

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 363**

51 Int. Cl.:

**C07F 9/6561** (2006.01)

**A61K 31/675** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2011 PCT/US2011/025680**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11103552**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2011 E 11713395 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2539352**

54 Título: **Derivados de AMP para tratar enfermedades cardíacas**

30 Prioridad:

**22.02.2010 US 306687 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.02.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CONNECTICUT (50.0%)  
263 Farmington Avenue  
Farmington, CT 06030, US y  
THE UNITED STATES OF AMERICA, AS  
REPRESENTED BY THE SECRETARY,  
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN  
SERVICES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LIANG, BRUCE;  
JACOBSON, KENNETH A.;  
JOSHI, BHALCHANDRA V. y  
KUMAR, THATIKONDA SANTOSH**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 654 363 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Derivados de AMP para tratar enfermedades cardíacas.

- 5 El Gobierno de los Estados Unidos de América tiene ciertos derechos en la presente invención de acuerdo con el National Institutes of Health Grant No. RO1-HL48225.

## Antecedentes

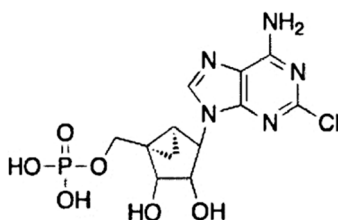
10 Las acciones de nucleótidos extracelulares en la señalización celular están mediadas por dos clases de receptores purinérgicos de la superficie celular: los receptores P2X son canales iónicos que se abren o se cierran por ligandos y que se activan mediante ATP extracelular, y los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G activados tanto por nucleótidos adenínicos como uracílicos. En el corazón, por ejemplo, se expresa una variedad de receptores P2.

15 Los receptores P2X cardíacos representan una diana terapéutica nueva y potencialmente importante para el tratamiento de insuficiencia cardíaca. Un receptor P2X en el cardiomiocito media la cardioprotección y es activado por ATP o su análogo potente 2-MeSATP 1, como se demuestra usando el modelo de calsequestrina (CSQ) de cardiomiopatía. El ATP extracelular puede provocar una corriente iónica en miocitos ventriculares cardíacos murinos, de rata, y de cobaya. El receptor P2X<sub>4</sub> es una subunidad importante del receptor P2X cardíaco nativo, que media la corriente iónica inducida por ATP extracelular. Esta corriente de P2X estaba aumentada en miocitos ventriculares cardíacos de los corazones CSQ. Además, la sobreexpresión del receptor P2X<sub>4</sub> específica de miocitos cardíacos puede imitar los efectos beneficiosos que siguen a la infusión crónica de análogos agonistas de P2X. Este análisis sugirió que la regulación de este receptor P2X cardíaco es protectora en hipertrofia o insuficiencia cardíaca.

20 El (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(6-amino-2-cloro-9H-purin-9-yl)-1-[fosforiloximetil]biciclo[3.1.0]hexano-2,3-diol, (MRS2339, 3) es un derivado de (N)-metanocarba monofosfato de 2-cloro-AMP 2 que contiene un sistema anular bicíclico rígido (biciclo[3.1.0]hexano) en lugar de ribosa. Este sistema anular impide la hidrólisis del 5'-fosfato en un compuesto modelo por su nucleotidasa. El compuesto 3 indujo una corriente en el miocito CSQ similar a aquella por el compuesto 1, característica de la acción del receptor P2X<sub>4</sub>. MRS2339 (compuesto 3) administrado crónicamente rescató el fenotipo hipertrófico y de insuficiencia cardíaca en el ratón que sobreexpresa CSQ. Cuando se administra vía una bomba miniosmótica Alzet, aumentó significativamente la longevidad en comparación con los ratones a los que se les inyectó vehículo. La mejora en la supervivencia estaba asociada con reducciones en la relación de peso del corazón/peso corporal y en el área de sección transversal de los miocitos cardíacos. El compuesto 3 estaba desprovisto de cualquier acción vasodilatadora en preparaciones anulares de la aorta, indicando que su efecto beneficioso en insuficiencia cardíaca no fue debido a ninguna descarga vascular.

30 La activación de este receptor P2X de miocitos conduce a la apertura de un canal catiónico no selectivo permeable a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, y Ca<sup>2+</sup>. La corriente es entrante en potenciales de membrana negativos, se invierte cerca de 0 mV, y se hace saliente a potenciales positivos. La activación continua de este canal receptor bajo los potenciales de membrana de reposo o negativos producirá una corriente entrante, mientras que la activación durante porciones despolarizadas del potencial de acción debería conducir a una corriente saliente. Estas corrientes iónicas representan un mecanismo iónico posible mediante el cual el canal de P2X de cardiomiocitos logra su efecto protector.

35 En su artículo "P2X purinergic receptor-mediated ionic current in cardiac myocytes of calsequestrin model of cardiomyopathy: Implications for the treatment of heart failure", American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology, vol. 292, n° 2, febrero de 2007, páginas H1077-H1084, Shen et al. describen el compuesto MRS-2339



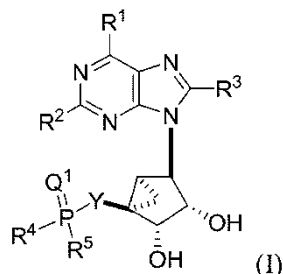
55 y su utilización como activadores del receptor P2X de miocitos que tienen actividad cardioprotectora.

Resultan necesarios unos activadores del receptor P2X de miocitos adicionales que presenten una actividad cardioprotectora.

**Sumario**

En un aspecto, se describen en la presente memoria unos derivados de N-metanocarba de fosfonatos y fosfinatos de AMP que comprenden

5



un isómero enriquecido en deuterio de los mismos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los que

10

$Q^1$  es O o S;

$R^1$  es hidrógeno o  $N(R^6)_2$ ;

15

$R^2$  es hidrógeno, alquilo de  $C_2-C_{12}$  o halógeno;

$R^3$  es hidrógeno;

20

$R^4$  y  $R^5$  se seleccionan independientemente de hidroxilo o alcoxi de  $C_1-C_{12}$ ;

o, alternativamente,  $R^4$  y  $R^5$  forman una estructura cíclica de 5 o 6 miembros con el átomo de fósforo, en la que la estructura cíclica contiene al menos dos átomos de oxígeno y al menos 2 o 3 átomos de carbono;

25

$R^6$  se selecciona independientemente de hidrógeno o alquilo de  $C_1-C_{12}$ ; e

Y es un grupo enlazante enlazado al átomo de fósforo mediante un átomo de carbono, seleccionado de alquileo de  $C_1-C_6$  o alquilenilo de  $C_1-C_6$ .

30

En un aspecto, una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP para el tratamiento de la enfermedad o afección cardíaca o vascular sensible a la activación del receptor P2X cardíaco y/o vascular para su uso en el tratamiento de enfermedad o afección cardíaca o vascular sensible a la activación del receptor P2X cardíaco y/o vascular en un sujeto mamífero que lo necesite.

35

En otro aspecto, una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP para su uso para la mejora del comportamiento contráctil cardíaco y/o función cardíaca.

40

En todavía otro aspecto, una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP para su uso en el tratamiento de una hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca sistólica, insuficiencia cardíaca diastólica, cardiomiopatía isquémica, cardiomiopatía no isquémica, o remodelación cardíaca adversa tras lesión al corazón como resultado de isquemia/reperfusión o causas no isquémicas en un sujeto mamífero que lo necesite.

45

**Breve descripción de las figuras**

50

La figura 1 muestra los efectos beneficiosos de derivados de fosfonatos sustituidos en 2-CI de (N)-metanocarba AMP en ratones con insuficiencia cardíaca. Se disolvieron diversos derivados de fosfonatos en disolución salina normal estéril (NS) a 3,3  $\mu$ M y se infundieron subcutáneamente de forma individual vía una minibomba Alzet en ratones CSQ como se describe en Métodos. Después de 28 días de infusión, la función cardíaca *in vivo* se evaluó usando acortamiento fraccionario (FS) derivado de una ecocardiografía. (A) el derivado de 5'-fosfonato sustituido en 2-CI 4 fue capaz de mejorar el comportamiento contráctil cardíaco *in vivo* en ratones con insuficiencia cardíaca en comparación con animales con insuficiencia cardíaca tratados con disolución salina normal (ANOVA de una vía con comparación de post-ensayo,  $P < 0,05$ ), mientras que el no sustituido 5 fue ineficaz  $P > 0,05$ . (B) De forma similar, el homólogo superior sustituido en 2-CI 9 fue capaz de potenciar la función contráctil cardíaca ( $P < 0,05$ ), mientras que el compuesto no sustituido parental 10 no mejoró la función contráctil ( $P > 0,05$ ). Los datos fueron media  $\pm$  SE.

55

La figura 2 muestra que la infusión crónica del compuesto 4 dio como resultado un FS derivado ecocardiográficamente mejorado en ratones con insuficiencia cardíaca CSQ. Tras la infusión subcutánea crónica de NS o de compuesto 4, se llevó a cabo una ecocardiografía con modo M dirigida bidimensional como se describió en Métodos. En cada figura se indica la frecuencia cardíaca (HR). La ecocardiografía con modo M representativa se mostró para un animal CSQ al que se le infundió disolución salina normal (NS) (A), y para un ratón CSQ al que se le infundió compuesto 4 (B). Un corazón procedente de los ratones a los que se les infundió NS mostró menos acortamiento tanto de la pared del tabique como de la pared libre del ventrículo izquierdo (LV) que el que mostraron los ratones a los que se les infundió el compuesto 4.

La figura 3 muestra cambios en calcio intracelular en células de astrocitoma humanas 1321N1 que expresan de forma estable el receptor hP2Y<sub>1</sub>. Se cuantificó la fluorescencia en respuesta a un agonista conocido del receptor hP2Y<sub>1</sub> 2-MeSADP (EC<sub>50</sub> 10,3 ± 0,4 nM), compuesto 3 (EC<sub>50</sub> 722 ± 55 nM), o los análogos de fosfonatos (compuestos 4-11, todos inactivos a 10 μM) usando un FLIPR-Tetra.

La figura 4 muestra que la infusión crónica del compuesto 11a provocó un acortamiento fraccionario contráctil del LV incrementado en el modelo de insuficiencia cardíaca que sobreexpresa calsecuestrina (CSQ). Tras 14 días de infusión del compuesto 11a (n = 6 ratones) o disolución salina normal (NS, n = 4) en ratones CSQ, el acortamiento fraccionario (FS) del LV se comparó entre los dos grupos. El tratamiento con el compuesto 11a dio como resultado una función contráctil del LV *in vivo* mejorada en animales con insuficiencia cardíaca. Los datos son la media y el error estándar.

La figura 5 muestra que la infusión crónica del compuesto 11a dio como resultado la conservación del grosor de la pared del LV en ratones con insuficiencia cardíaca que sobreexpresan CSQ. El engrosamiento de la pared cardíaca *in vivo* se evaluó mediante ecocardiografía tras 14 días de infusión de compuesto 11a o NS en ratones CSQ. a: En los animales a los que se les infundió el compuesto 11a, el grosor de la pared posterior del LV durante la sístole (LVPW@S) fue mayor ( $P < 0,05$ ) que aquel en ratones CSQ a los que se les infundió NS ( $P < 0,01$ ). b: Se obtuvieron datos similares cuando se comparó el grosor septal durante la sístole (IVS@S) entre ratones CSQ tratados con el compuesto 11a y los tratados con NS,  $P < MRS 0,01$ . c: El grosor de la pared posterior del LV durante la diástole también fue mayor en ratones CSQ a los que se les infundió el compuesto 11a que en ratones CSQ a los que se les infundió NS,  $P < 0,05$ . Los datos se expresan como media ± SEM. Los datos sugieren que el tratamiento con el compuesto 11a fue capaz de prevenir el adelgazamiento de la pared del LV en insuficiencia cardíaca.

Las características descritas anteriormente y otras características serán apreciadas y comprendidas por un experto en la materia a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones adjuntas.

#### Descripción detallada

Las enfermedades y afecciones cardíacas y vasculares sensibles a la activación de los receptores P2X cardíacos incluyen cardiomiopatía y aquellas enfermedades asociadas con defectos en la contractilidad cardíaca. Como agonistas de receptores P2X, los derivados de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP son particularmente útiles en el tratamiento de, por ejemplo, hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca que resulta de cualquier causa de homeostasis de Ca<sup>2+</sup> anormal o de lesiones miocárdicas, insuficiencia vascular que conduce a infarto de miocardio, para afecciones tras infarto de miocardio, para afecciones tras infarto de miocardio dentro del período tras el infarto a corto plazo, y para insuficiencia cardíaca diastólica. Los agonistas de receptores P2X se pueden usar como agentes cardioprotectores para incrementar las tasas de supervivencia en individuos que han tenido un suceso cardíaco tal como infarto de miocardio, o para prevenir sucesos cardíacos en pacientes con riesgo elevado. Los derivados de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP también son útiles en el tratamiento de insuficiencia cardíaca sistólica de cualquier etiología, cardiomiopatía isquémica, o cardiomiopatía no isquémica.

La hipertrofia y la insuficiencia cardíaca, por ejemplo, siguen siendo una afección médica con una “necesidad médica no satisfecha”. Se ha mostrado que las medicaciones disponibles son beneficiosas con una reducción solamente modesta de la tasa de mortalidad. Los agentes descritos en la presente memoria son una nueva clase de agentes orales que pueden prolongar la esperanza de vida en insuficiencia cardíaca. Pueden ser más eficaces que las medicaciones actualmente disponibles, dado el resultado beneficioso obtenido en el modelo de animal.

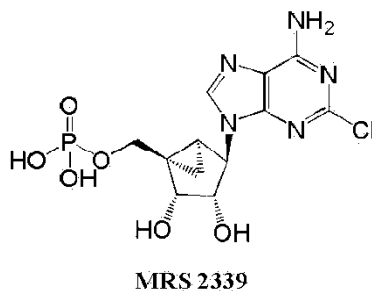
En una forma de realización, el derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP es un análogo de profármaco. Como se usa en la presente memoria, el término profármaco significa un compuesto que se administra en forma inactiva o menos activa, que se metaboliza *in vivo* a una forma más activa. Se pueden usar métodos consolidados para demostrar que los derivados de fosfonato o fosfinato y/o sus análogos son profármacos. Por ejemplo, el profármaco se puede inyectar en ratones, y la aparición del fármaco parental seguido de HPLC de muestras de suero tomadas en diferentes puntos de tiempo. Debido a que los receptores P2X son canales iónicos en la superficie celular que son estimulados por ligandos extracelulares, se seleccionó

un enfoque de profármaco que debería permitir la escisión del compuesto administrado antes de la internalización en una célula, pero no en el estómago o intestino.

5 En otro ejemplo, la regeneración del fármaco parental a partir del profármaco se puede seguir aplicando a sangre una disolución que contiene un profármaco sospechoso a una concentración de alrededor de 20  $\mu\text{M}$ . Durante la incubación, la mezcla sanguínea se puede mantener a 37°C, y las muestras se pueden retirar a 5 min., 0,5 h, 1 h, 2 h y 4 h. Tras retirarlas, las muestras se someten inmediatamente a hemólisis en tubos llenos previamente de agua enfriada con hielo, y se almacenan a -20°C hasta el análisis. Para el análisis, se añade a cada muestra un patrón interno que consiste en 100  $\mu\text{l}$  de una disolución 40  $\mu\text{M}$  en DMSO del derivado N6-(fluorenilmetílico) de adenosina y 100  $\mu\text{l}$  de una disolución al 10% de ácido sulfosalicílico. Tras someter suavemente a vórtice durante 5 min., las muestras se extraen tres veces, sucesivamente, con 0,5 ml de acetato de etilo saturado con agua. Cada extracción consiste en la adición de acetato de etilo, sometimiento a vórtice durante 5 min., centrifugación durante 5 min. a 2000 g, y separación manual del sobrenadante con una pipeta automática. Las fracciones del extracto se combinan y se evaporan hasta sequedad bajo una corriente de gas nitrógeno. El residuo se reconstituye entonces en 50  $\mu\text{l}$  de un sistema de fase móvil de HPLC. Se inyectan 40  $\mu\text{l}$  de esta disolución por cada experimento cromatográfico para proporcionar un perfil cinético para la conversión del profármaco en su nucleósido parental. La cromatografía se lleva a cabo, por ejemplo, a temperatura ambiente usando una columna de fase inversa (columna analítica Zorbax Eclipse 5  $\mu\text{m}$  XDB-C18, 250  $\times$  4,6 mm) equipada con una columna de guarda empaquetada con material C18. El caudal es 1,0 ml/min., y se usa la longitud de onda de detección de 280 nm. El curso de tiempo para la concentración relativa de cada derivado se calcula en base al porcentaje fraccionario de nucleósido total detectado, y se representa gráficamente.

En el contexto de la presente invención se ha explorado la relación estructura-actividad (SAR) de análogos de fosfonato del compuesto 3 en un modelo de cardioprotección.

25



Aunque se mostró que un (N)-metanocarba nucleósido 5'-monofosfato es un mal sustrato de 5'-nucleotidasa (CD73), la sustitución del grupo fosfoéster del compuesto 3 por un fosfonato podría incrementar adicionalmente la vida media *in vivo* debido a la estabilidad del enlace C-P. En algunos casos, se ha mostrado que los análogos de fosfonato de nucleótidos y otros ligandos conocidos presentan actividad en receptores P2. En una forma de realización, se ha encontrado que la sustitución de ésteres de monofosfatos por grupos fosforotioato de diversos ligandos proporciona resistencia a la hidrólisis catalizada por fosfatasas, sin reducir la afinidad de unión. En otra forma de realización, se ha mostrado que la introducción de deuterio en lugar de hidrógeno en localizaciones estratégicas en ligandos de receptores lábiles y otros fármacos incrementa el tiempo de vida biológico debido a un efecto isotópico, sin reducir la afinidad de unión.

Los 5'-fosfonato y 5'-metil fosfonatos de derivados de (N)-metanocarba adenina 4, 11 o 2-Cl adenina 5, 12 se sintetizaron usando el compuesto 13 previamente dado a conocer. Se pueden concebir al menos dos rutas sintéticas que conducen a estas moléculas diana, a saber, las rutas A y B (Esquema 7A) basadas en la instalación del grupo fosfonato. La ruta A implica la instalación del fosfonato al nivel nucleosídico para generar el intermedio clave 42, que se podría usar como intermedio común para la generación tanto de fosfonatos como de metil fosfonatos 43 usando condiciones de reacción de Michaelis-Arbuzov. Mientras tanto, la ruta B implica la instalación de fosfonato al nivel del azúcar en los intermedios halogenados 17 y 37 para proporcionar los intermedios 18 y 38. La ruta B no tiene un intermedio común, como la ruta A, y, como resultado, implica una secuencia sintética más prolongada y más laboriosa. En general, las condiciones de reacción de Michaelis-Arbuzov para generar derivados de fosfonatos requieren tiempos de reacción prolongados (24 a 48 horas) a temperaturas elevadas (120 a 180°C). Además, la eliminación del reactivo de fosfito de trialquilo necesita temperaturas elevadas y alto vacío. Debido a estas duras condiciones, una reacción de Michaelis-Arbuzov a nivel nucleosídico da generalmente como resultado rendimientos muy pobres (rendimiento menor que 25%) de los fosfonatos deseados, junto con la formación de un producto térmicamente degradado de color oscuro de los nucleósidos. Por otro lado, la reacción de Michaelis-Arbuzov a nivel del azúcar da generalmente como resultado rendimientos muy buenos. Por tanto, aunque la ruta B consume tiempo y contiene más etapas sintéticas que la ruta A, hemos decidido obtener estos derivados de fosfonatos vía la ruta B, creyendo que sería fiable con buenos rendimientos.

55

Los fosfonatos saturados e insaturados de cadena larga de derivados de (N)-metanocarba adenina o 2-Cl adenina 7-10 se podrían lograr a partir del mismo compuesto de partida 13 que para los fosfonatos 4, 5, 11 y 12. Similar a la síntesis de los fosfonatos 4, 5, 11 y 12, estos fosfonatos se podrían obtener posiblemente vía dos rutas sintéticas, a saber, la ruta C y D (Esquema 7B), basadas en la instalación del grupo fosfonato. El fosfonato insaturado de cadena larga se podría instalar mediante oxidación y 5'-alcohol del nucleósido 24 o del compuesto 15 seguido de la reacción de tipo Wittig usando metilendifosfonato de tetraisopropilo y NaH para proporcionar el diéster de fosfonato 26 o 30, respectivamente. Se podría esperar que esta reacción transcurriera de forma suave en las etapas tanto nucleosídica como del azúcar. Puesto que la ruta A tiene un intermedio común 26 para la síntesis de 5'-fosfonatos saturados e insaturados de cadena larga 7-10, hemos decidido explorar la síntesis de estos fosfonatos mediante la ruta sintética C más corta.

Hay cada vez más pruebas de que la activación crónica del receptor P2X cardíaco nativo por análogos nucleotídicos protege frente a la progresión de insuficiencia cardíaca. El receptor P2X<sub>4</sub> es una subunidad esencial de este receptor nativo, pero no sabemos qué otros subtipos de P2X están presentes. El receptor de miocitos cardíaco no es idéntico al receptor P2X<sub>4</sub> vascular, que tiene un papel clave en la respuesta de células endoteliales a cambios en el flujo sanguíneo.

El análogo nucleotídico sintético 3 activa el receptor P2X cardíaco nativo, como se indica en experimentos electrofisiológicos con miocitos cardíacos normales y aquellos que sobreexpresan CSQ y basados en su capacidad *in vivo* para mejorar el fenotipo de insuficiencia cardíaca de estos animales. El sistema anular carbocíclico rígido contenido en este derivado estabiliza los nucleótidos frente a la acción de las nucleotidasas. Por lo tanto, se espera que el compuesto 3 sea más estable que el ribósido correspondiente. En el presente estudio, hemos sintetizado derivados de monofosfatos de adenosina totalmente resistentes a la hidrólisis basándonos en enlaces de fosfonato. Se encontró que el enlace C-O-P del compuesto 3 es estable a lo largo de 24 horas en medio acuoso a pH 1,5 para simular la acidez del estómago; sin embargo, la incubación a 37°C en presencia de membranas celulares de mamífero (células de astrocitoma 1321N1) dio como resultado una hidrólisis considerable del 5'-fosfato de 3 (dato mostrado). Por lo tanto, se buscó una alternativa estructural más estable al enlace de 5'-fosfato.

Para ensayar los nuevos análogos, se usó un cribado *in vivo* de la función cardíaca. De este modo, los resultados de este estudio crónico reflejan probablemente tanto factores farmacodinámicos como farmacocinéticos. Varios de los nuevos análogos de fosfonatos presentaron la misma actividad agonista que el compuesto 3 en receptores P2X cardíacos nativos, es decir, protegieron al músculo cardíaco cuando se administraron crónicamente en el modelo de CSQ. El análisis de SAR mostró que la considerable cardioprotección estaba asociada con características estructurales específicas de los derivados de fosfonatos. La variación en la longitud de cadena y la saturación en el carbono 5' proporcionaron resultados consistentes en el cribado *in vivo*. Dos de los fosfonatos, 4 y 9, ambos homólogos saturados que contienen una sustitución 2-Cl, mejoraron el FS, mientras que los fosfonatos insaturados y los análogos 2-H fueron inactivos. El FS más favorable (20,25%, en comparación con 13,78% en los controles) se observó para (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-amino-2-cloropurin-9-il)-2',3'-(dihidroxil)-1'-(fosfonometileno)-bicyclo[3.1.0]hexano 4, que es el equivalente del compuesto 3 en el que se ha cortado el 5'-O. El homólogo superior 9 presentó un FS de 19,26%. De este modo, es posible extender el SAR alrededor del compuesto 3, para la activación crónica del receptor P2X cardíaco que conduce a un efecto beneficioso en insuficiencia cardíaca.

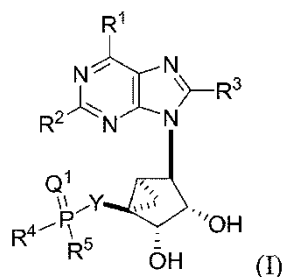
Además, el 5'-fosfato 3 y el profármaco 9a (MRS2944) son estables en condiciones ácidas representativas del ácido del estómago (pH 1,5). Sin embargo, la incubación de 5'-fosfato 3 o del fosfonato diéster 9a a 37°C en presencia de membranas celulares de mamíferos (células de astrocitoma 1321N1) dio como resultado una hidrólisis considerable (dato mostrado). Esto indica que la escisión deseable de un profármaco de fosfonato diéster tal como 9a es factible en presencia de tejido, mientras que los fármacos de fosfato, tal como 3, pueden ser el objeto de escisión prematura *in vivo*. Sin estar atados por la teoría, se cree que el enfoque de profármaco permitirá al fármaco enmascarado pasar a través del estómago para ser absorbido intacto en los intestinos, y, para el grupo fosforilo cargado, permanecer intacto hasta que el fármaco libre alcance el sitio de acción en el corazón. Por lo tanto, los fosfonatos estables serían adecuados en este esquema. La escisión de los derivados de profármaco ocurrirá en la circulación antes de alcanzar el sitio de acción tisular, debido a que la internalización intracelular sería indeseable. Por lo tanto, muchos de los esquemas de profármaco que buscan la penetración del fármaco enmascarado en las células, es decir, para aplicación antiviral o contra el cáncer de derivados nucleotídicos, probablemente no serían adecuados en la presente memoria.

No es factible estudiar los análogos en un sistema de receptor P2X<sub>4</sub> homotrimérico recombinante, debido a que se piensa que el receptor P2X cardíaco endógeno está compuesto de subunidades del receptor P2X<sub>4</sub> en asociación heteromérica con un subtipo de P2X todavía sin identificar. Se sabe que el receptor P2X<sub>4</sub> se asocia con otros subtipos de receptores P2X, y estos heterotrímeros son farmacológicamente distintos de los heterotrímeros de P2X<sub>4</sub>.

Otro sitio de acción de los nucleótidos de adenina en tejido cardíaco es el receptor P2Y<sub>1</sub> metabotrópico, que causa relajación del músculo liso vascular dependiente de óxido nítrico. Por lo tanto, ensayamos los nucleótidos

5 como agonistas del receptor P2Y<sub>1</sub> para explicar la posibilidad de que los efectos cardiovasculares observados de los derivados de fosfonatos fueran un resultado de la activación de un receptor P2Y<sub>1</sub> endotelial. El compuesto 3 se caracterizó inicialmente en ensayos de PLC como un agonista débil del receptor hP2Y<sub>1</sub> (EC<sub>50</sub> 1,89 μM), y esa conclusión es consistente con la potencia observada en la presente memoria al inducir calcio pasajero en la misma estirpe celular. Todos los derivados de fosfonatos ensayados fueron inactivos en el receptor P2Y<sub>1</sub>. Esto sugiere el uso de estos compuestos como sondas farmacológicas más selectivas del receptor P2X cardíaco endógeno que el compuesto 3. Sin embargo, merece la pena señalar que se mostró que la cardioprotección proporcionada por el compuesto 3 es independiente del receptor P2Y<sub>1</sub> por su incapacidad para dilatar anillos aórticos y por el uso de un antagonista selectivo de P2Y<sub>1</sub> MRS2500. Este agonista no podría bloquear la corriente de membrana provocada por 3 bajo pinzamiento de voltaje en miocitos cardíacos de ratón.

