 3,60 mmol) en diclorometano seco (8 ml). La mezcla se agitó a esta temperatura durante 1 h, se dejó que alcanzara temperatura ambiente y se añadió anilina (3,35 g, 36 mmol) seca (CaH<sub>2</sub>). Después de 3 h, la mezcla de reacción turbia se diluyó a 100 ml con diclorometano y se lavó con hidrogenocarbonato sódico saturado frío (3 x 25 ml). Después, la fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, el disolvente se retiró a presión reducida y el material residual se añadió lentamente con agitación vigorosa a ciclohexano (100 ml). El precipitado se secó y se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando metanol al 7 % en diclorometano como eluyente; rendimiento 1,46 g (68 %). La RMN <sup>1</sup>H estuvo de acuerdo con la bibliografía.

30

#### 35 Ejemplo 49

(Sp)8-(5-Metil-2-furil)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5e)

40

Se calentaron juntos DMF desgasificada seca (6 ml), acetato de paladio (0,0169 g, 0,07 mmol) y trifenilfosfina (0,041 g, 0,158 mmol) a 50 °C en una atmósfera de argón hasta que se produce una mezcla de color rojo intenso y homogénea (aprox. 15 min). Se añadieron 2-tributilestanil-5-metilfurano (0,904 mmol) y (Sp)8-bromoadenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (0,450 g, 0,753 mmol) y la mezcla se calentó a 80 °C durante 4 h. El disolvente se retiró por destilación, el residuo se disolvió en diclorometano (3 ml) y la solución se añadió con agitación vigorosa a hexano (50 ml). La cromatografía ultrarrápida del precipitado sobre gel de

silíce con metanol al 7 % en diclorometano proporcionó el producto, rendimiento: 0,405 g (90 %). HRMS (electronebulización): (M+H) 599,2181. Calc. para  $C_{27}H_{35}N_6O_6PSi + H$ : 599,2197. RMN  $^{31}P$  ( $CDCl_3$ , 81 MHz): RMN  $^1H$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  -0,130 (3H, s,  $CH_3Si$ ), -0,09 (3H, s,  $CH_3Si$ ), 0,730 (9H, s,  $(CH_3)_3C$ ), 2,40 (3H, s,  $CH_3$ -Fur), 4,3 - 4,7 (3H, m, H4' H5'), 5,21 (1H, d,  $J$  5,2 Hz, H2'), 5,6 - 5,7 (1H, m, H3'), 6,30 (1H, s, H1'), 6,41 (1H, d,  $J_{PH}$  3,3 Hz, NH), 6,9 - 7,2 (6H, m, H-Ar), 8,23 (1H, s, H2), 7,52 (2H, s a,  $NH_2$ ), 8,54 (1H, d,  $J$  9,4 Hz, H-Fur). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75 MHz):  $\delta$  -5,5, -5,0, 13,4, 17,7, 25,4, 68,3, 70,1, 72,2, 76,3, 93,5, 108,6, 115,0, 118,4, 118,5, 119,0, 128,8, 139,5, 140,5, 141,5, 149,8, 153,1, 154,8, 155,9.

## Ejemplo 50

(Sp)8-(5-Metoxi-2-furil)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5f)

- 10 Una solución de acetato de paladio (16,9 mg, 0,075 mmol) y trifenilfosfina (41,5 mg, 0,158 mmol) en DMF desgasificada seca (6 ml) se calentó a 50 °C en una atmósfera de argón durante 15 min (color rojo intenso) antes de añadir 2-(tributilestanil)-5-metoxifurano (0,387 g, 1,00 mmol) y (Sp)8-bromoadenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (4) (0,450 g, 0,753 mmol). La mezcla se calentó a 85 °C durante 4 h. El disolvente se retiró al vacío, el material residual se disolvió en diclorometano (3 ml),
- 15 la solución se añadió lentamente a hexano en agitación vigorosa (50 ml) y el material precipitado se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando metanol al 7 % en diclorometano; rendimiento 310 mg (67 %). HRMS (electronebulización): (M+H) 615,2118. Calc. para  $C_{27}H_{35}N_6O_7PSi + H$ : 615,2146. RMN  $^{31}P$  ( $CDCl_3$ , 81 MHz):  $\delta$  3,05. RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 200 MHz):  $\delta$  -0,02 (1H, s,  $CH_3Si$ ), 0,00 (3H, s,  $CH_3Si$ ), 0,82 (9H, s,  $(CH_3)_3C$ ), 3,96 (3H, s,  $CH_3O$ ), 4,5 - 4,7 (3H, m, H4' H5'), 5,30 (1H, d,  $J$  5,1 Hz, H2'), 5,40 (1H, d,  $J_{PH}$  3,6 Hz, NH), 5,8 - 5,9 (1H, m, H3'), 6,32 (1H, s, H1'), 6,65 (2H, s a,  $NH_2$ ), 7,0 - 7,3 (6H, m, H-Ar), 7,68 (1H, d,  $J$  9,4 Hz, H-Fur), 8,39 (1H, s, H2). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75 MHz):  $\delta$  -5,4, -4,8, 18,0, 25,5, 58,1, 69,1, 70,6, 72,9, 82,6, 94,2, 116,7, 119,4, 119,6, 122,8, 129,1, 133,2, 138,7, 141,8, 150,2, 152,9, 155,3, 163,3, 174,0.
- 20

## Ejemplo 51

(Sp)8-(5-(*terc*-Butildimetilsililoximetil)-2-furil)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5g)

- 25 Una solución de acetato de paladio (16,9 mg, 0,075 mmol) y trifenilfosfina (41,5 mg, 0,158 mmol) en DMF desgasificada seca (6 ml) se calentó a 50 °C en una atmósfera de argón durante 15 min (color rojo intenso) antes de añadir 2-(tributilestanil)-5-(*terc*-butildimetilsililoximetil)furano (0,478 g, 0,904 mmol) y (Sp)8-bromoadenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (4) (0,450 g, 0,753 mmol). La mezcla se calentó a 85 °C durante 4 h. El disolvente se retiró al vacío, el material residual se disolvió en diclorometano (3 ml),
- 30 la solución se añadió lentamente a hexano en agitación vigorosa (50 ml) y el material precipitado se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando metanol al 7 % en diclorometano; rendimiento 461 mg (84 %). HRMS (electronebulización): (M+H) 729,3001. Calc. para  $C_{33}H_{49}N_6O_7PSi_2H-H$ : 729,3011. RMN  $^{31}P$  ( $CDCl_3$ , 81 MHz):  $\delta$  3,05. RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 200 MHz):  $\delta$  -0,01 (3H, s,  $CH_3SiOCH$ ), 0,00 (3H, s,  $CH_3SiOCH$ ), 0,17 (6H, s,  $CH_3SiOCH_2$ ), 0,81 (9H, s,  $(CH_3)_3CSiOCH$ ), 0,98 (9H, s,  $(CH_3)_3CSiOCH_2$ ), 4,5 - 4,7 (3H, m, H4' H5'), 4,78 (2H, s,  $OCH_2Fur$ ), 5,31 (1H, d,  $J$  5,2 Hz, H2'), 5,8 - 5,9 (1H, m, H3'), 6,40 (1H, s, H1'), 6,47 (1H, d,  $J_{PH}$  3,4 Hz, NH), 6,61 (2H, s a,  $NH_2$ ), 7,1 - 7,3 (6H, m, H-Ar), 7,63 (1H, d,  $J$  9,4 Hz, H-Fu), 8,42 (1H, s, H2). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75 MHz):  $\delta$  -5,3, -4,7, 18,0, 18,3, 25,6, 25,8, 58,2, 69,1, 70,7, 72,8, 94,2, 109,1, 115,1, 119,5, 119,7, 122,8, 129,2, 138,7, 141,8, 142,5, 150,2, 153,3, 155,6, 157,6.
- 35

## Ejemplo 52

(Sp)8-(2-Benzofuril)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5h)

- 40 Una solución de acetato de paladio (16,9 mg, 0,075 mmol) y trifenilfosfina (41,5 mg, 0,158 mmol) en DMF desgasificada seca (6 ml) se calentó a 50 °C en una atmósfera de argón durante 15 min (color rojo intenso) antes de añadir 2-(tributilestanil)benzofurano (0,381 g, 0,936 mmol) y (Sp)8-bromoadenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (4) (0,450 g, 0,753 mmol). La mezcla se calentó a 85 °C durante 4 h. El disolvente se retiró al vacío, el material residual se disolvió en diclorometano (3 ml) y la solución se
- 45 añadió lentamente a hexano en agitación vigorosa (50 ml). El precipitado se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando metanol al 7 % en diclorometano; rendimiento: 439 mg (92 %). HRMS (electronebulización): (M+H) 635,2171. Calc. para  $C_{30}H_{35}N_6O_6PSiH$ : 635,2197. RMN  $^{31}P$  ( $CDCl_3$ , 81 MHz):  $\delta$  3,05. RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 200 MHz):  $\delta$  0,00 (3H, s,  $CH_3Si$ ), 0,03 (3H, s,  $CH_3Si$ ), 0,83 (9H, s,  $(CH_3)_3C$ ), 4,4 - 4,8 (3H, m, H4' H5'), 5,38 (1H, d,  $J$  5,0 Hz, H2'), 5,9 - 6,1 (1H, m, H3'), 6,58 (1H, s, H1'), 6,61 (1H, s a, NH), 7,0 - 7,8 (12H, m, H-Ar,  $NH_2$ ), 8,46 (1H, s, H2). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75 MHz):  $\delta$  -5,3, -4,7, 18,1, 25,6, 68,8, 70,8, 73,0, 73,1, 94,3, 110,5, 111,8, 119,5, 119,7, 122,0, 123,0, 123,9, 126,4, 127,4, 129,2, 138,6, 141,7, 144,7, 150,5, 153,8, 155,4, 155,8.
- 50

## Ejemplo 53

(Sp)8-(2-N-Metilpirrolil)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5i)

- 55 Una mezcla de  $Pd(OAc)_2$  (37 mg, 0,166 mmol) y  $PPh_3$  (91 mg, 0,348 mmol) en DMF (5 ml) se agitó a 50 °C hasta que la solución se hubo vuelto de color rojo oscuro. Se añadieron (Sp)8-bromoadenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (4) (0,500 g, 0,83 mmol) en DMF (2

ml) y 2-(tributilestanil)-N-metil-2-pirrol (0,461 g, 1,24 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 4 h. La DMF se retiró a presión reducida y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 7,5 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El producto fue un sólido de color blanco contaminado con trazas de residuos de organoestaño que se retiraron por disolución del producto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y re-precipitación en hexano; rendimiento 0,350 g (70 %); HRMS (electronebulización): M+H 598,2339. Calc. para C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>PSi+H: 598,2357. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ -0,13 (6H, s, 2 x CH<sub>3</sub>), 0,66 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3,73 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 4,35 - 4,41 (1H, m, H-4'), 4,50 - 4,66 (2H, m, O-CH<sub>2</sub>), 5,06 (1H, d, J 5,3, H-2'), 5,80 - 5,85 (1H, m, H-3''), 5,99 (1H, s, H-1'), 6,19 - 6,21 (1H, m, H-Pyr.), 6,57 - 6,59 (1H, m, H-pyr), 6,65 (2H, s a, NH<sub>2</sub>), 6,76 - 6,78 (1H, m, H-pyr), 6,95 (1H, t, J 7,3 Hz, H-Ph), 7,05 (2H, d, J'' 7,6 Hz, 2 x H-Ph), 7,17 (2H, t, J 7,9 Hz, 2 x H-Ph), 7,83 (1H, d, J 9,5 Hz, NH), 8,31 (1H, s, H-2); ). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ -5,5 y -4,9 (2 x CH<sub>3</sub>), 17,9 (Si-C), 25,5 (3 x CH<sub>3</sub>), 36,3 (N-CH<sub>3</sub>), 68,9 (d, J 6,6 Hz, OCH<sub>2</sub>), 70,5 (d, J 4,0 Hz, CH-4'), 72,8 (d, J 8,5 Hz, CH-2'), 77,5 (d, J 3,7 Hz, CH-3'), 94,2 (CH - 1'), 108,4, 114,2, 119,4, 119,9, 119,9, 122,7, 126,8, 129,2, 129,2, 138,6, 144,2, 149,8, 152,9, 155,5, 162,5.

## Ejemplo 54

(S<sub>r</sub>)-8-(3-Piridinil)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5j)

15 Una mezcla de Pd(OAc)<sub>2</sub> (37 mg, 0,166 mmol) y PPh<sub>3</sub> (91 mg, 0,348 mmol) en NMP (4 ml) se agitó a 50 °C hasta que la solución se hubo vuelto de color rojo oscuro. Se añadieron una solución de (Sp)8-bromoadenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (4) (0,500 g, 0,83 mmol) en NMP (2 ml) y 3-(tributilestanil)piridina (0,610 g, 1,66 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 110 °C durante 10 h antes de retirar la NMP a presión reducida, y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 7,5 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El producto fue un sólido de color blanco contaminado con trazas de residuos de organoestaño que se retiraron por disolución del producto de acoplamiento en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y reprecipitación en hexano; rendimiento 0,280 g (57 %); HRMS (electronebulización): M+H 596,2211. Calc. para C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>PSiH: 596,2201. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (CDCl<sub>3</sub>) -0,16 (3H, s, CH<sub>3</sub>), -0,15 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0,60 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4,30 - 4,43 (1H, m, H-4'), 4,60 - 4,68 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 5,15 (1H, d, J 5,2 Hz, H-2'), 5,69 (1H, s, H-1'), 5,75 - 5,82 (1H, m, H-3'), 6,37 (2H, s a, NH<sub>2</sub>), 6,58 (1H, d, J 9,2 Hz, NH), 6,99 - 7,10 (3H, m, 3 x H-Ph), 7,17 - 7,24 (2H, t, J 7,4 Hz, 2 x H-Ph), 7,42 - 7,48 (1H, m, H-pyr), 8,02 - 8,06 (1H, m, H-pyr), 8,37 (1H, s, H-2), 8,76 - 8,79 (1H, m, H-pyr), 8,97 (1H, d, J 1,7 Hz, H-pyr); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ -5,5 y -4,8 (2 x CH<sub>3</sub>), 18,0 (Si-C), 25,4 (3 x CH<sub>3</sub>), 68,9 (d, J 6,8 Hz, OCH<sub>2</sub>), 71,3 (d, J 4,5 Hz, CH-4'), 73,3 (d, J 8,8 Hz, CH-2'), 77,5 (d, J 3,8 Hz, CH-3'), 94,2 (CH-1'), 119,4, 119,5, 119,6, 122,9, 123,5, 125,0, 129,1, 129,1, 136,8, 138,5, 148,1, 149,8, 150,3, 151,4, 153,5, 155,9.

