ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
DE LA USC

Hugo
Fojo Carballo

Tesis doctoral

Optimización de antagonistas selectivos del receptor A_{2A} de adenosina y fármacos duales: una aproximación innovadora en la terapia del cáncer

Santiago de Compostela, 2025

Programa de doctorado en Investigación y Desarrollo de Medicamentos

TESIS DOCTORAL

OPTIMIZACIÓN DE ANTAGONISTAS SELECTIVOS DEL RECEPTOR A_{2A} DE ADENOSINA Y FÁRMACOS DUALES: UNA APROXIMACIÓN INNOVADORA EN LA TERAPIA DEL CÁNCER

Autor

Hugo Fojo Carballo

Directores: Eddy Sotelo Pérez y Xerardo García Mera

Tutor: Eddy Sotelo Pérez

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS.

SANTIAGO DE COMPOSTELA

JULIO 2025

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y de manera muy especial, quiero expresar mi más profundo agradecimiento al director de esta Tesis Doctoral, el **Prof. Eddy Sotelo**, por haber confiado en mí desde el primer día y por brindarme la oportunidad de descubrir el mundo de la investigación. Nunca imaginé, cuando decidí estudiar Farmacia, que este camino se cruzaría en mi vida, pero hoy no concibo un futuro en el que la ciencia y la investigación no formen parte de él. Además, como no podía ser de otra manera, sus enseñanzas, guía y consejos han contribuido de forma innegable al éxito de este proyecto y a que hoy me encuentre escribiendo estas líneas.

En segundo lugar, también quiero agradecer a mi codirector, el **Prof. Xerardo García**, por sus valiosos consejos a lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral, los cuales me han servido no solo en el ámbito de la investigación, sino también a nivel personal.

También quiero dedicar parte del éxito de esta Tesis Doctoral a la **Prof. Rita Paleo**. Su constante apoyo, su inestimable ayuda en la corrección del manuscrito, pero, sobre todo, su implicación en la caracterización estructural de los compuestos sintetizados ha sido de un valor incalculable y han contribuido de forma directa al buen desarrollo y culminación de este trabajo.

Al **Prof. Romano V.A. Orrú**, de la Universidad de Maastricht, por brindarme la valiosa oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio, lo cual ha sido una experiencia gratificante y enriquecedora tanto a nivel personal como profesional. Asimismo, quiero agradecer a todo su grupo de investigación y en especial al **Dr. Prabhat Ranjan**, por haberme guiado y acogido como a uno más desde el primer momento.

Al **Dr. Jhonny Azuaje**, **Dr**. **Rodrigo Bernárdez, Dr. Paolo Destito, Dra. María Majellaro** y **Dr. Adrián Robles**, por su inestimable ayuda a la resolución de la infinidad de problemas experimentales que surgen en el día a día del laboratorio, por compartir sus conocimientos y contribuir de forma desinteresada a mi desarrollo como profesional.

Me gustaría tener una mención especial para mis amigos y compañeros durante todo este viaje: **Aitor García**, **Sandra Ortigueira**, **Dr. Carlos Rodríguez**, **Dr. Rubén Prieto**, **Lucía Campos**, **Dr. David Reza**, **Dr. Darío Miranda**, **Dr. Pablo Carracedo**, **Dra. Claudia Gioè**, **Dra. Martina Migliavacca**, **Dra. Ana Mallo** y **Sara Falcón**, quería agradecerles todos los momentos de risas en el trabajo pero sobre todo los momentos que hemos compartido fuera del laboratorio, han sido los principales culpables de que me lleve un gran recuerdo de este camino.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

No me olvido de mis compañeros de ComBioMed: **Iván Rodríguez**, **Antonio Andújar**, **Lucia González**, **Dr. Fabio Francavilla**, **Dr. Giovanni Graziano**, **Asier Selas**, **Federica D'Agostino**, **Arielle Pacha** y muchos otros que han estado a lo largo de estos años.

Las colaboraciones con otros grupos de investigación han sido determinantes para el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral. Por ello quería agradecer a los grupos de farmacología de la Universidad de Santiago de Compostela, dirigido por la **Prof. María Isabel Loza** y al grupo dirigido por el **Prof. Manuel Freire-Garabal Núñez.** Al grupo de farmacología de la Universidad CEU San Pablo dirigido por la **Prof. Beatriz de Pascual Teresa** y el **Prof. José María Zapico**. Al grupo de inmunología de la Universidad de Santiago de Compostela, dirigido por la **Prof. Iria Gómez** y por último al grupo de Química Médica de la Universidad del País Vasco dirigido por la **Prof. Concepción Alonso**.

Al personal técnico y administrativo de la Universidad de Santiago de Compostela, en especial a **Xosé González**, técnico del Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia por facilitarnos el trabajo del día a día, y a los técnicos de **Espectrometría** y **Resonancia Magnética Nuclear**.

También me gustaría agradecer a la **Xunta de Galicia** por la concesión de la beca predoctoral.

A mis amigas de la carrera, **Ivette Giráldez**, **Candela García**, **Clara García** y **Rocío Mellid**, no me cabe la menor duda de que han sido un pilar fundamental para convertirme en la persona que soy hoy. Me han enseñado mucho más de lo que imaginan y nada me llena más de orgullo de ver en las grandes profesionales (y aún mejores personas) en las que se han convertido.

A mis amigas de toda la vida, **Irenita Dopico**, **Albita Ramos**, **Raquel González**, **Yaiza Pena**, **Mireya Benito** y **Carmela Salguero** gracias por enseñarme el verdadero significado de la amistad y por lograr que, pase lo que pase, todo siga siendo como el primer día. También vosotras sois una parte muy importante de este logro y siempre lo seréis.

Por último, y por encima de todo, quiero agradecer con todo mi corazón a mi familia. A mi madre, **Bea** y a mi padre, **Toni**, por ser el mayor ejemplo de amor, generosidad y entrega que uno puede tener. Gracias por haber confiado siempre en mí, por estar siempre y por apoyarme incondicionalmente en cada paso que he dado. A mi hermano **Víctor** y a mi cuñada **Anabel**, gracias por haber confiado en mi para darme la oportunidad de ser el padrino de **Leila**. A todos, gracias por ser hogar, refugio e impulso. Esta tesis lleva mi nombre, pero está escrita también con vuestro cariño, vuestro esfuerzo y vuestro ejemplo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

A mis padres, por su amor, su ejemplo y su confianza en mí.

Este logro también es vuestro.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

GLOSARIO DE TÉRMINOS ..... **I**
ABSTRACT ..... **VII**
1 INTRODUCCIÓN **1**
1.1 Sistema purinérgico **2**
1.2 Adenosina y receptores de adenosina **5**
1.2.1 Síntesis, transporte y metabolismo de la adenosina 5
1.2.2 Receptores de adenosina: clasificación, localización y funciones fisiológicas 7
1.2.3 Vías de señalización de los receptores de adenosina 13
1.2.4 Oligomerización de GPCRs y oligómeros del receptor A_{2A} 17
1.2.5 Estructura del receptor A_{2A} 20
1.3 Adenosina: implicación en el sistema inmune y aplicaciones en el contexto del cáncer **24**
1.3.1 Producción de adenosina en el microambiente tumoral 25
1.3.2 Efectos de la adenosina en el microambiente tumoral 27
1.3.2.1 Efectos de la adenosina en células tumorales y estromales 28
1.3.2.2 Efectos derivados de la adenosina en las células del sistema inmune 30
1.4 moduladores del receptor A_{2A} **35**
1.4.1 Agonistas del receptor A_{2A} 35
1.4.1.1 Aplicaciones terapéuticas y ensayos clínicos de los agonistas del receptor A_{2A} 38
1.4.2 Moduladores alostéricos del receptor A_{2A} 39
1.4.3 Antagonistas del receptor A_{2A} 40
1.4.3.1 Aplicaciones terapéuticas y ensayos clínicos de los antagonistas del receptor A_{2A} 48
1.4.4 Estudios de antagonistas A_{2A} en la inmunoterapia del cáncer 50
1.5 Fármacos multidiana **56**
1.5.1 Diseño racional de fármacos multidiana basado en la combinación de farmacóforos 57
1.5.2 Fármacos multidiana que modulan el A_{2A}R en el contexto del cáncer 60
2 ENFOQUE, OBJETIVOS Y LÍNEAS GENERALES DE LA TESIS **65**
2.1 Antecedentes **66**
2.2 Objetivos **68**
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN **72**

3.1 Capítulo I 73
3.1.1 Diseño de los ligandos 73
3.1.2 Química 77
3.1.3 Evaluación farmacológica 84
3.1.3.1 Ensayos de afinidad 84
3.1.4 Análisis de la relación estructura-actividad 85
3.1.5 Estudios preliminares del modelo de unión 93
3.1.5.1 Docking molecular 93
3.1.5.2 Simulaciones de dinámica molecular 95
3.1.6 Resumen de los principales hallazgos del Capítulo I 98
3.2 Capítulo II 99
3.2.1 Diseño de los ligandos 99
3.2.2 Química 102
3.2.3 Evaluación farmacológica 111
3.2.3.1 Ensayos de afinidad 111
3.2.3.2 Validación funcional de los ligandos 114
3.2.3.3 Ensayos de solubilidad 115
3.2.4 Análisis de la relación estructura-actividad 116
3.2.5 Estudios preliminares de los modelos de unión 132
3.2.5.1 Estudios de docking 132
3.2.5.2 Estudios de dinámica molecular 134
3.2.6 Separación de racematos y evaluación de enantiómeros 138
3.2.7 Evaluación del efecto antiproliferativo en líneas tumorales 144
3.2.7.1 Efecto antiproliferativo en la línea tumoral de melanoma HTB-70 144
3.2.7.2 Efecto antiproliferativo en la línea tumoral de cáncer de mama T47D 145
3.2.8 Ensayos de reactivación del sistema inmunitario 148
3.2.9 Resumen de los principales hallazgos del Capítulo II 153
3.3 Capítulo III 154
3.3.1 Antagonistas duales A_{2A}/A_{2B} 154
3.3.1.1 Diseño de los ligandos 154
3.3.1.2 Química 157
3.3.1.3 Evaluación farmacológica 162

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.1.4 Relación estructura-actividad 164
3.3.2 Compuestos duales A_{2A}-PARP-1 172
3.3.2.1 Diseño de los ligandos 172
3.3.2.2 Química 175
3.3.2.3 Evaluación farmacológica 181
3.3.2.4 Relación estructura-actividad 184
3.3.3 Resumen de los principales hallazgos del Capítulo III 187
4 CONCLUSIONS 188
5 EXPERIMENTAL SECTION 192
5.1 General considerations 193
5.1.1 Synthesis and purification 193
5.1.2 Structural characterization 193
5.1.3 Pharmacological evaluation 194
5.1.3.1 Radioligand binding competition assays 194
5.1.3.2 Determination of PARP1 activity 196
5.1.3.3 Functional experiments 196
5.1.4 Solubility determinations 197
5.1.5 Computational studies: docking and molecular dynamics simulations 197
5.1.6 Biological evaluation 198
5.1.6.1 Antiproliferative assays on HTB-70 tumour cells 198
5.1.6.2 Antiproliferative assays on T47D tumour cells 199
5.2 Chapter I 201
5.2.1 Synthesis of carboxylic acids used as precursors A16-A18 201
5.2.2 Synthesis of final compounds. 206
5.2.2.1 Spectroscopic and analytical for all compounds described 207
5.3 Chapter II 212
5.3.1 Synthesis of final compounds. 212
5.3.1.1 Spectroscopic and analytical data for all compounds described 214
5.3.2 Chiral HPLC separation of enantiomers 4ñ, 4s and 5k. 225
5.4 Chapter III 235
5.4.1 Synthesis of dual antagonist A_{2A}-A_{2B} 235
5.4.1.1 Spectroscopic and analytical data for all compounds described 236

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.2 Synthesis of key precursors for dual antagonist A_{2A}-PARP1 243
5.4.3 Synthesis of dual antagonist A_{2A}-PARP1 247
5.4.3.1 Spectroscopic and analytical data for all compounds described 249
6 REFERENCIAS 251
7 ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS 277
7.1 Índice de figuras 278
7.2 Índice de tablas 286
7.3 Índice de esquemas 288
8 APÉNDICES 289
8.1 Apéndice 1. Conflicto de intereses 290
8.2 Apéndice 2. Permiso de reproducción de imágenes y figuras 291

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

GLOSARIO DE TÉRMINOS

µM	Micromolar
µOP	Receptor opioide mu
5HT$_{2A}$	Receptor de serotonina 5-HT$_{2A}$
5HT$_{2B}$	Receptor de serotonina 5-HT$_{2B}$
5HT$_{2C}$	Receptor de serotonina 5-HT$_{2C}$
5'-NT	5'-Nucleotidasa
A$_1$R	Receptor de adenosina A$_1$
A$_{2A}$R	Receptor de adenosina A$_{2A}$
A$_{2B}$R	Receptor de adenosina A$_{2B}$
A$_3$R	Receptor de adenosina A$_3$
AC	Adenilato ciclasa
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AcOEt	Acetato de etilo
ADA	Adenosina desaminasa
ADK	Adenosina quinasa
ADO	Adenosina
ADP	Adenosín difosfato
AK	Adenilato quinasa
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARs	Receptores de adenosina
ATP	Adenosín trifosfato
BCR	Receptor de células B
BCRA1	Gen 1 del cáncer de mama y ovario
BCRA2	Gen 2 del cáncer de mama y ovario
BiFC	Complementación de fluorescencia bimolecular
Bn	Bencilo
BRET	Transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia
CAFs	Fibroblastos asociados al cáncer
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1
CB2	Receptor cannabinoide tipo 2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

***c*-Bu**	Ciclobutilo
CD25	Clúster de diferenciación 25
CD39	Clúster de diferenciación 39 o Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1
CD69	Clúster de diferenciación 69
CD73	Clúster de diferenciación 73 o Ecto-5'-nucleotidasa
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
CHO	Células de ovario de hámster chino
CNT	Transportador de nucleósidos concentrador
COX-2	Ciclooxigenasa-2
***c*-Pr**	Ciclopropilo
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
CTL	Linfocito T citotóxico
CTLA-4	Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos
Cy	Ciclohexilo
D2R	Receptor de dopamina D2
D3R	Receptor de dopamina D3
D4R	Receptor de dopamina D4
DAG	Diacilglicerol
DARPP-32	Proteína de fosforilación regulada por dopamina y AMPc
DCE	Dicloroetano
DCM	Diclorometano
DCs	Células dendríticas
DIPEA	*N*,*N*-diisopropiletilamina
DM	Dinámica molecular
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
ECL	Bucle extracelular
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EH	Enlace de hidrógeno
ENPP-1	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1
ENT	Transportador de nucleósidos equilibrador
EPAC	Proteína activadora del factor de intercambio de AMPc

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EPC	Células progenitoras endoteliales
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EtOH	Etanol
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
FRA-1	Proteína relacionada con FOS-1
FRET	Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia
GDP	Guanosín difosfato
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GSK-3β	Glicógeno sintasa quinasa-3 beta
GTP	Guanosín trifosfato
HDAC	Histona desacetilasa
HEK	Células de riñón embrionario humano
HeLa	Células HeLa
Hex	Hexano
HIF-1	Factor inducible por hipoxia-1
HOBT	Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HTB-70	Células HTB-70 (línea tumoral)
IC_{50}	Concentración inhibitoria media
ICL	Bucle intracelular
ICL2	Células linfoides innatas del grupo 2
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IFN-γ	Interferón gamma
IL-12	Interleucina-12
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-27	Interleucina-27
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
INO	Inosina
Ion	Ionomicina
IP3	Inositol trifosfato

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

***i*-Pr**	Isopropilo
K_B	Constante de unión
K_i	Constante de inhibición
LAG-3	Proteína de activación de linfocitos 3
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAO-A	Monoamina oxidasa-A
MAO-B	Monoamina oxidasa-B
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MAT	Metiltransferasa de S-adenosilmetionina
MCR-5	Células MCR-5 (línea celular)
MDSCs	Células supresoras de origen mieloide
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
MMP9	Metaloproteinasa de matriz 9
NA	Noradrenalina
NAM	Modulador alostérico negativo
NaOH	Hidróxido de sodio
NECA	5'-N-Etilcarboxamidoadenosina
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NK	Células Asesinas Naturales
nM	Nanomolar
NOS	Óxido nítrico sintasa
ns	Nanosegundos
NTPK	Nucleósido trifosfato quinasa
P1	Receptor Purinérgico P1
P2	Receptor Purinérgico P2
P2X	Receptor Purinérgico P2X
P2Y	Receptor Purinérgico P2Y
PAM	Modulador alostérico positivo
PARP1	Poli(ADP-ribosa) polimerasa 1
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PCI	Punto de control inmunitario

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PD-1	Proteína de muerte programada-1
PD-L1	Ligando de proteína de muerte programada-1
PD-L2	Ligando de proteína de muerte programada-2
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKA	Proteína quinasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMA	Acetato de forbol-12-miristato-13
PMDA	Agencia de dispositivos farmacéuticos y médicos
$POCl_3$	Oxicloruro de fósforo
PSB	Solución salina fosfatada
Py	Piridina
REA	Relación estructura-actividad
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Desviación cuadrática media de la raíz
RMSF	Fluctuación cuadrática media de la raíz
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP	Receptores purinérgicos
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAHH	S-adenosilhomocisteína hidrolasa
SDF-1	Factor derivado de estroma-1
SEM	Error estándar de la media
SNC	Sistema nervioso central
$SOCl_2$	Cloruro de tionilo
SP	Sistema purinérgico
T.A.	Temperatura ambiente
T47D	Células T47D (línea tumoral)
***t*-Bu**	Tercbutilo
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Célula T cooperadora
TLC	Cromatografía en capa fina
TM	Dominio transmembrana

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TNAP	Fosfatasa alcalina inespecífica de tejido
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Célula T reguladora
U-4CR	Ugi 4 Componentes
UDP	Uridín difosfato
UTP	Uridín trifosfato
VGEF	Factor de crecimiento endotelial vascular

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABSTRACT

Since the discovery of the purinergic system in 1972 and the advancement of molecular biology, our understanding of its involvement in various pathophysiological processes has increased substantially. The purinergic system has been implicated in metabolic disorders, central nervous system diseases, cardiovascular dysfunctions, chronic inflammation, immune dysregulation, and cancer progression. This expanding body of evidence has driven numerous academic groups and pharmaceutical companies to explore the therapeutic potential of modulating this system in both central and peripheral pathologies, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, hypertension, cardiac fibrosis, and gout.

Within this system, the adenosinergic pathway has gained prominence in recent years, particularly following the validation of the A_{2A} adenosine receptor as an immune checkpoint. Immune checkpoints are regulatory molecules of the immune system that maintain the balance between immune activation and tolerance. They act as natural brakes to prevent excessive immune responses or autoimmunity.

Adenosine, a central mediator in this context, is generated extracellularly from ATP released by stressed or apoptotic cells. This conversion is catalyzed by the ectonucleotidases CD39 and CD73, which sequentially dephosphorylate ATP to AMP and then to adenosine. Once formed, adenosine exerts its immunosuppressive effects via activation of P1-type purinergic receptors, mainly $A_{2A}R$ and $A_{2B}R$. Through $A_{2A}R$ signaling, adenosine inhibits the activation, proliferation, and cytotoxic functions of T and B lymphocytes and natural killer cells, impairs dendritic cell maturation, and promotes the expansion of immunoregulatory populations such as regulatory T cells and myeloid-derived suppressor cells. Additionally, it suppresses the production of proinflammatory cytokines including IL-2, IFN-γ, and TNF-α. Moreover, through $A_{2B}R$ signaling, it also exhibits proliferative, metastatic, and angiogenic effects (Figure 1). Although adenosine-mediated immunosuppression is essential for limiting tissue damage during physiological inflammatory responses, in the tumor microenvironment, this mechanism is often hijacked by tumor cells to establish an immunosuppressive microenvironment that facilitates immune escape and supports tumor progression.

As a result, targeting the adenosine-$A_{2A}R$/$A_{2B}R$ with antagonists has emerged as a promising approach in the field of cancer immunotherapy, as it holds great potential to restore immune system function.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

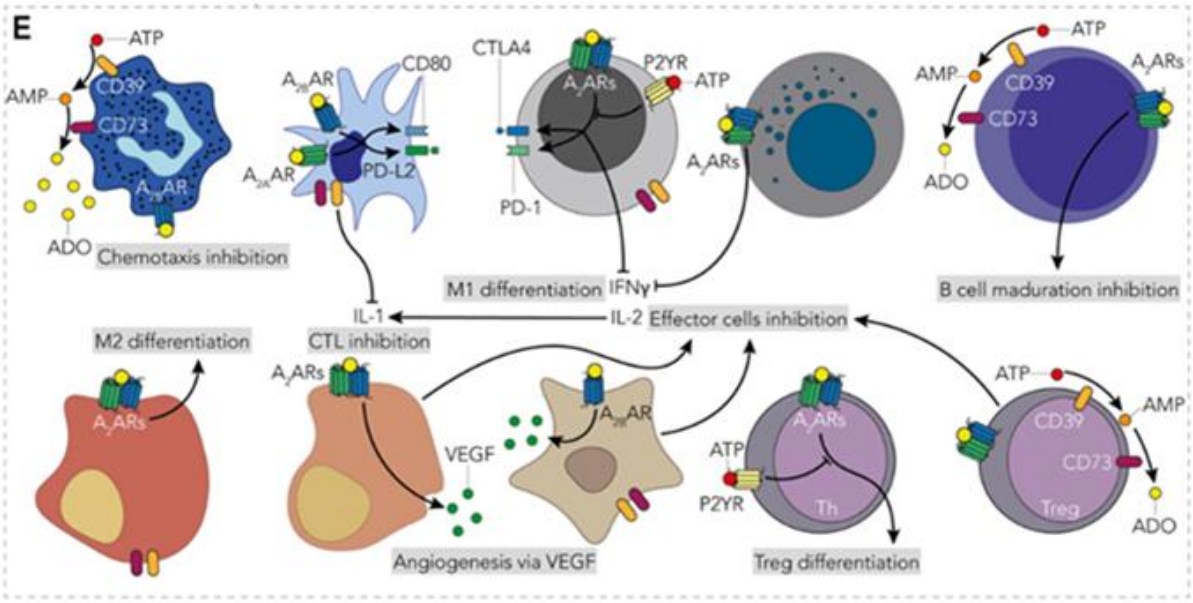
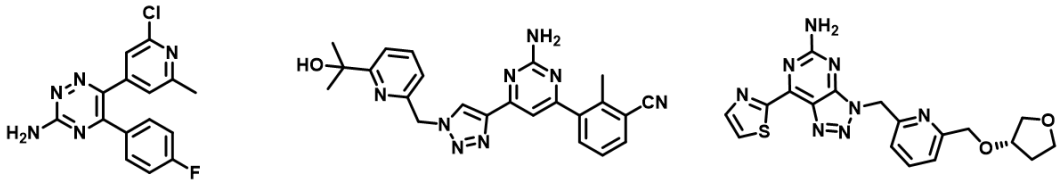


Figure 1. Immunosuppressive effects of ADO in immune system. Imagen reproduced from Prieto, R.; A_{2B} adenosine receptor as a novel target in cancer immunotherapy: validation and optimization of new ligands; Doctoral Thesis, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 2022.

The growing interest of the pharmaceutical industry in targeting the $A_{2A}R$ with antagonists as a therapeutic strategy against cancer immunotherapy is evidenced by the increasing number of ongoing clinical trials. Figure 2 provides representative examples of these drug candidates in clinical estudies.



AZD-4635
AstraZeneca
Resistant prostate cancer

Etrumadenant
Arcus Biosciences
Metastatic colorectal cancer

Ciforadenant
Corvus Pharmaceuticals
Triple negative breast cancer

Figure 2. Selection of $A_{2A}R$ antagonists that are currently in clinical trials for their use in cancer immunotherapy.

This Doctoral Thesis describes the design, synthesis, and structural characterization of novel potent and selective ligands for the adenosine A_{2A} receptor, as well as compounds with dual affinity for A_{2A}/A_{2B} and A_{2A}/PARP1 targets. The work also includes structure–activity relationship studies, pharmacological evaluations, and biological assays aimed at assessing

their antiproliferative and immunomodulatory activities. The research is organized into three chapters (**Chapters I–III**, corresponding to sections 3.1–3.3) and is presented as a monographic thesis. It provides a comprehensive exploration of advanced topics and key concepts in the fields of Medicinal Chemistry, with a particular focus on the adenosine receptor family and the enzyme poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1). The results obtained have not only contributed to the discovery of new ligands with therapeutic potential but also support a methodological approach designed to highlight the advantages of multicomponent reactions in the development of bioactive compounds in Medicinal Chemistry.

Chapter I (Section 3.1) This chapter describes a rational design strategy using the model compound **LuAA-41063** as a scaffold for the development of novel adenosine $A_{2A}R$ antagonists. The main objective was to probe the tolerance of the extracellular-facing region of the $A_{2A}R$ binding site by incorporating flexible linkers, aiming to identify potential secondary interactions that could be exploited to enhance ligand affinity and selectivity. Three compound series (**I–III**) were designed, distinguished by the chemical nature of the spacer introduced at the alkyl side chain of LuAA-41063 (Figure 3). A key secondary objective was to evaluate the Ugi-4CR as a synthetic platform for the efficient generation of structurally diverse $A_{2A}R$ antagonists. The insights gained from this chapter will guide the selection of the most suitable linker, which will be employed in Chapter II for a more in-depth exploration of the structure–activity relationships of this scaffold.

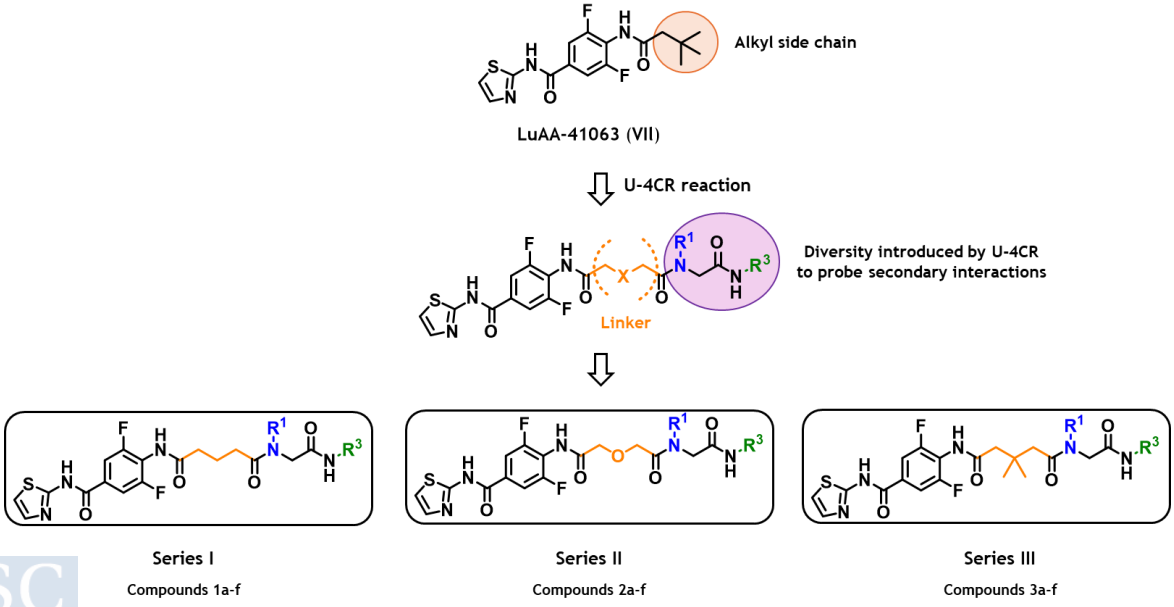


Figure 3. Design of the synthetic strategy carried out in Chapter I.

As a result, **18 ligands** were synthesized and pharmacological evaluated. SAR analysis identified the series III linker [X = $C(CH_3)_2$]as the most compatible with the $A_{2A}R$ binding site, leading to its selection for further optimization of $A_{2A}R$ derivatives in Chapter II. Figure 4 highlights **LuAA-41063** alongside the top derivatives **3a**, **3b** and **3d**, which showed improved $A_{2A}R$ selectivity (except **3a**) with a moderate reduction in affinity. These results validate the strategy of targeting secondary interaction regions and confirm the Ugi-4CR as an efficient and versatile synthetic approach for $A_{2A}R$ antagonist development.

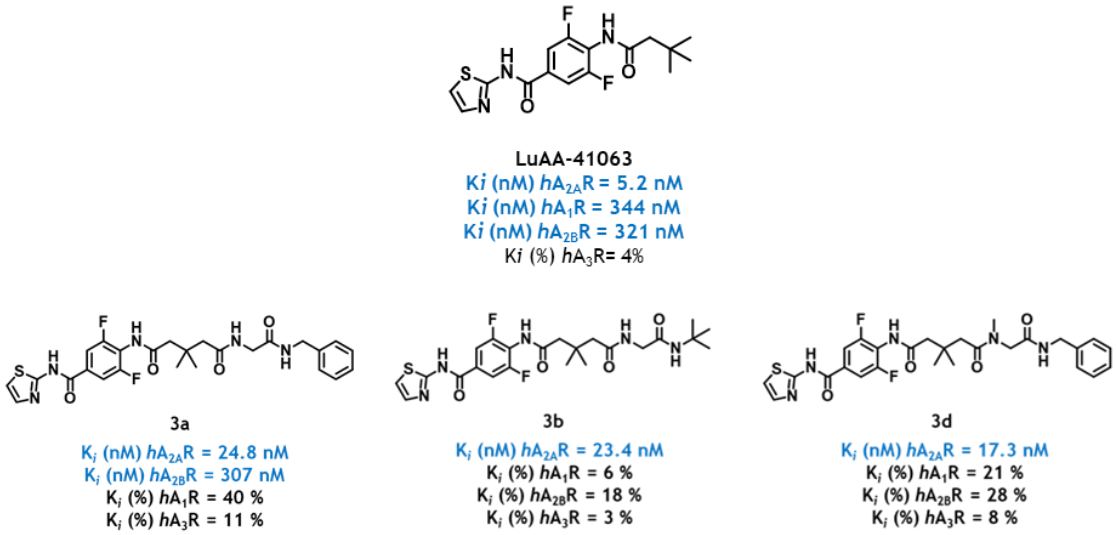


Figure 4. Structure of the 3 best compounds obtained in Chapter I and comparison of their pharmacological activity with the model compound.

Chapter II (Section 3.2). This chapter expands upon and systematizes the results obtained in the previous chapter. Our objective was to explore novel structural diversities and optimize both potency and selectivity toward the $A_{2A}R$). After identifying the optimal linker, a more in-depth investigation was conducted, leading to the design of two new series of compounds (Series IV and V). Series IV, synthesized via the U-4CR, focused on increasing structural diversity at positions R^1, R^2, and R^3 (Figure 5). This in-depth study enabled the establishment of SAR, the analysis of binding modes, and the identification of new key interactions near the extracellular region of $A_{2A}R$. In contrast, Series V, generated through the Ugi-Split approach, incorporated a piperazine moiety to enhance structural uniqueness, improve ligand solubility, and optimize pharmacokinetic properties (Figure 5). The most promising compounds from both series were selected for *in vitro* biological evaluation to assess their therapeutic potential as antiproliferative and immunomodulatory agents.

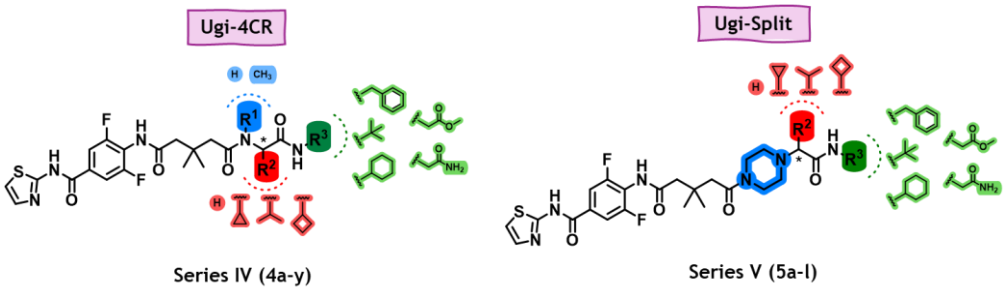


Figure 5. Design of the synthetic strategy carried out in Chapter II.

As a result, a total of **38 new ligands** were synthesized within both series: 26 compounds in Series IV and 12 in Series V. Pharmacological analysis of **26 ligands** from series IV revealed that 22 of the synthesized compounds exhibited high affinity and selectivity for the $A_{2A}R$, with K_i values below 60 nM. Notably, 9 of these ligands demonstrated low-nanomolar affinities (K_i < 15 nM; compounds **4f**, **4l**, **4n**, **4p**, **4s**, **4t**, **4u**, **4w**, and **4y**). The pharmacological profiles of these 9 ligands, along with their comparative performance against the model compound, are presented in Figure 6.

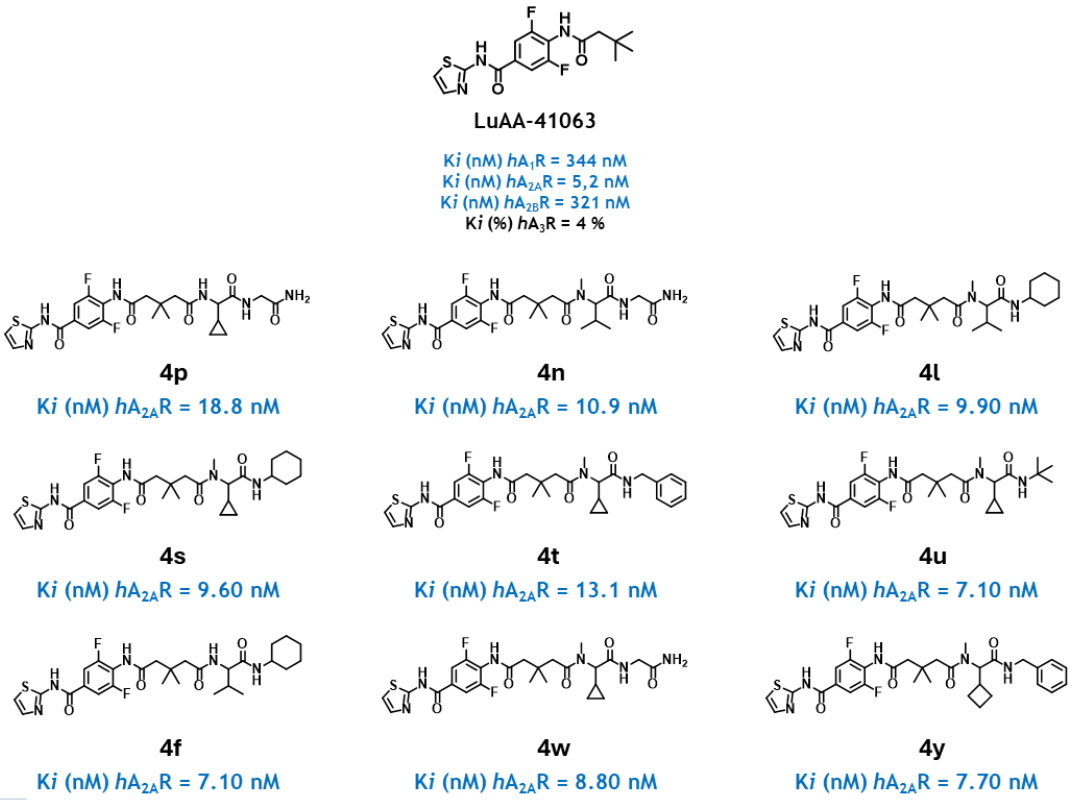


Figure 6. Structure of the 9 best selective $A_{2A}R$ antagonist obtained in Series IV (Chapter II) and comparison of their pharmacological activity with the model compound.

Furthermore, four compounds (**4e**, **4ñ** and **4x**) exhibited dual antagonistic activity at both A_{2A} and A_{2B} receptors, with K_i values below 25 nM for $A_{2A}R$ and between 200 and 400 nM for $A_{2B}R$ (Figure 7). This dual affinity is of great interest in the immuno-oncology field and led to the synthesis of series VI in Chapter III.

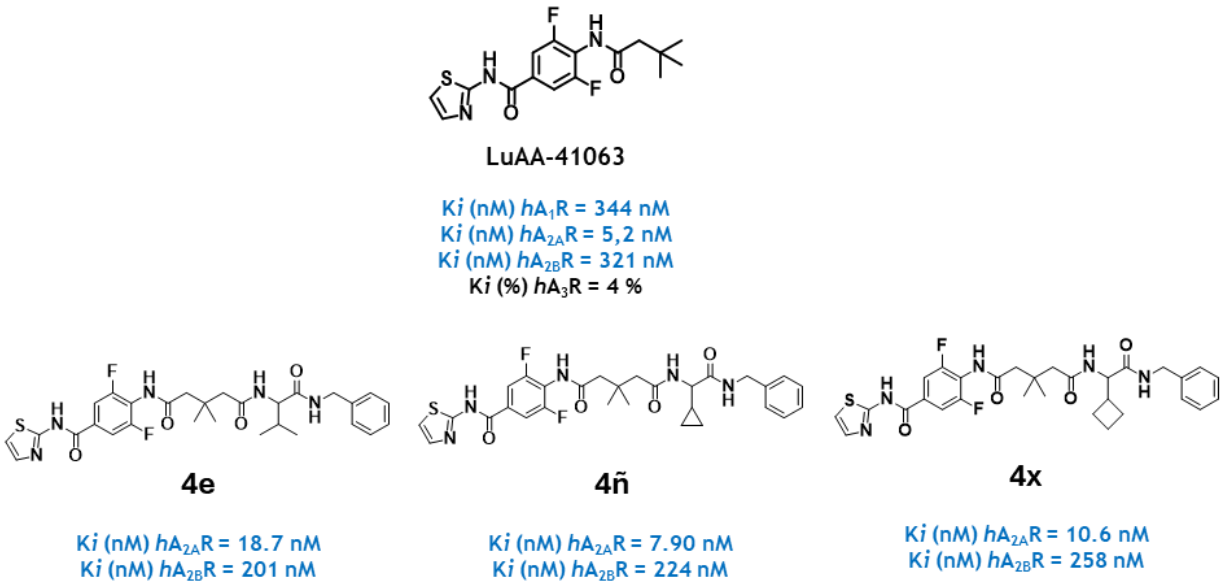


Figure 7. Structure of dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ antagonist obtained in series IV (Chapter II) and comparison of their pharmacological activity with the model compound.

Pharmacological study of **12 ligands** from series V revealed that all synthesized compounds (**5a–l**) exhibited high selectivity for the $A_{2A}R$, with K_i values ranging from 5.60 to 46.4 nM. Figure 8 shows the most potent ligands identified in this series (**5a**, **5k**, and **5l**), along with their binding affinities compared to the model compound.

In addition to these remarkable results in terms of affinity and selectivity, the introduction of a piperazine moiety into the structure of the compounds resulted in ligands with significantly improved solubility, thereby enhancing their pharmacological properties. Specifically, compounds **5f** (75.6 µM) and **5k** (81.3 µM) exhibit solubility levels approximately 25 times higher than that of **LuAA-41063** (3.07 µM).

Once the most promising compounds obtained in this chapter were selected, we further evaluated their antiproliferative and *in vitro* immunomodulatory effects through additional biological assays.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

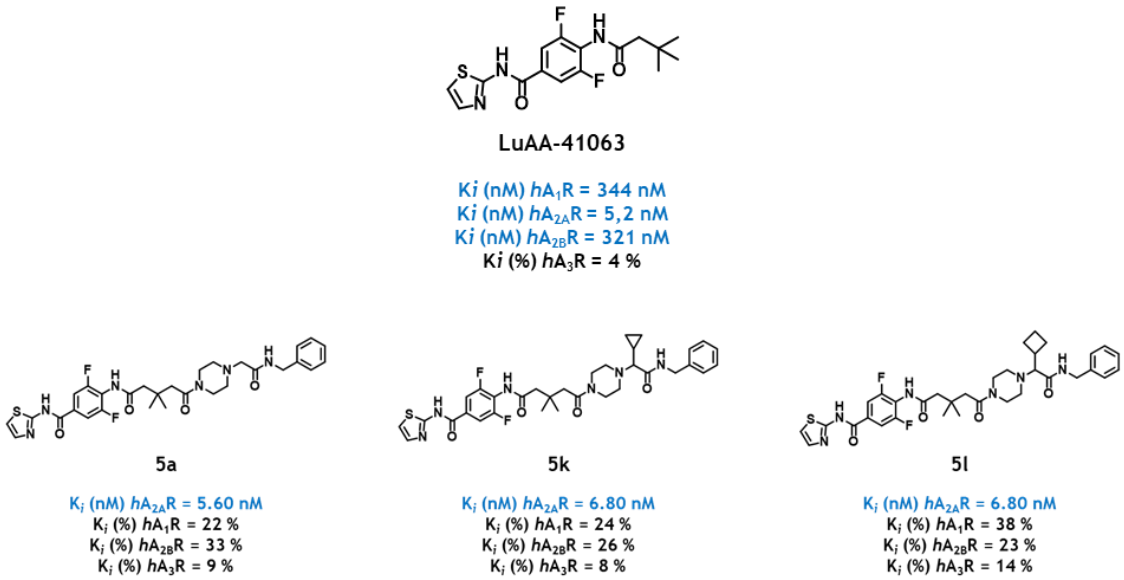


Figure 8. Structure of the 3 best selective and potent $A_{2A}R$ antagonist obtained in Series V (Chapter II) and comparison of their pharmacological activity with the model compound.

For the first antiproliferative assay, the HTB-70 melanoma cell line was used, along with the MRC-5 human lung fibroblast cell line as a non-tumor control. Notably, none of the tested compounds displayed antiproliferative activity against the MRC-5 cell line, indicating a favorable safety profile due to the lack of effect on healthy cells. Table 1 presents the data obtained from this assay, showing that the selected compounds **4j** and **5a** exhibit IC_{50} values of 12.73 µM and 47.02 µM, respectively. Table 1 also compares their potency with that of the reference ligand **LuAA-41063**, revealing that compounds **4j** and **5a** exhibit superior antiproliferative profiles.

Table 1. Results obtained from antiproliferative assays performed on the HTB-70 tumor cell line.

	Antiproliferative IC_{50} (µM)*		
Compound	**(HTB-70)**	**(MRC-5)**	**K_i $hA_{2A}R$ (nM)**
4j	12.73 ± 3.30	>50	5.40 ± 0.8
4s	>50	>50	9.60 ± 0.7
4y	>50	>50	7.70 ± 0.9
5a	47.02 ± 0.73	>50	5.60 ± 0.5
LuAA-41063	>50	>50	5.2 ± 0.6
Colchicine	7.58 ± 1.25	5.72 ± 2.1	-

*The reported IC_{50} antiproliferative values correspond to the concentrations required to inhibit 50% of cell growth.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

For the second assay, three $A_{2A}R$ antagonists (**4j**, **4s**, and **4y**) were evaluated *in vitro* using the breast cancer cell line T47D. The compounds were tested at concentrations of 5 and 10 µM, and the reference compounds **AZD-4635** and **LuAA-41063** were included in the same assay and at the same concentrations for comparative purposes. The antiproliferative effect was assessed at 24- and 48-hours post-treatment. The resulting data are presented in Figure 9 as a bar graph, quantifying the antiproliferative effect expressed as a percentage relative to the control.