10 Se describen en la presente memoria nuevos derivados de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP. Los derivados de N-metanocarba adecuados de AMP se dan en la Fórmula (I) a continuación:



15 un isómero enriquecido en deuterio de los mismos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en los que

20 Q<sup>1</sup> es O o S;

R<sup>1</sup> es hidrógeno o N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>;

25 R<sup>2</sup> es hidrógeno, alquilo de C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> o halógeno;

R<sup>3</sup> es hidrógeno;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se escogen independientemente de hidroxilo o alcoxi de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

30 o, como alternativa, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> forman una estructura cíclica de 5 o 6 miembros con el átomo de fósforo, en la que la estructura cíclica contiene al menos dos átomos de oxígeno y al menos 2 o 3 átomos de carbono;

R<sup>6</sup> se escoge independientemente de hidrógeno o alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; e

35 Y es un grupo enlazante enlazado al átomo de fósforo mediante un átomo de carbono, escogido de alquileno de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquenileno de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

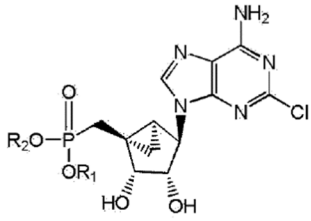
40 El grupo enlazante Y es alquileno de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquenileno de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. En una forma de realización, Y es -CH<sub>2</sub>-. En otra forma de realización, Y es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En todavía otra forma de realización, Y es -CH=CH-.

En otra forma de realización en la que el derivado de N-metanocarba de AMP es según la Fórmula (I), Q<sup>1</sup> es O; R<sup>1</sup> es N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, en el que cada R<sup>6</sup> es hidrógeno; R<sup>2</sup> es halógeno; R<sup>3</sup> es hidrógeno; R<sup>4</sup> es hidroxilo o alcoxi opcionalmente sustituido; R<sup>5</sup> es hidroxilo o alcoxi opcionalmente sustituido; e Y es un alquileno de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

45 Las formas de realización específicas de derivados de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP incluyen:

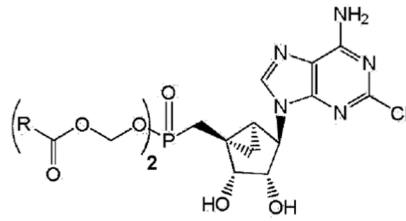
# ES 2 654 363 T3

Profármacos de ésteres alquílicos o arílicos



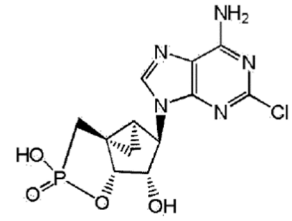
$R_1 = R_2 =$  cualesquiera grupos alquílicos o arílicos

Ésteres acioxialquílicos



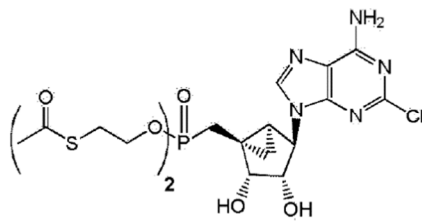
$R =$  cualesquiera grupos alquílicos o arílicos

Profármacos cíclicos

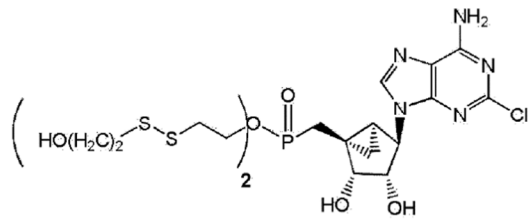


$R_1 =$  cualquier grupo alquílico o arílico;  $R_2 = H$

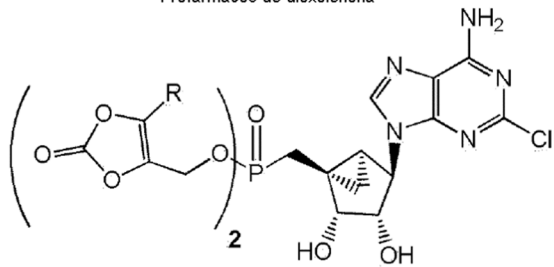
SATE ésteres de (S-acetilietanol)



DTE ésteres de (ditioetanol)

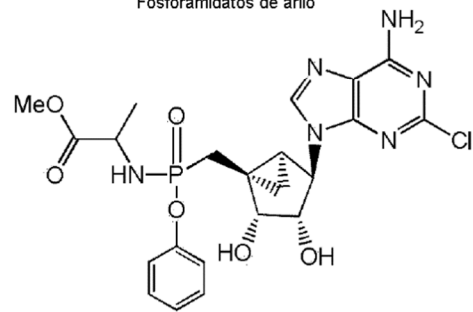


Profármacos de dioxolenona



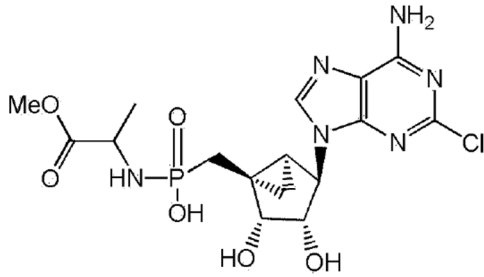
$R =$  alquilo o arilo

Fosforamidatos de arilo

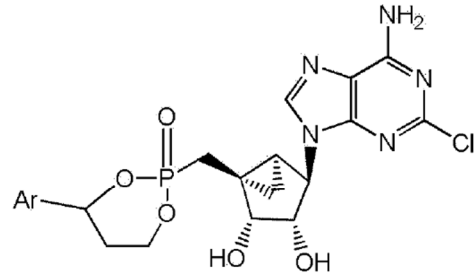




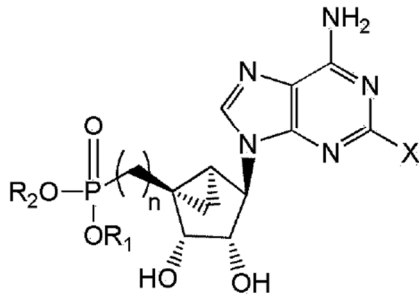
Monoésteres de fosforamidato



Éster de 1-aril-1,3-propanilo cíclico



Profármacos de ésteres alquílicos o arílicos<sup>1-3</sup>

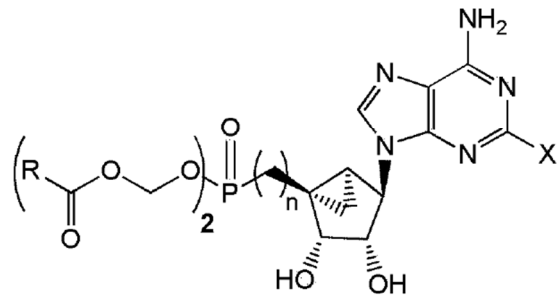


$n = 1$  o  $2$ ;  $X =$  cualquier halógeno

$R_1 = R_2 =$  cualesquiera grupos alquílicos o arílicos

$R_1 =$  cualquier grupo alquílico o arílico;  $R_2 = H$

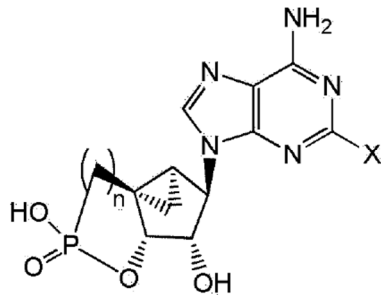
Ésteres aciloxialquílicos<sup>4,5</sup>



$n = 1$  o  $2$ ;  $X =$  cualquier halógeno

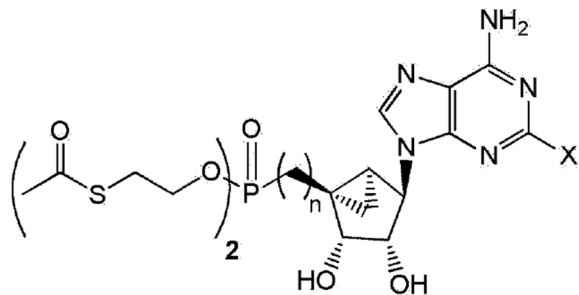
$R =$  cualesquiera grupos alquílicos o arílicos

Profármacos cíclicos<sup>6</sup>



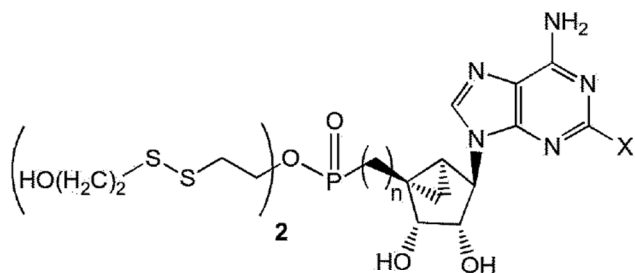
$n = 1$  o  $2$ ;  $X =$  cualquier halógeno

SATE ésteres de (S-acetilietanol)<sup>7,8</sup>



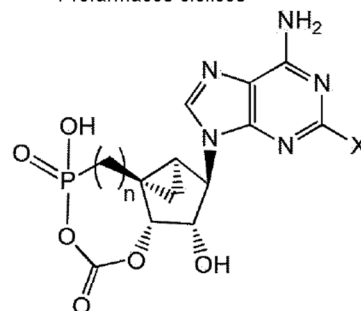
$n = 1$  o  $2$ ;  $X =$  cualquier halógeno

DTE ésteres de (ditioetanol)<sup>8</sup>



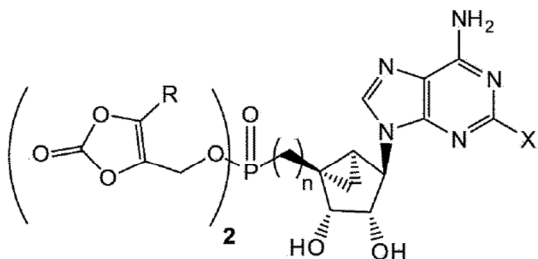
$n = 1$  o  $2$ ; X = cualquier halógeno

Profármacos cíclicos



$n = 1$  o  $2$ ; X = cualquier halógeno

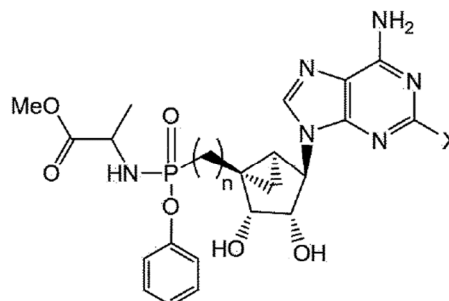
Profármacos de dioxolenona<sup>9</sup>



$n = 1$  o  $2$ ; X = cualquier halógeno

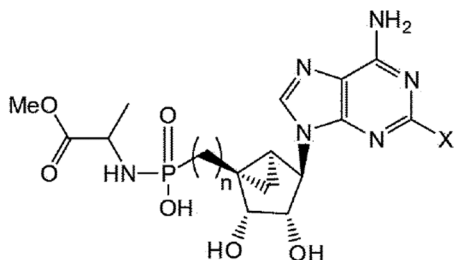
R = alquilo o arilo

Fosforamidatos de arilo<sup>10</sup>



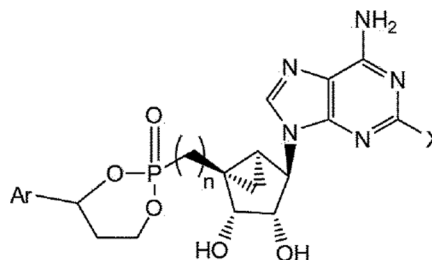
$n = 1$  o  $2$ ; X = cualquier halógeno

Monoésteres de fosforamidato<sup>11</sup>



$n = 1$  o  $2$ ; X = cualquier halógeno

Éster de 1-aril-1,3-propanilo cíclico<sup>12</sup>

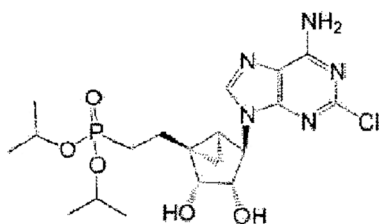


$n = 1$  o  $2$ ; X = cualquier halógeno

Sin estar atados por la teoría, se cree que la separación del fósforo con respecto al anillo de metanocarba es importante para la actividad *in vivo*. Entre los derivados de fosfonatos ensayados, solamente el espaciador más largo de 2 carbonos en 11a dio como resultado una cardioprotección eficaz mediante derivados de éster de profármaco, incluso aunque los precursores o nucleótidos desbloqueados, es decir, 4 y su homólogo superior 9, fueron activos en ambos casos. De este modo, tanto el diéster enmascarado 11a y su precursor cargado 9 fueron claramente protectores *in vivo*. Esto sugiere que el desbloqueo enzimático de los ésteres *in vivo* dependió del acceso estérico no impedido al grupo fosfonilo.

5

10



11a MRS2978

Los derivados de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP tienen afinidad por receptores P2X, incluyendo receptores P2X cardíacos y vasculares. La afinidad por el receptor P2X se puede determinar mediante la respuesta a la dosis de incrementos en la contractilidad para los diferentes compuestos. Los cambios en la contractilidad se pueden medir como cambios en la longitud del sarcómero y  $\text{Ca}^{2+}$  transitorios registrados a partir de miocitos aislados individuales usando un microscopio invertido de epifluorescencia.

En una forma de realización, los derivados de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP son útiles en el tratamiento de enfermedades cardíacas sensibles a la activación del receptor P2X cardíaco, tales como, por ejemplo, hipertrofia cardíaca y/o insuficiencia cardíaca que resulta de la homeostasis anormal de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En una forma de realización, los compuestos descritos en la presente memoria se usan en el tratamiento de enfermedades cardíacas sensibles a la activación del receptor P2X cardíaco, tales como cardiomiopatía. Las enfermedades cardíacas sensibles a la activación de receptores P2X cardíacos incluyen, por ejemplo, hipertrofia cardíaca y/o insuficiencia cardíaca que resulta de homeostasis anormal de  $\text{Ca}^{2+}$ . La hipertrofia cardíaca es un engrosamiento del músculo cardíaco (miocardio), que da como resultado una disminución en el tamaño de la cámara del corazón, incluyendo los ventrículos izquierdo y derecho. Se sabe que las alteraciones en el manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  están asociadas con hipertrofia cardíaca. La insuficiencia cardíaca es la insuficiencia del corazón para mantener un gasto cardíaco suficiente para satisfacer las demandas metabólicas del cuerpo. La insuficiencia cardíaca puede resultar de cualquier trastorno cardíaco estructural o funcional que altera la capacidad del corazón para llenarse con o bombear una cantidad suficiente de sangre por todo el cuerpo. Los componentes descritos en la presente memoria son particularmente útiles en el tratamiento de insuficiencia cardíaca que resulta de homeostasis anormal de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los compuestos descritos en la presente memoria son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades cardíacas sensibles a la activación del receptor P2X cardíaco asociado con defectos en la contractilidad cardíaca. Tales enfermedades incluyen infarto de miocardio. Como se usa en la presente memoria, infarto de miocardio, conocido normalmente como ataque al corazón, es un estado mórbido que ocurre cuando se interrumpe el suministro de sangre a una parte del corazón. La isquemia resultante o falta de oxígeno causa daño y muerte potencial del tejido del corazón. En una forma de realización, el tratamiento se realiza dentro del período tras el infarto a corto plazo. Como se usa en la presente memoria, el período tras el infarto a corto plazo es dentro de 48 horas del infarto de miocardio. La ventaja de tratar en el período tras el infarto a corto plazo es bloquear el estímulo para la hipertrofia cardíaca y el remodelado adverso en cualquier etapa temprana de la progresión de la insuficiencia cardíaca tras el infarto de miocardio.

En una forma de realización relacionada, los compuestos tienen afinidad por receptores P2X vasculares y se pueden usar para tratar afecciones asociadas con receptores P2X vasculares. Sin estar atados por la teoría, se cree que los receptores P2X vasculares producen óxido nítrico, que se puede difundir a los miocitos y mejorar la función de los miocitos. De este modo, mediante la unión a receptores P2X vasculares tales como receptores endoteliales, los derivados de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP se pueden usar para tratar afecciones sensibles a un incremento en óxido nítrico. Se incluyen en la presente memoria de este modo la composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP como se define anteriormente para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección cardíaca o vascular sensible a la activación del receptor P2X cardíaco y/o vascular en un sujeto mamífero que lo necesite.

Adicionalmente, los compuestos descritos en la presente memoria son útiles para mejorar la función cardíaca al incrementar la contractilidad del músculo cardíaco y/o al incrementar la relajación diastólica del músculo cardíaco. De este modo, se incluyen en la presente memoria la composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP como se define anteriormente para su uso en la mejora del comportamiento contráctil cardíaco o función cardíaca en un mamífero que lo necesite. En una forma de realización, el mamífero ha tenido o se sospecha que tiene un infarto de miocardio. En otra forma de realización, la administración se lleva a cabo dentro del período tras el infarto a corto plazo.

Los compuestos descritos en la presente memoria también son útiles para mejorar la función cardíaca administrándolos a un mamífero que necesite de tal tratamiento. Como se usa en la presente memoria, mejorar la función cardíaca puede incluir, por ejemplo, mejorar la capacidad del corazón para relajarse, proporcionar un remodelado favorable en un sujeto con insuficiencia cardíaca, disminuir la fibrosis, disminuir la hipertrofia de

miocitos cardíacos, y/o mejorar el manejo del calcio en miocitos en un sujeto con insuficiencia cardíaca.

Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden usar para tratar insuficiencia cardíaca sistólica o diastólica. La "sístole" ocurre cuando el corazón se contrae, y la "diástole" es la fase de relajación del corazón. El incremento en  $-dP/dt$  o fase de relajación del músculo cardíaco en animales transgénicos que sobreexpresan el receptor  $P2X_4$  sugiere que la activación del receptor  $P2X$  cardíaco se puede usar para tratar insuficiencia cardíaca diastólica. Al igual que la sobreexpresión del receptor  $P2X_4$ , el tratamiento con los derivados de N-metanocarba de AMP se puede emplear para individuos que necesiten tratamiento para insuficiencia cardíaca diastólica. La insuficiencia cardíaca diastólica está causada cuando el corazón no se relaja completamente, con lo que no se llena apropiadamente con sangre. Al incrementar la tasa de relajación del músculo cardíaco, los derivados de N-metanocarba de AMP mejorarán la función cardíaca en individuos con insuficiencia cardíaca diastólica. La insuficiencia cardíaca sistólica se denomina algunas veces como insuficiencia ventricular izquierda, y resulta de un defecto o anomalía en la función sistólica, es decir, en la contracción, durante la expulsión de sangre al resto del cuerpo. Como resultado, la cantidad de sangre bombeada al cuerpo y a los pulmones se reduce, y el ventrículo se agranda habitualmente.

En otra forma de realización, los compuestos descritos en la presente memoria se usan para tratar el remodelado adverso y la lesión tras isquemia/lesión por reperfusión. En una forma de realización, tratar individuos que necesitan tratamiento para isquemia y lesión por reperfusión. La isquemia es una deficiencia de oxígeno en una parte del cuerpo que causa cambios metabólicos, habitualmente temporales, que puede ser debida a una constricción o una obstrucción en el vaso sanguíneo que suministra a esa parte. La reperfusión es la restauración del flujo sanguíneo a un órgano o tejido. La isquemia y la reperfusión del músculo cardíaco pueden causar lesión significativa con consecuencias nocivas. Las terapias eficaces que reduzcan tal lesión tendrán beneficios significativos en el tratamiento de infarto de miocardio y lesión por reperfusión.

Se incluyen en la presente memoria de este modo la composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP como se define anteriormente para su uso en el tratamiento de una hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca sistólica, insuficiencia cardíaca diastólica, cardiomiopatía isquémica, cardiomiopatía no isquémica, o remodelado cardíaco adverso tras lesión al corazón como resultado de isquemia/reperfusión o causas no isquémicas en un sujeto mamífero que lo necesite.

Los derivados de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP de la presente invención se usan para tratar un mamífero tal como un ser humano.

En una forma de realización, el derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP se coadministra con un agente adicional tal como, por ejemplo, un bloqueador del receptor beta-adrenérgico, un bloqueador del receptor de angiotensina o un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina o un bloqueador del receptor de aldosterona.

En una forma de realización, se incluye en la presente memoria una composición que comprende un derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP como se define anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Para la administración oral, la preparación farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo disoluciones, jarabes o suspensiones, o se puede presentar como un producto farmacéutico para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o de propilo, o ácido sórbico). Las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Las preparaciones para administración oral se pueden formular de forma adecuada para dar una liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o tabletas formuladas de manera convencional.

Para la administración mediante inhalación, las composiciones se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol a partir de envases a presión o un nebulizador, con el uso de un

propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las composiciones se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo mediante inyección de bolo o infusión continua vía inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo en ampollas, o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

Las composiciones se pueden formular en cremas, lociones, ungüentos o tinturas, por ejemplo, que contienen bases convencionales, tales como hidrocarburos, vaselina, lanolina, ceras, glicerina, o alcohol. Las composiciones también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, las composiciones también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implante (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados apenas solubles, por ejemplo como una sal apenas soluble. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos o portadores de suministro para fármacos hidrófilos.

Si se desea, las composiciones se pueden presentar en un envase o dispositivo dispensador, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una hoja metálica o de plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

La cantidad de derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP que se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del hospedante tratado y del modo particular de administración. La cantidad terapéuticamente eficaz específica para un paciente particular dependerá de una variedad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, la combinación farmacéutica, y la gravedad de la enfermedad particular sometida a terapia. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores sin provocar efectos secundarios dañinos, con la condición de que tales niveles de dosis mayores se dividan en primer lugar en varias dosis pequeñas para la administración a lo largo del día. Las concentraciones de los compuestos descritos en la presente memoria encontradas en las composiciones terapéuticas variarán dependiendo de un número de factores, incluyendo la dosis del fármaco a administrar, las características químicas (por ejemplo, hidrofobia) de los compuestos empleados, y la vía de administración. En términos generales, los derivados de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP se pueden proporcionar en una disolución amortiguadora fisiológica acuosa (por ejemplo, 1 cc) que contiene alrededor de 0,2% p/v de compuesto para administración oral. Los intervalos de dosis típicos son alrededor de 285 µg/kg de peso corporal por día en tres dosis divididas; un intervalo de dosis preferido es de alrededor de 42 µg/kg a alrededor de 171 µg/kg de peso corporal por día. La dosificación preferida de fármaco que se debe administrar depende probablemente de variables tales como el tipo y grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, y la formulación del compuesto excipiente, y su vía de administración, así como otros factores, incluyendo la biodisponibilidad, que está influida a su vez por varios factores. Por ejemplo, si el compuesto se metaboliza en el hígado o se excreta en la bilis, parte del compuesto activo absorbido del tubo digestivo se inactivará por el hígado antes de que pueda alcanzar la circulación general y sea distribuido a sus sitios de acción. No se cree que los derivados de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP estarán sometidos a esta pérdida de primera pasada. Adicionalmente, debido a que estos compuestos son polares y solubles en agua, se espera que tendrán un pequeño volumen de distribución, y de este modo se eliminarán fácilmente por el riñón. Además, la unión de los presentes compuestos a proteínas plasmáticas puede limitar sus concentraciones libres en tejidos y en su lugar de acción, puesto que solamente es el fármaco no unido cuyos equilibrios atraviesa los sitios de receptores de membrana. Se anticipa que el resto de fosfato de los presentes compuestos puede facilitar la unión de los compuestos a albúminas plasmáticas, que a su vez influirán en la cantidad de compuesto libre disponible para activar receptores purinéricos P2 de las células musculares. Sin embargo, se espera que tal unión a proteína

plasmática no limitará generalmente la secreción tubular renal de la biotransformación, puesto que estos procesos reducen la concentración de fármaco libre y esto es seguido rápidamente de la asociación de este complejo de fármaco-proteína. Otro factor que afecta a la biodisponibilidad es la distribución de los compuestos a los tejidos. Dado el tamaño relativamente pequeño de los compuestos y su solubilidad en agua, se anticipa que los compuestos tendrán una segunda fase relativamente rápida de distribución del fármaco. Esta distribución se determina tanto por el flujo sanguíneo al tejido particular del órgano, tal como el corazón, así como por la velocidad a la que los compuestos se difunden en el compartimento intersticial desde la circulación general a través del endotelio capilar altamente permeable (excepto en el cerebro). Debido a la hidrofilia relativa de estos compuestos, se anticipa que no habrá grasa u otro reservorio tisular significativo de los compuestos, que daría cuenta de una tercera fase de distribución-acumulación.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 – Síntesis química

Los derivados de fosfonato en esqueletos de carbono variables (Tabla 1) se sintetizaron mediante los métodos mostrados en los Esquemas 1-6. En algunos casos, el átomo de fósforo se enlazó directamente al átomo de carbono de 5' (Esquemas 1, 2), mientras que en otros casos, se añadió un átomo de carbono en esa posición para formar un análogo nucleotídico saturado o insaturado (Esquemas 3-5). Como alternativa, en los compuestos 11 y 12 se incluyó un grupo metilfosfonato, compuestos los cuales fueron de otro modo equivalentes a 4 y 5, respectivamente (Esquema 6). La posición 2 contenía un hidrógeno (en los compuestos 5, 8, 10, 12) o Cl (como en el compuesto activo 3 conocido y los nuevos análogos 4, 7, 9, 11). El compuesto 3 de referencia se sintetizó mediante una modificación del método dado a conocer, que condujo a rendimientos mejorados.

El alcohol 13 conocido se protegió como un *O-terc*-butildimetilsilil éter usando TBDPS-Cl, imidazol y DMAP para obtener el compuesto 14, seguido de la reducción del éster etílico usando DIBAL-H en THF anhidro dando como resultado el compuesto 15 con un rendimiento muy bueno (Esquema 1). A fin de introducir un grupo yodo en la posición 5', se implementó un procedimiento clásico de dos etapas. Éste implicó la activación inicial del 5'-alcohol como un mesilato, seguido de un ataque nucleófilo  $S_N2$  del yoduro en la posición 5' activada, dando como resultado el 5'-yodocompuesto 17 con un rendimiento de 95%. El yodocompuesto 17 se sometió a condiciones de reacción clásica de Michaelis-Arbuzov con exceso de fosfito de trietilo y calentamiento hasta 110°C durante 17 h para proporcionar el diéster de fosfonato 18 con un rendimiento excelente del 94% (Esquema 1). La desililación usando TBAF dio como resultado el alcohol 19, que fue un sustrato adecuado para reacciones de acoplamiento de bases de Mitsunobu.

El alcohol 19 se usó como un intermedio clave común para sintetizar fosfonatos 4 y 5 (Esquema 2). Los procedimientos sintéticos para fosfonatos 4 y 5 implicaron una reacción de acoplamiento de una base de Mitsunobu inicial usando trifenilfosfina, azodicarboxilato de diisopropilo, y la base purínica correspondiente, seguido de la aminación en la posición 6 del anillo purínico usando  $NH_3$  2M en isopropanol (Esquema 2). Finalmente, la desprotección simultánea tanto del diéster de fosfonato como del acetónido de 21 y 23 se logró con el tratamiento con yodotrimetilsilano recientemente abierto, para obtener los fosfonatos diana 4 y 5, respectivamente (Esquema 2). Los esfuerzos por usar reactivos relativamente más suaves alternativos, bromotrimetilsilano y la resina de intercambio iónico Dowex-50, dieron como resultado una desprotección parcial (resultados no mostrados).

En los Esquemas 3-5 se muestran las rutas sintéticas hasta los derivados de fosfonatos saturados e insaturados alargados 7-10. El fosfonato saturado 10 se sintetizó mediante oxidación del alcohol 24 conocido hasta el 5'-aldehído 25 con un rendimiento de 80%. Es digno de destacar que no se observó ni siquiera una pequeña cantidad de descomposición del aldehído tras el almacenamiento a temperatura ambiente (rt) durante varios días. El éster de alquilfosfonato  $\alpha,\beta$ -insaturado 26 se preparó a partir del aldehído 25 en una reacción de tipo Wittig usando metilendifosfonato de tetrakisopropilo e hidruro sódico en THF anhidro. Se pudo inferir la configuración *E* del alqueno resultante a partir de la gran constante de acoplamiento ( $^3J = 17,1$  Hz). La aminación, seguida de la hidrólisis del diéster de fosfonato y acetónido, dio como resultado el alquilfosfonato  $\alpha,\beta$ -insaturado 27 (Esquema 3).