## Ejemplo 55

(Sp)B-(Fenil)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5k)

Una mezcla de Pd(OAc)<sub>2</sub> (37 mg, 0,166 mmol) y PPh<sub>3</sub> (91 mg, 0,348 mmol) en DMF (4 ml) se agitó a 50 °C hasta que la solución se hubo vuelto de color rojo oscuro. Se añadieron una solución de (R<sub>p</sub>)-8-bromoadenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (4) (0,500 g, 0,83 mmol) en NMP (2 ml) y feniltributilestanano (0,609 g, 1,66 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 135 °C durante 7 h antes de retirar la NMP a presión reducida y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 7,5 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El producto fue un sólido de color blanco contaminado con trazas de residuos de organoestaño que se retiraron por disolución del producto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y reprecipitación en hexano; rendimiento 0,310 g (63 %); HRMS (electronebulización): M+H 595,2275. Calc. para C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>PSi+H: 595,2248. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ -0,21 (6H, s, 2 x CH<sub>3</sub>), 0,57 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4,32 - 4,36 (1H, m, H-4'), 4,52 - 4,63 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 4,99 (1H, d, J 5,1 Hz, H-2'), 5,75 (1H, s, H-1'), 5,76 - 5,83 (1H, m, H-3'), 6,35 (2H, s a, NH<sub>2</sub>), 6,93 (1H, t, J 7,3 Hz, H-Ph), 7,03 (2H, d, J 8,0 Hz, 2 x H-Ph), 7,16 (2H, t, J 7,9 Hz, 2 x H-Ph), 7,33 (1H, d, J 9,4 Hz, NH), 7,51 - 7,54 (3H, m, H-Ph), 7,63 (2H, d, J 7,7 Hz, H-Ph), 8,26 (1H, s, H-2); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ -5,8 y -5,0 (2 x CH<sub>3</sub>), 17,7 (Si-C), 25,2 (3 x CH<sub>3</sub>), 68,9 (d, J 6,7 Hz, OCH<sub>2</sub>), 70,5 (d, J 4,2 Hz, CH-4'), 72,8 (d, J 8,6 Hz, CH-2'), 76,9 (d, J 3,8 Hz, CH-3'), 94,1 (CH-1'), 118,7, 119,1, 119,1, 119,2, 119,2, 122,8, 127,9, 128,9, 128,9, 129,2, 129,2, 130,8, 138,3, 150,1, 151,2, 152,9, 155,2.

## Ejemplo 56

(Sp)8-(4-Metoxifenil)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5l)

Una mezcla de Pd(OAc)<sub>2</sub> (37 mg, 0,166 mmol) y PPh<sub>3</sub> (91 mg, 0,348 mmol) en DMF (4 ml) se agitó a 50 °C hasta que la solución se hubo vuelto de color rojo oscuro. Se añadieron una solución de (Sp)8-bromoadenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (4) (0,500 g, 0,83 mmol) en NMP (2 ml) y 4-(tributilestanil)anisol (0,666 g, 1,66 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 120 - 125 °C durante 10 h antes de retirar la NMP a presión reducida. El material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 7,5 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El producto fue un sólido de color blanco que estaba contaminado con trazas de residuos de organoestaño que se retiraron por disolución en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y re-precipitación en hexano; rendimiento 0,315 g (61 %); HRMS (electronebulización): M+H 625,2368. Calc. para C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>PSi+H: 625,2354. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ -0,15 (3H, s, CH<sub>3</sub>), -0,14 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0,62 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3,85 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4,32 - 4,37 (1H, m, H-4'), 4,55 - 4,69 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 5,07 (1H, d, J 5,3 Hz, H-2'), 5,78 (1H, s, H-1'), 5,79 - 5,88 (1H, m, H-3'), 6,20 (2H, s a, NH<sub>2</sub>), 6,90 (1H, d, J 9,3 Hz, NH), 6,94 - 7,08 (5H, m, 5 x H-Ph), 7,19 (2H, t, J'' 7,4 Hz, 2 x H-Ph), 7,62 (2H, d, J 6,9 Hz, 2 x H-Ph),

8,35 (1H, s, H-2); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ -5,4 y -4,7 (2 x CH<sub>3</sub>), 18,0 (Si-C), 25,5 (3 x CH<sub>3</sub>), 55,4 (OCH<sub>3</sub>), 69,0 (d, J 6,9 Hz, OCH<sub>2</sub>), 70,7 (d, J 4,2 Hz, CH-4'), 72,8 (d, J 8,6 Hz, CH-2'), 76,9 (d, J' 3,8 Hz, CH-3'), 94,3 (CH-1'), 114,5, 114,5, 119,3, 119,5, 119,5, 119,6, 119,6, 120,7, 123,0, 129,2, 129,2, 130,9, 130,9, 138,4, 150,4, 151,5, 152,8, 155,2, 161,5.

#### 5 Ejemplo 57

(Sp)8-(2-Tiazolil)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5m)

Una solución de Pd(OAc)<sub>2</sub> (27 mg, 0,10 mmol) y PPh<sub>3</sub> (62 mg, 0,20 mmol) en DMF (5 ml) se agitó a 50 °C durante 30 min antes de añadir 2-(tributilestanil)tiazol (260 mg, 0,70 mmol), seguido de (Sp)8-bromadenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (4) (340 mg, 0,58 mmol). La mezcla se agitó a 85 °C durante 3 h. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 3:97 y 5:9, rendimiento: 160 mg (47 %) de un sólido de color castaño. EM (electronebulización) 602,2,- RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz): δ 2,71; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ -0,04 (6H, s, SiMe), 0,75 (9H, s, Si-tBu), 4,44 - 4,77 (3H, m, 5,42 (d, J 5,1 Hz), 5,77 - 5,85 (1H, m), 5,96 (1H, s), 6,44 (2H, s a, NH<sub>2</sub>), 6,96 - 7,35 (6H, m), 8,40 (1H, s), 8,47 (1H, s), 9,06 (1H, S).

#### 15 Ejemplo 58

Sal amonio de (Rp)-8-(2-tiazolil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (7m)

Una solución 1,0 M de *t*-BuOK en THF (0,29 ml, 0,29 mmol) se añadió a una solución de (Sp)8-(2-tiazolil)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5m) (136 mg, 0,23 mmol) en THF (3 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h antes de añadir disulfuro de carbono (0,04 ml, 0,7 mmol). La mezcla se agitó durante 3 h más a temperatura ambiente. El volumen del disolvente se redujo a aproximadamente 1 ml antes de añadir hexano (3 0 ml). El precipitado se formó y se aisló por filtración. El producto en bruto se disolvió en DMF (2 ml), se añadió NH<sub>4</sub>F (52 mg, 1,4 mmol) y la mezcla se agitó en una atmósfera de argón a 40 °C durante 48 h. El disolvente se retiró por evaporación y el producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, usando *i*PrOH:EtOAc:H<sub>2</sub>O:NH<sub>3</sub> (ac.) 7:7:1:1; rendimiento 54 mg (53 %) de un sólido de color blanco. HRMS (electronebulización) M 427,0047. Calc. para C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>PS<sub>2</sub>: 427,0048. RMN <sup>31</sup>P (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 81 MHz): δ 54,02; RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz): δ 3,95 - 4,15 (3H, m), 4,92 - 5,12 (2H, m), 6,60 - 7,30 (4H, s a), 7,50 (2H, s), 8,22 (1H, S), 8,34 (1H, S), 9,36 (1H, d, J 0,5 Hz).

#### Ejemplo 59

Sal de tributilamonio de (Rp)-8-(5-metil-2-furil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8e)

Se añadió *t*-butóxido sódico 1 M (0,60 ml) a una solución de (Sp)8-(5-metil-2-furil)-adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5e) (0,350 g, 0,552 mmol) en THF seco (7 ml) en una atmósfera de gas argón. La mezcla se agitó durante 30 min antes de añadir disulfuro de carbono (0,126 g, 1,66 mmol) y la agitación continuó durante 3 h. La mezcla de reacción se añadió lentamente a hexano, el precipitado se retiró por filtración y se disolvió en agua (10 ml). Se añadió gota a gota HCl 1 M con agitación vigorosa a la mezcla de reacción enfriada con hielo hasta pH 3. El ácido tioico 6e precipitado se retiró por filtración, se lavó con agua fría y se secó a alto vacío; rendimiento 0,270 g de un sólido de color amarillo. Después, el ácido (6e) se disolvió en DMF (3 ml) en una atmósfera de argón y se añadió fluoruro de amonio (0,056 g, 1,5 mmol). La mezcla se agitó durante 3 d a 40 °C, momento en el que se añadió exceso de tributilamina. Todos los materiales volátiles se retiraron por destilación a presión reducida y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando tributilamina al 1 % y metanol al 5 % en diclorometano. El producto de tioato contenía un poco de tributilamina libre que se retiró lavando repetidamente con hexano; rendimiento: 0,276 g (82 %). HRMS (electronebulización): M 424,0488. Calc. para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>PS: 424,0487. RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz): δ 57,0. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 1,00 (9H, t, J 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,3 - 1,5 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 1,7 - 1,9 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 2,44 <3H, s, CH<sub>3</sub>Fur), 3,05 (6H, t, J 6,5 Hz, NCH<sub>2</sub>), 4,4 - 4,6 (3H, m, H4' H5'), 5,24 (1H, d, J 4,8 Hz, H2'), 5,5 - 5,6 (1H, m, H3'), 6,20 - 6,24 (4H, m, H1' H-FurNH<sub>2</sub>), 7,06 (1H, d, J 3,3 Hz, H-Fu), 8,24 (1H, S, H2). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 13,4, 19,7, 24,9, 30,6, 51,7, 67,0, 71,1, 71,2, 71,5, 92,2, 108,1, 115,2, 119,0, 140,7, 142,4, 149,9, 152,0, 154,8, 155,3.

#### Ejemplo 60

Sal tributilamonio de (Rp)-8-(5-metoxi-2-furil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8f)

Se añadió *t*-butóxido sódico 1 M (0,50 ml) a una solución de (Sp)8-(5-metoxi-2-furil)-adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5f) (0,280 g, 0,456 mmol) en THF seco (6 ml) en una atmósfera de gas argón. La mezcla se agitó durante 30 min antes de añadir disulfuro de carbono (0,104 g, 1,3 mmol) y la agitación continuó durante 3 h. La mezcla de reacción se añadió lentamente a hexano, el precipitado se retiró por filtración y se disolvió en agua (10 ml). Se añadió gota a gota HCl 1 M con agitación vigorosa a la mezcla de reacción enfriada con hielo hasta pH 3. El ácido tioico 6f precipitado se retiró por filtración, se lavó con agua fría y se secó a alto vacío; rendimiento 0,127 g de un sólido de color pardo. El ácido tioico 6f se disolvió en DMF seca (2 ml) en una atmósfera de argón y se añadió fluoruro de amonio (0,037 g, 1 mmol). La mezcla se agitó

durante 3 d a 4 0 °C antes de añadir exceso de tributilamina. La evaporación a presión reducida retiró todos los materiales volátiles. El material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando tributilamina al 1 % y metanol al 5 % en diclorometano. La tributilamina libre presente en el producto de tioato se retiró lavando repetidamente con hexano; rendimiento: 0,109 g (29 %). HRMS (electronebulización): M 440,0427. Calc. para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>PS<sup>-</sup>: 440,0436. RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz): δ 57,0. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 0,99 (9H, t, J 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,3 - 1,5 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 1,7 - 1,9 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 3,05 (t, J 6,5 Hz, 6H, NCH<sub>2</sub>), 3,89 (3H, s, CH<sub>3</sub>O), 4,3 - 4,5 (3H, m, H4 ' H5'), 5,24 (1H, d, J'' 5,2 Hz, H2'), 5,6 - 5,7 (1H, m, H3'), 6,21 (1H, s, H1'), 6,41 (2H, s a, NH<sub>2</sub>), 6,89 (1H, d, J 8,4 Hz, H-Fur), 7,66 (1H, d, J 8,6 Hz, H-Fur), 8,35 (1H, s, H2). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 13,3, 19,8, 24,8, 51,6, 69,2, 70,6, 72,8, 76,4, 83,0, 94,2, 116,9, 119,4, 132,7, 138,7, 150,0, 152,8, 155,1, 163,3.