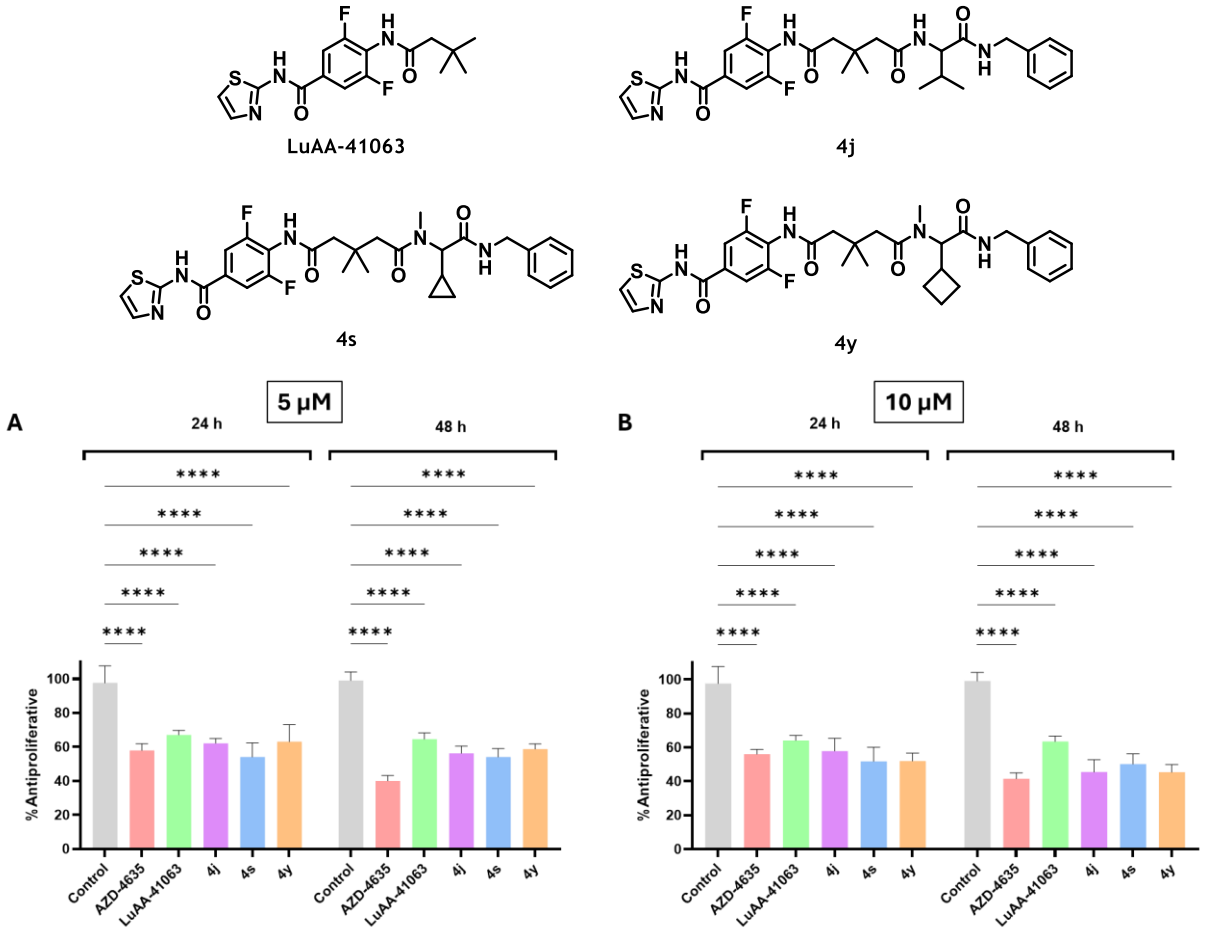


Figure 9. Results obtained from antiproliferative assays performed on the T47D tumor cell line.

As shown in Figure 9, the selected antagonists in this study reduced cell proliferation by approximately 40–55%, with results comparable to those obtained with the reference compounds **AZD-4635** and **LuAA-41063** at both 24 and 48 hours.

To preliminary evaluation of the immunomodulatory effects of the selected compounds, an immunosuppression model based on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was employed. In this model, an immunosuppressive state is induced by exposure to adenosine,

mimicking the conditions of the tumor microenvironment. The aim of the assay is to assess the ability of $A_{2A}R$ antagonists to reverse adenosine-mediated immunosuppression and restore immune cell activation. CD25 (a late activation marker) and CD69 (an early activation marker) were selected as indicators of immune activation, both of which are widely recognized as reliable markers of T cell activation. For these experiments, compounds **4s**, **5a** and the reference compound **AZD-4635** were tested at a concentration of 10 µM. The resulting data are presented in Figure 10, quantifying the expression of T cell activation markers expressed as a percentage.

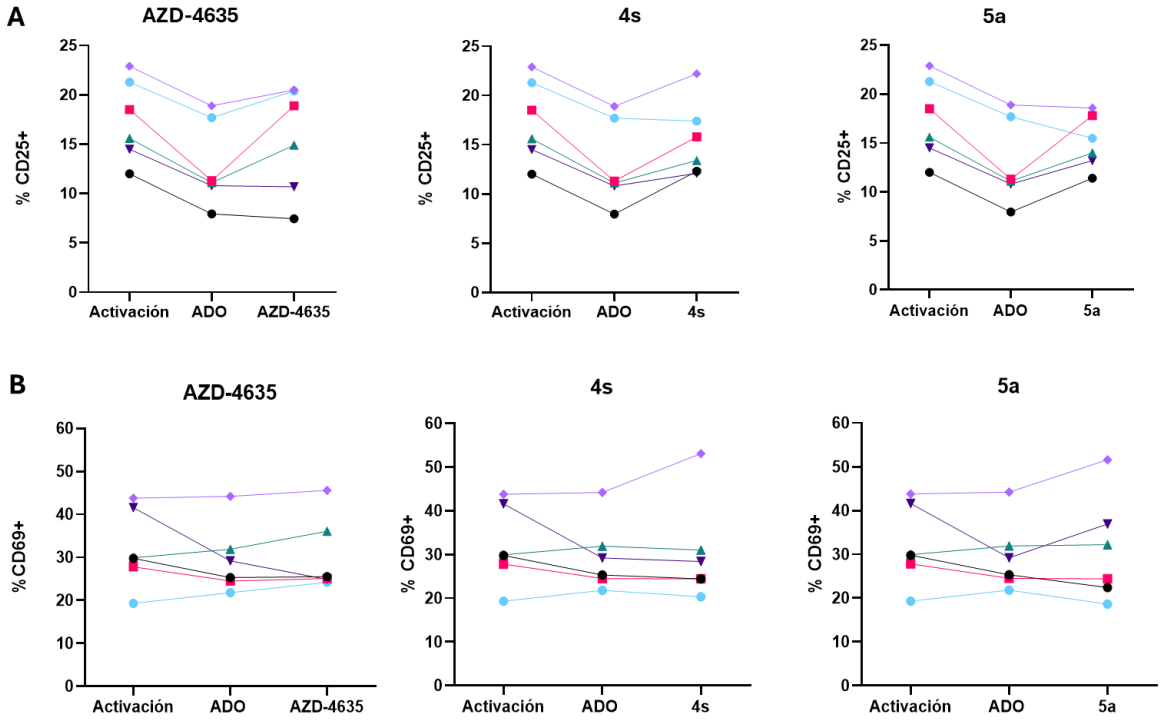


Figure 10. Results obtained from the immunomodulatory effects of the selected $A_{2A}R$ antagonist (4s and 5a) and the reference compound AZD-4635. A) Expression levels of the late T cell activation marker CD25. B) Expression levels of the late T cell activation marker CD69.

Figure 10 shows that ligands 4s and 5a exhibit immunomodulatory activity, as evidenced by the reactivation of the immune system. This effect is more pronounced when analyzing the expression of the late activation marker CD25, while the expression of the early activation marker CD69 is less markedly affected.

Chapter 2 presents a series of compounds with high affinity and selectivity for the $A_{2A}R$, which have demonstrated promising biological activity with therapeutic relevance: namely,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

antiproliferative effects on tumor cells and a notable immunomodulatory capacity. These findings represent a significant advance in the development of novel candidates for cancer immunotherapy, reinforcing the potential of $A_{2A}R$ as a valuable target in therapeutic strategies focused on modulating the tumor microenvironment.

Chapter III (Section 3.3). This chapter focuses on the design, synthesis, and characterization of new multitarget drugs as promising candidates in immuno-oncology. The objectives outlined here stem from several key observations made in previous chapters: **a)** the robustness of the primary pharmacophore [3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide]; **b)** the suitability of the spacer used to explore the extracellular region of the $A_{2A}R$; **c)** the versatility of the Ugi reaction in assembling secondary pharmacophores; and **d)** the emergence of affinity for the $A_{2B}R$ in several compounds from Series IV. Building on these insights, the main goal was to develop dual-target drugs that combine the primary pharmacophore directed at $A_{2A}R$ with new structural elements capable of interacting with a second relevant target in the cancer context. To this end, two primary strategies were pursued: first, to enhance affinity for the $A_{2B}R$ by designing dual A_{2A}/A_{2B} ligands; and second, to incorporate a typical pharmacophore of the enzyme poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1), resulting in dual A_{2A}/PARP1 drugs. Accordingly, two new series of compounds were designed: Series VI, consisting of dual A_{2A}/A_2B drugs developed through a merging strategy, and Series VII, comprising dual A_{2A}/PARP1 drugs created via a linking strategy (Figure 11). This chapter presents the design of these compounds, the synthetic methods employed, their pharmacological characterization, and a detailed analysis of their structure-activity relationships.

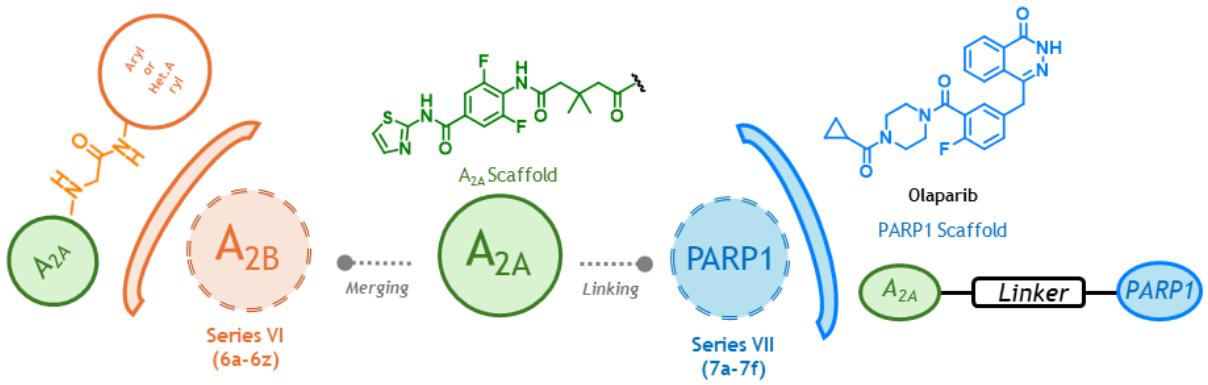


Figure 11. Design of the synthetic strategy carried out in Chapter III.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

As a result, **27 new derivatives** were synthesized in Series VI and pharmacologically evaluated. Following the structure–activity relationship analysis, 11 novel antagonists with dual affinity for $A_{2A}R$ and $A_{2B}R$ were identified. Figure 12displays the structures of the five most potent dual ligands obtained in Series VI (**6e**, **6i**, **6m**, **6p** and **6u**). In addition, 16 new ligands were identified that are highly selective and show strong affinity for $A_{2A}R$. These findings demonstrate that the use of the U-4CR to modulate the secondary pharmacophore is an effective strategy for obtaining both dual-affinity compounds and potent, selective $A_{2A}R$ antagonists.

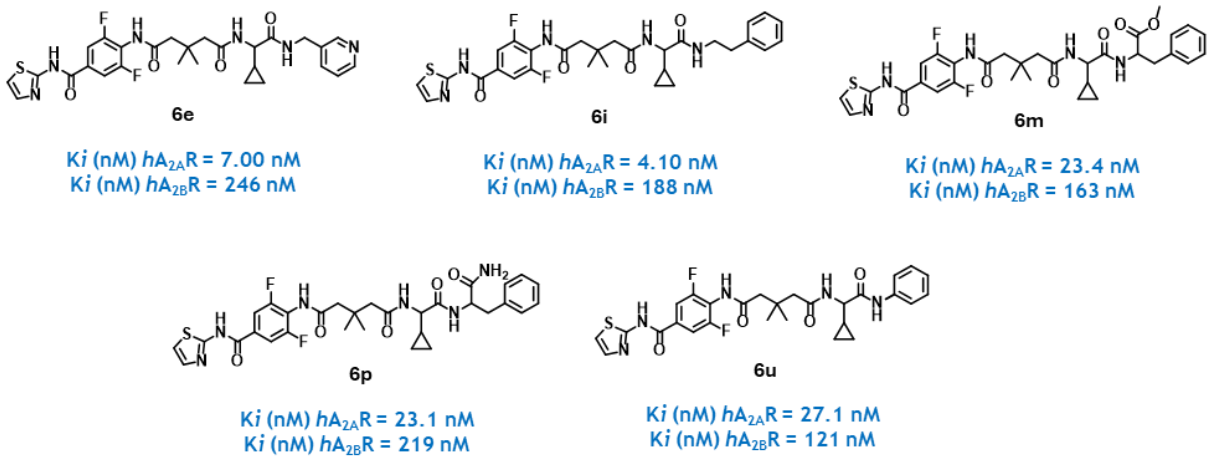
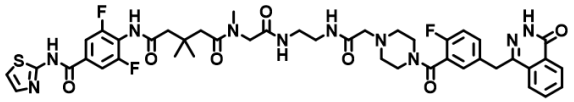


Figure 12. Most potent dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ antagonists from Series VI obtained in Chapter III.

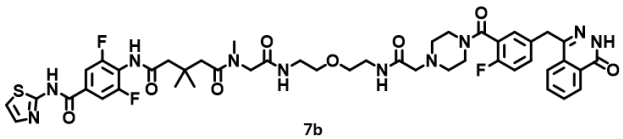
In Series VII, **6 novel compounds** with dual activity $A_{2A}R$/PARP1 were synthesized using a linking-based design strategy. This approach led to the development of six new chemical entities, classified into two subseries: three compounds in subseries VIIa, obtained via the U-4CR (Figure 13), and three compounds in subseries VIIb, synthesized using the Ugi-Split variant (Figure 14). Pharmacological evaluation enabled the establishment of the corresponding structure-activity relationship, identifying key structural features responsible for a more refined dual activity. Overall, these findings represent a significant advance in the rational design of multitarget agents with potential application in cancer therapy. Moreover, these compounds constitute the first-in-class molecules reported to exhibit this specific dual activity against $A_{2A}R$ and PARP1.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



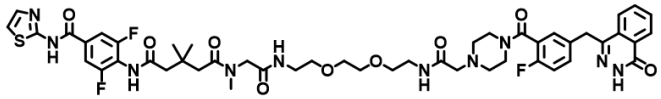
7a

Ki (nM) $hA_{2A}R$ = 83.1 nM
IC_{50} (nM) PARP1 = 83.1 nM



7b

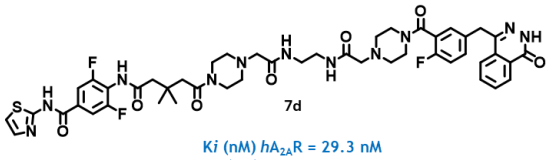
Ki (nM) $hA_{2A}R$ = 58.2 nM
IC_{50} (nM) PARP1 = 101 nM



7c

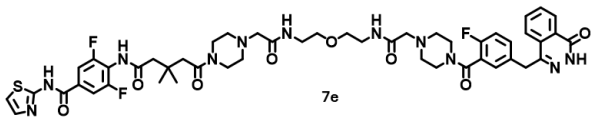
Ki (nM) $hA_{2A}R$ = 93.4 nM
IC_{50} (nM) PARP1 = 122 nM

Figure 13. Dual $A_{2A}R$/PARP1 ligands from Subseries VIIa.



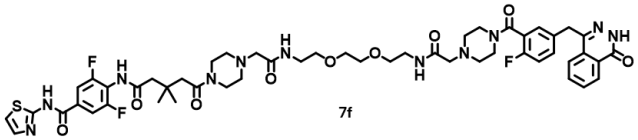
7d

Ki (nM) $hA_{2A}R$ = 29.3 nM
IC_{50} (nM) PARP1 = 51.7 nM



7e

Ki (nM) $hA_{2A}R$ = 28.7 nM
IC_{50} (nM) PARP1 = 63.2 nM



7f

Ki (nM) $hA_{2A}R$ = 24.4 nM
IC_{50} (nM) PARP1 = 69.0 nM

Figure 14. Dual $A_{2A}R$/PARP1 ligands from Subseries VIIb.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1 INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.1 SISTEMA PURINÉRGICO

La primera evidencia de la existencia del sistema purinérgico (SP) se remonta al año 1929, cuando los investigadores A. N. Drury y A. Szent-Györgyi, pertenecientes a los Departamentos de Patología y Bioquímica de la Universidad de Cambridge, realizaron un experimento que marcó el inicio en la investigación biomédica en este campo. Inyectaron en cobayas un extracto que contenía adenosina (ADO) y adenosina-5'-monofosfato (AMP), observando importantes efectos, como alteraciones en el ritmo cardíaco, dilatación arterial e inhibición de la contracción intestinal.[1] Décadas más tarde, en el año 1959, Pamela Holton describió la liberación de la adenosina-5'-trifosfato (ATP) durante la electroestimulación de los nervios sensoriales que inervan la arteria auditiva del conejo.[2]

Estos dos hallazgos fueron determinantes para que, en 1972, Geoffrey Burnstock formulara su innovadora hipótesis sobre la señalización purinérgica. Burnstock propuso que el ATP no solo servía como fuente de energía intracelular, sino que también actuaba como un neurotransmisor en la comunicación extracelular.[3] Esta hipótesis fue inicialmente recibida con escepticismo por gran parte de la comunidad científica, que defendía que los neurotransmisores clásicos, como la noradrenalina (NA) y la acetilcolina (ACh), eran los únicos responsables de la neurotransmisión. Sin embargo, en 1983, Burnstock refutó a sus detractores al demostrar que el ATP se liberaba junto con la NA en los nervios simpáticos, estableciendo definitivamente el papel del ATP como cotransmisor en el sistema nervioso autónomo.[4]

En la década de los 90, gracias a los avances en biología molecular, se logró por primera vez la clonación y caracterización de los receptores purinérgicos (RP).[5,6] A partir de este hecho, se descubrió que la presencia del sistema purinérgico no se limitaba solamente al sistema nervioso central (SNC), sino que también estaba presente en una amplia variedad de órganos y tejidos periféricos, donde interactúa de manera compleja con otras redes de transmisores para coordinar aspectos fundamentales de la homeostasis del organismo.

El SP está compuesto por los RP, sus ligandos endógenos, y las enzimas encargadas de la síntesis, transporte y degradación de dichos ligandos (Figura 1.1).[7]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

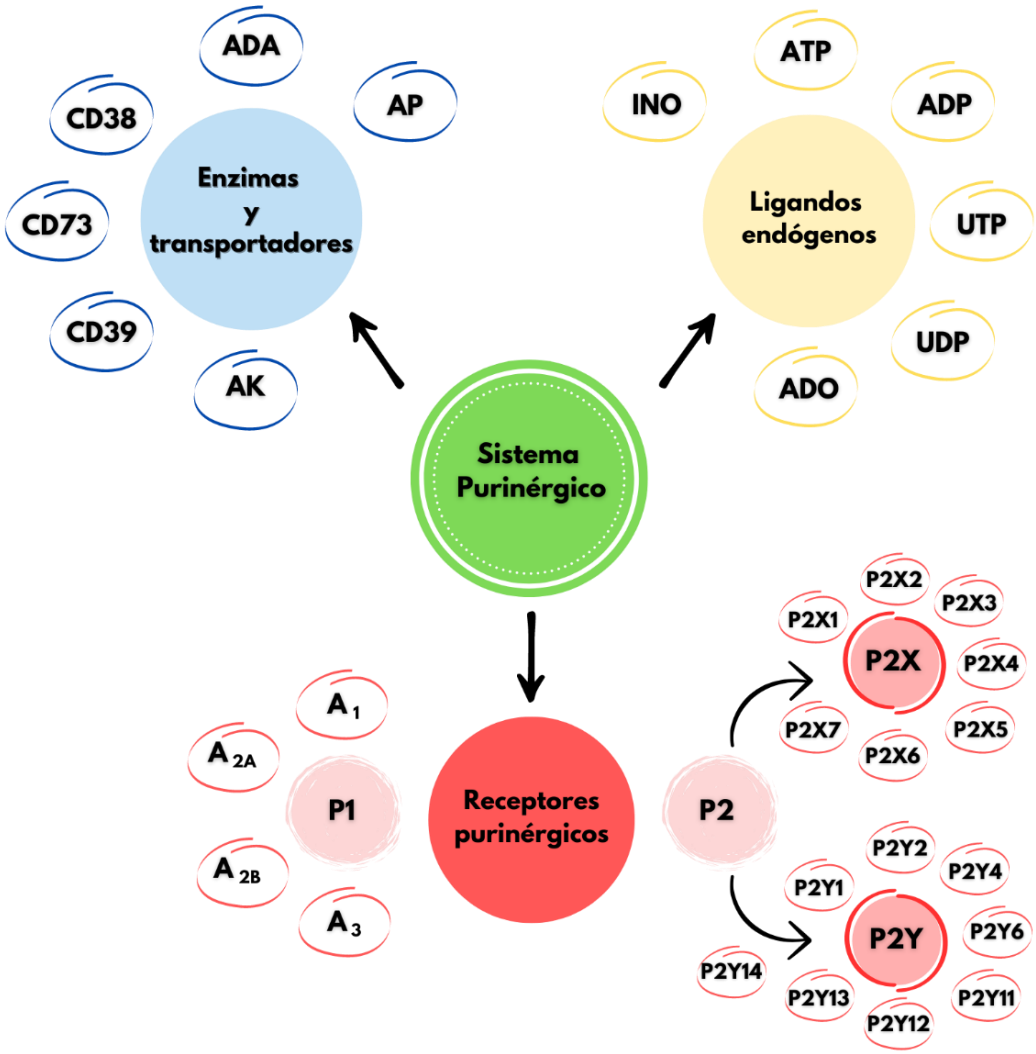


Figura 1.1. Sistema purinérgico y sus integrantes.

En la actualidad, los receptores purinérgicos se clasifican en dos grandes familias: los receptores purinérgicos tipo P1 y tipo P2. Los receptores P1 pertenecen a la familia de receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCR). Comprenden cuatro subtipos: A_1, A_{2A}, A_{2B} y A_3, y son activados selectivamente por la ADO.[8] Por su parte, los receptores P2 se dividen en dos grandes subfamilias: los receptores P2X y P2Y. Los receptores P2X son canales iónicos cuyo ligando endógeno es el ATP. Se han identificado siete subtipos de receptores P2X, denominados P2X1-P2X7. En cuanto a los receptores P2Y, al igual que los P1, son GPCR que pueden ser activados por distintos ligandos endógenos, como ATP, adenosina-5'-difosfato (ADP), uridina-5'-difosfato (UDP) y uridina-5'-trifosfato (UTP). Dentro de esta subfamilia, se han identificado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ocho subtipos de receptores, conocidos como P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 y P2Y14.[8]

En la Figura 1.2 se ilustra la participación del sistema purinérgico en una amplia variedad de procesos patológicos y en cómo su desregulación contribuye al desarrollo de diversas enfermedades. Entre estos procesos se incluyen: alteración del metabolismo, trastornos del sistema nervioso central, afecciones cardíacas y vasculares, alteraciones en el sistema inmune, procesos inflamatorios crónicos y progresión del cáncer.[9] La complejidad de esta red de señalización resalta su relevancia en la fisiopatología de múltiples sistemas, subrayando su potencial como dianas terapéuticas.

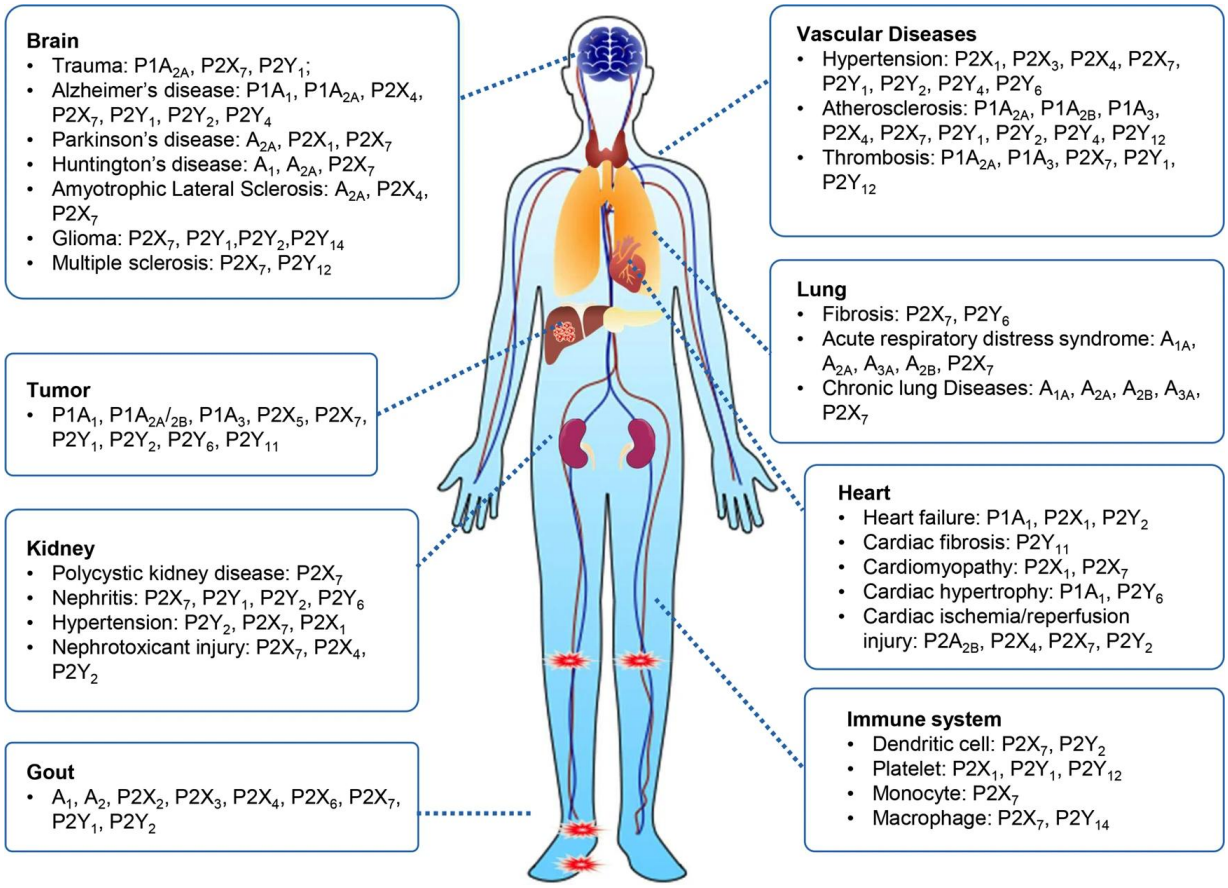
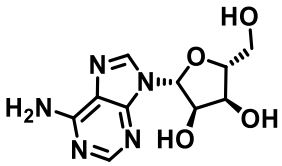


Figura 1.2. Implicación de los receptores purinérgicos en el desarrollo de diversas patologías.[9]

1.2 ADENOSINA Y RECEPTORES DE ADENOSINA

1.2.1 Síntesis, transporte y metabolismo de la adenosina

La ADO es un nucleósido constituido por una adenina y una ribofuranosa, unidos mediante un enlace β-*N*-glucosídico entre el C-1' de la ribosa y el N-9 de la adenina (Figura 1.3).[10] En condiciones fisiológicas su producción se localiza tanto a nivel intracelular como extracelular, donde se mantiene finamente regulada por la acción coordinada de un complejo conjunto de enzimas y transportadores.[11]



adenosina

Figura 1.3. Estructura química de la ADO.

A nivel intracelular la biosíntesis de ADO ocurre, principalmente, por la degradación de AMP intracelular, el cual es formado a partir del metabolismo del ATP mediante dos reacciones enzimáticas: la primera, catalizada por la adenilato quinasa (AK) que degrada el ATP en ADP, y la segunda, que convierte el ADP en AMP por acción de la nucleótido fosfoquinasa (NTPK).[12] Finalmente, el AMP intracelular es transformado por la enzima 5'-nucleotidasa citosólica (5'-NT) en ADO.[13] Con una cinética más lenta y en menor proporción, la ADO intracelular también se forma enzimáticamente mediante la *S*-adenosil-L-homocisteína hidrolasa (SAHH), que degrada la *S*-adenosil-L-homocisteína (SAH) en ADO y homocisteína.[14–16] La ADO intracelular tiene un tiempo de vida media inferior a un segundo, y su concentración está regulada por tres rutas enzimáticas: degradación a inosina (INO) mediante la adenosina desaminasa citosólica (ADA), fosforilación a AMP por la acción de la ADO quinasa (ADK) o servir de sustrato de la SAHH para formar nuevamente SAH.[17,18]

El transporte de ADO a través de la membrana plasmática se lleva a cabo mediante dos familias de transportadores de membrana: la familia SLC28 y la familia SLC29. Los transportadores equilibradores de nucleósidos (ENT) pertenecen a la familia SLC29, donde concretamente las isoformas ENT1 y ENT2 permiten el movimiento bidireccional de la ADO a favor del gradiente mediante transporte facilitado.[19] Por otro lado, los transportadores concentradores de nucleósidos (CNT) pertenecen a la familia SLC28, donde las isoformas CNT1 y CNT2 son las responsables del transporte bidireccional de ADO en contra del gradiente

mediante transporte activo secundario, utilizando un gradiente de iones Na^+ como fuente de energía.[20]

A nivel extracelular, la ruta canónica para la biosíntesis de ADO ocurre a través de dos reacciones enzimáticas secuenciales mediadas por enzimas presentes en la superficie celular. En primer lugar, la ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1 (ENTPD1 o CD39) transforma (a gran velocidad) el ATP y/o ADP en AMP.[21,22] Posteriormente, este AMP es convertido en ADO por la ecto-5'-nucleotidasa (5'-eNT o CD73).[23–25] Por otra parte, la ruta no canónica para la síntesis de ADO extracelular implica a la enzima CD38, que convierte el NAD^+ en ADP-ribosa, la cual es utilizada por la enzima ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa-1 (ENPP-1), para formar AMP. Este AMP es hidrolizado a ADO por CD73. Además de CD73, existen diversas fosfatasas de membrana, como la fosfatasa alcalina tisular inespecífica (TNAP), que hidroliza directamente el AMP a ADO.[26]

El aclaramiento de la ADO extracelular puede ocurrir en el propio espacio extracelular, donde es degradada a INO por la acción de una forma soluble de la ADA. Sin embargo, mayoritariamente, es captada hacia el interior celular donde sigue las rutas metabólicas previamente descritas. Además, la ADO extracelular puede unirse a los receptores de ADO para mediar las acciones fisiológicas derivadas de su activación.[26,27] En la Figura 1.4 se representa gráficamente un esquema de la producción, transporte y degradación de la ADO en condiciones fisiológicas.

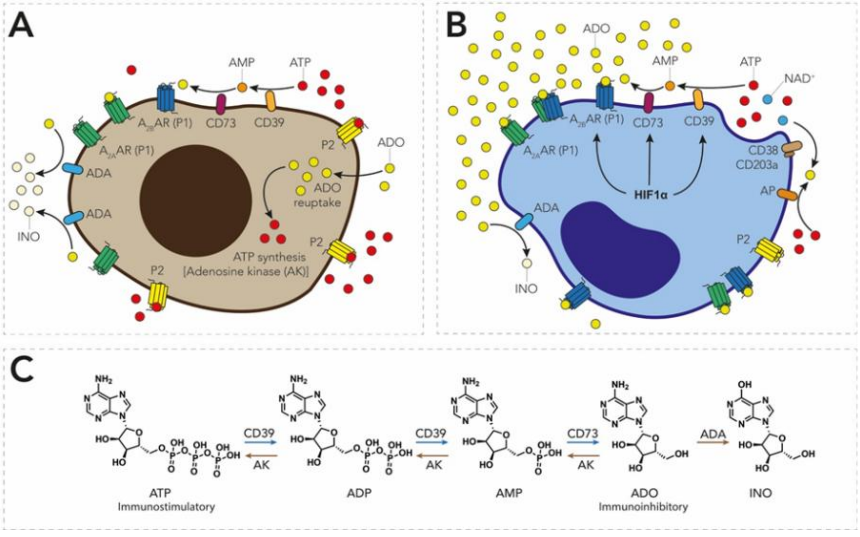


Figura 1.4. Síntesis, transporte y degradación de la adenosina. A) Síntesis, B) transporte y C) degradación de ADO en condiciones fisiológicas. Imagen reproducida de Prieto, R.; A_{2B} adenosine receptor as a novel target in cancer immunotherapy: validation and optimization of new ligands; Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 2022.

1.2.2 Receptores de adenosina: clasificación, localización y funciones fisiológicas

Los ARs han sido foco de investigación durante los últimos 50 años. Una búsqueda del término "receptores de ADO" en la base de datos PubMed arroja un resultado de más de 5000 entradas, donde el número de publicaciones aumenta considerablemente con el tiempo.[28]

La mayoría de las acciones fisiológicas de la ADO son mediadas por cuatro tipos de receptores metabotrópicos, los cuales, aunque están estrechamente relacionados, se diferencian en términos de estructura molecular, propiedades bioquímicas, distribución en los tejidos y perfil farmacológico.[7] Los ARs son proteínas integrales de la membrana celular que se incluyen en la clase A de la familia de los GPCR, presentando todos una estructura común.

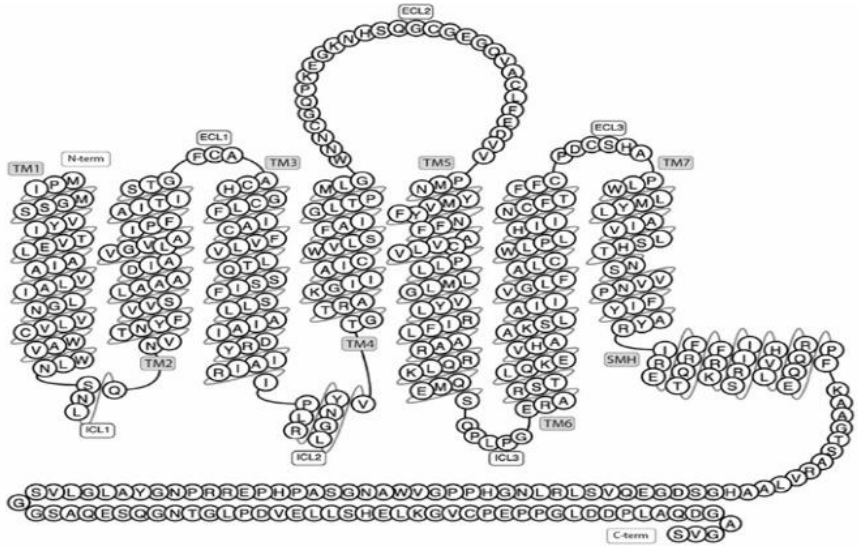


Figura 1.5. Estructura general de los GPCR, concretamente del $A_{2A}R$.

En la Figura 1.5 se representa la estructura general de un GPCR modelo ($A_{2A}R$), los cuales poseen siete dominios transmembrana (TM1-TM7), cada uno compuesto por una cadena de entre 20 y 27 aminoácidos que adopta una estructura de hélice-α.[8] Los TM están conectados entre sí mediante tres bucles extracelulares (ECL1-ECL3) y tres bucles intracelulares (ICL1-ICL3). El extremo NH_2-terminal se encuentra orientado hacia el espacio extracelular, mientras que el extremo C-terminal está orientado hacia el citosol.[8] Actualmente, los receptores de ADO (ARs) se clasifican en: el receptor de ADO A_1 (A_1R), el receptor de ADO A_{2A} ($A_{2A}R$), el receptor de ADO A_{2B} ($A_{2B}R$) y el receptor de ADO A_3 (A_3R).[7]

La Tabla 1.1 recoge la clasificación de los receptores de ADO, así como sus características moleculares principales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.1. Características moleculares de los receptores de ADO.[29]

	***h*A$_1$R**	***h*A$_{2A}$R**	***h*A$_{2B}$R**	***h*A$_3$R**
Afinidad por la ADO (**K*i***)	1-10 nM	30 nM	1000 nM	100 nM
Localización en el cromosoma	1q32.1	22g11.2	17p11.2-12	1p21-p13
N.º total de aminoácidos	326	410	328	318
% de similitud con *h*A$_1$R	-	38.3	44.0	46.5
% de similitud con *h*A$_{2A}$R	38.3	-	46.6	31
% de similitud con *h*A$_{2B}$R	44.0	46.6	-	35.7
Clonación	Humano, perro, vaca y conejo	Humano, perro, cobaya	Humano	Humano, rata, oveja y conejo

Los ARs se encuentran localizados en casi la totalidad del organismo, incluyendo el sistema nervioso central, los sistemas vascular, respiratorio, gastrointestinal y urogenital, así como en el sistema inmune. Además, también se encuentran expresados en los huesos, articulaciones, ojos y piel. Este amplio patrón de distribución refleja la importancia de los ARs en el control de diversas funciones, como la actividad neuronal, metabólica, cardíaca y renal.[29]

El A$_1$R se encuentra altamente expresado en el sistema nervioso central, específicamente en la corteza cerebral, el cerebelo, el hipocampo, la médula espinal y las células gliales.[29] En estas regiones regula diversas funciones fisiológicas, como el control del ciclo sueño-vigilia, la liberación de neurotransmisores y la reducción del dolor neuropático, desempeñando además funciones sedantes, anticonvulsivantes y ansiolíticas.[30–33] A nivel periférico, los receptores A$_1$ están presentes en las aurículas cardíacas, donde poseen efectos cronotrópicos negativos, dromotrópicos e inotrópicos.[34] En el riñón, el A$_1$R provoca vasoconstricción en las arteriolas, lo que reduce tanto el flujo sanguíneo renal como la tasa de filtración glomerular, además de provocar un aumento en la reabsorción tubular de Na^+.[35–37] Por otra parte, su activación en el tejido adiposo y en el páncreas inhibe la lipólisis y la secreción de insulina, respectivamente.[38] Está implicado también en la homeostasis ósea, donde favorece la diferenciación de los

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

osteoclastos.[39] Con una menor expresión, los receptores A_1 también se encuentran en las vías respiratorias, específicamente en las células epiteliales y del músculo liso, donde su activación provoca una respuesta broncoconstrictora.[40] Finalmente, se expresan en diversas células del sistema inmunológico, como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y monocitos, en los cuales ejercen un efecto proinflamatorio.[41]

El $A_{2A}R$ se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central, especialmente en zonas como el cuerpo estriado y el bulbo olfatorio, mientras que se observa en menor medida en la corteza cerebral y el hipocampo.[29] La activación del $A_{2A}R$ en estas regiones desempeña un papel crucial en procesos como la actividad motora, la liberación de otros neurotransmisores (glutamato y dopamina), la regulación de la función cognitiva (memoria), la secreción de moléculas involucradas en el metabolismo y el control sobre el comportamiento depresivo y el estrés.[42–48] En la enfermedad de Alzheimer, la activación del $A_{2A}R$ provoca un aumento en la pérdida de la función cognitiva y la memoria.[49] En estudios realizados en modelos animales, se demostró que la administración oral de antagonistas del $A_{2A}R$ disminuye la hiperfosforilación de la proteína Tau, mejorando la memoria.[50] Además, se demostró que la administración de la proteína αβ-amiloide en roedores con deleción genética de $A_{2A}R$ no inducía toxicidad sináptica o defectos en el proceso de aprendizaje.[51] El $A_{2A}R$ también está muy involucrado en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. La activación de dicho receptor ejerce un efecto neuroexcitatorio al aumentar la liberación de glutamato y regular la neurotransmisión dopaminérgica.[49] En el apartado 1.2.4 (Oligomerización de GPCRs y oligómeros del receptor A_{2A}) se explicará con más detalle su participación en la enfermedad de Parkinson. Por otra parte, el $A_{2A}R$ se expresa también tanto en neuronas presinápticas como postsinápticas, así como en células gliales, entre las que se incluyen astrocitos, microglía y oligodendrocitos.[29] Su activación en las células gliales promueve la diferenciación de la microglía y los astrocitos hacia un fenotipo proinflamatorio.[50] Este proceso de diferenciación se ha relacionado estrechamente con un pronóstico desfavorable en diversas enfermedades neurodegenerativas inflamatorias, destacando la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.[54,55] A nivel periférico, se ha descrito la expresión de $A_{2A}R$ en las células del sistema inmunitario, expresándose en la superficie de células como: linfocitos T, células *natural killer* (NK), macrófagos, células mieloides supresoras, células dendríticas y neutrófilos.[29] Las acciones fisiológicas derivadas de la activación de este receptor en dichas células son de naturaleza antiinflamatoria e inmunosupresora.[29] Numerosas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

evidencias respaldan el potente efecto antiinflamatorio a nivel periférico derivado de la activación del $A_{2A}R$. En modelos experimentales de artritis reumatoide, la activación de este receptor ha demostrado tener capacidad antiinflamatoria, al reducir la liberación de TNF-α mediada por la metaloproteína-3.[56] A su vez, a nivel pulmonar, la activación del $A_{2A}R$, induce una reducción del efecto inflamatorio causado por la alergia en las vías aéreas, dicho efecto está asociado a una disminución en la secreción de citocinas proinflamatorias por parte de las células linfoides innatas del grupo 2 (ICL2).[57] Por otro lado, el efecto inmunosupresor de la activación del $A_{2A}R$ se manifiesta principalmente mediante la inhibición de las funciones efectoras de los linfocitos T $CD8^+$, $CD4^+$, las células NK y los linfocitos B.[58,59] En los últimos años, el impacto del efecto inmunosupresor de la ADO y su relación con la progresión del cáncer ha cobrado gran relevancia, un tema que será tratado con mayor profundidad en la sección 1.3 (Adenosina: implicación en el sistema inmune y aplicaciones en el contexto del cáncer). En las articulaciones, el $A_{2A}R$ está implicado en la homeostasis del cartílago. Estudios en modelos animales han mostrado que la eliminación genética del receptor en condrocitos conduce a la aparición prematura de osteoartritis.[60] En el sistema circulatorio encontramos este receptor en vasos sanguíneos coronarios, linfáticos y cerebrales. A nivel coronario regula la presión sanguínea y el ritmo cardíaco, induciendo vasodilatación mediante su activación en las células del músculo liso y del endotelio vascular.[61] El $A_{2A}R$ también participa en la homeostasis ósea; su activación inhibe la diferenciación de osteoclastos promoviendo la formación de masa ósea nueva por los osteoblastos.[62]

