

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 043**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/167** (2006.01)

**A61K 31/426** (2006.01)

**A61K 31/56** (2006.01)

**A61P 11/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2010 PCT/US2010/056516**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12064340**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2010 E 10859431 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2498774**

54 Título: **Compuestos de doble acción que se dirigen al receptor A<sub>2A</sub> de adenosina y al transportador de adenosina para la prevención y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

30 Prioridad:

**13.11.2009 US 260932 P**

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

**01.12.2017**

73 Titular/es:

**ACADEMIA SINICA (100.0%)  
128, Sec. 2, Academia Road  
Nan-Kang, Taipei, TW**

72 Inventor/es:

**LIN, YUN-LIAN;  
CHERN, YIJUANG;  
FANG, JIM-MIN;  
LIN, JUNG-HSING y  
HUANG, NAI-KUEI**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 645 043 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

Compuestos de doble acción que se dirigen al receptor A<sub>2A</sub> de adenosina y al transportador de adenosina para la prevención y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

Campo técnico

La presente invención proporciona la identificación, síntesis y uso del compuesto activo para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Huntington.

Abreviaturas: A<sub>2A</sub>R, receptor A<sub>2A</sub> de adenosina; Ac<sub>2</sub>O, anhídrido acético; CGS, 6-amino-9-(5-etilcarbamoil-3,4-dihidroxi-oxolan-2-il)-2-[2-[4-(2-carboxietil)fenil]etilamino]purina; DIEA, diisopropiletilamina; DMF, *N,N*-dimetilformamida; DML, ligandos múltiples diseñados; ENT, transportador equilibrativo de nucleótidos, ESI, ionización por electrospray; EtOAc, acetato de etilo; HD, enfermedad de Huntington; hENT1, transportador equilibrativo de nucleósidos humano 1; HBA, aceptor de enlaces de hidrógeno; HBD, dador de enlaces de hidrógeno; HBTU, 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; HOBt, 1-hidroxibenzotriazol; HP, hidrofobicidad; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; IR, infrarrojo; JNK, cinasa *c-Jun N*-terminal; MS, espectrometría de masa; MsCl, cloruro de metanosulfonilo; MTT, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; NBTI, *S*-(4-nitrobenzil)-6-tioinosina; NMR, resonancia magnética nuclear; py, piridina; PyBOP, benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino fosfonio hexafluorofosfato; RA, anillo aromático; *t*-BuOH, butanol terciario; TEMPO, 2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oxi; THF, tetrahidrofurano; TLC, cromatografía en capa delgada; TsCl, cloruro de *p*-toluenosulfonilo; TsOH, ácido *p*-toluenosulfónico; ZM, 4-(2-[7-Amino-2-{2-furil}{1,2,4}triazolo{2,3-a}{1,3,5}triazin-5-il-amino]etil)fenol.

Técnica anterior

Introducción

La enfermedad de Huntington (HD) es una enfermedad neurodegenerativa autosómica dominante provocada por una expansión del trinucleótido CAG en el gen de Huntingtina (Htt), que expresa síntomas de corea, demencia y psiquiátricos.<sup>1-3</sup> El tratamiento eficaz de HD todavía no se ha desarrollado, aunque se han reportado unos pocos agentes terapéuticos con efectos moderados.<sup>4, 5</sup> Se ha demostrado que el agonista selectivo del receptor A<sub>2A</sub> de adenosina (A<sub>2A</sub>R), CGS21680 (en breve, CGS), puede atenuar los síntomas de HD en un modelo de ratón transgénico,<sup>6</sup> y se ha demostrado que este compuesto es capaz de rescatar la deficiencia del ciclo de la urea de la enfermedad HD mediante la potenciación de la actividad del sistema ubiquitina-proteosoma.<sup>7</sup> Sin embargo, se conoce que CGS ejerce un efecto inmunosupresor fuerte,<sup>8</sup> entre otros efectos secundarios, y por lo tanto no es adecuado para uso clínico. Por otra parte, un análogo de adenosina, designado como T1-11 (compuesto 1), también un agonista de A<sub>2A</sub>R, se aísla recientemente de *Gastordia elata* y muestra que previene la apoptosis de células PC12 derivadas de suero, lo que sugiere su potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades degenerativas neuronales.<sup>9</sup>

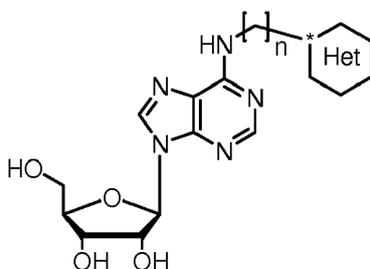
Resumen de la invención

Se ha reconocido que tanto el A<sub>2A</sub>R como el transportador de adenosina (tal como el transportador equilibrativo de nucleósidos ENT1) se localizan en el estriado,<sup>10-13</sup> donde el Htt mutante se agrega.<sup>14</sup> La inhibición del transportador de adenosina elevaría las concentraciones locales de adenosina, y de ese modo aumenta la eficacia en agonizar el A<sub>2A</sub>R. De manera interesante, se ha encontrado que el compuesto 1 también es un inhibidor de ENT1. Por otra parte, el efecto inmunosupresor potente de CGS era una consecuencia de la señalización de A<sub>2A</sub>R, lo que indica que la afinidad de unión extremadamente fuerte a A<sub>2A</sub>R puede no ser una propiedad deseable para agentes terapéuticos clínicamente útiles.

Por lo tanto, es de considerable interés modificar el compuesto 1 aún para conservar su propiedad de acción múltiple. Además, los compuestos transientes o de unión débil pueden ser preferibles a los compuestos de unión estable,<sup>15</sup> especialmente cuando se dirigen al sistema de señalización de A<sub>2A</sub>R debido a las razones mencionadas anteriormente. Los ligandos múltiples diseñados (DML)<sup>16,17</sup> son conceptualmente distintos a los compuestos promiscuos descubiertos mediante tamizaje aleatorio, porque ellos se diseñan racionalmente para optimizar las propiedades deseadas. Se ha propuesto que los DML pueden ser ventajosos para el tratamiento de enfermedades con etiologías complejas, p. ej., asma, obesidad, cáncer, y enfermedades psiquiátricas, en comparación con los compuestos de direccionamiento individual.<sup>16-18</sup> Se ha concebido que la redundancia y la robustez intrínseca de las redes biológicas complejas pueden ser responsables del fracaso de fármacos altamente selectivos en suministrar los efectos terapéuticos destinados.<sup>19</sup> Una evaluación reciente indica que la farmacología de A<sub>2A</sub>R es de hecho más compleja,<sup>20</sup> y por lo tanto los DML pueden ser especialmente adecuados para el direccionamiento del sistema de señalización de A<sub>2A</sub>R. Sin embargo, diseñar ligandos de múltiple direccionamiento es frecuentemente una tarea desafiante,<sup>21,22</sup> en parte debido a la dificultad en la construcción apropiada de los modelos computacionales para describir las interacciones de los ligandos con diversos objetivos, y en parte debido al aumento de las limitaciones de la síntesis química, y la satisfacción de las propiedades químico físicas de los compuestos. Quizás asociado con la complejidad creciente en la medida que aumenta el número de objetivos, actualmente la mayoría de los DML reportados son ligandos de doble función.<sup>22</sup>

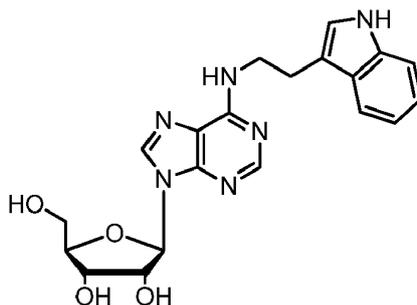
En la solicitud provisional presentada anteriormente, solicitud de patente provisional de los EE.UU. 61/260,932, hemos descrito una serie de compuestos que se han sintetizado y que muestran dobles funciones tanto en receptores como transportadores de adenosina. Otros derivados de adenosina se han descrito en el documento WO2008/156513 o US2008/0176816 A1.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula:



en donde  $n$  es 1 a 3, el heterociclo (sustituido) contiene anillos de 5 o 6 miembros y el heterociclo fusionado contiene heteroátomos de nitrógeno, oxígeno o azufre y los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, flúor, cloro, bromo, yodo, hidroxilo, alquilo  $C_{1-6}$ , trifluorometilo y fenilo sustituido, para el uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto que lo necesite.

En algunas modalidades, el compuesto es



La enfermedad neurodegenerativa puede ser una enfermedad por mal plegamiento de las proteínas que se define como una enfermedad provocada por el mal plegamiento de las proteínas. En algunas modalidades, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Prion, enfermedad de Huntington, y ataxias espino-cerebelosas.

Como otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos uno de los compuestos descritos anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

Para diseñar racionalmente los ligandos de doble acción apropiados como agentes terapéuticos para la enfermedad de Huntington, primero se construyen dos modelos de farmacóforo, uno para los agonistas de  $A_{2A}R$ , y el otro para los inhibidores de ENT1. Los farmacóforos tridimensionales son distribuciones espaciales específicas de las características funcionales químicas de una serie de compuestos que dirigen el mismo sitio activo de una biomolécula y ejercen la misma función,<sup>23</sup> que son particularmente útiles si las estructuras por rayos X de alta resolución o por NMR de las biomoléculas objetivo aún no se encuentran disponibles. El análisis de farmacóforos se ha aplicado exitosamente a numerosas tareas de descubrimiento de fármacos.<sup>24-29</sup> Aunque la estructura cristalina de alta resolución del receptor  $A_{2A}$  de adenosina humano se ha liberado recientemente,<sup>30</sup> esta representa la conformación vinculada con el antagonista ZM241385 (en breve, ZM), no con un agonista. Por otra parte, la estructura cristalina de ENT1 humano (hENT1) aún no se encuentra disponible, y además no existe una plantilla estructural adecuada para el moldeado por homología.

En base al plegamiento estructural de 1, se intentó diseñar una serie de derivados de adenosina (Figura 1). Las modificaciones químicas de la adenosina se llevaron a cabo si el ajuste farmacóforo del compuesto modificado predice una actividad aceptable. Los ensayos competitivos de unión a ligando se realizaron para verificar si los compuestos diseñados de hecho se unen al  $A_{2A}R$  y al ENT1 con buena afinidad. Finalmente, se analizó si estos compuestos pudieran prevenir la apoptosis de las células PC12 derivadas de suero, lo que es un indicio decisivo de su potencial para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.<sup>31,32</sup>

## Breve descripción de las figuras

Figura 1. Estructuras de CGS, NBTI y algunos derivados de adenosina diseñados con modificación en las posiciones  $N^6$  y  $C^5$ .

5 Figura 2. El modelo 3D del farmacóforo de los agonistas del receptor  $A_{2A}$  de adenosina. (A) Las características geométricas del modelo de farmacóforo. Cian: hidrofobicidad (HP), oro: anillo aromático (RA), magenta: dador de enlaces de hidrógeno (HBD), verde: aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA) (B) Ajuste de CGS en el modelo de farmacóforo. (C) Ajuste del compuesto 1. (D) Ajuste de NBTI. (E) Ajuste del compuesto 6. (F) Ajuste del compuesto 11.

10 Figura 3. El modelo 3D del farmacóforo de los inhibidores del transportador equilibrativo de nucleósidos humano (hENT1). (A) Las características geométricas del modelo de farmacóforo. Oro: anillo aromático (RA), verde: aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA1: 3.431Å distancia de RA; HBA2: 10.388Å distancia a de RA). (B) Ajuste de NBTI en el modelo de farmacóforo. (C) Ajuste del compuesto 1. (D) Ajuste de CGS. (E) Ajuste del compuesto 6. (F) Ajuste del compuesto 11.

15 Figura 4. El gráfico de dispersión de los valores de  $pK_i$  predichos de los agonistas de  $A_{2A}$ -R en función de los valores de  $pK_i$  medidos. Los círculos rellenos representan los compuestos de entrenamiento, y los círculos abiertos los compuestos sintetizados.

Figura 5. El gráfico de dispersión de los valores de  $pK_i$  predichos de los inhibidores de ENT1 en función de los valores de  $pK_i$  medidos. Los círculos rellenos representan los compuestos de entrenamiento, y los círculos abiertos los compuestos sintetizados.

20

## Descripción de las modalidades

25 Modelo de farmacóforo de los agonistas del receptor  $A_{2A}$  de adenosina humano. Como parte del enfoque de diseño de fármacos de doble farmacóforo, se construyó primero un modelo 3D del farmacóforo de los agonistas de  $A_{2A}$ R humano ( $hA_{2A}$ R) para diseñar los compuestos que podrían funcionar como agonistas de  $hA_{2A}$ R. El conjunto de entrenamiento incluye 25 compuestos que tienen una gran diversidad estructural y actividad de  $hA_{2A}$ R ( $K_i$  de 1.2 nM a 187  $\mu$ M) seleccionados de la bibliografía. Un agonista potente de  $hA_{2A}$ R CGS,<sup>33</sup> se incluye, además, en este conjunto de entrenamiento. El módulo HypoGen<sup>®</sup> de Catalyst<sup>®</sup> de Accelrys<sup>®</sup><sup>34</sup> se usó para construir el modelo de farmacóforo de estos ligandos. El farmacóforo construido se ilustra en la Figura 2A, que permite cuatro características geométricas que incluyen hidrofobicidad (HP, en cian), anillo aromático (RA, en oro), dador de enlaces de hidrógeno (HBD, en magenta) y aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA, en verde). Para CGS las cuatro características del farmacóforo construido pueden ajustarse con precisión (Figura 2B). Por el contrario, S-(4-nitrobenzil)-6-tiinosina (NBTI)<sup>35</sup> carece de un ajuste del anillo aromático (Figura 2D), de acuerdo con su afinidad débil como un ligando de  $hA_{2A}$ R, aunque este muestra una unión fuerte con el transportador de adenosina. Los ligandos de doble acción diseñados 1, 6 y 11 se ajustan al menos a tres características en este modelo de farmacóforo para agonistas de  $A_{2A}$ R (Figuras 2C, 2E y 2F).

40 Modelo de farmacóforo de los inhibidores de transportadores equilibrativos de nucleósidos. Para diseñar compuestos de doble función que actúen cooperativamente como los agonistas de  $hA_{2A}$ R y los inhibidores de hENT1, se construyó además el farmacóforo de los inhibidores de hENT1 (Figura 3A). El conjunto de entrenamiento incluye 25 compuestos que poseen actividad inhibitoria de hENT1 en el intervalo de  $IC_{50}$  de 0.29 nM a 32  $\mu$ M, que se seleccionaron de la bibliografía (ver Información de Apoyo). El modelo de farmacóforo construido de los inhibidores de hENT1 consiste en sólo tres características, que incluyen dos aceptores de enlaces de hidrógeno y un anillo aromático. Los cinco compuestos (NBTI, 1, CGS, 6, y 11) pueden ajustarse en estas tres características (Figuras 3B-F). El número diferente de características entre los farmacóforos de los agonistas de  $hA_{2A}$ R e inhibidores de hENT1 pudiera atribuirse a la naturaleza de los compuestos del conjunto de entrenamiento.

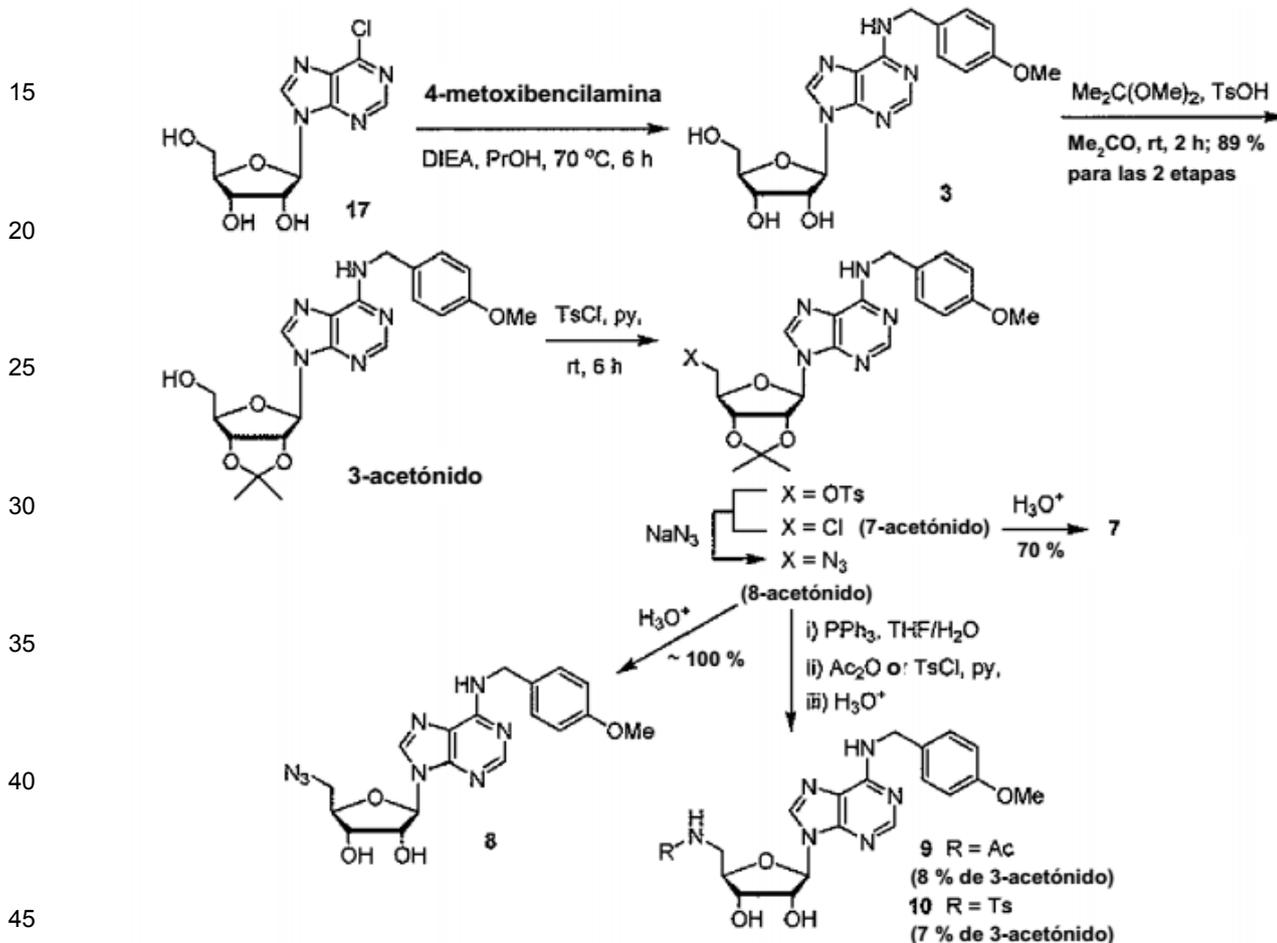
50 Mediante el escrutinio cuidadoso de las estructuras en el conjunto de entrenamiento de agonistas de  $hA_{2A}$ R (ver Información de Apoyo), se encontró que muchos de ellos poseen un grupo hidrofóbico en el extremo 5' de nucleósido, especialmente esos compuestos con mayor potencia, que incluye CGS. Por lo tanto, el farmacóforo construido debe incluir esta característica importante. Por el contrario, en el conjunto de entrenamiento de inhibidores de hENT1, casi todo el extremo 5' del nucleósido posee un grupo hidroxilo polar.