La hidrogenación catalítica de 27 en presencia de  $H_2$  (3 bares), paladio sobre carbón y MeOH:NaOH ac. 2M (1:1, v/v) dio como resultado la reducción esperada de la olefina y la descloración para dar el diéster de fosfonato saturado correspondiente 28. El compuesto 28 se convirtió en el alquilfosfonato saturado de cadena larga 10 usando las condiciones de reacción de desprotección con yodotrimetilsilano descritas previamente. Para nuestra sorpresa, los diversos esfuerzos para sintetizar 36 (Esquema 5) a partir de 27 mediante reducción de olefina, realizando la reacción a presión atmosférica y usando menor porcentaje en peso de catalizador, dieron como resultado una reacción incompleta o generaron una mezcla inseparable de productos deshalogenados y halogenados (resultados no mostrados).

Por tanto, a fin de sintetizar los fosfonatos 8 y 9, decidimos instalar el diéster de fosfonato antes de la reacción de acoplamiento de la base de Mitsunobu, como se describe en los Esquemas 4 y 5. El 5'-alcohol del compuesto 15 se oxidó usando la reacción de peryodinano de Dess-Martin para obtener el aldehído 29. Similar al aldehído 25, el aldehído 29 también presentó una estabilidad considerable a rt. El diéster de alquilfosfonato  $\alpha,\beta$ -insaturado 30 se obtuvo usando las condiciones de reacción de tipo Wittig descritas previamente. La desililación en condiciones estándar dio como resultado la formación del alcohol 31, que sirvió como el intermedio clave para la síntesis de alquilfosfonatos insaturados y saturados de cadena larga 8 y 9, respectivamente.

Una reacción de acoplamiento de base de Mitsunobu en el compuesto 31 usando trifenilfosfina, 6-cloropurina, y azodicarboxilato de diisopropilo, seguido de la aminación e hidrólisis del diéster de fosfonato y acetónido, dio como resultado la formación de alquilfosfonato  $\alpha,\beta$ -insaturado de cadena larga 8. La hidrogenación catalítica secuencial del diéster de vinilfosfonato resultante 31 en presencia de paladio sobre carbón, una reacción de acoplamiento de base de Mitsunobu, y la aminación, proporcionaron el diéster de fosfonato saturado de cadena larga 36. La desprotección simultánea del diéster de fosfonato y el acetónido usando yodotrimetilsilano dio como resultado el fosfonato deseado 9 junto con la formación de producto deshalogenado correspondiente para producir el fosfonato 10.

En el Esquema 6 se muestra el enfoque sintético a los metilfosfonatos 11 y 12. Implicó la 5'-bromación inicial usando  $\text{CBr}_4$  y tratamiento con trifenilfosfina y trietilamina para dar como resultado el 5'-bromoazúcar 37 con un rendimiento de 81%. Una reacción de Michaelis-Arbusov subsiguiente usando fosfito de metilo y dietilo, seguido de la desililación con TBAF, dio el monoéster de 5'-metilfosfonato 38 con 1-alcohol 39 como una mezcla inseparable de diastereómeros. Una reacción posterior de acoplamiento de base de Mitsunobu con 1,6-dicloropurina, seguido de la aminación y desprotección final, dio el metilfosfonato deseado 11 junto con el metilfosfonato deshalogenado correspondiente 12.

### Ejemplo 3- Evaluación biológica

Se infundieron subcutáneamente de forma individual diversos derivados de fosfonato vía una minibomba Alzet en ratones CSQ. Después de 28 días de infusión, se evaluó la función cardíaca *in vivo* usando acortamiento fraccionario (FS) derivado de ecocardiografía, que es la relación del cambio en el diámetro del ventrículo izquierdo entre los estados contraído y relajado. De este modo, un menor porcentaje representa una disminución en la función. Dos de los fosfonatos, 4 y 9, fueron capaces de causar un FS mejorado en comparación con el vehículo (figura 1, Tabla 1) y en comparación con el nucleótido de referencia 3. Otros análogos ensayados en este modelo (los análogos 2-H 5, 8, y 10, y los análogos 2-Cl 7 y 11) tuvieron menores valores de FS. Los compuestos 7, 8, y 10 no fueron protectores a esta dosis, es decir, el FS en los ratones CSQ tratados con el control de vehículo fue similar al de los ratones tratados crónicamente con estos nucleótidos. De este modo, en la serie de fosfonatos saturados, la orientación del fósforo con respecto al anillo de metanocarba fue en cierto modo estructuralmente permisiva, aunque la inclusión de una olefina en el espaciador evitó la acción cardioprotectora. En 11, un grupo OH del fosfonato se ha sustituido por  $\text{CH}_3$ . Esto reduce la carga global en la molécula, y está destinado a hacerla más biodisponible. Evidentemente, el sitio de unión del receptor requiere ambos oxígenos para la mejora más favorable en FS. Por lo tanto, como se resume en la figura 1, la mejora más significativa en FS estaba asociada con los homólogos saturados que contienen una sustitución 2-Cl y un grupo fosfonato no modificado, 4 y 9.

En la figura 2 se muestra una imagen ecocardiográfica de corazones CSQ a los que se les infunde compuesto 4 frente a disolución salina normal (NS). Fue evidente un mayor acortamiento tanto del tabique como de la pared libre ventricular izquierda (LV) en el corazón de ratones tratados con 4 en comparación con el de los ratones a los que se les infunde vehículo (NS).

También se investigó la capacidad de los análogos nucleotídicos para activar el receptor  $\text{P2Y}_1$  humano (Tabla 1). Este receptor es vasodilatador, y sería de esperar que la acción agonista de este subtipo fuese relevante para los efectos cardíacos observados. Se dio a conocer previamente que el compuesto 3 activa fosfolipasa C (PLC) mediado por el receptor  $\text{P2Y}_1$  humano. Los derivados de fosfonatos se ensayaron en un ensayo FLIPR de flujo de calcio inducido en células de astrocitoma 1321N1 que expresan de forma estable el receptor  $\text{P2Y}_1$  humano. El agonista conocido del receptor  $\text{P2Y}_1$  2-MeSADP indujo un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  con una  $\text{EC}_{50}$  de  $10,3 \pm 0,4$  nM ( $n = 3$ ) en las células transfectadas (figura 3), pero en las células de astrocitoma 1321N1 de control no hubo ningún cambio en  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en respuesta a 2-MeSADP  $10 \mu\text{M}$ . En el mismo ensayo, los análogos de fosfonatos 4-11 no produjeron ningún efecto a las concentraciones hasta  $10 \mu\text{M}$ . Sin embargo, el compuesto 3 fue activo en este ensayo como un agonista, con una  $\text{EC}_{50}$  de  $722 \pm 55$  nM ( $n = 3$ ). El efecto máximo de 3 fue alrededor de 80% del agonista total 2-MeSADP.

En conclusión, se ha expandido el intervalo de análogos nucleotídicos carbocíclicos que representan candidatos potenciales para el tratamiento de insuficiencia cardíaca. Se ha introducido un enlace química y biológicamente más estable que el grupo fosfato en el compuesto 3 en forma de grupos fosfonato, que en varios casos preserva la función contráctil cardíaca en un modelo genético de insuficiencia cardíaca. Se desarrollaron rutas fáciles para la síntesis de análogos de fosfonatos del compuesto 3 en la serie de (N)-metanocarba conformacionalmente

restringida, usando reacciones de Michaelis-Arbuzov y Wittig. Una ventaja adicional del enlace de fosfonato es que se ha eliminado la actividad indeseada como agonista del receptor P2Y<sub>1</sub>. Ahora se pueden explorar los efectos beneficiosos de estos agonistas resistentes a nucleotidasas en modelos adicionales de insuficiencia cardíaca y cardiomiopatía.

### Ejemplo 3 – Síntesis química adicional

Los nuevos derivados cargados de 5'-fosfonato (7a, Tabla 2a) y 5'-éster (9a-17a, Tabla 2) en la serie de (N)-metanocarba se sintetizaron mediante los métodos mostrados en los Esquemas 3a-4a. El compuesto 7a se preparó como el equivalente 2-yodo de 4 (Esquema 3a). Los derivados enmascarados con éster correspondientes (9a-17a), incluyendo los derivados de profármaco de los compuestos de referencia 3, 4, y 7, se prepararon a partir de intermedios o como se muestra en los Esquemas 3a-4a. La mayoría de los ésteres consistió en ésteres dietílicos, pero se incluyó un éster diisopropílico 11a. En algunos casos, el átomo de fósforo de un fosfonato se enlazó directamente al átomo de carbono en 5', por ejemplo en el 2-yododerivado 16a, mientras que en otros casos, se añadió un átomo de carbono en esa posición para formar un análogo de fosfonato saturado extendido, por ejemplo en el derivado de éster dietílico 10a. El compuesto 17a se preparó como el equivalente 2-etinílico de 9a.

Los procedimientos sintéticos para diversos fosfonatos de adenina (7a, 32a) y ésteres dietílicos de fosfonato (9a, 16a, 17a) sustituidos en la posición 2 comenzaron con la instalación de la nucleobase en un azúcar previamente descrito 27a mediante una reacción de acoplamiento de base de Mitsunobu usando PPh<sub>3</sub>, azodicarboxilato de diisopropilo, y 6-cloro-2-yodopurina para generar el nucleótido de 6-cloro-2-yodopurina 28a. A continuación, la aminación en la posición C6 del compuesto 28a usando NH<sub>3</sub> 2M en isopropanol (Esquema 3a) produjo el nucleótido 29a. Finalmente, la desprotección simultánea tanto del diéster de fosfonato como del acetónido de 29a se logró con el tratamiento con yodotrimetilsilano recientemente abierto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para obtener el fosfonato diana 7a con un rendimiento de 49%. Como alternativa, el tratamiento de los 2-cloro (30a) y 2-yodo (29a) nucleótidos con la resina de intercambio iónico Dowex-50 dio como resultado una desprotección quimioselectiva del acetónido, y dio como resultado la formación de los ésteres dietílicos de 2-cloro y 2-yodo fosfonatos 9a y 16a, respectivamente. Los derivados de éster dietílico de fosfonato 17a y de fosfonato 32a sustituidos en 2-etinilo se generaron usando la instalación inicial del grupo acetileno siguiendo el protocolo clásico de acoplamiento de Sonogashira usando trimetilsililacetileno, Pd(Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, CuI, TEA en DMF anhidra. Subsiguientemente, la protección de TMS en el acetileno se eliminó usando TBAF en THF anhidro para producir el diéster de fosfonato sustituido en 2-etinilo 31a. Similar a los otros derivados, los fosfonatos (32a) y ésteres dietílicos de fosfonatos (17a) de adenina sustituidos en 2-etinilo se sintetizaron usando los protocolos de desprotección quimioselectiva a base de Dowex y de desprotección completa a base de yodotrimetilsilano, respectivamente.

Los ésteres de fosfonatos de cadena larga saturados 16a y 11a se sintetizaron mediante oxidación del alcohol conocido 33a hasta el 5'-aldehído 34a con un rendimiento de 80%. Es digno de mención que no se observó ni siquiera una pequeña cantidad de descomposición del aldehído tras el almacenamiento a temperatura ambiente (rt) durante varios días. El éster de alquifosfonato  $\alpha,\beta$ -insaturado 35a se pudo preparar a partir del aldehído 34a en una reacción de tipo Wittig usando metilendifosfonato de tetraetilo e hidruro de sodio en THF anhidro. La aminación en la posición 6 de la base purínica nos daría el compuesto 36a, que se pudo someter a reducción quimioselectiva del alqueno usando la diimida generada *in situ* a partir de O-nitrobencenosulfonilhidrazida, Et<sub>3</sub>N en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para obtener el éster dietílico de fosfonato saturado de cadena larga 37a. La desprotección del acetónido de los compuestos 37a y 38a usando la resina Dowex-50 dio como resultado la formación de los ésteres de dietil y diisopropil fosfonato, los compuestos diana 10a y 11a, respectivamente.

### Ejemplo 4 – Evaluación biológica adicional

Se infundieron subcutáneamente de forma individual diversos derivados de fosfonatos vía una minibomba Alzet en ratones CSQ. Después de 14 días de infusión, se evaluó la función cardíaca *in vivo* usando acortamiento fraccionario (FS) derivado de ecocardiografía, que es la relación del cambio en el diámetro del ventrículo izquierdo entre los estados contraído y relajado (Tabla 2). De este modo, un menor porcentaje representa una disminución en la función.

Se exploraron las relaciones de estructura-actividad (SARs) de los análogos nucleotídicos cargados. Una infusión durante dos semanas del derivado 2-yodofosfonato 7a (n = 5 ratones) no mejoró FS o no evitó el adelgazamiento de la pared LV en ratones con insuficiencia cardíaca (datos no representados). De este modo, la sustitución 2-Cl del resto de adenina como en el fosfonato 4 fue esencial para la actividad; la sustitución con yodo en 7a abolió la protección. Se compararon varios análogos de fosfato y fosfonato nuevos, tales como los tioderivados. Una infusión durante 2 semanas del tiofosfato 4a (n = 5), que contiene un 5'-tioéster, pudo proteger a los ratones CSQ con una mejor conservación del grosor de la pared septal (0,492 ± 0,012 mm) y posterior (0,493 ± 0,016 mm) del LV en comparación con la obtenida en ratones CSQ a los que se les infundió NS (tanto septal como posterior: 0,450 ± 0,007 mm) (P<0,05, datos no mostrados). De este modo, se toleró la sustitución del oxígeno por azufre.



Se exploró las relaciones de estructura-actividad (SARs) de los análogos nucleotídicos enmascarados (no cargados) usando el mismo modelo experimental. Se mostró que solamente algunos de los derivados de éster de los agentes cardioprotectores previamente caracterizados 3, 4, y 9 actúan *in vivo*. Estos hallazgos implicaron que fue necesaria una etapa de escisión *in vivo* para liberar el fármaco activo nucleotídico cargado. Entre los derivados de profármaco, el éster diisopropílico 11a de fosfonato (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-amino-2-cloropurin-9-il)-2',3'-(dihidroxi)-1'-(fosfonoetilen)-biciclo[3.1.0]hexano 9 fue muy eficaz. Este diéster de fosfonato dio como resultado un FS mejorado en comparación con el vehículo (figura 4, Tabla 2). En ratones a los que se les infundió el compuesto 11a, el grosor de la pared posterior LV y el grosor septal durante la sístole, y el grosor de la pared posterior LV durante la diástole, fueron mayores que aquellos en ratones CSQ a los que se les infundió NS (figura 5). Otros análogos ensayados en este modelo, por ejemplo 7a y 9a, tuvieron menores valores de FS y no fueron protectores a esta dosis, es decir, el FS en ratones CSQ infundidos con los compuestos 7a y 9a fue similar a aquel de los ratones del control infundidos con disolución salina normal. Además, la infusión durante dos semanas de 7 (n = 5 ratones) o 9a (n = 4) no mejoró FS o previno el adelgazamiento de la pared LV en ratones CSQ con insuficiencia cardíaca (datos no mostrados). De este modo, el derivado 1'-(fosfonoetilénico) homólogo inferior 9a fue menos activo que 11a, sugiriendo que el desbloqueo de los ésteres *in vivo* dependió del acceso estérico no impedido al grupo fosfonilo.

#### Procedimientos experimentales para el Ejemplo 1

##### 20 Métodos generales:

El compuesto 13 se sintetizó como se dio a conocer, o se obtuvo como una síntesis a medida de Natland International Corporation (Research Triangle Park, NC). Todos los otros reactivos y disolventes (normales y anhídros) fueron de grado analítico, y se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Las reacciones se llevaron a cabo en una atmósfera de argón siempre que se usaron disolventes anhídros. Todas las reacciones se monitorizaron mediante cromatografía de capa fina (TLC) usando placas revestidas con gel de sílice con un indicador de fluorescencia que se visualizaron: a) bajo luz UV, b) sumergiéndolas en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. al 5% en etanol absoluto (v/v) seguido del calentamiento, o c) sumergiéndolas en una disolución de anisaldehído:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:2, v/v) en MeOH seguido de calentamiento. La cromatografía en columna de gel de sílice se llevó a cabo con gel de sílice (SiO<sub>2</sub>, malla 200-400, 60Å) usando presión de aire moderada. La evaporación de los disolventes se llevó a cabo a presión reducida a una temperatura por debajo de 50°C. Tras la cromatografía en columna, las fracciones apropiadas se reunieron, se evaporaron y se secaron a alto vacío durante al menos 12 h para dar los productos obtenidos con pureza elevada. La pureza de las muestras se averiguó mediante RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>31</sup>P. No se realizaron correcciones en los rendimientos para el disolvente de cristalización. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>31</sup>P se registraron a 300 MHz y 121,5 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se dan en partes por millón (ppm) con respecto a tetrametilsilano o disolvente deuterado como el patrón interno (dH: CDCl<sub>3</sub> 7,26 ppm). Para los compuestos 38-41, la integral de la señal de H3' del isómero menos dominante se ajustó a 1,0. Los nombres sistemáticos de los compuestos para nucleósidos bicíclicos se dan según la nomenclatura de von Baeyer. Las medidas espectroscópicas de masas de alta resolución (HRMS) se realizaron en un Q-TOF-2 (Micromass-Waters) optimizado para proteómica usando calibración externa con polianilina. Las exactitudes másicas observadas son las esperadas en base al comportamiento conocido del instrumento así como a las tendencias en las masas de compuestos patrón observadas a intervalos durante la serie de medidas. Las masas dadas a conocer son masas observadas sin corregir para esta tendencia dependiente del tiempo en la exactitud de las masas.

La purificación de los derivados nucleotídicos para el ensayo biológico se llevó a cabo mediante HPLC con una columna semipreparativa Luna 5 µm RP-C18(2) (250 X 10,0 mm; Phenomenex, Torrance, CA) en las siguientes condiciones: caudal de 2 ml/min.; acetato de trietilamonio 10 mM (TEAA)-CH<sub>3</sub>CN desde 100:0 (v/v) a 70:30 (v/v) en 30 min., y se aisló en forma de sal de trietilamonio. La pureza analítica de los compuestos se comprobó usando un HPLC Hewlett-Packard 1100 equipado con una columna analítica Zorbax SB-Aq 5 µm (50 x 4,6 mm; Agilent Technologies Inc, Palo Alto, CA). Fase móvil: sistema de disolvente de gradiente lineal: TBAP (dihidrogenofosfato de tetrabutilamonio) 5 mM-CH<sub>3</sub>CN desde 80:20 hasta 40:60 en 13 min.; el caudal fue 0,5 ml/min. Los picos se detectaron mediante absorción de UV con un detector de matriz de diodos a 254, 275, y 280 nm. Todos los derivados ensayados para determinar la actividad biológica mostraron una pureza >99% mediante análisis de HPLC (detección a 254 nm).

(1S,2R,3S,4S,5S)-2,3-O-(isopropiliden)-4-O-(*tert*-butildimetilsilil)-biciclo[3.1.0]hexanocarboxilato de etilo (14): El alcohol 13 conocido (0,83 g, 3,40 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (2 x 10 ml) y se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (25 ml). Se añadieron imidazol (0,69 g, 10,20 mmoles), DMAP (0,04 g, 0,34 mmoles) y *tert*-butilclorodifenilsilano (1,74 ml, 6,81 mmoles). Tras agitar a rt durante 16 h, la mezcla de reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (1 x 30 ml). La fase acuosa se volvió a extraer con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 50 ml). La fase orgánica combinada se evaporó hasta sequedad, y el residuo bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-8% en éter de petróleo, v/v) para producir el compuesto 14 (1,52 mg, 93%) como un aceite incoloro. *R*<sub>f</sub> = 0,3 (EtOAc al 10% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, v/v); ESI-HRMS *m/z* 519,1981 ([M + K]<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub>Si·K<sup>+</sup>: Calc. 519,1969); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,69-7,80 (m, 4H, Ph), 7,32-7,45 (m, 6H, Ph), 5,11 (d, 1H, *J* = 6,6 Hz), 4,42 (t, 1H, *J* = 6,1 Hz), 3,99-4,18 (m, 3H), 2,17-2,25 (m, 1H), 1,91 (t, 1H, *J* = 5,5 Hz), 1,57 (s,

3H), 1,45-1,53 (m, 1H), 1,18-1,24 (m, 6H), 1,07 (s, 9H).

(1S,2R,3S,4S,5S)-1-Hidroximetil-2,3-O-(isopropiliden)-4-O-(*terc*-butildimetilsilil)-biciclo[3.1.0]hexano (15): El compuesto 14 (0,98 g, 2,04 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (2 × 20 ml), se disolvió en THF anhidro (30 ml) y se enfrió hasta -70°C. Se añadió DIBAL-H (1,5 M en tolueno 10,8 ml, 16,32 mmoles) lentamente a esta disolución durante 20 min. Tras agitar a -70°C durante 3 h, la reacción se paralizó con la adición muy cuidadosa de MeOH enfriado con hielo (20 ml), seguido de calentamiento de la mezcla de reacción hasta rt. Se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M frío (20 ml) a la mezcla y se agitó durante 1 h, seguido de la adición de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 35 ml). La fase orgánica combinada se evaporó hasta sequedad, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-45% en éter de petróleo, v/v) para producir el compuesto 15 (0,74 g, 82%) como un aceite incoloro. *R*<sub>f</sub> = 0,4 (EtOAc al 50% en éter de petróleo, v/v); ESI-HRMS *m/z* 461,2112 ([M + Na]<sup>+</sup>, C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>Si·Na<sup>+</sup>: Calc. 461,2124); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,71-7,78 (m, 4H, Ph), 7,31-7,44 (m, 6H, Ph), 4,73 (d, 1H, *J* = 6,5 Hz), 4,44 (t, 1H, *J* = 6,5 Hz), 4,09 (t, 1H, *J* = 6,5 Hz), 3,59-3,67 (m, 1H), 3,41-3,49 (m, 1H), 1,57-1,59 (m, 4H), 1,33 (t, 1H, *J* = 5,5 Hz), 1,20 (s, 3H), 1,07 (s, 9H), 0,56-0,68 (m, 1H).

(1S,2R,3S,4S,5S)-2,3-O-(Isopropiliden)-1-metanosulfoniloximetil-4-O-(*terc*-butildimetilsilil)-biciclo[3.1.0]hexano (16): El compuesto 15 (0,59 g, 1,36 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (2 × 20 ml), se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (30 ml) y se enfrió hasta 0°C. Se añadieron trietilamina (0,95 ml, 6,79 mmoles) y cloruro de metanosulfonilo (0,22 ml, 2,72 moles) a 0°C durante 10 min. Tras calentar la mezcla de reacción hasta rt, se agitó durante 17 h. Después, se añadió H<sub>2</sub>O enfriada con hielo (25 ml), y la mezcla se extrajo con EtOAc (2 × 45 ml). La fase orgánica combinada se lavó con NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (2 × 35 ml) y se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-50% en éter de petróleo, v/v) para producir el compuesto 16 (0,68 g, 96%) como un aceite incoloro. *R*<sub>f</sub> = 0,5 (EtOAc al 50% en éter de petróleo, v/v); ESI-HRMS *m/z* 555,1623 ([M + K]<sup>+</sup>, C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>SSi·K<sup>+</sup>: Calc. 555,1639); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,69-7,77 (m, 4H, Ph), 7,31-7,45 (m, 6H, Ph), 4,69 (d, 1H, *J* = 6,5 Hz), 4,47 (t, 1H, *J* = 6,5 Hz), 4,37-4,43 (dd, 1H, *J* = 10,9 Hz), 4,07 (t, 1H, *J* = 6,5 Hz), 3,90-3,95 (dd, 1H, *J* = 10,9 Hz), 2,99 (s, 3H), 1,67-1,72 (m, 2H), 1,55 (s, 3H), 1,20 (s, 3H), 1,08 (s, 9H), 0,72-0,79 (m, 1H).

(1S,2R,3S,4S,5S)-1-Yodometil-2,3-O-(isopropiliden)-4-O-(*terc*-butildimetilsilil)-biciclo[3.1.0]hexano (17): El compuesto 16 (0,68 g, 1,32 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (2 × 20 ml), y el residuo se disolvió en 1,4-dioxano anhidro (25 ml). Se añadió NaI (0,59 g, 3,94 moles) a la mezcla, y se calentó hasta 65°C. Tras agitar durante 17 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta rt y se diluyó con H<sub>2</sub>O (25 ml) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (75 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 35 ml). La fase orgánica combinada se evaporó hasta sequedad, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-20% en éter de petróleo, v/v) para producir el compuesto 17 (0,69 g, 95%) como un aceite incoloro. *R*<sub>f</sub> = 0,5 (EtOAc al 20% en éter de petróleo, v/v); ESI-HRMS *m/z* 549,1322 ([M + H]<sup>+</sup>, C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>I<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Si·H<sup>+</sup>: Calc. 549,1322); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,68-7,77 (m, 4H, Ph), 7,32-7,46 (m, 6H, Ph), 4,69 (d, 1H, *J* = 6,5 Hz), 4,43 (t, 1H, *J* = 6,5 Hz), 4,09 (t, 1H, *J* = 6,5 Hz), 3,55-3,60 (dd, 1H, *J* = 10,5 Hz), 3,97-4,02 (dd, 1H, *J* = 10,5 Hz), 2,02 (t, 1H, *J* = 4,9 Hz), 1,54-1,57 (s, 4H), 1,20 (s, 3H), 1,07 (s, 9H), 0,83-0,90 (m, 1H).

Fosfonato de dietil-(1S,2R,3S,4S,5S)-2,3-O-(isopropiliden)-4-O-(*terc*-butildimetilsilil)-biciclo[3.1.0]hexano (18): El compuesto 17 (0,68 g, 1,23 mmoles) se disolvió en fosfito de trietilo (17 ml), y la mezcla se calentó hasta 110°C. Tras agitar durante 17 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta rt y se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-90% en éter de petróleo, v/v) para producir el compuesto 18 (0,65 g, 94%) como un aceite incoloro. *R*<sub>f</sub> = 0,3 (EtOAc); ESI-HRMS *m/z* 559,2665 ([M + H]<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>43</sub>O<sub>6</sub>PSi·H<sup>+</sup>: Calc. 559,2645); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,71-7,77 (m, 4H, Ph), 7,30-7,43 (m, 6H, Ph), 4,80 (d, 1H, *J* = 6,5 Hz), 4,47 (t, 1H, *J* = 6,5 Hz), 4,10 (t, 1H, *J* = 6,5 Hz), 3,91-4,05 (m, 4H), 2,22 (t, 1H, *J* = 16,5 Hz), 1,63-1,71 (m, 1H), 1,57-1,61 (m, 2H), 1,55 (s, 3H), 1,22 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,20 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,19 (s, 3H), 1,07 (s, 9H), 0,53-0,60 (m, 1H). RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) δ 29,93.