Históricamente y debido a su baja afinidad por la ADO, se pensaba que el $A_{2B}R$ tenía una relevancia fisiológica limitada. Sin embargo, con los datos aportados por los avances en la investigación, se ha demostrado que este receptor desempeña un papel importante en numerosos procesos fisiopatológicos. El $A_{2B}R$ se expresa principalmente en tejidos periféricos, incluyendo el sistema respiratorio, el sistema urogenital, el sistema gastrointestinal y el sistema cardiovascular. Asimismo, se encuentra presente en diversos tipos celulares, tales como fibroblastos, células del músculo liso, endotelio vascular, células del sistema inmune, plaquetas y adipocitos.[29] En el sistema cardiovascular, el $A_{2B}R$ ejerce principalmente efectos cardioprotectores. Su activación inhibe la proliferación de fibroblastos, el crecimiento de las células del músculo liso y la síntesis de colágeno, contribuyendo así a la prevención de la fibrosis. En estudios con fibroblastos cardíacos de rata, la activación de este receptor reduce la liberación de factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) y de angiotensina II, generando

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

un efecto antifibrótico.[63] Además, estudios *in vivo* han demostrado que el $A_{2B}R$ participa en el acondicionamiento isquémico, tanto en la fase previa como en la posterior al evento isquémico, resaltando su papel en la protección cardiovascular.[64,65] Por otro lado, su activación en adipocitos ejerce un control sobre el metabolismo energético de los mismos, así como en la respuesta inflamatoria del tejido adiposo. Se ha demostrado que el $A_{2B}R$ puede influir en la lipólisis y en la secreción de diversas adipocinas, incluidas aquellas relacionadas con la inflamación y la resistencia a la insulina, como la adiponectina y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α).[29] También se ha descrito que el $A_{2B}R$ modula la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros. Este proceso es relevante en el contexto de la obesidad, donde una mayor activación de A_{2B} podría contribuir al crecimiento del tejido adiposo y a un entorno proinflamatorio.[29] En el sistema respiratorio, la activación del $A_{2B}R$ contribuye a varios procesos, especialmente en respuesta a condiciones de hipoxia e inflamación. Este receptor se expresa en células del epitelio alveolar, células endoteliales y células del músculo liso de las vías respiratorias, y su activación modula funciones clave en estos tejidos.[29] La activación del $A_{2B}R$ en células del epitelio alveolar y células del músculo liso puede inducir broncoconstricción, aumentando la resistencia de las vías respiratorias. Esto juega un papel importante en enfermedades como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en las cuales la activación excesiva del $A_{2B}R$ puede contribuir al estrechamiento de las vías aumentando la dificultad respiratoria.[29] En el contexto del cáncer, se ha descrito que la activación del $A_{2B}R$ en las células que componen el microambiente tumoral favorece la proliferación celular, la angiogénesis y la metástasis, lo que acelera el crecimiento de la masa tumoral y la progresión de la enfermedad. Este aspecto será analizado con mayor detalle en la sección 1.3 (Adenosina: implicación en el sistema inmune y aplicaciones en el contexto del cáncer). Su expresión a nivel del SNC es relativamente baja en comparación con los demás subtipos; aun así, se encuentra en astrocitos, neuronas y microglía.[66–68] En astrocitos, actúa como un sensor de la actividad neuronal: en modelos animales con deleción genética de este receptor, se observó una pérdida de la plasticidad sináptica, así como una reducción en la memoria de reconocimiento y en la calidad del sueño.[69]

El A_3R se expresa en una gran variedad de células primarias, tejidos y líneas celulares.[70] Su expresión en el sistema nervioso central es baja, localizándose en regiones como el tálamo, el hipotálamo, la corteza y las células ganglionares, así como en las terminaciones nerviosas motoras.[29] Además, el A_3R está presente en células como la microglía y los astrocitos, donde

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

su activación inhibe la respuesta inflamatoria generando efectos analgésicos y neuroprotectores.[31] A nivel periférico, se ha identificado su expresión en el sistema cardiovascular, concretamente en células del músculo liso de las arterias coronaria y carótida, donde participa en los procesos de proliferación y diferenciación.[71,72] En el sistema inmune, se encuentra en células como mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, y linfocitos, ejerciendo un importante efecto antiinflamatorio, regulando la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de citocinas proinflamatorias como la interleucina-6 (IL-6), el TNF-α y la interleucina-1β (IL-1β), además de disminuir la quimiotaxis.[73–76] En el sistema respiratorio, los receptores A_3 se localizan en los bronquios, el parénquima pulmonar y mesotelioma pleural. Su activación reduce el crecimiento celular y la liberación de citocinas inflamatorias como IL-1β y TNF-α.[77–79]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.3 Vías de señalización de los receptores de adenosina

Las proteínas G son esenciales para la señalización intracelular; son proteínas heterotriméricas compuestas por tres subunidades (α, β y γ), que se encuentran unidas a los receptores de membrana. En condiciones de reposo, la subunidad α está unida a una molécula de GDP.[80] Cuando el ligando endógeno se une al receptor, se induce un cambio conformacional que promueve el intercambio de guanosín difosfato (GDP) por guanosín trifosfato (GTP) en la subunidad α, lo que desencadena la disociación del heterotrímero en la subunidad α y el complejo formado por las subunidades βγ. Tanto la subunidad α como el complejo βγ pueden, entonces, activar o inhibir diversas enzimas o canales iónicos, denominados efectores, que median la respuesta celular.[80] La señalización persiste hasta que la subunidad α hidroliza el GTP a GDP gracias a su actividad GTPasa, momento en el cual se reconstituye el complejo de las subunidades α, β y γ, terminando así la señalización.[80]

Tabla 1.2. Efecto de la activación de los 4 subtipos de receptores ADO sobre la adenilato ciclasa

	hA_1R	*h*A_{2A}R	*h*A_{2B}R	*h*A_3R
Efecto	↓ AMPc	↑ AMPc	↑ AMPc	↓ AMPc

El A_1R está acoplado a proteínas inhibitorias $G_{i/o}$.[29] Una vez activado, la subunidad $\alpha_{i/o}$ inhibe la actividad de la adenilato ciclasa (AC), lo que produce una reducción en la concentración de AMPc y, como consecuencia, la inhibición de la proteína quinasa A (PKA) y de la cascada de señalización derivada de la misma.[29] A su vez, el complejo formado por las subunidades βγ provoca la activación de diferentes vías de señalización. Por un lado, activa la fosfolipasa C (PLC); provocando la rotura del fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) presente en la membrana plasmática en diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3). El IP3 se une a los receptores de IP3 situados en el retículo endoplasmático, provocando la salida de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares. El incremento del Ca^{2+}, junto con el DAG, conduce a la activación de la proteína quinasa C (PKC) y de otras proteínas fijadoras de calcio que ponen en marcha la vía de las proteínas activadas por mitógenos (MAPK), tales como p38, ERK1/2 y JNK1/2.[29] Por otro lado, el complejo βγ modula la actividad de determinados canales iónicos. A nivel del SNC y miocardio, facilita la apertura de los canales iónicos de K^+ y el cierre de los canales iónicos de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que reduce la liberación de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

neurotransmisores en las sinapsis y disminuye la excitabilidad de las células cardíacas y neuronales.[81,82] En la Figura 1.6 se resumen las principales vías de señalización del A_1R.

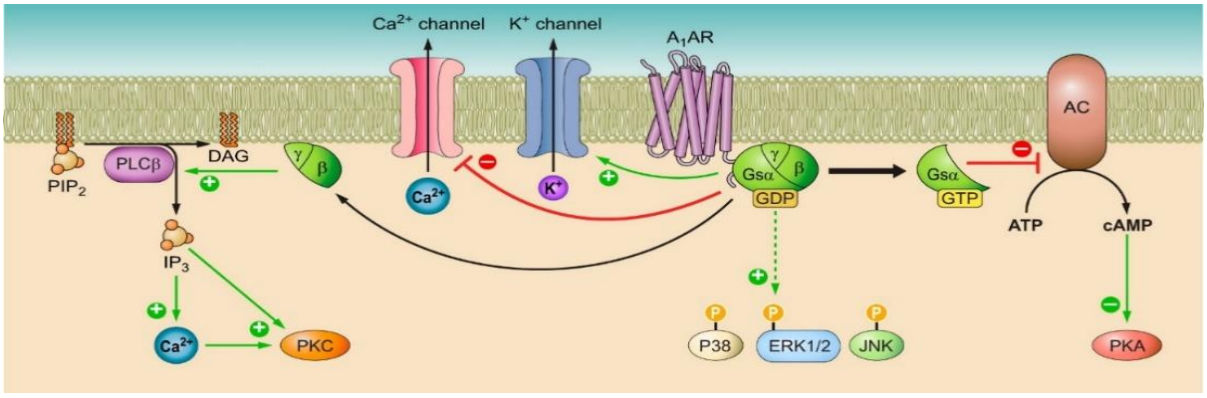


Figura 1.6. Resumen de la señalización mediada por el A_1R.[29]

El $A_{2A}R$ está acoplado a proteínas estimuladoras G_s. Su principal mecanismo efector, tras la activación, es la estimulación de la AC por la subunidad α. Esto provoca un aumento en la síntesis de AMPc, que a su vez activa la PKA,[83] la cual desempeña un papel fundamental en la regulación de diversas vías de señalización intracelular. Entre estas vías se incluyen la vía de las MAPK (p38, ERK1/2 y JNK1/2), implicadas en la respuesta celular a estímulos externos, como el estrés oxidativo y los factores de crecimiento.[84,85] En el SNC, la activación de PKA estimula la vía de las proteínas fijadoras de elementos de respuesta al AMPc (CREB), que regulan la transcripción de genes asociados con la neuroplasticidad y la memoria.[86] Otro sustrato importante de PKA es la fosfoproteína regulada por AMPc-32 (DARPP-32), una proteína clave en la modulación de la señalización dopaminérgica, especialmente en el sistema nervioso central, donde coordina la actividad de diversas quinasas y fosfatasas involucradas en la neurotransmisión.[86] Además, la PKA modula la actividad de una variedad de canales iónicos, entre los que se incluyen los de Ca^{2+}, Na^+ y K^+.[29] En la Figura 1.7 se resumen las principales vías de señalización del $A_{2A}R$.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

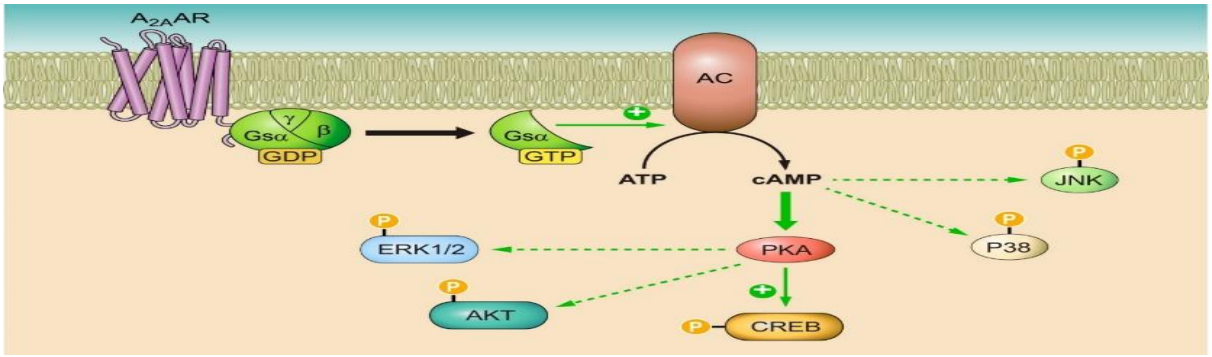


Figura 1.7. Señalización mediada por el $A_{2A}R$.[29]

Por su parte, el $A_{2B}R$ puede acoplarse tanto a proteínas G_s como a proteínas $G_{q/11}$, lo que le permite modular diversas vías de señalización intracelular.[29] La activación del complejo α_s, provoca la puesta en marcha de la señalización derivada del AMPc.[87] A nivel del SNC, la vía dependiente de AMPc fortalece la unión tipo "Gap Junction" en las células del endotelio microvascular del cerebro,[87] mientras que a nivel periférico, estimula la vía de las proteínas de intercambio dependientes de AMPc (EPAC). La subunidad α_s también puede estimular la vía de las MAPK en determinados tipos de células, tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico.[88] Por otro lado, cuando el receptor A_{2B} está acoplado a proteínas $G_{q/11}$ o al complejo $\beta\gamma$, su activación estimula la vía de la PLC. Esta señalización basada en Ca^{2+} activa la PKC y otros efectores sensibles al calcio, que participan en diversas respuestas celulares, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación y la inflamación.[29] En la Figura 1.8 se resumen las principales vías de señalización del $A_{2B}R$.

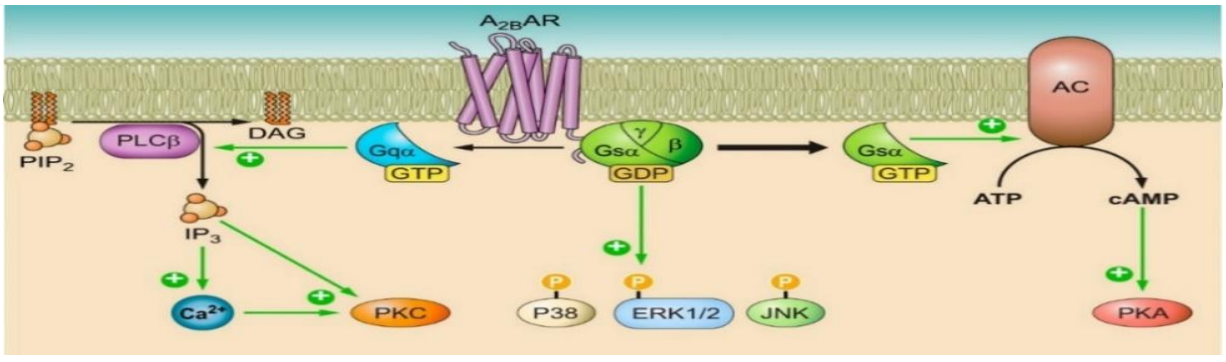


Figura 1.8. Señalización mediada por el $A_{2B}R$.[29]

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El A_3R puede acoplarse a proteínas G_i y $G_{q/11}$, activando una gran variedad de rutas de señalización intracelular. Cuando se asocia a proteínas G_i, la subunidad α inhibe la AC, lo que disminuye los niveles de AMPc, suprimiendo la señalización derivada PKA de esta vía efectora.[29] A su vez, esta inhibición favorece la señalización derivada de la glucógeno sintasa quinasa-3β (GSK-3β), además de provocar una regulación a la baja de la señalización mediada por la β-catenina, la ciclina-D1 y el factor nuclear κB (NF-κB).[89] En determinados contextos, dicha subunidad es capaz de modular las vías PI3K/AKT y MAPK, involucradas en los procesos de regulación de la inflamación y supervivencia celular.[70] Por otro lado, cuando el receptor está acoplado a proteínas $G_{q/11}$ o al complejo βγ, activa la PLC. Las vías efectoras derivadas de PLC son esenciales para diversas funciones celulares que derivan en efectos neuroprotectores y cardioprotectores.[70] Asimismo, el A_3R puede acoplarse a proteínas G monoméricas, activando el complejo RhoA y la fosfolipasa D (PLD). Esta activación regula la dinámica del citoesqueleto celular, además de participar en procesos como la migración celular y la reparación tisular, una vía efectora que se ha descrito únicamente para el A_3R.[70] En la Figura 1.9 se resumen las principales vías de señalización del A_3R.

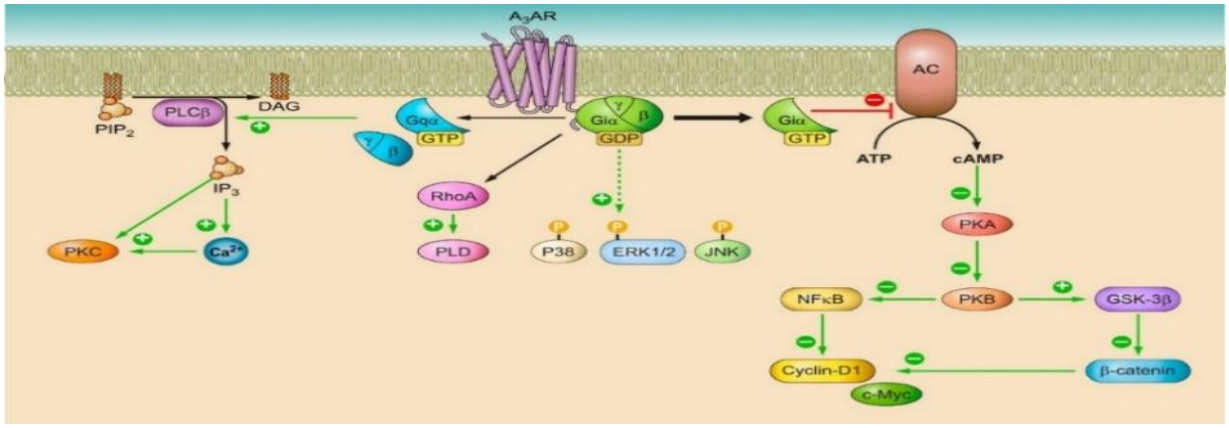


Figura 1.9. Señalización mediada por el A_3R.[29]

1.2.4 Oligomerización de GPCRs y oligómeros del receptor A_{2A}

Durante muchos años se ha pensado que los receptores de ADO, como muchos otros GPCR de la clase A, se encontraban únicamente en forma de monómeros. Sin embargo, en los últimos años se ha evidenciado que los GPCRs pueden formar oligómeros (homómeros y/o heterómeros), completamente estables y funcionales, capaces de desencadenar un tipo de señalización intracelular distinta a la que ejercen las unidades monoméricas.[8] Dependiendo de la "pareja de baile", los oligómeros pueden diferenciarse en: 1) homómeros, que surgen de la asociación de dos o más monómeros del mismo tipo de receptor; y 2) heterómeros, que surgen de la asociación de dos o más receptores distintos.

Homómeros del receptor A_{2A}

En teoría, se pueden obtener cuatro pares homoméricos para los ARs: A_1R-A_1R $A_{2A}R$-$A_{2A}R$, $A_{2B}R$-$A_{2B}R$ y A_3R-A_3R, pero solo los dos primeros han sido validados inequívocamente.[8]

$A_{2A}R$-$A_{2A}R$: La primera evidencia de que el $A_{2A}R$ podía formar homómeros fue descrita en 2004 por Canals y colaboradores.[90] Los autores utilizaron técnicas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y de bioluminiscencia (BRET), además de inmunoprecipitación, para demostrar que, en células HEK293 transfectadas, el $A_{2A}R$ podía existir tanto en forma de homómeros como de monómeros. Los resultados mostraron que el 90 % de los receptores presentes en la superficie celular se encontraban en forma de homómeros, mientras que solo el 10 % se presentaban como monómeros.[90] Años más tarde, en 2008, Vidi y colaboradores, utilizando una combinación de FRET y fragmentación de fluorescencia bimolecular (BiFC), demostraron que, en la membrana plasmática de células neuronales diferenciadas, existían principalmente oligómeros de este receptor, compuestos por al menos tres subunidades monoméricas.[91,92]

Heterómeros del receptor A_{2A}

Se han descrito numerosos heterómeros del $A_{2A}R$, entre los que destacan:

$A_{2A}R$-A_1R: Fue el primer ejemplo descrito de heterómero. Como se mencionó en el apartado anterior, el $A_{2A}R$ está acoplado a proteínas G de tipo G_S, mientras que el A_1R se acopla a proteínas G de tipo G_i, lo que permite que el heterómero posea dos vías de señalización distintas, activadas según el contexto. Cuando la concentración de ADO es baja, predomina la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

señalización mediada por el A_1R (mayor afinidad), lo cual disminuye la concentración intracelular de AMPc. Sin embargo, a concentraciones más altas de ADO, la vía de señalización preferente es la mediada por el $A_{2A}R$ (menor afinidad), resultando en un aumento de AMPc.[8]

$A_{2A}R$-D_2R: Es uno de los heterómeros más estudiados y prometedores a nivel terapéutico. Se localiza en el sistema nervioso central, principalmente en el estriado, y ha demostrado estar implicado en diversas enfermedades neurodegenerativas, como el párkinson y el alzhéimer, además de tener un rol en otras patologías del SNC, como la esquizofrenia.[93,94] La activación del $A_{2A}R$ en este heterómero reduce la afinidad de los agonistas dopaminérgicos, con la consecuente reducción de la señalización mediada por las proteínas G acopladas al receptor D_2 de dopamina (D_2R), afectando negativamente a la liberación de dopamina y a la actividad motora. En el contexto de la enfermedad de Parkinson, donde la pérdida de neuronas dopaminérgicas ya está presente, esta modulación negativa de la actividad del D_2R exacerba los síntomas motores característicos de la patología.[93] Como se analizará en el apartado 1.4.3.1 (Aplicaciones terapéuticas y ensayos clínicos de los antagonistas del $A_{2A}R$), el uso de antagonistas del $A_{2A}R$ en combinación con agonistas dopaminérgicos abre nuevas posibilidades en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Esta opción terapéutica ayuda a reducir los síntomas motores, mejorando la función motora y aliviando la rigidez y la lentitud en el movimiento.

$A_{2A}R$-CB_1R: La existencia de este heterómero fue descrita por Carriba y colaboradores en 2007 mediante el uso de técnicas de FRET y BRET.[95] Este estudio demostró la presencia del heterómero en el estriado, específicamente en las terminales de las neuronas glutamatérgicas que contactan con las neuronas espinosas medianas. En el mismo trabajo se observó que la señalización del receptor de cannabinoides tipo 1 (CB_1), a través de proteínas G de tipo $G_{i/o}$, depende de la activación previa del $A_{2A}R$. Este mecanismo ha llevado a postular este heterómero como una potencial diana terapéutica para abordar los efectos depresores motores y adictivos asociados al uso de cannabinoides mediante el empleo de antagonistas del $A_{2A}R$.[95]

$A_{2A}R$-$A_{2B}R$: Este heterómero fue uno de los últimos en ser identificado.[96] Mediante el uso de técnicas de FRET, BRET y BiFC, Hinz y colaboradores demostraron no solo la presencia de este heterómero, sino también la alteración en la señalización intracelular mediada por el $A_{2A}R$

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cuando se coexpresa con el $A_{2B}R$. Demostraron que, cuando existía coexpresión, los ligandos potentes y selectivos del $A_{2A}R$ perdían tanto su afinidad como su actividad funcional.[96] El descubrimiento de esta nueva entidad, por los motivos que se explicarán en el apartado 1.3 (Adenosina: implicación en el sistema inmune y aplicaciones en el contexto del cáncer), ha consolidado otras evidencias que destacan los roles de $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ y del heterómero $A_{2A}R$-$A_{2B}R$ como dianas terapéuticas relevantes en la inmunoterapia del cáncer, estimulando la búsqueda de nuevos antagonistas duales de estos receptores.

En la Figura 1.10 se representan los principales oligómeros que puede formar el $A_{2A}R$.

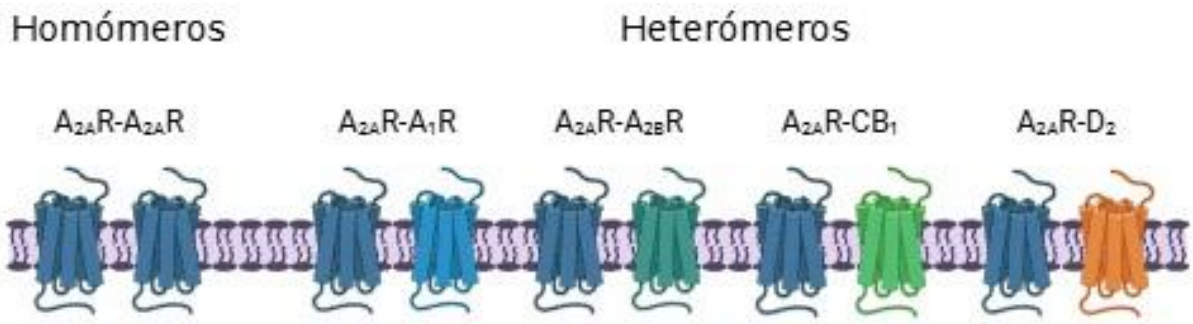


Figura 1.10. Ejemplos de oligómeros del $A_{2A}R$.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.5 Estructura del receptor A_{2A}

Desde su descubrimiento, los GPCR han sido intensiva y exitosamente empleados como dianas para el descubrimiento de nuevos fármacos. A pesar de que los receptores de ADO fueron clonados con éxito hace más de 25 años, y han sido objeto de numerosos estudios farmacológicos, mutagénicos y de modelado molecular, hasta la fecha solo se ha logrado obtener estructuras cristalinas de alta resolución para los receptores A_1 y A_{2A}.[7] La falta de estructuras cristalinas de los demás receptores ha dificultado una comprensión más profunda de los intrincados mecanismos de señalización molecular que subyacen durante la activación de los ARs.[97] Esta problemática se suele solventar empleando modelos de homología refinados para los receptores A_{2B} y A_3.

El A_{2A}R fue uno de los primeros GPCR cristalizados, y uno de los que cuenta con mayor número de estructuras cristalinas . En la base de datos "Protein Data Bank", existen más de 70 entradas que incluyen 15 estructuras de antagonistas y 4 de agonistas co-cristalizadas con distintos receptores recombinantes. Esto lo convierte en uno de los GPCR mejor estudiado, lo cual ha sido de gran valor para comprender y estudiar la flexibilidad conformacional tanto del sitio ortostérico como del sitio de unión de los ligandos alostéricos. Algunas de las estructuras de antagonistas que se han conseguido cristalizar son: ZM241385 (PDB: 3EML)[98], Etrumadenant (PDB: 8C9W),[99] Tozadenant (PDB: 5OLO),[100] PSB-2115 (PDB: 7PYR)[101] o Vipadenant (PDB: 5OLH)[100]. En cuanto a su conformación activa, encontramos al A_{2A}R formando complejos con agonistas como la ADO (PDB: 2YDO),[102] NECA (PDB: 2YDV),[102] UK-432097 (PDB: 3QAK)[103] o CGS21680 (PDB: 4UG2).[104]

En la Figura 1.11A se muestra la estructura del receptor recombinante A_{2A}AR-STaR2-*b*RIL unido al antagonista LJ-4517, con una resolución de 2.05 Å, obtenida mediante difracción de rayos X con láser libre de electrones (PDB: 8CU6).[105] El compuesto LJ-4517 se orienta casi perpendicularmente al plano de la membrana, donde el núcleo de adenina se ancla al bolsillo de unión mediante dos enlaces de hidrógeno con los residuos Glu169$^{5.30}$ y Asn253$^{6.55}$ y a través de interacciones tipo π-π con el residuo de Phe168$^{5.29}$ presentes en el ECL2.[105] El núcleo de adenina es común a muchas estructuras, tanto de agonistas como de antagonistas, siendo este modo de unión consistente en todas ellas.[102,103] El anillo de tiofeno unido al carbono C-8 penetra profundamente en el bolsillo ortostérico, donde establece interacciones tipo π-π con el residuo de His250$^{6.52}$ (Figura 1.11C). A su vez, este mismo residuo también ejerce interacciones hidrofóbicas con los residuos de Met177$^{6.57}$, Leu249$^{6.51}$ y Trp246$^{6.48}$ (Figura 1.11D).[105] El grupo

USC DE COMPOSTELA

-OH del carbono C-3' establece un enlace de hidrógeno con His278$^{7.43}$, siendo esta interacción insuficiente para activar la conformación activa del receptor (Figura 1.11C).[105] En los modelos de unión de los agonistas, los grupos -OH de los carbonos C-2' y C-3' de la ribosa forman enlaces de hidrógeno a través de moléculas de agua con los residuos His278$^{7.43}$ y Ser277$^{7.42}$, interacciones que resultan determinantes para la activación del receptor.[106,107]

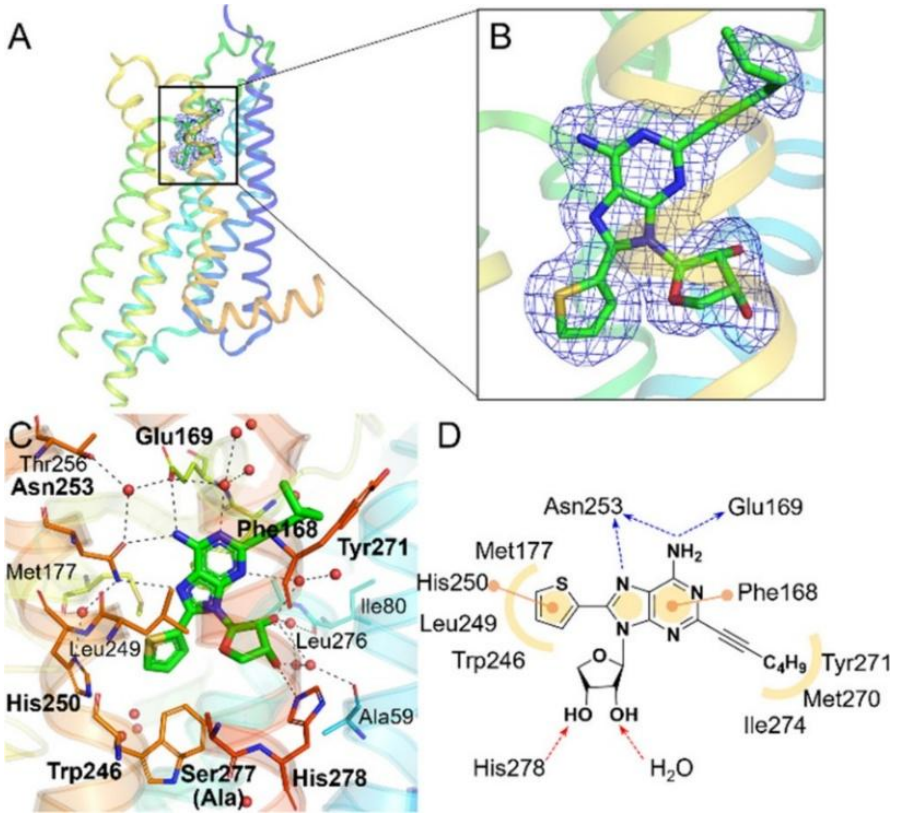


Figura 1.11. Estructura del A_{2A}RAR-StaR2-bRIL formando un complejo con el compuesto LJ-4517. (PDB ID: 8CU7). A) Visión general del receptor, con las hélices mostradas en colores pastel y el compuesto LJ-4517 en representación tipo "stick", en color verde. B) Disposición del compuesto LJ-4517 dentro de la cavidad ortostérica. C) Detalle de las interacciones entre el receptor y el compuesto LJ-4517. Los enlaces de hidrógeno del compuesto LJ-4517 se resaltan con líneas discontinuas negras. Las moléculas de agua se muestran como esferas rojas. D) Diagrama esquemático de las interacciones del ligando LJ-4517 con los residuos implicados. Los enlaces de hidrógeno se muestran como flechas discontinuas de color azul y rojo, y las interacciones tipo π-π se representan como líneas continuas naranjas con círculos en ambos extremos. Las interacciones hidrofóbicas se indican en color naranja claro.[105]

En el compuesto LJ-4517, el residuo de tiofeno en la posición C-8 provoca un desplazamiento estérico del residuo de ribosa de aproximadamente 70º, si se compara con el mismo residuo en NECA (PDB: 2YDV)[102] (Figura 1.12B). Este desplazamiento provoca que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

los grupos -OH de los carbonos C-2' y C-3' se alejen de la posición agonista, dificultando la formación de los enlaces de hidrógeno con los residuos His278$^{7.43}$ y Ser277$^{7.42}$, lo que mantiene al receptor en su conformación inactiva.[105] Finalmente, el grupo hexinilo se extiende sobre una cavidad exterior, recientemente descrita con el compuesto LUAA47070 (PDB: 5OLV)[100], estableciendo interacciones hidrofóbicas con los residuos Tyr271$^{7.34}$, Ile274$^{7.39}$ y Met270$^{7.35}$ (Figura 1.11C).[105]

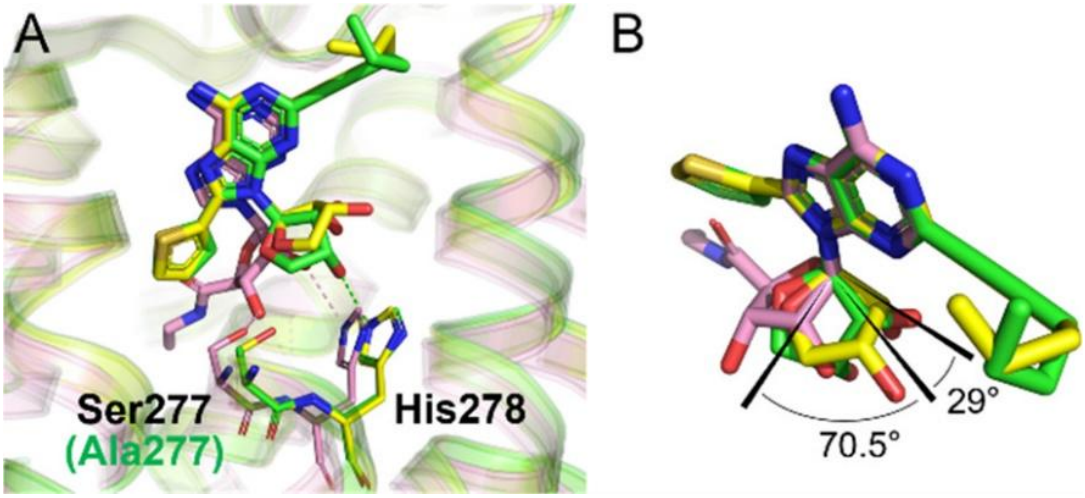


Figura 1.12. Disposición del residuo de ribosa en el antagonista LJ-4517 y el agonista NECA unidos al A_{2A}RAR-StaR2-bRIL. A) Estructuras cristalinas superpuestas del compuesto LJ-4517 unido a A_{2A}AR-STaR2-bRIL (verde; PDB ID: 8CU7), A2AAR-STaR2-S277-bRIL (amarillo; PDB ID: 8CU6) y NECA unido al A_{2A}RAR termoestabilizado (rosa; PDB ID: 2YDV). El antagonista LJ-4517 (verde) solo puede formar un enlace de hidrogeno (líneas discontinuas verdes) con el residuo His278$^{7.43}$, mientras que el agonista NECA (rosa) establece dos enlaces de hidrógeno (líneas discontinuas rosas) con los residuos Ser277$^{7.42}$ e His278$^{7.43}$. B) Diferencias en los ángulos de los residuos de ribosa del antagonista LJ-4517 unido a A2AAR-STaR2-bRIL (verde) y a A2AAR-STaR2-S277-bRIL (amarillo), comparados con el agonista NECA (rosa; PDB ID: 2YDV). Los compuestos están superpuestos en base a su núcleo común de adenina.[105]

En la Figura 1.13 se observa una comparación de la cavidad ortostérica ocupada por diferentes antagonistas y agonistas.[105] En las estructuras con agonistas (Figura 1.13A) se establecen interacciones con los residuos His278$^{7.43}$ y Ser277$^{7.42}$, lo que induce un reordenamiento conformacional de las hélices transmembrana TM5, TM6 y TM7, que rotan hacia el interior, reduciendo el tamaño de la cavidad ortostérica. (Figura 1.13A; flechas azules). Por otro lado, en las estructuras con antagonistas, el sitio de unión ortostérico es mucho mayor, ya que estos no establecen las interacciones con los residuos His278$^{7.43}$ y Ser277$^{7.42}$, lo que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

evita el cambio conformacional y mantiene al receptor en su estado inactivo (Figura 1.13B,C; flechas azules).[105]

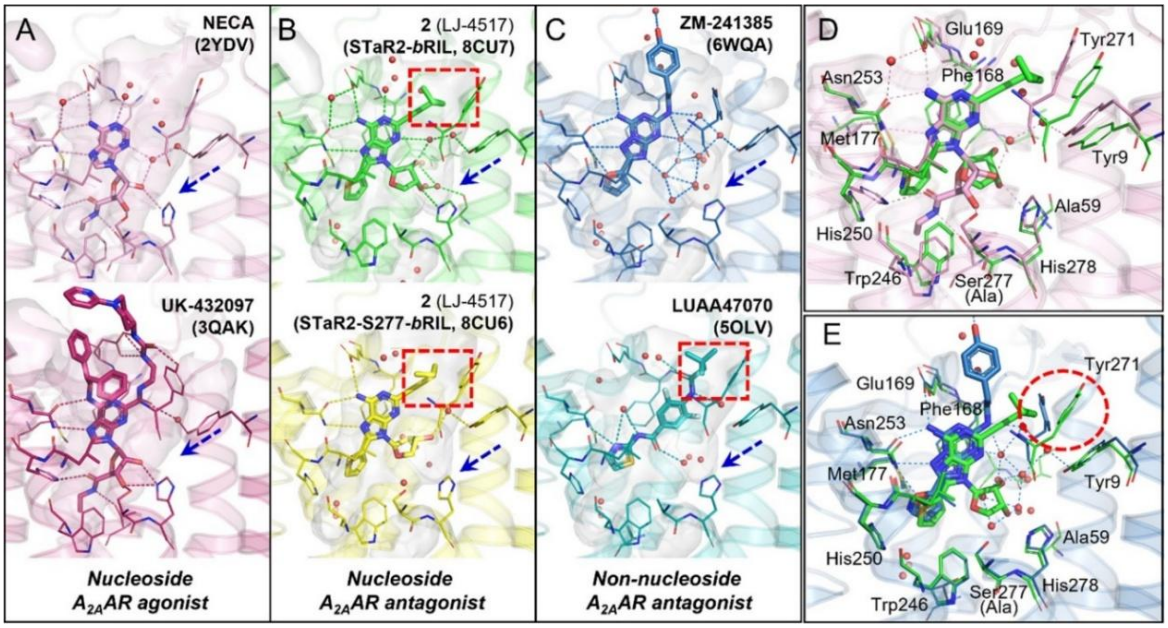


Figura 1.13. Comparación de los sitios de unión del $A_{2A}R$ formando complejos con agonistas nucleosídicos, antagonistas nucleosídicos y antagonistas no nucleosídicos. A) Representación de la superficie del sitio de unión del $A_{2A}R$ con los agonistas nucleosídicos NECA (rosa; PDB ID: 2YDV) y UK-432097 (granate; PDB ID: 3QAK). B) Representación de la superficie del sitio de unión del $A_{2A}R$ con el antagonista LJ-4517 unido a los constructos A_{2A}AR-STaR2-bRIL (verde; PDB ID: 8CU7) y A_{2A}AR-STaR2-S277-bRIL (amarillo; PDB ID: 8CU6). El grupo *N*-hexinilo del compuesto LJ-4517 se extiende hacia el exositio (cuadrado discontinuo rojo). C) Representación de la superficie del sitio de unión del $A_{2A}R$ con los antagonistas no nucleosídicos, ZM-241385 (azul cielo; PDB ID: 6WQA) y LUAA47070 (turquesa; PDB ID: 5OLV). En la estructura con el ZM-241385 unido, el exositio se encuentra cerrado debido al cambio en la conformación del residuo Tyr271$^{7.36}$. Las moléculas de agua presentes en el sitio de unión se muestran como esferas rojas. D) Superposición del compuesto LJ-4517 (verde; estructura A_{2A}AR-STaR2-bRIL; PDB ID: 8CU7) y el agonista NECA (rosa; PDB ID: 2YDV) en el sitio de unión del $A_{2A}R$. E) Superposición del compuesto LJ-4517 (verde; A_{2A}AR-STaR2-bRIL; PDB ID: 8CU7) y ZM-241385 (azul cielo; PDB ID: 6WQA) en el sitio de unión del $A_{2A}R$, ilustrando la diferencia en la conformación causada por el residuo Tyr271$^{7.36}$ (círculo discontinuo rojo).[105]

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3 ADENOSINA: IMPLICACIÓN EN EL SISTEMA INMUNE Y APLICACIONES EN EL CONTEXTO DEL CÁNCER

En los últimos años, el microambiente tumoral (MAT) ha generado un considerable interés en la investigación oncológica debido a su papel clave en la progresión, diseminación y resistencia a los tratamientos del cáncer. El MAT es un entorno heterogéneo, formado por una red compleja de componentes que interactúan dinámicamente favoreciendo la supervivencia, el crecimiento y la expansión del tumor. Además, el MAT tiene un papel vital en la evasión de la vigilancia inmunológica al crear condiciones que inhiben la respuesta inmune antitumoral, lo que permite que las células tumorales escapen de la eliminación por parte del sistema inmunológico. Estas interacciones entre el tumor y su entorno inmediato están mediadas por vías metabólicas, inflamatorias e inmunosupresoras, que promueven la formación de un nicho tumoral resistente y tolerante a las respuestas inmunitarias.

El conocimiento adquirido en este campo ha impulsado el desarrollo de terapias más selectivas, entre las cuales la inmunoterapia ha demostrado ser un campo de especial relevancia. Esta estrategia busca restaurar la actividad antitumoral del sistema inmunológico mediante el bloqueo de los puntos de control inmunitarios (PCI). Los PCI son proteínas de membrana que regulan la respuesta inmune, actuando como frenos naturales para evitar una activación excesiva por parte del sistema inmune. En el contexto del cáncer, las células tumorales utilizan estos mecanismos a su favor para evadir la respuesta inmunitaria. Las terapias basadas en los PCI buscan bloquear estas vías y reactivar la capacidad antitumoral del sistema inmune. La validez de estos tratamientos se ha demostrado en la clínica, donde el número de fármacos aprobados por las autoridades sanitarias ha ido en aumento. Existen anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAb) dirigidos a inhibir PCI clásicos, como el receptor de muerte programada (PD-1) (Nivolumab, Zimberelimab y Pembrolizumab) y sus ligandos PD-L1/2 (Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab) (Figura 1.14), así como contra el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) (Ipilimumab) (Figura 1.14).[108] Además, el número de PCI descubiertos y validados ha ido en aumento. Los últimos en unirse a este grupo han sido, por ejemplo, el gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3), *T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3* (TIM-3), *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors* (KIR), *T-cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domain* (TIGIT) o *Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptor 1* (LAIR-1).[109]

En este escenario, la ADO ha emergido como un mediador clave en la inmunosupresión, especialmente en el contexto del MAT. Desempeña un papel clave en la regulación de multitud

USC DE COMPOSTELA

de funciones inmunitarias, promoviendo la evasión inmunológica, la progresión, la migración y la supervivencia de las células tumorales. La ADO ejerce estos efectos a través de su unión a los receptores A_{2A} y A_{2B}, especialmente al $A_{2A}R$, el cual ha sido recientemente validado como un novedoso PCI.[110]

En los siguientes epígrafes, se explicarán los mecanismos que provocan el incremento en la concentración de ADO en el MAT, junto con los efectos derivados de su interacción con los receptores de ADO en las células del MAT.