55 Las diferencias de farmacóforos entre los dos objetivos en investigación también arrojaron luz sobre el diseño de los compuestos de doble función. Por ejemplo, el compuesto 6 no se ajusta bien a la característica hidrofóbica en el modelo de farmacóforo del receptor  $A_{2A}$ , y este es de hecho menos potente que CGS, que se ajusta bien a todas las características. Sin embargo, el compuesto 6 podría ajustarse bien en las tres características en el modelo de hENT1.

60 Como para el compuesto 11, este se ajusta bien a todas las características que incluyen la hidrofobicidad del modelo de farmacóforo de  $A_{2A}$ R. No obstante, este aún se ajusta bien al modelo de farmacóforo de hENT1, lo que indica la mayor tolerancia del modelo de farmacóforo de ENT1. En resumen, mediante la comparación de las características y calidades de ajuste de compuestos de estos dos modelos de farmacóforos, se puede formular la hipótesis que el bolsillo de unión de  $hA_{2A}$ R tiene un sitio hidrofóbico importante, y el bolsillo de unión a hENT1 puede ser más flexible para acomodar los nucleósidos con porciones hidrofóbicas en el extremo 5' en esta serie de compuestos. Los análisis de farmacóforos proporcionan una idea del diseño y la comprensión del compuesto de doble función en ausencia de la información estructural de hENT1.

65

Síntesis de derivados de adenosina. Una librería representativa de análogos de adenosina (Figura 1) se desarrolló en base a los modelos de farmacóforos. El compuesto 1, aislado originalmente de *Gastrodia elata*,<sup>9</sup> se sintetizó con un alto rendimiento mediante la reacción de sustitución de 6-cloropurina ribofuranósido (17) con 4-hidroxibencilamina (como la sal clorhídrica) en presencia de una base de diisopropilamina. Como la 4-hidroxibencilamina no se encontró comercialmente disponible, se preparó en dos etapas a partir de 4-hidroxibenzaldehído mediante la reacción de condensación de Pd/C y hidroxilamina para dar una oxima intermediaria, que se hidrogenó posteriormente mediante la catálisis de Pd/C y HCl. Mediante los procedimientos similares a aquel para el compuesto 1, se prepararon una serie de derivados de adenosina sustituidos con N<sup>6</sup>-2-6 mediante las reacciones de sustitución de 6-cloropurina ribofuranósido con bencilaminas sustituidas apropiadas. En lugar del método de calentamiento convencional, se aplicó además la radiación de microondas para acortar el tiempo de reacción en la preparación de N<sup>6</sup>-(3-indoliletíl)adenosina (6).



Esquema 1. Síntesis de N<sup>6</sup>-(4-metoxibencil)adenosina (3) y sustitución de su grupo 5'-hidroxi con cloro, azida, acetamida, y p-toluenosulfonamida.

50

El tratamiento de N<sup>6</sup>-(4-metoxibencil)adenosina 3 con 2,2-dimetoxipropano en acetona anhidra ofreció el 3-acetonido correspondiente, que reaccionó con cloruro de p-toluenosulfonilo en presencia de piridina para dar una mezcla de derivados de tosilato y de cloro (Esquema 1). El derivado de tosilato era inestable, mientras que el compuesto de cloruro (7-acetonido) podría aislarse mediante cromatografía e hidrolizarse posteriormente para dar 7. Sin la separación, esta mezcla se trató con azida sódica, seguido por la hidrólisis catalizada por ácido, para dar un compuesto de azida 8. Alternativamente, la reducción de Staudinger de 8-acetonido dio una amina intermediaria, que se convirtió a la acetamida 9 y a la sulfonamida 10 correspondiente después de la eliminación del grupo 2',3'-isopropilideno en ácido.

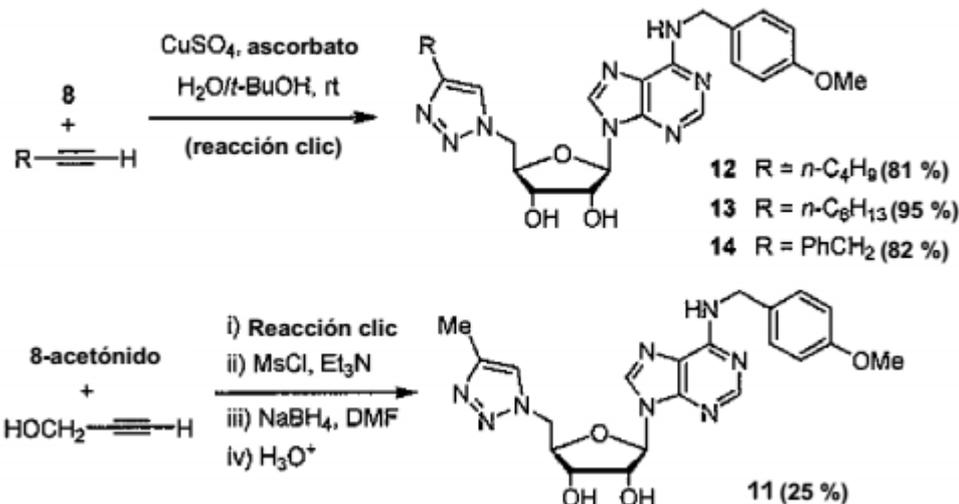
55

5

10

15

20



Esquema 2. Elaboración del grupo 5'-azido mediante la reacción clic para dar compuestos triazol.

25

En otro enfoque (Esquema 2), la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por  $\text{Cu}^+$  (reacción clic)<sup>38</sup> del compuesto azida 8 con 1-hexino, 1-octino, y 3-fenil-1-propino ofreció los derivados de triazol 12, 13y 14, respectivamente. De manera similar, la reacción clic de 8-acetonido con alcohol propargílico dio un compuesto de triazol, del que se activó el grupo hidroxilo como un mesilato y después se redujo mediante  $\text{NaBH}_4$  para dar un grupo metilo. El compuesto 11 se obtuvo después de la eliminación del grupo 2',3'-isopropilideno.

30

35

40

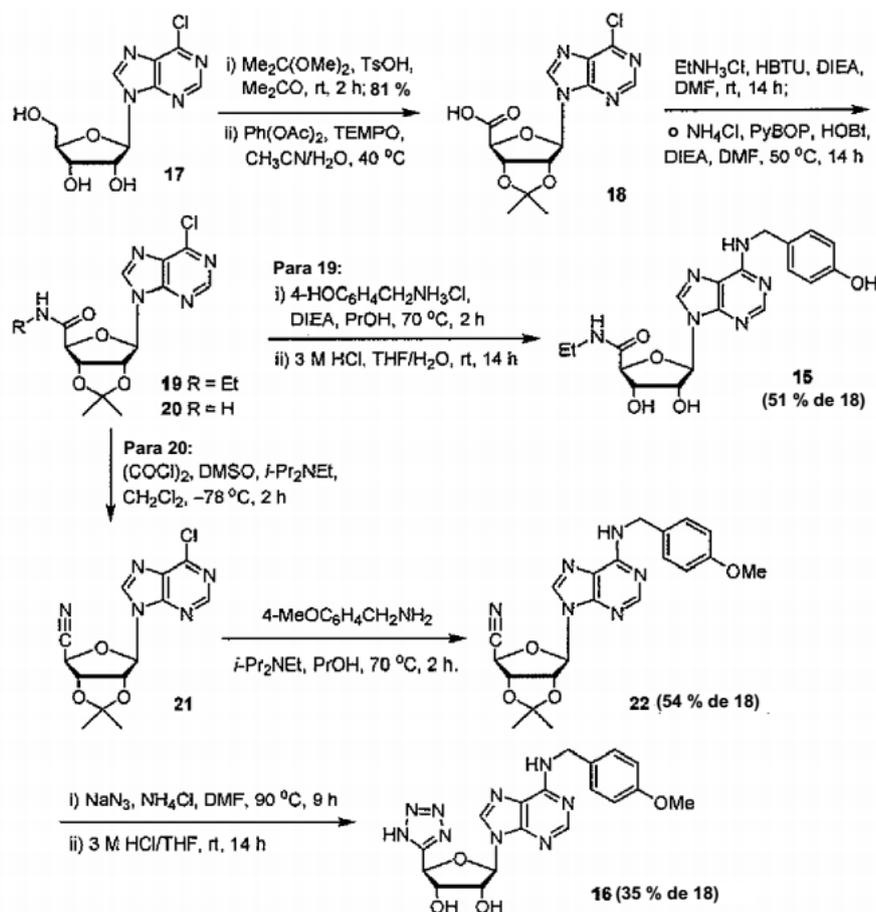
45

50

55

60

65



Esquema 3. Síntesis de derivados de carboxamida y tetrazol.

El acetónido de 6-cloropurina ribofuranósido se oxidó mediante (diacetoxiyodo) benceno con la catálisis de 2,2,6,6-tetrametilpiperidil-1-oxi (TEMPO)<sup>39</sup> para dar un ácido carboxílico 18. Las reacciones de acoplamiento de ácido 18 con etilamina y amonio dieron las amidas 19 y 20, respectivamente.

5 El átomo de cloro en 19 se reemplazó por 4-hidroxibencilamina, y la hidrólisis posterior del acetónido proporcionó amida 15. Por otra parte, la amida 20 se convirtió a nitrilo 21 en el tratamiento con Me<sub>2</sub>SO, cloruro de oxalilo y *i*-Pr<sub>2</sub>NEt.<sup>40</sup> Después el átomo de cloro se sustituyó por 4-metoxibencilamina, una cicloadición 1,3-dipolar del grupo ciano con NaN<sub>3</sub> introdujo la porción de tetrazol deseada en la posición C-5',41 que da 16 después de la eliminación del grupo 2',3'-isopropilideno en condiciones ácidas.

10 Evaluación biológica de derivados de adenosina modificados en N<sup>6</sup> y C<sup>5</sup>. Las propiedades farmacológicas de los análogos de adenosina preparados se caracterizaron por los Servicios Farma MDS mediante el uso de ensayos de unión a radioligandos. Las constantes de unión (K<sub>i</sub>) de algunos compuestos representativos se muestran en la Tabla 1. El agonista potente de A<sub>2A</sub>R CGS parece carecer de la actividad contra ENT1, mientras que el inhibidor NBTI de ENT1 no muestra la capacidad de unión con A<sub>2A</sub>R. Ni CGS o NBTI son fármacos de doble función. Algunos de los análogos de adenosina preparados muestran las dobles acciones sobre A<sub>2A</sub>R y ENT1, en particular, los compuestos 1, 4 y 6 que muestran los valores de K<sub>i</sub> en el intervalo micromolar bajo y submicromolar con A<sub>2A</sub>R y ENT1, respectivamente. Excepto para 11 y 15, los derivados de adenosina que tienen la modificación en la posición C-5' parece deteriorar su unión con A<sub>2A</sub>R, aunque aún conservan alta afinidad con ENT1.

20 Tabla 1. Actividad de unión de los derivados de adenosina modificados en N<sup>6</sup> y C<sup>5</sup> con receptor y transportador de adenosina.<sup>a</sup>

Compuesto	K <sub>i</sub> (μM)	
	A <sub>2A</sub> -R <sup>b</sup>	ENT1 <sup>c</sup>
CGS	7.77 × 10 <sup>-2</sup>	-
NBTI	> 10	2.9 × 10 <sup>-4</sup>
<b>1</b>	2.62	5.38 × 10 <sup>-1</sup>
<b>1-acetónido</b>	> 100	> 100
<b>2</b>	14.4	1.44 × 10 <sup>-2</sup>
<b>3</b>	30.1	3.18 × 10 <sup>-1</sup>
<b>4</b>	3.21	3.72
<b>5</b>	27.7	6.51 × 10 <sup>-3</sup>
<b>6</b>	4.39	3.47
<b>7</b>	> 100	2.98
<b>8</b>	-	5.81 × 10 <sup>-1</sup>
<b>9</b>	> 100	1.43
<b>10</b>	> 100	2 × 10 <sup>-1</sup>
<b>11</b>	41.8	9.60 × 10 <sup>-1</sup>
<b>12</b>	> 100	5.11 × 10 <sup>-1</sup>
<b>13</b>	> 100	5.2 × 10 <sup>-2</sup>
<b>14</b>	> 100	1.16 × 10 <sup>-1</sup>
<b>15</b>	20.3	> 10
<b>16</b>	> 100	1.17

<sup>a</sup> Los ensayos de unión a radioligandos se realizaron por los Servicios Farma MDS de Taiwan (Taipei, Taiwan) mediante el uso de protocolos estándar de unión. <sup>b</sup>Receptor de adenosina A<sub>2A</sub> humano. <sup>c</sup> Transportador de equilibrio 1 del conejillo de indias.

60 Hemos reportado anteriormente que el compuesto 1 aislado de un extracto metanólico acuoso de *Gastrodia elata* previno la apoptosis de células PC12 derivadas de suero mediante la supresión de la actividad de JNK.<sup>15</sup> En este estudio, las células PC12 derivadas de suero se trataron con el compuesto en la dosis indicada por 24 h. La viabilidad celular se controló mediante el ensayo de MTT, y se expresa como un porcentaje de la actividad de MTT medido en el grupo que contiene suero. A una concentración de 0.01 μM, los compuestos 4 y 6 también rescataron células PC12 de la apoptosis provocada por la extracción de suero por igual así como también el 1 de acuerdo con la viabilidad celular de

los ensayos de MTT. En conjunto, la doble función de estos compuestos en la activación del receptor de adenosina y en la inhibición del transportador de adenosina podría aumentar sinérgicamente la concentración eficaz de adenosina, especialmente cuando estas dos proteínas se encuentran próximas.

5 Evaluación estadística de modelos de farmacóforos. La Figura 4 muestra el gráfico de dispersión del  $pK_i$  experimental en función los valores de  $pK_i$  predichos a partir del modelo de farmacóforo de los agonistas de  $A_{2A}R$ . El valor de  $r^2$  de los valores de  $K_i$  predichos en función de los valores de  $K_i$  experimentales es 0.962, y la media cuadrática del error (rmse) es 0.658 kcal/mol. Este modelo de farmacóforo se evaluó adicionalmente mediante el uso de la prueba de aleatoriedad de Fisher para la significancia estadística, como se implementa en el módulo CatScramble. El módulo CatScramble  
10 mezcló los valores de  $pK_i$  aleatoriamente por 19 veces para generar nuevas hipótesis (es decir, modelos de farmacóforos). Ninguna de las 19 hipótesis de los datos mezclados tuvieron un costo más bajo que la hipótesis informada. La Tabla 2 resume las características ajustadas de los compuestos en la Figura 4, junto con la desviación de la distancia de la ubicación ajustada de la característica en el compuesto del centro de la característica en el modelo de farmacóforo. Para reiterar, la Tabla 2 es una representación cuantitativa de la Figura 4. Cuando un ligando se ajusta en un farmacóforo, la calidad de ajuste (o mapeo) se indica por el "valor de ajuste." Un valor de ajuste más alto representa un mejor ajuste, y la computadora ajusta los valores en dependencia de dos factores: los pesos asignados a las características de los farmacóforos y a cuán cerca se encuentran las características en las moléculas de las ubicaciones exactas de las características en el modelo de farmacóforo.

20 Tabla 2. Comparación de las actividades de los compuestos con el número ajustado de características del modelo de farmacóforo de agonistas de  $A_{2A}R$ . Los números se encuentran en la unidad de Å.

Compuesto ID	HBD	HBA	RA	HP	Valor de ajuste
CGS21680	√ / 0.166	√ / 0.125	√ / 0.201	√ / 0.436	10.6482
<b>1</b> (T1-11)	√ / 0.121	√ / 0.135	√ / 0.248	×	8.68049
NBTI	√ / 0.422	√ / 0.304	×	√ / 0.901	8.62848
<b>6</b>	√ / 0.377	√ / 0.359	√ / 0.403	×	8.52907
<b>11</b>	√ / 1.181	√ / 0.445	√ / 0.434	√ / 0.544	9.59155

35 El agonista de  $A_{2A}R$  potente CGS se ajusta a las cuatro características del farmacóforo construido, y las desviaciones de las ubicaciones de las características ajustadas de las ubicaciones exactas de las características del modelo de farmacóforo son también muy pequeñas. En comparación con CGS, el compuesto 1 carece de una porción hidrofóbica para ajustarse en la característica del modelo de farmacóforo, y por lo tanto muestra una afinidad reducida. Por el contrario, NBTI carece de una porción de anillo aromático, que suprime completamente la actividad para agonizar al receptor de adenosina  $A_{2A}$ . Esto indica que la característica del anillo aromático puede ser más importante que la porción hidrofóbica en este modelo de farmacóforo. El compuesto 6 no se ajusta a la característica hidrofóbica del modelo de farmacóforo, mientras que el compuesto 11 muestra un valor de ajuste más alto. Por el contrario, los ensayos de unión indican que el compuesto 6 ( $K_i = 4.39 \mu M$ ) muestra ~afinidad de unión 10 veces más fuerte que el compuesto 11 ( $K_i = 41.8 \mu M$ ). Esto puede racionalizarse por el hecho de que todas las ubicaciones ajustadas de las características del compuesto 6 tienen menos desviaciones de las ubicaciones exactas de las características.