#### 10 Ejemplo 61

Sal tributilamonio de (Rp)-8-(2-hidroxiometil-5-furil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8 g)

Se añadió *t*-butóxido sódico 1 M (0,62 ml) se añadió a una solución de (Sp)8-(5-*terc*-butildimetilsililoximetil)-2-furil)adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5 g)(0,410 g, 0,563 mmol) en THF seco (7 ml) en una atmósfera de argón. La mezcla se agitó durante 30 min antes de añadir disulfuro de carbono (0,128 g, 1,69 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h antes de añadir gota a gota a hexano. El precipitado formado se re-disolvió en agua. La adición lenta de HCl 1 M a la solución acuosa enfriada con hielo en agitación vigorosa hasta pH 3 precipitó el ácido tioico 6g que se retiró por filtración, se lavó con agua fría y se secó a alto vacío para producir el ácido tioico en forma de un sólido de color pardo (0,294 g). El producto se disolvió de nuevo en DMF seca (3 ml) en una atmósfera de argón y se añadió fluoruro de amonio (0,097 g, 2,63 mmol). La mezcla se agitó a 40 °C durante 3 d antes de añadir exceso de tributilamina. La destilación a presión reducida retiró todo el material volátil y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando tributilamina al 1 % y metanol al 5 % en diclorometano. El producto contenía un poco de tributilamina libre que se retiró mediante lavados repetidos con hexano; rendimiento 0,243 g (69 %). HRMS (electronebulización): M 440,043. Calc. para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>PS<sup>-</sup>: 440,0436. RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz): δ 57,0. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): 5 1,00 (9H, t, J 7,1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,3 - 1,5 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 1,7 - 1,9 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 2,9 - 3,1 (6H, m, NCH<sub>2</sub>), 4,4 - 4,6 (3H, m, H4 ' H5'), 4,85 (2H, s, HOCH<sub>2</sub>Fur), 5,26 (1H, d, J 5,0 Hz, H2'), 5,5 - 5,6 (1H, m, H3'), 6,2 - 6,3 (4H, m, H1' H- FurNH<sub>2</sub>), 7,12 (1H, d, J 8,3 Hz, H-Fur), 8,22 (1H, s, H2). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ: 13,4, 19,7, 24,9, 57,2, 51,7, 67,7, 71,1, 72,6, 75,9, 94,3, 108,8, 115,5, 119,1, 141,2, 149,5, 141,6, 150,2, 153,7, 155,2.

#### Ejemplo 62

30 Sal de tributilamonio de (Rp)-8-(2-benzofuril)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8h)

Se añadió *t*-butóxido sódico 1 M (0,69 ml) se añadió a una solución de (Sp)8-(2-benzofuril)-adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenilfosforamidato cíclico (5h) (0,400 g, 0,631 mmol) en THF seco (8 ml) en una atmósfera de argón. La mezcla se agitó durante 30 min antes de añadir disulfuro de carbono (0,143 g, 1,89 mmol) y la agitación continuó durante 3 h. La mezcla de reacción se añadió lentamente a hexano, el precipitado se retiró por filtración y se disolvió en agua (4 ml). La adición lenta de HCl 1 M a la solución acuosa enfriada con hielo en agitación vigorosa hasta pH 3 precipitó el ácido tioico 6b que se retiró por filtración, se lavó con agua fría y se secó a alto vacío para formar un sólido de color pardo (0,221 g). El producto se disolvió de nuevo en DMF seca (2 ml) en una atmósfera de argón y se añadió fluoruro de amonio (0,043 g, 1,1 mmol). La mezcla se agitó a 40 °C durante 3 d y se añadió exceso de tributilamina. Los materiales volátiles se retiraron por destilación a presión reducida y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando tributilamina al 1 % y metanol al 5 % en diclorometano. El producto se lavó repetidamente con hexano para retirar tributilamina libre; rendimiento 0,155 g (38 %). HRMS (electronebulización): M 460,0461. Calc. para C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>PS<sup>-</sup>: 460,0487. RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz): δ 57,0. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 1,00 (9H, t, J 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,3 - 1,5 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 1,7 - 1,9 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 3,08 (6H, t, J 6,4 Hz, NCH<sub>2</sub>), 4,4 - 4,6 (3H, m, H4', H5'), 5,33 (1H, d, J 5,2 Hz, H2'), 5,9 - 6,1 (1H, m, H3'), 6,43 (1H, s, H1'), 7,3 - 7,7 (5H, m, H- Ar), 8,31 (1H, s, H2). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 13,4, 19,8, 24,8, 51,6, 66,3, 72,4, 72,8, 75,5, 94,6, 111,8, 112,6, 120,0, 123,7, 124,3, 127,0, 128,3, 126,4, 149,9, 153,1, 154,2, 154,4, 155,8.

#### Ejemplo 63

Sal tributilamonio de (Rp)-8-(2-N-metilpirrolil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8i)

Una mezcla de (Sp)8-(2-N-metilpirrolil)adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-N-fenil-fosforamidato cíclico (5i) (0,300 g, 0,5 mmol) en THF seco (6 ml) y *terc*-butóxido potásico (0,62 ml, 0,62 mmol, 1 M en THF) se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 1 h antes de añadir disulfuro de carbono (0,09 ml, 1,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h antes de retirar la mayoría del disolvente por filtración a presión reducida. La adición de éter dietílico dio un precipitado sólido que se disolvió en agua (9 ml) y se añadió HCl 1,2 M (1,25 ml) a 0 °C. El precipitado fue el (Rp)-8-(2-N-metilpirrolil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico sililado 6i. El producto se secó bien al vacío antes de disolver el sólido (0,170 g, 0,3 mmol) en DMF (1,5 ml) en una atmósfera de argón y añadir fluoruro de amonio (0,075 g, 2,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 d antes de añadir tributilamina (0,111 g, 0,6 mmol) para generar una solución transparente. Los materiales volátiles se retiraron a presión reducida, el residuo se trituró con hexano para retirar cualquier resto de tributilamina y el material

residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NBu}_3$  100:10:1. La sal amonio, que contenía un poco de tributilamina libre, se purificó adicionalmente por disolución en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y precipitación con hexano; rendimiento 0,105 g (34 % en 5i) de un sólido de color blanco. HRMS (electronebulización): M-NHBu<sub>3</sub> 423,0647, Calc. para  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_5\text{PS-NH}(\text{C}_4\text{H}_9)_3$ : 423,0646. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, CH<sub>3</sub>OD): δ 0,93 (9H, t, J 7,3 Hz, 3 x CH<sub>3</sub>), 1,29 - 1,41 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 1,55 - 1,65 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 2,98 - 3,04 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 3,78 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 4,12 - 4,24 (1H, m, H-4'), 4,25 - 4,30 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 4,96 (1H, d, J 5,3 Hz, H-2'), 5,49 5,57 (1H, m, H-3'), 5,94 (1H, s, H-1'), 6,25 - 6,28 (1H, m, H-pyr), 6,60 - 6,62 (1H, m, H-pyr), 6,93 - 6,95 (1H, m, H-pyr), 8,13 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C (CH<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 13,9 (3 x CH<sub>3</sub>), 20,9 (3 x CH<sub>2</sub>), 26,9 (3 x CH<sub>2</sub>), 35,7 (N-CH<sub>3</sub>), 54,0 (3 x CH<sub>2</sub>), 68,5 (d, J 9,8 Hz, OCH<sub>2</sub>), 72,8 (d, J 7,6 Hz, CH-4'), 73,1 (d, J 5,7 Hz, CH-2'), 77,7 (d, J 6,6 Hz, CH-3'), 94,2 (CH-1'), 109,4, 120,1, 121,1, 128,4, 146,3, 151,2, 153,6, 156,8.

## Ejemplo 64

Sal tributilamonio de (*R<sub>p</sub>*)-8-(3-piridinil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8j)

Una mezcla de (Sp)-8-(3-piridinil)adenosin-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3',5'-*N*-fenilfosforamidato cíclico (5j) (0,300 g, 0,5 mmol) y *tert*-butóxido potásico (0,62 ml, 0,62 mmol, 1 M en THF) en THF (6 ml) en una atmósfera de argón se agitó a temperatura ambiente durante 1 h antes de añadir disulfuro de carbono (0,09 ml, 1,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El disolvente se retiró parcialmente a presión reducida y se añadió hexano hasta que se completó la precipitación. El precipitado se disolvió de nuevo en agua (9 ml) y se añadió HCl 1,2 M (1,25 ml) a 0 °C. El (*R<sub>p</sub>*)-8-(3-piridinil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico sililado 6j precipitado se recogió por filtración y se secó durante una noche a alto vacío. La mayoría de este material (0,180 g, 0,33 mmol) se disolvió en DMF seca (1,5 ml) en una atmósfera de argón y se añadió fluoruro de amonio (0,075 g, 2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 días y se filtró. Se añadió tributilamina (0,111 g, 0,6 mmol) al filtrado antes de evaporación a presión reducida. El material residual se trituró con hexano para retirar el exceso de tributilamina y se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NBu}_3$  100:10:1. La sal amonio, que contenía trazas de tributilamina, se purificó adicionalmente mediante disolución en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y reprecipitación mediante la adición de éter dietílico; rendimiento 0,100 g (34 % en 5j) de un sólido de color blanco. HRMS (electronebulización): M-NHBu<sub>3</sub> 421,0492. Calc. para  $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{O}_5\text{PS-NH}(\text{C}_4\text{H}_9)_3$ : 421,0489. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0,93 (9H, t, J 7,2 Hz, 3 x CH<sub>3</sub>), 1,29 - 1,43 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 1,67 - 1,79 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 2,98 3,06 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 4,30-4,44 (3H, m, H-4' y OCH<sub>2</sub>), 5,14 (1H, d, J 5,2 Hz, H-2'), 5,50 - 5,57 (1H, m, H-3'), 5,71 (1H, s, H-1'), 6,00 (2H, s a, NH<sub>2</sub>), 7,38 - 7,45 (1H, m, H-pyr), 8,03 - 8,09 (1H, m, H-pyr), 8,19 (1H, s, H-2), 8,70 - 8,73 (1H, m, H-pyr), 9,01 (1H, d, J 1,6 Hz, H-pirid). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 13,6 (3 x CH<sub>3</sub>), 2,0,1 (3 x CH<sub>2</sub>), 25,2 (3 x CH<sub>2</sub>), 51,9 (3 x CH<sub>2</sub>), 67,2 (d, J 9,7 Hz, OCH<sub>2</sub>), 71,6 (d, J 7,4 Hz, CH-4'), 71,8 (d, J 6,5 Hz, CH-2'), 77,2 (d, J 6,2 Hz, CH - 3'), 92,6 (CH-1'), 120,1, 124,0, 125,7, 137,3, 149,3, 150,6, 151,1, 151,7, 153,3, 155,8.

## Ejemplo 65

Sal tributilamonio de (*R<sub>p</sub>*)-8-feniladenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8k)

Una mezcla de (Sp)-8-(fenil)adenosin-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3',5'-*N*-fenilfosforamidato cíclico (5k) (0,250 g, 0,42 mmol) y *tert*-butóxido potásico (0,52 ml, 0,52 mmol, 1 M en THF (6 ml)) se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 1 h antes de añadir disulfuro de carbono (0,08 ml, 1,26 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y la mayoría del disolvente se retiró por evaporación. Se añadió hexano al residuo asta que se completó la precipitación. El precipitado sólido se disolvió en agua (9 ml) y se añadió HCl 1,2 M (1,05 ml) a 0 °C. El producto fue el (*R<sub>p</sub>*)-8-feniladenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico sililado. Parte de este material (0,210 g, 0,39 mmol) en DMF seca (2 ml) en una atmósfera de argón y se añadió fluoruro de amonio (0,100 g, 2,73 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. La mezcla de reacción se filtró y se añadió tributilamina (0,144 g, 0,78 mmol) al filtrado. Los materiales volátiles se retiraron por destilación a presión reducida y el material residual se trituró con hexano para retirar cualquier tributilamina libre. El material restante se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NBu}_3$  100:10:1. La sal amonio, que contenía tributilamina, se purificó adicionalmente mediante disolución en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y reprecipitación con hexano; rendimiento 0,100 g (39 % en 5k) de un sólido de color blanco. HRMS (electronebulización): M-NHBu<sub>3</sub> 420,0534. Calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_5\text{PS-NH}(\text{C}_4\text{H}_9)_3$ : 420,0537. RMN <sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 0,94 (9H, t, J 7,3 Hz, 3 x CH<sub>3</sub>), 1,32 - 1,41 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 1,59 - 1,66 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 3,03 - 3,09 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 4,10 - 4,15 (1H, m, H-4'), 4,25 - 4,33 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 4,98 (1H, d, J 5,3 Hz, H-2''), 5,47 - 5,54 (1H, m, H-3'), 5,71 (1H, s, H-1'), 7,52 - 7,55 (3H, m, H-Ph), 7,72 - 7,75 (2H, m, H-Ph), 8,17 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C (CH<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 13,9 (3 x CH<sub>3</sub>), 20,9 (3 x CH<sub>2</sub>), 26,9 (3 x CH<sub>2</sub>), 54,0 (3 x CH<sub>2</sub>), 68,4 (d, J 9,7 Hz, OCH<sub>2</sub>), 72,8 (d, J 7,6 Hz, CH-4'), 73,2 (d, J 5,7 Hz, CH-2'), 77,7 (d, J 6,6 Hz, CH-3'), 94,2 (CH-1'), 130,0, 130,1, 130,1, 130,7, 130,7, 131,9, 151,7, 153,1, 153,9, 157,0.