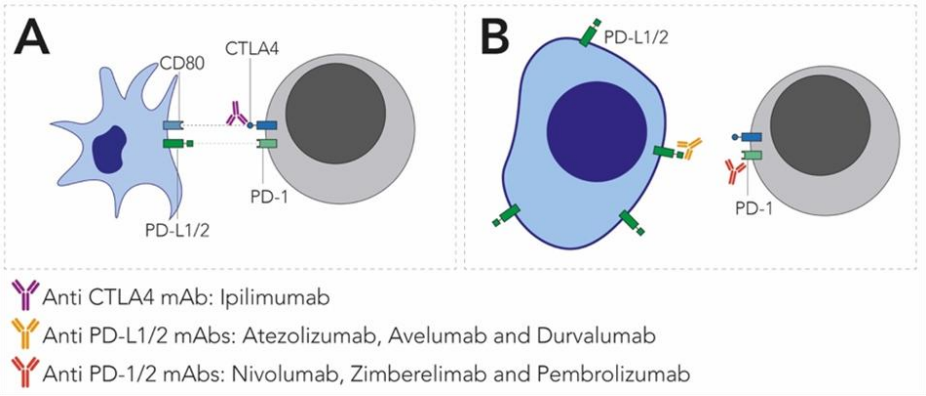


Figura 1.14. Puntos de control inmunitario. A) Regulación fisiológica de la activación del sistema inmunológico a través de las células dendríticas (azul) y los linfocitos T (gris). B) Efecto oncoprotector del sistema PD-1/PD-L1 en las células cancerosas (azul). Imagen reproducida de Prieto, R.; A_{2B} adenosine receptor as a novel target in cancer immunotherapy: validation and optimization of new ligands; Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 2022.

1.3.1 Producción de adenosina en el microambiente tumoral

Como se discutió en el apartado 1.2.1 (Síntesis, transporte y metabolismo de la adenosina), los niveles de ADO extracelular en condiciones fisiológicas están estrictamente regulados por la acción coordinada de varias enzimas, que mantienen su concentración en el rango subnanomolar.[111] Cabe destacar que el ATP y la ADO ejercen funciones antagónicas: mientras que el ATP ejerce un efecto proinflamatorio e inmunoprotector, la ADO presenta un efecto antiinflamatorio e inmunosupresor. En la matriz extracelular de los tumores sólidos, se puede encontrar ATP en concentraciones superiores a las fisiológicas.[112] El aumento en la concentración de ATP en el MAT es resultado tanto de la liberación pasiva (debido a la muerte celular) como de la secreción activa por parte de las células tumorales, provocada por

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

condiciones como la hipoxia, la inflamación, la deprivación de nutrientes o el tratamiento con fármacos citotóxicos.[113–115] El ATP desempeña funciones proinflamatorias que inducen una respuesta antitumoral por parte del sistema inmunológico. Sin embargo, la elevada expresión de las enzimas CD39 y CD73 en el MAT (en comparación con los tejidos sanos) contribuye a la rápida transformación del ATP en ADO, elevando su concentración por encima de los valores fisiológicos y predominando así un efecto inmunosupresor.[116,117] Cabe destacar también que las enzimas CD39 y CD73 se expresan no solo en las células tumorales, sino también en muchas células del sistema inmune, tales como linfocitos T reguladores (Treg), macrófagos, células dendríticas (DCs), células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) y linfocitos colaboradores (Th). Además, estas enzimas se encuentran presentes en células endoteliales y fibroblastos asociados al cáncer (CAFs).[116,118] Asimismo, los exosomas derivados de estas células también pueden contener CD39 y CD73 en sus vesículas.[119]

Diversos factores contribuyen al aumento en la expresión de las enzimas CD39 y CD73 en las células presentes en el MAT. Entre ellos se encuentran factores de transcripción, como el factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1); factores de crecimiento, como el TGF-β; y citocinas inflamatorias, entre las que destacan los interferones de tipo I, IL-2, IL-1β, IL-6, IL-27 y el TNF-α, además de agonistas del receptor de prostaglandina E_2.[117,118] HIF-1 y TGF-β son dos de los principales inductores de la expresión de CD39 y CD73 en el MAT. HIF-1 no solo regula de manera positiva la expresión de CD39[120] y CD73,[121] sino también la de los receptores de ADO A_{2A} y A_{2B}.[122–124] Además, HIF-1 inhibe la expresión de la AK y de los ENT, lo que genera una mayor acumulación de ADO en el ambiente extracelular, especialmente en condiciones de hipoxia. Por su parte, TGF-β también regula la expresión de CD39 y CD73, actuando en distintos tipos celulares del MAT, como los linfocitos T, las células NK, las células mieloides, las células tumorales, los CAFs y las células endoteliales.[125–127]

Además de la vía clásica, la formación de ADO dependiente de CD39 y CD73 también puede generarse a través de una ruta metabólica alternativa que involucra a CD38 y ENPP-1.[128] En el MAT se han observado altas concentraciones de NAD^+ debidas a las alteraciones metabólicas propias de las células tumorales, contribuyendo así a la disponibilidad de sustratos para la producción de ADO.[129] Finalmente, también se ha demostrado que determinadas modificaciones epigenéticas, la desregulación de microARN y la expresión de receptores de hormonas contribuyen de forma positiva tanto a la expresión de CD73 como a la de los AR en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

determinados tipos de tumores, como melanoma, cáncer de mama, ovario, pulmón y colorrectal.[130–135]

Todos los factores anteriormente descritos contribuyen de forma significativa a la desregulación del balance ATP-ADO en el MAT, incrementando la concentración de ADO a niveles micromolares. Esto causa un aumento en la activación de los receptores de ADO presentes en las células del MAT que, por diferentes mecanismos, favorecen el crecimiento y la progresión tumoral, así como su evasión del sistema inmune.

1.3.2 Efectos de la adenosina en el microambiente tumoral

La ADO ejerce sus efectos en el MAT principalmente a través de su interacción con los receptores A_{2A} y A_{2B}, que se encuentran en forma de monómeros o heterómeros, tanto en células tumorales y estromales como en diversas células del sistema inmunitario. La Figura 1.15 presenta una clasificación detallada de los distintos tipos celulares que conforman el MAT. En este apartado se describen las acciones derivadas de la activación de estos receptores, diferenciándose según el tipo celular involucrado.

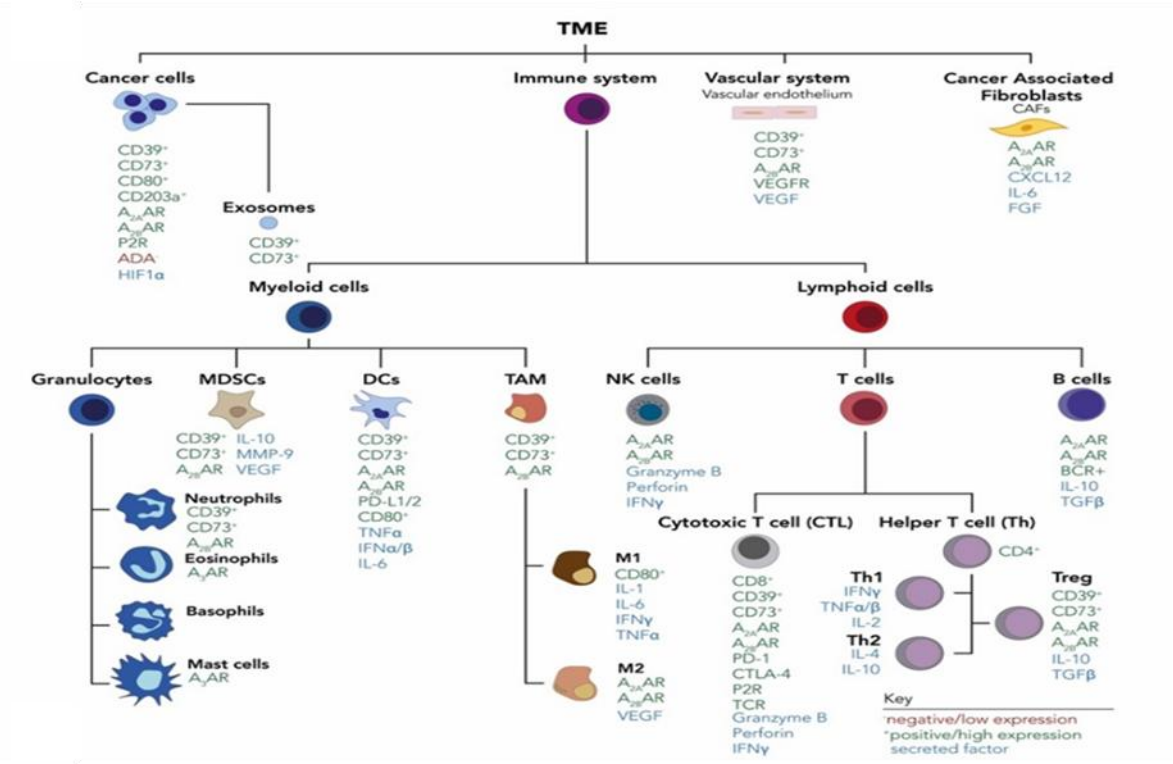


Figura 1.15. Composición celular del MAT. Imagen reproducida de Prieto, R.; A_{2B} adenosine receptor as a novel target in cancer immunotherapy: validation and optimization of new ligands; Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago, 2022.

1.3.2.1 Efectos de la adenosina en células tumorales y estromales

En las células tumorales se ha demostrado que la activación del $A_{2A}R$, mediada por la señalización dependiente de PI3K-AKT, y la activación del $A_{2B}R$, a través de la señalización dependiente de las MAPK (ERK, JNK y/o p38), propician su proliferación, supervivencia y capacidad invasiva en modelos preclínicos de cáncer de mama, hígado, gástrico y renal.[136–141] En el cáncer de mama triple negativo (TNBC), la activación del $A_{2B}R$ induce la activación del antígeno 1 relativo a FOS (FRA-1), una subunidad del factor de transcripción AP-1, y de RAP1B, una enzima con actividad GTPasa, las cuales promueven tanto la proliferación celular como la metástasis en modelos animales.[136,140] La deleción genética del $A_{2B}R$ o el bloqueo con antagonistas en este tipo de células tumorales reduce la metástasis pulmonar, además de obstaculizar la proliferación y supervivencia celular.[117] De manera similar, en modelos animales de hepatocarcinoma, se ha demostrado que el eje CD73-A_{2A} favorece el crecimiento tumoral y la metástasis a través de la activación de RAP1B.[142] Por otro lado, la activación del $A_{2B}R$ en células tumorales propicia la neovascularización mediante la secreción de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).[111] Finalmente, otros componentes del eje adenosinérgico, como CD73, también pueden favorecer el crecimiento de la masa tumoral independientemente de su actividad enzimática. CD73, mediante su unión a proteínas del espacio extracelular como la tenascina-C, aumenta el potencial metastásico de las células tumorales.[143] Asimismo, CD73 puede activar directamente la señalización mediada por el receptor EGFR e iniciar una cascada de señalización intracelular que provoca un aumento en la proliferación, supervivencia y capacidad invasiva de las células tumorales.[133,144]

En la Figura 1.16 se muestran los resultados de un estudio pangénico, a partir de la combinación de diferentes bases de datos, que analiza la expresión del $A_{2A}R$ en 18 tipos de tumores sólidos y en 3 tumores líquidos, comparándola con la expresión observada en tejidos sanos.[111]

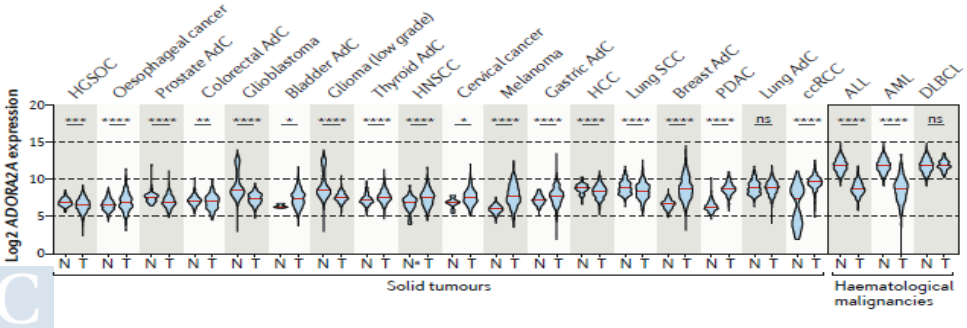


Figura 1.16. Comparación en la expresión media del $A_{2A}R$ entre el tejido sano y sus correspondientes tumores.[111]

Las células estromales son componentes sanos del organismo que desempeñan un papel crucial en el MAT, habiéndose demostrado su importancia en la progresión de la enfermedad. Entre las principales células estromales destacan las del endotelio vascular y los fibroblastos asociados al cáncer.[111]

En diversos tipos de tumores, como el cáncer de mama, ovario, colorrectal, pancreático y renal, se ha evidenciado la presencia de las enzimas CD39 y CD73 en CAFs, las cuales contribuyen de forma directa a la inmunosupresión mediada por la ADO.[145–147] En pacientes con cáncer de ovario, la alta expresión de CD73 en CAFs se ha relacionado con un peor pronóstico. Estudios en modelos animales han demostrado que la sobreexpresión de esta enzima compromete la respuesta antitumoral mediada por el sistema inmune,[148] lo que también se ha observado en pacientes con TNBC.[149] Además, la activación del $A_{2A}R$ aumenta la proliferación de CAFs en pacientes con cáncer de pulmón de células grandes.[111] De manera similar, la activación del $A_{2B}R$ en CAFs favorece la producción de factor 1 derivado de células estromales (SDF-1) y del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), aumentando el número de fibroblastos activados. Cuando la ADO se une al $A_{2B}R$ de estos fibroblastos activados, estos secretan, por un lado, CXCL12, lo que aumenta el reclutamiento de células endoteliales progenitoras (EPC) favoreciendo así la angiogénesis y, por otro lado, IL-6, una citocina que reduce la adhesión de las células tumorales, lo que facilita la metástasis.[150] La retroalimentación ejercida por la producción de ADO por parte de los CAFs y la señalización derivada de la activación del $A_{2B}R$ en estas células conduce también a un aumento en la expresión de la enzima CD73, lo que amplifica el efecto inmunosupresor en el MAT.[147]

Por otra parte, además de en los CAFs, la señalización adenosinérgica también afecta a la función de las células endoteliales. Los receptores de ADO están expresados en las células del endotelio vascular donde regulan funciones como la permeabilidad,[151] la angiogénesis[152,153] y el tráfico de linfocitos.[154,155] Estudios en modelos animales han demostrado que la producción de ADO mediada por CD73 en las células endoteliales puede inhibir la adhesión de los linfocitos T mediante una disminución de la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión-1.[145] Además, la señalización derivada de la activación del $A_{2B}R$ en las células endoteliales promueve la angiogénesis de la masa tumoral mediante la secreción de VEGF y otros factores angiogénicos, como el óxido nítrico.[156,157] Adicionalmente, estudios *in vivo* en ratones han demostrado que la activación del $A_{2A}R$ promueve la formación de nuevos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

vasos linfáticos en el tumor, así como la formación de nuevos ganglios linfáticos que permiten el anidamiento de núcleos metastásicos.[158]

En la Figura 1.17 se resumen las acciones derivadas de la ADO en las células tumorales y estromales.

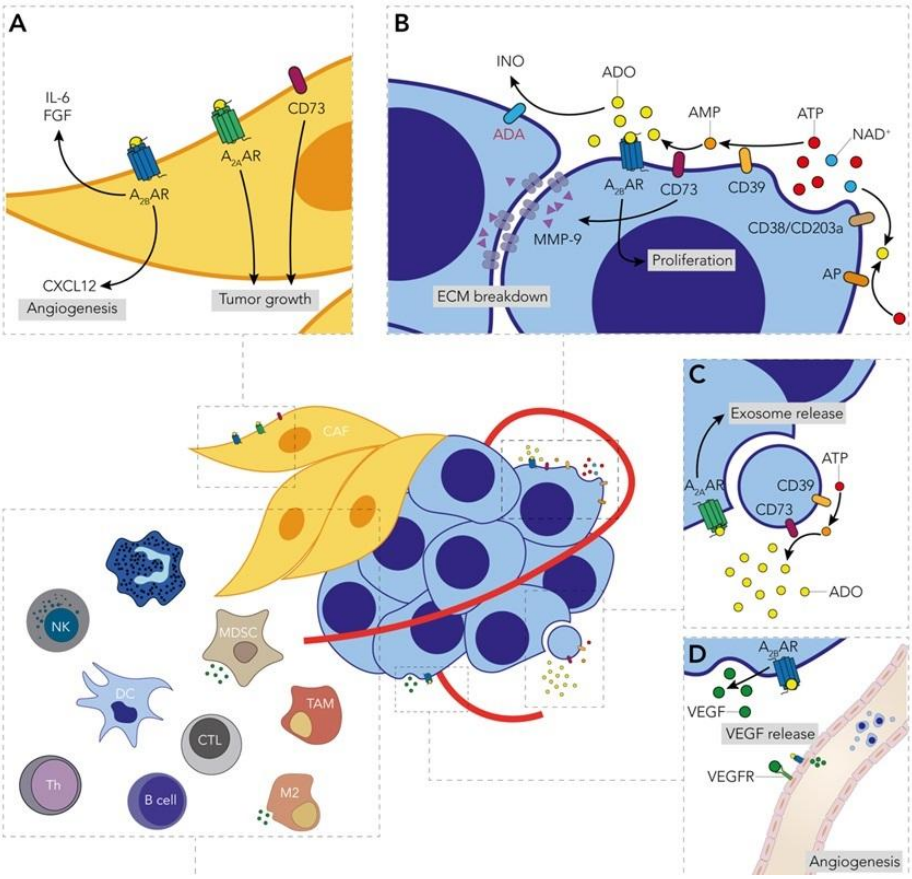


Figura 1.17. Resumen de las acciones derivadas de la ADO en las células tumorales y estromales. Imagen reproducida de Prieto, R.; A_{2B} adenosine receptor as a novel target in cancer immunotherapy: validation and optimization of new ligands; Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 2022.

1.3.2.2 Efectos derivados de la adenosina en las células del sistema inmune

A nivel del sistema inmune, la ADO es considerada un potente inmunosupresor. Suprime la inmunidad tumoral principalmente al restringir la infiltración y la citotoxicidad de las células inmunes, además de estimular la producción de citocinas antiinflamatorias y promover la proliferación e infiltración de células inmunosupresoras. Estos efectos están mediados, principalmente, por la señalización derivada de su unión a los receptores A_{2A} y A_{2B},

presentes tanto en las células linfoides como en las mieloides. A continuación, se describen los efectos derivados de la activación de dichos receptores en los distintos tipos de células.

Células mieloides

Los ***macrófagos*** son células esenciales que forman parte del sistema inmune innato y que poseen una gran capacidad de diferenciación. Estos pueden diferenciarse en los fenotipos M1 y M2, con actividad pro y antiinflamatoria, respectivamente. En los macrófagos, la señalización derivada del receptor tipo Toll (TLR) produce un aumento en la expresión de los receptores A_{2A} y A_{2B},[159,160] los cuales propician la diferenciación de estas células hacia el fenotipo M2. Este fenotipo está asociado con un incremento en la producción de citocinas inmunosupresoras, como IL-10 e IL-6, y con una inhibición en la secreción de citocinas proinflamatorias, como TNF-α e IL-12. Además, la activación del A_{2B}R estimula la secreción de VEGF, lo que facilita la neovascularización de la masa tumoral.[161,162]

Las ***células dendríticas*** son las principales células presentadoras de antígenos y desempeñan un papel crucial en la modulación de la función y diferenciación de los linfocitos T. Tras la exposición a los antígenos, estas células migran hacia los ganglios linfáticos, donde expresan el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC II) y secretan citocinas proinflamatorias, como el TNF-α y la IL-12. La señalización derivada de la unión de la ADO a sus receptores A_{2A} y A_{2B} induce un aumento en la expresión de citocinas inmunosupresoras como IL-6, IL-8 e IL-10, así como de factores prooncogénicos como el TGF-β y el VEGF.[163] Por otro lado, esta señalización también induce una disminución en la producción de citocinas proinflamatorias, como TNF-α e IL-12. La activación de los receptores A_{2A} y A_{2B} promueve la expresión de enzimas inmunomoduladoras, como la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), las cuales también inhiben la producción de citocinas proinflamatorias, como IL-12.[163] Estudios *in vitro* demostraron que la exposición de las DCs a ADO causa anergia en los linfocitos T citotóxicos.[164] Todos los factores detallados contribuyen a un cambio hacia un fenotipo tolerogénico de las DCs que favorece el ambiente inmunosupresor en el MAT.

Los ***granulocitos***, que incluyen neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos, también expresan receptores de ADO y están implicados en la patogénesis de diversas

enfermedades inflamatorias, como el cáncer.[165] Por ejemplo, en los neutrófilos, la señalización derivada de la activación de los receptores A_1 y A_3 estimula la quimiotaxis y la migración transendotelial ejerciendo un efecto proinflamatorio;[166] mientras que la activación del $A_{2A}R$ causa inmunosupresión, inhibiendo las funciones efectoras de estas células al reducir su migración, adherencia, fagocitosis y producción de ROS.[167,168] En los mastocitos, la activación de los receptores A_{2A} y A_{2B} inhibe tanto la quimiotaxis como la desgranulación, causando también inmunosupresión.[169]

Las ***células supresoras derivadas de mieloides*** son un grupo de células inmunitarias de linaje mieloide. En situaciones patológicas como el cáncer y la inflamación, la concentración de estas puede dispararse hasta 10 veces.[170] Estas células interactúan con linfocitos T, DCs, macrofágos y células NK en el MAT, regulando su función. Su capacidad inhibidora es tan relevante que el número de MDSCs se considera un parámetro importante para evaluar la progresión de la inmunoterapia del cáncer. La ADO desempeña un papel clave en la regulación de las MDSCs. Estudios *in vitro* demostraron que la estimulación del $A_{2B}R$ induce la diferenciación de progenitores hematopoyéticos hacia MDSCs y que, además, la activación de estos receptores en las propias células produce la liberación de IL-10 y metaloproteína-9 (MMP9), con efectos inmunosupresores y prometastásicos, respectivamente.[171]

Células linfoides

Las ***células NK*** son componentes clave del sistema inmune innato, con funciones citotóxicas esenciales. La activación del $A_{2A}R$ en estas células inhibe su maduración y bloquea la secreción de perforina e interferón gamma (IFN-γ), moléculas fundamentales para ejercer su actividad citolítica, lo que compromete su función en el MAT.[172,173] Además, la activación del $A_{2A}R$ promueve la liberación de citocinas inmunosupresoras, como IL-10, así como de factores prooncogénicos, como el TGF-β.[174] También se ha demostrado que la activación del $A_{2A}R$ en estas células inhibe la función efectora de los linfocitos T al regular la expresión de proteínas inhibitorias de membrana, como LAG-3, TIM-3 y PD-1, exacerbando el ambiente inmunosupresor y debilitando aún más la respuesta inmunitaria antitumoral.[175]

Los ***linfocitos B*** son un tipo de células adaptativas del sistema inmunitario con funciones humorales. Son producidos por la línea celular linfoide y maduran en la médula ósea,

presentando el receptor de linfocitos B (BCR) en su superficie celular. La función básica de las células B es unirse a un antígeno, estimular la quimiotaxis de linfocitos Th y diferenciarse en células plasmáticas que secretan grandes cantidades de anticuerpos contra este antígeno.[176] En los linfocitos B, la activación del $A_{2A}R$ disminuye la señalización mediada por BCR, causa la supresión en la síntesis del factor de transcripción nuclear-κB, lo que perjudica la activación, la maduración a células plasmáticas y la supervivencia celular.[176]

Los ***linfocitos T*** son células fundamentales del sistema inmune adaptativo, con diversas funciones. Se originan a partir del linaje linfoide y maduran en el timo, donde adquieren el receptor de células T (TCR) en su membrana. Según su función, los linfocitos T se clasifican en dos principales subtipos: los ***linfocitos T citotóxicos*** (CTL), que expresan la proteína CD8 en su superficie, y los ***linfocitos T colaboradores***, que expresan la proteína CD4. Ambos subtipos desempeñan roles clave en la defensa inmunitaria. Los CTL comparten funciones similares con las células NK. Una vez en el MAT, los CTL secretan perforinas, las cuales debilitan la membrana celular de las células tumorales y permiten la entrada de granzimas, que inducen apoptosis al fragmentar el ADN. Sin embargo, la activación del $A_{2A}R$ en los CTL inhibe la señalización mediada por el TCR y el receptor de IL-2, lo que induce un estado de anergia al bloquear su activación, proliferación y maduración. Este estado de anergia impide la liberación de las granzimas, perforinas y citocinas proinflamatorias, como TNF-α e IFN-γ, perdiendo así su capacidad citolítica.[177–179] Asimismo, la activación del $A_{2A}R$ en los linfocitos T se asocia con un aumento en la expresión de proteínas inhibidoras en la superficie celular, tales como TIM-3, LAG-3, CTLA-4 y PD-1.[175,180] Por otra parte, los linfocitos Th desempeñan un papel asistencial clave, encargándose de la secreción de citocinas y otras proteínas de bajo peso molecular (TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-10), que actúan como mediadores en la actividad de los CTL, las células NK y los linfocitos B. La activación del $A_{2A}R$ en linfocitos T $CD4^+$ reduce la secreción de estos mediadores, lo que disminuye la capacidad citotóxica de las células reguladas. A su vez, la señalización mediada por los receptores A_{2A} y A_{2B} promueve la diferenciación de los Th en linfocitos Treg. Estos linfocitos Treg contribuyen a un entorno inmunosupresor mediante la liberación de citocinas, como la IL-10, y la expresión en la membrana de proteínas inhibitorias, tales como LAG-3, CTLA-4 y PD-1.[175,180]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la Figura 1.18 se resumen las acciones derivadas de la ADO en las diferentes células del sistema inmune.

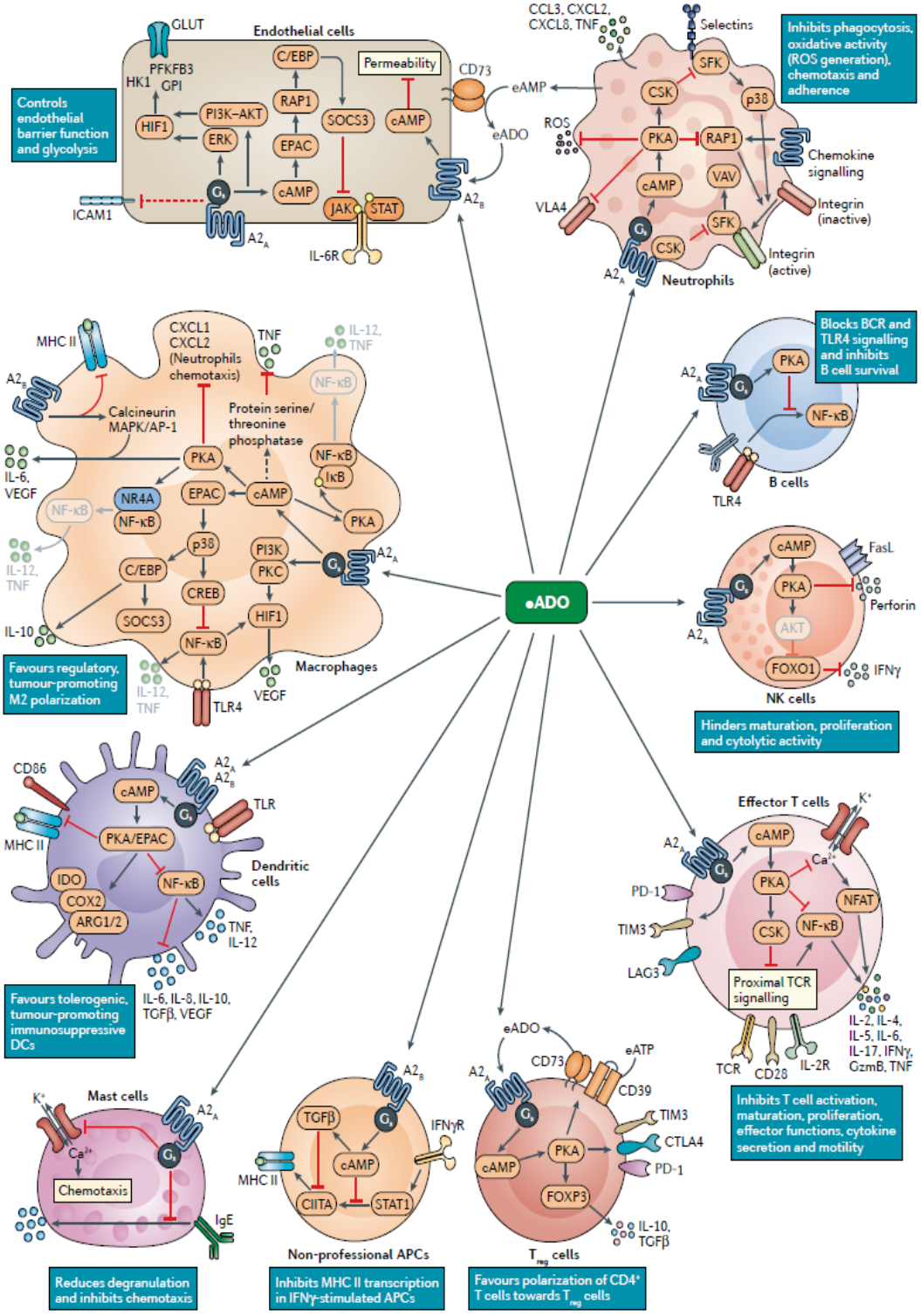


Figura 1.18. Resumen de las acciones derivadas de la ADO en las diferentes células del sistema inmune.[111]

1.4 MODULADORES DEL RECEPTOR A_{2A}

Desde la identificación del papel fundamental de los cuatro subtipos de receptores de ADO en la regulación de funciones fisiológicas, numerosos grupos de investigación y compañías farmacéuticas han centrado sus programas de investigación en el desarrollo de fármacos dirigidos a modular estos receptores. En este apartado, se hará un análisis de los moduladores del $A_{2A}R$, incluyendo fármacos agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos, así como un resumen de la investigación actual enfocada en la inmunoterapia del cáncer.

1.4.1 Agonistas del receptor A_{2A}

El potencial terapéutico de la modulación de las funciones de la ADO fue descubierto en la década de 1980.[181] Desde entonces, el desarrollo de agonistas con alta afinidad y selectividad por el $A_{2A}R$ ha ido en aumento. Existen numerosas revisiones que abordan la relación estructura-actividad (REA) de estos ligandos en los que se acepta mayoritariamente que la conservación del *scaffold* de la ADO es esencial para obtener agonistas potentes y selectivos.[182,183] Sin embargo, este enfoque presenta tres importantes inconvenientes derivados de las características estructurales de la propia ADO: 1) la escasa biodisponibilidad oral y pobre perfil farmacocinético (debido a su baja solubilidad). 2) el corto tiempo de vida media en circulación (<1s), la ADO es rápidamente captada al interior celular por los transportadores de membrana (ENT y CNT), convertida en AMP por la acción de la AK, o degradada a INO por la ADA (Figura 1.19), y 3) la escasa selectividad de los agonistas sintetizados, lo que limita su eficacia terapéutica.[184]

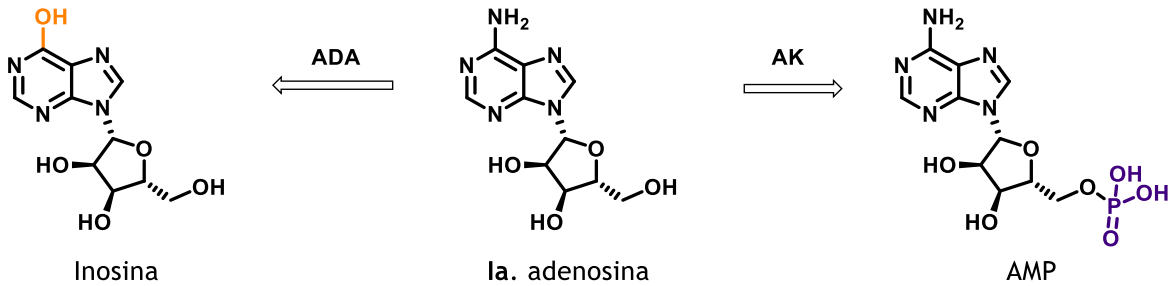


Figura 1.19. ADO y sus principales rutas de metabolización.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Con el fin de solventar estos inconvenientes y dotar a los compuestos de un mejor perfil farmacodinámico y farmacocinético, se han realizado diversas modificaciones sobre la estructura de la ADO, las cuales pueden agruparse en tres grandes categorías: 1) modificaciones sobre la ribosa, 2) modificaciones en la posición C-2, y 3) sustituciones sobre el grupo amino de la posición 6 (Figura 1.20).

Las modificaciones estructurales en el anillo de ribosa han sido ampliamente estudiadas. Con la farmacomodulación en esta parte de la molécula, además de mejorar la potencia, se busca reducir el metabolismo, impidiendo la conversión en AMP por la AK. La mayoría de las variaciones exploradas, incluyendo cambios en la estereoquímica de los sustituyentes, generan compuestos con actividad moderada o con pérdida completa de afinidad.[185] Como se ha descrito en el apartado 1.2.5 (Estructura del receptor A_{2A}), los grupos hidroxilo en las posiciones 2' y 3' son esenciales para la activación del receptor; cualquier modificación en estas posiciones conduce a compuestos inactivos.[185] Por otra parte, la sustitución del oxígeno heterocíclico del anillo de ribosa por un grupo metileno o azufre produce compuestos con menor selectividad hacia el $A_{2A}R$.[182] La posición 5' es la que mejor tolera los cambios estructurales, la sustitución del grupo hidroximetilo de dicha posición por un grupo etilcarboxamido condujo a la obtención de **NECA** (**Ib**), primer agonista no selectivo de los receptores de ADO (Figura 1.20).

En cuanto a las modificaciones en el C-2 (Figura 1.20), existen numerosos estudios de REA de derivados de ADO sustituidos en C-2. El principal objetivo de las modificaciones en este punto de la ADO es obtener fármacos con mayor estabilidad metabólica, evitando ser atacados por la ADA. El primer cambio estructural realizado en dicho punto fue la introducción de un átomo de cloro (Figura 1.20). La **2-cloroadenosina** (**Ic**) demostró ser un agonista no selectivo de los receptores de ADO más estable frente a la acción de la ADA.[186] La sustitución del hidrógeno en C-2 por ciclohexilamina condujo a la obtención del primer agonista selectivo **CV-1808** (**Ig**) (Figura 1.20), el cual posee una selectividad 4 veces mayor por el $A_{2A}R$ que por el A_1R (Tabla 1.3). Desde entonces se han realizado una gran variedad de sustituciones en este punto de la molécula, que han conducido a la obtención de agonistas potentes y selectivos por el $A_{2A}R$ (Tabla 1.3). Los compuestos con mejor afinidad y selectividad por el $A_{2A}R$ surgieron con la introducción de grupos voluminosos con función amina como **Binodesonon** (**Id**) y **Regadenoson** (**Ie**) o función éter como **Sonedenoson** (**If**) (Figura 1.20).[184]

Las sustituciones del grupo amino de la posición 6 son las peor toleradas por el $A_{2A}R$, conduciendo en la mayoría de los casos, a una pérdida de actividad. Sustituciones en este punto

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

con grupos voluminosos (alquilo, cicloalquilo y arilalquilo) derivan generalmente en compuestos potentes y selectivos del A_1R.[185]

En la búsqueda del candidato idóneo, se han realizado modificaciones combinadas en los dos anillos presentes en la ADO, con el fin de evitar la inactivación por las dos posibles rutas metabólicas. Entre los compuestos más representativos se encuentran análogos de **NECA** (**Ib**), en los que se han realizado modificaciones en la posición C-2. Se han introducido grupos voluminosos con función amina como **CGS-21680** (**Ih**) o grupos que contienen un grupo alquino como **HENECA** (**Ii**) y **Apadenoson** (**Ij**) (Figura 1.20). A pesar de la evidente mejora en el perfil farmacocinético, los compuestos generalmente poseen una pobre selectividad y afinidad por el $A_{2A}R$ a excepción del **Apadenoson** (**Ij**) (Tabla 1.3).[184]

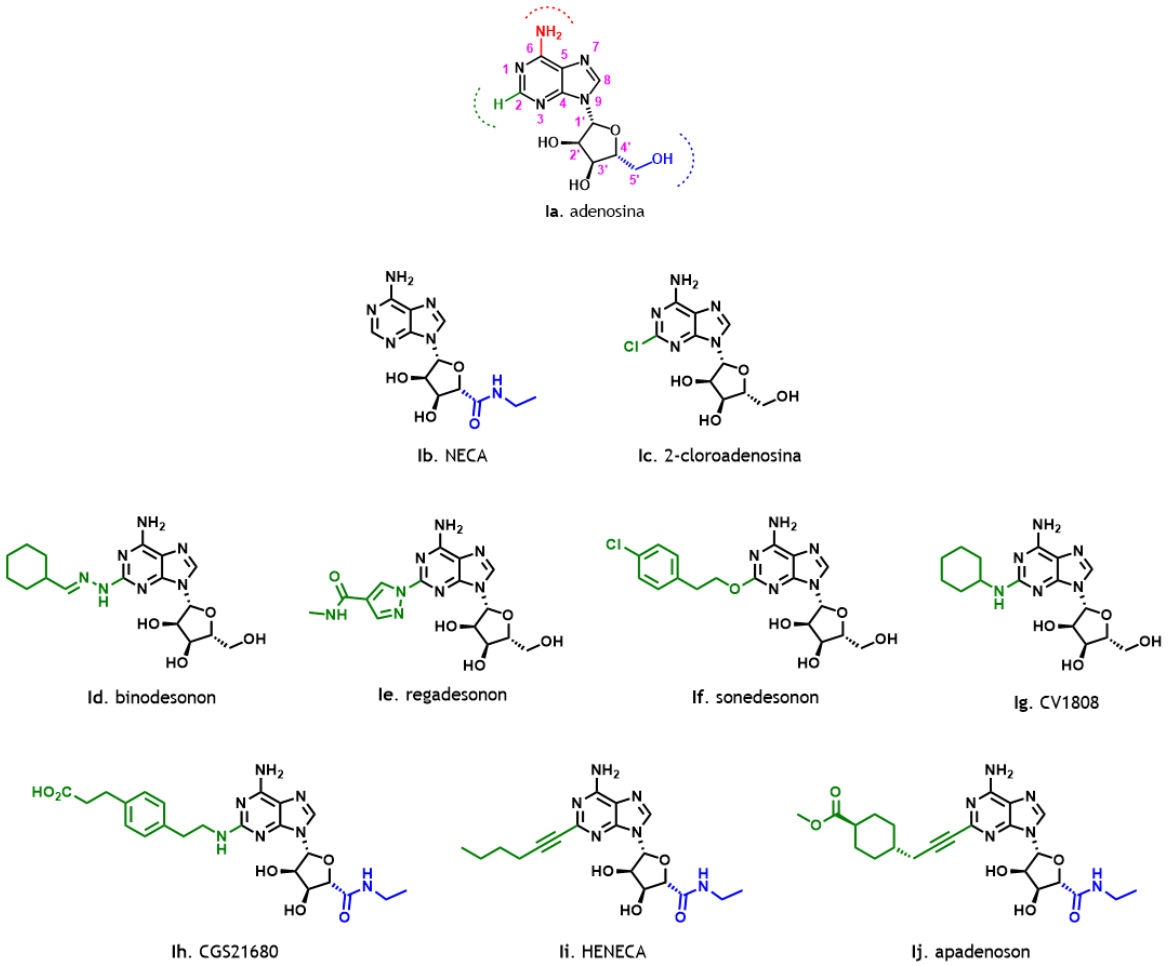


Figura 1.20. Estructura de la ADO con los puntos de modificación resaltados (primera línea). Estructura de los primeros agonistas no selectivos del $A_{2A}R$ (segunda línea), agonistas selectivos obtenidos por modificación en el C-2 (tercera línea) y agonistas derivados de NECA obtenidos por modificación en la posición C-2 (cuarta línea). La afinidad por el $A_{2A}R$ de los compuestos se muestra en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Datos de afinidad de los agonistas del $A_{2A}R$.

		K_i			
		***h*A$_1$AR**	***h*A$_{2A}$AR**	***h*A$_{2B}$AR**	***h*A$_3$AR**
		Agonistas no selectivos			
Ia[184]	ADO	10.0 nM	30.0 nM	1,000 nM	100 nM
Ib[184]	NECA	14.0 nM	20.0 nM	2,400 nM	6.20 nM
Ic[184]	2-Cloroadenosina	300 nM	80.0 nM	24,000 nM	1,900 nM
		Agonistas selectivos del $A_{2A}R$			
Id[184]	Binodenoson	>48,000 nM	270 nM	>10,000 nM	903 nM
Ie[184]	Regadenoson	>10,000 nM	290 nM	>10,000 nM	>10,000 nM
If[184]	Sonedenoson	>10,000 nM	490 nM	>10,000 nM	>10,000 nM
Ig[184]	CV180	400 nM	100 nM	N.D.	N.D.
Ih[184]	CGS21680	290 nM	27 nM	>10,000 nM	67 nM
Ii[184]	HENECA	60 nM	6.4 nM	6,100 nM	2.4 nM
Ii[184]	Apadenoson	77.0 nM	0.50 nM	N.D.	45.0 nM

N.D.: no determinada

1.4.1.1 Aplicaciones terapéuticas y ensayos clínicos de los agonistas del receptor A_{2A}

Varios agonistas selectivos del $A_{2A}R$ han alcanzado la fase de ensayos clínicos, impulsados por su potencial terapéutico y su eficacia en el diagnóstico de diversas patologías. Entre las aplicaciones clínicas evaluadas se incluyen enfermedades inflamatorias, hipertensión (cardíaca y pulmonar), fibrilación auricular, EPOC, anemia drepanocítica y el diagnóstico mediante imagen de la perfusión miocárdica en pacientes con antecedentes de isquemia.[187] A pesar de los múltiples intentos, la mayoría no ha logrado superar los ensayos clínicos de forma satisfactoria (Tabla 1.4). Entre las principales razones de estos resultados se encuentran la aparición de efectos adversos no deseados, una eficacia limitada en algunas patologías y el bajo perfil de seguridad. Estas limitaciones han restringido su uso clínico a la obtención de imágenes diagnósticas, sin lograr un impacto más amplio en el tratamiento de enfermedades.[188] Los únicos agonistas del $A_{2A}R$ aprobados por las autoridades sanitarias para uso clínico son la propia **ADO** (**Ia**) (**Adenocard**® y **Adenoscan**®) y el **Regadenoson** (**Ie**) (**Lexiscan**®).

Adenocard® se utiliza para revertir la taquicardia paroxística supraventricular en pacientes sin compromiso hemodinámico. Por su parte, **Adenoscan**® y **Lexiscan**® se utilizan como vasodilatadores para obtener imágenes de la perfusión miocárdica en pacientes que no pueden realizar ejercicio físico.[188,189]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1.4. Ejemplos del desempeño en ensayos clínicos de los agonistas del $A_{2A}R$.