El modelo de farmacóforo construido de los inhibidores de hENT1 consiste en sólo tres características, a saber, una característica de anillo aromático y dos aceptores de enlaces de hidrógeno. El valor de  $r^2$  de los valores de  $K_i$  predichos en función de los valores de  $K_i$  experimentales es 0.927, y la rmse es 0.85 kcal/mol (Figura 5). Este modelo de farmacóforo se evaluó adicionalmente mediante el módulo CatScrambler. Los cinco compuestos (NBTI, 1, CGS, 6, y 11) pueden ajustarse en todas estas tres características (Figuras 3B-F), y por lo tanto las desviaciones de las ubicaciones exactas de las características necesitan compararse (Tabla 3). Aparentemente, el inhibidor más potente, NBTI, tiene el valor de ajuste más alto y la desviación más pequeña de las tres características. Los valores de ajuste de los compuestos 1, 11 y 6 son 6.61, 6.4 y 5.86, respectivamente, que son consistentes con la clasificación de su actividad medida. CGS (con un valor de ajuste alto de 7.1) es obviamente un valor atípico de este modelo, ya que este compuesto no tiene actividad inhibitoria hacia hENT1. Sin embargo, CGS es el único compuesto con una característica de anillo aromático ajustada a la porción de nucleósido (Figura 3). Esto es por lo tanto importante para examinar cuidadosamente si el grupo funcional ajustado es de hecho el mismo como los grupos funcionales de los compuestos del conjunto de entrenamiento que definen la característica consenso en el análisis de farmacóforo. El "valor de ajuste" sólo no puede considerarse la medida de ajuste.

Tabla 3. Comparación de las actividades de los compuestos con el número ajustado de características del modelo de farmacóforo del inhibidor de ENT1. Los números están en la unidad de Å.

Compuesto ID	HBD	HBA	RA	Valor de ajuste
NBTI	√ / 0.421	√ / 0.647	√ / 0.793	5.92748
<b>1</b>	√ / 0.544	√ / 0.619	√ / 0.586	4.94133
CGS21680	√ / 0.567	√ / 1.276	√ / 0.358	5.37611
<b>6</b>	√ / 0.421	√ / 0.647	√ / 0.493	5.40138
<b>11</b>	√ / 0.74	√ / 0.588	√ / 0.942	4.35311

## 15 Conclusión

Hemos adoptado un enfoque de modelado de doble farmacóforo para diseñar compuestos de doble acción que se dirigen al sistema de señalización de A<sub>2A</sub>R. En base al andamiaje estructural de 1, se diseñó y se sintetizó una serie de derivados de adenosina y se llevaron a cabo modificaciones químicas de adenosina si el ajuste del farmacóforo del compuesto modificado predice una actividad aceptable. Los ensayos competitivos de unión a ligando verifican que los compuestos diseñados de hecho se unen tanto a A<sub>2A</sub>R como a ENT1 con afinidad moderada. La cantidad eficaz de los compuestos diseñados para el tratamiento terapéutico de enfermedades neurodegenerativas, que incluyen la enfermedad de Huntington, es 1.5-2.5 mg/kg, en base a la dosificación oral de T1-11 representativo en ratones. La vía de administración preferida de los compuestos diseñados es la administración oral, ya sea en formas de liberación inmediata o de liberación lenta. Finalmente, se muestra que estos compuestos previenen la apoptosis de las células PC12 derivadas de suero, lo que es un indicio decisivo de su potencial para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

## 30 Sección Experimental

Materiales y Métodos. Todos los reactivos y disolventes fueron de grado reactivo y se usaron sin purificación adicional a menos que se especificara de cualquier otra manera. El tetrahidrofurano y el éter dietílico se destilaron de Na/benzofenona y el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se destiló de CaH<sub>2</sub>. Todos los experimentos de sensibilidad al aire o humedad se realizaron bajo argón. Todos los cristales se secaron en horno por más de 2 horas y se usaron después del enfriamiento a temperatura ambiente en desecantes. Las reacciones de microondas se realizaron mediante el uso de una unidad de microondas de modo único enfocada (CEM Discover). La máquina consiste en un sistema de suministro de energía de microondas enfocado continuo con una salida de energía seleccionable por el operador.

Los puntos de fusión se registraron en un microaparato Yanaco. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro digital de Japan JASCO Co. DIP-1000. Los valores [α]<sub>D</sub> se dan en unidades de 10<sup>-1</sup>grados cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. Los espectros infrarrojos (IR) se registraron en Nicolet Magna 550-II. Los espectros de NMR se obtuvieron en Varian Unity Plus-400 (400 MHz) y los cambios químicos (δ) se registraron en partes por millón (ppm) en relación con δ<sub>H</sub> 7.24/ δ<sub>C</sub> 77.0 (línea central de t) para CHCl<sub>3</sub>/CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>H</sub> 2.05/ δ<sub>C</sub> 29.92 para (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO/(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, δ<sub>H</sub> 3.31/ δ<sub>C</sub> 49.0 para CH<sub>3</sub>OH/CD<sub>3</sub>OD, y δ<sub>H</sub> 2.49 (m) / δ<sub>C</sub> 39.5 (m) para (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO/(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO. Los patrones de división se informaron como s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuarteto), m (multiplete) y br (ancho). Las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz. Los experimentos de ESI-MS se realizaron en un espectrómetro de masa de alta resolución Bruker Daltonics BioTOF III. La cromatografía analítica en capa delgada (TLC) se realizó en placas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> de E. Merck (0.25 mm). Los compuestos se visualizaron mediante UV, o aspersion con anisaldehído o ninhidrina. La cromatografía en columna se llevó a cabo en columnas empaquetadas con gel de sílice de 70-230 mesh. La pureza de los compuestos analizados en A<sub>2A</sub>-R y ENT1 se evaluó para ser ≥95 % mediante HPLC (Agilent HP-1100) con detección a 280 nm de longitud de onda.

Construcción de modelos de farmacóforos. El módulo HypoGen de Catalyst<sup>®</sup> de Accelrys se usó para construir el modelo de farmacóforo de agonistas de A<sub>2A</sub>R humanos e inhibidores de ENT 1 humanos. Las estructuras químicas de los compuestos del conjunto de entrenamiento y sus afinidades de unión al A<sub>2A</sub>R humano (o ENT 1 humano) se recolectaron de la bibliografía (ver Información de Apoyo) .<sup>41-44</sup> Es importante asegurar que la actividad de los compuestos de entrenamiento cubra al menos cuatro órdenes de magnitud, con al menos tres compuestos en cada escala logarítmica.<sup>23,45</sup> Se recomienda, además, seleccionar compuestos con mayor diversidad química como el conjunto de entrenamiento.<sup>45</sup> Cada compuesto se esbozó con ChemDraw, y después se importó en Catalyst 4.11. La "Mejor" opción se usó para la generación de la conformación. En Catalyst<sup>®</sup>, se usó el algoritmo Poling para generar 250 conformaciones, cuyas energías son menores que 20.0 kcal/mol a partir de la energía más baja de todas las conformaciones. Se seleccionaron cinco características moleculares, a saber, hidrofobicidad (HPh), aceptor de s de hidrógeno (HBA), dador de enlaces de hidrógeno (HBD), átomo positivamente ionizable (PI), y átomo negativamente ionizable (NI). Todos estos compuestos se cargaron en la hoja de cálculo de Catalyst y se les asignaron la incertidumbre predeterminada de 3. Los otros parámetros se encuentran como predeterminados.

5  $N^6$ -(4-Hidroxibencil)adenosina (1).<sup>9</sup> Clorhidrato de hidroxilamina (1.29 g, 18.6 mmol) y acetato de sodio (1.67 g, 20.4 mmol) se añadieron a una solución de 4-hidroxibenzaldehído (1.25 g, 10.2 mmol) en etanol (20 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 6 h. El etanol se eliminó a presión reducida. Al residuo se le añadió agua, y después se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 ×). La capa orgánica combinada se lavó sobre MgSO<sub>4</sub>. Después los compuestos volátiles se eliminaron mediante evaporación rotativa a presión reducida, el residuo se recrystalizó a partir de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para dar la oxima de 4-hidroxibenzaldehído (1.3 g, 93 %). C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>; sólido amarillo claro, mp 92.0-93.6 °C.

10 Una solución de la oxima preparada anteriormente (342 mg, 2.5 mmol) y ácido clorhídrico concentrado (1 mL) en etanol (20 mL) se sometió a hidrogenación a presión atmosférica en presencia de Pd/C al 10 % (80 mg) por 4 h. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró para rendir la sal clorhídrica de 4-hidroxibencilamina como sólidos amarillos claros, que se usaron para la próxima etapa sin purificación adicional.

15 Una mezcla de 4-hidroxibencilamina (395 mg, como la sal clorhídrica), 6-cloropurina ribósido (143 mg, 0.5 mmol), y diisopropiletilamina (DIEA, 2 mL, 12 mmol) en 1-propanol (25 mL) se calentó a 70 °C por 6 h. La mezcla se concentró a presión reducida, y se trituró con agua para dar precipitados blancos, que se filtraron para rendir el compuesto del título 1 (151 mg, 81 %). La pureza del producto fue > 99 % como se muestra mediante HPLC en una columna ODS-3 de Inertsil (4.6 × 250 mm, 5 μm) con elución de TFA/MeOH (6:4) al 0.1 %. C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>; polvo blanco, mp 208.7-209.2 °C (lit.<sup>9</sup> mp 216-219 °C); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -64.5 (DMSO, c = 1) (lit.<sup>9</sup> [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> = -87 (MeOH, c = 0.1)); TLC (MeOH/EtOAc (1:9)) R<sub>f</sub> = 0.3; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 9.22 (1 H, s), 8.34 (1H, s), 8.30 (1 H, br s), 8.18 (1 H, s), 7.12 (2 H, d, J = 8.0 Hz), 6.65 (2 H, d, J = 8.0 Hz), 5.86 (1 H, d, J = 5.6 Hz), 5.41 (2 H, m), 5.18 (1 H, d, J = 5.6 Hz), 4.60 (2 H, m), 4.13 (1 H, q, J = 4.6, 7.4 Hz), 3.95 (1 H, q, J = 3.4, 6.2 Hz), 3.66 (1 H, m), 3.53 (1 H, m); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 155.3, 153.6, 151.6, 147.6, 139.1, 129.5, 127.9 (2 ×), 119.2, 114.4 (2 ×), 87.6, 85.6, 73.3, 70.5, 61.5, 42.4; calcd de ESI-HRMS para C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: 374.1459, encontrado: *m/z* 374.1412 [M + H]<sup>+</sup>.

25  $N^6$ -(4-Bromobencil)adenosina (2). Mediante un procedimiento similar a aquel para el compuesto 1, 6-cloropurina ribósido (98 mg, 0.34 mmol) se trató con clorhidrato de 4-bromobencilamina (5 equiv) y diisopropiletilamina (2 mL, 12 mmol) en 1-propanol (20 mL) a 70 °C por 7 h para dar el compuesto del título 2 (41 mg, 28 %) después de la recrystalización a partir de MeOH. La pureza del producto fue del 95 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent, 4.6 × 250 mm, 5 μm) con elución de gradientes de CH<sub>3</sub>CN acuoso al 30-60 % en 20 min. C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>4</sub>; polvo blanco; mp 179.2-179.4 °C; [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> = -50.1 (CH<sub>3</sub>OH, c = 1.0); TLC (MeOH/EtOAc (1:9)) R<sub>f</sub> = 0.69; IR *v*<sub>max</sub> (neta) 3333, 2925, 2865, 2358, 1621, 1486, 1408, 1336, 1298, 1224, 1121, 1081, 1011 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 8.47 (1 H, br s), 8.37 (1 H, s), 8.19 (1 H, s), 7.47 (2 H, d, J = 8.0 Hz), 7.28 (2 H, d, J = 8.0 Hz), 5.88 (1 H, d, J = 6.4 Hz), 5.43 (1 H, d, J = 6.0 Hz), 5.37 (1 H, dd, J = 2.4, 7.2 Hz), 5.18 (1 H, d, J = 4.8 Hz), 4.66 (2 H, br s), 4.61 (1 H, dd, J = 5.6, 6.0 Hz), 4.08-4.16 (2 H, m) 3.96 (1 H, d, J = 2.8 Hz), 3.64-3.69 (2 H, m), 3.57-3.52, (2 H, m); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) δ 154.2, 152.1, 148.3, 139.9, 139.3, 130.9 (2 ×), 130.6 (2 ×), 119.6, 87.9, 85.9, 73.5, 70.7, 61.7, 42.4; calcd de ESI-HRMS para C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: 436.0620, encontrado: *m/z* 436.0654 [M + H]<sup>+</sup>.

40  $N^6$ -(4-Metoxibencil)adenosina (3). Mediante un procedimiento similar a aquel para 1, 6-cloropurina ribósido (100 mg, 0.35 mmol) se trató con 4-metoxibencilamina (243 mg, 1.77 mmol) y diisopropiletilamina (2 mL, 12 mmol) en 1-propanol (20 mL) a 70 °C por 7 h para dar el compuesto del título 3 (95 mg, 76 %) después de la recrystalización a partir de MeOH. La pureza del producto fue > 99 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent, 4.6 × 250 mm, 5 μm) con elución de gradientes de CH<sub>3</sub>CN acuoso al 30-60 % en 20 min. C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>; polvo blanco; mp 147.6-148.2 °C; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -55.3 (DMSO, c = 1.0) (lit.<sup>21</sup> [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -66.15 (MeOH, c = 0.12)); TLC (MeOH/EtOAc (1:9)) R<sub>f</sub> = 0.60; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 8.38 (2 H, m), 8.19 (1 H, br s), 8.30 (1 H, br s), 7.25 (2 H, d, J = 8.4 Hz), 6.83 (2 H, d, J = 8.4 Hz), 5.87 (1 H, d, J = 6.0 Hz), 5.45-5.38 (2 H, m), 5.19 (1 H, d, J = 3.2 Hz), 4.61 (2 H, s), 4.14 (1 H, s), 3.95 (1 H, dd, J = 3.2, 6.8 Hz), 3.70-3.64 (4 H, m), 3.57-3.52 (1 H, m); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 157.8, 154.2, 152.1, 148.2, 139.7, 131.7, 128.3 (2 ×), 119.6, 113.4 (2 ×), 87.8, 85.8, 73.4, 70.6, 61.6, 55.0; ESI-MS calcd para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: 388.1615, encontrado: *m/z* 388.1620 [M+H]<sup>+</sup>.

50  $N^6$ -(3-Hidroxibencil)adenosina (4). Mediante un procedimiento similar a aquel para 1, 6-cloropurina ribósido (143 mg, 0.5 mmol) se trató con sal clorhídrica de 3-hidroxibencilamina (395 mg, 2.46 mmol) y diisopropiletilamina (2 mL, 12 mmol) en 1-propanol (25 mL) a 70 °C por 6 h. La mezcla se concentró a presión reducida, y se trituró con agua para dar precipitados blancos, que se filtraron para rendir el compuesto del título 4 (151 mg, 81 %). La pureza del producto fue >99 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent, 4.6 × 250 mm, 5 μm) con elución de gradientes de CH<sub>3</sub>CN acuoso al 30-60 % en 20 min. C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>; polvo blanco, mp 195.6-196.5 °C; TLC (MeOH/EtOAc (1:9)) R<sub>f</sub> = 0.3; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -46.5 (DMSO, c = 1.0); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 9.22 (1 H, s), 8.34 (1H, s), 8.30 (1 H, br s), 8.18 (1 H, s), 7.12 (2 H, d, J = 8.0 Hz), 6.65 (2 H, d, J = 8.0 Hz), 5.86 (1 H, d, J = 5.6 Hz), 5.41 (2 H, m), 5.18 (1 H, d, J = 5.6 Hz), 4.60 (2 H, m), 4.13 (1 H, q, J = 4.6, 7.4 Hz), 3.95 (1 H, q, J = 3.4, 6.2 Hz), 3.66 (1 H, m), 3.53 (1 H, m); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 155.3, 153.6, 151.6, 147.6, 139.1, 129.5, 127.9 (2 ×), 119.2, 114.4 (2 ×), 87.6, 85.6, 73.3, 70.5, 61.5, 42.4; calcd de ESI-HRMS para C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: 374.1459, encontrado: *m/z* 374.1412 [M+H]<sup>+</sup>.

65  $N^6$ -(4-Nitrobencil)adenosina (5). Mediante un procedimiento similar a aquel para 1, 6-cloropurina ribósido (102 mg, 0.36 mmol) se trató con clorhidrato de 4-nitrobencilamina (336 mg, 1.78 mmol) y diisopropiletilamina (2 mL, 12 mmol) en 1-propanol (20 mL) a 70 °C por 7 h para dar el compuesto del título 5 (55.6 mg, 38 %) después de la recrystalización a partir de MeOH. La pureza del producto fue > 99 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent, 4.6 × 250 mm, 5 μm) con elución de gradientes de CH<sub>3</sub>CN acuoso al 30-60 % en 20 min. C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>; cristales blancos

de MeOH; mp 167.8-168.6 °C (lit.<sup>4</sup> mp 174-176 °C);  $[\alpha]_D^{20} = -50.7$  (DMSO,  $c = 0.5$ ); TLC (MeOH/EtOAc (1:9))  $R_f = 0.45$ ;  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  8.62 (1 H, br s), 8.40 (1 H, s), 8.18-8.14 (3 H, m), 7.56 (2 H, d,  $J = 8.4$  Hz), 5.88 (1 H, d,  $J = 6.0$  Hz), 5.44 (1 H, d,  $J = 5.6$  Hz), 5.34 (1 H, t,  $J = 5.6$  Hz) 7.12 (2 H, d,  $J = 8.0$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  152.1, 147.9, 146.1, 140.0, 127.8 (2  $\times$ ), 123.3 (2  $\times$ ), 87.8, 85.8, 73.4, 70.6, 61.6, 42.7; calcd de ESI-HRMS para  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_6$ : 403.1361, encontrado:  $m/z$  403.1372  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$\text{N}^6$ -(3-Indoliletíl) adenosina (6). En un frasco de fondo redondo (10 mL) se colocó una solución de 6-cloropurina ribonucleósido (71 mg, 0.25 mmol), tripamina (101 mg, 0.63 mmol) y diisopropiletamina (0.24 mL, 2.88 mmol) en EtOH (3 mL). El frasco se colocó en la cavidad de un reactor de microondas monomodo enfocado, y se irradió a 150 W por 10 min en etanol en reflujo. La mezcla se concentró mediante evaporación rotativa, y el residuo se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice; MeOH/EtOAc (1:9)) para dar el compuesto del título 6 (85 mg, 83 %). La pureza del producto fue > 99 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent,  $4.6 \times 250$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ) con elución de gradientes de  $\text{CH}_3\text{CN}$  acuoso al 30-60 %.  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_4$ ; polvo blanco; mp 187.0-187.2 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -55.7$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $c = 1.0$ ); TLC (MeOH/EtOAc (1:9))  $R_f = 0.41$ ;  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  10.78 (1 H, s), 8.33 (1 H, s), 8.25 (1 H, s), 7.96 (1 H, br s), 7.61 (1 H, d,  $J = 7.2$  Hz), 7.32 (1 H, d,  $J = 9.2$  Hz), 7.18 (1 H, s), 7.05 (1 H, t,  $J = 8.0$  Hz), 5.80 (1 H, d,  $J = 6.0$  Hz), 5.47-5.44 (2 H, m), 5.20 (1 H, d,  $J = 4.4$  Hz), 4.61 (1 H, d,  $J = 5.6$  Hz), 4.14 (1 H, d,  $J = 2.8$  Hz), 3.96 (1 H, d,  $J = 3.2$  Hz), 3.77 (1 H, br s), 3.69-3.52 (2 H, m), 3.01 (2 H, t,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  154.3, 152.2, 148.0, 139.5, 136.0, 127.1, 122.4, 120.8, 119.6, 118.3, 118.1, 111.7, 111.2, 87.9, 85.8, 73.4, 70.6, 61.6, 40.5, 25.1; calcd de ESI-HRMS para  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_4$ : 411.1775, encontrado:  $m/z$  411.1750  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

5'-Cloro-5'-desoxi- $\text{N}^6$ -(4-metoxibencil)adenosina (7). La reacción de 3-acetónido (2.96 g, 6.9 mmol) con cloruro de *p*-toluenosulfonilo (6.3 g, 34.6 mmol) en piridina (6.0 mL) dio una mezcla de derivados de sulfonato y de cloro (5:1) como se muestra mediante el espectro de NMR de  $^1\text{H}$ . La mezcla se preparó mediante cromatografía rápida (gel de sílice;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (100:1)). El compuesto sulfonato mostró NMR de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.25 (1 H, s), 7.66 (1 H, s), 7.60 (2 H, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.29 (2 H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.14 (2 H, d,  $J = 8.0$  Hz), 6.86 (2 H, d,  $J = 8.4$  Hz), 6.00 (1 H, s), 5.31 (1 H, d,  $J = 6.0$  Hz), 5.04 (1 H, dd,  $J = 3.2, 6.0$  Hz), 4.78 (br, s), 4.43-4.47 (1 H, m), 4.20-4.30 (2 H, m), 3.78 (3 H, s), 2.36 (3 H, s), 1.58 (3 H, s), 1.36 (3 H, s). El compuesto sulfonato era inestable, y no se persiguió la conversión adicional.