Fosfonato de dietil-(1S,2R,3S,4S,5S)-4-hidroxi-2,3-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano (19): El compuesto 18 (0,65 g, 1,16 mmoles) se disolvió en una mezcla de THF (20 ml) y fluoruro de tetrabutilamonio (1 M en THF, 2,91 ml, 2,91 mmoles). Tras agitar durante 17 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-7% en EtOAc, v/v) para producir el compuesto 19 (0,33 g, 88%) como un aceite incoloro. *R*<sub>f</sub> = 0,3 (MeOH al 5% en EtOAc, v/v); ESI-HRMS *m/z* 321,1466 [M + H]<sup>+</sup>, C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub>P·H<sup>+</sup>: Calc. 321,1467); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 5,02 (d, 1H, *J* = 6,1 Hz), 4,50-4,58 (m, 2H), 4,02-4,17 (m, 4H), 2,32-2,37 (m, 1H), 2,26 (t, 1H, *J* = 16,5 Hz), 1,88-1,96 (m, 1H), 1,61-1,74 (m, 1H), 1,54 (s, 3H), 1,32 (t, 6H, *J* = 7,2 Hz), 1,28 (s, 3H), 1,21-1,27 (m, 1H), 0,60-0,67 (m, 1H). RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) δ 29,01.

Fosfonato de dietil-(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(2,6-dicloropurin-9-il)-2',3'-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano (20): Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (97 μl, 0,49 mmoles) a rt a una mezcla de trifenilfosfina (128 mg, 0,49 mmoles) y 2,6-dicloropurina (92 mg, 0,49 mmoles) en THF anhidro (3 ml). Tras agitar durante 30 min., se añadió una disolución del compuesto 19 (78 mg, 0,25 mmoles) en THF (3 ml) a la mezcla. Tras agitar durante 51 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en

columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-4% en EtOAc, v/v) para producir el nucleósido 20 (90 mg, 75%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,5$  (MeOH al 5% en EtOAc, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  491,1013  $[M + H]^+$ ,  $C_{19}H_{25}Cl_2N_4O_5P \cdot H^+$ : Calc. 491,1018); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,82 (s, 1H), 5,39 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 5,10 (s, 1H), 4,61 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,02-4,21 (m, 4H), 2,46 (t, 1H,  $J = 16,5$  Hz), 1,91-2,06 (m, 1H), 1,74-1,82 (m, 1H), 1,54 (s, 3H), 1,32 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,26 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,24 (s, 3H), 1,08-1,21 (m, 1H), 0,97-1,06 (m, 1H).

Fosfonato de dietil-(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-amino-2-cloropurin-9-il)-2',3'-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano (21): El nucleósido 20 (90 mg, 0,19 mmoles) se trató con  $NH_3$  2 M en *i*-PrOH (5 ml), y la mezcla se calentó hasta 70°C y se agitó durante 17 h. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-5% en  $CH_2Cl_2$ , v/v) para producir el nucleósido 21 (70 mg, 80%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,5$  (MeOH al 5% en  $CH_2Cl_2$ , v/v); ESI-HRMS  $m/z$  472,1519  $[M + H]^+$ ,  $C_{19}H_{27}ClN_5O_5P \cdot H^+$ : Calc. 472,1517); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,31 (s, 1H), 5,98 (s, 2H), 5,36 (d, 1H,  $J = 7,1$  Hz), 4,97 (s, 1H), 4,61 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,03-4,19 (m, 4H), 2,39 (t, 1H,  $J = 16,5$  Hz), 2,03-2,17 (m, 1H), 1,70-1,77 (m, 1H), 1,52 (s, 3H), 1,32 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,25 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,23 (s, 3H), 1,18-1,21 (m, 1H), 0,96-1,04 (m, 1H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Amino-2-cloropurin-9-il)-2',3'-(dihidroxi)-1'-(fosfometilen)-biciclo[3.1.0]hexano (4): El nucleósido 21 (30 mg, 0,064 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (3 x 3 ml) y se disolvió en  $CH_2Cl_2$  anhidro (3 ml). A esta disolución se añadió yodotrimetilsilano (91  $\mu$ l, 0,64 mmoles). Tras agitar durante 17 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C seguido de la adición de  $H_2O$  enfriada con hielo (25 ml) y  $CH_2Cl_2$  (25 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se lavó con  $CH_2Cl_2$  (1 x 35 ml) y éter dietílico (3 x 35 ml). La fase acuosa resultante se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante HPLC (tiempo de retención: 19,1 min.) para producir 4 (8,5 mg, 23%) como un material sólido blanco. ESI-HRMS  $m/z$  374,0397  $[M - H]^-$ ,  $C_{12}H_{14}ClN_5O_5P^-$ : Calc. 374,0421); RMN  $^1H$  ( $D_2O$ )  $\delta$  8,21 (s, 1H), 4,71 (s, 1H), 4,57 (d, 1H,  $J = 6,6$  Hz), 4,01 (d, 1H,  $J = 6,6$  Hz), 3,19 (q, 2H,  $J = 7,2$  Hz), 2,23 (t, 1H, 15,5 Hz), 1,63-1,77 (m, 2H), 1,42-1,49 (m, 1H), 1,26 (t, 36H), 0,96-1,04 (m, 1H). RMN  $^{31}P$  ( $D_2O$ )  $\delta$  23,68. Pureza >99% mediante HPLC (tiempo de retención: 4,51 min.).

Fosfonato de dietil-(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-cloropurin-9-il)-2',3'-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano (22): Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (100  $\mu$ l, 0,50 mmoles) a rt a una mezcla de trifenilfosfina (133 mg, 0,50 mmoles) y 6-cloropurina (96 mg, 0,50 mmoles) en THF anhidro (3 ml). Tras agitar la mezcla durante 30 min., se añadió una disolución del compuesto 19 (81 mg, 0,26 mmoles) en THF (3 ml). Tras agitar durante 17 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-4% en EtOAc, v/v) para producir el nucleósido 22 (100 mg, 87%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,5$  (MeOH al 5% en EtOAc, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  457,1417  $[M + H]^+$ ,  $C_{19}H_{26}ClN_4O_5P \cdot H^+$ : Calc. 457,1408); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,84 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 5,39 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 5,15 (s, 1H), 4,62 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,07-4,21 (m, 4H), 2,44 (t, 1H,  $J = 16,5$  Hz), 1,94-2,18 (m, 1H), 1,83-1,90 (m, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,33 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,24-1,30 (m, 4H), 0,97-1,06 (m, 1H).

Fosfonato de dietil-(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-aminopurin-9-il)-2',3'-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano (23): El nucleósido 22 (100 mg, 0,22 mmoles) se trató con  $NH_3$  2 M en *i*-PrOH (5 ml) y se calentó hasta 70°C. Tras agitar durante 19 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-6% en  $CH_2Cl_2$ , v/v) para producir el nucleósido 23 (75 mg, 79%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,4$  (MeOH al 5% en  $CH_2Cl_2$ , v/v); ESI-HRMS  $m/z$  438,1912  $[M + H]^+$ ,  $C_{19}H_{28}N_5O_5P \cdot H^+$ : Calc. 438,1906); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,38 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 5,54 (s, 2H), 5,36 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 5,03 (s, 1H), 4,63 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 4,06-4,20 (m, 4H), 2,38 (t, 1H,  $J = 16,5$  Hz), 1,97-2,11 (m, 1H), 1,78-1,85 (m, 1H), 1,68 (s, 3H), 1,32 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,27 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,23 (s, 3H), 1,18-1,21 (m, 1H), 0,95-1,02 (m, 1H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Aminopurin-9-il)-2',3'-(dihidroxi)-1'-(fosfometilen)-biciclo[3.1.0]hexano (5): El nucleósido 23 (25 mg, 0,057 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (3 x 3 ml) y se disolvió en  $CH_2Cl_2$  anhidro (3 ml). Se añadió yodotrimetilsilano (83  $\mu$ l, 0,57 mmoles). Tras agitar durante 15 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, seguido de la adición de  $H_2O$  enfriada con hielo (25 ml) y  $CH_2Cl_2$  (25 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se lavó con  $CH_2Cl_2$  (1 x 35 ml) y éter dietílico (3 x 35 ml). La fase acuosa resultante se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante HPLC (tiempo de retención: 17,5 min.) para producir 5 (6,8 mg, 27%) como un material sólido blanco. ESI-HRMS  $m/z$  340,0817  $[M - H]^-$ ,  $C_{12}H_{15}N_5O_5P^-$ : Calc. 340,0811); RMN  $^1H$  ( $D_2O$ )  $\delta$  8,36 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 4,75 (s, 1H), 4,63 (d, 1H,  $J = 6,1$  Hz), 4,09 (d, 1H,  $J = 6,1$  Hz), 3,19 (q, 6H,  $J = 7,2$  Hz), 1,95-2,18 (m, 2H), 1,75-1,84 (m, 1H), 1,40-1,46 (m, 1H), 1,26 (t, 9H,  $J = 7,2$  Hz), 0,92-1,02 (m, 1H). RMN  $^{31}P$  ( $D_2O$ )  $\delta$  25,36. Pureza >99% mediante HPLC (tiempo de retención: 2,9 min.).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(2,6-Dicloropurin-9-il)-1'-formil-2,3-O-(isopropilidino)-biciclo[3.1.0]hexano (25): El nucleósido 24 conocido (150 mg, 0,41 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (2 x 8 ml) y se disolvió en  $CH_2Cl_2$  anhidro (8 ml). Se añadió peryodinato de Dess-Martin (257 mg, 0,61 mmoles). Tras agitar durante 1 h, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (50 ml) y se lavó con una mezcla acuosa de  $Na_2S_2O_3$  y  $NaHCO_3$  (3 x 35 ml). La fase acuosa se extrajo entonces con EtOAc (2 x 35 ml). La fase orgánica combinada se evaporó hasta sequedad, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-

100% en éter de petróleo, v/v) para producir el compuesto 25 (120 mg, 80%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,6$  (EtOAc); ESI-HRMS  $m/z$  369,0527 ( $[M + H]^+$ ,  $C_{15}H_{14}Cl_2N_4O_3 \cdot H^+$ : Calc. 369,0521); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  9,62 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 5,94 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 4,97 (s, 1H), 4,83 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 2,22-2,29 (m, 1H), 1,73 (t, 1H,  $J = 6,1$  Hz), 1,57 (s, 3H), 1,30 (s, 3H).

5 (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(2,6-Dicloropurin-9-il)-1'-[(E)-etenilfosfonato de diisopropilo]-2',3'-O-(isopropilidín)-biciclo[3.1.0]hexano (26): Se añadió metilendifosfonato de tetraisopropilo (165  $\mu$ l, 0,51 mmoles) a una suspensión de NaH (dispersión al 60% en aceite mineral, 25 mg, 1,02 mmoles) en THF anhidro (2 ml) a 0°C. Después de que la evolución de  $H_2$  cesó, se añadió gota a gota cuidadosamente a 0°C una disolución de aldehído 25 (125 mg, 0,34 mmoles) en THF anhidro (3 ml). Tras agitar a 0°C durante 1 h, la mezcla se calentó hasta rt. Tras agitar a rt durante 1 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, y se añadió  $H_2O$  enfriada con hielo (20 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3  $\times$  35 ml). La fase orgánica combinada se evaporó hasta sequedad, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-4% en EtOAc, v/v) para producir el nucleósido 26 (150 mg, 83%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,3$  (EtOAc); ESI-HRMS  $m/z$  531,1313 ( $[M + H]^+$ ,  $C_{22}H_{29}Cl_2N_4O_5P \cdot H^+$ : Calc. 531,1331); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,04 (s, 1H), 6,50-6,65 (m, 1H), 5,97 (t, 1H,  $J = 17,1$  Hz), 5,53 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 4,98 (s, 1H), 4,77 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 4,60-4,74 (m, 2H), 1,82-1,90 (m, 1H), 1,59 (s, 3H), 1,22-1,38 (m, 16H), 0,83-0,90 (m, 1H). RMN  $^{31}P$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  16,64.

20 (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Amino-2-cloropurin-9-il)-1'-[(E)-etenilfosfonato de diisopropilo]-2,3-O-(isopropilidín)-biciclo-[3.1.0]-hexano (27): El nucleósido 26 (100 mg, 0,19 mmoles) se trató con  $NH_3$  2 M en *i*-PrOH (5 ml) y se calentó hasta 70°C. Tras agitar durante 16 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-8% en  $CH_2Cl_2$ , v/v) para producir el nucleósido 27 (85 mg, 88%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,3$  (MeOH al 5% en EtOAc, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  512,1821 ( $[M + H]^+$ ,  $C_{22}H_{31}ClN_5O_5P \cdot H^+$ : Calc. 512,1830); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  7,69 (s, 1H), 6,52-6,68 (m, 1H), 5,94 (t, 1H,  $J = 17,5$  Hz), 5,75 (s, 2H), 5,51 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 4,91 (s, 1H), 4,76 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 4,59-4,73 (m, 2H), 1,80-1,89 (m, 1H), 1,61 (s, 3H), 1,21-1,37 (m, 15H), 1,08-1,17 (m, 1H), 0,77-0,95 (m, 1H).

30 (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Amino-2-cloropurin-9-il)-2',3'-(dihidroxi)-1'-[(E)-fosfonoetenil]-biciclo[3.1.0]-hexano (7): El nucleósido 27 (12 mg, 0,023 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (3  $\times$  2 ml) y se disolvió en  $CH_2Cl_2$  anhidro (2 ml). Se añadió yodotrimetilsilano (35  $\mu$ l, 0,24 mmoles). Tras agitar durante 18 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, seguido de la adición de  $H_2O$  enfriada con hielo (15 ml) y  $CH_2Cl_2$  (15 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se lavó con  $CH_2Cl_2$  (1  $\times$  25 ml) y éter dietílico (3  $\times$  35 ml). La fase acuosa resultante se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante HPLC (tiempo de retención: 22,8 min.) para producir 7 (2,5 mg, 28%) como un material sólido blanco. ESI-HRMS  $m/z$  386,0403  $[M - H]^-$ ,  $C_{13}H_{14}N_5ClO_5P^-$ : Calc. 386,0421); RMN  $^1H$  ( $D_2O$ )  $\delta$  7,99 (s, 1H), 6,21-6,36 (m, 1H), 6,06 (t, 1H,  $J = 17,5$  Hz), 4,84-4,89 (m, 1H), 4,06 (d, 1H,  $J = 6,6$  Hz), 3,22 (q, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,99-2,06 (m, 1H), 1,78-1,87 (m, 1H), 1,29 (t, 6H,  $J = 7,2$  Hz), 1,21-1,26 (m, 1H). RMN  $^{31}P$  ( $D_2O$ )  $\delta$  14,68. Pureza >99% mediante HPLC (tiempo de retención: 4,3 min.)

40 (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Aminopurin-9-il)-1'-(diisopropil-fosfonoetenil)-2',3'-O-(isopropilidín)-biciclo[3.1.0]hexano (28): El nucleósido 27 (20 mg, 0,04 mmoles) se disolvió en una mezcla de MeOH y NaOH 2 M acuoso (3 ml, 2:1, v/v). Se añadieron Pd al 10%/C (20 mg) y  $H_2$  (3 bares) a esta disolución. Tras agitar la mezcla durante 19 h, el catalizador se eliminó mediante filtración a través de una almohadilla de Celite, que se lavó con MeOH (40 ml), y el filtrado se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-10% en EtOAc, v/v) para producir el nucleósido 28 (15 mg, 79%) como material sólido blanco.  $R_f = 0,5$  (MeOH al 15% en EtOAc, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  480,2385 ( $[M + H]^+$ ,  $C_{22}H_{34}N_5O_5PH^+$ : Calc. 480,2376); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,32 (s, 1H), 7,79 (s, 1H), 5,80 (s, 2H), 5,19 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 4,83 (s, 1H), 4,74 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 4,63-4,73 (m, 2H), 1,60-2,35 (m, 4H), 1,52 (s, 3H), 1,44-1,51 (m, 1H), 1,33 (s, 6H), 1,31 (s, 6H), 1,23 (s, 3H), 1,04-1,09 (m, 1H), 0,76-0,83 (m, 1H). RMN  $^{31}P$  ( $CDCl_3$ ) 30,04.

50 (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Aminopurin-9-il)-2',3'-(dihidroxi)-1'-(fosfonoetenil)-biciclo[3.1.0]hexano (10): El nucleósido 28 (15 mg, 0,032 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (3  $\times$  2 ml) y se disolvió en  $CH_2Cl_2$  anhidro (2 ml). Se añadió yodotrimetilsilano (45  $\mu$ l, 0,32 mmoles). Tras agitar durante 15 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, seguido de la adición de  $H_2O$  enfriada con hielo (15 ml) y  $CH_2Cl_2$  (15 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se lavó con  $CH_2Cl_2$  (1  $\times$  25 ml) y éter dietílico (3  $\times$  35 ml). La fase acuosa resultante se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante HPLC (tiempo de retención: 16,6 min.) para producir 10 (6,7 mg, 47%) como un material sólido blanco. ESI-HRMS  $m/z$  354,0970  $[M - H]^-$ ,  $C_{13}H_{17}N_5O_5P^-$ : Calc. 354,0967); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,20 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,58 (d, 1H,  $J = 6,1$  Hz), 4,09 (d, 1H,  $J = 6,1$  Hz), 3,21 (q, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,69-2,14 (m, 4H), 1,59-1,69 (m, 1H), 1,39-1,349 (m, 1H), 1,29 (t, 6H,  $J = 7,2$  Hz), 0,81-0,92 (m, 1H). RMN  $^{31}P$  ( $D_2O$ )  $\delta$  27,95. Pureza >99% mediante HPLC (tiempo de retención: 2,91 min.)

65 (1S,2R,3S,4S,5S)-1-Formil-2,3-O-(isopropilidén)-4-O-(*terc*-butildimetilsilil)-biciclo[3.1.0]hexano (29): El compuesto 15 (0,63 g, 1,43 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (2  $\times$  25 ml) y se disolvió en  $CH_2Cl_2$  anhidro (25 ml). Se añadió peryodinano de Dess-Martin (0,91 g, 2,13 mmoles) a esta disolución. Tras agitar durante 4 h, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (50 ml) y se lavó con una mezcla acuosa de  $Na_2S_2O_3$  y  $NaHCO_3$  (3  $\times$  50

ml). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 × 50 ml). La fase orgánica combinada se evaporó hasta sequedad, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-25% en éter de petróleo, v/v) para producir el aldehído 29 (452 mg, 73%) como un aceite incoloro.  $R_f = 0,6$  (EtOAc al 50% en éter de petróleo, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  459,1986 ( $[M + Na]^+$ ,  $C_{26}H_{32}O_4Si \cdot Na^+$ : Calc. 459,1968); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,92 (s, 1H), 7,68-7,78 (m, 4H, Ph), 7,31-7,48 (m, 6H, Ph), 5,13 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,41 (t, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,16 (t, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 2,19-2,28 (m, 1H), 2,10-2,18 (m, 1H), 1,55 (s, 3H), 1,43-1,51 (m, 1H), 1,23 (s, 3H), 1,09 (s, 9H).

(1S,2R,3S,4S,5S)-1-[Diisopropil-(E)-fosfonoetenil]-2,3-O-(isopropiliden)-4-O-(*terc*-butildimetilsilil)-

biciclo[3.1.0]hexano (30): Se añadió metilendifosfonato de tetraisopropilo (475  $\mu$ l, 1,47 mmoles) a una suspensión de hidruro de sodio (71 mg, 2,95 mmoles, dispersión al 60% en aceite mineral) en THF anhidro (6 ml) a 0°C. Después de que la evolución de  $H_2$  cesó, se añadió gota a gota cuidadosamente a 0°C una disolución de aldehído 29 (0,43 g, 0,98 mmoles) en THF anhidro (4 ml). Tras agitar a 0°C durante 1 h, la mezcla se calentó hasta rt. Tras agitar a rt durante 1 h, la mezcla se enfrió hasta 0°C, y se añadió  $H_2O$  enfriada con hielo (20 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 × 35 ml). La fase orgánica combinada se evaporó hasta sequedad, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-70% en éter de petróleo, v/v) para producir el nucleósido 30 (0,24 mg, 48%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,4$  (EtOAc al 70% en éter de petróleo, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  599,2938 ( $[M + H]^+$ ,  $C_{33}H_{47}O_6PSi \cdot H^+$ : Calc. 599,2958); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  7,69-7,77 (m, 4H, Ph), 7,31-7,45 (m, 6H, Ph), 6,24-6,40 (m, 1H), 5,66 (t, 1H,  $J = 17,5$  Hz), 4,75 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,52-4,64 (m, 2H), 4,42 (t, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,11 (t, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 1,93-1,99 (m, 1H), 1,78-1,85 (m, 1H), 1,57 (s, 3H), 1,19-1,32 (m, 15H), 1,07 (s, 9H), 0,93-1,01 (m, 1H).

(1S,2R,3S,4S,5S)-1-[Diisopropil-(E)-fosfonoetenil]-4-(hidroxi)-2,3-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano (31): El compuesto 30 (0,45 g, 0,76 mmoles) se disolvió en THF (10 ml), y se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (1,0 M en THF, 2,3 ml, 2,3 mmoles). Tras agitar durante 13 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-7% en EtOAc, v/v) para producir el compuesto 31 (0,26 g, 98%) como un aceite incoloro.  $R_f = 0,3$  (EtOAc); ESI-HRMS  $m/z$  361,1790 ( $[M + H]^+$ ,  $C_{17}H_{29}O_6P \cdot H^+$ : Calc. 361,1780); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  6,34-6,49 (m, 1H), 5,74 (t, 1H,  $J = 17,5$  Hz), 4,99 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,47-4,69 (m, 4H), 2,40 (d, 1H,  $J = 9,5$  Hz), 2,07-2,15 (m, 1H), 1,59-1,63 (m, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,22-1,34 (m, 15H), 0,93-1,07 (m, 1H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Cloropurin-9-il)-1'-[diisopropil-(E)-fosfonoetenil]-2',3'-O-(isopropiliden)-

biciclo[3.1.0]hexano (32): Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (90  $\mu$ l, 0,45 mmoles) a rt a una mezcla de trifenilfosfina (117 mg, 0,45 mmoles) y 6-cloropurina (70 mg, 0,45 mmoles) en THF anhidro (5 ml). Tras agitar durante 30 min., se añadió una disolución del compuesto 31 (80 mg, 0,23 mmoles) en THF (5 ml). Tras agitar durante 60 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetona al 0-55% en éter de petróleo, v/v) para producir el nucleósido 32 (92 mg, 85%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,4$  (acetona al 60% en éter de petróleo, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  519,1532 ( $[M + Na]^+$ ,  $C_{22}H_{30}CN_4O_5P \cdot Na^+$ : Calc. 519,1540); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,71 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 6,49-6,63 (m, 1H), 5,96 (t, 1H,  $J = 17,5$ ), 5,53 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 5,02 (s, 1H), 4,79 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,61-4,73 (m, 2H), 1,86-1,92 (m, 1H), 1,58-1,63 (m, 1H), 1,54 (s, 3H), 1,22-1,38 (m, 16H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Aminopurin-9-il)-1'-[diisopropil-(E)-fosfonoetenil]-2',3'-O-(isopropiliden)-

biciclo[3.1.0]hexano (33): El nucleósido 32 (90 mg, 0,19 mmoles) se trató con  $NH_3$  2 M en *i*-PrOH (7 ml) y se calentó hasta 70°C. Tras agitar durante 17 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-12% en  $CH_2Cl_2$ , v/v) para producir el nucleósido 33 (74 mg, 85%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,2$  (MeOH al 10% en EtOAc, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  478,2198 ( $[M + H]^+$ ,  $C_{22}H_{32}N_5O_5P \cdot H^+$ : Calc. 478,2219); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,30 (s, 1H), 7,73 (s, 1H), 6,51-6,66 (m, 1H), 5,96 (t, 1H,  $J = 17,5$ ), 5,47-5,54 (m, 3H), 4,95 (s, 1H), 4,78 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,60-4,72 (m, 2H), 1,86-1,94 (m, 1H), 1,53-1,57 (m, 4H), 1,24-1,37 (m, 16H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Aminopurin-9-il)-2',3'-(dihidroxi)-1'-[(E)-fosfonoetenil]-biciclo[3.1.0]hexano (8): El nucleósido 33 (20 mg, 0,042 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (3 × 5 ml) y se disolvió en  $CH_2Cl_2$  anhidro (5 ml). Se añadió yodotrimetilsilano (60  $\mu$ l, 0,42 mmoles). Tras agitar durante 17 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, seguido de la adición de  $H_2O$  enfriada con hielo (25 ml) y  $CH_2Cl_2$  (25 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se lavó con  $CH_2Cl_2$  (1 × 35 ml) y éter dietílico (3 × 35 ml). La fase acuosa resultante se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante HPLC (tiempo de retención: 16,5 min.) para producir 8 (11,8 mg, 78%) como un material sólido blanco. ESI-HRMS  $m/z$  352,0821  $[M - H]^-$ ,  $C_{13}H_{15}N_5O_5P^-$ : Calc. 352,0811); RMN  $^1H$  ( $D_2O$ )  $\delta$  8,30 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 6,30-6,44 (m, 1H), 6,07 (t, 1H,  $J = 17,5$ ), 4,97 (s, 1H), 4,89 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 4,09 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 3,21 (q, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 2,03-2,10 (m, 2H), 1,84-1,89 (m, 1H), 1,29 (t, 7H,  $J = 7,2$  Hz). RMN  $^{31}P$  ( $D_2O$ )  $\delta$  15,71. Pureza >99% mediante HPLC (tiempo de retención: 3,5 min.)

(1S,2R,3S,4S,5S)-1-(Diisopropil-fosfonoetenil)-4-(hidroxi)-2,3-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano (34): El compuesto 31 (30 mg, 0,083 mmoles) se disolvió en MeOH (3 ml). Se añadió Pd al 10%/C (25 mg) y  $H_2$  (3 bar). Tras agitar la mezcla durante 17 h, el catalizador se eliminó mediante filtración a través de una almohadilla de

Celite, que se lavó con MeOH (40 ml), y el filtrado se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetona al 0-90% en éter de petróleo, v/v) para producir el nucleósido 34 (22 mg, 72%) como material sólido blanco.  $R_f = 0,3$  (MeOH al 5% en EtOAc, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  363,1933 ( $[M + H]^+$ ,  $C_{17}H_{31}O_6P \cdot H^+$ : Calc. 363,1937); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  4,61-4,76 (m, 2H), 4,43-4,54 (m, 2H), 4,17-4,35 (m, 1H), 2,32 (d,  $J = 9,8$  Hz, 1H), 1,43-1,93 (m, 8H), 1,22-1,37 (m, 15H), 1,07-1,14 (m, 1H), 0,47-0,56 (m, 1H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(2,6-Dicloropurin-9-il)-1'-(diisopropil-fosfonoetenil)-2',3'-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano (35): Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (93  $\mu$ l, 0,47 mmoles) a rt a una mezcla de trifetilfosfina (123 mg, 0,47 mmoles) y 2,6-dicloropurina (89 mg, 0,47 mmoles) en THF anhidro (4 ml). Tras agitar durante 30 min., se añadió una disolución del compuesto 34 (85 mg, 0,24 mmoles) en THF (4 ml). Tras agitar durante 65 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-5% en EtOAc, v/v) para producir el nucleósido 35 (50 mg, 40%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,4$  (MeOH al 5% en EtOAc, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  533,1497 ( $[M + H]^+$ ,  $C_{22}H_{31}Cl_2N_4O_5P \cdot H^+$ : Calc. 533,1487); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8,09 (s, 1H), 5,20 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 4,86 (s, 1H), 4,73 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 4,63-4,73 (m, 2H), 2,25-2,44 (m, 1H), 1,79-2,09 (m, 2H), 1,58-1,70 (m, 1H), 1,52 (s, 3H), 1,43-1,52 (m, 1H), 1,28-1,35 (m, 12H), 1,24 (s, 3H), 1,04-1,11 (m, 1H), 0,78-0,87 (m, 1H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Amino-2-cloropurin-9-il)-1'-(diisopropil-fosfonoetenil)-2',3'-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano (36): El nucleósido 35 (50 mg, 0,094 mmoles) se trató con  $NH_3$  2 M en *i*-PrOH (5 ml) y se calentó hasta 70°C. Tras agitar durante 19 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-10% en  $CH_2Cl_2$ , v/v) para producir el nucleósido 36 (34 mg, 71%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,4$  (MeOH al 8% en EtOAc, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  514,1978 ( $[M + H]^+$ ,  $C_{22}H_{33}ClN_5O_5P \cdot H^+$ : Calc. 514,1986); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  7,73 (s, 1H), 5,84 (s, 2H), 5,20 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,76 (s, 1H), 4,72 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,62-4,71 (m, 2H), 2,24-2,40 (m, 1H), 1,75-2,08 (m, 1H), 1,56-1,74 (m, 5H), 1,40-1,47 (m, 1H), 1,28-1,35 (m, 12H), 1,24 (s, 3H), 1,01-1,06 (m, 1H), 0,74-0,82 (m, 1H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Amino-2-cloropurin-9-il)-2',3'-(dihidroxi)-1'-(fosfonoetenil)-biciclo[3.1.0]hexano (9): El nucleósido 23 (25 mg, 0,049 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (3  $\times$  4 ml) y se disolvió en  $CH_2Cl_2$  anhidro (4 ml). Se añadió yodotrimetilsilano (70  $\mu$ l, 0,49 mmoles). Tras agitar durante 19 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, seguido de la adición de  $H_2O$  enfriada con hielo (25 ml) y  $CH_2Cl_2$  (25 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se lavó con  $CH_2Cl_2$  (1  $\times$  35 ml) y éter dietílico (3  $\times$  35 ml). La fase acuosa resultante se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante HPLC (tiempo de retención: 21,5 min.) para producir 9 (8,5 mg) y 10 (1,3 mg, 53%, rendimiento combinado) como materiales sólidos blancos. ESI-HRMS  $m/z$  388,0574 ( $[M - H]^-$ ,  $C_{13}H_{16}ClN_5O_5P$ : Calc. 388,0578); RMN  $^1H$  ( $D_2O$ )  $\delta$  8,15 (s, 1H), 4,74 (s, 1H), 4,61 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 4,11 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 3,21 (q, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,70-2,11 (m, 4H), 1,63-1,71 (m, 1H), 1,33-1,38 (m, 1H), 1,29 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 0,81-0,91 (m, 1H). RMN  $^{31}P$  ( $D_2O$ )  $\delta$  28,26. Pureza >99% mediante HPLC (tiempo de retención: 4,6 min.)