Ligando	Indicación	Fase	Identificador
ADO (**Ia**)	Taquicardia paroxística supraventricular (Adenocard®)	Aprobado	
	Diagnóstico de imagen en perfusión miocárdica mediante resonancia magnética. (Adenoscan®)	Aprobado	
Regadenoson (**Ie**)	Diagnóstico de imagen en perfusión miocárdica mediante resonancia magnética. (Lexiscan®)	Aprobado	
	Anemia drepanocítica.[187]	II	NCT01788631
	Hipertensión pulmonar.[187]	-	NCT02220634
	Trasplante de pulmón.[187]	I	NCT03072589
Sonedenoson (**If**)	Tratamiento crónico de las ulceras de pie diabético.[187]	II	NCT00312364
	Enfermedad obstructiva crónica.[187]	II	NCT00430300
	Dolor neuropático diabético.[187]	II	NCT00452777
Binodenoson (**Id**)	Enfermedades de las arterias coronarias.[187]	III	NCT00944970

1.4.2 Moduladores alostéricos del receptor A_{2A}

La búsqueda de moduladores alostéricos para los receptores de ADO es un campo mucho menos desarrollado que el de los agonistas y antagonistas. Los moduladores alostéricos se unen a un sitio distinto del sitio de unión del ligando, denominado sitio ortoestérico, y su efecto solo se manifiesta en presencia del ligando ortoestérico. Un *modulador alostérico positivo* (PAM), potencia los efectos del ligando ortoestérico (agonista), mientras que un *modulador alostérico negativo* (NAM) atenúa dichos efectos.

Los fármacos PAMs del $A_{2A}R$ más conocidos y estudiados son: la **Amilorida** (**IIa**) y su derivado **5-(*N*,*N*-hexametilen)-amilorida** (**HMA, IIb**). Ambas estructuras presentan un núcleo central de pirazina, con un sustituyente guanidina en posición 2, un grupo amino en posición 3, y un átomo de cloro en posición 6 (Figura 1.21). Sin embargo, ambos compuestos presentan una limitación importante ya que son capaces de unirse al sitio de unión del ion Na^+, una región bien conservada en distintas familias de GPCR de la clase A como los receptores α_2-adrenérgicos, el receptor D_2 de dopamina, y los receptores A_1 y A_3, lo que hace que tengan poca selectividad por el $A_{2A}R$.[190,191]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Dado que el **HMA** (**IIb**) exhibe una mayor afinidad por el $A_{2A}R$ que la **Amilorida** (**IIa**), IJzerman y colaboradores llevaron a cabo un estudio en 2019 en el que desarrollaron derivados

del **HMA**. En este trabajo, se diseñaron análogos con modificaciones en la posición 5', y se evaluó la capacidad para desplazar al ligando ortoestérico **[H^3]ZM241385** (antagonista). La sustitución del anillo de azepano en el compuesto **IIb** por grupos fenetilo sustituidos resultó en la obtención de compuestos como **IIc**, **IId y IIe** (Figura 1.21), los cuales mostraron una actividad similar o superior a la del compuesto de referencia.[192]

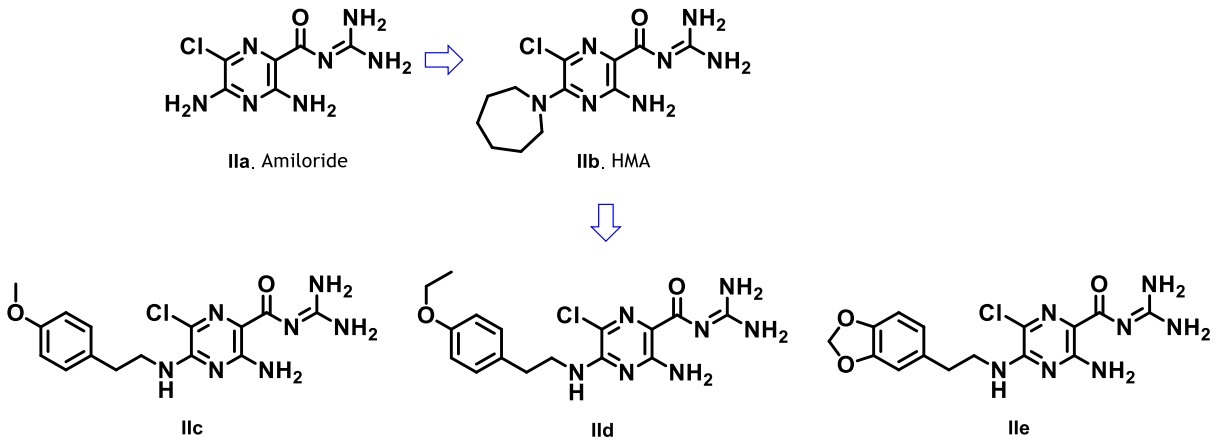


Figura 1.21. Moduladores alostéricos del $A_{2A}R$. Los datos de afinidad pueden verse en la referencia 193.

1.4.3 Antagonistas del receptor A_{2A}

Existen numerosas revisiones sobre el desarrollo y la REA de los antagonistas de los receptores de ADO. En este apartado, para facilitar el análisis, clasificaremos los antagonistas del $A_{2A}R$ de ADO en función de su estructura química en dos grandes familias: los derivados xantínicos (**III**) y los no xantínicos; a su vez, los no xantínicos los clasificaremos en triciclos (**IV**), biciclos (**V**) y monociclos (**VI**).

Derivados xantínicos

Todos estos compuestos provienen de la farmacomodulación de los alcaloides naturales **cafeína** (**IIIa**) y **teofilina** (**IIIb**), los cuales actúan como antagonistas débiles (μM) y no selectivos de los receptores de ADO (Tabla 1.5). La REA de los derivados xantínicos como antagonistas de los receptores de ADO ha sido extensamente investigada. Como resultado de este esfuerzo, estos constituyen en la actualidad una de las mayores colecciones de antagonistas disponibles. Esta exploración exhaustiva se ha centrado en las posiciones 1, 3 y 8, y ha permitido la obtención de ligandos potentes y selectivos para cada subtipo de receptor de ADO.[193]

El primer antagonista potente del $A_{2A}R$, derivado de estas estructuras, fue **DMPX** (**IIIc**) (Tabla 1.5), y se obtuvo sustituyendo el metilo en la posición 1 de la cafeína por un grupo propargilo (Figura 1.22).[194] Años más tarde, Daly y colaboradores demostraron que la sustitución en posición 8 con grupos insaturados, concretamente estirilos, de los derivados propargilados en N-1, mejoraba tanto la afinidad como la selectividad por el $A_{2A}R$ (Tabla 1.5).[195] De este trabajo surgieron compuestos como **IIId** y **IIIe** (Figura 1.22). Sin embargo, a pesar de la mejora sustancial en cuanto a la afinidad y selectividad, estos compuestos eran altamente inestables en fase acuosa.[194]

Una vez mejoradas la potencia y selectividad, los esfuerzos se centraron en conseguir compuestos más hidrosolubles. Bajo esta premisa, Müller y colaboradores, presentaron la serie de los compuestos **MSX**, derivados xantínicos con sustituyentes propargilo en posición 1 y estirilo en posición 8, donde la novedad estructural se encuentra en la posición 3. La introducción de un grupo 3-hidroxipropilo genera en la molécula un punto viable para la síntesis de profármacos (Figura 1.22).[196–198] De esta serie de compuestos, surge **MSX-2** (**IIIf**), un derivado potente y selectivo por el $A_{2A}R$ (Tabla 1.5), que sirvió como modelo para el desarrollo de profármacos. La sal disódica del fosfato de **IIIf** (**MSX-3**, **IIIg**) y L-valina (**MSX-4**, **IIIh**) son estables en disolución y, además, sufren una escisión enzimática in vivo, lo que permite la liberación del compuesto activo **MSX-2**.[199]

Durante sus estudios sobre la farmacomodulación de estos compuestos, Suzuki y colaboradores desarrollaron el compuesto **KF-17837** (**IIIi**) (Figura 1.22) mediante la modificación de derivados que contienen un grupo estirilo en la posición 8. Este compuesto se obtuvo reemplazando los grupos metilo en las posiciones 1 y 3 por grupos propilo, lo cual resultó en una excelente afinidad y selectividad hacia el $A_{2A}R$ (Tabla 1.5). Posteriormente, la sustitución de los grupos propilo por diferentes grupos etilo dio lugar a la obtención de la **Istradefilina** (**IIIj**) (Figura 1.22), hasta la fecha el único antagonista del $A_{2A}R$ aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

A pesar de que se han desarrollado antagonistas xantínicos potentes y selectivos, y estos han sido objeto de intensos estudios, aún persisten desafíos significativos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

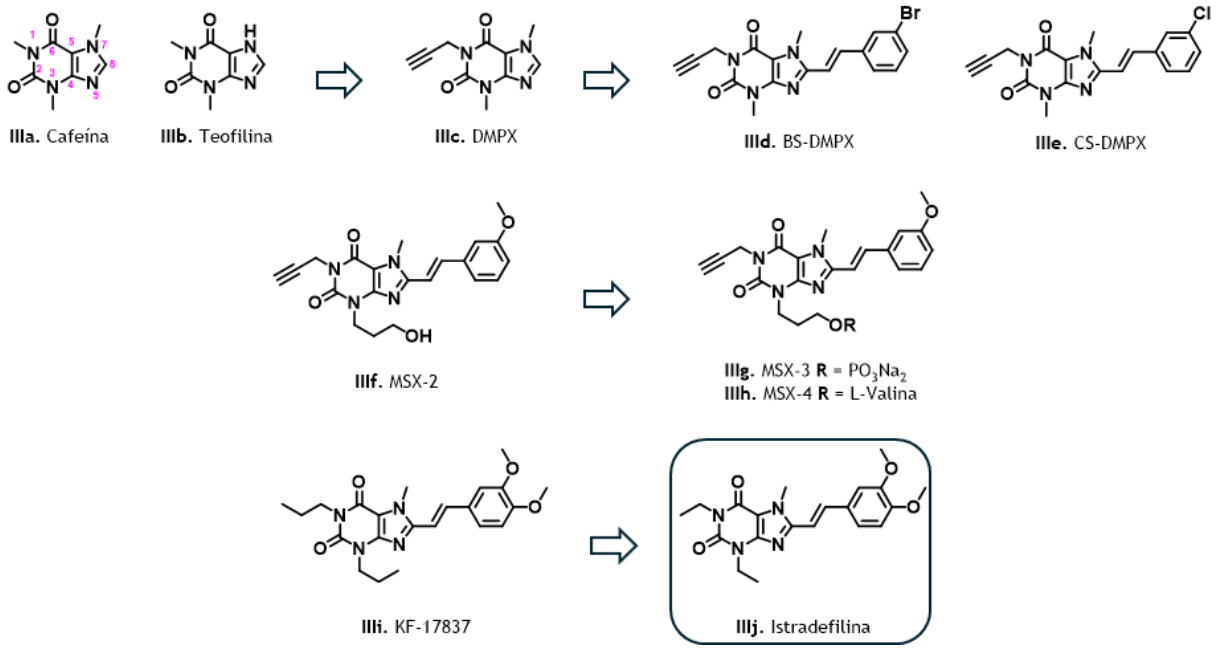


Figura 1.22. Antagonistas del $A_{2A}R$ xantínicos. Los datos de afinidad se pueden ver en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Datos de afinidad de los antagonistas xantínicos.

Fármaco		K_i (nM)			
		***h*A$_1$AR**	***h*A$_{2A}$AR**	***h*A$_{2B}$AR**	***h*A$_3$AR**
		Antagonistas xantínicos			
IIIa[194]	Cafeína	10700 nM	23400 nM	33800 nM	13300 nM
IIIb[194]	Teofilina	6700 nM	1.71 nM	9.07 nM	22300 nM
IIIc[194]	DMPX	45,000 nM	16,000 nM	N.D.	N.D.
IIId[194]	BS-DMPX	1200 nM	8.20 nM	10000 nM	10000 nM
IIIe[194]	CS-DPMX	1300 nM	13.00 nM	N.D.	N.D.
IIIf[194]	MSX-2	2500 nM	5.00 nM	2900 nM	>10000 nM
IIIi[194]	KF-17837	390 nM	7.90 nM	1500 nM	300 nM
IIIi[194]	Istradefilina	841 nM	12.00 nM	>10000 nM	4470 nM

N.D.: no determinada

Derivados no xantínicos

Los antagonistas A_{2A} no xantínicos pueden clasificarse, según su estructura, en monociclos, biciclos y triciclos. Estos compuestos surgen para superar las limitaciones de los derivados xantínicos. En el apartado 1.2.5(Estructura del receptor A_{2A}) se ha descrito cómo el núcleo de adenina actúa como punto de anclaje al receptor, mientras que el residuo de ribosa es

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

responsable de su activación. De este modo, la mayoría de los antagonistas poseen el núcleo heterocíclico (adenina o análogos), pero se ha eliminado el residuo de ribosa.

El primer componente tricíclico (**IV**), descrito en 1987 por Williams y colaboradores, fue el compuesto **CGS-15943** (**IVa**), el cual posee estructura de triazoloquinazolina (Figura 1.23).[200] Utilizando el compuesto **IVa** como modelo, Baraldi y colaboradores diseñaron una serie de derivados reemplazando el anillo fenilo por derivados de pirazol N^1-sustituidos. El compuesto más prometedor de esta serie fue **SCH-58261** (**IVb**), que contiene un sustituyente fenetilo en posición N^1 (Figura 1.23), lo cual mejoró tanto la potencia como la selectividad en comparación con **IVa** (Tabla 1.6). Sin embargo, estos compuestos presentaban un perfil farmacocinético limitado debido a su baja solubilidad y su escasa biodisponibilidad oral.[201] Para abordar estas limitaciones, sustituyeron el fenilo de **IVb** por grupos arilpiperazina, obteniendo el compuesto **SCH-412348** (**IVc**) (Figura 1.23), el cual además de mejorar la potencia y la selectividad (Tabla 1.6), incrementó la solubilidad.[202] Una importante mejora surgió cuando se eliminaron los átomos de flúor del anillo de fenilo de **IVc** y se introdujo un grupo 2-metoxi-etoxilo en posición *para*, obteniendo el fármaco **Predalenant** (**IVd**) (Figura 1.23). Este compuesto, como se detallará en el siguiente apartado, ha logrado avanzar hacia ensayos clínicos para el tratamiento del párkinson.

Debido al prometedor perfil del **Predalenant**, se han realizado diversas modificaciones estructurales del mismo con el objetivo mejorar aún más su perfil farmacocinético y farmacodinámico. Entre esas modificaciones (Figura 1.23) destacan la sustitución del anillo de pirazol por un anillo de imidazol (**IVe**), la sustitución del anillo de furano en la posición 2 por un anillo de piridina (**IVf**), y la sustitución del grupo arilpiperazina por dimetilamina (**IVg**) o morfolina (**IVh**). En los compuestos **IVg** y **IVh**, además, el anillo de furano en la posición 2 fue reemplazado por un grupo 3-clorobencilo (Figura 1.23). Sin embargo, ninguna de estas modificaciones logró mejorar el perfil farmacológico del **Predalenant** (Tabla 1.6).[194]

Posteriormente, Luthra y colaboradores basándose en el compuesto **IVb**, sintetizaron derivados de la tiazolotriazopirimidina, destacando el compuesto **IVi** (Figura 1.23) como el más potente y selectivo de esta serie (Tabla 1.6).[203] La sustitución del bencilo del compuesto **IVi** por un grupo arilpiperazina condujo a la obtención del **Inupadenant** (**IVj**) un antagonista potente y selectivo del $A_{2A}R$ (Tabla 1.6) que, como se comentará en el siguiente apartado ha entrado en ensayos clínicos para su empleo en la inmunoterapia contra el cáncer.[194]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

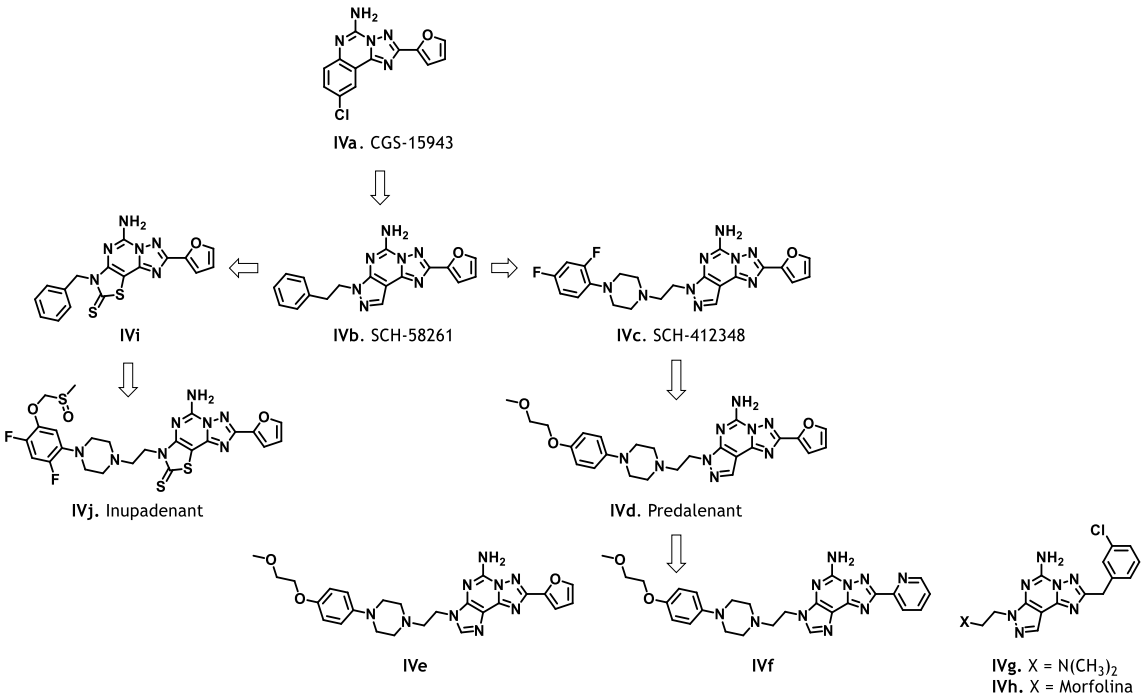


Figura 1.23. Principales derivados no xantínicos con estructura tricíclica. Los datos de afinidad se pueden ver en la Tabla 1.6.

El primer candidato identificado en la familia de los compuestos bicíclicos (**V**) fue el **ZM241385** (**Va**) (Figura 1.24), desarrollado por AstraZeneca®. Este compuesto mostró buenos resultados en términos de solubilidad y potencia (Tabla 1.6); sin embargo, presentaba limitaciones significativas, como baja selectividad, limitada biodisponibilidad oral e incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica.[204] La optimización de esta estructura condujo a la síntesis de nuevos derivados bicíclicos.

Investigadores de Roche emplearon núcleos de benzoxazol y tiazolopirimidina, generando los compuestos **Vb**, **Vc** y **Vd** (**Tozadenant**) (Figura *1.24*), los cuales demostraron una buena potencia y selectividad por el $A_{2A}R$ (Tabla 1.6).[205] En particular, el fármaco **Tozadenant** (**Vd**), como se discutirá en el próximo apartado, ha avanzado hacia ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

El *screening* de más de 2000 compuestos permitió la identificación de un nuevo núcleo bicíclico con actividad antagonista del $A_{2A}R$. Las estructuras basadas en el sistema tieno[3,2-*d*]pirimidina (**Ve**) (Figura 1.24) mostraron alta potencia y selectividad, además de una buena biodisponibilidad oral.[206] Estudios posteriores de optimización en esta clase de compuestos llevaron a la síntesis de derivados con estructuras de imidazo[4,5-*d*]pirimidina y triazolo[4,5-

d]pirimidina. En particular, los compuestos **Vf** y **Vg** (Figura 1.24) mostraron una afinidad extremadamente alta y buena selectividad hacia el $A_{2A}R$ (Tabla 1.6). Sin embargo, la incorporación de un residuo de urea en su estructura dio como resultado una baja solubilidad y un perfil subóptimo durante estudios *in vivo*.[207] Para solventar los problemas de solubilidad, se realizaron diversas modificaciones estructurales, las cuales permitieron la obtención de dos compuestos con un perfil farmacológico prometedor. En el primero de estos compuestos, la sustitución del residuo de urea por un grupo bencilo dio lugar al desarrollo de **Vipadenant** (**Vh**). En el segundo, la sustitución por un grupo azabencilo condujo a la síntesis de **Ciforadenant** (**Vi**) (Figura *1.24*). Ambos compuestos mantuvieron la alta afinidad y selectividad de sus análogos, además de mejorar significativamente los problemas de solubilidad (Tabla 1.6). Como se abordará en el siguiente apartado, la mejora sustancial en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de estas estructuras permitió que **Vipadenant** (**Vh**) y **Ciforadenant** (**Vi**) progresaran hacia ensayos clínicos para las indicaciones de párkinson y cáncer, respectivamente.[194]

Finalmente, Gütschow y colaboradores identificaron que el núcleo de benzotiazinona apropiadamente sustituido también pueden actuar como antagonista del $A_{2A}R$. El estudio de este núcleo llevó a la síntesis del compuesto **Vj** (Figura *1.24*), un antagonista potente y selectivo (Tabla 1.6) con acción dual, pues también es un potente inhibidor de la monoamina oxidasa-B (MAO-B) (IC_{50} = 34.9 nM).[208,209]

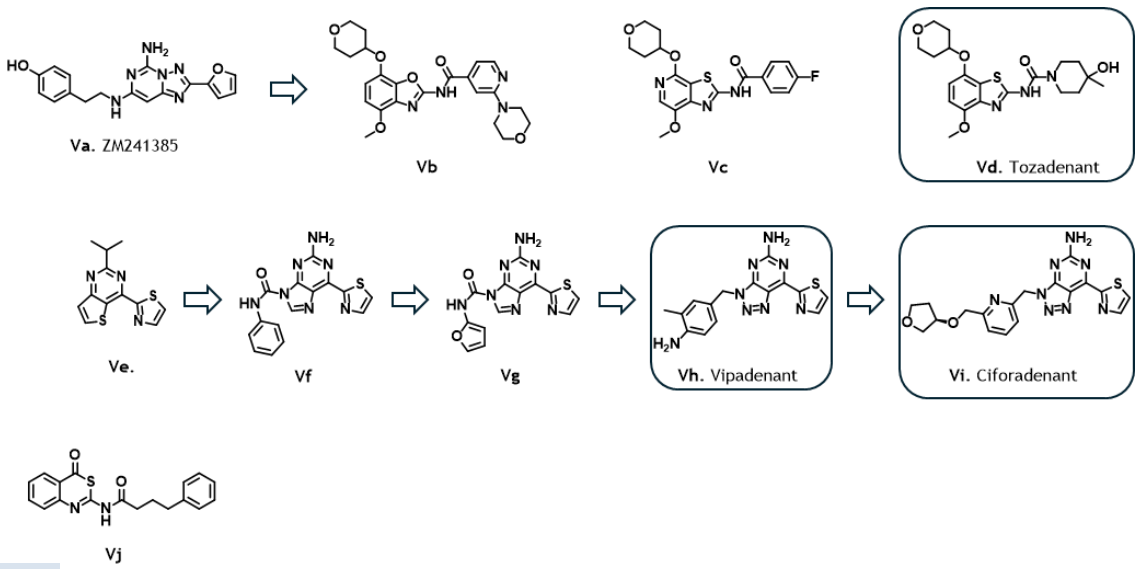


Figura 1.24. Principales derivados no xantínicos con estructura bicíclica. Los datos de afinidad se pueden ver en la Tabla 1.6.

La optimización de los derivados monocíclicos (**VI**) como antagonistas del $A_{2A}R$ ha estado motivada por la mejora en la accesibilidad sintética de los compuestos y la resolución de los problemas de solubilidad asociados a los derivados tricíclicos y bicíclicos.

El primer derivado monocíclico identificado como antagonista del $A_{2A}R$ posee un núcleo de 1,2,4-triazina, concretamente el compuesto **VIa** (Figura 1.25), que a pesar de que goza de buena afinidad por el $A_{2A}R$, no posee una selectividad significativa (Tabla 1.6).[194] A partir de esta estructura, se ha realizado una exploración de la REA muy profunda, obteniéndose compuestos como **VIb** y **VIc**, donde el anillo fenilo en posición *para* respeto a la amina se sustituyó por aminas cíclicas (Figura 1.25). Estos compuestos demostraron tener una mayor afinidad y selectividad en comparación con el compuesto **VIa** (Tabla 1.6).[210,211] AstraZeneca, por su parte, sintetizó el **AZD-4653** (**VId**) (Figura 1.25) que posee buena afinidad por el $A_{2A}R$, pero sin lograr mejorar la selectividad (Tabla 1.6). No obstante, esto no ha impedido que este ligando avanzase en ensayos clínicos para su empleo en la inmunoterapia del cáncer.[212]

Otra estructura monocíclica que posee notable actividad antagonista del $A_{2A}R$ es la pirimidina trisustituida (**VIe**). Este descubrimiento supuso que numerosas compañías centraran su esfuerzo en la farmacomodulación de este núcleo, impulsando sus programas de descubrimiento de fármacos, y dando lugar a numerosos compuestos prometedores.

Neurocrine Biosciences® utilizó el compuesto **VIe** como base para desarrollar una serie de derivados trisustituidos de la pirimidina. Entre ellos, los compuestos **VIf** y **VIg** (Figura 1.25) mostraron una alta afinidad y selectividad por el $A_{2A}R$ (Tabla 1.6). Sin embargo, Yang y colaboradores evidenciaron que el grupo acetamida presente en estos compuestos tendía a hidrolizarse (a amina primaria) en condiciones ácidas, como las presentes en el estómago.[213] Para resolver este problema se llevaron a cabo sustituciones bioisostéricas, reemplazando la función acetamida por un anillo de pirazol. Esta modificación dio lugar a los compuestos **VIh** y **VIi** (Figura 1.25), que no solo resolvieron el problema de la hidrólisis sino que también mejoraron la afinidad y selectividad de los compuestos, logrando una potencia comparable a la del **Predalenant** (**IVd**) (Tabla 1.6).[214]

Siguiendo con la farmacomodulación de este esqueleto, la compañía PaloBioFarma, desarrolló el compuesto **PBF-509**, conocido posteriormente como **Taminadenant** (Novartis®) (**VIj**) (Figura 1.25), obtenido mediante la sustitución de los grupos fenilo de **VIe** por pirazoles. Este ligando presenta una excelente selectividad y potencia por el $A_{2A}R$ (Tabla 1.6), y como se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

comentará en el siguiente apartado, se encuentra en fase de ensayos clínicos para la enfermedad de Parkinson y en la inmunoterapia contra el cáncer.[212]

En julio de 2018, Arcus Biosciences® patentó nuevos derivados pirimidínicos diseñados para bloquear la ruta adenosinérgica. En esta patente se incluye el compuesto **AB928**, también conocido como **Etrumadenant** (**VIk**) (Figura 1.25). Una 2-aminopirimidina disustituida con actividad dual sobre los receptores A_{2A} y A_{2B}, que, con el reciente descubrimiento del heterómero A_{2A}/A_{2B}, lo convierte en un candidato excelente para la inmunoterapia contra el cáncer.[212]

Por último, la compañía Lundbeck desarrolló una serie de compuestos basados en la estructura de 3,5-difluorobenzamida. Entre estos, el más prometedor fue el **LuAA-41063** (**VII**), ilustrado en la Figura 1.25, el cual mostró una alta afinidad y selectividad por el $A_{2A}R$ (Tabla 1.6). Sin embargo, este fármaco presentaba una baja hidrosolubilidad, lo que limita sus propiedades farmacocinéticas. Para superar esta limitación, se diseñó el profármaco **LuAA-47070** (**VIm**), representado en la Figura 1.25. Este desarrollo será analizado con mayor detalle en el apartado 2 (Enfoque, objetivos y líneas generales de la tesis), dado que esta estructura química ha sido la seleccionada como base para el desarrollo de nuevos antagonistas del $A_{2A}R$ en el contexto de esta tesis doctoral.

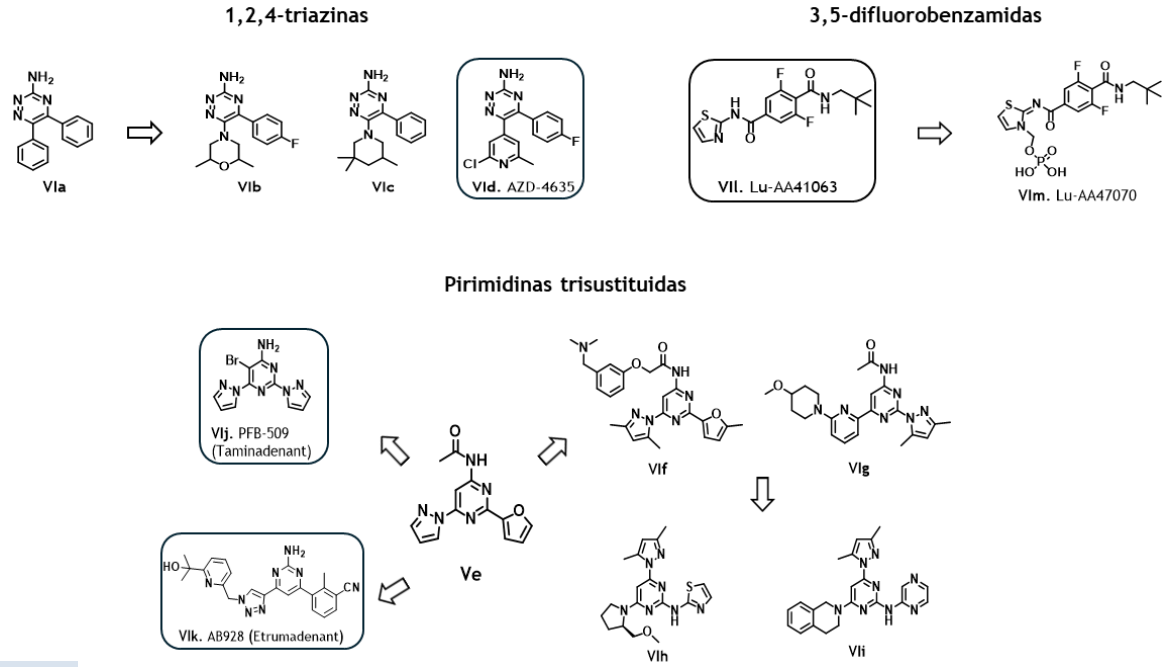


Figura 1.25. Principales derivados no xantínicos con estructura monocíclica. Los datos de afinidad se pueden ver en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6. Datos de afinidad de los antagonistas no xantínicos.

	Fármaco	K_i (nM)			
		hA_1AR	*h*A_{2A}AR	*h*A_{2B}AR	*h*A_3AR
		Antagonistas no xantínicos (Triciclos)			
IVa[194]	CGS-15943	3.50 nM	1.20 nM	32.4 nM	35.0 nM
IVb[194]	SCH-58261	549 nM	1.10 nM	1110 nM	1200 nM
IVc[194]	SCH-412348	>996 nM	0.60 nM	N.D.	N.D.
IVd[194]	Predalenant	>1000 nM	0.90 nM	>1000 nM	>1000 nM
IVe[194]		602 nM	0.90 nM	N.D.	N.D.
IVf[194]		1361 nM	12.60 nM	N.D.	N.D.
IVg[194]		1398 nM	5.20 nM	N.D.	N.D.
IVh[194]		1405 nM	14.20 nM	N.D.	N.D.
IVi[194]		>10000 nM	6.30 nM	N.D.	N.D.
IVj[194]	Inupadenant	500 nM*	1.83 nM*	2200 nM*	>10000 nM*
		Antagonistas no xantínicos (biciclos)			
Va[194]	ZM241385	255 nM	0.80 nM	50.0 nM	>10000 nM
Vb[194]		8775 nM	25 nM	N.D.	N.D.
Vc[194]		2100 nM	5.00 nM	N.D.	N.D.
Vd[194]	Tozadenant	1350 nM	5.00 nM	700 nM	1570 nM
Ve[194]		207 nM	1.40 nM	865 nM	476 nM
Vf[194]		17.0 nM	1.10 nM	112 nM	1472 nM
Vg[194]		170 nM	1.70 nM	141 nM	1931 nM
Vh[194]	Vipadenant	68.0 nM	1.30 nM	63.0 nM	1005 nM
Vi[194]	Ciforadenant	192 nM	3.40 nM	3975 nM	2498 nM
Vj[194]		2500 nM	39.5 nM	N.D.	N.D.
		Antagonistas no xantínicos (monociclos)			
VIa[194]		115 nM	270 nM	N.D.	N.D.
VIb[194]		>10000 nM	16.0 nM	N.D.	N.D.
VIc[194]		>10000 nM	41.0 nM	N.D.	N.D.
VId[212]	AZD-4635	160 nM	1.70 nM	64.0 nM	>10000 nM
VIe[194]		10.2 nM	0.60 nM	N.D.	N.D.
VIf[194]		40.0 nM	0.10 nM	N.D.	N.D.
VIg[194]		77.2 nM	0.40 nM	N.D.	N.D.
VIh[194]		>10000 nM	9.50 nM	N.D.	N.D.
VIi[194]		>10000 nM	1.10 nM	N.D.	N.D.
VIj[212]	Taminadenant	2500 nM	12.0 nM	1000 nM	5000 nM
VIk[212]	Etrumadenant	640 nM	1.50 nM	2.00 nM	489 nM
VIl[194]	Lu-AA41063	410 nM	9.00 nM	260 nM	>10000 nM

*N.D. = No determinada | *: Valores de IC_{50} |*

1.4.3.1 Aplicaciones terapéuticas y ensayos clínicos de los antagonistas del receptor A_{2A}

El potencial terapéutico de la modulación antagonista del A_{2A}R de ADO ha atraído la atención de numerosos grupos académicos y compañías farmacéuticas. Esta tendencia es observable en el aumento sustancial de publicaciones científicas y el creciente número de patentes de pequeñas moléculas dirigidas a esta diana terapéutica en los últimos años. Inicialmente, los programas de descubrimiento y desarrollo de antagonistas del A_{2A}R de ADO se enfocaron en el tratamiento de trastornos neurológicos, destacando la enfermedad de Parkinson como principal indicación (debido a la implicación de la vía adenosinérgica en la regulación de la actividad motora y la neurotransmisión dopaminérgica). Como se detalló en el

apartado anterior, algunos de estos antagonistas han logrado avanzar hacia ensayos clínicos. Sin embargo, hasta la fecha, solo uno ha recibido aprobación para esta indicación. Este es el caso de la **Istradefilina** (**IIIj**) (**NOURIANZ®**), el primer agente no dopaminérgico aprobado en 2013 por la *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency* (PMDA) de Japón, y en 2019 por la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos.[7,215] Este fármaco ha demostrado alta eficacia, mejorando los síntomas motores en pacientes con enfermedad de Parkinson cuando se utiliza en combinación con L-dopa. En la Tabla 1.7 se presenta un resumen del desempeño de diversos antagonistas del $A_{2A}R$ para la enfermedad de Parkinson.

Tabla 1.7. Desempeño de los antagonistas del $A_{2A}R$ en ensayos clínicos para la enfermedad de Parkinson.

Fármaco	Patrocinador	Fase	Identificador (ensayo clínico)	Motivo de descontinuación
Tozadenant (**Vd**)[216]	Biotie Therapies UCB Pharma SA	III	NCT03051607	Efectos adversos severos
Predalenant (**IVd**)[217]	Merck Sharp & Dohme LLC	III	NCT01227265	Eficacia no significativa
Vipadenant (**Vh**)[218]	Vernalis plc-Biogen Idec	II	NCT00442780	Efectos adversos severos
PBF-509 (**Vlj**)[219]	PaloBiofarma	I	NCT02111330	Continúa en ensayos clínicos
Istradefilina (**IIIj**)	Kyowa Hakko Kirin Co Ltd	Aprobado		

Aunque los antagonistas del $A_{2A}R$ mostraron potencial en estudios preclínicos para el tratamiento de trastornos neurológicos, la mayoría de los ligandos no progresaron satisfactoriamente en los ensayos clínicos en la enfermedad de Parkinson. La limitada eficacia y la aparición de efectos adversos graves llevaron al abandono de esta área por parte de las compañías farmacéuticas. Sin embargo, el reciente descubrimiento de la implicación del $A_{2A}R$ en el contexto del MAT y la inmunoterapia del cáncer ha renovado el interés en estos compuestos, redirigiendo la investigación hacia su potencial en la inmunoterapia del cáncer. Este cambio de enfoque ha sido respaldado por una creciente cantidad de ensayos clínicos centrados en evaluar la capacidad de los antagonistas del $A_{2A}R$ para restaurar la función del sistema inmunológico y mejorar la respuesta antitumoral en numerosos tumores. En la Tabla

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.8 se presenta un resumen de las indicaciones y distintas fases alcanzadas de varios antagonistas del $A_{2A}R$ en el contexto de la inmunoterapia contra el cáncer.

Tabla 1.8. Situación actual de algunos antagonistas del $A_{2A}R$ en ensayos clínicos para la inmunoterapia contra el cáncer.

Fármaco	Patrocinador	Indicación	Fase	Identificador (ensayo clínico)
Ciforadenant (**Vi**)[220,221]	M.D. Anderson Cancer Center	Carcinoma de células renales avanzado En combinación con ipilimumab y nivolumab	Ib/II	NCT05501054
	Corvus Pharmaceuticals	Cáncer de próstata Carcinoma de células renales Cáncer de mama triple negativo Melanoma Cáncer colorrectal En combinación con atezolizumab	I/Ib	NCT02655822
AZD-4635 (**VId**)[222]	AstraZeneca®	Cáncer de próstata resistente En combinación con durvalumab y oleclumab	II	NCT04089553
Etrumadenant (**VIk**)[223]	Arcus Biosciences	Cáncer colorrectal metastásico En combinación con zimberilimab	Ib/II	NCT04660812
Taminadenant (**VIj**)[224]	PaloBiofarma Novartis®	Cáncer de pulmón no microcítico avanzado En combinación con spartalizumab	I	NCT02403193
Inupadenant (**IVj**)[225]	iTeos Therapeutics®	Cáncer de pulmón no microcítico metastásico Segunda línea de tratamiento en combinación con quimioterapia	II	NCT05403385

1.4.4 Estudios de antagonistas A_{2A} en la inmunoterapia del cáncer

Como se ha discutido en la sección 1.4.3.1 (Aplicaciones terapéuticas y ensayos clínicos de los antagonistas del receptor A_{2A}), los programas de desarrollo de los antagonistas están experimentando una transformación significativa en sus objetivos. Inicialmente concebidos para tratar enfermedades neurológicas, como el Parkinson, su desarrollo se ha orientado hacia la inmunoterapia del cáncer. Numerosos fármacos "clásicos", actualmente en ensayos clínicos para la inmunoterapia contra el cáncer, ven su eficacia significativamente reducida cuando se exponen a altas concentraciones de ADO, como las presentes en el MAT. Estas concentraciones, que pueden alcanzar niveles micromolares, son considerablemente más altas que las observadas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

en otras condiciones patológicas, como la enfermedad de Parkinson. Esta limitación resalta la necesidad de desarrollar nuevas estructuras y de optimizar las estructuras "clásicas" existentes, con el objetivo de identificar candidatos terapéuticos ideales. En esta sección se presenta un análisis de dos trabajos recientes en este campo, enfocados en el desarrollo de nuevos antagonistas del $A_{2A}R$ y en la evaluación del perfil inmunoterapéutico de los mismos en modelos preclínicos.

El primer trabajo fue publicado en el 2022 por Yonghui Wang y colaboradores. En este estudio, mediante un cribado exhaustivo de su quimioteca, identificaron que el núcleo de 2-aminopteridin-7(8H)-ona actuaba como antagonista del $A_{2A}R$.[226] Tras un extenso trabajo de farmacomodulación, identificaron el compuesto **VIIa** como un potente antagonista del $A_{2A}R$ (Figura 1.26), que fue estudiado *in vitro* para evaluar su desempeño a nivel inmunológico. En particular, se investigó su capacidad para activar linfocitos T en un modelo celular de coestimulación de células Jurkat T con Ionomicina (Ion) y acetato de 12-miristato-13-forbol (PMA) (Figura 1.26A).[226] Utilizaron como biomarcador de la activación la producción de IL-2, una citocina proinflamatoria (esencial para su actividad citolítica) que es secretada por linfocitos T activados. Como se observa en la Figura 1.26B, la estimulación de los linfocitos T con la mezcla de PMA e Ion aumenta considerablemente la cantidad de mRNA de IL-2, mientras que este aumento se ve disminuido cuando se tratan los linfocitos T con **NECA** (**IIb**) (agonista). Sin embargo, el tratamiento con el compuesto **VIIa** revierte la supresión, aumentando la producción de mRNA de IL-2 casi en 4 veces en presencia de **NECA** (**IIb**). En la Figura 1.26C se cuantificó la cantidad de proteína IL-2 mediante Western blot, donde se corroboró que, efectivamente el tratamiento con **NECA** (**IIb**) disminuye la cantidad de IL-2, mientras que el empleo de **VIIa** es capaz de revertir la disminución causada por **NECA** (**IIb**). Además, se comparó el efecto del compuesto **VIIa** frente a un antagonista de referencia "clásico", el **Ciforadenant** (**Vi**) (**CPI-444** en la publicación), observándose un desempeño superior por parte del nuevo compuesto.[226]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

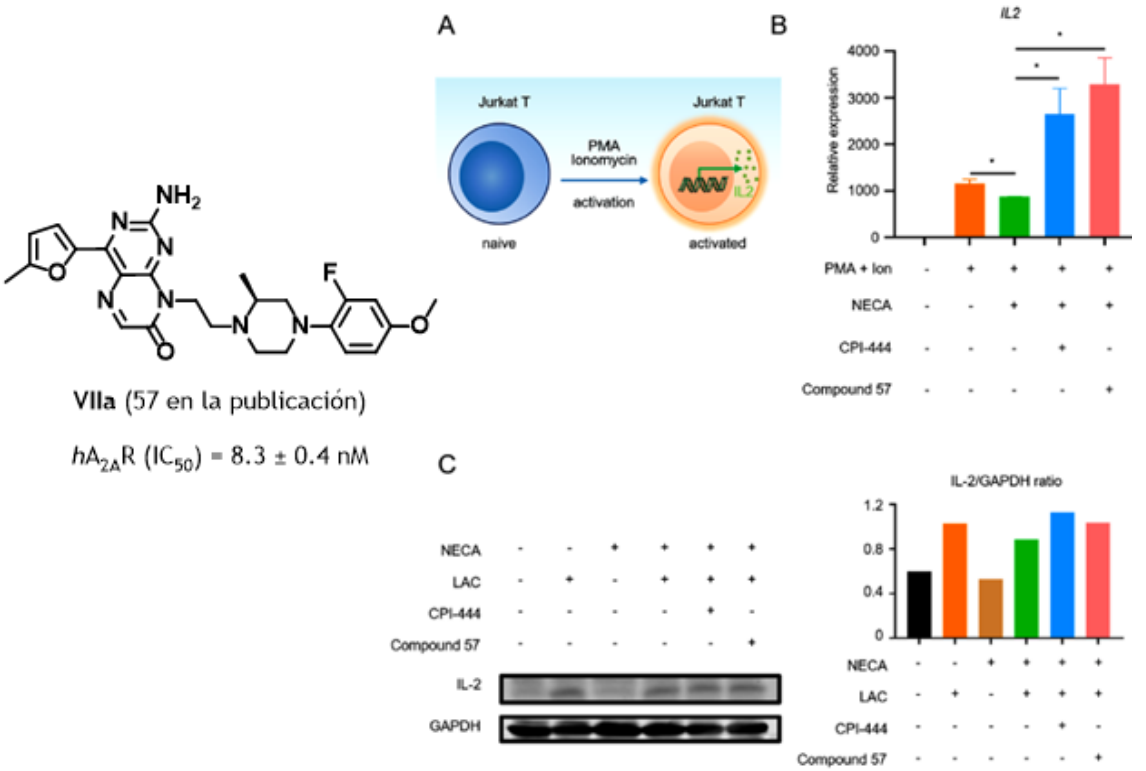


Figura 1.26. Primer ensayo de evaluación de la actividad inmunomoduladora del compuesto VIIa A) Ilustración gráfica de la activación *in vitro* de las células Jurkat T. B) Determinación de la expresión relativa de mRNA de IL-2 producido por las células Jurkat T previamente activadas mediante QPCR. Las células fueron estimuladas mediante la combinación de PMA (20ng/mL), Ion (1µg/mL), en presencia o no de NECA (IIb) (1µM), Ciforadenant (Vi ó CPI-444) (10 µM) y VIIa (57) (10µM). C) Análisis mediante Western Blot (izq.) y la cuantificación (dch) de los niveles de proteína IL-2 producidos por las células Jurkat T activadas. Las células fueron activadas en presencia de (LAC, una mezcla de PMA, Ion y Brefeldina A), NECA (IIb) (1µM), Ciforadenant (Vi ó CPI-444) (10 µM) y VIIa (57) (10µM) durante toda la noche. GAPDH fue aplicado como control para la normalización.[226]

En un experimento complementario, se evaluó la capacidad de los linfocitos T tratados con el compuesto **VIIa** para eliminar células cancerosas *in vitro* (Figura 1.27A). Para ello, se co-cultivaron células tumorales HCT116 (células objetivo (O)) con linfocitos T activados previamente (células efectoras (E)) utilizando diferentes proporciones (E:O = 0:1, 3:1, 6:1 y 12:1). Como se muestra en la Figura 1.27B, el aumento en la proporción de células efectoras resulta en una reducción significativa de la supervivencia de las células objetivo, evidenciando la capacidad citotóxica de los linfocitos T activados. En particular, a una ratio E:O de 6:1, las células HCT116 presentan una tasa de supervivencia del 51.4%. Fijada la relación idónea en 6:1, en la Figura 1.27C se ilustra (en la izquierda gráficamente y en la derecha cuantitativamente), cómo el tratamiento con **NECA (IIb,** agonista) reduce significativamente

la capacidad citotóxica de los linfocitos T y como el tratamiento con el compuesto **VIIa** revierte este efecto, devolviendo la tasa de supervivencia de las células tumorales al 48.6%. Además, el compuesto **VIIa** demostró un desempeño superior al antagonista de referencia **Ciforadenant** (**Vi**) (CPI-444 en la publicación).[226] Los resultados obtenidos en ambos estudios demuestran que el compuesto **VIIa** posee la capacidad de revertir de manera eficaz los efectos inmunosupresores inducidos por la activación del $A_{2A}R$ por el agonista **NECA** (**IIb**) en los linfocitos T. Esto convierte al compuesto **VIIa** en un prometedor fármaco para su empleo en la inmunoterapia del cáncer.