El compuesto de cloro (7-acetónido) mostró NMR de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.3 (1 H, s), 7.74 (1 H, s), 7.29 (2 H, d,  $J = 8.4$  Hz), 6.86 (2 H, d,  $J = 8.4$  Hz), 6.07 (1 H, s), 5.45 (1 H, d,  $J = 6.4$  Hz), 5.16 (1 H, s), 4.78 (br, s), 4.50 (1 H, d,  $J = 6.0$  Hz), 3.83-3.77 (4 H, m), 3.63-3.59 (1 H, m), 1.62 (3 H, s), 1.40 (3 H, s). El compuesto 7-acetónido (8.5 mg, 0.019 mmol) se disolvió en 3 M HCl/THF (1:1, 130  $\mu\text{L}$ ). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 14 horas; y se neutralizó con una disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . La mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró, y se concentró para dar el compuesto del título 7 (5.9 mg, 70 %). La pureza del producto fue > 99 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C 18 (Agilent,  $4.6 \times 250$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ) con elución de gradientes de  $\text{CH}_3\text{CN}$  acuoso al 30-60 %.  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClN}_5\text{O}_4$ ; sólido blanco; mp 182.0-182.6 °C; TLC (EtOAc)  $R_f = 0.4$ ;  $[\alpha]_D^{21} = -45.4$  (THF,  $c = 0.68$ );  $\text{IR}_{\text{vmáx}}$  (neta) 3329, 3127, 1630, 1586, 1515, 1487, 1421, 1379, 1354, 1297, 1253, 1174, 1111, 1063, 1031  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  8.26 (1 H, s), 8.23 (1H, s), 7.30 (2 H, d,  $J = 8.8$  Hz), 6.86 (2 H, d,  $J = 8.8$  Hz), 6.03 (1 H, d,  $J = 4.8$  Hz), 4.77 (1 H, t,  $J = 5.2$  Hz), 4.72 (2 H, br s), 4.38 (1 H, t,  $J = 5.2$  Hz), 4.27 (1 H, t,  $J = 4.8$  Hz), 3.94 (1 H, dd,  $J = 6.8, 4.8$  Hz), 3.83 (1 H, dd,  $J = 6.8, 4.8$  Hz), 3.76 (1H, s);  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  157.9, 154.2, 152.5, 148.6, 139.6, 131.8, 128.4 (2  $\times$ ), 119.4, 113.5 (2  $\times$ ), 87.5, 83.7, 72.7, 71.3, 55.1, 44.9, 42.4; calcd de ESI-HRMS para  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClN}_5\text{O}_4$ : 406.1282, encontrado:  $m/z$  406.1279  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

5'-Azido-5'-desoxi- $\text{N}^6$ -(4-metoxibencil)adenosina (8). El compuesto azida 8-acetónido (41.5 mg, 0.092 mmol) se agitó en HCl/THF (1:1, 0.26 mL) 3 M a temperatura ambiente por 14 h, y después se neutralizó con solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . La mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró, y se concentró para dar un rendimiento cuantitativo del compuesto del título 8. La pureza del producto fue 98 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent,  $4.6 \times 250$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ) con elución de gradientes de  $\text{CH}_3\text{CN}$  acuoso al 30-60 %.  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_4$ ; sólido blanco; mp 190.6-191.1 °C; TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (9:1))  $R_f = 0.5$ ;  $[\alpha]_D^{24} = -13.9$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 1.0$ );  $\text{IR}_{\text{vmáx}}$ (neta) 3333, 2925, 2853, 2102, 1620, 1465, 1465, 1337, 1295, 1246, 1176, 1110, 1069, 1034  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  8.27 (1 H, br s), 8.24 (1 H, br s), 7.30 (2 H, d,  $J = 8.4$  Hz), 6.86 (2 H, d,  $J = 8.4$  Hz), 6.02 (1 H, d,  $J = 4.8$  Hz), 4.77 (1 H, t,  $J = 5.2$  Hz), 4.73 (2 H, br s), 4.36 (1 H, t,  $J = 5.2$  Hz), 4.18 (1 H, q,  $J = 4.0$  Hz), 3.65 (2 H, t,  $J = 3.6$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 100MHz) 157.9, 154.2, 152.4, 148.7, 139.7, 131.8, 128.4 (2  $\times$ ), 119.5, 113.5 (2  $\times$ ), 87.8, 72.8, 70.9, 55.1, 51.8, 42.4 ; calcd de ESI-HRMS para  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_4$ : 413.1686, encontrado:  $m/z$  413.1686  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

5'-Azido-5'-desoxi-2',3'-O-isopropilideno- $\text{N}^6$ -(4-metoxibencil)adenosina (8-actónido). Para el acetónido de  $\text{N}^6$ -(4-metoxibencil)adenosina (3-acetónido, 2.96 g, 6.9 mmol) en piridina anhidra (36 mL) se añadió a una solución de cloruro de *p*-toluenosulfonilo (6.3 g, 34.6 mmol) en piridina anhidra (6.0 mL) gota a gota mediante una jeringa a una solución de . La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 6 h. La piridina se eliminó a presión reducida, y el residuo se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró, y se concentró para dar una mezcla de derivados de sulfonato y de cloro (5:1) como se muestra mediante el espectro de NMR de  $^1\text{H}$ .

La mezcla preparada anteriormente se disolvió en DMF anhidro (70 mL), y se añadió azida sódica (1.34 g, 20.6 mmol). La mezcla se agitó a 80 °C por 6 h, y después se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró, y se concentró para dar un aceite amarillo pálido, que se purificó

- mediante cromatografía rápida (gel de sílice; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (100:1)) para dar 8-acetónido (653 mg, 21 % de rendimiento general). C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>; aceite incoloro; TLC (EtOAc/Hexano (6:4)) R<sub>f</sub> = 0.39; [α]<sup>23</sup><sub>D</sub> = +5.0 (EtOAc, c = 1.0); IR ν<sub>máx</sub> (neta) 3280, 2987, 2931, 2101, 1618, 1512, 1478, 1375, 1330, 1296, 1248, 1211, 1154, 1091 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.38 (1 H, br s), 7.72 (1H, br s), 7.26 (2 H, d, J = 8.8 Hz), 6.84 (2 H, d, J = 8.8 Hz), 6.37 (1H, br s), 6.06 δ (1 H, d, J = 2.0 Hz), 5.46 -5.44 (1 H, m), 5.07 -5.05 (1 H, m), 4.77 (2 H, br s), 4.38 -4.35 (1 H, m), 3.77 (3 H, s), 3.51-3.62 (2 H, m), 1.61 (3 H, s), 1.39 (3 H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 158.7, 154.5, 153.1, 147.9, 139.0, 130.2, 128.8 (2 ×), 120.1, 114.4, 113.8 (2 ×), 90.4, 85.6, 83.9, 82.0, 55.2, 52.2, 43.7, 29.7, 27.1, 25.3; calcd de ESI-HRMS para C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: 453.1999, encontrado: m/z 453.1999 [M + H]<sup>+</sup>.
- 5' -Acetamido-5'-desoxi-N<sup>6</sup>-(4-metoxibencil)adenosina (9). El compuesto azida 8-acetónido (95 mg, 0.21 mmol) se agitó con trifenilfosfina (66 mg, 0.24 mmol) en THF/H<sub>2</sub>O (10:1, 2 mL) a temperatura ambiente por 4.5 h. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se tomó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, y se acidificó con solución de HCl (1 M) hasta pH = 2. La fase acuosa se separó, se neutralizó con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>, y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El extracto orgánico se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró, y se concentró para rendir un producto de amina cruda.
- La amina cruda se trató con anhídrido acético (98.6 μL, 1.05 mmol) en piridina anhidra (0.2 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 1.5 h, y se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró, se concentró, y se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2)) para rendir el acetónido del compuesto 9 (56 mg, 57 % de rendimiento para las 2 etapas). La pureza del producto fue > 99 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent, 4.6 × 250 mm, 5 μm) con elución de gradientes de CH<sub>3</sub>CN acuoso al 30-60 %. C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>; aceite incoloro; TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2)) R<sub>f</sub> = 0.2; [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> = -146.6 (CHCl<sub>3</sub>, c = 1.0); IR ν<sub>máx</sub> (neta) 3280, 3062, 2989, 2930, 2835, 2358, 1667, 1620, 1513, 1376, 1336, 1296, 1246, 1215, 1096, 1034 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.36-8.38 (2 H, m), 7.73 (1 H, s), 7.28 (2 H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2 H, d, J = 8.8 Hz), 6.15 (1 H, br s), 5.77 (1 H, d, J = 4.8 Hz), 5.26 (1 H, t, J = 4.8 Hz), 4.81 (1 H, dd, J = 4.0, 2.4 Hz), 4.76 (2 H, br s), 4.47-4.48 (1 H, m), 4.11-4.17 (1 H, m), 3.79 (3 H, s), 3.24 (1 H, d, J = 14.4 Hz), 2.15 (3H, s), 1.61 (3 H, s), 1.34 (3 H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 170.5, 158.8, 154.8, 152.7, 147.7, 139.7, 130.0, 128.9 (2 ×), 121.1, 114.6, 113.9 (2 ×), 92.5, 83.3, 82.2, 81.3, 55.3, 43.9, 41.1, 27.6, 25.4, 23.2; calcd de ESI-HRMS para C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 469.2190, encontrado m/z 469.2193 [M + H]<sup>+</sup>.
- El acetónido de 9 (17.2 mg, 0.037 mmol) se agitó en HCl/THF (1:1, 0.1 mL) 3 M a temperatura ambiente por 14 h, y después se neutralizó con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró, y se concentró para dar el compuesto del título 9 (11 mg, 70 %). La pureza del producto 9 fue 99 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent, 4.6 × 250 mm, 5 μm) con elución de gradientes de CH<sub>3</sub>CN acuoso al 30-60 % en 20 min. C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>; polvo blanco; mp 121.1-121.6 °C; TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1)) R<sub>f</sub> = 0.5; [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> = -108.7 (THF, c = 0.89); IR ν<sub>máx</sub> (neta) 3275, 3071, 2923, 2852, 2360, 1621, 1512, 1375, 1339, 7.297, 1245, 1175, 1126, 1076 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.76 (1 H, s), 8.27 (1H, s), 7.24 (2 H, d, J = 8.4 Hz), 6.81 (2 H, d, J = 8.4 Hz), 6.54 (1 H, s), 5.70 (1 H, d, J = 5.6 Hz), 4.72 (3 H, d, J = 5.6 Hz), 4.23 (1 H, s), 4.18 (1 H, s), 3.98-4.03 (1 H, m), 3.75 (3 H, s), 3.13 (1 H, d, J = 14.0 Hz), 2.02 (3 H, s); <sup>13</sup>C NMR (DMSO, 1.00 MHz) δ 169.4, 157.9, 154.3, 152.3, 148.3, 140.2, 131.8, 128.4 (2 ×), 119.8, 113.5 (2 ×), 87.9, 83.6, 72.6, 71.3, 55.1, 42.4, 41.1, 22.7; calcd de ESI-HRMS para C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 427.1730, encontrado: m/z 427.1727 [M + H]<sup>+</sup>.
- 5'-(*p*-Tolilsulfonamido)-5'-desoxi-N<sup>6</sup>-(4-metoxibencil)adenosina (10). El compuesto de amina cruda (~72.4 mg), preparado mediante la reducción de Staudinger de 8-acetónido, se disolvió en piridina anhidra (1.1 mL), y se añadió una solución de cloruro de *p*-toluenosulfonilo (159.4 mg, 0.87 mmol) en piridina anhidra (1.12 mL) gota a gota mediante una jeringa. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 4.5 h. La piridina se eliminó a presión reducida, y el residuo se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró, y se concentró para dar un aceite incoloro, que se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (120:1 a 100:1)) para dar el acetónido del compuesto 10 (40.4 mg, 41 % de rendimiento). C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S; TLC (EtOAc/Hexano (10:1)) R<sub>f</sub> = 0.25; [α]<sup>27</sup><sub>D</sub> = +2.7 (CHCl<sub>3</sub>, c = 1.0); IR ν<sub>máx</sub> (neta) 2925, 2862, 2360, 1621, 1513, 1480, 1383, 1329, 1301, 1247, 1215, 1158, 1087, 1034 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 9.29 (1 H, d, J = 10.0 Hz), 8.60 (1 H, s), 7.71 (2 H, d, J = 8.0 Hz), 7.63 (1 H, s), 7.28 (2 H, d, J = 8.4 Hz), 7.24 (2 H, d, J = 8.0 Hz), 6.85 (2 H, d, J = 8.4 Hz), 6.35 (1 H, br s), 5.70 (1 H, d, J = 4.8 Hz), 5.24 (1 H, t, J = 5.6 Hz), 4.93 (1 H, d, J = 6.0 Hz), 4.78 (2 H, br s), 4.49 (1 H, d, J = 1.2 Hz), 3.79 (3 H, s), 3.43-3.47 (1 H, m), 3.13 (1 H, dd, J = 2.4, 10.8 Hz), 2.37 (3 H, s), 1.59 (3 H, s), 1.31 (3 H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 158.9, 154.8, 153.1, 142.8, 139.2, 137.2, 130.0, 129.6 (2 ×), 129.0 (2 ×), 126.7 (2 ×), 114.5, 114.0 (2 ×), 93.4, 82.8, 82.3, 82.6, 55.3, 45.3, 44.1, 27.6, 25.2, 21.5; calcd de ESI-HRMS para C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S: 581.2182, encontrado: m/z 581.2198 [M + H]<sup>+</sup>.
- El acetónido de 10 (41.7 mg, 0.072 mmol) se agitó en HCl/THF (1:1, 0.2 mL) 3 M a temperatura ambiente por 14 h, y después se neutralizó con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró, y se concentró para dar el producto crudo, que se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 25:1) para rendir el compuesto del título 10 (68 %). La pureza del producto fue > 99 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C 18 (Agilent, 4.6 × 250 mm, 5 μm) con elución de gradientes de CH<sub>3</sub>CN acuoso al 30-60 %. C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S; TLC (EtOAc/Hexano (10:1)) R<sub>f</sub> = 0.25; [α]<sup>26</sup><sub>D</sub> = +25.9 (THF, c = 0.8); IR ν<sub>máx</sub> (neta) 3356, 2926, 2860, 2362, 1620, 1513, 1461, 1330, 1301, 1247, 1159, 1069, 1038 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ 7.91 (1 H, s), 7.66 (1H, s), 7.27 (2 H, d, J = 8.0 Hz), 6.84-6.87 (4 H, m), 6.41 (2 H, d, J = 8.4 Hz), 5.40 (1 H, d, J = 6.4 Hz), 4.28 (3 H, br s), 3.77-3.82 (3 H, m), 2.88-2.89

(1 H, m), 2.85 (1 H, d,  $J = 2.8$  Hz), 2.71 (1 H, d,  $J = 2.8$  Hz), 2.68 (1 H, d,  $J = 3.2$  Hz), 1.92 (3 H, s);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)  $\delta$  160.6, 156.3, 153.9, 149.3, 144.9, 142.0, 138.7, 132.2, 130.9 (2  $\times$ ), 130.1 (2  $\times$ ), 128.0 (2  $\times$ ), 121.7, 115.1 (2  $\times$ ), 91.6, 85.9, 74.4, 73.1, 55.9, 46.2, 44.8, 21.6; calcd de ESI-HRMS para  $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$ : 541.1869, encontrado:  $m/z$  541.1877  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

5

5'-Desoxi-5'-(4-metil-1,2,3-triazol-1-il)- $N^6$ -(4-metoxibencil)adenosina (11). Una mezcla de compuesto azida 8-acetonido (313 mg, 0.69 mmol),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (24.9 mg), ascorbato sódico (61.4 mg) y alcohol propargílico en  $\text{H}_2\text{O}/t\text{-BuOH}$  (1:1, 7 mL) se agitó a temperatura ambiente por 12 h, y después se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró, y se concentró para rendir un acetónido de triazol (~220 mg) como aceite incoloro. TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (9:1))  $R_f = 0.5$ ; calcd de ESI-HRMS para  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{O}_5$ : 509.2261, encontrado:  $m/z$  509.2267  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

10

El compuesto de triazol preparado anteriormente se agitó con trietilamina (0.15 mL, 1.08 mmol) y cloruro de metilsulfonilo (0.08 mL, 1.08 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (4.3 mL) a temperatura ambiente por 2 h. La mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró, y se concentró para rendir un compuesto mesilato como aceite incoloro. TLC ( $\text{EtOAc}/\text{Hex}$  (4:1))  $R_f = 0.45$ ; calcd de ESI-HRMS para  $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_7\text{SNa}$ : 609.1856, encontrado:  $m/z$  609.1876  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

15

El mesilato se trató con  $\text{NaBH}_4$  (24.5 mg, 0.65 mmol) a 0 °C en DMF, y después se calentó a 60 °C por 6 h. La mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró, y se concentró para dar 11-acetonido como aceite incoloro. TLC ( $\text{EtOAc}/\text{Hex}$  (4:1))  $R_f = 0.25$ ; calcd de ESI-HRMS para  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{O}_4$ : 493.2312, encontrado:  $m/z$  493.2312  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . El acetónido de 11 se agitó en  $\text{HCl}/\text{THF}$  (1:1, 0.33 mL) 3 M a temperatura ambiente por 14 h, y después se neutralizó con solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . La mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo se disolvió en THF, se filtró, y se concentró para dar el compuesto del título 11 (48.1 mg, 25 % de rendimiento general). La pureza del producto fue 98 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent, 4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) con elución de gradientes de  $\text{CH}_3\text{CN}$  acuoso al 30-60 %.  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_8\text{O}_4$ ; polvo blanco; mp 183.0-183.2 °C; TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (9:1))  $R_f = 0.12$ ;  $[\alpha]_D^{27} = +20.3$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $c = 0.45$ ); IR  $\nu_{\text{máx}}$  (neta) 3217, 2921, 2850, 2685, 1620, 1513, 1470, 1337, 1297, 1244, 1176, 1111, 1058  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  8.22 (1 H, s), 7.99 (1H, s), 7.45 (1 H, s), 7.31 (2 H, d,  $J = 8.8$  Hz), 6.87 (2 H, d,  $J = 8.8$  Hz), 5.96 (1 H, d,  $J = 4.0$  Hz), 4.82-4.68 (5 H, m), 4.46 (1 H, t,  $J = 4.0$  Hz), 4.34 (1 H, q,  $J = 4.0$  Hz), 3.77 (3 H, s), 2.15 (3 H, s);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  158.7, 154.2, 152.9, 148.0, 142.8, 138.8, 130.1, 128.8 (2  $\times$ ), 123.1, 119.6, 113.8 (2  $\times$ ), 89.3, 82.2, 73.4, 70.8, 55.2, 50.9, 43.9, 10.5; ESI-HRMS (modo negativo) calcd para  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_8\text{O}_4$ : 451.1842, encontrado:  $m/z$  451.1843  $[\text{M} - \text{H}]^-$ .