## Ejemplo 66

Sal tributilamonio de (*R<sub>p</sub>*)-8-(4-metoxifenil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8l)

Una mezcla de (*R<sub>p</sub>*)-8-(4-metoxifenil)adenosin-2'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-3',5'-*N*-fenilfosforamidato cíclico (5l) (0,300 g, 0,48 mmol) y *tert*-butóxido potásico (0,6 ml, 0,6 mmol, 1 M en THF) en THF (6 ml) en una atmósfera de argón se agitó a temperatura ambiente durante 1 h antes de añadir disulfuro de carbono (0,09 ml, 1,44 mmol). La mezcla de reacción

se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, momento en el que la mayoría del disolvente se retiró por destilación a presión reducida y se añadió éter dietílico hasta que se completó la precipitación. El precipitado se disolvió de nuevo en agua (9 ml) y se añadió HCl 1,2 M (1,2 ml) a 0 °C. El (*R<sub>p</sub>*)-8-(4-metoxifeniladenosin)-3',5'-ácido fosforotioico cíclico sililado 6l se recogió por filtración y se secó durante una noche a alto vacío. Una parte del producto secado (0,250 g, 0,44 mmol) se disolvió en DMF seca (2 ml) en una atmósfera de argón y se añadió fluoruro de amonio (0,104 g, 2,8 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 días y se filtró. Se añadió tributilamina (0,163 g, 0,88 mmol) al filtrado y el disolvente se retiró a presión reducida. El material residual se extrajo con hexano para retirar cualquier exceso de tributilamina y el residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH:NBU<sub>3</sub> 100:10:1. La sal amonio, que contenía un poco de tributilamina libre, se purificó adicionalmente por disolución en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y precipitación con hexano; rendimiento 0,130 g (42 % en 5l) de un sólido de color blanco. HRMS (electronebulización): M-NHBU<sub>3</sub> 450,0648. Calc. para C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>PS-NH(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>: 450,0642. RMN <sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 0,93 (9H, t, J 7,3 Hz, 3 x CH<sub>3</sub>), 1,29 - 1,42 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 1,58 - 1,69 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 3,04 - 3,24 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 3,81 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4,10 - 4,17 (1H, m, H-4'), 4,25 - 4,33 (2H, m, O-CH<sub>2</sub>), 4,97 (1H, d, J 5,3, H-2''), 5,46 - 5,52 (1H, m, H-3'), 5,71 (1H, s, H-1'), 7,0 (2H, d, J' 8,6 Hz, 2 x H-Ph), 7,6 (2H, d, J 8,6 Hz, 2 x H-Ph), 8,14 (1H, s, H-2); RMN <sup>13</sup>C (CH<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 14,0 (3 x CH<sub>3</sub>), 21,0 (3 x CH<sub>2</sub>), 26,9 (3 x CH<sub>2</sub>), 54,0 (3 x CH<sub>2</sub>), 56,1 (OCH<sub>3</sub>), 68,5 (d, J'' 9,7 Hz, OCH<sub>2</sub>), 72,8 (d, J 7,6 Hz, CH-4'), 73,2 (d, J'' 5,7 Hz, CH-2'), 77,7 (d, J'' 6,6 Hz, CH-3'), 94,4 (CH-1'), 115,6, 115,6, 119,8, 121,9, 132,2, 151,7, 153,3, 153,4, 156,6, 163,3.

## Ejemplo 67

Sal sódica de (*R<sub>p</sub>*)-8-(2-N-metilpirrolil)-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (9i)

Se disolvió sal amonio de (*R<sub>p</sub>*)-8-(N-metil-2-pirrolil)-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (5i) (0,100 g, 0,16 mmol) en NaOH 0,1 M en MeOH (1,7 ml). La sal sódica se precipitó mediante la adición de éter dietílico y se recogió por filtración; rendimiento 0,060 g (84 %) de un material sólido de color blanco. HRMS (electronebulización): M-Na 423,0630. Calc. para C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>PS-Na: 423,0646. RMN <sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 3,86 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 4,22 - 4,41 (3H, m, H-4' y OCH<sub>2</sub>), 5,04 (1H, d, J 5,3 Hz, H-2'), 5,49 - 5,56 (1H, m, H-3'), 5,93 (1H, s, H-1'), 6,25 - 6,29 (1H, m, H-Pir), 6,67 - 6,70 (1H, m, H-Pir), 7,01 - 7,03 (1H, m, H-Pir), 8,22 (1H, s, H-2); RMN <sup>13</sup>C (CH<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 35,7 (N-CH<sub>3</sub>), 68,5 (d, J 9,8 Hz, OCH<sub>2</sub>), 72,8 (d, J'' 7,6 Hz, CH-4'), 73,1 (d, J 5,7 Hz, CH-2'), 77,7 (d, J 6,6 Hz, CH-3'), 94,2 (CH-1'), 109,4, 120,1, 121,1, 128,4, 146,3, 151,2, 153,6, 156,8.

## Ejemplo 68

Sal sódica de (*R<sub>p</sub>*)-8-(3-piridinil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (9j)

Sal tributilamonio de (*R<sub>p</sub>*)-8-(3-piridinil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8j) (0,100 g, 0,16 mmol) en NaOH 0,1 M en MeOH (1,7 ml). La adición de éter dietílico precipitó la sal sódica; rendimiento 0,057 g (80 %) de un sólido de color blanco material. HRMS (electronebulización): M-Na 421,0495. Calc. para C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>PS-Na: 421,0489. RMN <sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 4,16 - 4,31 (3H, m, H-4' y OCH<sub>2</sub>), 5,03 (1H, d, J 5,1 Hz, H-2'), 5,41 - 5,45 (1H, m, H-3'), 5,64 (1H, s, H-1'), 7,57 - 7,61 (1H, m, H-pirid), 8,18 - 8,22 (1H, m, H-pirid), 8,19 (1H, s, H-2), 8,68 - 8,71 (1H, m, H-pirid), 8,92 (1H, d, J 1,4 Hz, H-pirid). RMN <sup>13</sup>C (CH<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 68,3 (d, J 9,4 Hz, OCH<sub>2</sub>), 72,7 (d, J 1,1 Hz, CH-4'), 73,3 (d, J 5,6 Hz, CH-2'), 77,6 (d, J 6,4 Hz, CH-3'), 94,2 (CH-1'), 120,3, 125,3, 127,2, 138,9, 149,7, 150,6, 151,8, 151,9, 154,3, 157,3.

## Ejemplo 69

Sal sódica de (*R<sub>p</sub>*)-8-feniladenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (9k)

Se disolvió sal tributilamonio de (*R<sub>p</sub>*)-8-feniladenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8k) (0,100 g, 0,16 mmol) en NaOH 0,1 M en MeOH (1,7 ml). La sal sódica se precipitó al añadir éter dietílico; rendimiento 0,053 g (75 %) de un sólido de color blanco. HRMS (electronebulización): M-Na 420,0529. Calc. para C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>PS-Na: 420,0537. RMN <sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 4,16 - 4,40 (3H, m, H-4' y OCH<sub>2</sub>), 5,03 (1H, d, J 5,3 Hz, H-2'), 5,50 - 5,58 (1H, m, H-3'), 5,76 (1H, s, H-1'), 7,57 - 7,60 (3H, m, H-Ph), 7,76 - 7,81 (2H, m, H-Ph), 8,21 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C (CH<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 68,4 (d, J 9,7 Hz, OCH<sub>2</sub>), 72,8 (d, J 7,6 Hz, CH-4'), 73,3 (d, J 5,7 Hz, CH-2'), 77,7 (d, J 6,4 Hz, CH-3'), 94,2 (CH-1'), 130,0, 130,1, 130,1, 130,7, 130,7, 131,9, 151,7, 153,1, 154,0, 157,0.

## Ejemplo 70

Sal sódica de (*R<sub>p</sub>*)-8-(4-metoxifenil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (9l)

Se disolvió sal tributilamonio de (*R<sub>p</sub>*)-8-(4-metoxifenil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8l) (0,090 g, 0,14 mmol) en NaOH 0,1 M en MeOH (1,5 ml). La sal sódica se precipitó mediante la adición de éter dietílico; rendimiento 0,050 g (75 %) de un sólido de color blanco. HRMS (electronebulización): M-Na 450,0648. Calc. para C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>PS-Na: 450,0642. RMN <sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 3,88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4,20 - 4,24 (1H, m, H-4'), 4,25 - 4,39 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 5,02 (1H, d, J 5,3 Hz, H-2'), 5,51 - 5,57 (1H, m, H-3'), 5,76 (1H, s, H-1'), 7,12 (2H, d, J 8,6 Hz, 2 x H-Ph), 7,73 (2H, d, J 8,6 Hz, 2 x H-Ph), 8,21 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C (CH<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 56,0 (OCH<sub>3</sub>), 68,3 (d, J 9,7 Hz, OCH<sub>2</sub>), 72,8 (d, J 7,6 Hz, CH-4'), 73,2 (d, J 5,7 Hz, CH-2'), 77,7 (d, J 6,4 Hz, CH-3'), 94,4 (CH-1'), 115,5, 115,5, 119,7, 121,9, 132,1, 132,1, 151,7, 153,2, 153,4, 156,7, 163,2.

## Ejemplo 71

(*R*<sub>p</sub>)-8-Bromoadenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-*N*-fosforamidato de bencilo cíclico (10)

Una solución de sal tributilamonio de 8-bromoadenosin-2'-O-(*terc*-butil-dimetilsilil)-3',5'-ácido fosfórico cíclico (2) (2,14 g, 3,0 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) se añadió gota a gota a una solución de cloruro de oxalilo (0,31 ml, 3,6 mmol) y DMF (0,28 ml, 3,6 mmol) en THF (15 ml) a 0 °C. Se añadió bencilamina (15 mmol, 1,64 ml) después de 30 min y la mezcla se agitó durante 10 min a 0 °C y durante 2 h a temperatura ambiente, se diluyó con CHCl<sub>3</sub> (50 ml) y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (ac.) saturado (2 x 15 ml). La fase orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>), el disolvente se retiró por destilación y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 3:97 y 5:95; rendimiento 1,28 g (67 %) de un sólido de color blanco. EM (electronebulización): 611,2/613,2; RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz): δ 8,29; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0,011 (3H, s, Si-Me), 0,014 (3H, s, Si-Me), 0,82 (9H, s, Si-tBu), 4,12 - 4,21 (3H, m), 4,39 - 4,68 (3H, m), 4,97 (1H, d, *J* 5,1 Hz), 5,54 - 5,60 (1H, m), 5,88 (1H, s), 6,50 (2H, s a, NH<sub>2</sub>), 7,19 - 7,33 (5H, m), 8,04 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ -5,2, -4,8, 18,0, 25,5, 45,2, 68,2 (*J*<sub>P</sub> 6,9 Hz), 71,2 (*J*<sub>P</sub> 4,2 Hz), 72,9 (*J*<sub>P</sub> 8,3 Hz), 76,2 (*J*<sub>P</sub> 3,6 Hz), 93,4, 118,3, 127,0, 127,4, 128,5, 137,3, 138,7 (*J*<sub>P</sub> 6,5 Hz), 149,9, 153,4, 154,6.

## Ejemplo 72

15 (*R*<sub>p</sub>)-8-(2-Furil)adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-fosforamidato de *N*-bencilo cíclico (11a)

Una solución de Pd(OAc)<sub>2</sub> (60 mg, 0,27 mmol) y PPh<sub>3</sub> (142 mg, 0,54 mmol) en DMF (8 ml) en una atmósfera de argón se agitó a 50 °C durante 15 min antes de añadir 2-(tri-*n*-butilestanil)furano (0,63 ml, 2,0 mmol). Posteriormente, se añadió una solución de (Sp)8-bromoadenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-*N*-bencilfosforamidato cíclico (10) (800 mg, 1,3 mmol) en DMF (10 ml). La mezcla se agitó a 85 °C durante 2,5 h. El disolvente se retiró por destilación y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 3:97 y 5:95; rendimiento 636 mg (80 %) de un sólido de color blanco. EM (electronebulización): 599,2; RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz): δ 8,08; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0,00 (3H, s, Si-Me), 0,04 (3H, s, Si-Me), 0,82 (9H, s, Si-tBu), 4,02 - 4,09 (1H, m), 4,17 - 4,29 (3H m), 4,41-4,65 (2H m), 5,16 (d, *J* 5,2 Hz), 5,79 (1H, *J* 1,8, 5,2 Hz), 6,31 - 6,34 (3H, s + s a), 6,62 (1H, c, *J* 1,8 Hz), 7,14 (1H, dd, *J* 0,6, 3,5 Hz), 7,25 - 7,38 (5H, m), 7,65 (1H, dd, *J* 0,6, 1,8 Hz), 8,25 (1H, s, H-2); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ -5,3, -4,7, 18,0, 25,5, 45,3, 68,4 (*J*<sub>P</sub> 7,2 Hz), 71,3 (*J*<sub>P</sub> 4,3 Hz), 73,1 (*J*<sub>P</sub> 8,5 Hz), 77,2, 94,2, 112,1, 114,1, 119,7, 127,1, 127,5, 128,6, 138,8 (*J*<sub>P</sub> 6,5 Hz), 141,7, 143,5, 144,8, 150,2, 153,1, 155,3.

## Ejemplo 73

Sal amonio de (*R*<sub>p</sub>)-8-(2-furil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (7a)

Una solución 1,6 M de *n*BuLi en hexano (0,25 ml, 0,39 mmol) a una solución de (Sp)8-(2-furil)adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-fosforamidato de *N*-bencilo cíclico (11a) (200 mg, 0,33 mmol) en THF (4 ml) a -78 °C. La mezcla se agitó durante 10 min a esta temperatura antes de añadir disulfuro de carbono (0,06 ml, 1,0 mmol) y el baño de refrigeración se retiró. La mezcla se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. El volumen del disolvente se redujo a aproximadamente 1 ml antes de añadir hexano (40 ml). El precipitado se recogió y se disolvió en DMF seca (2 ml) y se añadió fluoruro de amonio (75 mg, 2,0 mmol). La mezcla se agitó en una atmósfera de argón a 40 °C durante 48 h. El disolvente se retiró por destilación y el producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando iPrOH:EtOAc:H<sub>2</sub>O:NH<sub>3</sub> (ac.) 7:7:1:1; rendimiento: 106 mg (74 %) de un sólido de color blanco. Los datos espectroscópicos fueron como se han registrado previamente.

## Ejemplo 74

(*R*<sub>p</sub>)-B-(3-furil)adenosin-3',5'-fosforotioato cíclico de S-4-(isobutiriloxi)bencilo (12)

40 Se disolvió sal amonio de (*R*<sub>p</sub>)-8-(3-furil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (7c) (0,2 mmol) en metanol (12 ml) y se añadió trietilamina (0,3 mmol). La evaporación de la mezcla de reacción al vacío dejó la sal amonio de (*R*<sub>p</sub>)-8-(3-furil)adenosin-3',5'-ácido fosforotioico cíclico. Parte de este producto (70 mg, 0,16 mmol) y yoduro de 4-(isobutiriloxi)bencilo (73 mg, 0,24 mmol) en DMF (2 ml) se agitaron a temperatura ambiente durante 48 h. El disolvente se retiró por evaporación y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 3:97 y 5:95; rendimiento: 38 mg (40 %) de un sólido de color blanco. EM (electronebulización): 588,2; RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz): δ 27,1; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 1,26 (6H, d, *J* 1,0 Hz), 2,75 (1H, Sep, *J* 7,0 Hz), 4,08 (1H, s), 4,16 (1H, s), 4,34 - 4,50 (3H, m), 5,26 (1H, d, *J*" 4,8 Hz), 5,67 - 5,74 (1H, m), 5,91 (1H, s), 6,46 (2H, s a), 6,80 (1H, s), 6,98 (2H, d, *J* 8,5 Hz), 7,34 (2H, d, *J* 8,5 Hz), 7,92 (1H, s), 8,13 (1H, s).