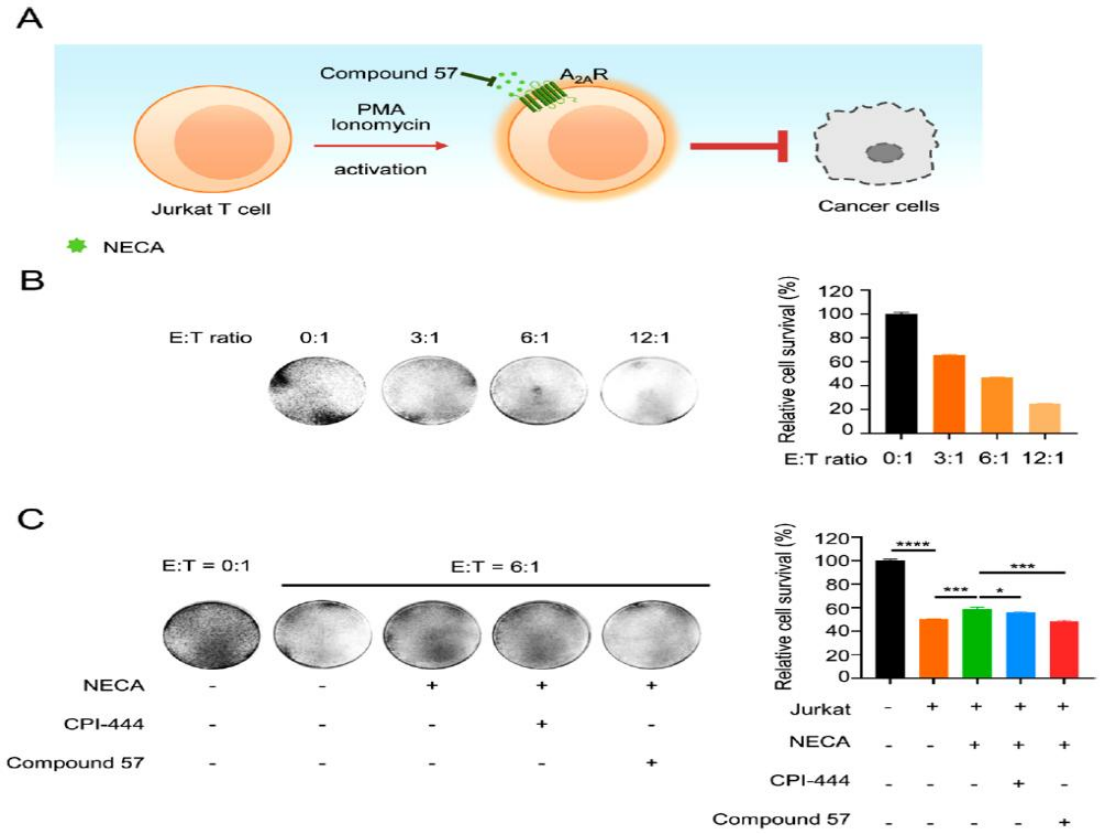


Figura 1.27. Segundo ensayo de evaluación de la actividad inmunomoduladora del compuesto VIIa A) Representación gráfica del ensayo de la capacidad de los linfocitos T activados para la eliminación de células cancerosas. B) Los linfocitos T activados muestran una gran actividad citotóxica. Los linfocitos T (células efectoras) previamente activados con PMA e Ion y cocultivados con células HCT116 (células objetivo) a diferentes ratios E:O durante 48 horas y finalmente teñidas con cristal violeta. La cantidad de células supervivientes se ha calculado en base al grupo control (barra negra) mediante absorbancia a 595 nM. C) En la izq. la representación gráfica y en la drcha. la cuantificación de las células HCT116 incubadas con las células Jurkat T activadas con un ratio E:O 6:1, con la administración de varios tratamientos. Las células fueron tratadas con NECA (1μM) (IIb), Ciforadenant (Vi ó CPI-444) (10 μM) y VIIa (57) (10μM) durante 48 horas. La cuantificación se ha hecho mediante absorbancia de las células teñidas con cristal violeta.[226]

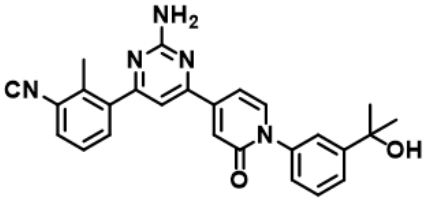
El segundo trabajo usó una metodología muy similar al anterior. En 2023, Qiong Xie y colaboradores llevaron a cabo un cribado exhaustivo de su quimioteca que les permitió identificar un compuesto inicial con una estructura basada en un núcleo de piridinona. A partir de este hallazgo realizaron un proceso de farmacomodulación, lo que les permitió optimizar y caracterizar diferentes fármacos. Entre ellos, identificaron al compuesto **VIIb** como un antagonista potente y selectivo del $A_{2A}R$ (Figura 1.28). Una vez identificado el mejor candidato, realizaron diferentes ensayos biológicos para comprobar su desempeño a nivel inmunológico.[227]

Como se detalló previamente en la sección 1.3. (Adenosina: implicación en el sistema inmune y aplicaciones en el contexto del cáncer), los linfocitos T $CD8^+$ desempeñan su función citotóxica a través de la secreción de moléculas efectoras como granzima B, IFN-γ e IL-2. Sin embargo, la activación del $A_{2A}R$ en estos linfocitos inhibe tanto la producción como la secreción de estas moléculas; además de aumentar la expresión en la membrana de otros PCI como LAG-3 y TIM-3, lo que culmina en un estado de anergia funcional en los linfocitos T $CD8^+$, comprometiendo su capacidad para eliminar eficazmente las células tumorales.

En un primer ensayo biológico *in vitro*, se evaluó la capacidad del compuesto **VIIb** para revertir los efectos inducidos por **NECA (IIb)** en células T Jurkat previamente activadas (Figura 1.28A). Como se observa en la Figura 1.28B,C, el tratamiento con **NECA (IIb)** provoca un aumento significativo en la expresión génica de los puntos de control inmunitarios LAG-3 y TIM-3. Por otro lado, **NECA (IIb)** induce una marcada disminución en la expresión de moléculas efectoras, reduciendo los niveles de granzima B, de IFN-γ e IL-2 en comparación con el control (Figura 1.28D-F). El tratamiento de las células T Jurkat con el compuesto **VIIb** a diferentes concentraciones (Figura 1.28D-F) demostró su capacidad para revertir los efectos inducidos por el tratamiento con **NECA (IIb)**.[227] En un segundo ensayo *in vitro*, se evaluó la capacidad de los linfocitos T tratados con el compuesto **VIIb** para eliminar células cancerosas (Figura 1.28G). Para ello, se utilizó la línea celular MC38, un modelo murino de cáncer colorrectal genéticamente modificado para expresar ovoalbúmina (MC38-OVA). Los linfocitos T (OT-1) empleados en el estudio fueron aislados de ratones transgénicos y fueron diseñados para reconocer específicamente residuos de ovoalbúmina. Como se muestra en la Figura 1.28H,I, los potentes efectos inmunosupresores causados por **NECA (IIb)** fueron revertidos significativamente tras el tratamiento con el compuesto **VIIb,** el cual demostró además un rendimiento superior en comparación con el antagonista "clásico" **Ciforadenant (Vi)** (CPI-444

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en la publicación). Estos resultados destacan la capacidad del compuesto **VIIb** para potenciar tanto la activación como la función citolítica de los linfocitos T mediante el antagonismo del $A_{2A}R$. Esto lo posiciona como un candidato prometedor para el desarrollo de estrategias de inmunoterapia contra el cáncer.[227]



VIIb (38 en la publicación)

$hA_{2A}R$ (IC_{50}) = 29 ± 14.2 nM

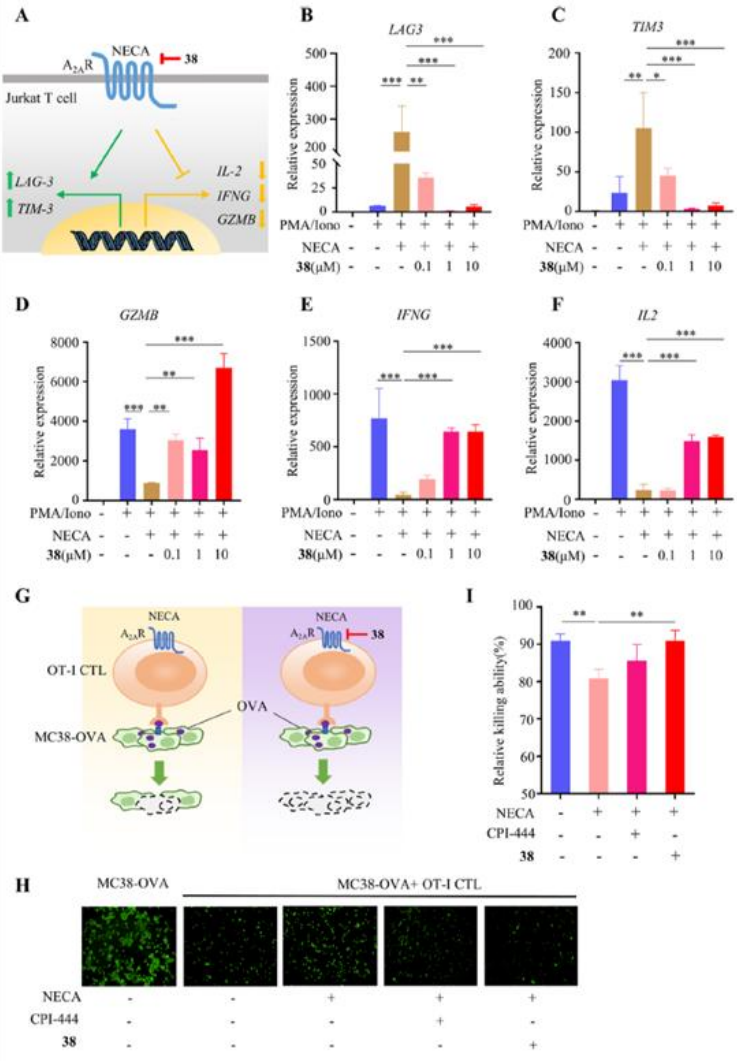


Figura 1.28. Evaluación de la actividad inmunomoduladora del compuesto VIIb A) Representación gráfica de los efectos del compuesto **VIIb** (**38**) sobre la expresión génica de las inmuno-moléculas en las células Jurkat T. B-F) Las células T Jurkat se estimularon con 20 ng/mL de PMA y 1 μg/mL de Iono en presencia de **NECA** (**IIb**) (1 μM) con o sin el compuesto **VIIb** (**38**) (0,1, 1 y 10 μM) durante 5 h. La expresión génica de LAG-3 (B), TIM-3 (C), GZMB (D), IFNG (E) e IL-2 (F) en células T Jurkat activadas se determinó mediante qRT-PCR. G) Representación gráfica de la citotoxicidad de los linfocitos T sobre las células cancerosas MC38-OVA. H) Imágenes de las células MC38-OVA co-cultivadas con los linfocitos T (OT-1) con varios tratamientos. Ambos tipos celulares fueron co-cultivados durante 48h en presencia de **NECA** (1μM) sin y con el compuesto **VIIb** (38) y Ciforadenant (**Vi** ó **CPI-444**). Las células MC38-OVA supervivientes fueron teñidas con Calceína AM (verde fluorescente). I) La cuantificación relativa de la capacidad citotóxica de los linfocito T (OT-1) fue realizada acorde con la imagen H.[227]

1.5 FÁRMACOS MULTIDIANA

Durante el último siglo, la premisa "una molécula, una diana, una enfermedad" ha dominado el enfoque de la industria farmacéutica. Esta estrategia ha llevado al desarrollo de una amplia gama de fármacos selectivos, los cuales han demostrado ser efectivos para el tratamiento de múltiples patologías.[228] Sin embargo, aunque este modelo ha sido exitoso en el tratamiento de muchas enfermedades, está demostrando sus limitaciones en el abordaje de patologías más complejas y con una etiología multifactorial, como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas o las cardiovasculares. Estas patologías, caracterizadas por su complejidad biológica y la interacción de múltiples receptores y vías de señalización, requieren enfoques terapéuticos más amplios que consideren la red de alteraciones subyacentes, más allá de la simple inhibición de una diana específica.[228] A partir de esta premisa, surge el concepto de fármacos multidiana (FM), en los cuales una sola molécula es capaz de modular de manera simultánea dos o más dianas terapéuticas asociadas a una misma patología.[228] Existen dos estrategias principales para el tratamiento multidiana. 1) ***combinación de monoterapias***: esta estrategia clásica implica la combinación de dos o más formulaciones, cada una con un principio activo que actúa sobre dianas terapéuticas diferentes. Alternativamente, se puede emplear una única formulación que contenga varios principios activos, cada uno dirigido a diferentes objetivos terapéuticos y 2) ***fármacos multidiana***: en este enfoque, un único principio activo ejerce su efecto sobre dos o más dianas terapéuticas simultáneamente (Figura 1.29), lo que permite una intervención más integral sobre las vías patológicas asociadas a la enfermedad.

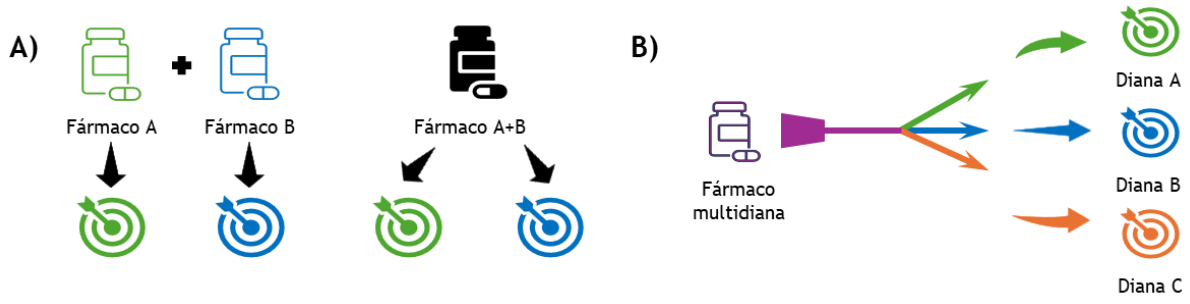


Figura 1.29. Representación gráfica de las estrategias para el tratamiento multidiana A) Combinación de monoterapias B) Fármacos multidiana.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.5.1 Diseño racional de fármacos multidiana basado en la combinación de farmacóforos

Este enfoque es el predominante en el diseño de fármacos multidiana. Consiste en la combinación de farmacóforos pertenecientes a dianas distintas, generando una nueva entidad química que conserva los efectos farmacológicos de ambos farmacóforos sobre las dianas originales.[229] Esta técnica puede llevarse a cabo mediante tres estrategias de diseño, que se diferencian por el grado de solapamiento estructural entre sus componentes. Estas estrategias, ordenadas de menor a mayor grado de integración, son: *linking*, *fusing* y *merging* (Figura 1.30). Cada una de estas estrategias presenta ventajas y desafíos específicos en cuanto a la estabilidad, selectividad y eficacia del ligando resultante.[229]

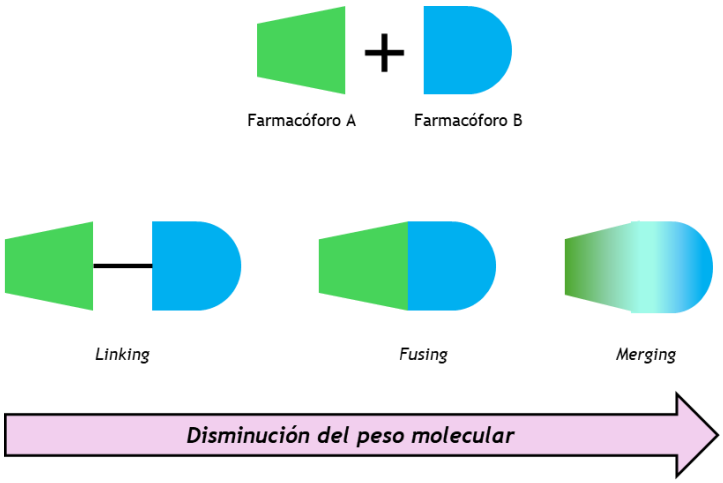


Figura 1.30. Estrategias de diseño racional de fármacos multidiana.

Linking

Este método de diseño implica la combinación de dos farmacóforos separados por un espaciador, el cual no está presente en la estructura original de los componentes (Figura 1.31).[230] Se considera la estrategia más sencilla en términos de accesibilidad sintética, aunque presenta varios factores críticos a tener en cuenta, como la elección del punto de unión del espaciador, su longitud y su naturaleza química.[231] Uno de los principales inconvenientes de este tipo de fármacos multidiana es que, debido a su estructura, suelen tener un peso molecular elevado, lo que puede disminuir su biodisponibilidad oral y su capacidad para atravesar barreras.[229] Dependiendo del tipo de espaciador, estos fármacos se pueden clasificar en: 1) espaciadores degradables: generalmente estos espaciadores son ésteres que se degradan por acción de las

USC DE COMPOSTELA

esterasas presentes en la circulación sanguínea, liberando los dos principios activos, cada uno con su actividad correspondiente y 2) espaciadores no degradables: este tipo de espaciadores, que son los más utilizados actualmente, permanecen estables en el organismo, manteniendo la molécula como una única entidad química con actividad multidiana.[229] En la Figura 1.31 se presenta el fármaco multidiana (**VIIIc**) diseñado mediante la técnica de *linking*, sintetizado a partir de los farmacóforos individuales (**VIIIa, Tacrina**) y (**VIIIb**) desarrollado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.[228] Este compuesto muestra una acción multidiana al actuar simultáneamente sobre la acetilcolinesterasa (AChE), la butilcolinesterasa (BuChE) y la glucógeno sintasa quinasa-3β (GSK-3β), tres dianas clave en la fisiopatología de la enfermedad.

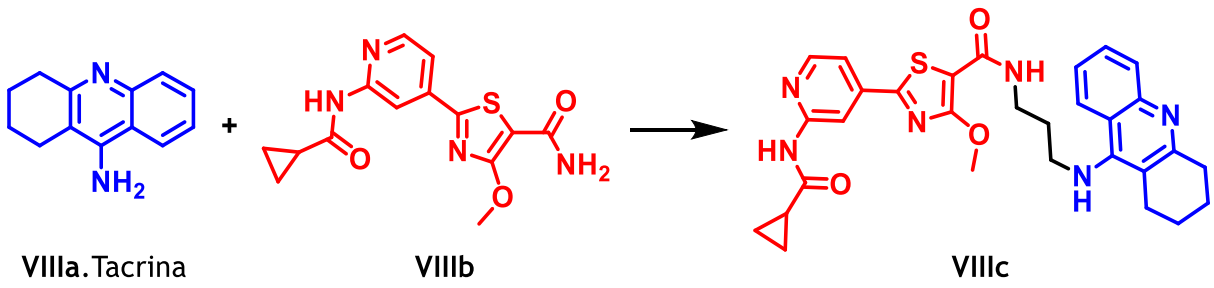


Figura 1.31.Diseño racional de un ligando multidiana mediante la técnica de *linking*.

En la Tabla 1.9 se detalla la actividad biológica de los dos fármacos modelo, así como la actividad obtenida para el fármaco multidiana.

Tabla 1.9. Actividad biológica de los compuestos en las dianas GSK-3β, hAChE y hBuChE.[232]

Ligando	hGSK-3β IC_{50} (nM)	hAChE IC_{50} (nM)	hBuChE IC_{50} (nM)
Tacrina (**VIIIa**)	N.D.	230 ± 31	40 ± 3.7
VIIIb	1.10	N.D.	N.D.
VIIIc	66 ± 6.2	6.40 ± 0.3	260 ± 32

N.D. = *No determinada*

Fusing

Este método de diseño consiste en el solapamiento parcial de las estructuras de los dos fármacos. Este tipo de diseño elimina el espaciador, y aprovecha las similitudes estructurales

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de los ligandos de partida.[229] En la Figura 1.32 se muestra un fármaco multidiana, denominado **VIIIf**, diseñado mediante la técnica de *fusing*, a partir de los farmacóforos de **Rivastigmina** (**VIIId**) y **Rasagilina** (**VIIIe**). Este compuesto ha sido desarrollado como una potencial terapia para la enfermedad de Parkinson.[228] El ligando **Ladostigil** (**VIIIf**) se caracteriza por su acción multidiana, ya que actúa simultáneamente sobre la acetil colinesterasa E (AChE), la monoamino oxidasa-A (MAO-A) y la (MAO-B) tres enzimas clave implicadas en la fisiopatología de esta enfermedad.

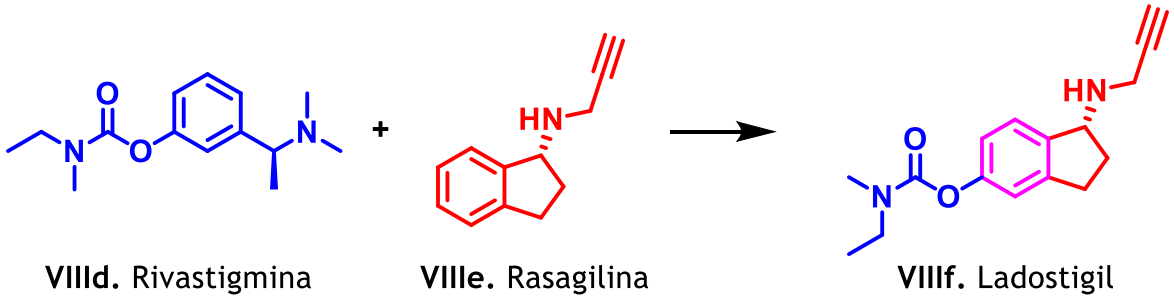


Figura 1.32. Diseño racional de un ligando multidiana la técnica de *fusing*.

En la Tabla 1.10 se detalla la actividad biológica de los dos fármacos modelo, así como la actividad obtenida para el fármaco multidiana.

Tabla 1.10. Actividad biológica de los compuestos en las dianas hAChE, MAO-A y MAO-B.[228]

Ligando	MAO-A IC_{50} (μM)	MAO-B IC_{50} (μM)	hAChE IC_{50} (μM)
Rivastigmina (**VIIId**)	N.D.	N.D.	0.92
Rasagilina **(VIIIe)**	0.41	0.0044	N.D.
Ladostigil **(VIIIf)**	52.4	85	120

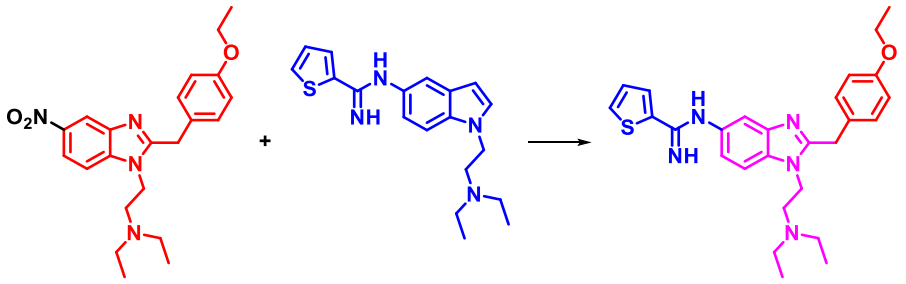
N.D. = *No determinada*

Merging

Este tipo de fármacos multidiana presenta el mayor grado de solapamiento estructural entre los farmacóforos (Figura 1.33). El diseño se basa en la identificación de las regiones tolerantes de cada diana terapéutica y aprovechar las similitudes estructurales de los ligandos base para lograr el máximo solapamiento entre las estructuras. El objetivo es obtener compuestos de bajo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

peso molecular con un perfil farmacocinético y farmacodinámico optimizado. Este enfoque favorece la creación de moléculas más eficientes, que puedan interactuar simultáneamente con varias dianas, minimizando a la vez posibles efectos secundarios y mejorando su viabilidad terapéutica.[229] En la Figura 1.33 se muestra el fármaco multidiana **VIIIj**, creado para el tratamiento del dolor, mediante la combinación del farmacóforo del compuesto **VIIIg** (agonista de los receptores opioides tipo μ (μOP) y el farmacóforo **VIIIh** (estructura típica de los inhibidores de los distintos isotipos de la óxido nítrico sintasa (xNOS)).[233]



VIIIg. Etonizaceno **VIIIh.** **VIIIi.**

Figura 1.33. Diseño racional de un ligando multidiana mediante la técnica de *merging*.

En la Tabla 1.11 se detalla la actividad biológica de los dos fármacos modelo, así como la actividad obtenida para el fármaco multidiana.

Tabla 1.11. Actividad biológica de los compuestos en las dianas MOP y NOS.[233]

Ligando	nNOS IC_{50} (μM)	eNOS IC_{50} (μM)	iNOS IC_{50} (μM)	*h*μOP *Ki* (nM)
(**VIIg**) Etonizaceno	N.D.	N.D.	N.D.	0.2
L-NMMA*	0.95	0.65	1.8	N.D.
(**VIIIi**)	0.44	4.74	55.2	5.41

N.D. = *No determinada* | *compuesto usado como referencia para los inhibidores de NOS

1.5.2 Fármacos multidiana que modulan el $A_{2A}R$ en el contexto del cáncer

Como se destacó al inicio de esta sección, las enfermedades con etiología multifactorial requieren enfoques terapéuticos más complejos que permitan abordar de manera simultánea múltiples dianas terapéuticas. En el caso del cáncer, la complejidad del MAT y como interactúa

con su entorno a través de diferentes vías favoreciendo su crecimiento y supervivencia, resaltan la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas que combinen la modulación de las múltiples rutas implicadas en la progresión tumoral. En línea con los objetivos de esta tesis doctoral, en esta sección se analizarán brevemente algunos de los fármacos multidiana en desarrollo, especialmente en aquellos dirigidos a abordar varias dianas terapéuticas en el contexto del cáncer en los que el $A_{2A}R$ se encuentre implicado.

A_{2A}-HDAC

Las enzimas histonas desacetilasas (HDAC) son proteínas que eliminan grupos acetilo de las histonas y otras proteínas, lo que compacta la cromatina y regula la expresión génica al reducir la accesibilidad del ADN para la transcripción. Este mecanismo desempeña un papel crucial en procesos celulares como el control del ciclo celular, la diferenciación y la respuesta al estrés. En el contexto del cáncer, las HDAC (mayormente HDAC-1 y HDAC-6) están implicadas en la desregulación epigenética al reprimir genes supresores de tumores y activar genes que favorecen la proliferación y supervivencia celular. Esta actividad contribuye al crecimiento tumoral, la invasión, la resistencia a la apoptosis y la progresión metastásica. Por ello, los inhibidores de HDAC han surgido como una estrategia terapéutica prometedora para restaurar el equilibrio epigenético y reactivar genes supresores, ofreciendo un enfoque innovador en el tratamiento del cáncer. Los fármacos duales A_{2A}-HDAC combinan la modulación de las vías epigenéticas y purinérgicas, ofreciendo un tratamiento sinérgico para inhibir el crecimiento tumoral y remodelar el microambiente inmunosupresor en el cáncer. En 2021, Jianjun y colaboradores publicaron un estudio en el que desarrollaron fármacos duales utilizando la técnica de *linking*. En este trabajo, emplearon como farmacóforos para el $A_{2A}R$ los antagonistas **ZM241385** (**Va**) y **SCH-58261** (**IVb**), mientras que como inhibidores de HDAC utilizaron el **Vorinostat** (**IXa**) y el **Mocetinostat** (**IXb**).[234] Un año más tarde, los mismos autores publicaron un segundo estudio de características similares, en el que mantuvieron los mismos inhibidores de HDAC, pero reemplazaron los farmacóforos del $A_{2A}R$ por los antagonistas **Vipadenant** (**Vh**) y **Ciforadenant** (**Vi**).[235] En la Figura 1.34se muestran los mejores ligandos obtenidos en ambos estudios, y en la Tabla 1.12 se presentan los resultados de la actividad biológica de dichos compuestos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

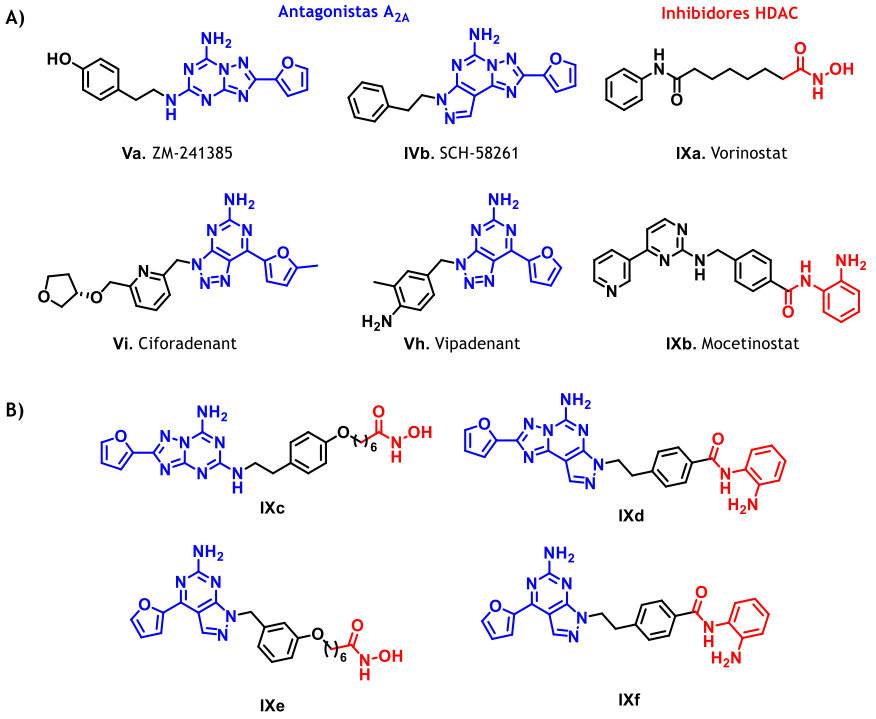


Figura 1.34. Fármacos duales A_{2A}/HDAC. A) Estructuras químicas de los precursores utilizados en el desarrollo de fármacos duales A_{2A}-HDAC. B) Mejores compuestos obtenidos en ambos trabajos. Los datos de actividad biológica pueden verse en la Tabla 1.12.[234,235]

Tabla 1.12. Datos de actividad biológica de los farmacóforos de partida y de los mejores ligandos obtenidos en ambos trabajos.[234,235]

Ligandos	$hA_{2A}R$ (K_i, nM)	HDAC-1 (IC_{50}, nM)	HDAC-6 (IC_{50}, nM)
(**Va**) ZM-241385	2.60 ± 0.7	N.D.	N.D.
(**IVb**) SCH-58261	2.40 ± 0.5	N.D.	N.D.
(**Vi**) Ciforadenant	1.30 ± 0.7	N.D.	N.D.
(**Vh**) Vipadenant[194]	0.76 ± 0.26	N.D.	N.D.
(**IXa**) Vorinostat	N.D.	14.6 ± 1.4	18.5 ± 6.5
(**IXb**) Mocetinostat	N.D.	86.3 ± 4.5	>10000
(**IXc**)	4.90 ± 0.4	8.00 ± 1.2	5.90 ± 0.1
(**IXd**)	2.20 ± 0.4	80.2 ± 13.1	>10,000
(**IXe**)	10.3 ± 2.7	18.5 ± 2.5	N.D.
(**IXf**)	163.5 ± 14.5	145.3 ± 12.6	N.D.

N.D. = *No determinada*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A_{2A}/A_{2B}

En el apartado 1.3 (Adenosina: implicación en el sistema inmune y aplicaciones en el contexto del cáncer), se abordó el papel clave de la ADO en la regulación del MAT, destacando cómo la activación de los $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$ contribuye significativamente a la progresión y supervivencia del tumor. Este efecto se debe a la capacidad de estos receptores para modular múltiples procesos biológicos, incluyendo la supresión de la respuesta inmune antitumoral, la promoción de la angiogénesis o el aumento de la proliferación celular entre otros. En este contexto, el desarrollo de fármacos multidiana que antagonicen simultáneamente la acción de ambos receptores emerge como una estrategia terapéutica innovadora. Este enfoque no solo busca interrumpir las vías que facilitan el crecimiento tumoral, sino también potenciar la eficacia de las terapias inmunológicas actuales, al revertir los efectos inmunosupresores de la ADO. En la sección 1.4.3 (Antagonistas del receptor A_{2A}), se describió el candidato **Etrumadenant** (**VIk**), un antagonista dual de los $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$, que actualmente se encuentra en la fase Ib/II de ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico. Tomando este compuesto como referencia, Weiqiang Lu y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el que desarrollaron una serie de análogos estructurales de **Etrumadenant** con actividad dual. En dicho trabajo, los investigadores conservaron la estructura principal de 2-aminopirimidina y exploraron los efectos de la sustitución del residuo en la posición 1 del anillo de triazol por diferentes derivados de naturaleza indólica.[236] En la Figura 1.35 se presentan las estructuras químicas de los mejores ligandos obtenidos en el trabajo.

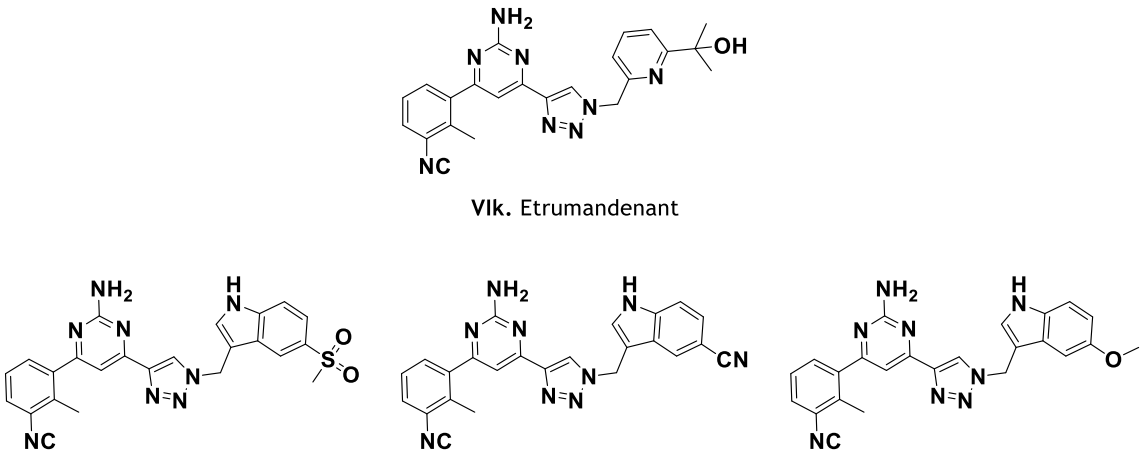


Figura 1.35. Estructuras químicas de los mejores ligandos con actividad dual A_{2A}/A_{2B}.[236] Los datos de actividad biológica pueden verse en la Tabla 1.13.

En la Tabla 1.13 se detallan los resultados de afinidad de los compuestos **IXg**, **IXh** e **IXi** para los receptores A_{2A} y A_{2B}.

Tabla 1.13. Datos de actividad biológica de los antagonistas duales A_{2A}/A_{2B}.[236]

Ligando	**$hA_{2A}R$ IC_{50} (nM)**	**$hA_{2B}R$ IC_{50} (nM)**
Etrumadenant (**VIId**)	7.5 ± 0.2	31.4 ± 1.3
IXg	11.2 ± 0.2	6.4 ± 0.3
IXIh	18.3 ± 0.8	9.7 ± 0.5
IXi	53.5 ± 5.6	44.7 ± 2.0

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2 ENFOQUE, OBJETIVOS Y LÍNEAS GENERALES DE LA TESIS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2.1 ANTECEDENTES

En 2011, Lundbeck Denmark Research publicó un artículo con los resultados de su programa de investigación enfocado en el descubrimiento y desarrollo de nuevos antagonistas del $A_{2A}R$, dirigidos al tratamiento de la enfermedad de Parkinson.[237] En este estudio, se llevó a cabo un cribado exhaustivo de 200,000 compuestos, lo que permitió identificar un farmacóforo con una estructura derivada del sistema 4-carboxamido-*N*-tiazol-2-il-benzamida. A partir de este *hit* inicial, realizaron un extenso trabajo de farmacomodulación, lo que condujo al desarrollo del compuesto **LuAA-41063** (**VII**) (Figura 2.1), estructuralmente identificado como 4-(3,3-dimetilbutanamido)-3,5-difluoro-*N*-(tiazol-2-il)benzamida. Los valores de K_i descritos para **LuAA-41063**, de **5,9 nM** para el receptor A_1 y **410 nM** para el $A_{2A}R$, ponen de manifiesto que, aunque se trata de un compuesto potente, presenta una selectividad limitada entre ambos subtipos. Cabe destacar también que, en este estudio, no se documentaron datos de afinidad de los receptores A_{2B} y A_3. La caracterización preliminar del perfil ADME, concluyó que el compuesto presentaba propiedades farmacocinéticas aceptables. Sin embargo, destacaron la baja solubilidad en medio acuoso (1µg/mL a pH:7.4) de **LuAA-41063**, lo que afectaba negativamente a su biodisponibilidad para administración por vía oral. Este inconveniente comprometía su formulación en forma sólida para dicha vía de administración. Para solventar este inconveniente, los autores desarrollaron y formularon un profármaco de **LuAA-41063**, concretamente **LuAA-47070** (Figura 2.1), que, tras la hidrólisis del éster fosfórico y la posterior eliminación de formaldehído, libera el fármaco activo.[237]

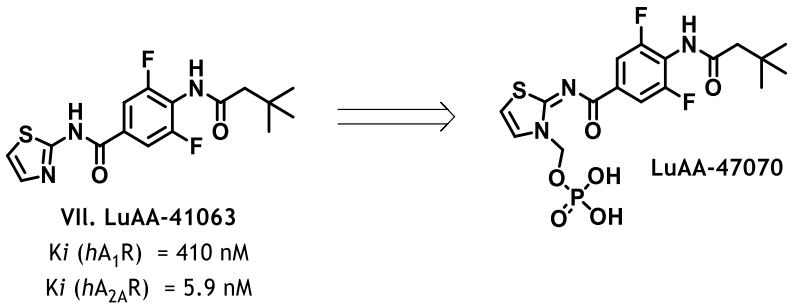


Figura 2.1. Estructura de LuAA-41063 y su profármaco LuAA-47070.[237]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Continuando con el programa de desarrollo, en 2015 se publicó un segundo estudio centrado en la obtención de derivados de **LuAA-41063** (**VII**) con solubilidad acuosa mejorada.[238] Lo que nos hizo suponer que el profármaco **LuAA-47070** no funcionó como esperaban. En este trabajo, el enfoque principal fue identificar la región específica de la estructura que pudiera soportar de manera óptima la introducción de grupos funcionales, con el objetivo de mejorar la solubilidad del compuesto, sin comprometer la potencia ni la selectividad. En los estudios de *docking* observaron que el residuo de aminotiazol de **VII** se encontraba orientado hacia el interior del receptor, mientras que la cadena alquílica se disponía hacia el espacio extracelular. Con estos datos, decidieron realizar las modificaciones sobre el anillo central de benceno y sobre la cadena alquílica lateral, dejando el residuo de aminotiazol intacto. En primer lugar, eliminaron los grupos carbonilos presentes en la estructura, lo que condujo a la obtención de los compuestos **Xa** y **Xb** (Figura 2.2), los cuales experimentaron una pérdida (total) o considerable de la afinidad. En segundo lugar, introdujeron un nitrógeno básico en el anillo de benceno central, lo que dio lugar a los compuestos **Xc** y **Xd** (Figura 2.2), los cuales mostraron también una pérdida parcial o total de afinidad por el $A_{2A}R$. Finalmente, probaron cadenas alquílicas de diferentes longitudes con grupos polares en el extremo. Los mejores compuestos obtenidos fueron **Xf** y **Xe** (Figura 2.2), los cuales, poseían una longitud de 4 carbonos y, aunque mostraron una disminución de la afinidad en comparación con la molécula modelo, se mantuvieron dentro del rango submicromolar, demostrando que la cadena alquílica era la región que mejor toleraba las modificaciones.[238]

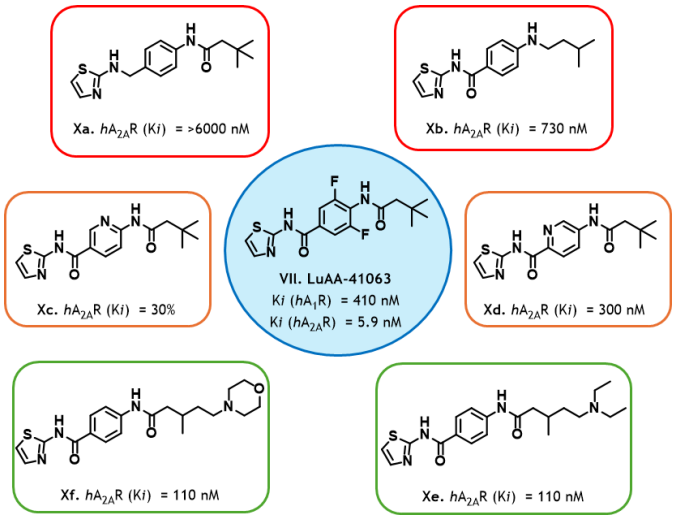


Figura 2.2. Análogos de LuAA-41063 con la solubilidad acuosa mejorada. En rojo, las sustituciones de los grupos carbonilo por metilenos. En naranja, la introducción de un nitrógeno básico en el benceno central. En verde, las modificaciones realizadas en la cadena alquílica lateral.[238]

2.2 OBJETIVOS

Como se ha expuesto en la introducción de esta tesis doctoral, el $A_{2A}R$ se ha validado como un novedoso punto de control inmunitario, consolidándose como una diana terapéutica prometedora en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer. Su activación, inducida por los altos niveles de adenosina presentes en el microambiente tumoral, genera un estado de inmunosupresión que limita significativamente la eficacia de la respuesta inmunitaria antitumoral. En este contexto, el uso de antagonistas selectivos para bloquear el receptor ha demostrado ser una estrategia efectiva para revertir dicha inmunosupresión. Esto permite restaurar funciones clave del sistema inmunitario, como la activación de linfocitos T citotóxicos y células NK, potenciando así su capacidad de atacar y eliminar células tumorales. Esta novedosa aproximación terapéutica abre nuevas posibilidades para el desarrollo de estrategias combinadas más efectivas, y que, potencialmente, pueden mejorar significativamente los resultados en el tratamiento del cáncer.