(1S,2R,3S,4S,5S)-1-Bromometil-2,3-O-(isopropiliden)-4-O-(*tert*-butildimetilsilil)-biciclo[3.1.0]hexano (37): El compuesto 15 (0,30 g, 0,69 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (3  $\times$  10 ml) y se disolvió en  $CH_2Cl_2$  anhidro (8 ml). Se añadieron  $CBr_4$  (0,46 g, 1,36 mmoles), trifetilfosfina (0,36 g, 1,36 mmoles), y trietilamina (0,3 ml, 2,07 mmoles). Tras agitar durante 17 h, la mezcla de reacción se diluyó con  $CH_2Cl_2$  (50 ml) y NaCl acuoso sat. (25 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con  $CH_2Cl_2$  (3  $\times$  25 ml). La fase orgánica combinada se evaporó hasta sequedad, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-20% en éter de petróleo, v/v) para producir el compuesto 37 (0,28 g, 81%) como un aceite incoloro.  $R_f = 0,8$  (EtOAc al 50% en éter de petróleo, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  523,1296 ( $[M + Na]^+$ ,  $C_{26}H_{33}BrO_3Si \cdot Na^+$ : Calc. 523,1280); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  7,67,77 (m, 4H, Ph), 7,30-7,45 (m, 6H, Ph), 4,77 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,44 (t, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,08 (t, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 3,76 (d, 1H,  $J = 10,5$  Hz), 3,13 (d, 1H,  $J = 10,5$  Hz), 1,80-1,87 (m, 1H), 1,60-1,70 (m, 1H), 1,55 (s, 3H), 1,21 (s, 3H), 1,05 (s, 9H), 0,71-0,86 (m, 1H).

(1S,2R,3S,4S,5S)-1-C-(Etoximetilfosfinil)-2,3-O-(isopropiliden)-4-O-(*tert*-butildimetilsilil)-biciclo[3.1.0]hexano (38): El compuesto 37 (0,28 g, 0,56 mmoles) se disolvió en fosfito de metilo y dietilo (4 ml) y se calentó hasta 110°C. Tras agitar durante 17 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta rt y se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-90% en éter de petróleo, v/v) para producir una mezcla diastereomérica inseparable de compuesto 38 (0,28 g, 95%) como un aceite incoloro.  $R_f = 0,6$  (MeOH al 5% en EtOAc, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  529,2532 ( $[M + H]^+$ ,  $C_{29}H_{41}O_5PSi \cdot H^+$ : Calc. 529,2539); RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  7,68-7,77 (m, 6,8H, Ph), 7,29-7,46 (m, 10,2H, Ph), 4,75 (d, 0,7H,  $J = 6,5$  Hz), 4,68 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,43-4,49 (m, 1,7H), 3,87-4,14 (m, 5,1H), 1,73-1,92 (m, 3,4H), 1,62 (s, 5,1H), 1,57-1,60 (m, 1,7H), 1,48 (d, 3H,  $J = 3,4$  Hz), 1,44 (d, 2,1H,  $J = 3,4$  Hz), 1,26 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,22 (t, 2,1H,  $J = 7,2$  Hz), 1,19 (s, 2,1H), 1,18 (s, 3H), 1,09-1,13 (m, 1,7H), 1,07 (s, 15,3H), 0,52-0,69 (m, 1H).

(1S,2R,3S,4S,5S)-1-C-(Etoximetilfosfinil)-4-hidroxi-2,3-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano (39): El compuesto 38 (0,30 g, 0,57 mmoles) se disolvió en THF (10 ml), y se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (1,0 M en THF,

1,70 ml, 1,70 mmoles). Tras agitar durante 21 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-15% en EtOAc, v/v) para producir una mezcla diastereomérica inseparable de compuesto 39 (0,15 g, 91%) como un aceite incoloro.  $R_f = 0,2$  (15% MeOH en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v); ESI-HRMS  $m/z$  291,1366 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{P} \cdot \text{H}^+$ : Calc. 291,1361); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,89-5,03 (m, 2H), 4,50-4,60 (m, 4H), 3,97-4,14 (m, 4H), 2,34-2,40 (m, 2H), 1,95 (t, 2H,  $J = 7,7$  Hz), 1,90 (t, 2H,  $J = 7,7$  Hz), 1,78-1,87 (m, 2H), 1,66 (s, 6H), 1,55 (d, 3H,  $J = 3,9$  Hz), 1,50 (d, 3H,  $J = 3,9$  Hz), 1,29-1,35 (m, 6H), 1,28 (s, 6H), 1,23-1,26 (m, 2H), 0,60-0,71 (m, 2H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-1'-C-(Etoximetilfosfinil)-4'-(2,6-dicloropurin-9-il)-2',3'-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano (40): Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (360  $\mu\text{l}$ , 1,82 mmoles) a rt a una mezcla de trifenilfosfina (0,48 g, 1,82 mmoles) y 2,6-dicloropurina (0,35 g, 1,82 mmoles) en THF anhidro (5 ml). Tras agitar durante 30 min., se añadió una disolución del compuesto 39 (0,27 g, 0,91 mmoles) en THF (5 ml). Tras agitar durante 60 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-10% en EtOAc, v/v) para producir una mezcla diastereomérica inseparable de nucleósido 40 (0,25 mg, 60%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,2$  (MeOH al 10% en EtOAc, v/v); ESI-HRMS  $m/z$  461,0899 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4\text{P} \cdot \text{H}^+$ : Calc. 461,0912); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,79 (s, 0,5H), 8,51 (s, 1H), 5,45 (d, 0,5H,  $J = 7,2$  Hz), 5,32 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 5,06 (s, 0,5H), 4,96 (s, 1H), 4,66 (d, 1,5H,  $J = 7,2$  Hz), 3,98-4,21 (m, 3H), 2,40-2,51 (m, 0,5H), 2,15-2,24 (m, 1H), 1,93-2,11 (m, 1,5H), 1,63-1,75 (m, 0,5H), 1,61 (s, 5,5H), 1,59 (d, 3H,  $J = 3,9$  Hz), 1,55 (d, 1,5H,  $J = 3,9$  Hz), 1,35 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,25 (t, 1,5H,  $J = 7,2$  Hz), 1,24 (s, 4,5H), 1,18-1,23 (m, 1,5H), 0,95-1,13 (m, 1,5H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Amino-2-cloropurin-9-il)-1'-C-(etoximetilfosfinil)-2',3'-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano (41): El nucleósido 40 (0,20 g, 0,44 mmoles) se trató con  $\text{NH}_3$  2M en *i*-PrOH (8 ml) y se calentó hasta 70°C. Tras agitar durante 15 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-7% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v) para producir el nucleósido 41 (150 mg, 79%) como un material sólido blanco.  $R_f = 0,4$  (MeOH al 10% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v); ESI-HRMS  $m/z$  442,1416 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{ClN}_5\text{O}_4\text{P} \cdot \text{H}^+$ : Calc. 442,1411); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,21 (s, 0,5H), 8,00 (s, 1H), 5,96 (s, 3H), 5,40 (d, 0,5H,  $J = 6,5$  Hz), 5,30 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 4,91 (s, 0,5H), 4,81 (s, 1H), 4,62-4,71 (d, 1,5H,  $J = 7,2$  Hz), 4,10-4,22 (m, 2H), 3,98-4,09 (m, 1H), 3,60-3,80 (m, 1H), 2,64 (t, 1H,  $J = 15,3$  Hz), 2,35 (t, 0,5H,  $J = 15,3$  Hz), 2,01-2,17 (m, 0,5H), 1,87 (t, 1,5H,  $J = 15,8$  Hz), 1,75 (s, 4,5H), 1,55-1,69 (m, 4,5H), 1,36 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,25 (t, 1,5H,  $J = 7,2$  Hz), 1,24 (s, 4,5H), 1,17-1,22 (m, 1,5H), 0,96-1,07 (m, 1,5H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Amino-2-cloropurin-9-il)-2',3'-dihidroxi-1'-(ácido metilfosfónico)-biciclo[3.1.0]hexano (11) y (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Aminopurin-9-il)-2',3'-dihidroxi-1'-(ácido metilfosfónico)-biciclo[3.1.0]hexano (12): El nucleósido 29 (15 mg, 0,034 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (3  $\times$  3 ml) y se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (4 ml). Se añadió yodotrimetilsilano (91  $\mu\text{l}$ , 0,33 mmoles). Tras agitar durante 19 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, seguido de la adición de  $\text{H}_2\text{O}$  enfriada con hielo (25 ml) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se lavó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1  $\times$  35 ml) y éter dietílico (3  $\times$  35 ml). La fase acuosa resultante se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante HPLC (tiempo de retención: 16,8 min.) para producir 11 (1,3 mg, 11%) y 12 (0,8 mg, 20%, rendimiento combinado) como un material sólido blanco.

Datos analíticos del compuesto 11: ESI-HRMS  $m/z$  372,0625  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ,  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{ClN}_5\text{O}_4\text{P}$ : Calc. 372,0628); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,23 (s, 1H), 4,76-4,79 (m, 1H), 4,63 (d, 1H,  $J = 6,2$  Hz), 4,12 (d, 1H,  $J = 6,2$  Hz), 3,21 (q, 2H,  $J = 7,2$  Hz), 2,34 (t, 1H,  $J = 15,3$  Hz), 1,75-1,86 (m, 1H), 1,68-1,75 (m, 1H), 1,51-1,56 (m, 1H), 1,35 (d, 3H,  $J = 13,2$  Hz), 1,26 (t, 1H,  $J = 7,2$  Hz) 0,96-1,04 (m, 1H). RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  46,01. Pureza >99% mediante HPLC (tiempo de retención: 4,19 min.).

Datos analíticos del compuesto 12: ESI-HRMS  $m/z$  338,1016  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ,  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4\text{P}$ : Calc. 338,1018); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,26 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 4,76-4,79 (m, 1H), 4,63 (d, 1H,  $J = 6,2$  Hz), 4,12 (d, 1H,  $J = 6,2$  Hz), 3,21 (q, 2H,  $J = 7,2$  Hz), 2,34 (t, 1H,  $J = 15,3$  Hz), 1,75-1,86 (m, 1H), 1,68-1,75 (m, 1H), 1,51-1,56 (m, 1H), 1,35 (d, 3H,  $J = 13,2$  Hz), 1,26 (t, 1H,  $J = 7,2$  Hz) 0,96-1,04 (m, 1H). RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  46,0. Pureza >99% mediante HPLC (tiempo de retención: 5,91 min.).

### Procedimientos experimentales para el Ejemplo 3

Métodos generales: El compuesto 13a se sintetizó como se dio a conocer, o se obtuvo como una síntesis a medida de Natland International Corporation (Research Triangle Park, NC). Todos los otros reactivos y disolventes (normales y anhidros) fueron de grado analítico, y se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Las reacciones se llevaron a cabo en una atmósfera de argón siempre que se usaron disolventes anhidros. Todas las reacciones se monitorizaron mediante cromatografía de capa fina (TLC) usando placas revestidas con gel de sílice con un indicador de fluorescencia que se visualizaron: a) bajo luz UV, b) sumergiéndolas en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. al 5% en etanol absoluto (v/v) seguido del calentamiento, o c) sumergiéndolas en una disolución de anisaldehído: $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:2, v/v) en MeOH seguido de calentamiento. La cromatografía en columna de gel de sílice se llevó a cabo con gel de sílice ( $\text{SiO}_2$ , malla 200-400, 60Å) usando presión de aire moderada. La evaporación de los disolventes se llevó a cabo a presión reducida a una temperatura por debajo

de 50°C. Tras la cromatografía en columna, las fracciones apropiadas se reunieron, se evaporaron y se secaron a alto vacío durante al menos 12 h para dar los productos obtenidos con pureza elevada. La pureza de las muestras se averiguó mediante RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>31</sup>P. No se realizaron correcciones en los rendimientos para el disolvente de cristalización. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>31</sup>P se registraron a 300 MHz y 121,5 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se dan en partes por millón (ppm) con respecto a tetrametilsilano o disolvente deuterado como el patrón interno (<sup>2</sup>H: CDCl<sub>3</sub> 7,26 ppm). Los nombres sistemáticos de los compuestos para nucleósidos bicyclicos se dan según la nomenclatura de von Baeyer. Las medidas espectroscópicas de masas de alta resolución (HRMS) se realizaron en un Q-TOF-2 (Micromass-Waters) optimizado para proteómica usando calibración externa con polianilina. Las exactitudes máxicas observadas son las esperadas en base al comportamiento conocido del instrumento así como a las tendencias en las masas de compuestos patrón observadas a intervalos durante la serie de medidas. Las masas dadas a conocer son masas observadas sin corregir para esta tendencia dependiente del tiempo en la exactitud de las masas.

La purificación de los derivados nucleotídicos para el ensayo biológico se llevó a cabo mediante HPLC con una columna semipreparativa Luna 5 micrómetros RP-C18 (250 X 10,0 mm; Phenomenex, Torrance, CA) en las siguientes condiciones: caudal de 2 ml/min.; acetato de trietilamonio 10 mM (TEAA)-CH<sub>3</sub>CN desde 100:0 (v/v) a 70:30 (v/v) en 30 min., y se aisló en forma de sal de trietilamonio. La pureza analítica de los compuestos se comprobó usando un HPLC Hewlett-Packard 1100 equipado con una columna analítica Zorbax SB-Aq 5 μm (50 x 4,6 mm; Agilent Technologies Inc, Palo Alto, CA). Fase móvil: sistema de disolvente de gradiente lineal: TBAP (dihidrogenofosfato de tetrabutilamonio) 5 mM-CH<sub>3</sub>CN desde 80:20 hasta 40:60 en 13 min.; el caudal fue 0,5 ml/min. Los picos se detectaron mediante absorción de UV con un detector de matriz de diodos a 254, 275, y 280 nm. Todos los derivados ensayados para determinar la actividad biológica mostraron una pureza >99% mediante análisis de HPLC (detección a 254 nm).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(6-amino-2-cloro-purin-9-il)-2,3-(dihidroxil)-1-[hidroximetil]bicyclo-[3.1.0]hexano (19a). El nucleósido 18a (25 mg, 0,071 mmoles) se disolvió en ácido trifluoroacético acuoso al 10% (1,5 ml, v/v). Tras agitar a temperatura ambiente durante 17 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-12% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, v/v) para producir 2',3',5'-trihidroxi nucleósido 19a (15,2 mg, 69%). *R<sub>f</sub>* = 0,3 (MeOH al 20% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, v/v). RMN <sup>1</sup>H (MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ 8,48 (s, 1H), 4,80 (s, 1H), 4,76 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 4,23-4,28 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 3,87 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 3,35 (s, 1H), 1,58-1,63 (m, 1H), 1,50-1,55 (m, 1H), 0,72-0,78 (m, 1H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(6-amino-2-cloro-purin-9-il)-1-[yodometil]-2,3-(O-isopropilidin)bicyclo-[3.1.0]hexano (20a). El nucleósido 18a (45 mg, 0,128 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro (3 x 10 ml) y se disolvió en THF anhidro (3 ml). Se añadieron I<sub>2</sub> (66 mg, 0,256 mmoles), trifetilfosfina (68 mg, 0,256 mmoles), e imidazol (18 mg, 0,256 mmoles). Tras agitar durante 17 h, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (30 ml) y se lavó con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> acuoso saturado (2 x 15 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 25 ml). La fase orgánica combinada se evaporó hasta sequedad, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-80% en éter de petróleo, v/v) para producir 5'-yodo nucleósido 20a (41 mg, 74%). *R<sub>f</sub>* = 0,4 (MeOH al 5% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, v/v). ESI-HRMS *m/z* 462,0205 ([M + H]<sup>+</sup> (C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Cl, calc. 462,0194). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,09 (s, 1H), 5,91 (s, 2H), 5,32 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 4,91 (s, 1H), 5,32 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 3,63-3,69 (d, 1H, *J* = 10,5 Hz), 3,53-3,56 (d, 1H, *J* = 10,5 Hz), 1,65-1,74 (m, 1H), 1,71 (s, 3H), 1,29 (s, 3H), 1,22-1,31 (m, 1H), 1,10-1,15 (m, 1H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(6-amino-2-cloro-purin-9-il)-2,3-(dihidroxi)-1-[yodometil]bicyclo-[3.1.0]hexano (21a). Se disolvió 5-yodo nucleósido 20a (106 mg, 0,229 mmoles) en THF (1 ml), seguido de la adición de ácido trifluoroacético acuoso al 10% (3,5 ml, v/v). Tras agitar la mezcla de reacción a 65°C durante 15 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-80% en éter de petróleo, v/v) para producir 2',3'-dihidroxi-5'-yodo nucleósido 21a (41 mg, 60%). *R<sub>f</sub>* = 0,3 (MeOH al 10% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, v/v). ESI-HRMS *m/z* 421,9883 ([M + H]<sup>+</sup> (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Cl, calc. 421,9881). RMN <sup>1</sup>H (MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ 8,41 (s, 1H), 4,75 (dd, 1H, *J* = 1,8 Hz), 4,10 (dt, 1H, *J* = 8 Hz, 2,8 Hz), 3,87-3,91 (d, 1H, *J* = 10,5 Hz), 3,46-3,52 (d, 1H, *J* = 10,5 Hz), 1,91-1,95 (m, 1H), 1,67-1,72 (m, 1H), 1,04-1,09 (m, 1H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(6-amino-2-cloro-purin-9-il)-2,3-(dihidroxi)-1-[monofosforotioato]-bicyclo-[3.1.0]hexano (12a). A la suspensión de 5'-yodo nucleósido 21a (3 mg, 7,12 μmoles) y H<sub>2</sub>O (0,5 ml), se añadió tiosulfato de trisodio (10 mg, 55 μmoles). Tras agitar la mezcla de reacción durante 3 d a temperatura ambiente en atmósfera de argón, la mezcla de reacción se liofilizó y se purificó mediante HPLC semipreparativa (tiempo de retención 19,5 min.) para obtener 5'-monofosforotioato 12a (1,65 mg, 57%) como un sólido blanco. ESI-HRMS *m/z* 406,0159 ([M + H]<sup>+</sup> (C<sub>19</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>SCl, calc. 406,0165). RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ 8,39 (s, 1H), 4,62 (s, 1H), 4,63 (s, 1H), 3,97 (d, 1H, *J* = 6,5 Hz), 3,19-3,26 (m, 1H), 2,79-2,87 (m, 1H), 1,69-1,74 (m, 1H), 1,39-1,43 (m, 1H), 0,84-0,90 (m, 1H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(6-Amino-2-cloropurin-9-il)-2',3'-O-(isopropiliden)-bicyclo[3.1.0]hexanocarboxilato de etilo (23a). El nucleósido 22a (53 mg, 0,13 mmoles) se trató con NH<sub>3</sub> 2 M en *i*-PrOH (5 ml) y se calentó hasta 70°C. Tras agitar la reacción durante 16 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-4% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, v/v) para producir el



nucleósido 23a (35 mg, 68%) como un sólido blanco.  $R_f = 0,4$  (MeOH al 5% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v). ESI-HRMS  $m/z$  394,1286 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$  ( $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_4\text{Cl}$ , calc. 394,1282). RMN  $^1\text{H}$  (MeOD- $d_4$ )  $\delta$  8,09 (s, 1H), 5,85 (d, 1H,  $J = 7,1$  Hz), 4,98 (s, 1H), 4,81 (d, 1H,  $J = 7,1$  Hz), 4,20-4,26 (m, 1H), 2,23-2,28 (m, 1H), 1,64-1,67 (m, 1H), 1,52 (s, 3H), 1,34 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz), 1,20-1,29 (m, 4H).

5 (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(6-Amino-2-cloro-purin-9-il)-1-[hidroxideuterometil]-2,3-(O-isopropilidin)biciclo[3.1.0]hexano (24a). El nucleósido 23a (9 mg, 23  $\mu\text{moles}$ ) se coevaporó con tolueno anhidro ( $3 \times 10$  ml), y se disolvió en THF anhidro (10 ml). Se añadió  $\text{LiBD}_4$  (3 mg, 115  $\mu\text{moles}$ ) y tras agitar la mezcla de reacción durante 4 h a  $70^\circ\text{C}$ , se enfrió hasta la temperatura ambiente y se paralizó con una adición lenta de MeOH (3 ml). La  
10 mezcla de reacción resultante se evaporó hasta sequedad, y se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-8% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v) para producir el nucleósido 24a (6 mg, 72%) como un sólido blanco.  $R_f = 0,4$  (MeOH al 10% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v). ESI-HRMS  $m/z$  421,9883 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$  ( $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_2\text{Cl}$ , calc. 421,9881). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,82 (s, 1H), 5,92 (s, 2H), 5,60 (d, 1H,  $J = 6,4$  Hz), 4,78 (s, 1H), 4,68 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 1,71-1,77 (m, 1H), 1,55 (s, 3H), 1,27 (s, 3H), 1,10-1,15 (m, 1H), 0,98-1,02 (m, 1H).

15 (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(6-Amino-2-cloro-9H-purin-9-il)-2,3-(O-isopropiliden)-1-[(di-terc-butilfosfato)dideuterometil]biciclo[3.1.0]hexano (26a). El nucleósido 24a (6 mg, 17  $\mu\text{moles}$ ) se coevaporó con tolueno anhidro ( $3 \times 10$  ml), y se disolvió en THF anhidro (1 ml). se añadieron  $N,N'$ -diethylfosforamidito de di- $t$ -butilo (24  $\mu\text{l}$ , 85  $\mu\text{moles}$ ) y tetrazol (12 mg, 169  $\mu\text{moles}$ ). Tras agitar a rt durante 4 h, la mezcla de reacción se  
20 enfrió hasta  $-70^\circ\text{C}$ , seguido de la adición de ácido  $m$ -cloroperbenzoico (25 mg, 77%). La mezcla de reacción se calentó hasta  $0^\circ\text{C}$  y se dejó agitar durante 15 min., seguido de la adición de trietilamina (0,5 ml). La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad, y el residuo bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-4% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v) para producir el nucleósido 26a (7 mg, 76%) como un sólido blanco.  $R_f = 0,3$  (MeOH al 5% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v); ESI-HRMS  $m/z$  546,2234 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$  ( $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{D}_2\text{N}_5\text{O}_6\text{Cl}$ , calc. 546,2217). RMN  $^1\text{H}$  (MeOD- $d_4$ )  $\delta$  8,15 (s, 1H), 5,34 (d, 1H,  $J = 6,8$  Hz), 4,98 (s, 1H), 4,77 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz), 1,74-1,77 (m, 1H), 1,48-1,55 (m, 21H), 1,25 (s, 3H), 1,21-1,24 (m, 1H), 1,09-1,13 (m, 1H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(6-Amino-2-cloro-9H-purin-9-il)-1-[fosforiloxidideuterometil]-2,3-diol-biciclo[3.1.0]hexano  
30 (6a). A una disolución que contiene nucleósido 26a (7 mg, 12,8  $\mu\text{moles}$ ) en MeOH y  $\text{H}_2\text{O}$  (2 ml, 1:1, v/v) se añadió resina Dowex-50 (~50 mg). La mezcla se agitó durante 3 h a  $70^\circ\text{C}$ , y la resina se eliminó mediante filtración. El filtrado se trató entonces con amortiguador de bicarbonato de trietilamonio 1 M (1 ml) y se evaporó hasta sequedad. La mezcla resultante se purificó mediante HPLC semipreparativa (tiempo de retención 16,5 min.) para obtener 5'-monofosfato de 6a (1,62 mg, 32%) como un sólido blanco. ESI-HRMS  $m/z$  392,0493 ( $[\text{M} - \text{H}]^+$  ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{D}_2\text{N}_5\text{O}_6\text{ClP}$ , calc. 392,0496). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,45 (s, 1H), 4,73 (s, 1H), 3,97 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz), 1,72-1,77 (m, 1H), 1,39-1,43 (m, 1H), 0,84-0,90 (m, 1H). RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  2,48.

Fosfonato de dietil-(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-cloro-2-yodo-purin-9-il)-2',3'-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano  
40 (28a). Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (86  $\mu\text{l}$ , 0,44 mmoles) a rt a una mezcla de trifetilfosfina (115 mg, 0,44 mmoles) y 6-cloro-2-yodopurina (122 mg, 0,44 mmoles) en THF anhidro (4 ml). Tras agitar durante 45 min., se añadió una disolución del compuesto 27a (70 mg, 0,22 mmoles) en THF (4 ml) a la mezcla. Tras agitar durante 36 h, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-3% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v) para producir el nucleósido 28a (89 mg, 70%) como un sólido blanco.  $R_f = 0,5$  (MeOH al 5% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v); ESI-HRMS  $m/z$  583,0374 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{ClIN}_4\text{O}_5\text{P} \cdot \text{H}^+$ ; Calc. 583,0373); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,64 (s, 1H), 5,39 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz), 5,07 (s, 1H), 4,64 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz), 4,15-4,21 (m, 4H), 2,41 (t, 1H,  $J = 16,0$  Hz), 2,11-2,22 (m, 1H), 1,73-1,79 (m, 1H), 1,59-1,64 (m, 1H), 1,54 (s, 3H), 1,35 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz), 1,28 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz), 1,25 (s, 3H), 1,04-1,09 (m, 1H).