## Ejemplo 75

50 (*R*<sub>p</sub>)-8-(4-Fluorofenil)adenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-fosforamidato de *N*-bencilo cíclico (11m)

Una mezcla de Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,037 g, 0,163 mmol) y PPh<sub>3</sub> (0,091 g, 0,348 mmol) en NMP (4 ml) se agitó a 50 °C hasta que la solución se hubo vuelto de color rojo oscuro. Se añadieron una solución de 8-bromoadenosin-2'-O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-fosforamidato de *N*-bencilo cíclico (10) (0,500 g, 0,81 mmol) en NMP (2 ml) y 1-tributilestanil-4-fluorobenceno (0,623 g, 1,62 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 130 - 135 °C durante 8 h, se

dejó enfriar a temperatura ambiente, la NMP se retiró a presión reducida y el material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 7,5 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El producto fue un material sólido de color blanco que contenía trazas de residuos de organoestaño que se retiraron por disolución del producto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y re-precipitación mediante la adición de hexano; rendimiento 0,248 g (49 %); RMN <sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ -0,17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), -0,11 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0,62 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4,06 (2H, d, J 12,5 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>), 4,12 - 4,21 (1H, m, H-4'), 4,44 - 4,59 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 5,05 (1H, d, J'' 5,3 Hz, H-2'), 5,63 - 5,70 (1H, m, H-3'), 5,71 (1H, s, H-1'), 7,15 - 7,33 (7H, m, 7 x H-Ph), 7,71 - 7,76 (2H, m, 2 x H-Ph), 8,21 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C (MeOH, 75 MHz): δ -5,2 y -4,5 (2 x CH<sub>3</sub>), 18,9 (Si-C), 25,9 (3 x CH<sub>3</sub>), 45,9 (NHCH<sub>2</sub>), 69,8 (d, J 7,2 Hz, OCH<sub>2</sub>), 72,5 (d, J 4,4 Hz, CH-4'), 74,2 (d, J 8,3 Hz, CH-2'), 78,1 (d, J 3,8 Hz, CH-3'), 95,6 (CH-1'), 117,1, 117,4, 120,0, 126,1, 126,1, 128,1, 128,1, 128,4, 132,9, 133,0, 140,8, 140,85, 151,5, 151,6, 154,2, 157,2, 164,0.

## Ejemplo 76

Sal tributilamonio de (R<sub>p</sub>)-8-(4-fluorofenil)-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8m)

Se añadió nBuLi 1,6 M en hexano (0,27 ml, 0,43 mmol) a una solución de (R<sub>p</sub>)-8-(4-fluorofenil)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-fosforamidato de N-bencilo cíclico (11m) (0,250 g, 0,39 mmol) en THF (6 ml) a -78 °C. La mezcla se agitó en una atmósfera de argón, a -78 °C, durante 10 min antes de añadir CS<sub>2</sub> (0,08 ml, 1,24 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 20 min y a temperatura ambiente durante 2 h. La mayoría del disolvente se retiró por destilación y se añadió hexano hasta que se completó la precipitación. El precipitado se disolvió en agua (9 ml) y se añadió HCl 1,2 M (1,1 ml) a 0 °C. Se precipitó (R<sub>p</sub>)-8-(4-Fluorofenil)-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (6m). El ácido tioico secado (0,150 g, 0,27 mmol) se disolvió en DMF seca (1,5 ml), se añadió fluoruro de amonio (0,070 g, 1,9 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. La mezcla de reacción se filtró y se añadió tributilamina al filtrado hasta que se obtuvo una solución transparente. El material volátil se retiró por destilación del filtrado, el material residual se extrajo con hexano para retirar el exceso de tributilamina y el material restante se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH:NBU<sub>3</sub> 100:10:1. La sal amonio, que contenía tributilamina, se purificó adicionalmente por disolución en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y reprecipitación mediante la adición de hexano; rendimiento 0,065 g (38 % en 11m) de un sólido de color blanco material. RMN <sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 0,90 (9H, t, J 7,3 Hz, 3 x CH<sub>3</sub>), 1,31 - 1,40 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>), 1,56 - 1,65 (6H, m, 3 - CH<sub>2</sub>), 3,04 - 3,15 (6H, m, 3 - CH<sub>2</sub>), 3,87 - 3,92 (1H, m, H-4'), 4,04 - 4,32 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 5,02 (1H, d, J 5,3 Hz, H-2'), 5,40 - 5,48 (1H, m, H-3'), 5,68 (1H, s, H-1'), 7,22 - 7,27 (2H, m, 2 x H-Ph), 7,73 - 7,78 (2H, m, 2 x H-Ph), 8,16 (1H, s, H-2). RMN <sup>13</sup>C (MeOD, 75 MHz): δ -5,2 (CH<sub>3</sub>OD) 13,9 (3 x CH<sub>3</sub>), 20,9 (3 x CH<sub>2</sub>), 26,7 (3 x CH<sub>2</sub>), 53,9 (3 x CH<sub>2</sub>), 68,2 (d, J 9,6 Hz, OCH<sub>2</sub>), 72,8 (d, J 7,6 Hz, CH-4'), 73,4 (d, J 5,7 Hz, CH-2'), 78,7 (d, J'' 6,4 Hz, CH-3'), 94,5 (CH-1'), 116,9, 116,9, 119,8, 126,2 132,9, 132,9, 151,6, 153,3, 153,9, 156,9, 163,9.

## Ejemplo 77

Sal sódica de (R<sub>p</sub>)-8-(4-fluorofenil)-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (9m)

Se disolvió sal tributilamonio de (R<sub>p</sub>)-8-(4-fluorofenil)-3',5'-ácido fosforotioico cíclico (8m) (0,050 g, 0,11 mmol) en NaOH 0,1 M en MeOH (1,1 ml). La sal sódica se precipitó mediante la adición de hexano; rendimiento 0,027 g (51 %) de un material sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 4,20 - 4,41 (3H, m, H-4' y OCH<sub>2</sub>), 5,08 (1H, d, J 5,4 Hz, H-2'), 5,51 - 5,58 (1H, m, H-3'), 5,75 (1H, s, H-1'), 7,29 - 7,34 (2H, m, 2 x H-Ph), 7,80 7,86 (2H, m, 2 x H-Ph), 8,23 (1H, s, H-2); RMN <sup>13</sup>C (MeOD, 75 MHz): δ 68,3 (d, J 9,3 Hz, OCH<sub>2</sub>), 72,9 (d, J 7,8 Hz, CH-4'), 73,2 (d, J 5,6 Hz, CH-2'), 77,6 (d, J 6,5 Hz, CH-3'), 94,1 (CH-1'), 116,9, 117,2, 119,8, 126,2, 132,9, 132,9, 151,6, 153,2, 153,9, 156,9, 163,8.

## Ejemplo 78

(R<sub>p</sub>) 8-(2-Tienil)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-fosforamidato de N-bencilo cíclico (11b)

Una solución de cloruro de 2-tienilcinc (0,3 ml, 1 M, 0,3 00 mmol) en THF (2 ml) se añadió, en una atmósfera de argón, a una solución de (S) 8-bromoadenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-fosforamidato de N-bencilo cíclico (10) (0,122 g, 0,200 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0,046 g, 0,040 mmol) en THF (2 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo suave durante 3 h. Se añadieron una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (3 ml) y diclorometano (10 ml) a la mezcla de reacción fría y la fase orgánica se extrajo con salmuera saturada (2 x 3 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y los disolventes se retiraron por destilación. El material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:2 0; rendimiento 0,059 g (48 %). RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz): δ 8,3. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ 0,11 (6H, s, CH<sub>3</sub>Si), 0,88 (9H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 4,2 - 4,7 (5H, m, H4' H5' PhCH<sub>2</sub>), 5,08 (1H, d, J 5,1 Hz, H2'), 5,28 (1H, s, NH), 5,5 - 5,6 (1H, m, H3'), 5,94 (1H, s, H1'), 6,53 (2H, s a, NH<sub>2</sub>), 7,09 (1H, dd, J 4,0, 5,6 Hz, H4-tienilo), 7,2 - 7,4 (7H, m, H-Ar), 8,10 (1H, s, H2). La reacción posterior, por ejemplo tiación con disulfuro de carbono y una base fuerte y desililación, condujo al ácido tioico 7b.

## Ejemplo 79

Preparación de cápsulas para administración oral

55 Sal de amonio del ácido (Rp)-8-(2-furil) adenosin-3',5' cíclico fosforotioico (Ejemplo 73) - 50 mg

Lactosa -c.s.

El polvo se mezcló y se cargó en cápsulas (cápsulas de tamaño 0).

Ejemplo 80

Preparación de formulación para inyección

- 5 Sal de sodio del ácido (Rp)-8-(4-fluorofenil)-3', 5'-cíclico fosforotioico (Ejemplo 77) - 25 mg

Cloruro de sodio - c.s.

Agua purificada -añadir 5 ml

- 10 Se preparó una solución isotónica de sal de sodio del ácido (Rp)-8-(4-fluorofenil)-3',5' cíclico fosforotioico disolviendo en agua este compuesto y cloruro de sodio. La solución se cargó en un vial de 5 ml y se sometió a autoclave. El producto contiene 5 mg de sal de sodio del ácido (Rp)-8-(4-fluorofenil)-3',5'- cíclico fosforotioico por ml.

Ejemplo 81

Determinación de valores  $CI_{50}$  de nuevos análogos de Rp-AMPSc en un ensayo *in vitro* de activación de la enzima PKA de tipo  $I\alpha$  (ensayo quinasa Cook)

- 15 El propósito del siguiente análisis fue la clasificación de nuevos análogos de Rp-AMPSc como antagonistas o agonistas del complejo holoenzimático de Tipo I ( $RI\alpha/C\alpha$ ) de la proteína quinasa dependiente de AMPc y la determinación de los valores  $CE_{50}$  utilizando un ensayo de supresión o de activación basado en un ensayo espectrofotométrico de Cook.

Exploración de análogos de Rp-AMPSc para antagonistas y agonistas:

- 20 En primer lugar, se exploraron nuevos análogos de Rp-AMPSc en un ensayo de activación utilizando la holoenzima  $RI\alpha$  10 nM y 10  $\mu$ M de cada análogo de Rp-AMPSc para ensayar la activación. Para caracterizar en detalle las propiedades antagonistas de los análogos de Rp-AMPSc se utilizó un ensayo de supresión. La holoenzima  $RI\alpha$  10 nM se activó parcialmente (80 %) por adición de 1  $\mu$ M de Sp-8-Br-AMPSc (en mezcla de ensayo durante 3 minutos). Después la holoenzima se reconstituyó por adición de antagonista Rp-AMPSc (concentraciones en aumento, tiempo de incubación de cinco minutos antes de comenzar el ensayo con kemptide). Los antagonistas bloquearon después la unión y la activación de la PKA por Sp-8-Br-AMPSc por antagonismo competitivo y produjeron una disminución en la actividad quinasa.

Determinación de la  $CE_{50}$  para análogos de Rp-AMPSc frente a la PKA de tipo  $I\alpha$ :

- 30 Utilizando el ensayo de supresión basado en el ensayo espectrofotométrico de Cook y diferentes concentraciones de análogos de Rp-AMPSc que variaban de pM a mM se determinaron valores de  $CE_{50}$  para antagonistas. Se realizaron al menos 10 mediciones por duplicado por análogo utilizando la holoenzima  $RI\alpha$  parcialmente activada (10 nM) en Sp-8-Br AMPSc 1  $\mu$ M (activación del complejo del 80 %). Se realizaron preincubaciones de cinco minutos antes de añadir kemptide para permitir la reconstrucción del complejo holoenzimático para compuestos con propiedades antagonistas. Los nuevos compuestos se compararon con Rp-8-Br-AMPSc en el ensayo.

- 35 Se determinó la constante de activación de la holoenzima  $RI\alpha$  con AMPc. Después de una preincubación de 3 minutos de concentraciones en aumento de AMPc con holoenzima  $RI\alpha$  10 nM en mezcla de ensayo la reacción se inició por adición de 200  $\mu$ M de kemptide. La  $DO_{340}$  se monitorizó durante 1 minuto y la pendiente ( $\Delta DO_{340}/min$ ) se representó como una correlación directa para la actividad relativa de la subunidad catalítica activada. La  $CE_{50}$  fue de 88 nM.

- 40 Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-(2-furil)-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-(2-furil)-AMPSc fue de 238, 337 y 360 nM en tres experimentos en este sistema de ensayo.

Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-(2-tienil)-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-(2-tienil)-AMPSc fue de 449 nM en este sistema de ensayo.

Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-(3-furil)-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-(3-furil)-AMPSc fue de 607 nM en este sistema de ensayo.

- 45 Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-(3-tienil)-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-(3- tienil)- AMPSc fue de 739 nM en este sistema de ensayo.

Se estudió la inversa de la activación PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-fenil-AMPSc. El efecto antagonista medio máximo ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-fenil-AMPSc fue de 1058  $\mu$ M en este sistema de ensayo.

Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-acetil-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-acetil-AMPSc fue de 1,58  $\mu$ M en este sistema de ensayo.

Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-etoxivinil-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-etoxivinil-AMPSc fue de 2,4  $\mu$ M en este sistema de ensayo.

- 5 Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-(2-Br-5-furil)-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-(2-Br-5-furil)-AMPSc fue de 2,9  $\mu$ M en este sistema de ensayo.

Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-etil-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-etil-AMPSc-AMPSc fue de 6,13  $\mu$ M en este sistema de ensayo.

- 10 Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-metil-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-Me-AMPSc fue de 8,76  $\mu$ M en este sistema de ensayo.

Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por el compuesto previamente conocido Rp-8-Br-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-Br-AMPSc fue de 1202 nM en este sistema de ensayo y de 1350 nM en promedio en diversos experimentos (n=3).

- 15 Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-(3-pirrol)-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-(3-pir)-AMPSc fue de 3,61  $\mu$ M en este sistema de ensayo.

Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-(5-metil-2-furil)-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-(5-Me-2-furil)-AMPSc fue de 1,16 M en este sistema de ensayo.

Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc inversa por Rp-8-benzofuril-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-Me-AMPSc fue de 2,78  $\mu$ M en este sistema de ensayo.

- 20 Se estudió la inversa de la activación de PKA mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-(5-hidroximetil-2-furil)-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-(5-MeOH-2-furil)-AMPSc fue de 1,98  $\mu$ M en este sistema de ensayo.

#### Ejemplo 82

- 25 Determinación de valores de  $CI_{50}$  de nuevos análogos de Rp-AMPSc en un ensayo *in vitro* de activación enzimática de PKA de tipo II $\alpha$  (ensayo quinasa de Cook)

Para caracterizar selectivamente el perfil de los compuestos antagonistas para la diana farmacológica preferida (PKA de tipo I $\alpha$ ) frente a otras enzimas PKA que preferentemente no deben inhibirse cuando dirigen la PKA de tipo I $\alpha$  a inmunoestimulación, los valores de  $CE_{50}$  de algunos compuestos seleccionados frente a la PKA de tipo II $\alpha$  se determinaron utilizando el ensayo de supresión basado en el ensayo espectrofotométrico de Cook.

- 30 Determinación de la  $CE_{50}$  de análogos de Rp-AMPSc frente a la PKA de tipo II $\alpha$ : Se realizaron al menos 10 mediciones por duplicado por análogo utilizando la holoenzima RII $\alpha$  parcialmente activada (10 nM) en 1  $\mu$ M de Sp-8-Br AMPSc (activación del 75 % del complejo).

Para permitir la reconstrucción del holocomplejo se realizaron preincubaciones de cinco minutos antes de añadir kemptide.

- 35 Se determinó la constante de activación de Holo RII $\alpha$  con el agonista Sp-8-Br-AMPSc. Después de una preincubación de 3 minutos de concentraciones en aumento de AMPc con holo RII $\alpha$  10 nM en mezcla de ensayo la reacción se inició por adición de 200  $\mu$ M de kemptide. La  $DO_{340}$  se monitorizó durante 1 minuto y la pendiente ( $\Delta DO_{340}/min$ ) se representó como una correlación directa para la actividad relativa de la subunidad catalítica activada. La  $CE_{50}$  fue de 294 nM.

- 40 Se estudió la inversa de la activación de PKA de tipo II mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-(2-furil)-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-(2-furil)-AMPSc fue de 11,6 y de 16,7  $\mu$ M en dos experimentos en este sistema de ensayo.

Se estudió la inversa de la activación de PKA de tipo II mediada por Sp-8-Br-AMPc por Rp-8-fenil-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-fenil-AMPSc fue de 48,6  $\mu$ M en este sistema de ensayo.

- 45 Se estudió la inversa de la activación de PKA de tipo II mediada por Sp-8-Br-AMPc por el compuesto previamente conocido Rp-8-Br-AMPSc. La mitad del máximo efecto antagonista ( $CI_{50}$  o  $CE_{50}$ ) de Rp-8-Br-AMPSc fue de 14,9  $\mu$ M en este sistema de ensayo.

## Ejemplo 83

Determinación de valores de  $CE_{50}$  de nuevos análogos de Rp-AMPSc que se unen a la PKA de tipo  $I\alpha$  en un ensayo *in vitro* de unión a ligando competitivo (ensayo Biacore)

5 El propósito de este experimento fue evaluar las propiedades de análogos de AMPc que actúan como antagonistas del complejo holoenzimático de tipo I ( $RI\alpha/C\alpha$ ) de la proteína quinasa dependiente de AMPc en un ensayo de competición y unión en superficie basado en terminología Biacore y determinar los valores de  $CE_{50}$  para determinar los efectos antagonistas por este método de unión a ligando que es independiente del ensayo de actividad enzimática.

Ensayo competición en superficie con antagonistas de holo  $RI\alpha$ :

10 El ensayo de competición en superficie Biacore se diseñó como un método alternativo al ensayo de Cook basado en actividad. Este ensayo permite medir la unión de antagonistas independientemente de la actividad quinasa para determinar valores de  $CE_{50}$  para análogos de AMPc que se unen específicamente a distintos dominios de unión del AMPc dentro del complejo holoenzimático. Por lo tanto, ambos ensayos, basados en actividad o en unión produjeron información complementaria sobre el mecanismo de cómo la unión a antagonistas impide la activación del complejo holoenzimático.

15 Para estos estudios fue necesario capturar no solo la subunidad reguladora sobre las superficies detectoras agonistas (es decir, 8- AHA AMPc), sino inmovilizar todo el complejo holoenzimático dirigido al sitio mediante ligandos antagonistas (es decir, Rp-8AHA AMPSc). Esto facilita la determinación de los valores de  $CE_{50}$  para antagonistas que se unen al complejo holoenzimático o a sitios únicos de las subunidades reguladoras. El complejo holoenzimático se incubará con diferentes cantidades de antagonista antes de la inyección en la superficie de la microplaca. La unión de antagonistas producirá una señal de unión reducida sobre la superficie de la microplaca (competición en superficie) dando valores de  $CE_{50}$  para los antagonistas. Sin embargo, si el holo complejo se disocia después de unirse a la superficie del ligando debido a las propiedades agonistas parciales del ligando, la señal de unión resultante será menor de la esperada y la disociación puede alterar el valor de  $CE_{50}$  observado para el antagonista. Estos diversos experimentos tuvieron que realizarse para validar si la holo  $RI\alpha$  o solo la  $RI\alpha$  se unía durante la asociación al Rp-8-AHA AMP o a la superficie del 8-AHA AMPc

Por esta razón se ensayó la unión de la holo  $RI\alpha$  sobre las dos superficies diferentes, la superficie de 8-AHA AMPc y de Rp 8AHA AMPSc usando dos condiciones diferentes. En presencia de ATP y Mg las subunidades reguladoras y catalíticas se unen estrechamente y forman el complejo holoenzimático, mientras que en presencia de EDTA, que quela los iones Mg, la afinidad es significativamente menor y se facilita la disociación del complejo. Durante la asociación de una solución holoenzimática  $RI\alpha$  10 nM se obtuvo una señal de respuesta de 900 UR en la superficie de Rp-8-AHA AMPSc. En la superficie de 8-AHA AMPc se obtuvo menos de la mitad de esta señal, lo que indica que solamente la subunidad  $RI\alpha$  de la holoenzima se unía a la superficie de 8-AHA AMPc o que durante la unión de la holoenzima el complejo se disociaba dejando solamente la subunidad  $RI\alpha$  unida a la superficie de la microplaca. Cuando se añadió EDTA 10 mM a la holoenzima para facilitar la disociación del complejo antes de la inyección, solamente se unieron 250 UR tanto a la superficie de Rp-8-AHA AMPSc como a la de 8-AHA AMPc, lo que podría deberse solo a la unión de la subunidad  $RI\alpha$ . Cuando se añadió un exceso de antagonista (Rp-8-Br AMPSc 10  $\mu$ M o Rp-8-(2-furil) AMPSc 10  $\mu$ M) a la holoenzima, la unión del holocomplejo se bloqueó por completo en la superficie de Rp-8-AHA AMPSc, mientras que no se observó ningún efecto en la unión a la superficie de 8-AHA AMPc.

40 Para determinar los valores  $CE_{50}$  de antagonistas, se incubaron diferentes concentraciones de antagonistas con holo  $RI\alpha$  10 nM y se inyectaron sobre las dos superficies de detección. Solo fueron detectable efectos competitivos de Rp-8-(2-furil) AMPSc y Rp-8-Br AMPSc en la superficie de Rp-8AHA AMPSc, mientras que la unión a 8-AHA AMPc no se vio afectada por ninguna concentración de antagonista. Las  $CE_{50}$  resultantes se determinaron en la superficie de Rp-8-AHA AMPSc. Con una  $CE_{50}$  de 377 nM para Rp-8-(2-furil) AMPSc y una  $CE_{50}$  de 2,9  $\mu$ M para Rp-8-Br AMPSc estos datos son similares a los valores  $CE_{50}$  estimados por el ensayo de Cook en estudios previos ( $CE_{50}$  = 349 nM para Rp-8-(2-Furil) AMPSc y  $CE_{50}$  = 1,3  $\mu$ M para Rp-8-Br AMPSc). El Rp-8-(3-Furil) AMPSc se analizó de la misma manera y tuvo un valor  $CE_{50}$  de 743 nM (ensayo de Cook 607 nM) . En consecuencia se puede llegar a la conclusión de que el ensayo de antagonista de unión a ligando en Biacore produce resultados comparables a los de los datos basados en ensayos de actividad.

50 Se realizaron ensayos de unión de competencia en las superficies de Rp-8-AHA AMPSc y 8-AHA AMPc con Holo  $RI\alpha$  10 nM, Holo  $RI\alpha$  en EDTA 10 mM y Holo  $RI\alpha$  en presencia de 10  $\mu$ M de antagonistas Rp-8- Br AMPSc o Rp-8-2-Furil AMPSc. Se registraron tiempos de asociación y disociación de 5 minutos a un caudal de 10  $\mu$ l/min.

Inyecciones de Holo  $RI\alpha$  10 nM con Rp-8-(2-Furil) AMPSc 3,9 nM-8  $\mu$ M y Rp-8-Br AMPSc 19 nM-38,4  $\mu$ M que se unían a las superficies detectoras de Rp-8-AHA AMPSc y 8-AHA AMPc produjeron tiempos de asociación y disociación de 5 minutos a un caudal de 10  $\mu$ l/min.

55 Se determinaron los valores de  $CE_{50}$  del antagonista Rp-8-(2Furil) AMPSc sobre la superficie de Rp-8-AHA AMPSc; la señal de unión de Holo  $RI\alpha$  después de un tiempo de asociación de 5 minutos a un caudal de 10  $\mu$ l/min se representó

frente al log de la concentración del antagonista. La CE<sub>50</sub> se determinó como 377 nM.

Se determinaron los valores de CE<sub>50</sub> del antagonista Rp-8- (3Furil) AMPSc sobre la superficie de Rp-8-AHA AMPSc ; la señal de unión de Holo RI $\alpha$  después de un tiempo de asociación de 5 minutos a un caudal de 10  $\mu$ l/min se representó frente al log de la concentración del antagonista. La CE<sub>50</sub> se determinó como 743 nM.

- 5 Se determinaron los valores de CE<sub>50</sub> del antagonista previamente conocido Rp-8-Br- AMPSc sobre la superficie de Rp-8-AHA AMPSc; la señal de unión de Holo RI $\alpha$  después de un tiempo de asociación de 5 minutos a un caudal de 10  $\mu$ l/min se representó frente al log de la concentración de antagonista. La CE<sub>50</sub> se determinó como 2,6  $\mu$ M.

Resumen de resultados de caracterización biológica *in vitro*

- 10 La Tabla 1 proporciona una visión global de los datos del ensayo de Cook para la actividad enzimática de PKA de tipo I $\alpha$ .

TABLA 1

Análogos de Rp AMPSc	Antagonista	Agonista	Inhibición CE <sub>50</sub>	Fuerza relativa*
Rp-8- (2-furil)AMPSc	sí	no	3,19E-07	4,24
Rp-8-(2-tienil)AMPSc	sí	no	4,49E-07	3,01
Rp-8-(3-furil)AMPSc	sí	no	6,07E-07	2,23
Rp-8-(3-tienil)AMPSc	sí	no	7,39E-07	1,83
Rp-8-Phe AMPSc	sí	no	1,06E-06	1,28
Rp-8-(5-Me-2-furil)AMPSc	sí	no	1,16E-06	1,17
Rp-8-Br AMPSc (3x)	sí	no	1,35E-06	1,00
Rp-8-Acetil AMPSc	sí	no	1,58E-06	0,86
Rp-8- (5-MeOH-2-furil)AMPSc	sí	no	50 % de inhibición a 1,98E-06	0,68
Rp-8-(1-etoxivinil) AMPSc	sí	no	2,40E-06	0,56
Rp-8-benzofuril AMPSc	sí	no	2,78E-06	0,49
Rp-8-(2-Br-5- furil)AMPSc	sí*	no	50 % de inhibición a 3E-06	0,45
Rp-8-(3-Pir)AMPSc	sí	no	3,61E-06	0,37
Rp-8-Et AMPSc	sí	no	6,13E-06	0,22
Rp-8-Me AMPSc	sí	no	8,72E-06	0,16

\*antagonistas relacionados con Rp-8Br-AMPS

- 15 La tabla 2 proporciona una visión global de los datos del ensayo de Cook para la actividad enzimática de PKA de tipo II $\alpha$  en comparación con los datos de activación para la PKA de tipo I $\alpha$  para los compuestos seleccionados y muestra los perfiles de selectividad.

TABLA 2

Holo RII $\alpha$

Análogos de Rp AMPSc	Antagonista	Inhibición relativa*	Agonista	Inhibición CE <sub>50</sub>	Fuerza relativa **	CE <sub>50</sub> RII/CE <sub>50</sub> RI***
Sp-8Br AMPSc	no		sí	4,65E-07		
Rp-8 (2-furil) AMPSc	sí	59 %	no	1,16E-05	1,28	32
Rp-8Br AMPSc	sí	79 %	no	1,49E-05	1,00	12
Rp-8-Fe AMPSc	sí	61 %	no	4,86E-05	0,31	46

\* % del efecto antagonista con Sp-8Br-AMPSc 1  $\mu$ M a 250  $\mu$ M de análogo de Rp-AMPSc

\*\* antagonista relacionados con Rp-8-Br-AMPSc

- 20 \*\*\* selectividad para PKA de tipo I (CE<sub>50</sub> de PKA de tipo II/ CE<sub>50</sub> de PKA de tipo I)

La tabla 3 muestra datos del ensayo de Cook para la actividad enzimática de PKA de tipo I $\alpha$  en comparación con los datos del ensayo de competición de unión a ligando (ensayo Biacore) con compuestos seleccionados.