En el grupo ComBioMed, hemos desarrollado una plataforma de reacciones multicomponente empleada en los últimos 15 años en el descubrimiento y optimización de nuevos fármacos. Así hemos realizado aportaciones al descubrimiento de nuevos ligandos, herramientas farmacológicas y ligandos fluorescentes para diferentes GPCRs (receptores A_1, A_{2A}, A_{2B} y A_3, receptores D_2, D_3, D_4 ,receptores de CB_1 y CB_2 y receptores $5HT_{2A}$, $5HT_{2B}$ y $5HT_{2C}$). Estos fármacos están siendo estudiados para tratar diferentes patologías con alta prevalencia y tratamientos limitados, entre las que se incluyen; la enfermedad de Parkinson, glaucoma, diabetes, esquizofrenia, dolor, inflamación y cáncer.

La presente tesis doctoral tiene como objetivo el diseño, síntesis, optimización y evaluación biológica de nuevos antagonistas del $A_{2A}R$, potentes y selectivos, para su empleo en la inmunoterapia del cáncer. Para ello, hemos tomado como punto de partida el ligando **LuAA-41063**, que ha sido derivatizado y optimizado. Con el fin de alcanzar este objetivo general, la investigación se ha estructurado en torno a tres objetivos específicos, desarrollados de forma independiente en tres capítulos, cada uno de ellos con una finalidad diferenciada. A continuación, se presenta un resumen de los objetivos de cada capítulo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO I (sección 3.1). Este capítulo aborda la exploración inicial de la molécula modelo **LuAA-41063** (**VII**) como prueba de concepto para el diseño racional de nuevos antagonistas del $A_{2A}R$. El objetivo principal es evaluar la tolerancia de la zona próxima a la región extracelular del $A_{2A}R$ mediante la incorporación de espaciadores flexibles, con el fin de identificar sitios de unión secundarios que permitan mejorar la selectividad y afinidad de LuAA-41063. Esta estrategia tiene dos subobjetivos: por un lado, seleccionar los espaciadores más adecuados para extender la molécula hacia el entorno extracelular del $A_{2A}R$, lo que permitirá sentar las bases para el desarrollo futuro de fármacos con actividad dual; y, por otro lado, explorar la utilidad de la reacción Ugi-4CR como una herramienta sintética versátil para modificar el farmacóforo secundario de manera eficiente. Como punto de modificación se eligió la cadena alquílica lateral de **LuAA-41063** (marcada en naranja en el Figura 2.3), ya que, como se detalla en el apartado 2.1 (Antecedentes), esta región presenta una alta tolerancia estructural. El estudio se organizó en tres series (**series I–III**), diferenciadas por la naturaleza química del espaciador incorporado (Figura 2.3).

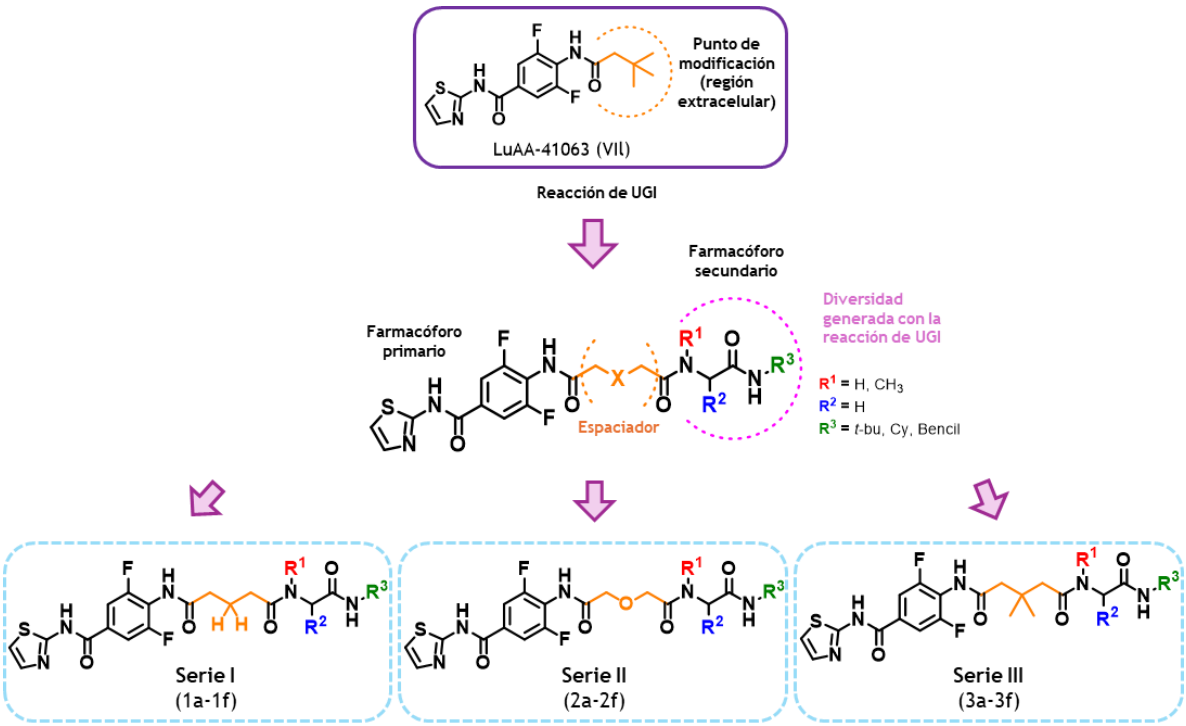


Figura 2.3. Estrategia de diseño y diversidad explorada en el Capítulo I de la tesis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO II (Sección 3.2). Este capítulo amplía y sistematiza los resultados obtenidos en el capítulo anterior. Nos propusimos explorar nuevos espacios de diversidad y optimizar la potencia y la selectividad por el $A_{2A}R$ (Figura 2.4). Una vez identificado el espaciador óptimo, se procedió a una exploración más profunda del farmacóforo secundario, generado mediante la reacción de Ugi. Para ello, se diseñaron dos series de compuestos (**Serie IV-V**). La **Serie IV** se enfocó en incrementar la diversidad estructural en las posiciones R^1, R^2 y R^3, con el fin de establecer relaciones estructura-actividad, analizar los modos de unión e identificar nuevas interacciones clave en la zona próxima a la región extracelular del $A_{2A}R$. Por otra parte, con la Serie **V**, se buscó introducir una piperazina en la estructura con el objetivo de aumentar la diversidad estructural y dotarla de mayor exclusividad, además de mejorar la solubilidad de los ligandos y optimizar su perfil farmacocinético. Los compuestos más prometedores de ambas series fueron seleccionados para su evaluación biológica *in vitro*, con el objetivo de determinar su potencial terapéutico como fármacos antiproliferativos e inmunomoduladores en el contexto del cáncer.

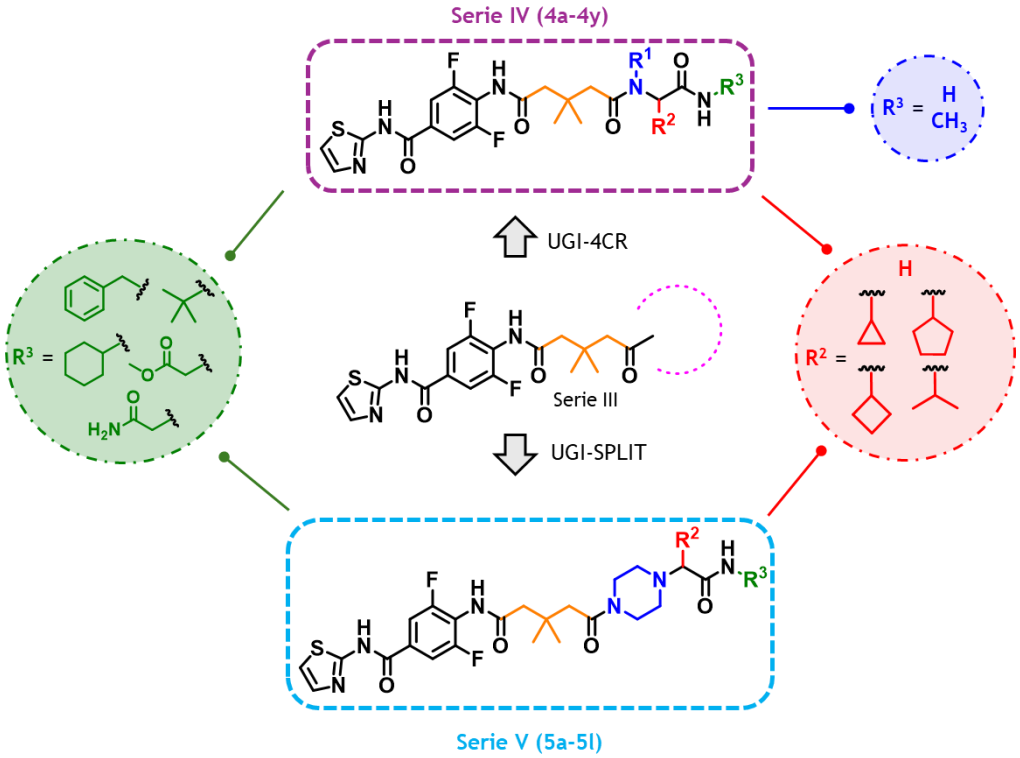


Figura 2.4. Estrategia de diseño y diversidad empleada para la exploración exhaustiva de la molécula modelo en base a los resultados del Capítulo I. En color morado la serie IV sintetizada mediante la reacción de Ugi-4CR. En color azul cielo la Serie V sintetizada mediante la reacción de Ugi-Split.

CAPÍTULO III (Sección 3.3). En este capítulo se aborda el diseño, la síntesis y la caracterización de nuevos fármacos multidiana como candidatos en inmuno-oncología. Los objetivos aquí planteados se fundamentan en varias observaciones derivadas de los capítulos anteriores: a) la robustez del farmacóforo primario [3,5-difluoro-*N*-(tiazol-2-il)benzamida]; b) la idoneidad del espaciador empleado para explorar la región extracelular del $A_{2A}R$; c) la versatilidad de la reacción de Ugi para ensamblar farmacóforos secundarios; y d) la aparición de una afinidad incipiente por el $A_{2B}R$ en varios compuestos de la Serie IV. A partir de estas observaciones, el objetivo principal fue desarrollar fármacos duales que combinen el farmacóforo primario ($A_{2A}R$) con nuevos elementos estructurales capaces de interactuar con una segunda diana relevante en el contexto del cáncer. Para ello nos planteamos dos estrategias principales: 1) potenciar la afinidad por el $A_{2B}R$ (diseño de fármacos duales A_{2A}/A_{2B}), y 2) incorporar un farmacóforo típico de la enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1), generando fármacos duales A_{2A}/PARP1. En base a esos objetivos se diseñaron dos nuevas series de compuestos: **Serie VI**: fármacos duales A_{2A} – A_{2B}, obtenidos mediante una estrategia de *merging* (Figura 2.5); y **Serie VII**: fármacos duales A_{2A} – PARP1, desarrollados mediante la estrategia de *linking* (Figura 2.5). En este capítulo se presentan el diseño de los compuestos, los métodos sintéticos empleados, su caracterización farmacológica y el análisis de las relaciones estructura-actividad.

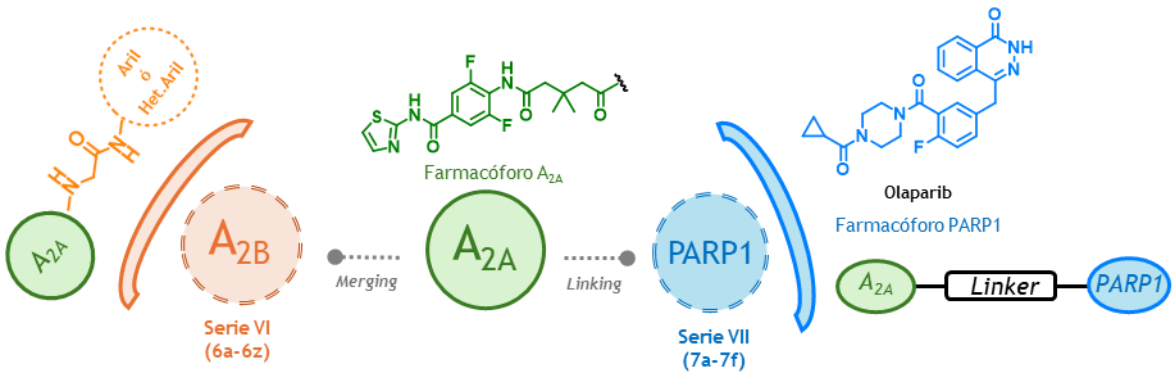


Figura 2.5. Estrategia de diseño para los compuestos duales de las series VI-VII pertenecientes al Capítulo III.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.1 CAPÍTULO I

3.1.1 Diseño de los ligandos

Como se indicó anteriormente, el objetivo principal de este capítulo fue llevar a cabo una prueba de concepto, utilizando como referencia el ligando modelo **LuAA-41063** (**VII**), con el propósito de diseñar nuevos antagonistas del $A_{2A}R$ más potentes y selectivos. Los nuevos ligandos exploran interacciones en regiones adicionales del receptor, y sientan las bases para el desarrollo de fármacos con actividad dual y otras herramientas farmacológicas. Con este fin, se planteó la modificación estructural del ligando modelo mediante la incorporación de espaciadores lineales flexibles y un farmacóforo secundario unido en su extremo (Figura 3.1). La introducción del farmacóforo secundario debería de jugar un papel clave para conseguir una mejora de la selectividad, afinidad y solubilidad de los derivados.

Los nuevos compuestos fueron diseñados a partir de modelos computacionales y de las evidencias experimentales disponibles sobre el modo de unión de **LuAA-41063** (**VII**) en complejo con el $A_{2A}R$. El enfoque de diseño adoptado consistió en mantener la interacción del ligando con el sitio ortostérico del $A_{2A}R$ (farmacóforo primario) e incorporar un espaciador en el extremo opuesto de la molécula. Tal como se muestra en la Figura 3.1, el punto de anclaje seleccionado para la introducción del espaciador flexible fue la cadena alquílica del ligando, debido a su orientación hacia la zona central del $A_{2A}R$ y a su tolerancia estructural (previamente observada). El estudio se organizó en tres series (**I–III**), diferenciadas por la naturaleza química de los espaciadores, que incorporan (en su extremo terminal) un grupo α-acilaminoacetamida (que ejerce las funciones de farmacóforo secundario) y que se ensambla mediante la reacción de U-4CR.

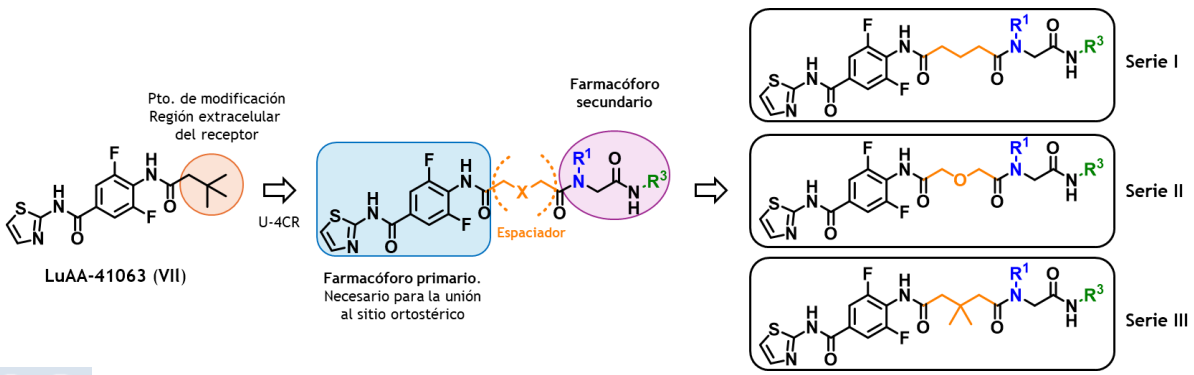
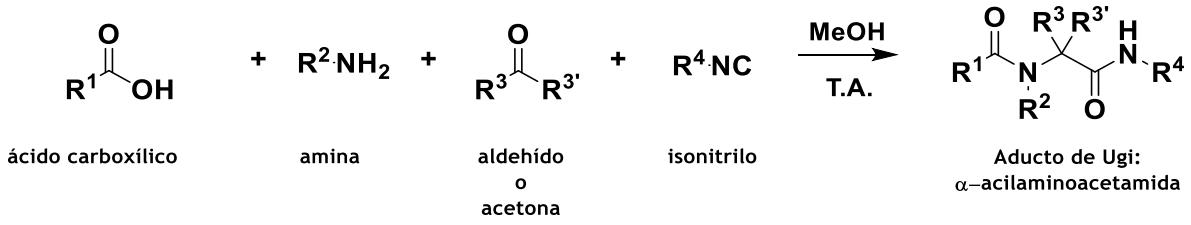


Figura 3.1. Estrategia de diseño empleada para la obtención de nuevos derivados de LuAA-41063.

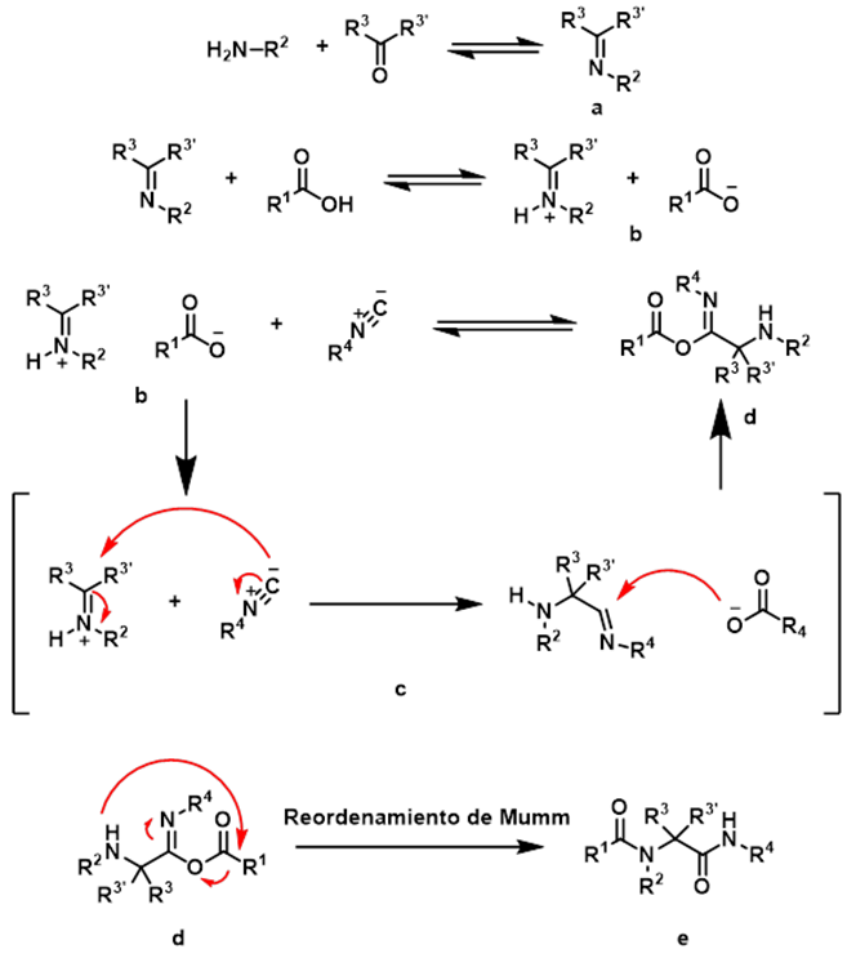
La reacción de U-4CR implica la combinación de cuatro componentes: un ácido carboxílico, una amina, un aldehído o cetona, y un isonitrilo, obteniéndose productos con una estructura característica de α-acilaminoacetamida (Esquema 3.1). Esta metodología sintética ofrece una vía eficiente y versátil para la generación rápida de quimiotecas de derivados de **LuAA-41063**, lo cual facilita una exploración sistemática de la REA y permite la identificación rápida de nuevos antagonistas del $A_{2A}R$.



Esquema 3.1. Representación de la reacción de U-4CR.

El Esquema 3.2 muestra el mecanismo más aceptado de la reacción multicomponente de U-4CR. El proceso se inicia con la condensación entre el componente carbonílico (aldehído o cetona) y una amina primaria, lo que da lugar a la formación de una imina (a). A continuación, el ácido carboxílico protona el nitrógeno de la imina, generando un ion iminio (b). Esta protonación es un paso clave, ya que la baja nucleofilia del isonitrilo requiere un centro altamente electrofílico (ion iminio) para que pueda producirse la adición nucleofílica. La adición del isonitrilo al ion iminio conduce a la formación de un α-aducto (c), el cual presenta un centro nitrilo fuertemente electrofílico. Este centro es atacado por el ion carboxilato, dando lugar a un intermedio (d) estructuralmente análogo a un anhídrido de ácido, en el que un oxígeno ha sido reemplazado por un grupo N–R. Esta similitud estructural justifica su comportamiento como agente acilante. El átomo de nitrógeno de la amina, al ser el nucleófilo más próximo, participa en una acilación intramolecular que conduce al producto final de la reacción de Ugi. Este paso se conoce como reordenamiento de Mumm y constituye la etapa final e irreversible del proceso. Cabe destacar que todos los pasos de esta secuencia son reversibles, excepto el reordenamiento de Mumm. Esta irreversibilidad favorece decisivamente la formación del producto final, una α-acilaminoacetamida altamente estable (e), que desplaza el equilibrio hacia su formación.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Esquema 3.2. Representación del mecanismo más aceptado para la reacción de U-4CR.

Prueba de concepto basada en la reacción de Ugi-4CR (series I-III)

Uno de los objetivos de este capítulo es validar la estrategia de síntesis basada en la reacción de U-4CR para la obtención de nuevos derivados del ligando modelo **LuAA-41063** (**VII**). El empleo de esta reacción nos permite, en un solo paso sintético, la incorporación del espaciador seleccionado (procedente del ácido carboxílico), así como el farmacóforo secundario (α-acilaminoacetamida). Esta prueba de concepto constituye un paso fundamental, ya que permite, por una parte, ampliar la exploración estructural preliminar (la cual será realizada en el Capítulo II) y, por otra, establecer los cimientos para el diseño racional de herramientas farmacológicas, tales como ligandos fluorescentes y nuevas familias de fármacos hetero-bivalentes. En este último caso, se plantea la conjugación con otros farmacóforos de interés terapéutico, orientada al desarrollo de compuestos duales con aplicación en el ámbito oncológico, aspecto que se tratará en profundidad en el Capítulo III.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para esta prueba de concepto, se diseñó una colección de **18 derivados**, distribuidos en tres series (**I-III**). Estos compuestos presentan tres puntos de diversidad estructural (Figura 3.2): el conector central del espaciador (X, en naranja), y los sustituyentes R^1 (azul) y R^3 (verde). El espaciador varía en cada serie, X = CH_2 para la **serie I**, X = O para la **serie II**, y X = $C(CH_3)_2$ para la **serie III** (Figura 3.2).

Los grupos R^1 (hidrógeno o metilo) y R^3 (bencilo, *terc*-butilo y ciclohexilo) se mantuvieron constantes para cada serie. Estas variaciones estructurales introducidas en el farmacóforo secundario, aunque sencillas, fueron diseñadas para modificar propiedades clave como la flexibilidad conformacional, la lipofilia, la solubilidad y el volumen estérico de los compuestos finales, lo que permite evaluar de manera preliminar la tolerancia del $A_{2A}R$ a dichos factores. Como se discutirá más adelante, estas variaciones estructurales tienen un impacto significativo sobre el perfil adenosinérgico de los compuestos obtenidos.

La estructura general de los compuestos de las tres series, y los elementos de diversidad introducidos (en X y en el farmacóforo secundario) se muestran en la Figura 3.2.

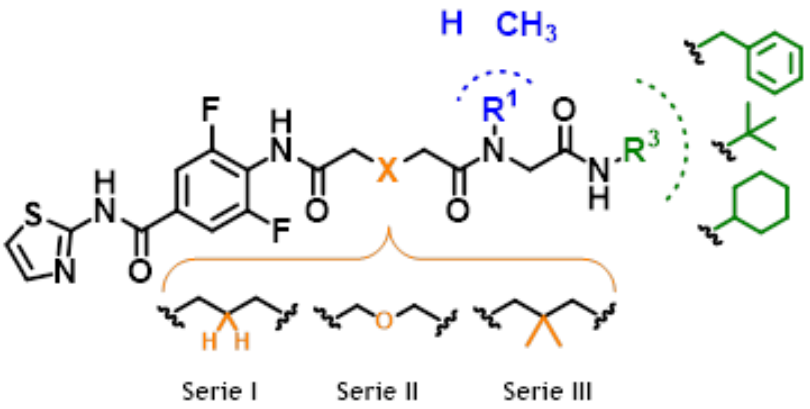


Figura 3.2. Estructura general de los ligandos y puntos de diversidad explorados en este estudio.

3.1.2 Química

Para abordar la síntesis de los ligandos diseñados en este capítulo nos planteamos una estrategia sintética inspirada en la aproximación originalmente publicada por los investigadores de la compañía Lundbeck.[237] Ello requirió preparar los precursores ácidos con el farmacóforo integrado (**A16-A18**). Los precursores utilizados para la prueba de concepto, basada en la reacción de U-4CR, han sido seleccionados estratégicamente con el fin de examinar los determinantes estructurales que rigen el perfil de afinidad de los antagonistas A_{2A} diseñados. La Figura 3.3muestra los precursores empleados en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral que, a excepción de los ácidos carboxílicos, son todos comerciales.

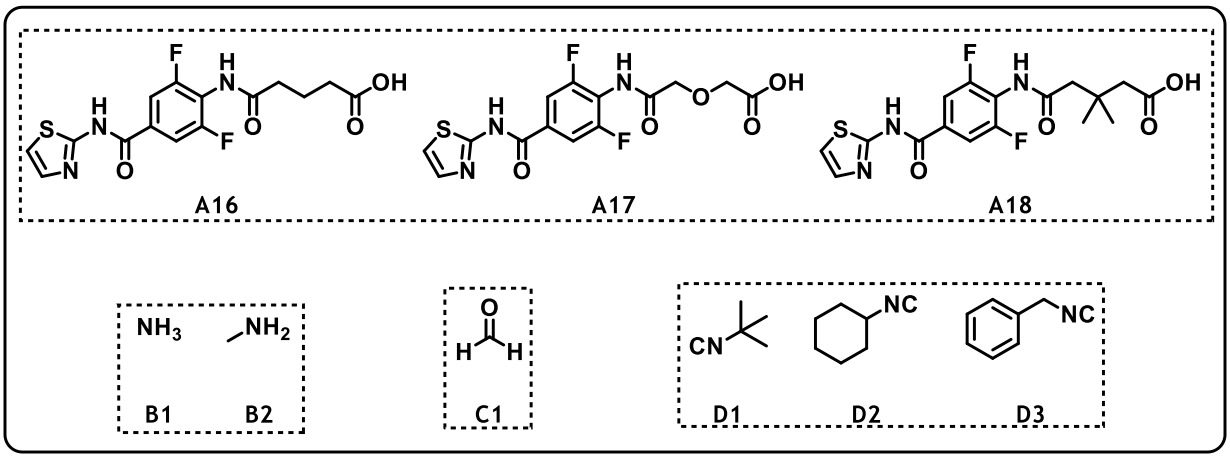
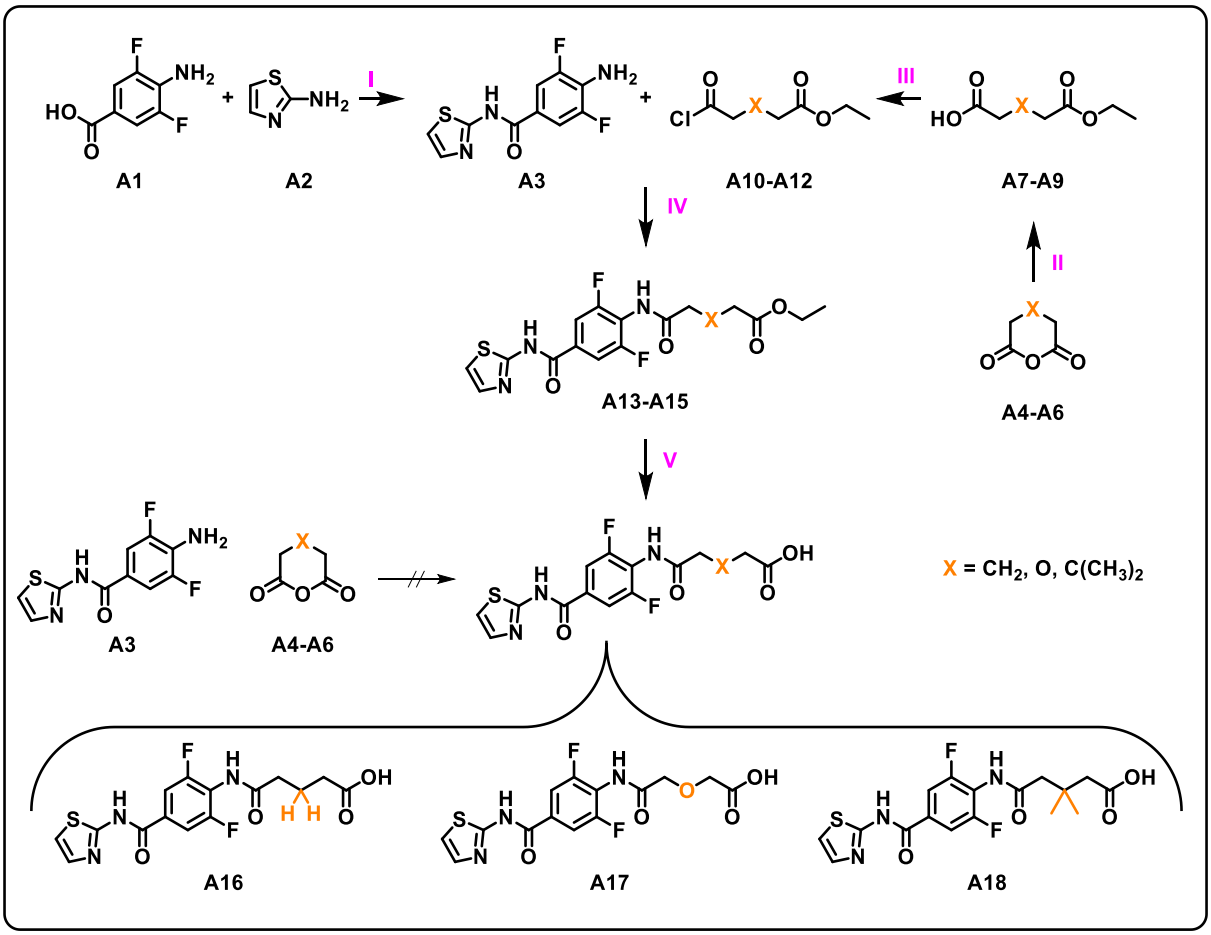


Figura 3.3. Precursores sintéticos utilizados en el Capítulo I. A: ácidos carboxílicos, B: aminas, C: aldehídos, y D: isonitrilos.

El diseño de los precursores ácidos (Figura 3.3, compuestos A16–A18) se basó en el análisis del modo de unión del ligando modelo en su interacción con el $A_{2A}R$. Para emplear la reacción de U-4CR como herramienta exploratoria, fue necesario funcionalizar el espaciador flexible con un grupo ácido carboxílico. Para ello se desarrolló la ruta sintética que se muestra en el Esquema 3.3 y que se describe brevemente a continuación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Esquema 3.3. Ruta sintética empleada para la obtención de los ácidos carboxílicos empleados como precursores para la reacción de Ugi-4CR. I) HOBT, EDC, DIPEA, en DCM; T.A., 24 h. II) DMAP, DIPEA en EtOH; 90 ºC, 12 h. III) $SOCl_2$ en Tolueno; 120 ºC, 2 h. IV) Py en DCE; T.A., 12 h. V) NaOH (2M) en 1,4-dioxano; 90 ºC, 3 h.

El **paso I** consiste en el acoplamiento entre el ácido 4-amino-3,5-difluorobenzoico (**A1**) y el 2-aminotiazol (**A2**). Para ello, se empleó como agente de activación la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), utilizándose *N*,*N*-diisopropiletilamina (DIPEA) como base y diclorometano (DCM) como disolvente. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 24 horas, obteniéndose como producto la 4-amino-3,5-difluoro-*N*-(tiazol-2-il)benzamida (**A3**), con un rendimiento del 72 %.

Debido a la baja nucleofilia del grupo amino de la 4-amino-3,5-difluoro-*N*-(tiazol-2-il)benzamida (**A3**), atribuida principalmente al efecto inductivo de los átomos de flúor adyacentes y al impedimento estérico, no fue posible efectuar su reacción directa con el correspondiente anhídrido (**A4-A6**). Por esta razón, se optó por realizar primero la apertura del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

correspondiente anhídrido (**II**) (alcoholísis) y, posteriormente, su conversión al cloruro de ácido (**III**).

En el **paso II**, para la apertura de los anhídridos (**A4-A6**), se utilizó 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador, DIPEA como base y etanol como disolvente. La reacción se realizó a 90 °C durante 12 horas, obteniéndose los productos **A7-A9** con un rendimiento de entre el 83-87 %.

En el **paso III**, para la conversión de los ácidos (**A7-A9**) en sus cloruros de ácido, se disolvieron en tolueno, se agregó cloruro de tionilo ($SOCl_2$) y la mezcla se calentó a 120 °C durante 2 horas, obteniéndose los productos **A10-A12** con un rendimiento cuantitativo. La eliminación de los disolventes y reactivos mediante evaporación a presión reducida permitió obtener los crudos que se emplearon en el siguiente paso sintético sin purificación adicional.

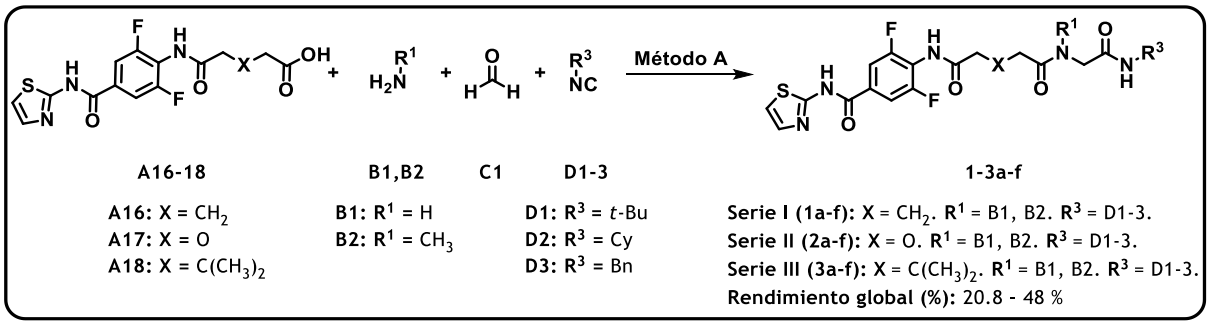
En el **paso IV**, se realizó una reacción de adición-eliminación entre la amina (**A3**) y los cloruros de ácido correspondientes (**A10-A12**), se empleó piridina (Py) como base y dicloroetano (DCE) como disolvente, se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 12 horas obteniendo los correspondientes ésteres etílicos (**A13-A15**) con un rendimiento del 79-81 %.

Por último, en el **paso V** se realizó la hidrólisis (en medio básico) de los ésteres (**A13-A15**), para ello se disolvieron en 1,4-dioxano y se tratan con NaOH (2M) a 90 ºC durante 3 horas, obteniéndose los correspondientes ácidos carboxílicos (**A16-A18**) con un rendimiento de entre el 93-95 %.

En el apartado 5 (Experimental Section), se proporciona una descripción detallada de los métodos sintéticos empleados, así como el equipamiento empleado en su caracterización y los datos estructurales, espectroscópicos y analíticos que soportan la identidad de todos los compuestos preparados.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para la síntesis de los 18 derivados (**1a-f-3a-f**) de LuAA-41063 preparados en las series I-III se empleó la ruta sintética representada en el Esquema 3.4la cual se detallará a continuación.



Esquema 3.4. Ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos 1a-f-3a-f pertenecientes al Capítulo I basada en la reacción de Ugi-4CR. Método A: MeOH, T.A, 48 h.

Los derivados propuestos (**1a-f, 3a-f**) se obtuvieron haciendo reaccionar los precursores ácidos (**A16**, **A17** y **A18**), con una amina [amoníaco (**B1**) o metilamina (**B2**)], con formaldehído (**C1**)] y el correspondiente isonitrilo [*terc*-butil-isonitrilo (**D1**), ciclohexil-isonitrilo (**D2**) o bencil-isonitrilo (**D3**)]. La reacción se realizó en MeOH y transcurrió bajo agitación orbital a temperatura ambiente durante 48 horas (Método A). Tras verificar la finalización de la reacción (mediante TLC), el disolvente se evaporó a presión reducida, obteniéndose un residuo oleoso que posteriormente se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice, utilizando una mezcla de MeOH:DCM en gradiente. La reacción de Ugi-4CR permitió obtener los productos deseados con rendimientos entre el 20.8 y el 48 %. La pureza de todos los compuestos sintetizados se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), obteniéndose valores superiores al 95%.

En el apartado 5 (Experimental Section), se proporciona una descripción detallada de los métodos sintéticos empleados, así como el equipamiento empleado en su caracterización y los datos estructurales, espectroscópicos y analíticos que soportan la identidad de todos los compuestos preparados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A continuación, se presenta la estructura de los 18 derivados de LuAA-41063 sintetizados en este capítulo **1a-f-3a-f**.

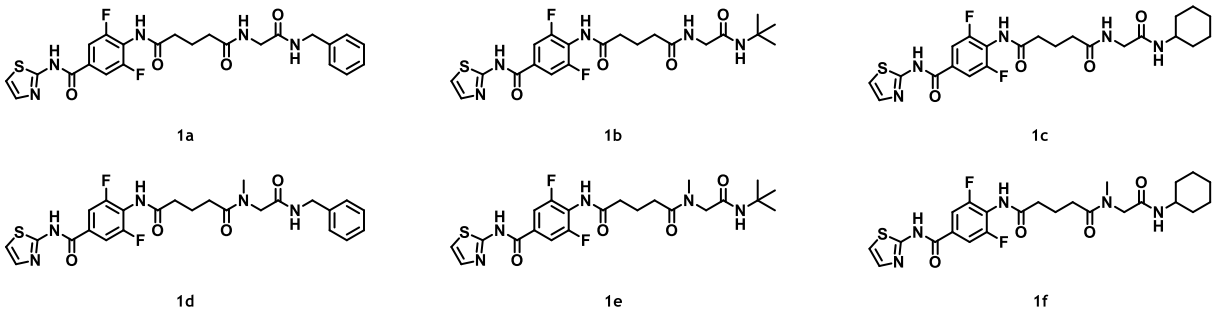


Figura 3.4. Estructura de los compuestos pertenecientes a la Serie I.

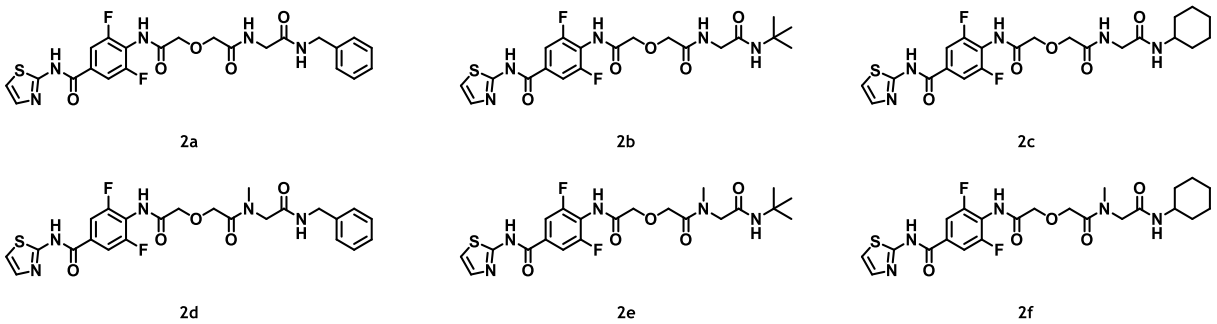


Figura 3.5. Estructura de los compuestos pertenecientes a la Serie II.