Fosfonato de dietil-(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-amino-2-yodopurin-9-il)-2',3'-O-(isopropiliden)-biciclo[3.1.0]hexano  
50 (29a). El nucleósido 28a (80 mg, 0,14 mmoles) se trató con  $\text{NH}_3$  2M en  $i$ -PrOH (8 ml), y la mezcla se calentó hasta  $70^\circ\text{C}$  y se agitó durante 17 h. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-6% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v) para producir el nucleósido 29a (48 mg, 64%) como un sólido blanco.  $R_f = 0,4$  (MeOH al 7% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v); ESI-HRMS  $m/z$  564,0873 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{IN}_5\text{O}_5\text{P} \cdot \text{H}^+$ ; Calc. 564,0856); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,15 (s, 1H), 5,74 (s, 2H), 5,34 (d, 1H,  $J = 6,1$  Hz), 4,94 (s, 1H), 4,64 (d, 1H,  $J = 6,1$  Hz), 4,12-4,19 (m, 4H), 2,19-2,42 (m, 2H), 1,69-1,74 (m, 1H), 1,55 (s, 3H), 1,33 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz), 1,26 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz), 1,22 (s, 3H), 1,18-1,21 (m, 1H), 1,03-1,09 (m, 1H).

(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Amino-2-yodopurin-9-il)-2',3'-(dihidroxi)-1'-(fosfometilen)-biciclo[3.1.0]hexano (7a). El nucleósido 29a (10 mg, 0,017 mmoles) se coevaporó con tolueno anhidro ( $3 \times 3$  ml) y se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (2 ml). A esta disolución se añadió yodotrimetilsilano (25  $\mu\text{l}$ , 0,17 mmoles). Tras agitar durante 17 h, la  
60 mezcla de reacción se enfrió hasta  $0^\circ\text{C}$ , seguido de la adición de  $\text{H}_2\text{O}$  enfriada con hielo (20 ml) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se lavó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 35$  ml) y éter dietílico ( $4 \times 35$  ml). La fase acuosa resultante se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante HPLC (tiempo de retención: 20 min.) para producir 7a (4,1 mg, 49%) como un sólido blanco. ESI-HRMS  $m/z$  465,9777 ( $[\text{M} - \text{H}]^-$ ,  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{IN}_5\text{O}_5\text{P}$ ; Calc. 465,9771); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,19 (s, 1H), 4,71 (s, 1H), 4,58 (d, 1H,  $J = 5,8$  Hz), 3,98 (d, 1H,  $J = 5,8$  Hz), 3,13 (q, 4H,  $J = 7,2$  Hz), 2,17 (t, 1H, 15,5 Hz), 1,90 (t, 1H, 15,5 Hz), 1,68-1,74 (m, 1H), 1,35-1,42 (m, 1H), 1,21 (t, 6H,  $J =$

7,2 Hz), 0,88-0,94 (m, 1H). RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  25,39. Pureza >99% mediante HPLC (tiempo de retención: 5,9 min.).

5 Fosfonato de dietil-(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-amino-2-yodopurin-9-il)-2',3'-(dihidroxi)-biciclo[3.1.0]hexano (16a). A una disolución que contiene 29a (6 mg, 11,2  $\mu\text{moles}$ ) en  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (2 ml, 1:1, v/v) se añadió resina Dowex-50 (~50 Mg). La mezcla se agitó durante 3 h a 70°C, y la resina se eliminó mediante filtración. El filtrado se evaporó hasta sequedad, y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-8% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v) para producir el nucleósido 16a (4,5 mg, 49%) como un sólido blanco.  $R_f$  = 0,2 (MeOH al 5% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v); ESI-HRMS  $m/z$  524,0562  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_5\text{P}\cdot\text{H}^+$ : Calc. 524,0560; RMN  $^1\text{H}$  (MeOD- $d_4$ )  $\delta$  8,25(s, 1H), 4,77-4,81 (m, 2H), 4,10-4,19 (m, 4H), 3,98 (d, 1H,  $J$  = 6,8 Hz), 2,35-2,52 (m, 1H), 1,68-1,73 (m, 1H), 1,49-1,52 (m, 1H), 1,29-1,35 (m, 6H), 0,85-0,91 (m, 1H).

15 Fosfonato de dietil-(1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-amino-2-cloropurin-9-il)-2',3'-(hidroxi)-biciclo[3.1.0]hexano (9a). A una disolución que contiene 30a (25 Mg, 0,053 mmoles) en MeOH (3 ml) y agua (3 ml) se añadió resina Dowex-50 (~100 mg). La mezcla se agitó durante 3 h a 70°C, y la resina se eliminó mediante filtración. El filtrado se evaporó hasta sequedad, y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 10% en EtOAc, v/v) para producir el nucleósido 9a (8,3 mg, 40%) como un sólido blanco.  $R_f$  = 0,4 (MeOH al 10% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v); ESI-HRMS  $m/z$  432,1197  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{ClN}_5\text{O}_5\text{P}\cdot\text{H}^+$ : Calc. 432,1204; RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,31 (s, 1H), 4,73-4,79 (m, 2H), 4,06-4,18 (m, 4H), 3,98 (d,  $J$  = 6,6 Hz), 2,23-2,54 (m, 1H), 1,92-2,03 (m, 1H), 1,72-1,78 (m, 1H), 1,51-1,57 (m, 1H), 1,28-1,35 (m, 6H), 0,80-0,89 (m, 1H).

25 (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4'-(6-Amino-2-cloropurin-9-il)-1'-[(E)-etenilfosfonato de diisopropilo]-2,3-(dihidroxi)-biciclo[3.1.0]-hexano (11a). A una disolución que contiene 38a (10 mg, 19,5  $\mu\text{moles}$ ) en  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (4 ml, 1:1, v/v) se añadió resina Dowex-50 (~50 mg). La mezcla se agitó durante 3 h a 70°C, y la resina se eliminó mediante filtración. El filtrado se evaporó hasta sequedad, y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH al 0-10% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v) para producir el nucleósido 11a (4,5 mg, 49%) como un sólido blanco.  $R_f$  = 0,3 (MeOH al 10% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , v/v); ESI-HRMS  $m/z$  474,1679  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{ClN}_5\text{O}_5\text{P}\cdot\text{H}^+$ : Calc. 474,1673; RMN  $^1\text{H}$  (MeOD- $d_4$ )  $\delta$  8,06 (s, 1H), 4,76 (d, 1H,  $J$  = 6,9 Hz), 4,65-4,71 (m, 3H), 4,07 (d, 1H,  $J$  = 6,9 Hz), 3,67-3,72 (m, 1H), 3,55-3,59 (m, 1H), 2,10-2,16 (m, 1H), 1,80-2,03 (m, 1H), 1,47-1,52 (m, 1H), 1,28-1,41 (m, 13H), 0,66-0,72 (m, 1H).

### Protocolos experimentales para evaluación biológica

35 Ratones CSQ y administración de compuestos: Se criaron ratones que presentan el modelo CSQ de cardiomiopatía severa e insuficiencia cardíaca, y se mantuvieron según el método descrito previamente. Los ratones transgénicos (TG) CSQ fueron proporcionados originalmente por el Dr. Larry Jones, y desarrollaron hipertrofia seguido de un fenotipo de insuficiencia cardíaca letal con muerte próxima a la edad de 3 meses.

40 El compuesto 3 y sus análogos se disolvieron en disolución salina amortiguada con fosfato, pH=7,4 a 3,3  $\mu\text{M}$  (200  $\mu\text{l}$  de volumen total), se filtraron para la esterilidad para la administración *in vivo* a 6  $\mu\text{l}$  por día durante 28 días vía una minibomba osmótica (Alzet) en ratones CSQ. La función cardíaca intacta *in vivo* se evaluó mediante ecocardiografía tras la infusión de nucleótido o vehículo.

45 Ecocardiografía de ratón: La ecocardiografía transtorácica se llevó a cabo usando un transductor de 30 MHz lineal según las instrucciones del fabricante (Sistema de Formación de Imágenes de Alta Resolución Vevo 660 de VisualSonics, Toronto, Canadá) similar a los métodos descritos previamente. Se llevaron a cabo medidas ecocardiográficas en modo M bidimensionales al nivel del músculo papilar medio. Los ratones se anestesiaron con 1% de isoflurano usando un vaporizador como se describió previamente. Se midieron los diámetros diastólico final (LVEDD) y sistólico final (LVESD) del ventrículo izquierdo, y FS (definido como LVEDD-LVESD/LVEDD). Los parámetros se midieron digitalmente en trazadores en modo M, y se promediaron a partir de más de 3 ciclos cardíacos.

55 Activación de los receptores P2Y<sub>1</sub> humanos: La actividad del receptor hP2Y<sub>1</sub> se cuantificó en células de astrocitoma humanas 1321N1 que expresan de forma estable este receptor, obtenidas del Prof. T. K. Harden, University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, NC. Se ha descrito el procedimiento para medir calcio intracelular usando un FLIPR en respuesta a derivados nucleotídicos. Las células se hicieron crecer toda la noche en 100 ml de medio en placas de fondo plano de 96 pocillos a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> o hasta que alcanzaron una confluencia de ~80%. Se usó el kit de ensayo calcio-4 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) como se instruye, sin lavado de las células. Las células se cargaron con 40 ml de colorante con probenecida en cada pocillo, y se incubaron durante 1 h a rt. La placa de los compuestos se preparó con diluciones de diversos compuestos en amortiguador de Hank a pH 7,2. Las muestras se estudiaron por duplicado con un FLIPR-Tetra (Molecular Devices) a rt. Se monitorizó la fluorescencia celular (excitación = 485 nm; emisión = 525 nm) tras la exposición a un compuesto. Los incrementos en el calcio intracelular se dan a conocer como el valor de fluorescencia máxima tras la exposición menos el valor de fluorescencia basal antes de la exposición.

65

Análisis de los datos: Excepto que se indique de otro modo, los datos se proporcionan como media  $\pm$  error estándar de la media. Para el análisis de múltiples grupos, se usó ANOVA de una vía y la comparación de post-ensayo. Para evaluar los efectos de intervenciones experimentales, se usó la prueba de la t de Student para muestras pareadas o no pareadas;  $P < 0,05$  se tomó como estadísticamente significativo.

5 Los términos “un” y “una” no representan una limitación de cantidad, sino más bien representan la presencia de al menos uno de los artículos citados. El término “o” significa “y/o”. Las expresiones “que comprende”, “que tiene”, “que incluye”, y “que contiene”, se han de interpretar como términos de extremos abiertos (es decir, queriendo decir “que incluye, pero no se limita a”). La cita de intervalos de valores pretende meramente servir como un método taquigráfico para referirse individualmente a cada valor independiente que cae dentro del intervalo, excepto que se indique de otro modo en la presente memoria, y cada valor independiente se incorpora en la memoria descriptiva como si se citase individualmente en la presente memoria. Los puntos finales de todos los intervalos están incluidos dentro del intervalo, y se pueden combinar de forma independiente. Todos los métodos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo en un orden adecuado excepto que se indique de otro modo en la presente memoria o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, “tal como”), pretende meramente ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación sobre el alcance de la invención excepto que se reivindique de otro modo. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención como se usa en la presente memoria.

20 Los compuestos químicos se describen usando nomenclatura estándar. Excepto que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido normalmente por alguien de pericia en la técnica a la que pertenece esta invención.

25 Las fórmulas incluyen todas las subfórmulas de las mismas. Por ejemplo, las fórmulas I-VI incluyen sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y otros derivados, hidratos, polimorfos, y de los mismos.

30 Todas las formas (por ejemplo, solvatos, isómeros ópticos, formas enantioméricas, polimorfos, compuesto libre y sales) de un agente activo se pueden emplear solas o en combinación.

35 En ciertas situaciones, los compuestos de las fórmulas pueden contener uno o más elementos asimétricos tales como centros estereogénicos, incluyendo centros quirales, ejes estereogénicos y similares, por ejemplo átomos de carbono asimétricos, de manera que los compuestos pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas. Estos compuestos pueden ser, por ejemplo, racematos o formas ópticamente activas. Para compuestos con dos o más elementos asimétricos, estos compuestos pueden ser adicionalmente mezclas de diastereómeros. Para compuestos que tienen centros asimétricos, se debería entender que todos los isómeros ópticos y sus mezclas están englobados. Además, los compuestos con dobles enlaces carbono-carbono pueden aparecer en formas Z y E, estando todas las formas isoméricas de los compuestos incluidas en la presente invención. Las fórmulas I-VI incluyen todas las formas quirales, estereoisómeros, diastereómeros, y enantiómeros de los compuestos de fórmula I-VI.

40 Un guión (“-”) que no está entre dos letras o símbolos se usa para indicar un punto de unión para un sustituyente. Por ejemplo,  $-(\text{CH}_2)\text{cicloalquilo}$  de  $\text{C}_3\text{-C}_7$  está unido a través del carbono del grupo metilénico ( $\text{CH}_2$ ).

45 ilo, acetilo y propanoilo.

50 “Alquilo” es un grupo hidrocarbonado alifático saturado de cadena ramificada o lineal, que tiene el número especificado de átomos de carbono, generalmente de 1 a alrededor de 12 átomos de carbono. El término alquilo de  $\text{C}_1\text{-C}_4$ , como se usa en la presente memoria, indica un grupo alquilo que tiene de 1 a alrededor de 4 átomos de carbono. Otras formas de realización incluyen grupos alquilo que tienen de 1 a 8 átomos de carbono, 1 a 6 átomos de átomos de carbono, o de 1 a 2 átomos de carbono, por ejemplo alquilo de  $\text{C}_1\text{-C}_8$ , alquilo de  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , y alquilo de  $\text{C}_1\text{-C}_2$ .

55 “Alquenilo” es una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que comprende uno o más dobles enlaces carbono-carbono insaturados, que puede aparecer en cualquier punto estable a lo largo de la cadena. Los grupos alquenilo descritos en la presente memoria tienen el número indicado de átomos de carbono. Alquenilo de  $\text{C}_2\text{-C}_6$  indica un grupo alquenilo de 2 a alrededor de 6 átomos de carbono. Cuando no se indica ningún número de átomos de carbono, los grupos alquenilo descritos en la presente memoria tienen típicamente de 2 a alrededor de 12 átomos de carbono, aunque se prefieren grupos alquenilo inferior, que tienen 8 o menos átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen grupos etenilo, propenilo, y butenilo.

60 “Alcoxi” indica un grupo alquilo como se define anteriormente con el número indicado de átomos de carbono unidos a través de un puente de oxígeno (-O-). Los ejemplos de alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, 2-butoxi, t-butoxi, n-pentoxi, 2-pentoxi, 3-pentoxi, isopentoxi, neopentoxi, n-hexoxi, 2-hexoxi, 3-hexoxi, y 3-metilpentoxi. Los grupos alcoxi incluyen, por ejemplo, grupos metoxi.

“Halo” o “halógeno indica fluoro, cloro, bromo, y yodo.

Las “sales farmacéuticamente aceptables” incluyen derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto parental se modifica obteniendo sales de adición de ácidos o bases inorgánicas y orgánicas, no tóxicas, de los mismos. Las sales de los presentes compuestos se pueden sintetizar a partir del compuesto parental que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar formas de ácidos libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido, carbonato, bicarbonato, o similar, de Na, Ca, Mg, o K), o haciendo reaccionar formas de bases libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Tales reacciones se llevan a cabo típicamente en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo, cuando sea posible. Las sales de los presentes compuestos incluyen además solvatos de los compuestos y de las sales de los compuestos.

Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de restos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de restos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales y las sales de amonio cuaternario del compuesto parental formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, las sales de ácidos no tóxicos convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico, y similar; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, mesílico, esílico, besílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico,  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ , en el que n es 0-4, y similar. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., p. 1418 (1985), por ejemplo, se pueden encontrar listas de sales adecuadas adicionales. Otras sales ejemplares son las sales amínicas del grupo ácido fosfónico o fosfínico, incluyendo sales de aminas orgánicas tales como sal de trietilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de etanolamina, sal de trietanolamina, sal de dicitlohexilamina, sal de N,N'-dibenciletilendiamina, y similar; y sales de aminoácidos tales como arginato, asparginato, glutamato, y similar; y combinaciones que comprenden una o más de las sales anteriores.

Aunque la invención se ha descrito haciendo referencia a una forma de realización preferida, se entenderá por un experto en la materia que se pueden introducir diversos cambios y se pueden sustituir equivalentes por sus elementos sin separarse del alcance de la invención. Además, se pueden introducir muchas modificaciones para adaptarla a una situación particular o material a las enseñanzas de la invención sin apartarse de su alcance esencial. Por lo tanto, se pretende que la invención no esté limitada a la forma de realización particular descrita como el mejor modo contemplado para poner en práctica esta invención, sino que la invención incluirá todas las formas de realización que están comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Todas las patentes, solicitudes de patente, y otras referencias citadas se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.

#### Abreviaturas:

5'-AMP, 5'-monofosfato de adenosina;  
 CSQ, calsecuestrina;  
 DIBAL-H, hidruro de diisobutilaluminio;  
 DMEM, medio de Eagle modificado de Dulbecco;  
 FS, acortamiento fraccionario;  
 HEPES, ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico;  
 HPLC, cromatografía de líquidos de altas prestaciones;  
 HRMS, espectroscopía de masas de alta resolución;  
 LV, ventrículo izquierdo;  
 LVEDD, diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo;  
 LVESD, diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo;

MRS2339, (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(6-amino-2-cloro-9H-purin-9-il)-1-[fosforiloximetil]biciclo[3.1.0]hexano-2,3-diol;

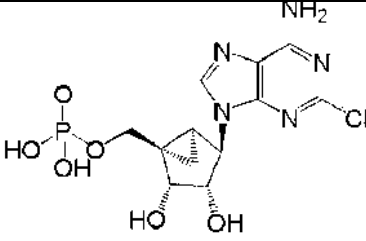
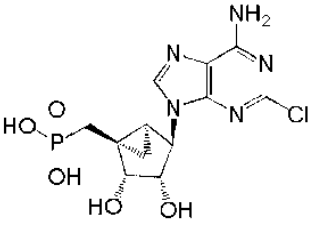
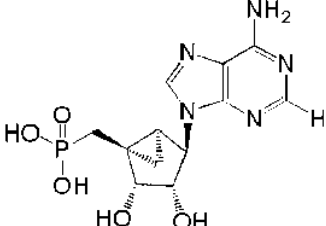
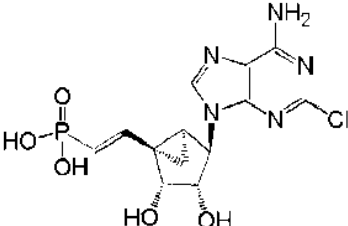
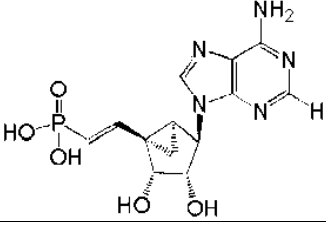
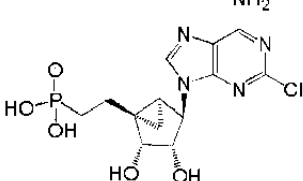
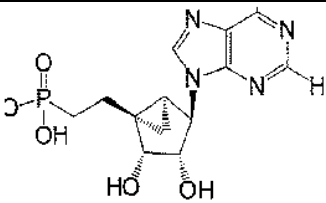
NS, disolución salina normal;  
 PLC, fosfolipasa C;  
 SAR, relación estructura-actividad;  
 TBAF, fluoruro de tetrabutilamonio;  
 TBAP, fosfato de tetrabutilamonio;  
 TBDPS-Cl, *tert*-butil(cloro)difenilsilano;  
 THF, tetrahidrofurano;

TEAA, acetato de. trietilamonio

### Esquemas

- 5 Esquema 1: Reactivos y condiciones: a) *tert*-Butilclorodifenilsilano, imidazol, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> an., 93%; b) DIBAL-H, THF an., 82%; c) cloruro de metanosulfonilo, trietilamina, Chic12 an., 96%; d) NaI, 65°C, 1,4-dioxano an., 95%; e) fosfito de trietilo, 110°C; f) TBAF, THF, 88%.
- 10 Esquema 2: Reactivos y condiciones: a) trifetilfosfina, 2,6-dicloropurina, azodicarboxilato de diisopropilo, THF an., 75%; b) NH<sub>3</sub> 2 M en *i*-PrOH, 70°C, 80% para 9, 79% para 11; c) yodotrimetilsilano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> an., 23% para 4 y 27% para 5; d) trifetilfosfina, 6-cloropurina, azodicarboxilato de diisopropilo, THF an., 87%.
- 15 Esquema 3: Reactivos y condiciones: a) peryodinano de Dess-Martin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> an., 80%; b) metilendifosfonato de tetraisopropilo, NaH, THF an., 83%; c) NH<sub>3</sub> 2 M en *i*-PrOH, 70°C, 80%; d) Pd al 10%/C, H<sub>2</sub> (3 bares), MeOH:NaOH ac. 2M (1:1, v/v), 79%; e) yodotrimetilsilano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> an., 47% para 10 y 28% para 7; d) trifetilfosfina, 6-cloropurina, azodicarboxilato de diisopropilo, THF an., 87%.
- 20 Esquema 4: Reactivos y condiciones: a) peryodinano de Dess-Martin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> an., 72%; b) metilendifosfonato de tetraisopropilo, NaH, THF an., 48%; c) TBAF, THF, 88%; d) trifetilfosfina, 6-cloropurina, azodicarboxilato de diisopropilo, THF an., 85%; e) NH<sub>3</sub> 2 M en *i*-PrOH, 70°C, 85%; e) yodotrimetilsilano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> an., 78%.
- 25 Esquema 5: Reactivos y condiciones: a) Pd al 10%/C, H<sub>2</sub> (3 bares), MeOH, 72%; b) trifetilfosfina, 2,6-dicloropurina, azodicarboxilato de diisopropilo, THF an., 40%; c) NH<sub>3</sub> 2 M en *i*-PrOH, 70°C, 71%; d) yodotrimetilsilano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> an., 45%.
- 30 Esquema 6: Reactivos y condiciones: a) CBr<sub>4</sub>, trifetilfosfina, trietilamina, 81%; b) fosfito de dietilo y metilo, 110°C, 95%; c) TBAF, THF, 91%, d) trifetilfosfina, 2,6-dicloropurina, azodicarboxilato de diisopropilo, THF an., 75%; e) NH<sub>3</sub> 2 M en *i*-PrOH, 70°C, 60%; f) yodotrimetilsilano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> an., 20% de rendimiento combinado.
- 35 Esquema 7: A) Análisis retrosintético de 5'-fosfonato y 5'-metilfosfonatos de derivados de (N)-metanocarba adenina o 2-Cl adenina. B) Análisis retrosintético de 5'-fosfonatos de cadena larga saturados e insaturados de derivados de (N)-metanocarba adenina o 2-Cl adenina.
- 40 Esquema 1a: Reactivos y condiciones: a) ácido trifluoroacético acuoso al 10%, 60%; b) i) cloruro de tiofosforilo, 1,8-bis-(dimetilamino)naftaleno (esponja de protones), piridina, ii) paralizar la reacción con bicarbonato de tetraetilamonio (TEAB); c) i) cloruro de tiofosforilo, 1,8-bis-(dimetilamino)naftaleno (esponja de protones), piridina, ii) paralizar la reacción con EtOH; d) trifetilfosfina, I<sub>2</sub>, imidazol, THF anhidro, 74%, e) Dowex-50, MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), 70°C; f) O,O-dietiltiofosfato de sodio, EtOH; THF; g) tiofosfato de trisodio, H<sub>2</sub>O, 57%; h) sal potásica de ditiofosfato de dietilo, DMF.
- 45 Esquema 2a: Reactivos y condiciones: a) NH<sub>3</sub> 2 M en *i*-PrOH, 70°C, 68%; b) LiBD<sub>4</sub>, THF anhidro, 72%; c) i) *N,N'*-dietilfosforamidito de di-*t*-butilo, THF anhidro, tetrazol; ii) ácido *m*-cloroperbenzoico, 76%; d) resina Dowex-50, MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) 70°C.
- 50 Esquema 3a: Reactivos y condiciones: a) trifetilfosfina, 6-cloro-2-yodopurina, azodicarboxilato de diisopropilo, THF an., 70%; b) NH<sub>3</sub> 2 M en *i*-PrOH, 70°C, 64%; c) yodotrimetilsilano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> an., 49% para 7; d) Dowex-50, MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), 70°C, 3 h, 49% para 16, e) i) trimetilsililacetileno, Pd(Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub>CuI, TEA, DMF anhidra ii) TBAF, THF anhidro.
- 50 Esquema 4a: Reactivos y condiciones: a) peryodinano de Dess-Martin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> an.; b) metilendifosfonato de tetraetilo, NaH, THF an.; c) NH<sub>3</sub> 2 M en *i*-PrOH, 70°C; d) O-nitrobencenosulfonilhidrazida, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; e) Dowex-50, MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), 70°C.

Tabla 1. Análogos de fosfonatos: estructura y efectos sobre la función cardíaca *in vivo* según se determina mediante FS derivado de ecocardiografía en ratones CSQ con insuficiencia cardíaca.

Nº	Estructura	FS en % en ratones CSQ <sup>a</sup>	n=
3	 <p>MRS 2339</p>	15,47 ± 1,15	10
4	 <p>MRS2776</p>	20,25 ± 1,19	8
5	 <p>MRS2925</p>	16,23 ± 0,93	13
7		12,12 ± 1,2	11
8		13,88 ± 2,12	8
9	 <p>MRS2925</p>	19,26 ± 1,23	16
10		11,15 ± 1,44	12
11		15,0 ± 1,2	10

12		ND	
<sup>a</sup> a 3,3 μM. Los ratones del control de vehículo presentaron un %FS de 13,78 ± 1,19% (n=16). ND – no determinado.			

Tabla 2. Nuevos análogos de fosfato y fosfonato: estructura y efectos sobre la función cardíaca *in vivo* según se determina mediante FS derivado de ecocardiografía en ratones CSQ con insuficiencia cardíaca.