TABLA 3

antagonista	Cook holo RI $\alpha$	Biacore holo RI $\alpha$	Cook holo RII $\alpha$	Biacore holo RII $\alpha$
Rp-8(2-furil)AMPSc	349 nM	377 nM*		
Rp-8 (3-furil) AMPSc	607 nM	743 nM*		
Rp-8Br AMPSc	1,3 $\mu$ M	2,9 $\mu$ M* (holo 10 nM)	14,9 $\mu$ M	10,8 $\mu$ M (superficie Rp-8-AHA)
Rp-8Br AMPSc	1,3 $\mu$ M	2,4 $\mu$ M* (holo 2 nM)	14,9 $\mu$ M	21,2 $\mu$ M (superficie 8-AHA)

Ejemplo 84

5 Ensayo preclínico en linfocitos T humanos, ensayo clínico *ex vivo* en linfocitos T HIV+.

Se caracterizaron análogos de AMPc con respecto a sus propiedades agonistas o antagonistas, fuerzas y efectos tóxicos utilizando un ensayo en el que fue posible evaluar los efectos de los compuestos sobre la proliferación de linfocitos T. Se activaron linfocitos T periféricos humanos para su proliferación en una forma policlonal por entrecruzamiento de los marcadores de superficie CD3. Las células se expusieron a concentraciones crecientes de diversos nuevos análogos de AMPc en ausencia y presencia del agonista de PKA de tipo I Sp-8-Br-AMPSc, añadido para imitar el nivel elevado de AMPc en linfocitos T de individuos infectados por VIH.

Basándose en la configuración Rp de su fosforo quiral, podría esperarse que los compuestos mostrasen propiedades antagonistas. Los compuestos ensayados eran derivados de Rp-8-Br-AMPSc con sustituciones en la posición 8 del anillo de adenina. Esta posición es un centro de extracción de electrones que proporciona selectividad dirigida a fármacos. Era de esperar que las modificaciones en esta posición produjeran compuestos con una afinidad más fuerte por la unión al sitio B sobre la subunidad R de la PKA de tipo I y por tanto mayor fuerza y selectividad mejorada.

La Tabla 4 resume las propiedades de compuestos análogos de AMPc ensayados usando linfocitos T primarios humanos. Se realizaron diversas modificaciones de la molécula AMPc en diversas posiciones, pero hasta ahora ninguna condujo a ninguna mejora en cuanto a la fuerza y selectividad en comparación con el compuesto de partida Rp-8-Br-AMPSc detectado usando ensayos de proliferación de linfocitos T. Sin embargo, algunos compuestos (véase la Tabla 4) mostraron ser más fuertes que el compuesto de referencia Rp-8-Br-AMPSc cuando se ensayaron directamente sobre la holoenzima PKA de tipo I usando un ensayo enzimático (véase la Tabla 4).

TABLA 4

Ensayo <i>ex vivo</i> en linfocitos T				
Compuesto	Número de análogo	Propiedades antagonistas	Propiedades agonistas	Fuerza relativa*
Rp-8-Br-AMPSc	LA-1001	Sí	No	1,00
Sp-8-Br-AMPSc	-	No	Sí	1,00
Rp-8-(2-FU)-AMPSc	LA-3026 LA-3001	Sí	No	0,37
Rp-8-(2-Br-5-FU)-AMPSc	LA-3027/LA-3002	Sí	No	0,19
Rp-8-cPA-AMPSc	LA-3028	Sí	No	0,04
Rp-8-Fe-AMPSc	LA-3003	Sí	No	0,09
Rp-8-EtVin-AMPSc	LA-3004	Sí	No	0,26
Rp-8-Me-AMPSc	LA-3005	Sí	No	0,69
Rp-8-Ac-AMPSc	LA-3006	Sí	No	0,43
Rp-8-Et-AMPSc	LA-3007	Sí	No	0,63
Rp-8-(1-OHEt)-AMPSc	LA-3008			
Rp-8-(3-FU)-AMPSc	LA-3009	Sí	No ensayadas	0,56

Ensayo ex vivo en linfocitos T				
Compuesto	Número de análogo	Propiedades antagonistas	Propiedades agonistas	Fuerza relativa*
Rp-8-(3-TH)-AMPCS	LA-3010	Sí	No ensayadas	0,02
Rp-8-(2-TH)-AMPCS	LA-3011	Sí	No	0,24
Rp-8-(3-Pir)-AMPSc	LA-3012	Sí	No	0,11
Rp-8-(5-Me-2-FU)-AMPSc	LA-4 006	Sí	No	0,35
Rp-8-benzofuril-AMPSc	LA-4007	Sí	No	0,10
Rp-8-(5-MeO-2-FU)-AMPSc	LA-4008	Sí	No	0,25
Rp-8-(5-MeOH-2-FU)-AMPSc	LA-4010	Sí	No	0,15
Rp-8-(2'-N-Me-pirrol)-AMPSc	LA-4013	Sí	No	0,35
Rp-8-(2-tiazol)-AMPSc	LA-4014	Débiles	No	
Rp-8-(3-piridinil)-AMPSc	LA-4015	No	No	
Rp-8-(para-MeOH-Fe)-AMPSc	LA-4016	No	Sí	

## Ejemplo 85

Prueba de experimentos de principio en un SIDA murino, con inmunodeficiencia inducida por retrovirus de ratón

Figura 1. El tratamiento de ratones infectados con antagonistas de PKA de tipo I reduce la frecuencia de linfocitos T CD4 secretores de TNF- $\alpha$ . La frecuencia de células TNF- $\alpha$  positivas se evaluó por tinción intracitoplasmática. Las células se analizaron después de estimulación con enterotoxina estafilocócica (SEB) o en condiciones basales. El efecto de Rp-8-Br-AMPC sobre la secreción estimulada por SEB fue significativo con un valor de  $p = 0,0012$ . El efecto de Rp-8-furilo también fue significativo a un valor de  $p = 0,0041$ .

El tratamiento de Rp-8-Br-AMPC redujo drásticamente la secreción de TNF- $\alpha$  por linfocitos T CD4 de ratones infectados (figura 1). El SIDAM (Sida murino) se caracterizó por un fuerte aumento de la frecuencia de linfocitos CD4<sup>+</sup> secretores de TNF- $\alpha$ , bien espontáneamente o después de estimulación con SEB. En ratones tratados, esta frecuencia se redujo a valores casi normales. En el caso de Rp-8-Br-AMPC, esto no podría atribuirse al efecto tóxico dado que las respuestas proliferativas contra el Acm anti-CD3 estaban realmente aumentadas. El Rp-8-furil-AMPC inhibió la secreción de TNF- $\alpha$  por linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los animales infectados. En estos experimentos, el Rp-8-furil-AMPC y el Rp-8-Br-AMPC tuvieron efectos similares sobre la secreción espontánea e inducida por SEB de TNF- $\alpha$  por linfocitos T CD4<sup>+</sup> (figura 1). El tratamiento con Rp-8-Br-AMPC y Rp-8-(2-furil)-AMPSc modificó el perfil secretor de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los ratones infectados, aumentando ligeramente el IFN- $\gamma$  (ambos mostrados) y reduciendo la secreción de TNF- $\alpha$  después de estimulación con enterotoxina estafilocócica SEB. Esto indica que el tratamiento con esta clase de agentes mejoraría respuestas inmunitarias Th1 directamente contra patógenos intracelulares oportunistas ayudando al mismo tiempo a reducir manifestaciones inflamatorias del síndrome.

## 20 Detalles experimentales para los ejemplos 81 a 85

Ensayo enzimático acoplado de Cook para PKA

Preparación del complejo holoenzimático R1 $\alpha$ :

La formación de la holoenzima se realizó por diálisis durante una noche de PKA R1 $\alpha$  y PKA C $\alpha$  en una proporción molar de 1,2 a 1,0. Se realizaron tres cambios de tampón de 1 l (tampón de diálisis: MOPS 20 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 100  $\mu$ M,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM) para retirar el AMPc de la subunidad reguladora.

Ensayo de la formación del complejo holoenzimático y condiciones de ensayo:

La holoenzima se diluyó (tampón de dilución: MOPS 100 mM pH 7,0; MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM) a una solución de reserva 1  $\mu$ M y la actividad se ensayó en el ensayo de Cook (mezcla de ensayo: MOPS 100 mM pH 7,0, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, fosfoenol piruvato 1 mM, ATP 1 mM, NADH 200  $\mu$ M, DTT 1 mM, lactato deshidrogenasa 15 U/ml, piruvato quinasa 70 U/ml). La reacción se inició mezclando kemptide 1  $\mu$ l 25 mM (concentración final de péptido activo de 200  $\mu$ M) con holoenzima 1  $\mu$ l (concentración final de 10 nM) en un volumen total de mezcla de ensayo de 100  $\mu$ M. La DO<sub>340</sub> se monitorizó durante 1 minuto y la actividad relativa de C $\alpha$  se representó como una pendiente de deterioro de DO/minuto. Solamente una pequeña actividad residual de C $\alpha$  (<8 % de complejo activado) mostró una formación

casi completa de complejo holoenzimático inactivo.

La determinación de la constante de activación del AMPc se realizó mediante concentraciones en aumento de AMPc en una preincubación de 3 minutos con holoenzima 10 nM en la mezcla de ensayo ( $CE_{50} = 88$  nM).

Preparación del holocomplejo RII $\alpha$ :

- 5 La formación de la holoenzima se realizó por diálisis durante una noche de PKA RII $\alpha$  y PKA C $\alpha$  en una proporción molar de 1,2 a 1.0. Aunque la formación de holo RII $\alpha$  no requiere ATP/Mg, se utilizó de nuevo el mismo tampón de diálisis que para la formación de la holo RI $\alpha$  (MOPS 20 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, ATP 100  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM), dado que el ATP se requiere en el ensayo de Cook y este tampón imita las condiciones *in vivo*. La formación holo completa y la activación holo de AMPc 1  $\mu$ M se verificó antes y después de los experimentos de titulación. Incluso después de 10 cuatro semanas en hielo la holo RII $\alpha$  mostró la misma actividad residual de la PKA C $\alpha$  del 21 % y podría activarse completamente por AMPc a medida que se preparaba recientemente.

Preparación de soluciones de reserva de Rp-AMPSc:

- 15 Todos los análogos de Rp-AMPSc se disolvieron en tampón de dilución con DMSO al 20 % a una concentración final de 10 mM y las concentraciones se determinaron espectrofotométricamente utilizando coeficientes de extinción molar a  $\lambda_{\text{máx}}$ . Se prepararon diluciones adicionales de los análogos de Rp-AMPSc por diluciones repetidas 1:10 veces en tampón de dilución. Preferentemente se añadió 1  $\mu$ l, pero no más de 5  $\mu$ l de análogo de Rp-AMPSc, a la mezcla de ensayo. Por lo tanto, la concentración de DMSO en la mezcla de ensayo final no fue mayor del 1 %. El efecto del DMSO en las enzimas de ensayo se analizó y los resultados mostraron que las concentraciones de DMSO de 11 % o 20 más no tenían efectos sobre las enzimas del ensayo (columnas ADP) y Holo RI $\alpha$  (columnas C $\alpha$ , Holo RI $\alpha$  y AMPc activado $\alpha$ ).

Ensayo competitivo de unión a ligando *in vitro* para antagonistas de AMPc (ensayo Biacore)

Preparación de holocomplejos RI $\alpha$  y RII $\alpha$ :

- 25 Se realizó la formación de holoenzimas por análisis durante una noche de PKA RI $\alpha$  o RII $\alpha$  y PKA C $\alpha$  en una proporción molar de 1,2 a 1.0. Se realizaron tres cambios de tampón de 1 l (tampón de diálisis: MOPS 20 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 100  $\mu$ M,  $\beta$ -mercapto-etanol 5 mM) para retirar el AMPc de la subunidad reguladora. Ambos complejos holoenzimáticos se utilizaron y se ensayaron en estudios previos.

Preparación de las superficies de Rp-8-AHA AMPSc y 8-AHA AMPc:

- 30 Ambos nucleótidos se disolvieron en tampón borato 100 mM pH 8,5 a una concentración de 3 mM y se acoplaron covalentemente a una microplaca detectora CM5 por aminoacoplamiento convencional usando EDC/NHS. Como superficie blanco se utilizó una superficie de dextrano CM no tratada.

Condiciones experimentales para el ensayo de competición de superficie:

- |    |                            |   |
|----|----------------------------|---|
|    | Instrumento:               | Biacore 2000, Biacore AB, Uppsala, Suecia   |
|    | Temperatura:               | 25 °C   |
| 35 | Microplaca CM5 (01.12.03): | FC1: dextrano CM (Referencia)<br>FC2: Rp-8-AHA AMPSc 3 mM<br>FC3: dextrano CM<br>FC4: 8-AHA AMPc 3 mM                   |
|    | Superficies:               | FC1-FC2-FC3-FC4, flujo en serie   |
|    | Referencia:                | FC1   |
| 40 | Tampón de revelado 1:      | MOPS 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, ATP 100 $\mu$ M, MgCl <sub>2</sub> 5 mM, Tween 20 al 0,005 % , filtrado y desgasificado |
|    | Tampón de revelado 2:      | MOPS 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005 % , filtrado y desgasificado  |

- 45 Condiciones de ensayo: 10 o 2 nM de holo complejo se inyectó durante 5 minutos utilizando el comando kinject con un tiempo de disociación 5 minutos. Para el tampón de revelado holo RI $\alpha$  y para el tampón de revelado holo RII $\alpha$  se utilizó el tampón de revelado 2. Se utilizaron de diez a catorce concentraciones diferentes de agonistas o antagonistas de PKA en un intervalo apropiado para determinar los valores de  $CE_{50}$  de estos análogos de AMPc. Por lo tanto la señal de unión sobre la superficie tanto de Rp-8-AHA AMPSc como de 8-AHA AMPc después de un tiempo de

disociación de 5 minutos se representó frente a log de la concentración del compuesto.