20

25

30

35

5'-(4-Butil-1,2,3-triazol-1-il)-5'-desoxi- $N^6$ -(4-metoxibencil)adenosina (12). Un compuesto de azida 8 (13.31 mg, 0.032 mmol),  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{SH}_2\text{O}$  (0.40 mg), ascorbato sódico (0.95 mg) y 1-hexino en  $\text{H}_2\text{O}/t\text{-BuOH}$  (1:1, 430  $\mu\text{L}$ ) se agitó a temperatura ambiente por 30 h, y después se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La capa orgánica se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se concentró para dar el compuesto del título 12 (12.82 mg, 81 %). La pureza del producto fue > 95 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent, 4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) con elución de gradientes de  $\text{CH}_3\text{CN}$  acuoso al 30-60 %.  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_4$ ; polvo blanco; mp 105.0-105.4 °C; TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (9:1))  $R_f = 0.38$ ;  $[\alpha]_D^{23} = -12.2$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 1.0$ ); IR  $\nu_{\text{máx}}$  (neta) 3333, 3140, 2929, 2858, 2360, 1619, 1512, 1464, 1333, 1297, 1245, 1176, 1094, 1037  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.28 (1 H, s), 7.73 (1H, s), 7.27 (2 H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.15 (1 H, s), 6.84 (2 H, d,  $J = 8.4$  Hz), 6.13 (1 H, br s), 5.89 (1 H, d,  $J = 5.2$  Hz), 4.73 (3 H, dd,  $J = 9.6, 4.8$  Hz), 4.61-4.67 (2 H, m), 4.51 (1 H, d,  $J = 4.4$  Hz), 4.34 (1 H, br s), 3.78 (3 H, s), 2.45-2.57 (2 H, m), 1.39-1.46 (2 H, m), 1.19-1.28 (2 H, m), 0.84 (3 H, t,  $J = 7.6$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  158.8, 154.3, 152.9, 148.5, 148.0, 138.8, 130.1, 128.9 (2  $\times$ ), 122.5, 119.7, 113.9 (2  $\times$ ), 89.5, 82.5, 73.5, 70.9, 55.3, 51.1, 44.0, 31.2, 25.0, 22.3, 13.8; calcd de ESI-HRMS para  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_4$ : 493.2312, encontrado:  $m/z$  493.2316  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

40

45

50

5'-Desoxi-5'-(4-hexil-1,2,3-triazol-1-il)- $N^6$ -(4-meoxibencil)adenosina (13). Una mezcla de compuesto azida 8 (10.30 mg, 0.025 mmol),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.31 mg), ascorbato sódico (0.73 mg) y 1-octino (4.46  $\mu\text{L}$ , 0.03 mmol) en  $\text{H}_2\text{O}/t\text{-BuOH}$  (1:1, 333  $\mu\text{L}$ ) se agitó a temperatura ambiente por 37 h, y después se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró, y se concentró para dar el compuesto del título 13 (12.36 mg, 94.6 %). La pureza del producto fue > 98 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent, 4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) con elución de gradientes de  $\text{CH}_3\text{CN}$  acuoso al 30-60 %.  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{O}_4$ ; polvo blanco; mp 101.4-102.1 °C; TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (9:1))  $R_f = 0.33$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -9.7$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 1.0$ ); IR  $\nu_{\text{máx}}$  (neta) 3332, 3148, 2926, 2855, 2359, 1620, 1513, 1463, 1336, 1297, 1246, 1175, 1109, 1037  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.26 (1 H, s), 7.67 (1H, s), 7.26 (2 H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.16 (1 H, s), 6.82 (2 H, d,  $J = 8.4$  Hz), 6.31 (1 H, br s), 5.91 (1 H, d,  $J = 4.4$  Hz), 4.63-4.75 (4 H, m), 4.58 (1 H, t,  $J = 4.8$  Hz), 4.44-4.51 (2 H, m), 3.76 (3 H, s), 2.42-2.56 (2 H, m), 1.20-1.24 (8 H, m), 0.82 (3 H, t,  $J = 6.8$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  157.9, 154.2, 152.5, 148.4, 146.7, 139.7, 131.8, 128.4 (2  $\times$ ), 122.5, 119.5, 113.6 (2  $\times$ ), 93.9, 87.9, 82.4, 72.7, 70.9, 55.1, 51.2, 42.4, 31.1, 28.9, 28.3, 25.0, 22.2, 14.1; calcd de ESI-HRMS para  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{O}_4$ : 521.2625, encontrado:  $m/z$  521.2628  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

55

60

65

5'-(4-Bencil-1,2,3-triazol-1-il)-5'-desoxi- $N^6$ -(4-metoxibencil)adenosina (14). Una mezcla de compuesto azida 8 (11.97 mg, 0.029 mmol),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.36 mg), ascorbato sódico (0.85 mg) y 3-fenil-1-propino en  $\text{H}_2\text{O}/t\text{-BuOH}$  (1:1, 386  $\mu\text{L}$ ) se ajustó a temperatura ambiente por 30 h, y después se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró, y se concentró para dar el compuesto del título 14 (12.57 mg, 82

5  
10  
15  
20

%). La pureza del producto fue 99 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent, 4.6 × 250 mm, 5 µm) con elución de gradientes de CH<sub>3</sub>CN acuoso al 30-60 %. C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub>; polvo blanco, mp 123.3-123.9 °C; TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1)) R<sub>f</sub> = 0.38; [α]<sup>26</sup><sub>D</sub> = +9.3 (CHCl<sub>3</sub>, c = 1.0); IR ν<sub>máx</sub> (neta) 3329, 3143, 3029, 2925, 2835, 2359, 1620, 1479, 1434, 1333, 1296, 1245, 1176, 1109, 1034 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.27 (1 H, s), 7.66 (1H, s), 7.27 (2 H, d, J = 8.8 Hz), 7.10-7.19 (3 H, m), 7.03-7.06 (3 H, m), 6.81 (2 H, d, J = 8.8 Hz), 6.20 (1 H, br s), 5.86 (1 H, d, J = 4.8 Hz), 4.75 (2 H, br s), 4.67 (1 H, dd, J = 10.0, 4.8 Hz), 4.56-4.60 (2 H, m), 4.36 (1 H, t, J = 4.4 Hz), 3.86 (2 H, dd, J = 18.4, 16.0 Hz), 3.75 (3 H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) 158.8, 154.2, 152.9, 147.1, 138.8, 138.2, 130.1, 128.9 (2 ×), 128.3 (2 ×), 126.4, 123.3, 119.7, 113.9 (2 ×), 89.4, 82.3, 73.6, 70.9, 55.3, 51.1, 44.0, 31.8; calcd de ESI-HRMS para C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub>: 527.2155, encontrado: m/z 527.2140 [M + H]<sup>+</sup>.

15  
20

Etilamida de ácido 3,4-dihidroxi-5-[6-(4-hidroxibencilamino)-purin-9-il]-to trahidrofuran-2-carboxílico (15). El acetónido derivado de 6-cloropurina ribofuranósido (17-acetónido, 158 mg, 0.48 mmol) se agitó con PhI(OAc)<sub>2</sub> (509 mg, 1.56 mmol) y 2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oxi (TEMPO, 15.4 mg, 0.1 mmol) en una solución desgasificada de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1, 2.6 mL) a 40 °C por 4 h. La mezcla se concentró a presión reducida para rendir un producto de ácido crudo 18.

15  
20

El ácido crudo se trató con etilamina (117 mg, como la sal clorhídrica), O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU, 375 mg, 0.72 mmol) y diisopropiletilamina (0.5 ml, 2.89 mmol) en DMF anhidro (11.6 mL) a temperatura ambiente por 14 h. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró, se concentró, y se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice; EtOAc/hexano (1:1)) para rendir un producto amida 19 como aceite incoloro.

25  
30

El producto amida se trató con 4-hidroxibencilamina (385 mg, 2.4 mmol como la sal clorhídrica) y diisopropiletilamina (2.8 mL, 16.9 mmol) en 1-propanol (28 mL) a 70 °C por 2 h. La mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró, se concentró, y se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (97:3)) para dar 15-acetónido (179 mg, 82 %). C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>; aceite incoloro; TLC (EtOAc/hexano (4:1)) R<sub>f</sub> = 0.13; [α]<sup>22</sup><sub>D</sub> = -32.0 (EtOAc, c = 1.0); IR ν<sub>máx</sub> (neta) 3347, 3103, 2982, 2933, 1732, 1667, 1615, 1516, 1479, 1461, 1376, 1332, 1295, 1245, 1212, 1154, 1088 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 9.01 (1 H, br s), 8.35 (1H, br s), 7.81 (1H, s), 7.14 (1H, br s), 7.04 (2 H, d, J = 8.0 Hz), 6.68 (2 H, d, J = 8.0 Hz), 6.49 (1 H, t, 4.8 Hz), 6.03 (1 H, d, J = 2.4 Hz), 5.33-5.38 (2 H, m), 4.70 (3 H, s), 3.09-3.16 (2 H, m), 1.62 (3 H, s), 1.37 (3 H, s), 0.90 (3 H, t, J = 7.2 Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 168.7, 155.8, 154.2, 153.1, 147.7, 139.1, 128.8 (3 ×), 119.6, 115.4 (2 ×), 114.3, 91.6, 85.6, 83.3, 82.4, 43.9, 34.0, 27.0, 25.1, 14.2; calcd de ESI-HRMS para C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 455.2043, encontrado: m/z 455.2037 [M + H]<sup>+</sup>.

35  
40

El acetónido de 15 (26 mg, 0.057 mmol) se agitó en HCl/THF (1:1, 0.3 mL) 1 M a temperatura ambiente por 16 h, y después se neutralizó con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Después de la concentración, el residuo se trituró con H<sub>2</sub>O para dar el compuesto del título 15, que se recristalizó a partir de MeOH (14.65 mg, 62 %). C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>; polvo blanco, mp 179.7-180.5 °C; TLC (EtOAc) R<sub>f</sub> = 0.04; [α]<sup>23</sup><sub>D</sub> = -27.7 (MeOH, c = 1.0); IR ν<sub>máx</sub> (neta) 3256, 2688, 2360, 1618, 1515, 1335, 1294, 1232, 1128, 1052 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ 8.29 (1 H, s), 8.22 (1H, s), 7.20 (2 H, d, J = 8.4 Hz), 6.73 (2 H, d, J = 8.4 Hz), 6.00 (1 H, d, J = 7.6 Hz), 4.76-4.73 (1 H, m), 4.70 (2 H, br s), 4.46 (1 H, s), 4.30-4.31 (1 H, m), 3.36 (2 H, q, 7.2 Hz), 1.21 (3 H, t, 7.2 Hz); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) δ 171.8, 157.5, 155.8, 153.6, 149.1, 141.9, 130.5, 129.9 (2 ×), 121.3, 116.2 (2 ×), 90.5, 86.3, 74.9, 73.4, 44.9, 35.2, 15.3; calcd de ESI-HRMS para C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 413.1573, encontrado: m/z 413.1573 [M - H]<sup>+</sup>; Anal. Calcd para C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>•H<sub>2</sub>O: C, 52.77; H, 5.59; N, 19.43; encontrado: C, 52.88; H, 5.40; N, 19.44.

45  
50

2-[6-(4-Metoxibencilamino)-purin-9-il]-5-(1H-tetrazol-5-il)-tetrahidrofuran-3,4-diol (16). El ácido crudo 18 obtenido de la oxidación de 17-acetónido (aprox. 3.98 mmol) con PhI(OAc)<sub>2</sub>/TEMPO se trató con cloruro de amonio (426 mg, 7.96 mmol), benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato (PyBOP, 3.07 g, 5.97 mmol), hidroxibenzotriazol (HOBt, 807 mg, 5.97 mmol) y diisopropiletilamina (2.5 mL, 15.9 mmol) en DMF anhidro (40 mL) a 50 °C por 14 h. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró, se concentró, y se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice; EtOAc/hexano (1:1 a 4:1)) para rendir un producto amida 20 como aceite incoloro.

55  
60

Una solución de dimetil sulfóxido (0.85 mL, 11.9 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) se añadió a una solución de cloruro de oxalilo (0.7 mL, 7.96 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) a -78 °C. La mezcla se agitó por 30 min, y se añadió una solución de amida 20 (ca. 3.98 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). La mezcla se agitó a -78 °C por otros 30 min, y se añadió diisopropiletilamina (2.6 mL, 15.9 mmol). Después de 1 h de agitación, la formación de nitrilo 21 se controló mediante el análisis por TLC. La mezcla se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró, se concentró, y se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice; EtOAc/hexano (2:3)) para rendir nitrilo 21 como aceite incoloro (863 mg) contaminado con una cantidad pequeña de HOBt.

65

El producto nitrilo preparado anteriormente (863 mg, 2.68 mmol) se trató con 4-metoxibencilamina (1.84 g, 13.4 mmol) y diisopropiletilamina (15.5 mL) en 1-propanol (26 mL) a 70 °C por 4 h. La mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> se filtró, se concentró, y se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (300:1 a 150:1)) para dar el compuesto 22 (905 mg, 54 % de rendimiento general). C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>; aceite incoloro; TLC (EtOAc/hexano (4:1)) R<sub>f</sub> = 0.55; [α]<sup>26</sup><sub>D</sub> = +25.8 (EtOAc, c = 1.0); IR ν<sub>máx</sub> (neta) 3373, 3282, 2990, 2925, 2853, 1679, 1618, 1512, 1465, 1376, 1331, 1295, 1249, 1212, 1135, 1086

cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.39 (1 H, br s), 7.64 (1 H, br s), 7.26 (2 H, d, *J* = 10.4 Hz), 6.83 (2 H, d, *J* = 10.4 Hz), 6.54 (1 H, t, *J* = 5.6 Hz), 6.13 (1 H, s), 5.77 (1 H, d, *J* = 4.0 Hz), 5.68 (1 H, dd, *J* = 1.6, 4.0 Hz), 4.95 (1 H, d, *J* = 1.6 Hz), 4.75 (2 H, br s), 3.79 (3 H, s), 1.57 (3 H, s), 1.42 (3 H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 158.8, 154.5, 153.2, 148.2, 138.9, 130.2, 128.9 (2 ×), 119.7, 115.9, 114.5, 113.9 (2 ×), 91.6, 84.6, 83.9, 75.1, 55.3, 44.0, 26.6, 25.1; ESI-HRMS (modo negativo) calcd para C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: 421.1624, encontrado: *m/z* 421.1612 [M - H]<sup>-</sup>.

Una solución de nitrilo 22 (905 mg, 2.14 mmol) y NH<sub>4</sub>Cl (429 mg, 8.04 mmol) en DMF (20 mL) se enfrió a 0 °C, y se añadió NaN<sub>3</sub> (523 mg, 8.04 mmol). El baño de hielo se eliminó; la mezcla se calentó a 40 °C por 1 h, lentamente a 90 °C, y se mantuvo la agitación a 90 °C por 9 h. La mezcla se enfrió, se concentró a presión reducida, se disolvió en EtOAc, y se extrajo con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (pH = 8). La fase acuosa combinada se acidificó mediante la adición de solución de HCl (1 M) hasta pH = 2, y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró, y se concentró para dar un producto de tetrazol prácticamente puro 16-acetónido como aceite incoloro (460 mg, 46 % de rendimiento). C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>9</sub>O<sub>4</sub> TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1)) *R<sub>f</sub>* = 0.25; [α]<sup>27</sup><sub>D</sub> = +13.2 (EtOAc, *c* = 1.0); IR *v*<sub>máx</sub> (neta) 3361, 2926, 2852, 1613, 1513, 1481, 1375, 1333, 1293, 1249, 1210, 1176, 1154, 1101, 1034 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.90 (1 H, br s), 7.68 (1 H, br s), 7.35 (2 H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.86 (2 H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.83 (1 H, br s), 6.18 (1 H, s), 5.85 (1 H, s), 5.73 (1 H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.49 (1 H, d, *J* = 6.0 Hz), 4.92 (1 H, dd, *J* = 6.8, 7.6 Hz), 4.39 (1 H, dd, *J* = 4.0, 10.4 Hz), 3.77 (3 H, s), 1.69 (3 H, s), 1.43 (3 H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 158.4, 154.9, 152.9, 152.6, 146.2, 138.5, 129.5, 129.2 (2 ×), 118.4, 114.2, 113.7 (2 ×), 93.4, 85.9, 83.7, 82.3, 55.4, 44.1, 27.1, 25.2; ESI-HRMS (modo negativo) calcd para C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>9</sub>O<sub>4</sub>: 464.1795, encontrado: *m/z* 1786 [M - H]<sup>-</sup>.