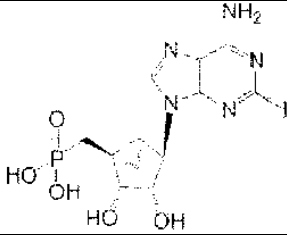
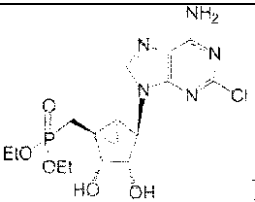
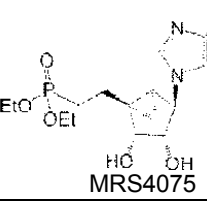
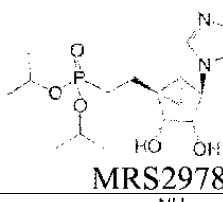
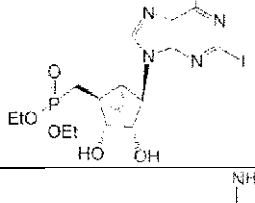
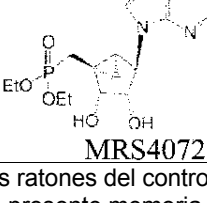
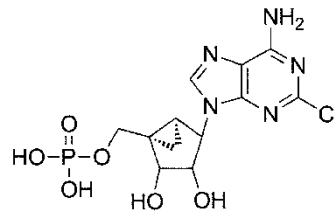
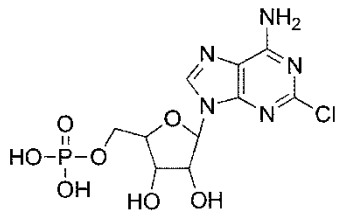
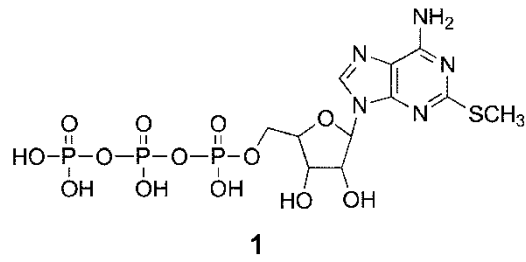
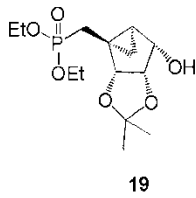
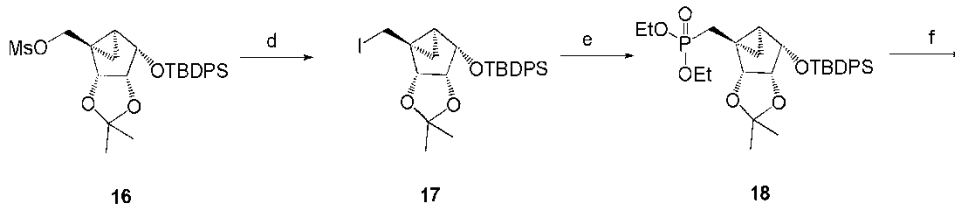
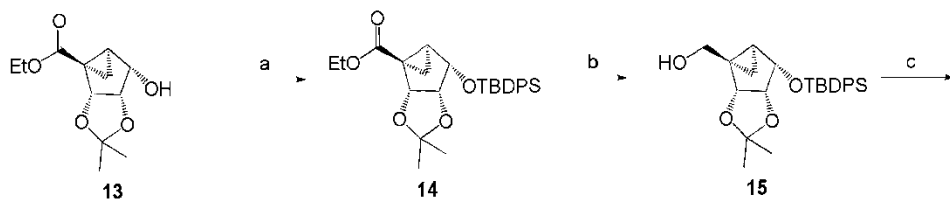
Nº	Estructura	FS en % en ratones CSQ <sup>a</sup>	n=
Nucleótidos cargados			
7a	 <p style="text-align: center;">MRS2972</p>	10,33 ± 1,77	5
Nucleótidos enmascarados			
9a	 <p style="text-align: center;">MRS2944</p>	8,58 ± 2,09	4
10a	 <p style="text-align: center;">MRS4075</p>		
11a	 <p style="text-align: center;">MRS2978</p>	12,94 ± 0,98	6
16a	 <p style="text-align: center;">MRS4071</p>	ND, Ningún efecto esperado	
17a	 <p style="text-align: center;">MRS4072</p>		
<sup>a</sup> a 10 μM. Los ratones del control de vehículo presentaron un %FS de 7,13 ± 1,49% (n= 4). Los ratones CSQ usados en la presente memoria fueron fenotípicamente más severos que los ratones usados para los datos en la Tabla 1. <sup>2</sup> ND – no determinado.			