Volumen de inyección:	50 $\mu$ l
Caudal:	10 $\mu$ l/min
Regeneración:	SDS al 0,1 %, clorhidrato de guanidinio 3 M

#### 5 Ensayo preclínico en linfocitos T humanos, ensayo clínico ex vivo en linfocitos T HIV+.

Selección negativa de linfocitos T CD3+ de sangre periférica:

10 De forma rutinaria se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana de la capa leucocitoplaquetaria a través de centrifugación en gradiente de densidad con solución de linfoprep. La mayoría de los trombocitos aislados junto con las CMSP se retiraron por lavado en PBS. El aislamiento de linfocitos T de CMSP se basó en la retirada de monocitos con el marcador de superficie CD14 y de linfocitos B con el marcador de superficie CD19 utilizando perlas magnéticas monodispersas revestidas con anticuerpos contra los respectivos marcadores específicos de células.

15 Se añadieron diez ml de capa leucocitoplaquetaria y 25 ml de PBS se añadieron a cada tubo de 50 ml y se mezclaron. En el fondo de los tubos se sedimentaron diez ml de solución linfoprep y se centrifugaron a 800 x g durante 25 minutos a 4 °C con freno al mínimo. La capa de CMSP se aisló y se lavó dos veces en PBS (centrifugación a 300 x g durante 7 minutos a 4 °C). El sedimento se suspendió en RPMI 1640/FCS al 10%/PS y se contó el número de CMSP. Dinaperlas CD14 y CD19 se lavaron 6 veces en RPMI 1640/FCS al 10%/PS usando un CPM, después se mezcló con CMPS (3 x 10<sup>7</sup> células/ml) a una proporción de perla con respecto a célula de 5:1 (se calculó que las CMSP contenían monocitos al 20 % y linfocitos B al 20 %) y se colocó en una plataforma mecedora a 4 °C. Después 45 minutos las células positivamente seleccionadas (monocitos y linfocitos B) se retiraron de la mezcla celular usando un CPM, dejando una suspensión de linfocitos T. Se contó el número de linfocitos T y las células se utilizaron en experimentos o se cultivaron en una suspensión de 1-2 x 10<sup>6</sup> células por ml de RPMI 1640/FCS al 10%/PS a 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5 %.

Ensayos de proliferación:

25 Se realizaron ensayos de proliferación para estudiar la fuerza de diversos análogos de AMPc como inhibidores o potenciadores de proliferación de linfocitos T. Se incubaron cien mil linfocitos T seleccionados negativamente en un volumen total de 100  $\mu$ l de RPMI 1640/FCS al 10%/PS en cada pocillo de placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano. La activación de las células se consiguió por adición de anticuerpos anti-CD3 a una dilución final de 1:10<sup>4</sup> (50 ng/ml) y el entrecruzamiento posterior del complejo TCR/CD3 por adición de perlas magnéticas revestidas con anti-IgG de ratón de cabra a una proporción de perla con respecto a célula de 1:1. Las perlas se lavaron seis veces en RPMI 1640/FCS al 10 %/PS utilizando un CPM antes de la adición a la suspensión celular. Las células se incubaron durante 65 h a 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5 % y se examinó la proliferación añadiendo [metil-<sup>3</sup>H] timidina 5  $\mu$ Ci después de 48 horas de este periodo. Las células se recogieron sobre placas de filtro utilizando un recogedor multimuestra y las placas de filtro se secaron en una incubadora térmica a 50 °C durante 2 h. Se añadieron 20  $\mu$ l de líquido de centelleo a cada pocillo y la proliferación se midió posteriormente por recuento de centelleo  $\beta$ . Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Tratamiento de linfocitos T activados con análogos de AMPc:

40 Se trataron linfocitos T con concentraciones en aumento de diversos análogos de AMPc, se añadieron 30 minutos antes de la activación de las células por la adición de anticuerpos anti-CD3 para permitir la difusión de los compuestos en las células. La fuerza de cada análogo para inhibir o estimular la proliferación celular se determinó midiendo la incorporación de [metil-<sup>3</sup>H]timidina como una función de la concentración del análogo de AMPc.

Prueba de experimentos de principio en un SIDA murino, de inmunodeficiencia inducida por retrovirus de ratón

Animales:

45 Ratonos C57BL6 se infectaron con una preparación viral que contenía el virus defectuoso responsable del SIDAM (titulado con el ensayo de placa XC y que contenía virus ecotrópico 10<sup>3</sup> UFP) y se trataron con los diferentes agentes farmacológicos aproximadamente 10 semanas después de la infección.

Tratamientos:

Los diferentes compuestos se administraron durante 10 días por inyecciones IP repetitivas o inserción de bombas osmóticas. Se ensayaron los siguientes agentes:

- Rp-8-Br-AMPc: 1 mg/día/ratón
- 50 - Rp-8-furil-AMPc: se ensayaron dos dosificaciones 1 mg/día/ratón y 2,5 mg/día/ratón

- Rofecoxib: 60 µg/día/ratón

Ratones infectados recibieron inyecciones intralipídicas o de PBS como controles para rofecoxib o Rp-Br/furil-AMPC respectivamente. Normalmente, cada grupo experimental contenía de 6 a 9 animales. Cuando las células se cultivaron después del sacrificio de los animales, los diferentes agentes se añadieron al medio de cultivo.

5 Ensayos de proliferación y citocinas:

Después del sacrificio de los animales, las células se cultivaron durante 72 horas en presencia de Acm anti-CD3 (2C11: 4 µg/ml). Al final del cultivo se añadió timidina marcada con tritio y la radioactividad se midió en un analizador de centelleo.

10 Además del ensayo de proliferación realizado en linfocitos de ganglios linfáticos en respuesta contra el Ac anti-CD3, se midió la secreción de TNF $\alpha$  en linfocitos T CD4<sup>+</sup> después de activación durante 6 horas con SEB utilizando el método de tinción intracitoplasmática.

Ejemplo 86

(Sp) 8-(2-Tienil)adenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-fosforamidato de N-bencilo cíclico (11b)

15 Una solución de cloruro de 2-tienilcinc (0,3 ml, 1 M, 0,300 mmol) en THF (2 ml) se añadió, en una atmósfera de argón, a una solución de (S) 8-bromoadenosin-2'O-(*terc*-butildimetilsilil)-3',5'-fosforamidato de N-bencilo (0,122 g, 0,200 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0,046 g, 0,040 mmol) en THF (2 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo suave durante 3 h. Se añadieron una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (3 ml) y diclorometano (10 ml) a la mezcla de reacción fría y la fase orgánica se extrajo con salmuera saturada (2 x 3 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y los disolventes se retiraron por destilación. El material residual se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice  
20 usando MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:20; rendimiento 0,059 g (48 %). RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz):  $\delta$  8,3. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  0,11 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si), 0,88 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 4,2 - 4,7 (m, 5H, H4' H5', PhCH<sub>2</sub>), 5,08 (d, J 5,1 Hz, 1H, H2'), 5,28 (s, 1H, NH), 5,5 - 5,6 (m, 1H, H3'), 5,94 (s, 1H', H1'), 6,53 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>), 7,09 (dd, J 4,0, 5,6 Hz, 1H, H4-tienilo), 7,2 - 7,4 (m, 7H, H-Ar), 8,10 (s, 1H, H2).

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto adenosín 3',5'-monotiofosforotioato cíclico en la configuración Rp, en el que el sustituyente 8 se selecciona entre:
- un grupo aralquilo, alcarilo, alquilo, alquilo cíclico, alqueniilo o alquinilo unido opcionalmente mediante un grupo carbonilo o tiocarbonilo y opcionalmente sustituido con grupos acilo, halo, hidroxilo, tiol, amino, carboxi (u otro oxiácido), ciano, azido, alcoxi, éster, éter o alquiltio, donde dichos grupos alquilo o análogos insaturados de los mismos contienen hasta 10 átomos de carbono;
  - grupos arilo opcionalmente sustituidos; y
  - grupos heteroarilo.
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustituyente 8 se selecciona entre:
- grupos arilo opcionalmente sustituidos seleccionados entre benceno, naftaleno y sistemas carbocíclicos anulados, y sistemas heterocíclicos anulados incluyendo piridina, di- y triazinas, furano, tiofeno, pirrol y los azoles, y triazoles, y oxa- y tiadiazoles, y tetrazoles; y
  - grupos heteroarilo seleccionados entre las azinas de anillo de seis miembros, piridina, las diazinas, triazinas y sistemas carbocíclicos anulados, y sistemas heterocíclicos anulados como se ha definido anteriormente, y sistemas de anillo de cinco miembros, tales como furano, tiofeno y pirrol, los azoles, y triazoles, y oxa- y tiadiazoles, y tetrazoles y sistemas heterocíclicos y carbocíclicos anulados;
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el sustituyente 8 comprende un grupo fenilo, furilo o tienilo.
4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 protegido en uno o más de los grupos azufre fosforotioico, el grupo adenosinamina y el grupo furil hidroxilo.
5. Proceso para la preparación de un adenosín monofosforotioato 3',5'-cíclico 8-carbamoilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo dicho proceso al menos una de las siguientes etapas:
- a) hacer reaccionar un adenosín fosforamidato 3',5'-cíclico 8-carbamoilado 2'-protegido con disulfuro de carbono y desproteger el 2'-hidroxilo;
  - b) hacer reaccionar una adenosina 8-carbamoilada con  $\text{SPCl}_3$  en un disolvente seco;
  - c) hacer reaccionar una adenosina 8-carbamoilada con un fosfito y posteriormente con azufre;
  - d) hacer reaccionar un 8-halo-adenosín monofosforotioato cíclico opcionalmente 2'-protegido con un agente de alquilación y, si se requiere, desproteger el 2'-hidroxilo;
  - e) transformar un adenosin monofosforotioato 3',5'-cíclico 8-carbamoilado en una sal del mismo;
  - f) hacer reaccionar un adenosin monofosforotioato 3',5'-cíclico 8-carbamoilado para realizar una sustitución de sililo en el oxígeno 2'; y
  - g) separar los isómeros Rp y Sp de una mezcla isomérica Rp/Sp de un adenosin monofosforotioato 3',5'-cíclico 8-carbamoilados o un derivado del mismo.
6. Un adenosin fosforamidato 3',5'-cíclico 8-carbamoilado en la configuración Sp, en el que el sustituyente 8 es como se ha definido en la reivindicación 1.
7. Un adenosin fosforotioato 3',5'-cíclico 8-carbamoilado-2'-protegido en la configuración Rp, en el que el sustituyente 8 es como se ha definido en la reivindicación 1.
8. Un 8-halo adenosin fosforamidato 3',5'-cíclico, en la configuración Sp, en el que el grupo amino del fosforamidato comprende un átomo de hidrógeno.
9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación en 8 en el que dicho compuesto está 2'-protegido.
10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que dicha protección en 2' es 2'-sililación.
11. Una composición farmacéutica que comprende un adenosín monofosforotioato 3',5'-cíclico 8-carbamoilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 junto con un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.
12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como un medicamento.

13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, inmunodeficiencia e infecciones virales.

5 14. El uso de un adenosín 3',5'-monofosforotioato cíclico 8-carbamoilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, inmunodeficiencias e infecciones virales.

15. Un método de ensayo para determinar adenosín monofosfato cíclico AMPc en una muestra, generalmente una muestra biológica, cuyo método implica poner en contacto dicha muestra con un análogo de AMPc y un reactivo de unión a AMPc, caracterizado por que dicho análogo es un adenosín 3',5'-monofosforotioato cíclico 8- carbamoilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

10

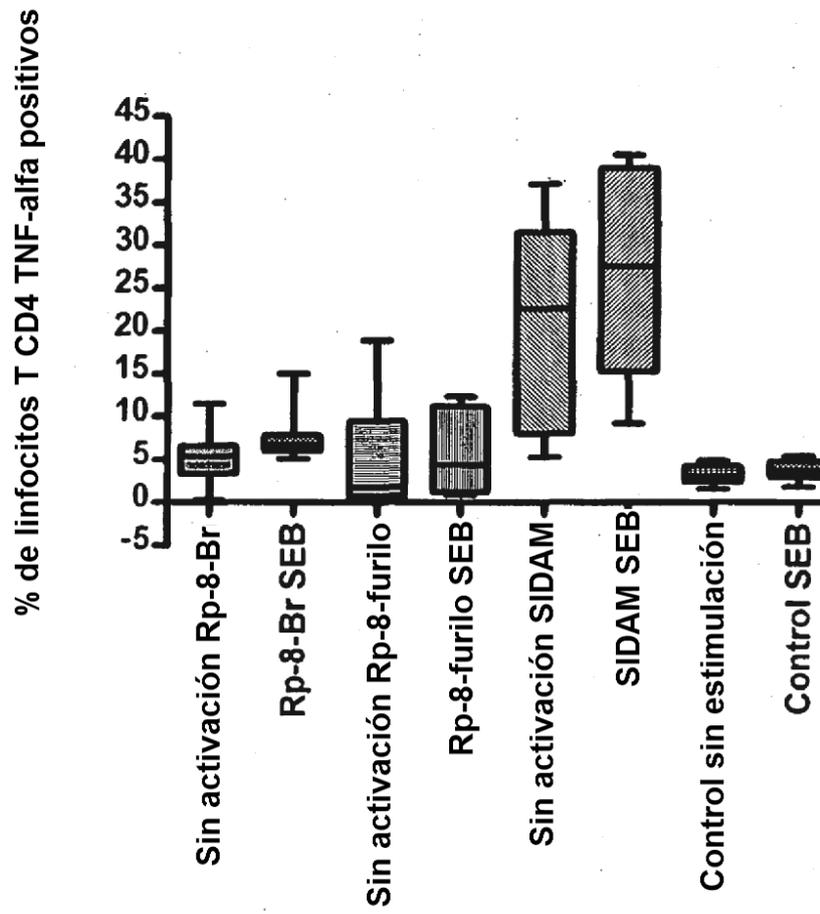


FIG. 1