El compuesto 16-acetónido (460 mg, 0.99 mmol) se agitó en HCl/THF (1:1, 0.1 mL) 3 M a temperatura ambiente por 14 h, y después se neutralizó con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La mezcla se concentró a presión reducida; el residuo se tomó con THF, se filtró, y se concentró para dar el compuesto del título 16 (320 mg, 76 %). La pureza del producto fue 99 % como se muestra mediante HPLC en una columna HC-C18 (Agilent, 4.6 × 250 mm, 5 μm) con elución de gradientes de CH<sub>3</sub>CN acuoso al 30-60 % en 20 min. C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>9</sub>O<sub>4</sub>; polvo blanco; mp 210.0-210.6 °C; TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1)) *R<sub>f</sub>* = 0.05; [α]<sup>26</sup><sub>D</sub> = -25.8 (THF, *c* = 1.0); IR *v*<sub>máx</sub> (neta) 3397, 2841, 2692, 1623, 1511, 1475, 1419, 1339, 1302, 1236, 1180, 1124, 1045 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 8.82 (1 H, s), 8.30 (1 H, br s), 8.20 (1 H, s), 7.26 (2 H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.83 (2 H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.08 (1 H, d, *J* = 5.6 Hz), 5.53 (1 H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.46 (1 H, d, *J* = 2.8 Hz), 5.18 (1 H, s), 4.91 (1 H, d, *J* = 5.2 Hz), 4.62 (2 H, br s), 4.20 (1 H, s), 3.69 (3 H, d, *J* = 2.0 Hz); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) δ 159.9, 157.4, 153.7, 151.9, 138.8, 131.5, 127.9 (2 ×), 113.1 (2 ×), 85.9, 79.1, 75.4, 74.3, 54.6, 41.9; ESI-HRMS (modo negativo) calcd para C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>9</sub>O<sub>4</sub>: 427.1730, encontrado: *m/z* 427.1727 [M - H]<sup>-</sup>.

6-Cloro-9-(2',3'-O-isopropilideno-β-D-ribofuranosil)-purina (17-acetónido). Una mezcla de 6-cloropurina ribósido (286 mg, 1.0 mmol), 2,2-dimetoxipropano (0.6 mL, 4.90 mmol) y monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (420 mg, 2.21 mmol) en acetona anhidra (10 mL) calentada a 55 °C por 2 h. La solución se vertió lentamente en NaHCO<sub>3</sub> saturado para agitación (10 mL), y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La capa orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, concentrado mediante evaporación rotativa a presión reducida, y se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice; EtOAc/hexano (1:1)) para rendir el compuesto del título 17-acetónido (264 mg, 81 %). C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>; polvo blanco; mp 157.4-158.8 °C; TLC (EtOAc/hexano (1:1)) *R<sub>f</sub>* = 0.23; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.74 (1 H, s), 8.26 (1 H, s), 5.98 (1 H, d, *J* = 4.4 Hz), 5.17 (1 H, t, *J* = 5.2 Hz), 5.08 (1 H, d, *J* = 6.0 Hz), 4.98 (1 H, br s), 4.53 (1 H, s), 3.95 (1 H, m), 3.81 (1 H, m), 1.63 (3 H, s), 1.36 (3 H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 151.7, 151.4, 150.2, 144.5, 132.8, 114.4, 94.0, 86.6, 83.7, 81.8, 63.5, 28.1, 25.8; calcd de ESI-HRMS para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 327.0860, encontrado: *m/z* 327.0913 [M + H]<sup>+</sup>.

N<sup>6</sup>-(4-Dimetilaminobencil)adenosina (23). Mediante un procedimiento similar a aquel para el compuesto 1, 6-cloropurina ribósido (100 mg, 0.35 mmol) se trató con clorhidrato de 4-dimetilaminobencilamina (5 equiv) y diisopropiletilamina (2 mL, 12 mmol) en 1-propanol (20 mL) a 70 °C por 7 h para dar el compuesto del título 23 (68 mg, 49 %) después de la recristalización a partir de MeOH. C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>; polvo blanco; mp 170.2-170.7 °C; [α]<sup>20</sup><sub>D</sub> = -64.5 (DMSO, *c* = 10 cm); TLC (MeOH/EtOAc (1:9)) *R<sub>f</sub>* = 0.58; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 8.34 (1 H, s), 8.28 (1 H, br s), 8.19 (1 H, br s), 7.15 (2 H, d, *J* = 8.8 Hz), 6.63 (2 H, d, *J* = 8.8 Hz), 5.87 (1 H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.44-5.40 (2 H, m), 5.18 (1 H, d, *J* = 4.4 Hz), 4.62-4.58 (3 H, m), 4.14 (1 H, dd, *J* = 4.4, 8.0 Hz), 3.95 (1 H, d, *J* = 4.4 Hz), 3.68-3.64 (1 H, m), 3.57-3.54 (1 H, m), 2.81 (6 H, s); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 154.2, 152.1, 149.2, 148.1, 139.6, 128.0 (2 ×), 127.3, 119.6, 112.2 (2 ×), 87.9, 85.8, 73.4, 70.6, 61.6, 42.4, 40.3 (2 ×); calcd de ESI-MS para C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: 401.1932, encontrado: *m/z* 401.1964 (M<sup>+</sup> + H).

N<sup>6</sup>-(1-Pirenimetil)adenosina (24). En un frasco de fondo redondo (10 mL) se añadieron 6-cloropurina ribósido (70 mg, 0.25 mmol) y clorhidrato de 1-pirenometilamina (167 mg, 0.63 mmol) en EtOH (3 mL). Diisopropiletilamina (0.24 mL, 2.88 mmol) se añadió como la base. El frasco de fondo redondo se colocó en la cavidad de un reactor de microondas monomodo enfocado (CEM Discover) y se irradió en 150 W por 10 min en el punto de ebullición de EtOH. El disolvente se eliminó mediante un rotavapor y el residuo se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice; EtOAc/MeOH (95:5)) para rendir el producto deseado 24 (59 mg, 49 %). C<sub>27</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>; polvo amarillo; mp 143.9-144.4 °C; [α]<sup>20</sup><sub>D</sub> = -50.4 (DMSO, *c* = 1.0); TLC (EtOAc/MeOH (9:1)) *R<sub>f</sub>* = 0.43; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 8.68 (1 H, br s), 8.54 (1 H, d, *J* = 9.2 Hz), 8.39 (1 H, s), 8.28 (2 H, d, *J* = 7.6 Hz), 8.25-8.19 (4 H, m), 5.91 (1 H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.46 (2 H, br s), 5.40 (1 H, br s), 5.21 (1 H, br s), 4.63 (1 H, d, *J* = 4.4 Hz), 4.16 (1 H, br s), 3.98 (1 H, d, *J* = 2.8 Hz), 3.68 (1 H, d, *J* = 12 Hz), 3.58 (1 H, m); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) δ 151.8, 139.5, 130.3, 129.8, 129.3, 127.3, 126.9, 126.8, 126.3, 125.7, 124.7, 124.6, 124.2, 123.5, 123.4, 122.7, 87.5, 85.5, 73.1, 70.2, 61.3; calcd de ESI-HRMS para C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: 482.1823, encontrado: *m/z* 482.1827 [M + H]<sup>+</sup>.

Ensayos de unión a radioligandos. Los ensayos de unión a radioligandos se realizaron mediante MDS Pharma Services de Taiwan (Taipei, Taiwan) mediante el uso de protocolos estándar de unión. Para el ensayo de unión del receptor de A<sub>2A</sub>, las proteínas de membrana<sup>46</sup> recolectadas de células HEK293 que sobreexpresan el receptor de A<sub>2A</sub> humano se incubaron en amortiguador de reacción [Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 1 mM, y 2 U/mL de adenosina desaminasa] que contiene <sup>3</sup>H-CGS21680 (50 nM) por 90 min a 25 °C. La unión no específica se evaluó en presencia de adenosina-5'-N-etilcarboxamida (NECA) 50 μM.

Los ensayos de unión para transportadores de adenosina se realizaron como se describió antes.<sup>47</sup> Las fracciones de membrana se recolectaron de la corteza cerebral de conejillos de indias derivados de las líneas Duncan Hartley se incubaron con NBTI marcado con <sup>3</sup>H (0.5 nM) por 30 min a 25 °C en un amortiguador de incubación que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7.4). La unión no específica se evaluó en presencia de NBTI 5 μM, un inhibidor de alta afinidad del transportador equilibrativo de nucleósidos 1 (ENT1), que inhibe sólo ENT1 a 0.5 nM.<sup>48</sup> Las reacciones se terminaron mediante filtración sobre fibras de vidrio GF/B y mediante el lavado con el amortiguador de reacción correspondiente.

Ensayo de metabolismo de MTT. Las células PC12 compradas de ATCC (Manassas, VA, USA) se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero de caballo al 10 % y suero fetal bovino al 5 % y se incubaron en incubadora de CO<sub>2</sub> (5 %) a 37 °C. La supervivencia se evaluó mediante el ensayo de metabolismo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) como se describió en otras partes.<sup>49, 50</sup> Brevemente, las células cultivadas en placas de 150-mm se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en DMEM. Las células suspendidas (1 × 10<sup>4</sup> células) se cultivaron en placas de 96 pocillos y se trataron con o sin el reactivo indicado. Después de la incubación por 24 h, MTT (0.5 mg/mL) se añadió al medio y se incubó por 3 h. Después de desechar el medio, DMSO (100 μL) se aplicó después al pocillo para disolver los cristales de formazán derivados del clivaje mitocondrial del anillo de tetrazolio por las células vivas. La absorbancia a 570/630 nm en cada pocillo se midió en un lector de ensayo inmunoabsorbente ligado a microenzimas (ELISA).

Lista de referencias:

- Andrew, S. E.; Goldberg, Y. P.; Kremer, B.; Telenius, H.; Theilmann, J.; Adam, S.; Starr, E.; Squitieri, F.; Lin, B.; Kalchman, M. A.; Graham, R. K.; Hayden, M. R. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat. Genet.* 1993, 4, 398-403.
- DiFiglia, M.; Sapp, E.; Chase, K. O.; Davies, S. W.; Bates, G. P.; Vonsattel, J. P.; Aronin, N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 1997, 277, 1990-1993.
- MacDonald, M. E.; Ambrose, C. M.; Duyao, M. P.; Myers, R. H.; Lin, C.; Srinidhi, L.; Barnes, G.; Taylor, S. A.; James, M.; Groot, N. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993, 72, 971-983.
- Beal, M. F.; Ferrante, R. J. Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004, 5, 373-384.
- Okamoto, S. -i.; Pouladi, M. A.; Talantova, M.; Yao, D.; Xia, P.; Dagmar Ehrnhoefer. E.; Zaidi, R.; Clemente, A.; Kaul, M. ; Graham, R. K. ; Zhang, D. ; Chen, H. -S. V.; Tong, G.; Hayden, M. R. ; Lipton, S. A. Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin. *Nat. Med.* 2009, 15, 1407-1413.
- Chou, S. Y.; Lee, Y. C.; Chen, H. M.; Chiang, M. C.; Lai, H. L.; Chang, H. H.; Wu, Y. C.; Sun, C. N.; Chien, C. L.; Lin, Y. S.; Wang, S. C.; Tung, Y. Y.; Chang, C.; Chern, Y. CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model. *J. Neurochem.* 2005, 93, 310-320.
- Chiang, M. C.; Chen, H. M.; Lai, H. L.; Chen, H. W.; Chou, S. Y.; Chen, C. M.; Tsai, F. J.; Chern, Y. The A2A adenosine receptor rescues the urea cycle deficiency of Huntington's disease by enhancing the activity of the ubiquitin-proteasome system. *Hum. Mol. Genet.* 2009, 18, 2929-2942.
- Link, A. A.; Kino, T.; Worth, J. A.; McGuire, J. L.; Crane, M. L.; Chrousos, G. P.; Wilder, R. L.; Elenkov, I. J. Ligand-activation of the adenosine A2A receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J. Immunol.* 2000, 164, 436-442.
- Huang, N.-K.; Chern, Y.; Fang, J.-M.; Lin, C.-I.; Chen, W.-P.; Lin, Y.-L. Neuroprotective principles from *Gastrodia elata*. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 571-574.
- Fink, J. S.; Weaver, D. R.; Rivkees, S. A.; Peterfreund, R. A.; Pollack, A. E.; Adler, E. M.; Reppert, S. M. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1992, 14, 186-195.
- Dixon, A. K.; Gubitza, A. K.; Sirinathsinghji, D. J. S.; Richardson, P. J.; Freeman, T. C. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1996, 118, 1461-1468.
- Rosin, D. L.; Robeva, A.; Woodard, R. L.; Guyenet, P. G.; Linden, J. Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 1998, 401, 163-186.
- Anderson, C. M.; Xiong, W.; Geiger, J. D.; Young, J. D.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A.; Parkinson, F. E. Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain. *J. Neurochem.* 1999, 73, 867-873.
- Sapp, E.; Schwarz, C.; Chase, K.; Bhide, P. G.; Young, A. B.; Penney, J.; Vonsattel, J. P.; Aronin, N.; DiFiglia, M. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann. Neurol.* 1997, 42, 604-612.
- Ohlson, S. Designing transient binding drugs: A new concept for drug discovery. *Drug Discov. Today* 2008, 13, 433-439.

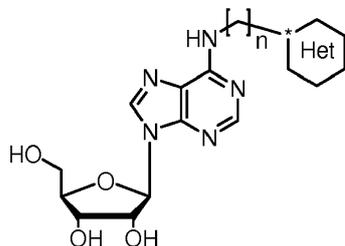
16. Morphy, R.; Kay, C.; Rankovic, Z. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discov. Today* 2004, 9, 641-651.
17. Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed multiple ligands. an emerging drug discovery paradigm. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 6523-6543.
- 5 18. Zimmermann, G. R.; Lehar, J.; Keith, C. T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov. Today* 2007, 12, 34-42.
19. Hopkins, A. L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat. Chem. Bio.* 2008, 4, 682-690.
20. Popoli, P.; Blum, D.; Domenici, M. R.; Burnouf, S.; Chern, Y. A critical evaluation of adenosine A2A receptors as potentially "druggable" targets in Huntington's disease. *Curr. Pharm. Des.* 2008, 14, 1500-1511.
- 10 21. Morphy, R.; Rankovic, Z. The Physicochemical challenges of designing multiple ligands. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 4961-4970.
22. Morphy, R.; Rankovic, Z. Designing multiple ligands - medicinal chemistry strategies and challenges. *Curr. Pharm. Des.* 2009, 15, 587-600.
23. Kurogi, Y.; Güner, O. Pharmacophore modeling and three-dimensional database searching for drug design using catalyst. *Curr. Med. Chem.* 2001, 8, 1035-1055.
- 15 24. Kaminski, J. J.; Rane, D. F.; Snow, M. E.; Weber, L.; Rothofsky, M. L.; Anderson, S. D.; Lin, S. L. Identification of novel farnesyl protein transferase inhibitors using three-dimensional database searching methods. *J. Med. Chem.* 1997, 40, 4103-4112.
25. Singh, J.; Van Vlijmen, H.; Liao, Y.; Lee, W. C.; Cornebise, M.; Harris, M.; Shu, I. H.; Gill, A.; Cuervo, J. H.; Abraham, W. M.; Adams, S. P. Identification of potent and novel  $\alpha 4\beta 1$  antagonists using in silico screening. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 2988-2993.
26. Kotsikorou, E.; Oldfield, E. A quantitative structure-activity relationship and pharmacophore modeling investigation of aryl-X and heterocyclic bisphosphonates as bone resorption agents. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 2932-2944.
27. Chen, G. S.; Chang, C. S.; Kan, W. M.; Chang, C. L.; Wang, K. C.; Chern, J. W. Novel lead generation through hypothetical pharmacophore three-dimensional database searching: discovery of isoflavonoids as nonsteroidal inhibitors of rat 5 $\alpha$ -reductase. *J. Med. Chem.* 2001, 44, 3759-3763.
- 25 28. Zampieri, D.; Mamolo, M. G.; Laurini, E.; Florio, C.; Zanette, C.; Fermeglia, M.; Posocco, P.; Paneni, M. S.; Pricl, S.; Vio, L. Synthesis, biological evaluation, and three-dimensional in silico pharmacophore model for  $\sigma 1$  receptor ligands based on a series of substituted benzo[d]oxazol-2(3H)-one derivatives. *J. Med. Chem.* 2009, 52, 5380-5393.
- 30 29. Wei, D.; Jiang, X.; Zhou, L.; Chen, J.; Chen, Z.; He, C.; Yang, K.; Liu, Y.; Pei, J.; Lai, L. Discovery of multitarget inhibitors by combining molecular docking with common pharmacophore matching. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 7882-7888.
- 30 30. Jaakola, V. P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y.; Lane, J. R.; Ijzerman, A. P.; Stevens, R. C. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 2008, 322, 1211-1217.
- 35 31. Walkinshaw, G. & Waters, C.M. Neurotoxin-induced cell-death in neuronal pc12 cells is mediated by induction of apoptosis. *Neuroscience* 1994, 63, 975-987.
32. Chiang, M. C.; Lee, Y. C.; Huang, C. L.; Chern, Y. cAMP-response element-binding protein contributes to suppression of the A2A adenosine receptor promoter by mutant Huntingtin with expanded polyglutamine residues. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 1.4331-14340.
- 40 33. Jarvis, M. F.; Schulz, R.; Hutchison, A. J.; Do, U. H.; Sills, M. A.; Williams, M. [3H] CGS 21680, a selective A2 adenosine receptor agonist directly labels A2 receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989, 251, 888-893.
34. Catalyst, Accelrys, 9685 North Scranton Road, San Diego, CA 92121, U.S.A. <http://www.accelrys.com>
- 45 35. Cass, C. E.; Gaudette, L. A.; Paterson, A. R. Mediated transport of nucleosides in human erythrocytes - specific binding of inhibitor nitrobenzylthioinosine to nucleoside transport sites in erythrocyte-membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1974, 345, 1-10.
36. Zhu, Z. X.; Buolamwini, J. K. Constrained NBMPR analogue synthesis, pharmacophore mapping and 3D-QSAR modeling of equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 3848-3865.
- 50 37. Dixon, S. L.; Smondirev, A. M.; Knoll, E. H.; Rao, S. N.; Shaw, D. E.; Friesner, R. A. PHASE: a new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2006, 20, 647-671.
38. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2004-2021.
- 55 39. Epp, J. B.; Widlanski, T. S. Facile preparation of nucleoside-5'-carboxylic acids. *J. Org. Chem.* 1999, 64, 293-295.
40. Nakajima, N.; Saito, M.; Ubukata, M. Activated dimethyl sulfoxide dehydration of amide and its application to one-pot preparation of benzyl-type perfluoroimidates. *Tetrahedron*, 2002, 58, 3561-3577.
41. Bosch, M. P.; Campos, F.; Niubó, I.; Rosell, G.; Díaz, J. L.; Brea, J.; Loza, M. I.; Guerrero, A. Synthesis and biological activity of new potential agonists for human adenosine A2A receptor. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 4041-4053.
- 60 42. Martin, P. L.; Barrett, R. J.; Linden, J.; Abraham, W. M. Pharmacology of 2-cyclohexylmethylidenehydrazinoadenosine (WRC-0470), a novel, short-acting adenosine A2A receptor agonist that produces selective coronary vasodilation. *Drug Develop. Res.* 1997, 40, 313-324.