Diagrama 1

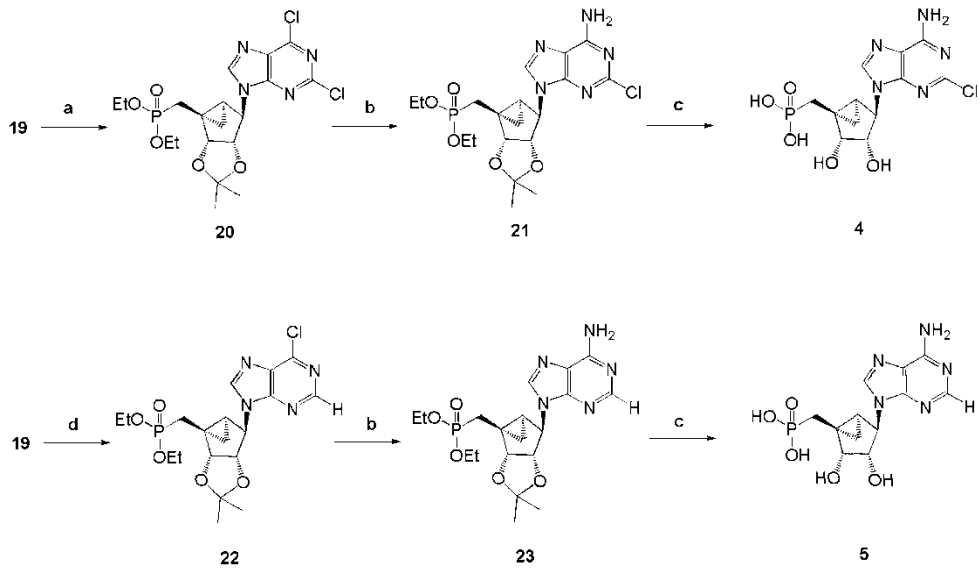


5 Esquema 1

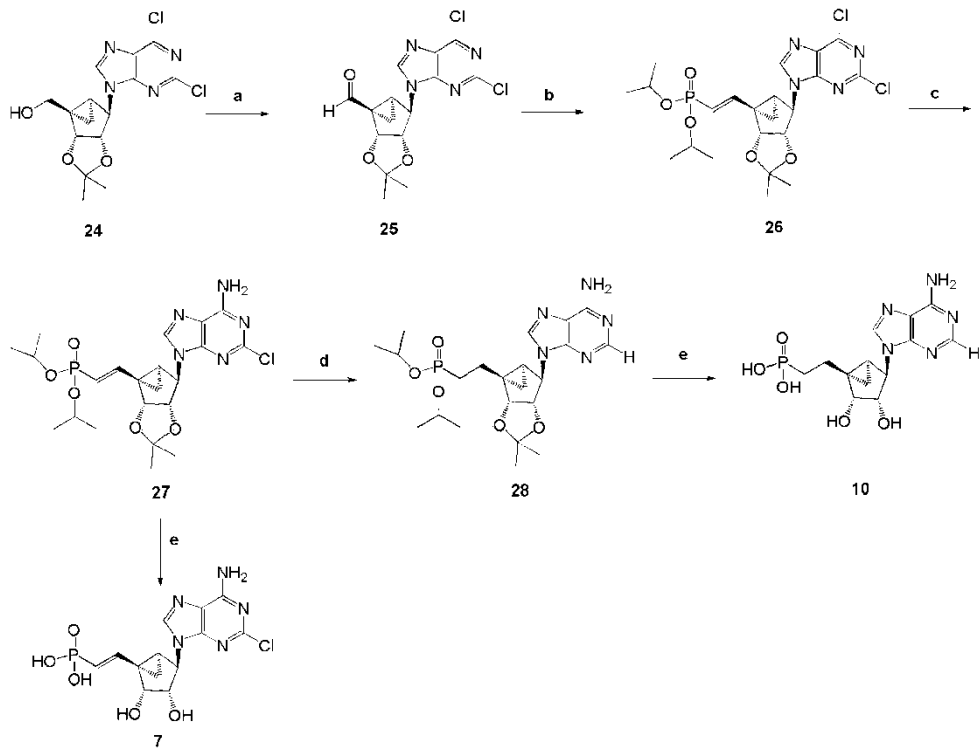




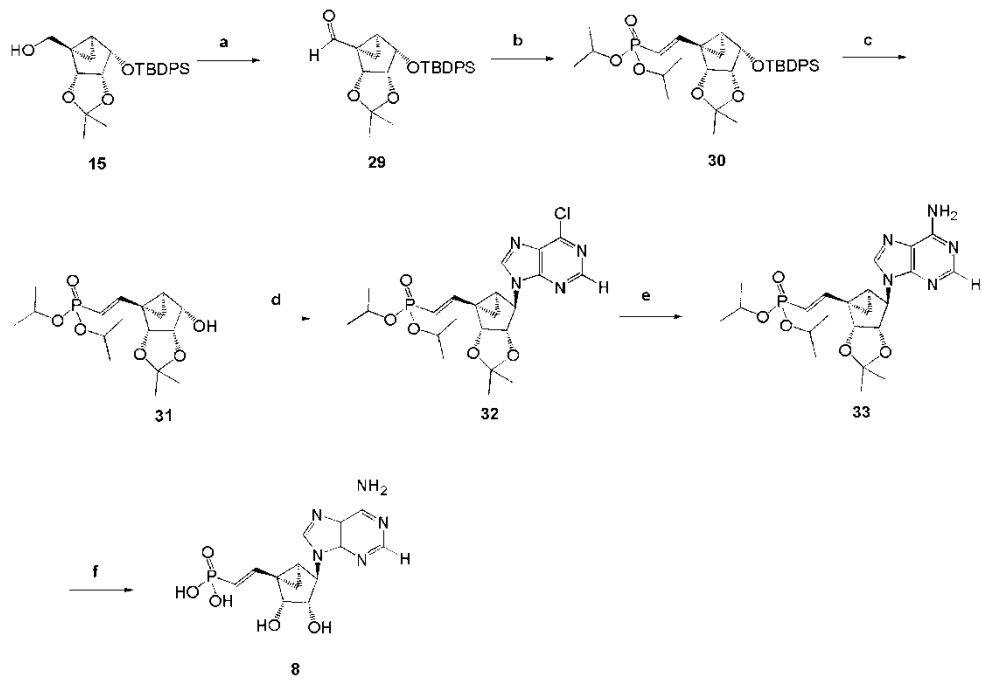
Esquema 2



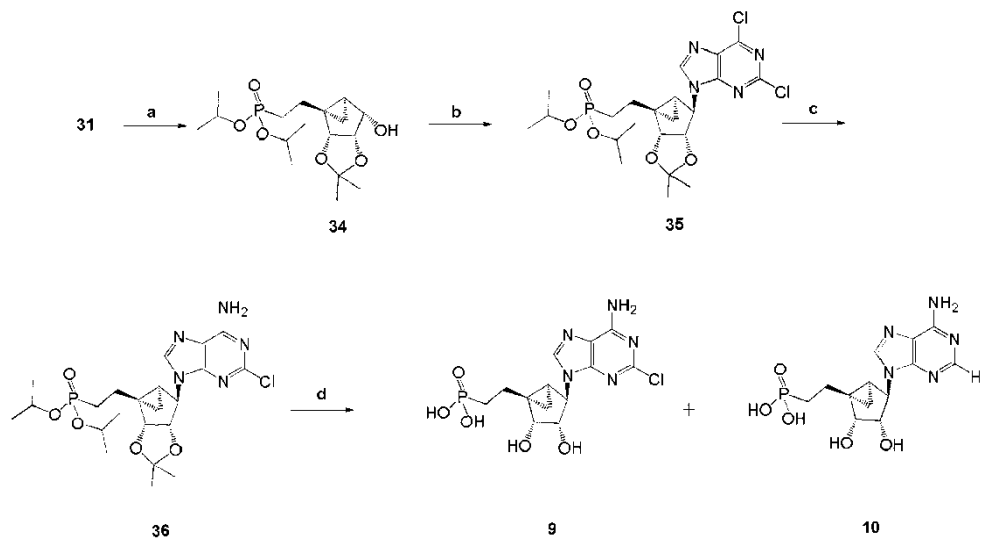
5 Esquema 3



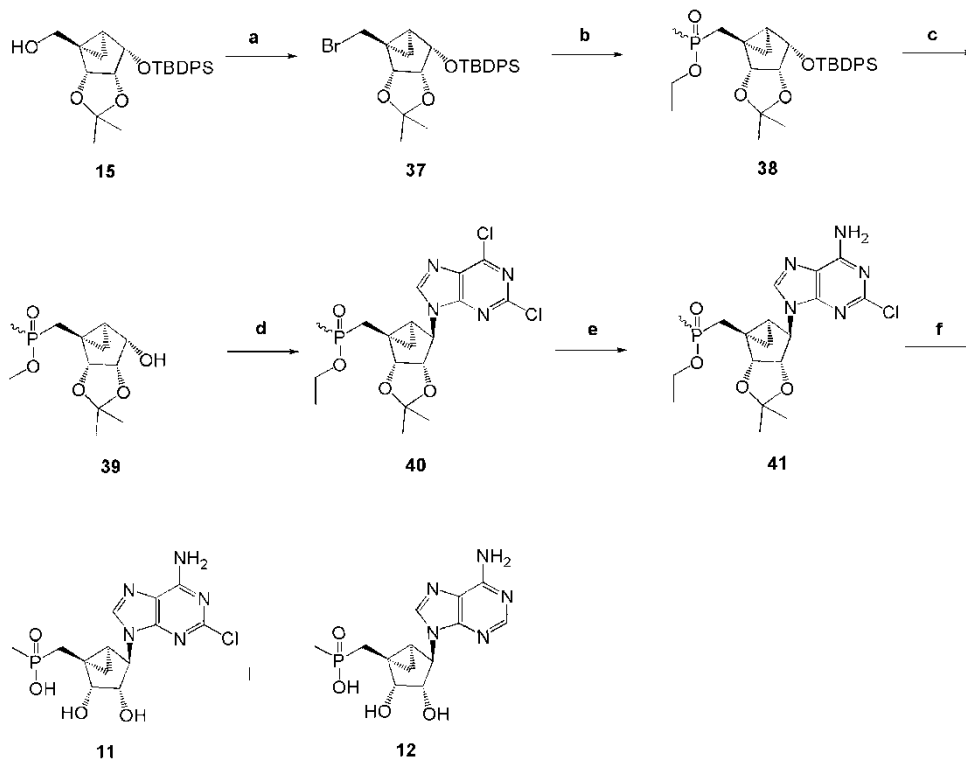
Esquema 4



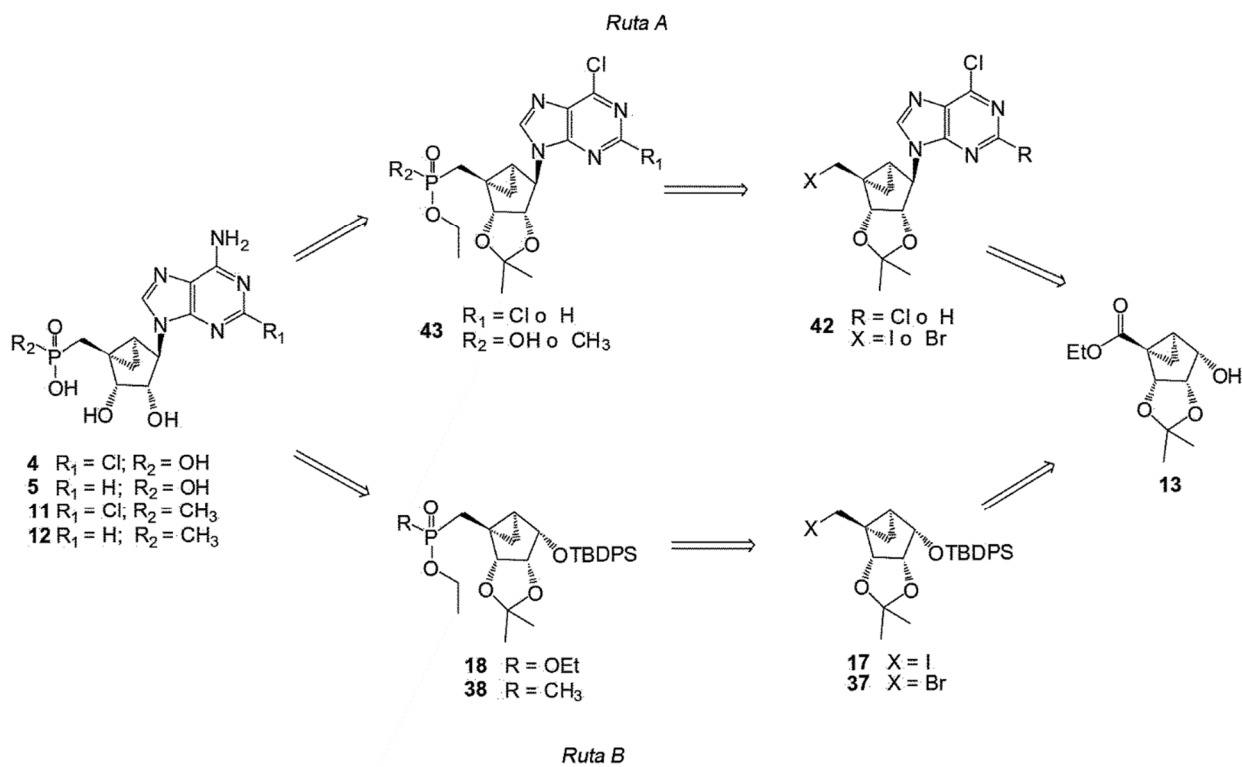
5 Esquema 5



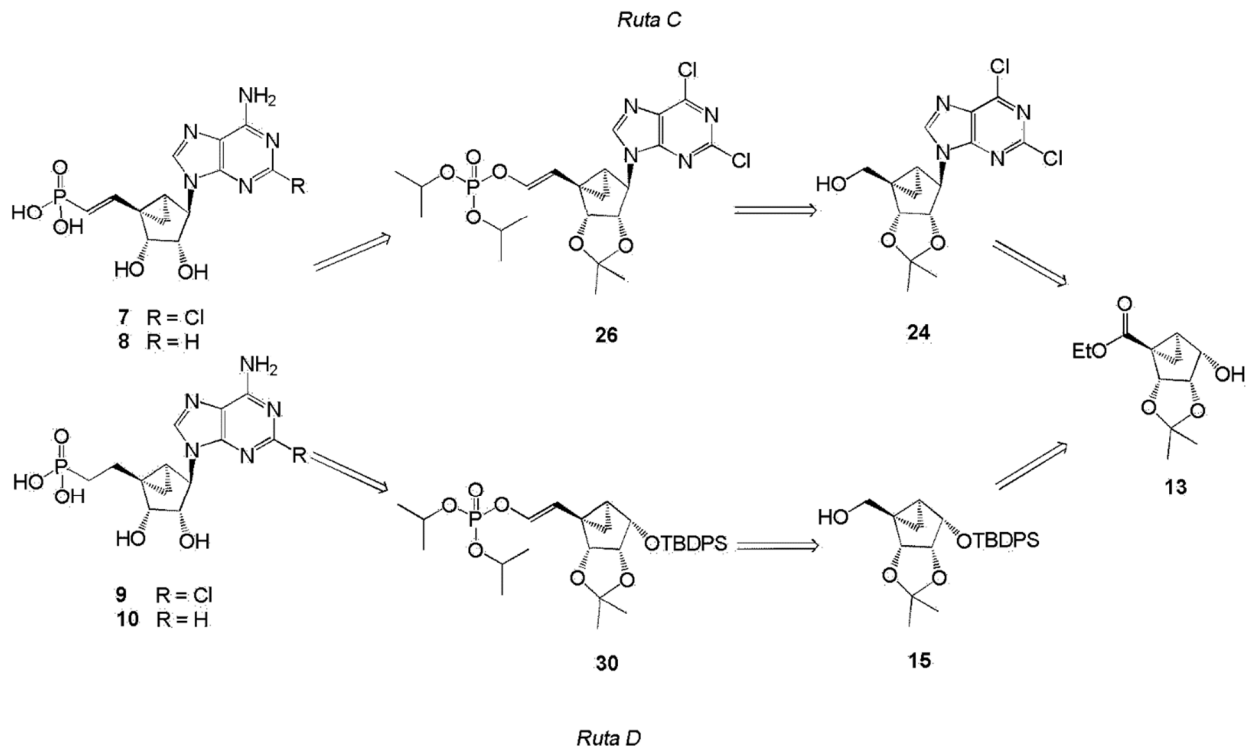
Esquema 6



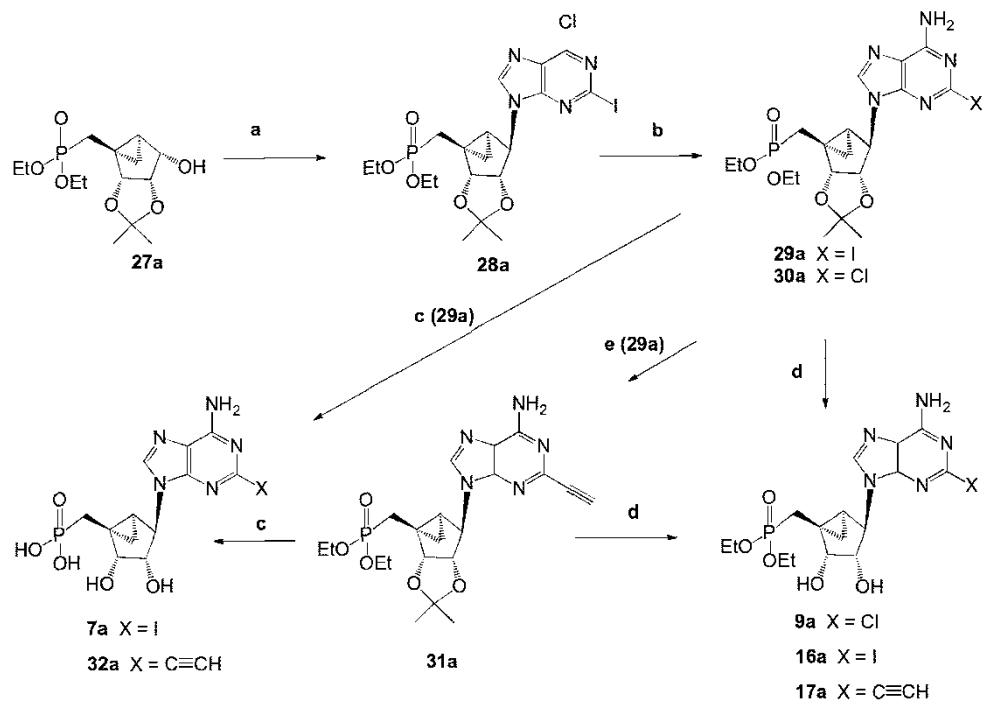
5 Esquema 7A



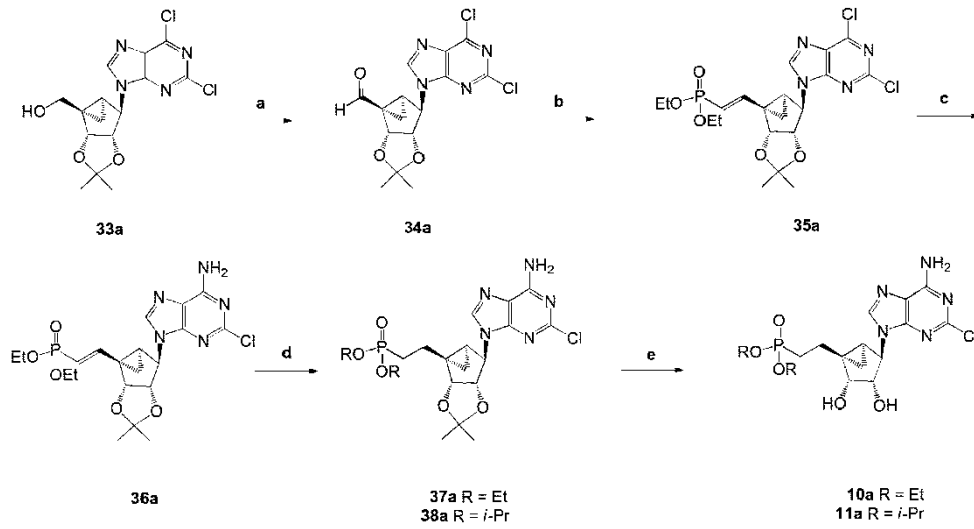
Esquema 7B



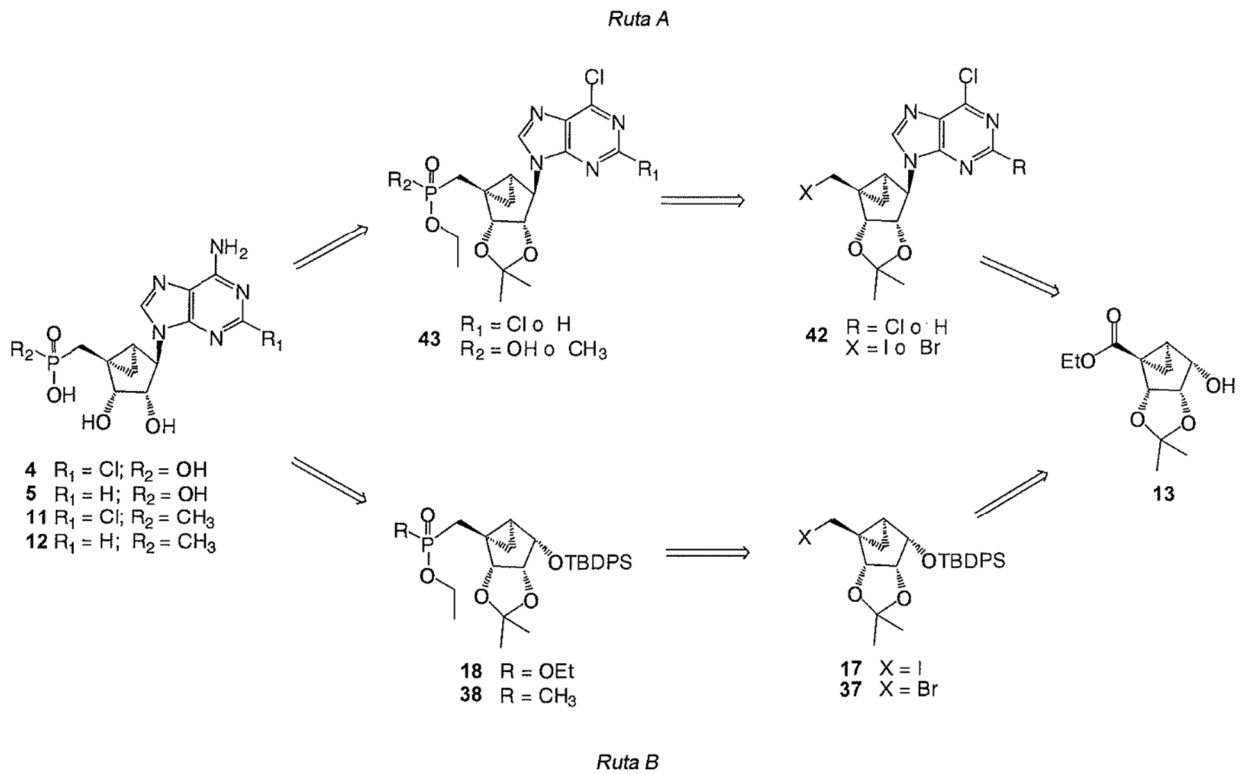
5 Esquema 3a



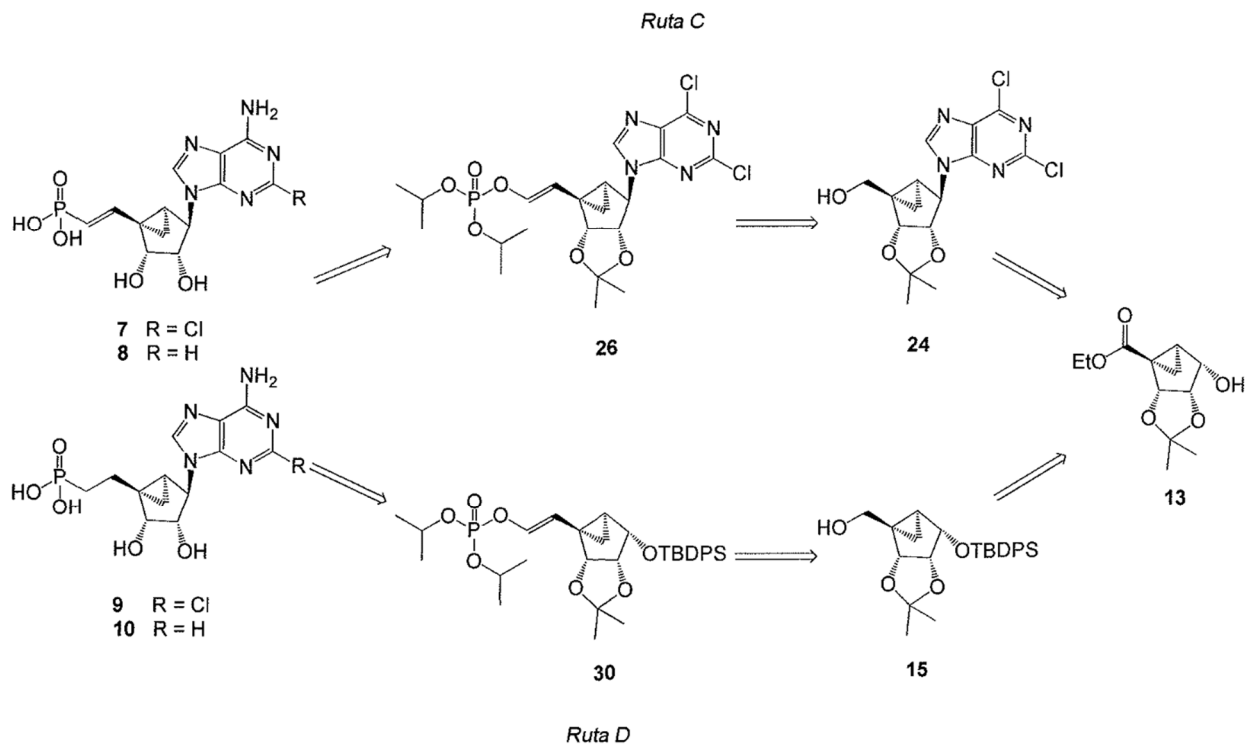
Esquema 4a



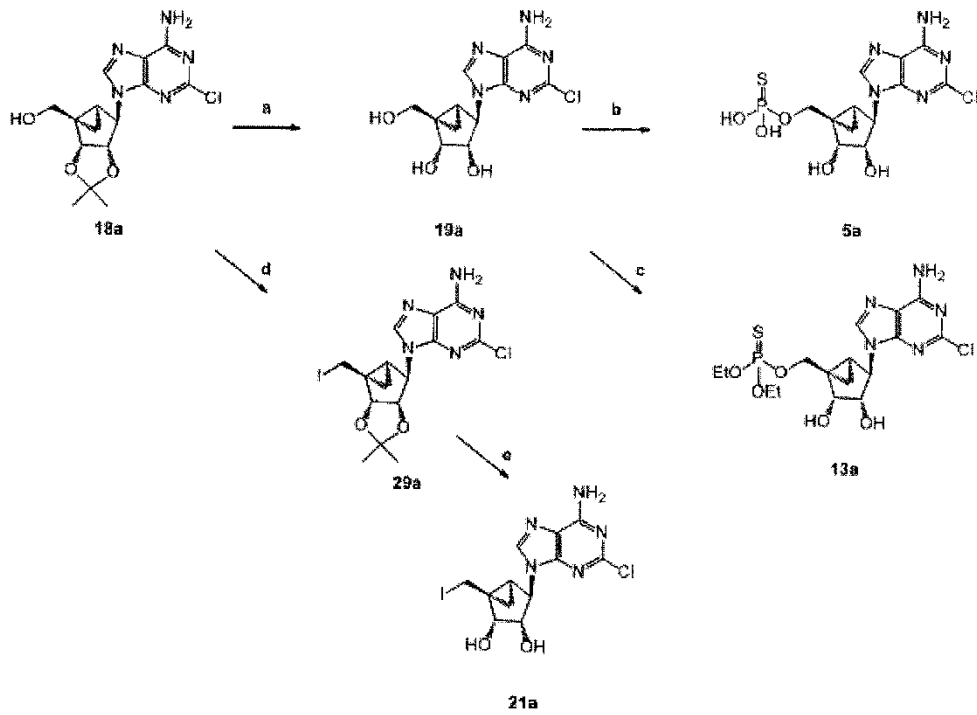
5 Esquema 7A



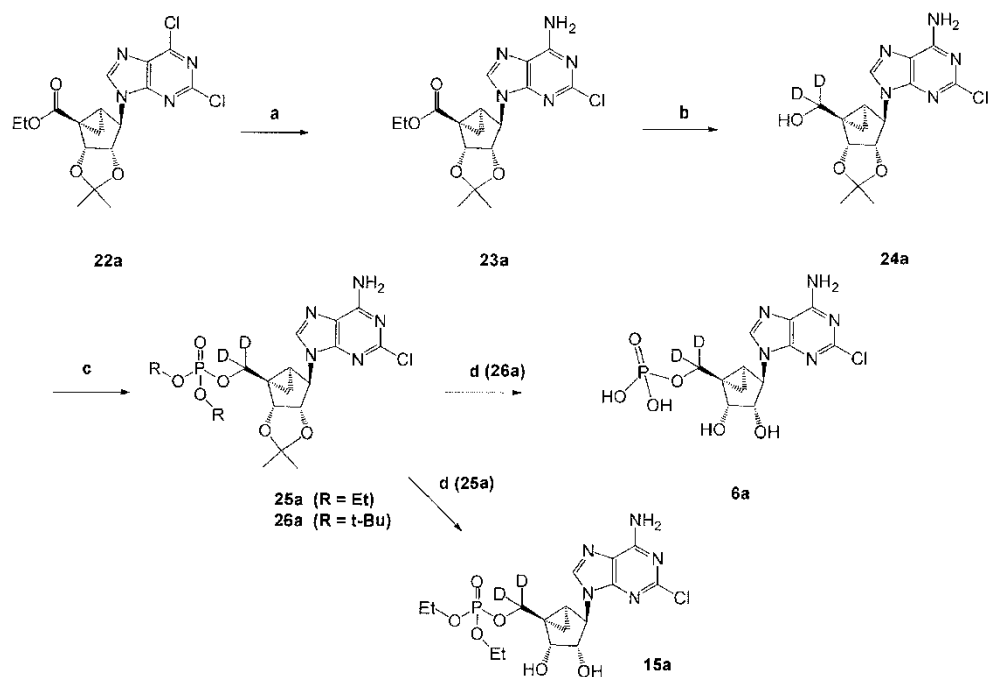
Esquema 7B



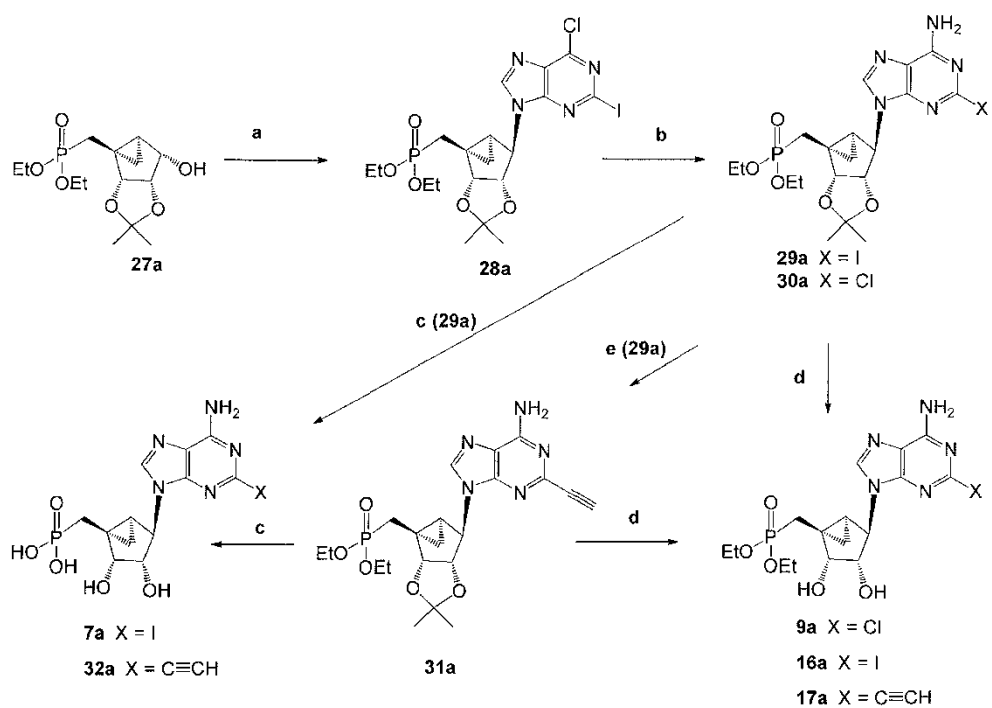
5 Esquema 1a



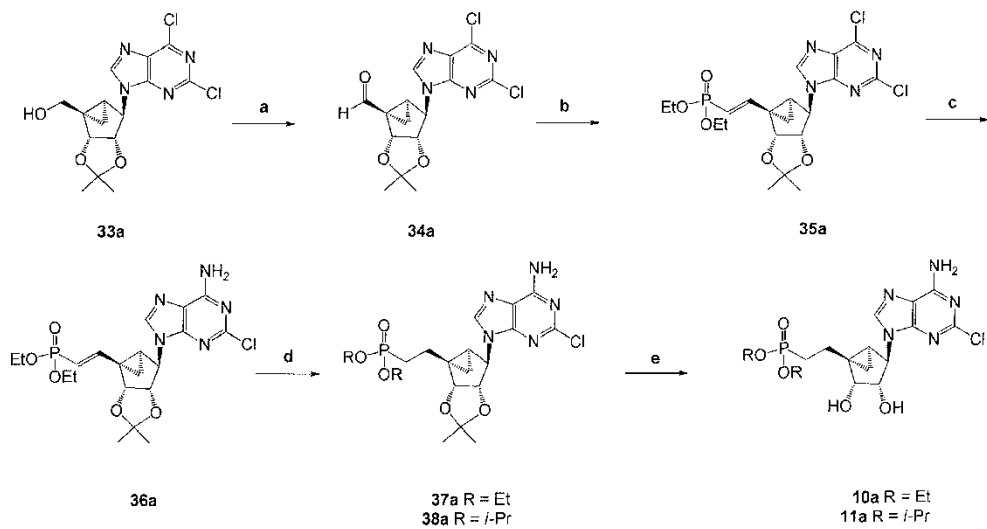
Esquema 2a



5 Esquema 3a



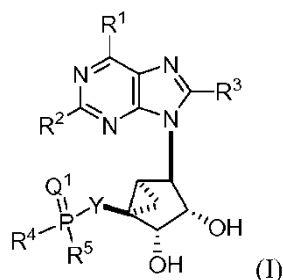
Esquema 4a





REIVINDICACIONES

1. Derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP de fórmula (I)



5

un isómero enriquecido en deuterio del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

Q<sup>1</sup> es O o S;

10

R<sup>1</sup> es hidrógeno o N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>;

R<sup>2</sup> es hidrógeno, alquilo de C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> o halógeno;

15

R<sup>3</sup> es hidrógeno;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente de entre hidroxilo o alcoxi de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

20

o alternativamente, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> forman una estructura cíclica de 5 o 6 miembros con el átomo de fósforo en la que la estructura cíclica contiene por lo menos dos átomos de oxígeno y por lo menos 2 o 3 átomos de carbono;

R<sup>6</sup> se selecciona independientemente de entre hidrógeno o alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; e

25

Y es un grupo enlazante enlazado al átomo de fósforo mediante un átomo de carbono seleccionado de entre alqueno de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alqueno de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

2. Derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP según la reivindicación 1, caracterizado por que

30

Q<sup>1</sup> es O;

R<sup>1</sup> es N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub> en el que cada R<sup>6</sup> es hidrógeno;

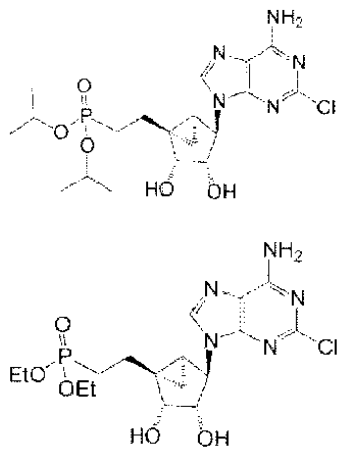
y R<sup>2</sup> es halógeno.

35

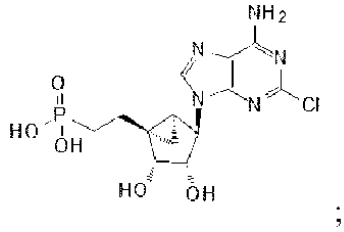
3. Derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP según la reivindicación 2, caracterizado por que Y es un alqueno de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

40

4. Derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP según la reivindicación 1 seleccionado de entre



o



5

5. Composición farmacéutica que comprende el derivado de N-metanocarba de fosfonato o fosfinato de AMP según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, para su utilización en el tratamiento de una enfermedad o afección cardíaca o vascular sensible a la activación del receptor P2X cardíaco y/o vascular en un sujeto mamífero que lo necesite.

15

7. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, para su utilización en la mejora del funcionamiento contráctil cardíaco o de la función cardíaca en un mamífero que la necesite.

8. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, para su utilización en el tratamiento de hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca sistólica, insuficiencia cardíaca diastólica, cardiomiopatía isquémica, cardiomiopatía no isquémica, o remodelado cardíaco adverso tras daño al corazón como resultado de isquemia/reperfusión o causas no isquémicas en un sujeto mamífero que lo necesite.

Figura 1A

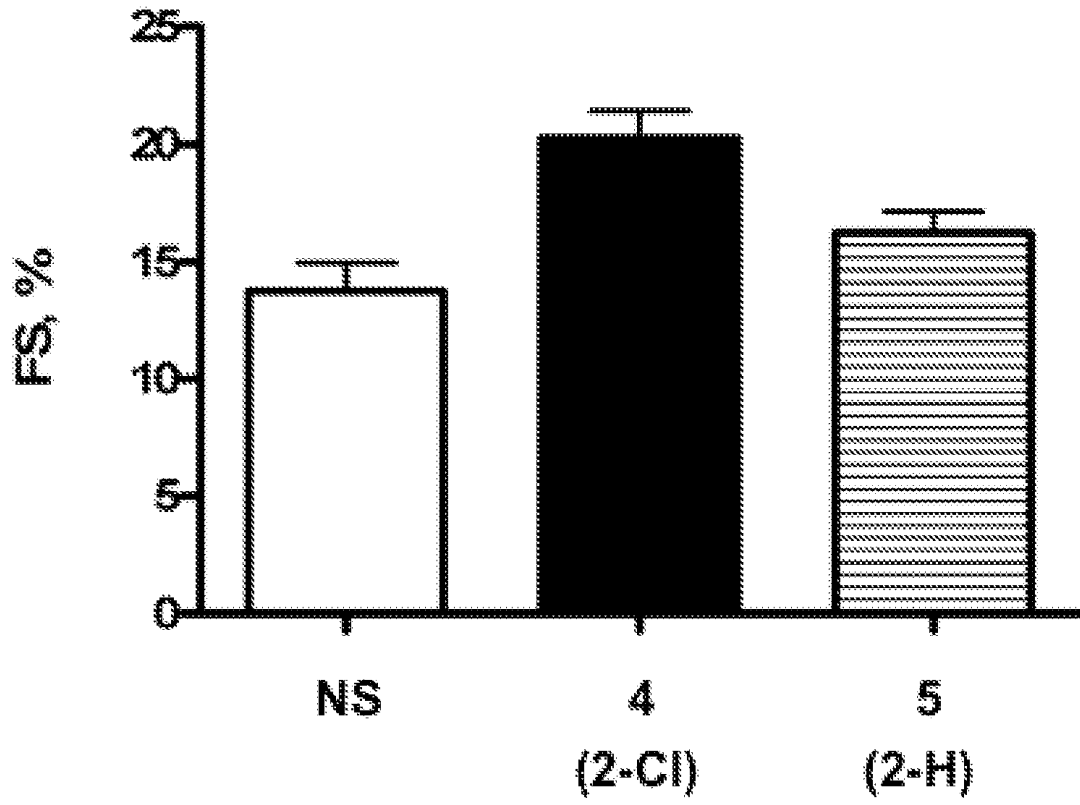


Figura 1B

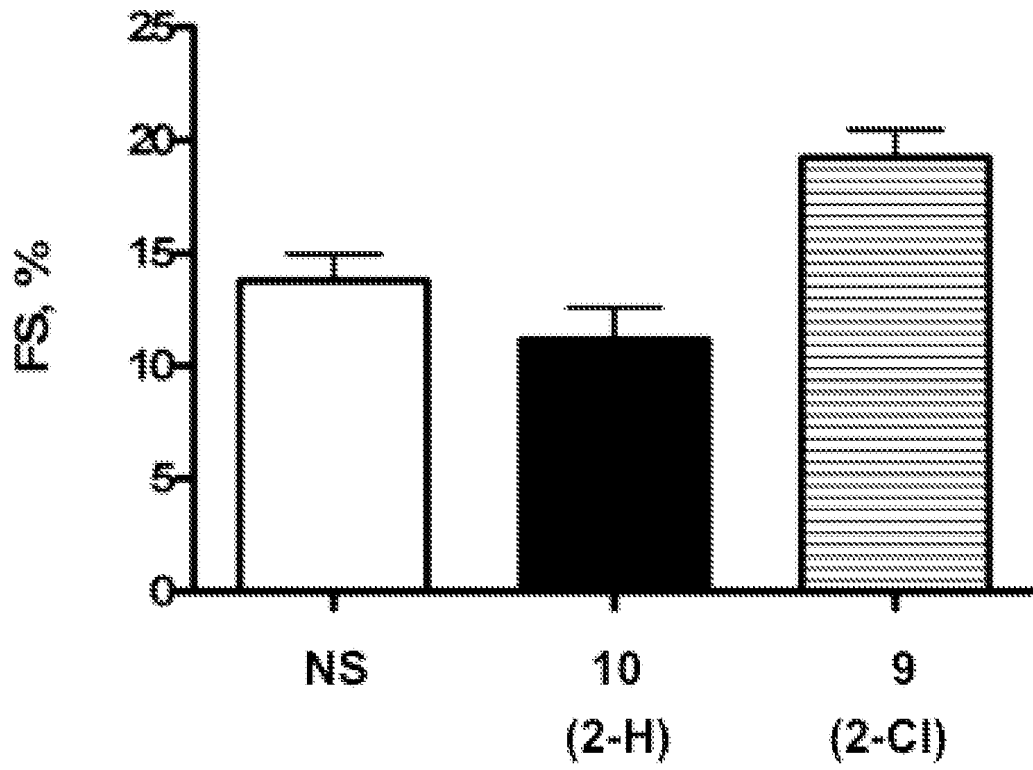


Figura 2

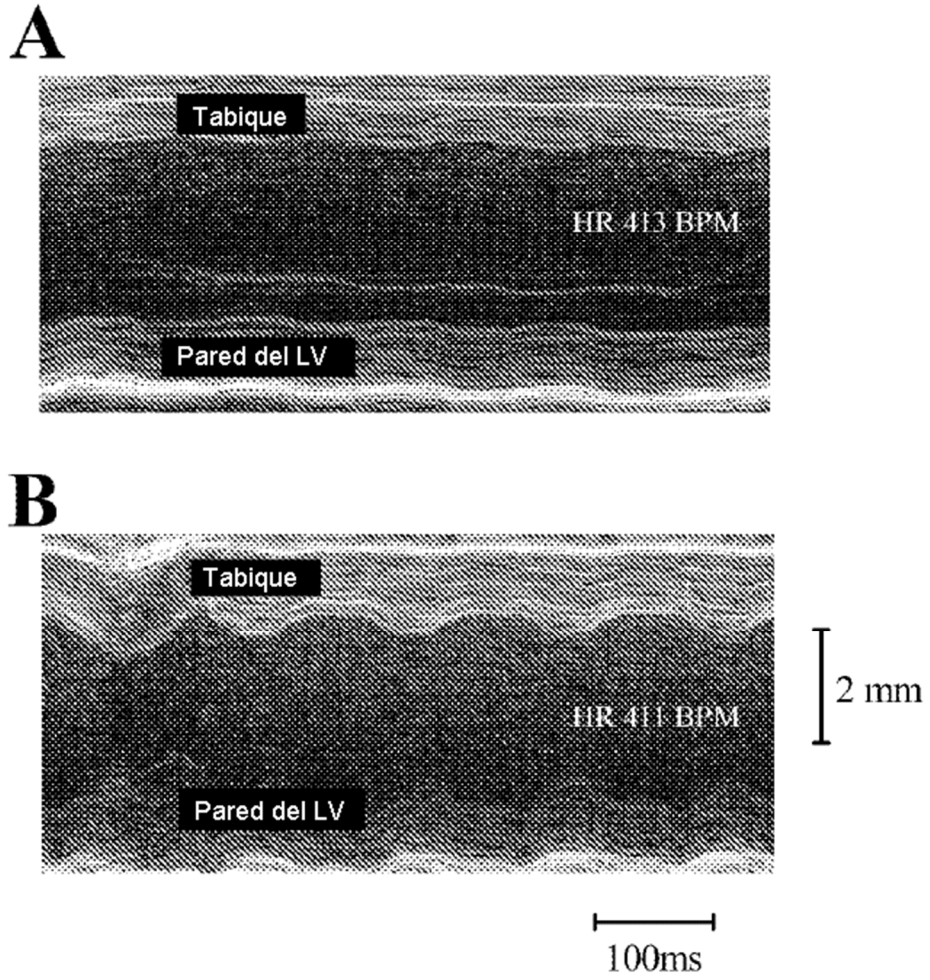


Figura 3

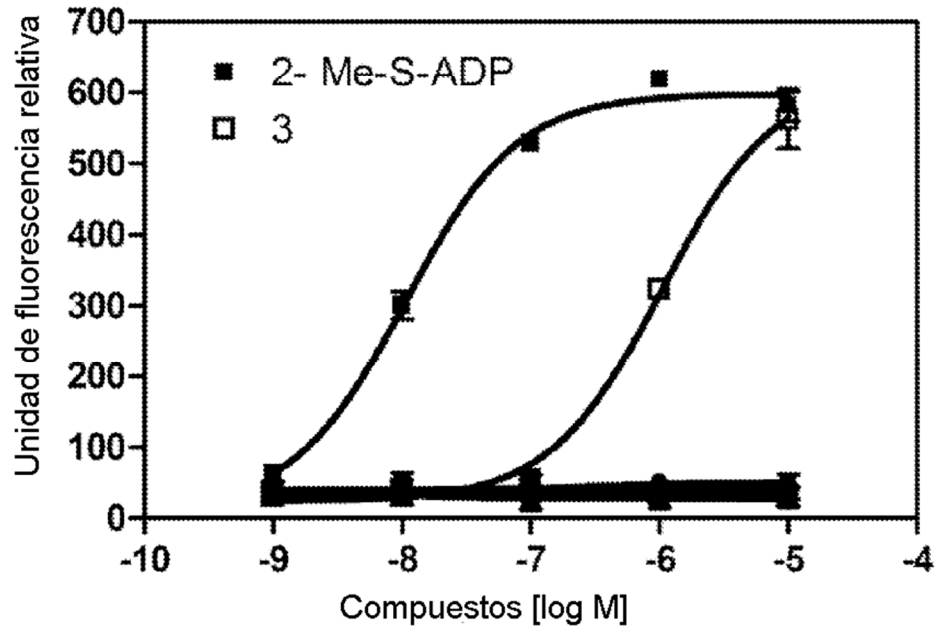
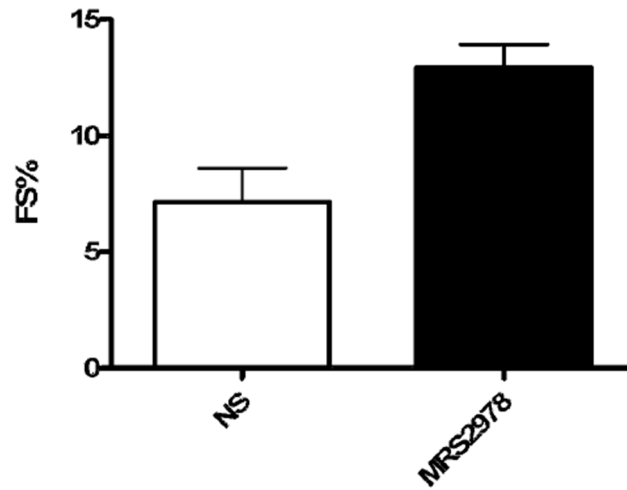


Figura 4

La infusión durante 2 semanas de MRS2978 causó un acortamiento fraccionario del corazón intacto mejorado *in vivo*



NS, n=4 frente a MRS2978, n=6, P<0,01

Figura 5A

La infusión durante 2 semanas de MRS2978 causó un grosor conservado de la pared posterior del LV en la sístole

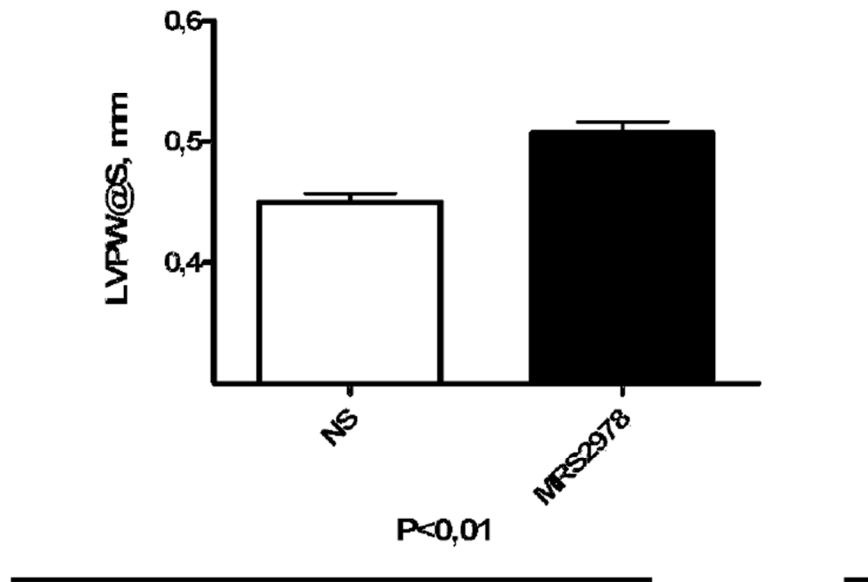


Figura 5B

La infusión durante 2 semanas de MRS2978 causó un engrosamiento septal mejorado del LV en la sístole

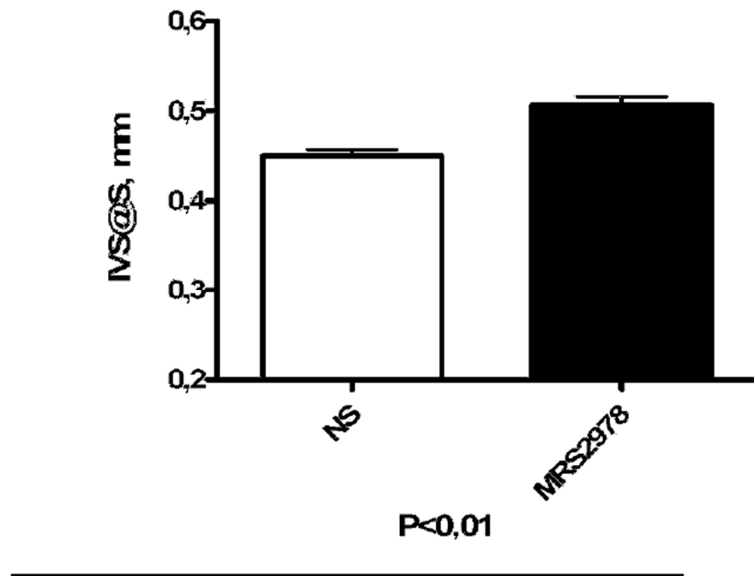




Figura 5c

La infusión durante 2 semanas de MRS2978 causó un grosor conservado de la pared posterior del LV en la sístole