43. Volpini, R.; Camaioni, E.; Costanzi, S.; Vittori, S.; Klotz, K. N.; Cristalli, G. Synthesis of di- and tri-substituted adenosine derivatives and their affinities at human adenosine receptor subtypes. *Nucleosides Nucleotides* 1999, 18, 2511-2520.
- 5 44. Vittori, S.; Costanzi, S.; Lambertucci, C.; Portino, F. R.; Taffi, S.; Volpini, R.; Klotz, K. N.; Cristalli, G. A2B adenosine receptor agonists: synthesis and biological evaluation of 2-phenylhydroxypropynyl adenosine and NECA derivatives. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* 2004, 23, 471-481.
45. Güner, O.; Clement, O.; Kurogi, Y. Pharmacophore modeling and three dimensional database searching for drug design using catalyst: recent advances. *Curr. Med. Chem.* 2004, 11, 2991-3005.
- 10 46. Varani, K.; Gessi, S.; Dalpiaz, A.; Borea, P. A. Pharmacological and biochemical characterization of purified A2A adenosine receptors in human platelet membranes by [<sup>3</sup>H]-CGS 21680 binding. *Br. J. Pharmacol.* 1996, 117, 1693-701.
47. Verma, A. & Marangos, P.J. Nitrobenzylthioinosine binding in brain: an interspecies study. *Life Sci.* 1985, 36, 283-290.
- 15 48. Ward, J. L.; Sherali, A.; Mo, Z. P.; Tse, C. M. Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 Cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 8375-8381.
49. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983, 65, 55-63.
- 20 50. Huang, N. K.; Lin, Y. W.; Huang, C. L.; Messing, R. O.; Chern, Y. Activation of protein kinase A and a typical protein kinase C by A2A adenosine receptors antagonizes apoptosis due to serum deprivation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 13838-13846.

25

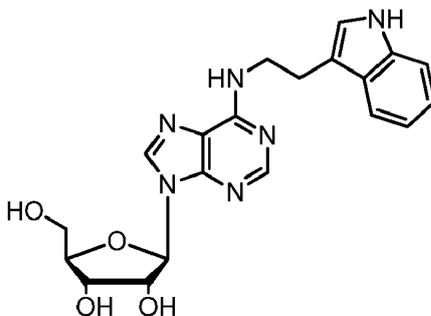
Reivindicaciones

1. Una composición que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula:



en donde n es 1 a 3, el heterociclo (sustituido) contiene anillos de 5 o 6 miembros y el heterociclo fusionado contiene heteroátomos de nitrógeno, oxígeno o azufre y el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, flúor, cloro, bromo, yodo, hidroxilo, alquilo C<sub>1-6</sub>, trifluorometilo y fenilo (sustituido), para usar en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto que lo necesite.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es:



3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad por el mal plegamiento de proteínas.
- 40
4. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Prion, enfermedad de Huntington y ataxias espinocerebelosas.
- 45
5. La composición de la reivindicación 4, en donde la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Huntington.
6. La composición de la reivindicación 4, en donde la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer.
7. La composición de la reivindicación 4, en donde la enfermedad neurodegenerativa es esclerosis lateral amiotrófica.
- 50
8. La composición de la reivindicación 4, en donde la enfermedad neurodegenerativa es ataxia espinocerebelosa.

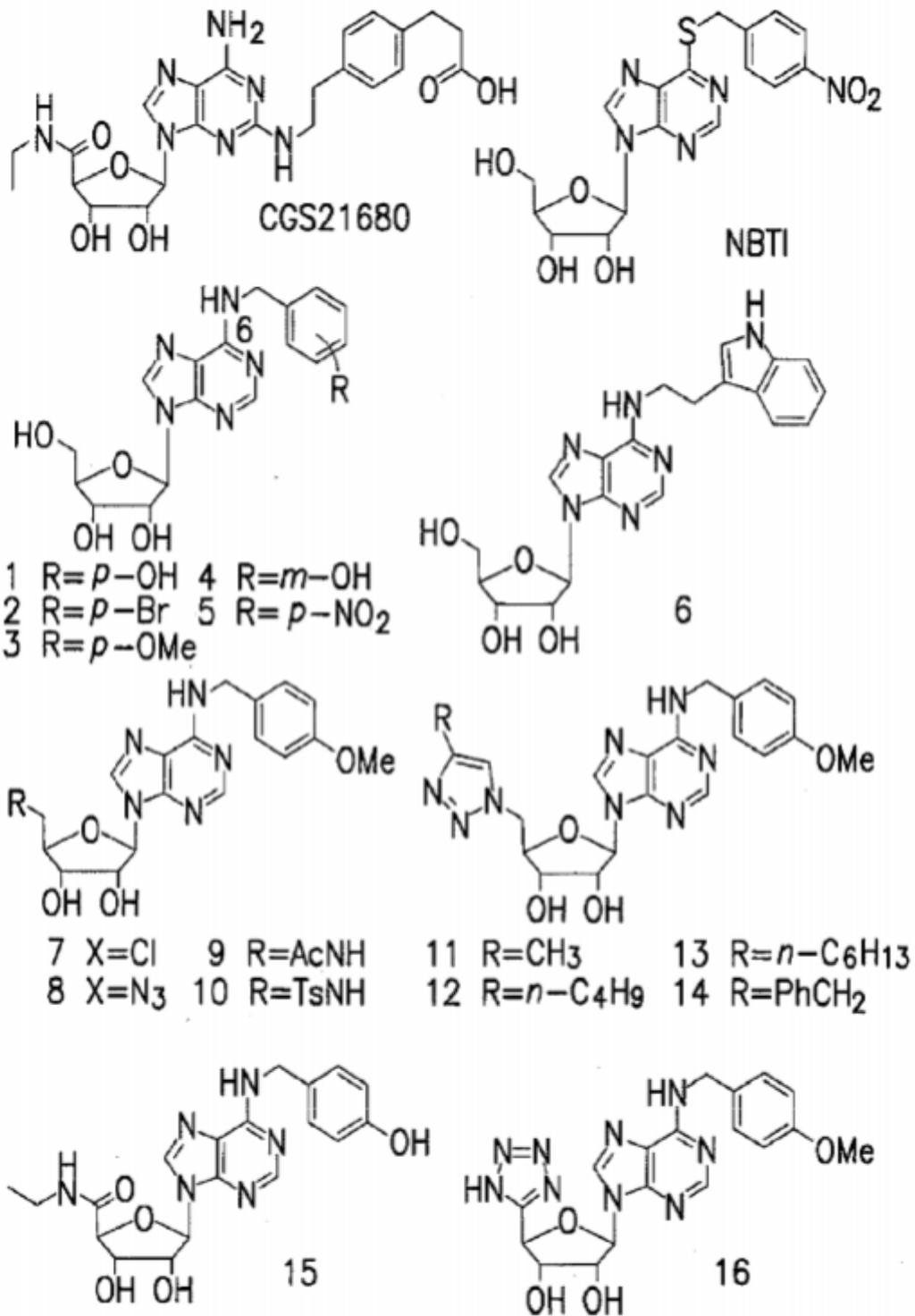


Figura 1

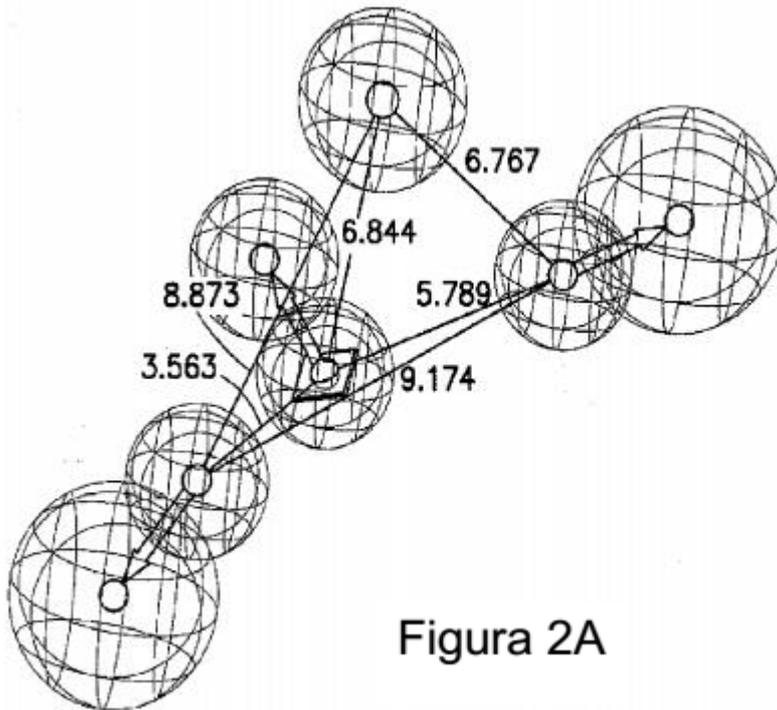


Figura 2A

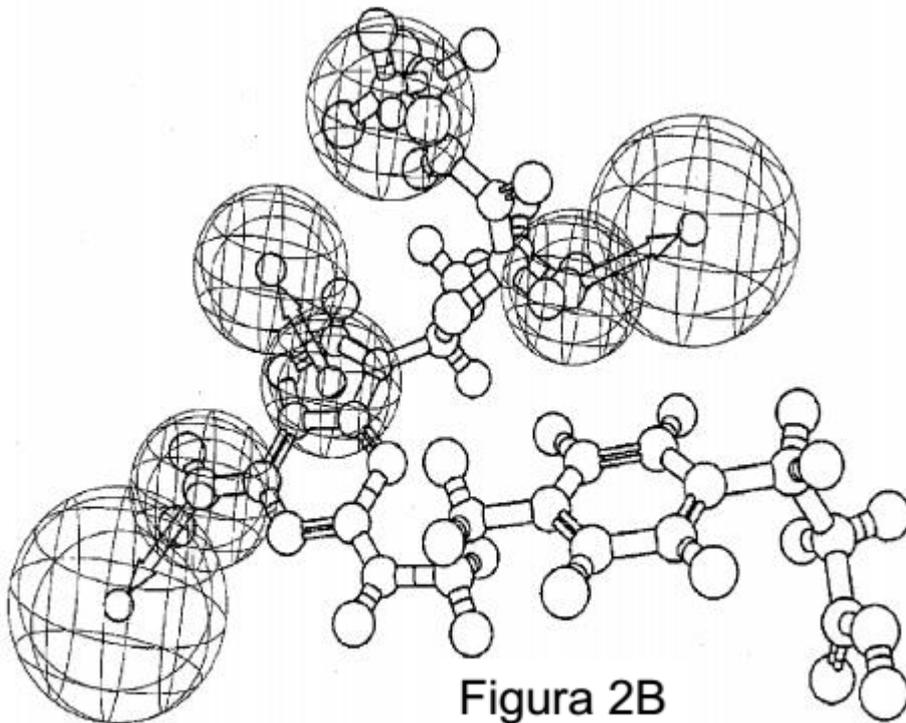


Figura 2B

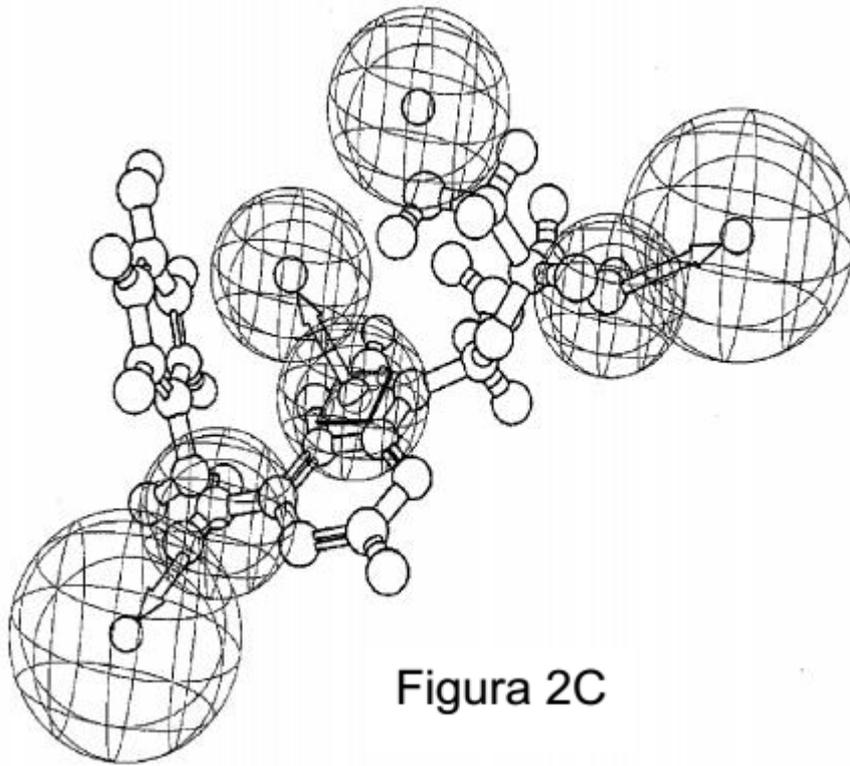


Figura 2C

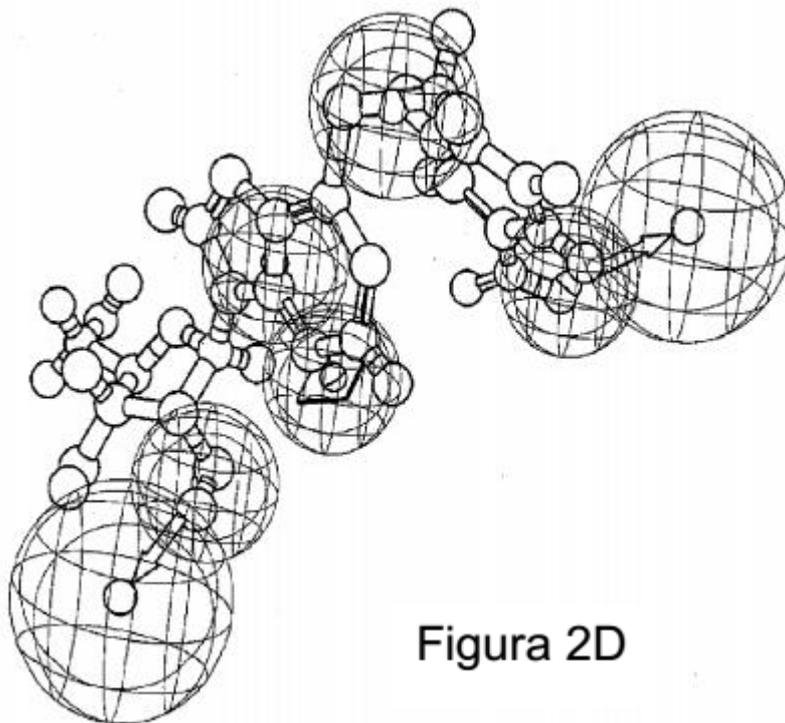


Figura 2D

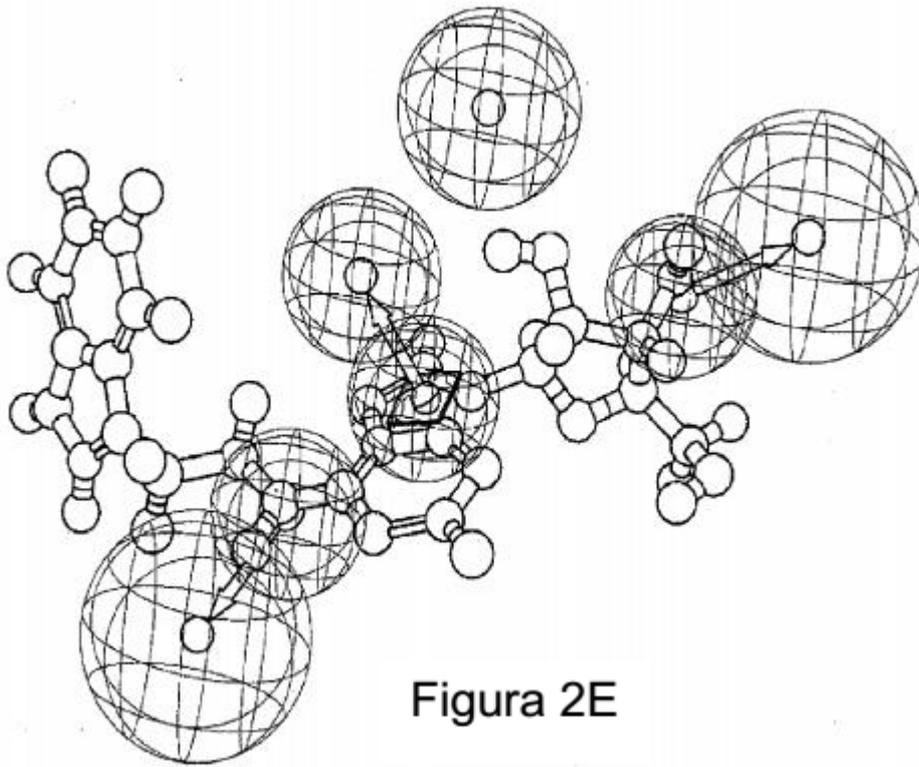


Figura 2E

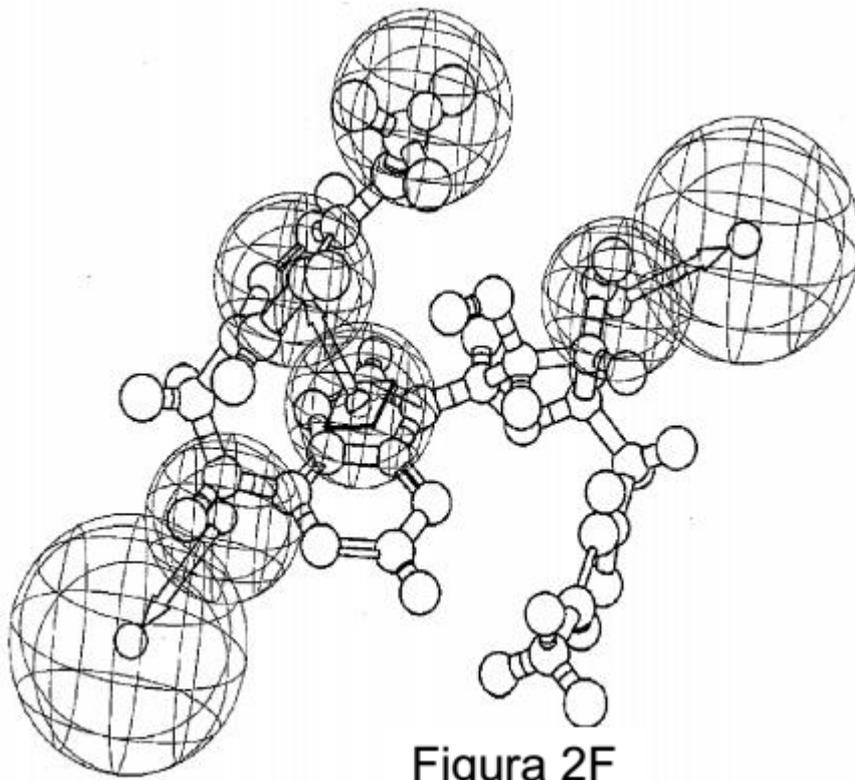


Figura 2F

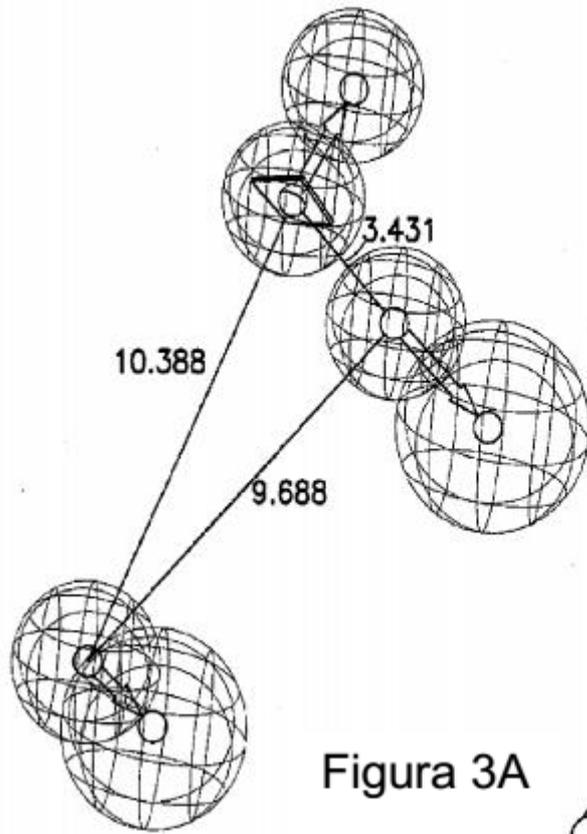


Figura 3A

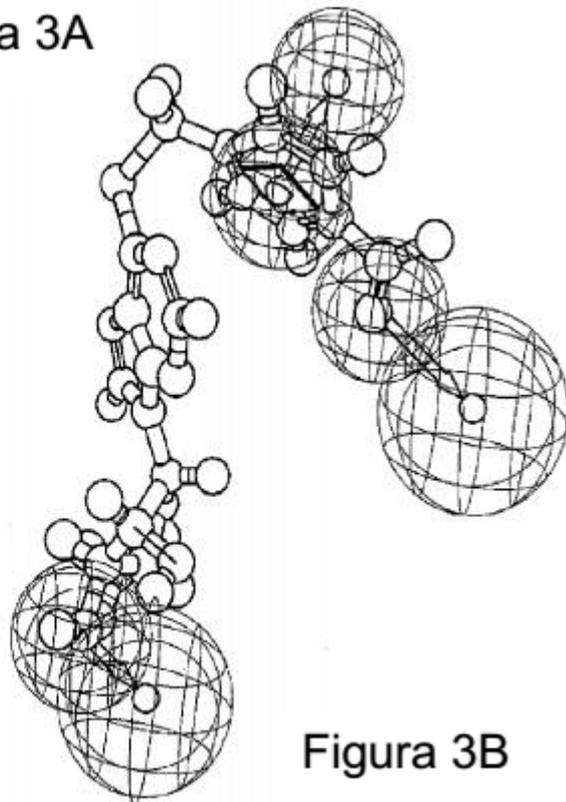


Figura 3B

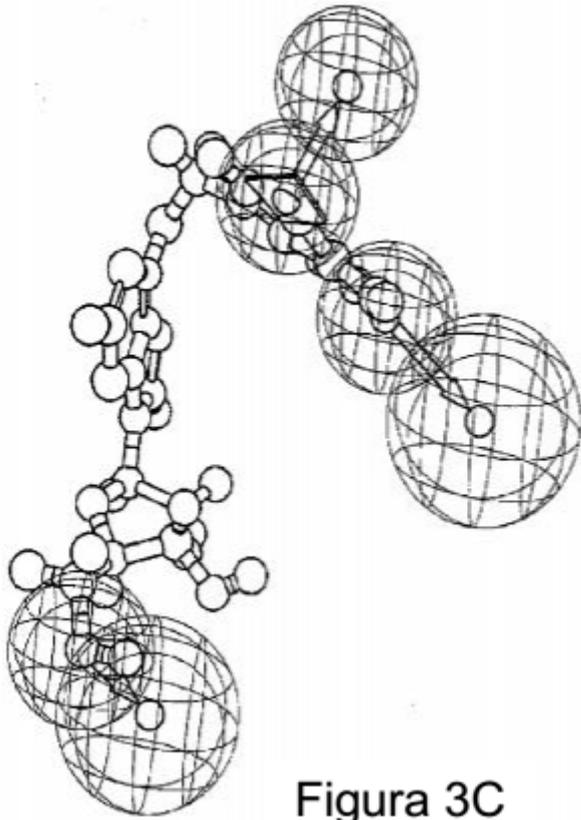


Figura 3C

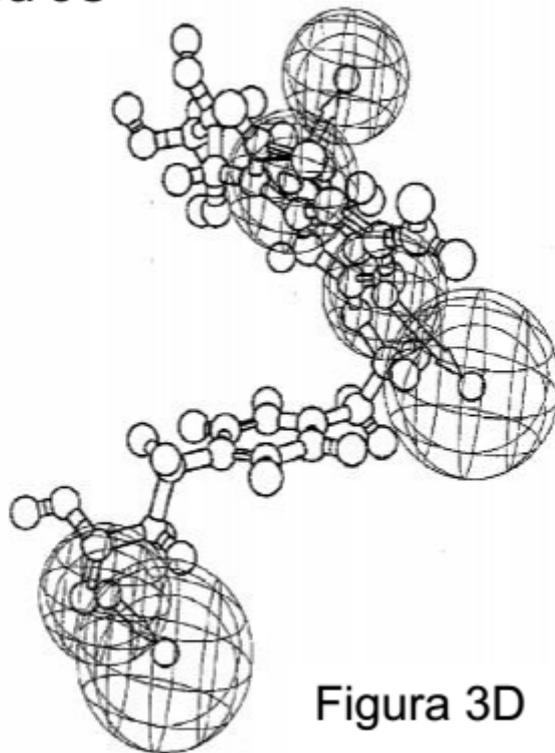


Figura 3D

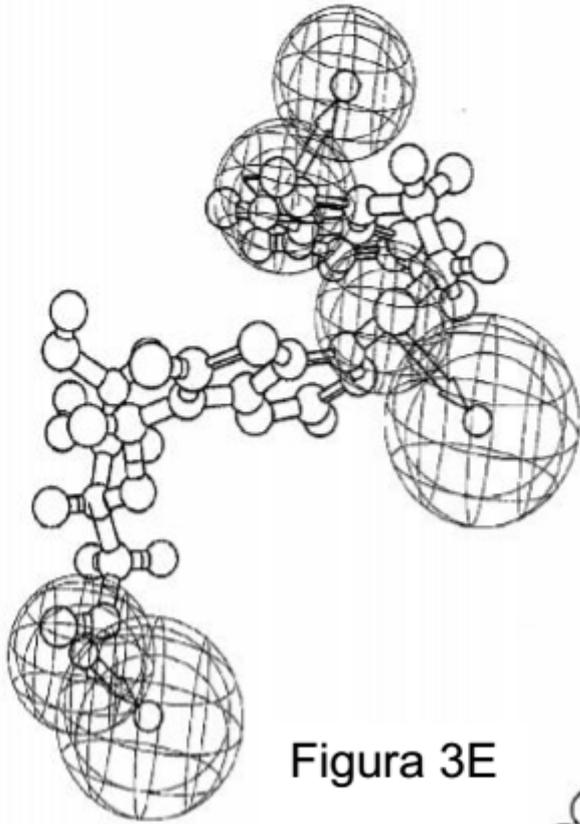


Figura 3E

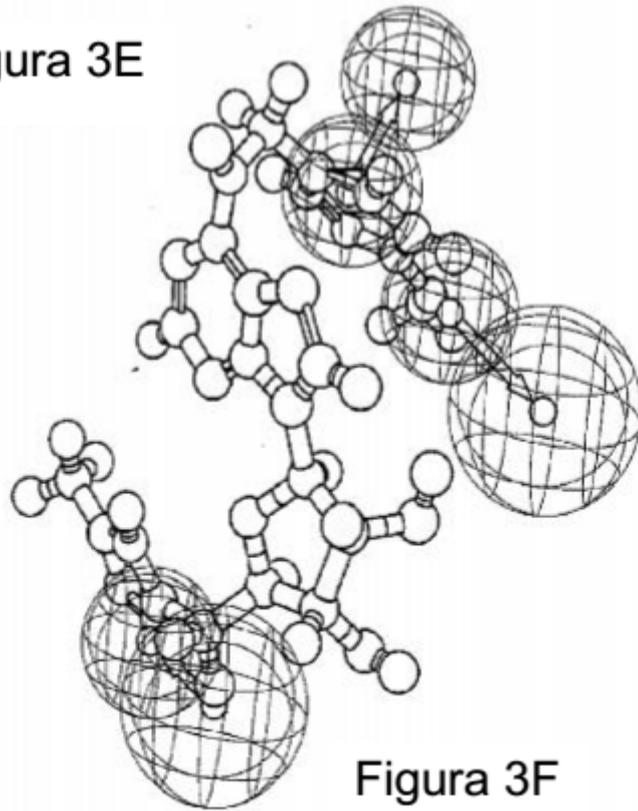


Figura 3F

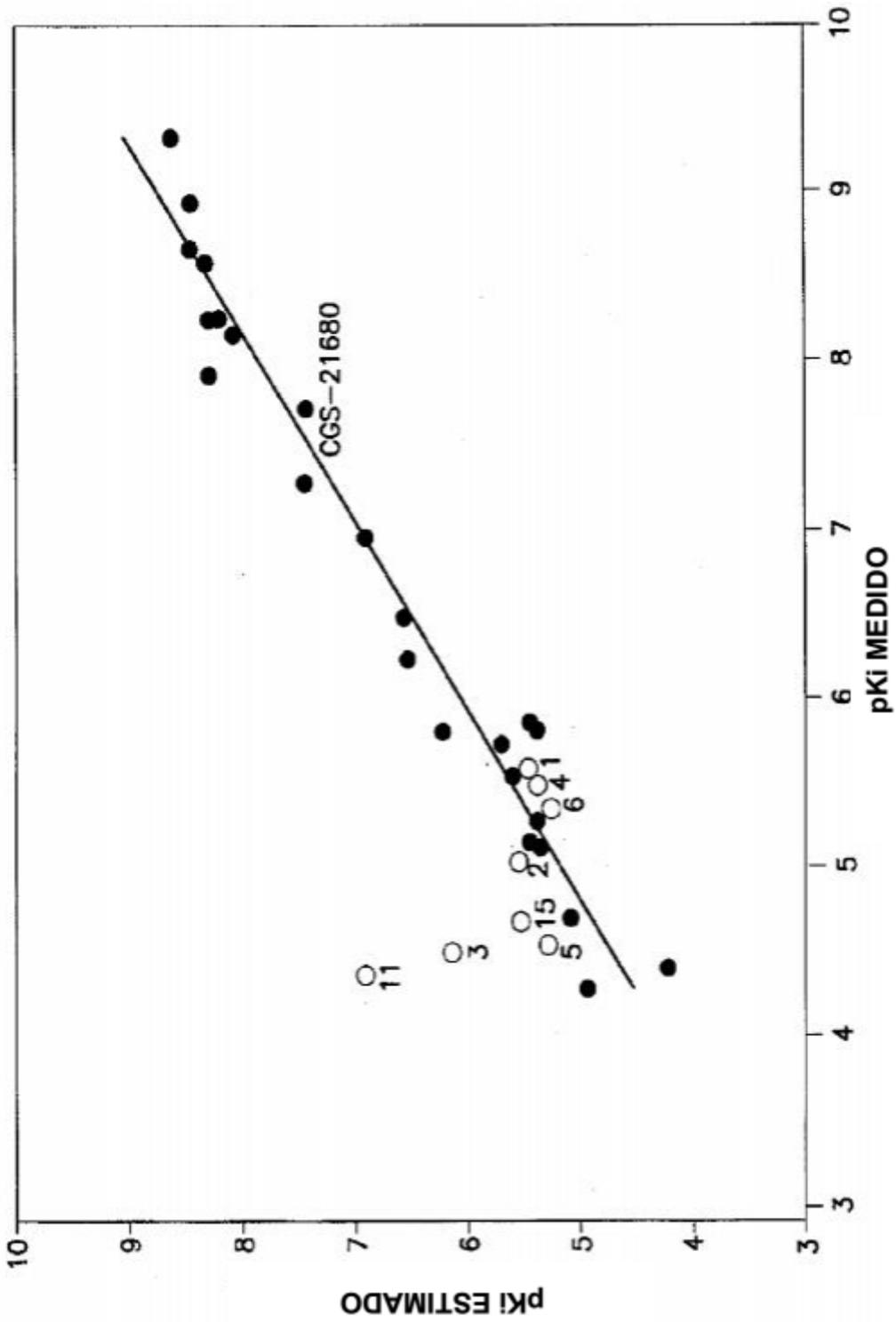


Figura 4

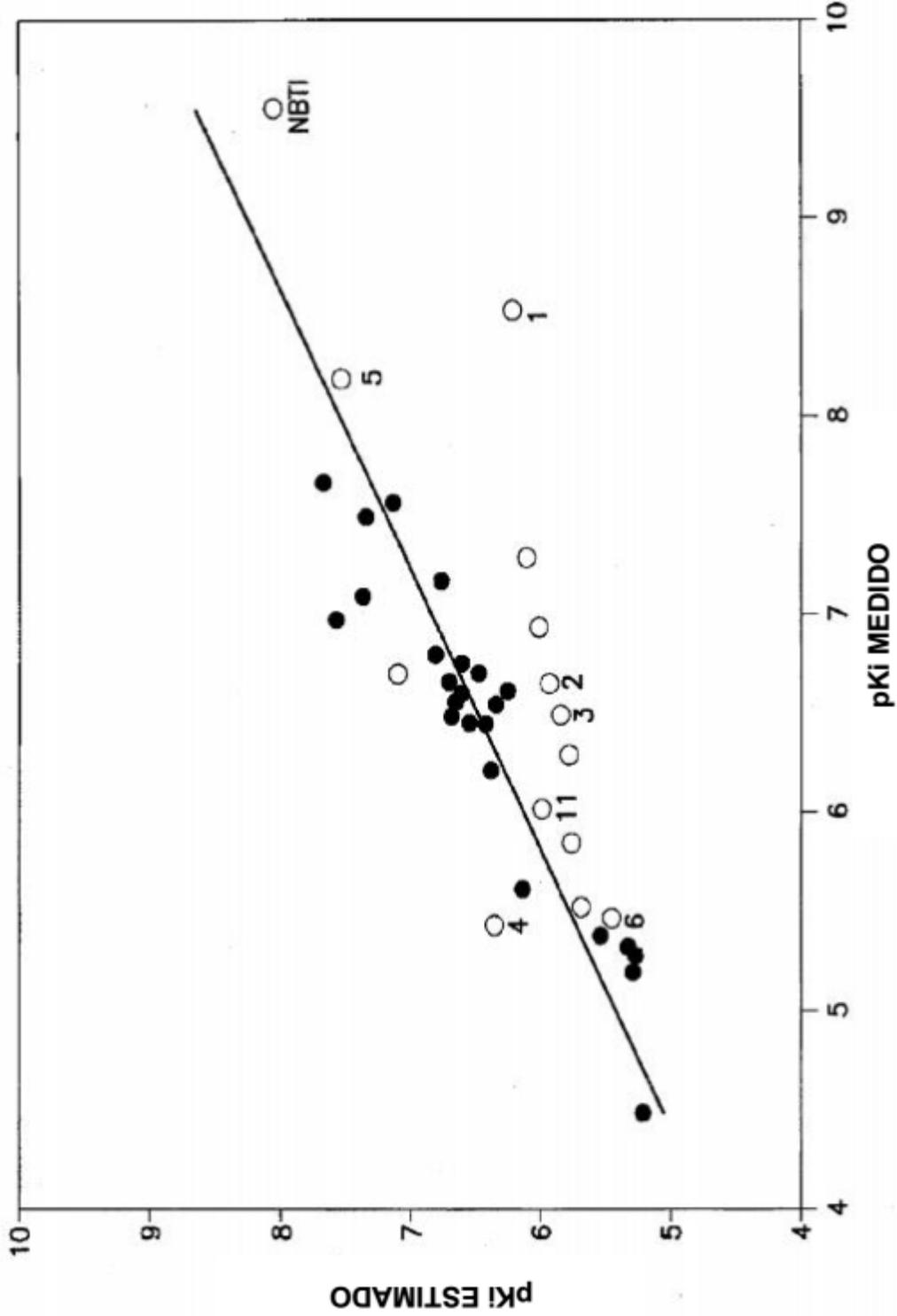


Figura 5