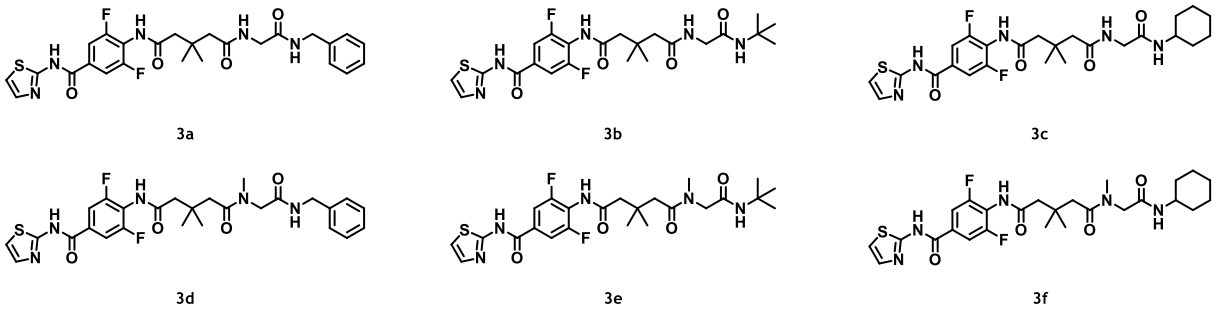


Figura 3.6. Estructura de los compuestos pertenecientes a la Serie III.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A continuación, a modo de ejemplo, se muestran espectros de RMN representativos de los compuestos sintetizados en las series I-III.

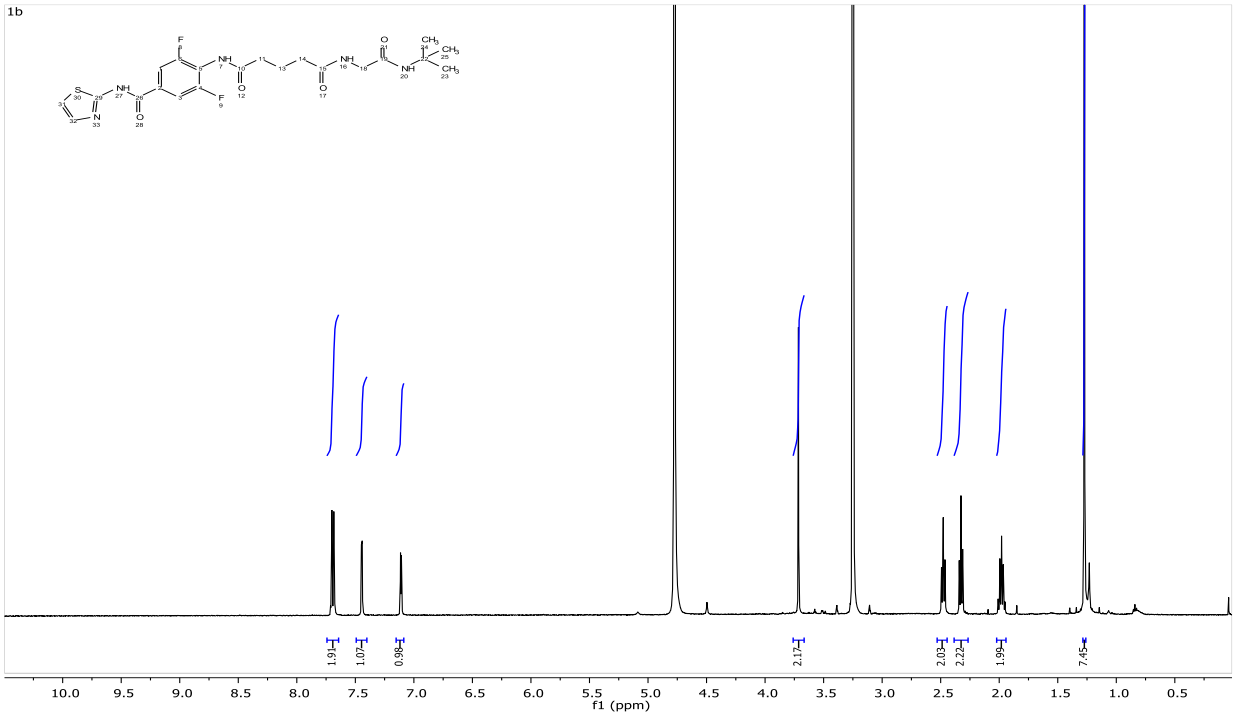


Figura 3.7. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto **1b** en MeOD (300 MHz) (serie I).

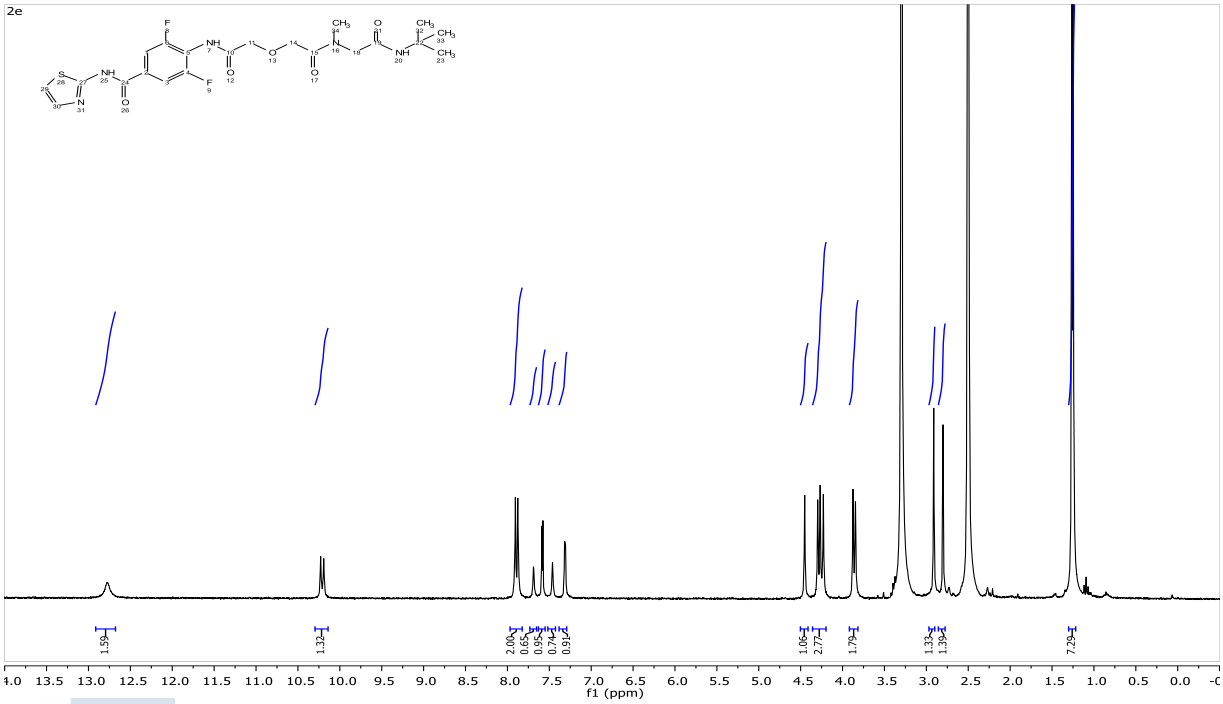


Figura 3.8. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto **2e** en DMSO-d_6 (500 MHz) (serie II).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

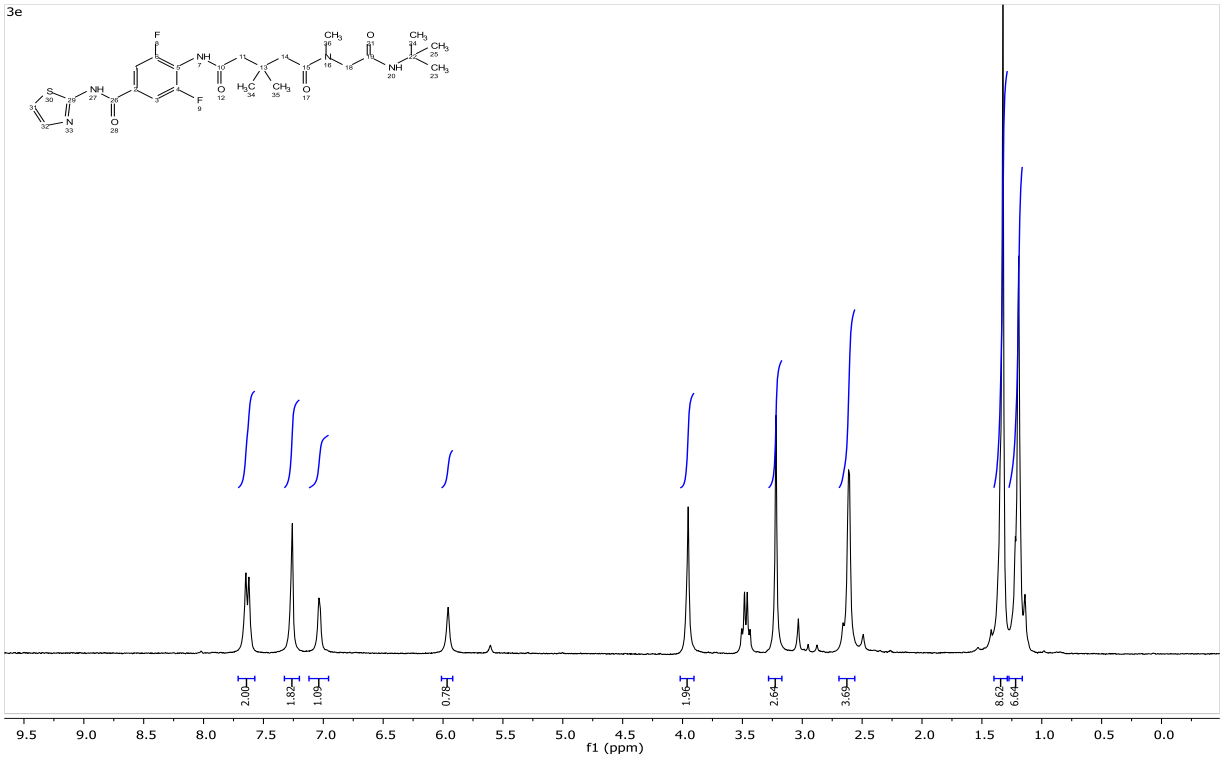


Figura 3.9. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto **3e** en $CDCl_3$ (300 MHz) (serie III).

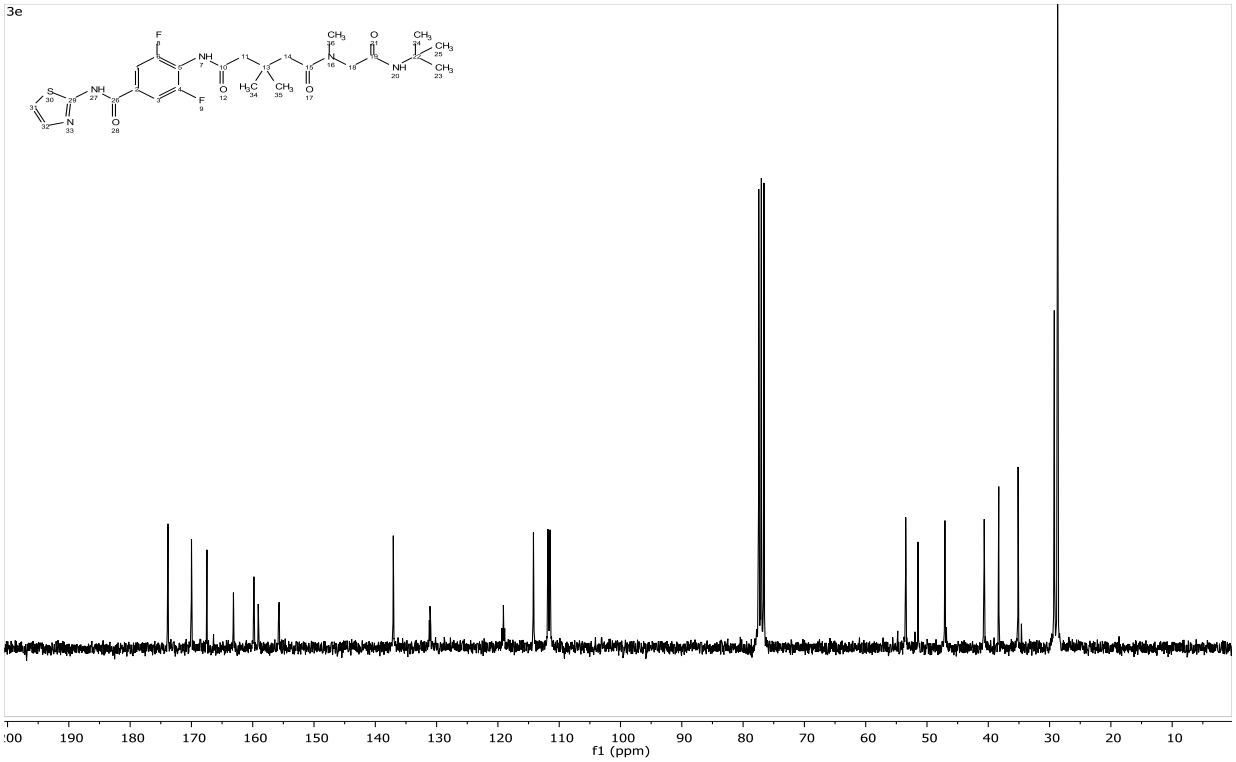


Figura 3.10. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **3e** en $CDCl_3$ (300 MHz) (serie III).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.3 Evaluación farmacológica

3.1.3.1 Ensayos de afinidad

El perfil adenosinérgico (afinidad y selectividad) de los 18 nuevos derivados de la 3,5-difluoro-*N*-(tiazol-2-il)benzamida (**1a-f- 3a-f**), de las **series I-III** fue evaluado *in vitro* mediante ensayos competitivos con radioligandos en los cuatro subtipos de receptores de adenosina (A_1R, $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ y A_3R). La evaluación farmacológica fue realizada en el grupo BioFarma (USC) en colaboración con los profesores María I. Loza y José Brea. Para estos estudios, los receptores de adenosina humanos fueron expresados en líneas celulares transfectadas, utilizando, células de ovario de hámster chino (CHO) para A_1R, células de carcinoma epitelial humano (HeLa) para $A_{2A}R$ y A_3R y células de riñón embrionario humano (HEK-293) para $A_{2B}R$. Los radioligandos empleados en los ensayos de unión fueron: [^{3}H]DPCPX para A_1R y $A_{2B}R$; [^{3}H]NECA para A_3R y [^{3}H]ZM241385 para $A_{2A}R$. Todos los compuestos fueron inicialmente evaluados a 1 μM y los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 3.1.

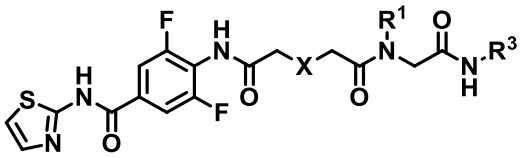
Los datos de afinidad se presentan como K_i ± SEM (nM, n = 3), obtenidos mediante ajuste por regresión no lineal utilizando el software Prism 10.0 (GraphPad, San Diego, CA). Para aquellos compuestos que no desplazaron completamente el radioligando (<60 %), debido a su baja afinidad o solubilidad, los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la unión específica a 1 μM (n = 2, promedio).

Como control interno, en esos estudios empleamos diferentes antagonistas ($A_{2A}R$) de referencia (**ZM241385, LuAA-41063 y Etrumadenant**) que fueron evaluados simultáneamente y bajo los mismos protocolos experimentales que nuestros ligandos. Los datos obtenidos para esos fármacos se presentan en las correspondientes tablas.

En el apartado 5 (Experimental section) se proporciona una descripción detallada de los protocolos experimentales y estadísticos empleados para la determinación de la afinidad de los compuestos en cada subtipo de receptor de adenosina.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.1. Estructura general y datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina de los compuestos pertenecientes a las series I-III (**1a-f-3a-f**).



Compuesto	X	R^1	R^3	K_i (nM) o % a 1 µM			
				hA_1[a)]	hA_{2A}[b)]	hA_{2B}[c)]	hA_3[d)]
1a	CH_2	H	Bn	2%	104 ± 6	25%	13%
1b	CH_2	H	*t*-Bu	25%	112 ± 3	25%	13%
1c	CH_2	H	Cy	2%	163 ± 5	18%	18%
1d	CH_2	CH_3	Bn	14%	60.8 ± 2.2	35%	41%
1e	CH_2	CH_3	*t*-Bu	15%	123 ± 4	22%	7%
1f	CH_2	CH_3	Cy	3%	53.7 ± 2.3	28%	40%
2a	O	H	Bn	28%	615 ± 12	16%	32%
2b	O	H	*t*-Bu	3%	43%	3%	45%
2c	O	H	Cy	4%	36%	1%	4%
2d	O	CH_3	Bn	8%	123 ± 4	13%	15%
2e	O	CH_3	*t*-Bu	5%	30%	1%	6%
2f	O	CH_3	Cy	13%	55%	2%	21%
3a	$C(CH_3)_2$	H	Bn	40%	24.8 ± 1.2	307 ± 11	11%
3b	$C(CH_3)_2$	H	*t*-Bu	6%	23.4 ± 1.3	18%	3%
3c	$C(CH_3)_2$	H	Cy	18%	45.7 ± 2.9	12%	18%
3d	$C(CH_3)_2$	CH_3	Bn	21%	17.3 ± 1.5	28%	8%
3e	$C(CH_3)_2$	CH_3	*t*-Bu	25%	41.9 ± 2.1	22%	17%
3f	$C(CH_3)_2$	CH_3	Cy	13%	42.4 ± 3.5	33%	31%
LuAA-41063*	-	-	-	410	4.9	-	-
LuAA-41063**	-	-	-	344 ± 12	5.2 ± 0.6	321 ± 8	4%
Etrumadenant	-	-	-	65.0 ± 4	1.50 ± 0.3	2.00 ± 0.9	489 ± 10
ZM241385	-	-	-	683 ± 4	1.9 ± 0.1	65.7 ± 1	863 ± 4

a) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células CHO humanas expresado como K*i* (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). b) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol en células HeLa humanas expresado como K*i* (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). c) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células HEK-293 humanas expresado como K*i* (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). d) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]NECA en células HeLa humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). * Datos de afinidad extraídos de la referencia bibliográfica 237. **Datos de afinidad experimentales obtenidos en nuestros ensayos.

3.1.4 Análisis de la relación estructura-actividad

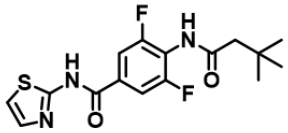
En este apartado se analizará cualitativa y cuantitativamente el perfil adenosinérgico de los nuevos compuestos **1a-f-3a-f**, en términos de afinidad y selectividad, considerando los siguientes aspectos estructurales: **1)** el impacto de la elongación de la cadena alquílica, **2)** el efecto de la naturaleza del espaciador (grupo X) y **3)** la influencia del patrón de sustitución en el grupo α-acilaminoacetamida (R^1 y R^3). Para ello, se usarán los datos farmacológicos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

recogidos en la Tabla 3.1. Los valores de afinidad de los compuestos han sido expresados como constantes de inhibición (K_i).

Con fines comparativos, también hemos sintetizado y evaluado el ligando de referencia **LuAA-41063** (**VII**) bajo las mismas condiciones experimentales. Cabe recordar que los datos publicados para **LuAA-41063** (**VII**) solo describen su afinidad por los receptores A_1 y A_{2A} (K_i = 410 nM y K_i = 4.9 nM, respectivamente). La evaluación farmacológica del lote de **LuAA-41063** preparado en nuestro laboratorio (frente a los cuatro subtipos de receptores de adenosina) permitió completar la caracterización de su perfil adenosinérgico.

En la Figura 3.11 se muestra una comparación de los resultados publicados por Lundbeck[237] con los obtenidos en nuestros ensayos para el compuesto de referencia. Estos estudios confirmaron la afinidad previamente descrita frente al $A_{2A}R$ y A_1R. Además, nuestro ensayo reveló una afinidad significativa por el $A_{2B}R$ (K_i $A_{2B}R$= 321 nM), que no había sido descrita anteriormente, además de la ausencia de afinidad por el A_3R. Estos datos evidencian que **LuAA-41063** (**VII**) está lejos de ser un ligando selectivo por el $A_{2A}R$ y que existe un importante margen para mejorar su perfil de selectividad mediante modificaciones estructurales. Por otro lado, la afinidad emergente hacia el $A_{2B}R$, descubierta en este estudio, sugiere un potencial interés de este farmacóforo en el diseño de antagonistas duales A_{2A}/A_{2B}, una estrategia terapéutica de creciente relevancia en el contexto de la inmunoterapia del cáncer.[236]



LuAA-41063 (VII)

Datos farmacológicos bibliográficos	Datos farmacológicos experimentales
K_i (nM) $hA_{2A}R$ = 4.9 nM	**K_i (nM) $hA_{2A}R$ = 5.2 nM**
K_i (nM) hA_1R = 410 nM	K_i (nM) hA_1R = 344 nM
K_i (nM) $hA_{2B}R$ = N.D.	K_i (nM) $hA_{2B}R$ = 321 nM
K_i (nM) hA_3R = N.D.	K_i (%) hA_3R = 4%

Figura 3.11. Comparación de los datos farmacológicos bibliográficos *vs* experimentales del ligando LuAA-41063.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Impacto de la elongación de la cadena alquílica

Una vez establecido el perfil adenosinérgico (completo y revisado) del fármaco de referencia, es posible evaluar de forma rigurosa el impacto de las modificaciones estructurales introducidas. Para estos estudios y por coherencia metodológica, empleamos los datos farmacológicos generados en el marco de este proyecto (Tabla 3.1). Dado que **LuAA-41063** ha mostrado un perfil de selectividad bastante limitado, resulta fundamental analizar no solo los cambios de afinidad por el $A_{2A}R$, sino también la evolución de su interacción con los demás subtipos de receptores de adenosina (selectividad), especialmente A_1 y A_{2B}.

La comparación de los valores de K_i frente al $A_{2A}R$ (Tabla 3.1) permite un primer análisis del impacto estructural asociado a la elongación de la cadena. Como era previsible en esta fase inicial de prueba de concepto, la extensión de la cadena lateral de **LuAA-41063** produce una disminución en la afinidad por el $A_{2A}R$, con reducciones del orden de 4 a 32 veces. Este efecto es altamente dependiente de la naturaleza del grupo X del espaciador y de los sustituyentes en R^1 y R^3. Asimismo, el análisis de los datos de afinidad revela que estas modificaciones tienen un impacto significativo en el perfil de selectividad. En la mayoría de los casos, la inclusión de los nuevos elementos estructurales conduce a una clara mejora en la selectividad, con una reducción notable en la afinidad por los receptores A_1 y A_{2B}. La principal excepción a esta tendencia es el compuesto **3a**, que presenta un incipiente perfil dual $A_{2A}R/A_{2B}R$, con valores de K_i de 24.8 nM y 307 nM, respectivamente.

A la vista de los datos de afinidad obtenidos (Tabla 3.1), nos planteamos si las modificaciones estructurales introducidas podrían haber afectado la funcionalidad de los nuevos compuestos. Para abordar esta cuestión, se seleccionó un compuesto representativo (**3d**), que fue evaluado en un ensayo funcional preliminar. Los resultados confirmaron que el compuesto mantiene su perfil antagonista del $A_{2A}R$, con un valor de K_B de 29.3 ± 1.6 nM.

Impacto de la naturaleza del grupo X del espaciador

Para una evaluación rápida e intuitiva de la influencia del grupo X del espaciador sobre la afinidad de los ligandos, los valores de K_i de los compuestos se han pasado a escala logarítmica (pK_i). En la Figura 3.12 se muestra un diagrama de barras donde se representan los valores de pK_i de los compuestos de las **series I-III** y que permite comparar de forma efectiva las variaciones en la afinidad con el ligando de referencia. Para aquellos compuestos que no han

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

logrado desplazar el 60% del radioligando empleado en los ensayos de competición (compuestos, **2b**, **2c**, **2e** y **2f**) se les ha asignado un valor de $pK_i = 5$.

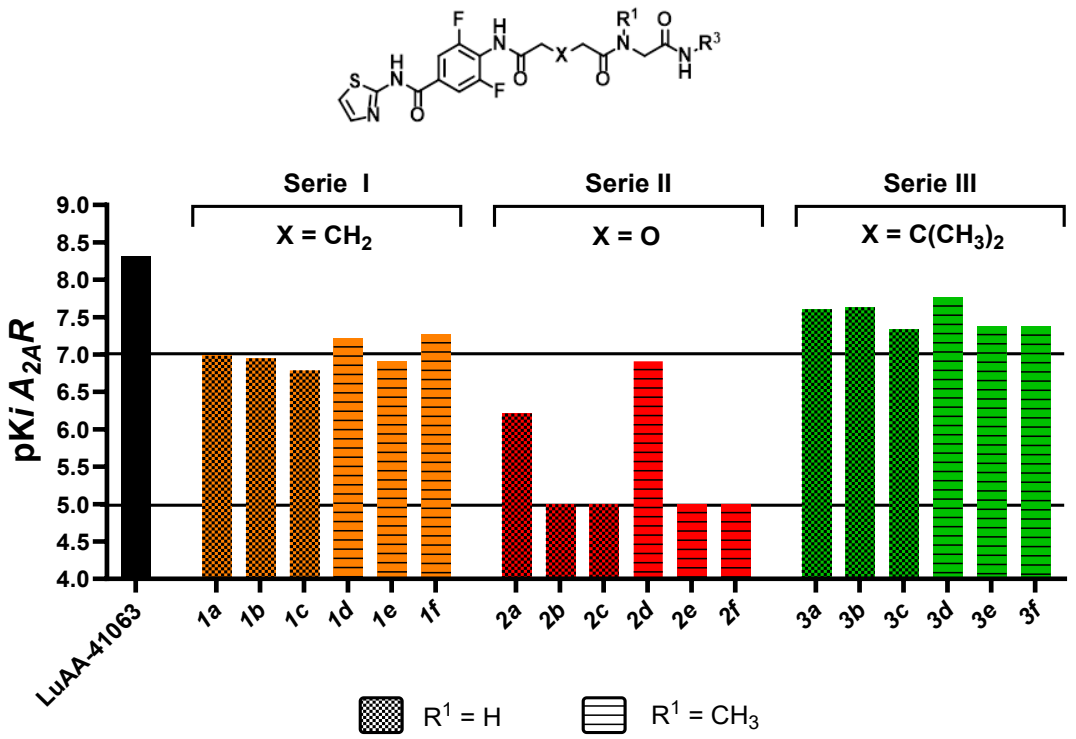


Figura 3.12. Diagrama de barras evaluando la influencia del espaciador utilizado en el perfil adenosinérgico de los compuestos.

En la serie I (**1a–f**) el grupo X es un grupo metileno, lo que convierte al espaciador en una cadena de propilo. Los compuestos de esta serie conservan la afinidad por el $A_{2A}R$, con valores de K_i moderados que oscilan entre 53.7 y 163 nM (Tabla 3.1), aunque acompañados de una pérdida de afinidad significativa (10-32 veces) respecto al ligando de referencia (Figura 3.13). No obstante, la introducción del espaciador ha permitido la obtención de ligandos muy selectivos frente a los demás subtipos de receptores de adenosina (Tabla 3.1). El compuesto más destacado de la serie, **1f** (K_i $A_{2A}R$ = 57.3 nM), presenta una afinidad aproximadamente 10 veces menor que LuAA-41063, pero muestra una selectividad altísima por el $A_{2A}R$ (Figura 3.13).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

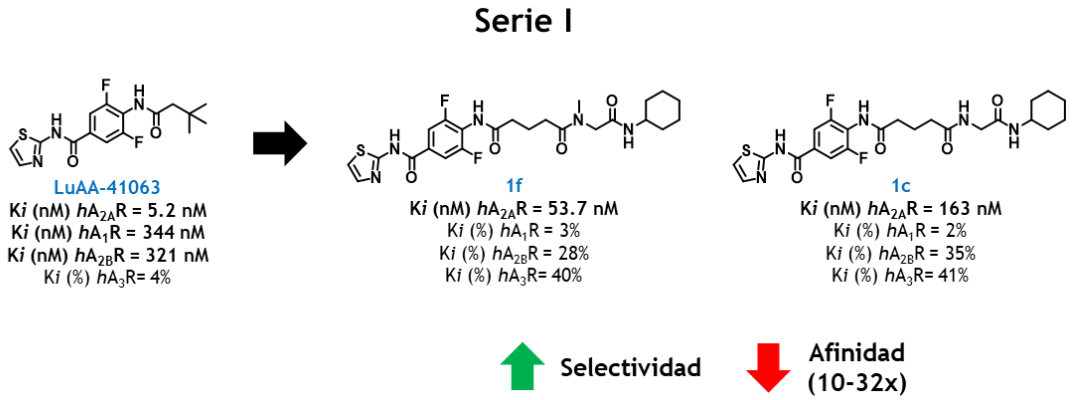


Figura 3.13. Comparación entre el mejor y el peor compuesto de la serie I con la molécula modelo.

La serie II (**2a-f**) fue diseñada siguiendo principios de sustitución bioisostérica clásica, donde se ha reemplazado el grupo metileno (presente en la Serie I) por un átomo de oxígeno. A pesar de la base racional de este enfoque, los resultados obtenidos durante la evaluación farmacológica mostraron que, en su mayoría, los compuestos de esta serie son inactivos frente al $A_{2A}R$ y a los demás subtipos, con pérdidas de afinidad que oscilan entre 25 y 100 veces (Tabla 3.1). De los seis compuestos sintetizados, solo **2a** y **2d** presentaron afinidades reseñables, con valores de K_i **de 613 nM y 123 nM**, respectivamente (Figura 3.14). Los dos compuestos activos (**2a** y **2d**) mantienen la selectividad por el $A_{2A}R$ observada en la serie I. Los resultados indican claramente que la incorporación de un átomo de oxígeno en la región central del espaciador afecta negativamente al reconocimiento molecular y a la interacción con el $A_{2A}R$.

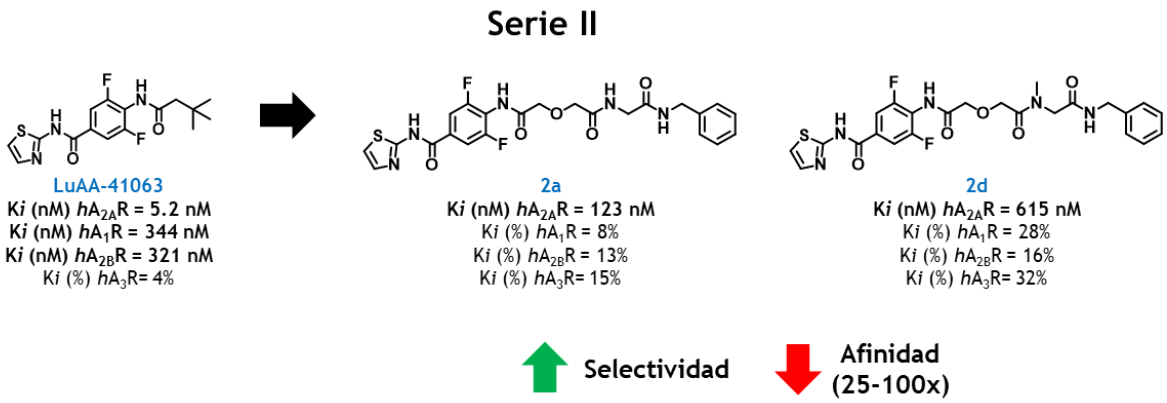


Figura 3.14. Comparación entre el mejor y el peor compuesto de la serie II con la molécula modelo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Inspirados por la naturaleza ramificada del extremo de la cadena alquílica de **LuAA-41063**, para la serie III (**3a-f**) seleccionamos un grupo X en el que el átomo central del espaciador esté sustituido por dos grupos metilo. Este patrón de sustitución introduce una tensión estérica localizada que podría favorecer una orientación espacial distinta respecto a las series anteriores. La revisión de los datos farmacológicos revela un cambio notable en el comportamiento de esta serie, ya que todos los compuestos muestran alta afinidad por el $A_{2A}R$ (K_i **< 50 nM**) (Tabla 3.1). Aunque los valores de K_i frente al $A_{2A}R$ se sitúan entre (17.3 y 45.7 nM), se observa, (como en las series previas) una disminución de afinidad (de entre 4 y 10 veces) en comparación con el ligando modelo **LuAA-41063** (Figura.3.15), siendo esta pérdida la menor de las tres series. Cabe destacar que, con la única excepción del compuesto **3a** (que también muestra afinidad moderada por el receptor A_{2B}, K_i = 307 nM), todos los miembros de esta serie presentan una completa selectividad por el $A_{2A}R$. A pesar de su afinidad incipiente por el $A_{2B}R$, el perfil dual A_{2A}–A_{2B} de **3a** resulta muy interesante en el contexto de la inmunoterapia del cáncer y será explorado con mayor profundidad en los capítulos posteriores de esta tesis doctoral.

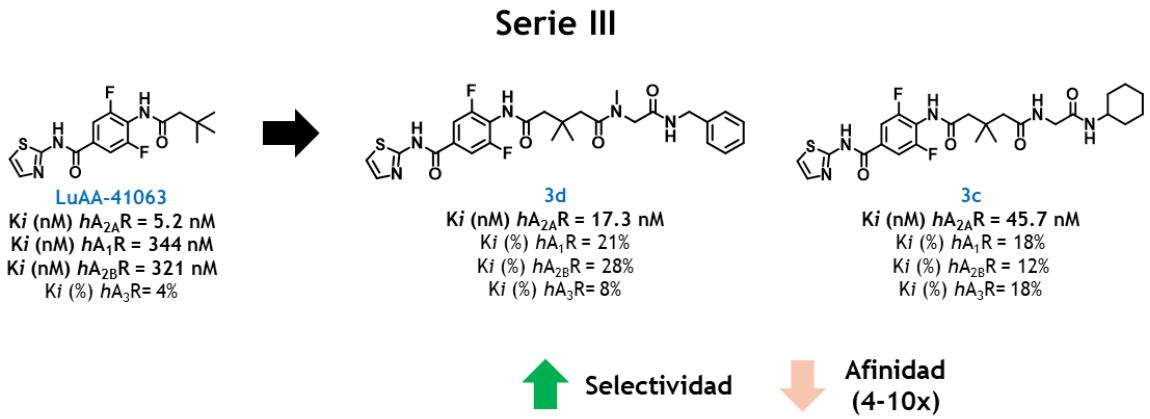


Figura.3.15. Comparación entre el mejor y el peor compuesto de la serie III con la molécula modelo.

En resumen, el análisis conjunto de los resultados farmacológicos obtenidos para las tres series pone de manifiesto que la introducción del grupo $C(CH_3)_2$ en la cadena alquílica del espaciador representa la estrategia más efectiva. Este patrón estructural no solo permite conservar una alta afinidad por el $A_{2A}R$, sino que también contribuye de forma inequívoca a mejorar el perfil de selectividad frente a los subtipos A_1R y $A_{2B}R$, consolidándose como la mejor opción para el desarrollo y optimización de nuevos antagonistas selectivos del $A_{2A}R$.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Impacto del patrón de sustitución en el farmacóforo secundario (R^1 y R^3).

Aunque el análisis detallado de la influencia del patrón de sustitución en el farmacóforo secundario sobre el perfil adenosinérgico se desarrollará de forma más extensa en el siguiente capítulo, en este apartado se ofrece una valoración preliminar. Dada la escasa afinidad observada en la serie II (X = O), estos compuestos se han excluido de la presente comparación. En este caso, el análisis se centrará en los datos de afinidad (K_i) recogidos en la Tabla 3.1, ya que la representación logarítmica de los valores de afinidad (en forma de pK_i) dificulta la apreciación de diferencias sutiles.

Una primera revisión de los datos disponibles sugiere que, a diferencia de lo observado en apartados anteriores, en estas series no se identifican tendencias muy marcadas respecto a la idoneidad de los sustituyentes en R^1 y R^3. No obstante, se aprecia que, cuando R^3 se encuentra sustituido con grupos como bencilo (Bn) o ciclohexilo (Cy), los derivados metilados en la amida (R^1) muestran una afinidad ligeramente superior en comparación con sus análogos no metilados (Figura 3.16A). Este comportamiento es opuesto al observado cuando el sustituyente en R^3 es el grupo *Terc*-butilo (Figura 3.16B). Los datos obtenidos sugieren que cuando el sustituyente en R^1 = CH_3 y en R^3 = Bn, la unión con el $A_{2A}R$ es ligeramente mejor (compuesto **3d**).

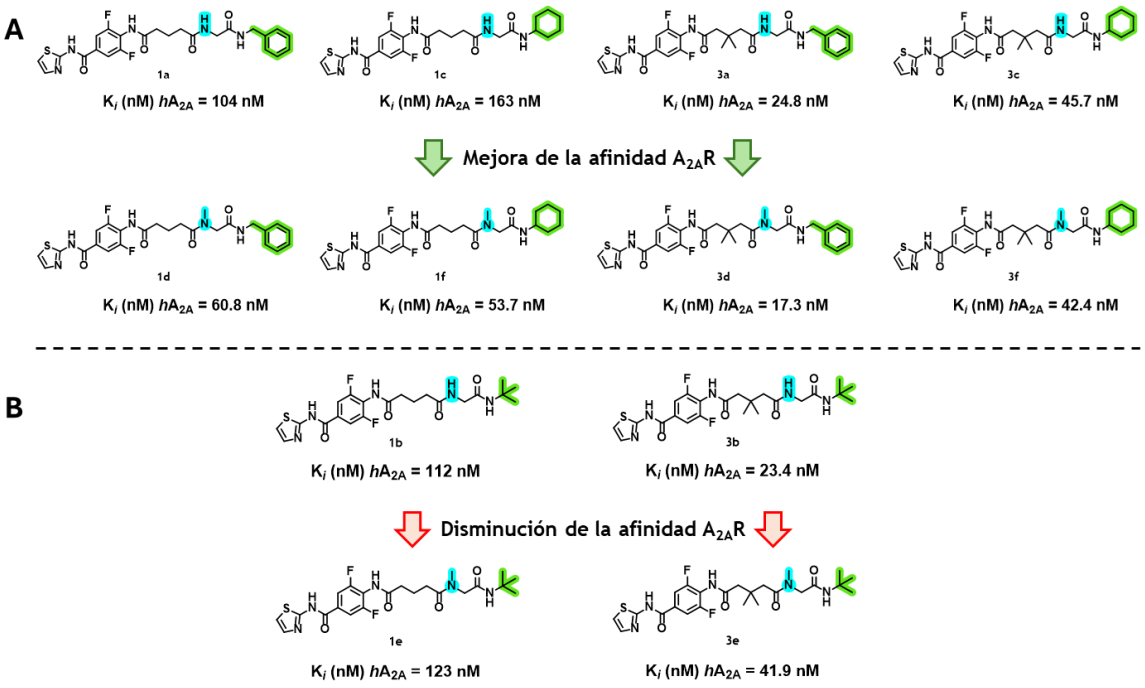


Figura 3.16. Comparación del efecto de *N*-metilación de la amida (R^1) para los compuestos de las series I y III. A) Efecto de *N*-metilación para los ligandos con bencilo y ciclohexilo en R^3. B) Efecto de *N*-metilación en los ligandos con *terc*-butilo en R^3.

Por último, independientemente de las sustituciones introducidas en las posiciones R^1 y R^3 en las series I-III, no se ha observado una variación significativa en la selectividad hacia el $A_{2A}R$. A excepción del compuesto **3a** (R^1 = H y R^3 = Bn), el cual posee una K_i **de 307 nM** por el $A_{2B}R$, todos los compuestos han logrado mejorar la selectividad de la molécula modelo **LuAA-41063** (Tabla 3.1). El análisis sugiere, a priori, que las modificaciones en el farmacóforo secundario tienen un impacto limitado en la capacidad de los compuestos para discriminar entre los distintos subtipos del receptor de adenosina.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

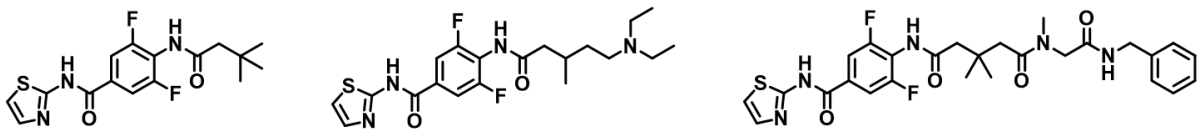
3.1.5 Estudios preliminares del modelo de unión

Aprovechando la disponibilidad de diversas estructuras cristalográficas del $A_{2A}R$, incluida una del complejo con el ligando de referencia **LuAA-41063**, en el presente apartado se realizará un estudio preliminar empleando herramientas computacionales, orientado a proponer los posibles modos de unión de los compuestos descritos en este trabajo. Este análisis tiene como objetivo contribuir a una mejor comprensión de las interacciones moleculares que gobiernan el reconocimiento por el $A_{2A}R$.

3.1.5.1 Docking molecular

El modo de unión propuesto para los nuevos derivados 3,5-difluoro-*N*-(tiazol-2-il)benzamida (serie I-III) en el sitio de unión ortostérico del $A_{2A}R$ de adenosina fue estudiado usando una combinación de *docking* automático y simulaciones de dinámica molecular.

Para los estudios de *docking* se ha seleccionado nuestro ligando **3d** y dos compuestos modelo sintetizados por la compañía Lundbeck (**LuAA-41063** (**VII**) y **Xe**) (Figura 3.17). Se ha utilizado el software Maestro (Schrödinger, versión 2024-2) y una estructura cristalográfica del $A_{2A}R$ (código PDB:4EIY). Comparando los modos de unión del nuevo compuesto (**3d**) con los compuestos modelo (**VII** y **Xe**), el estudio buscó identificar características estructurales específicas que mejoren o disminuyan la predicción de la afinidad por el $A_{2A}R$.



LuAA-41063 (VII)

K_i (nM) $hA_{2A}R$ = 4.9 nM

Xe

K_i (nM) $hA_{2A}R$ = 110 nM

3d

K_i (nM) $hA_{2A}R$ = 17.3 nM

Figura 3.17. Estructura general de los compuestos seleccionados para realizar las simulaciones de *docking* molecular.

El modo de unión general de los nuevos ligandos se muestra en la Figura 3.18A, donde se hace evidente que la elongación de la cadena lateral de LuAA-41063 se extiende en dirección hacia la zona extracelular. El modo de unión predicho por el *docking* se ilustra en la Figura 3.18B-D para el ligando modelo LuAA-41063 (**VII**), el compuesto **Xe** y el ligando representativo **3d**, respectivamente. El compuesto modelo **VII** presenta cuatro interacciones

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

clave: un enlace de hidrógeno con Asn253$^{6.65}$, una interacción de apilamiento tipo π-π con el residuo His250$^{6.52}$, e interacciones a través de enlaces de hidrógeno y apilamiento tipo π-π con el residuo Phe168^{ECL2} (Figura 3.18B). Las interacciones del *scaffold* central están preservadas tanto en los ligandos previamente elongados (**Xe**, Figura 3.18C) como en el nuevo ligando sintetizado **3d** (Figura 3.18D). Además, se observó que las cadenas laterales de las nuevas series aquí descritas establecen interacciones críticas con el residuo de Lys^{ECL2}, estabilizando así la unión al receptor (Figura 3.18D). Estos hallazgos preliminares ofrecen información sobre la afinidad superior de los nuevos ligandos propuestos en comparación con los previamente sintetizados por la compañía Lundbeck.

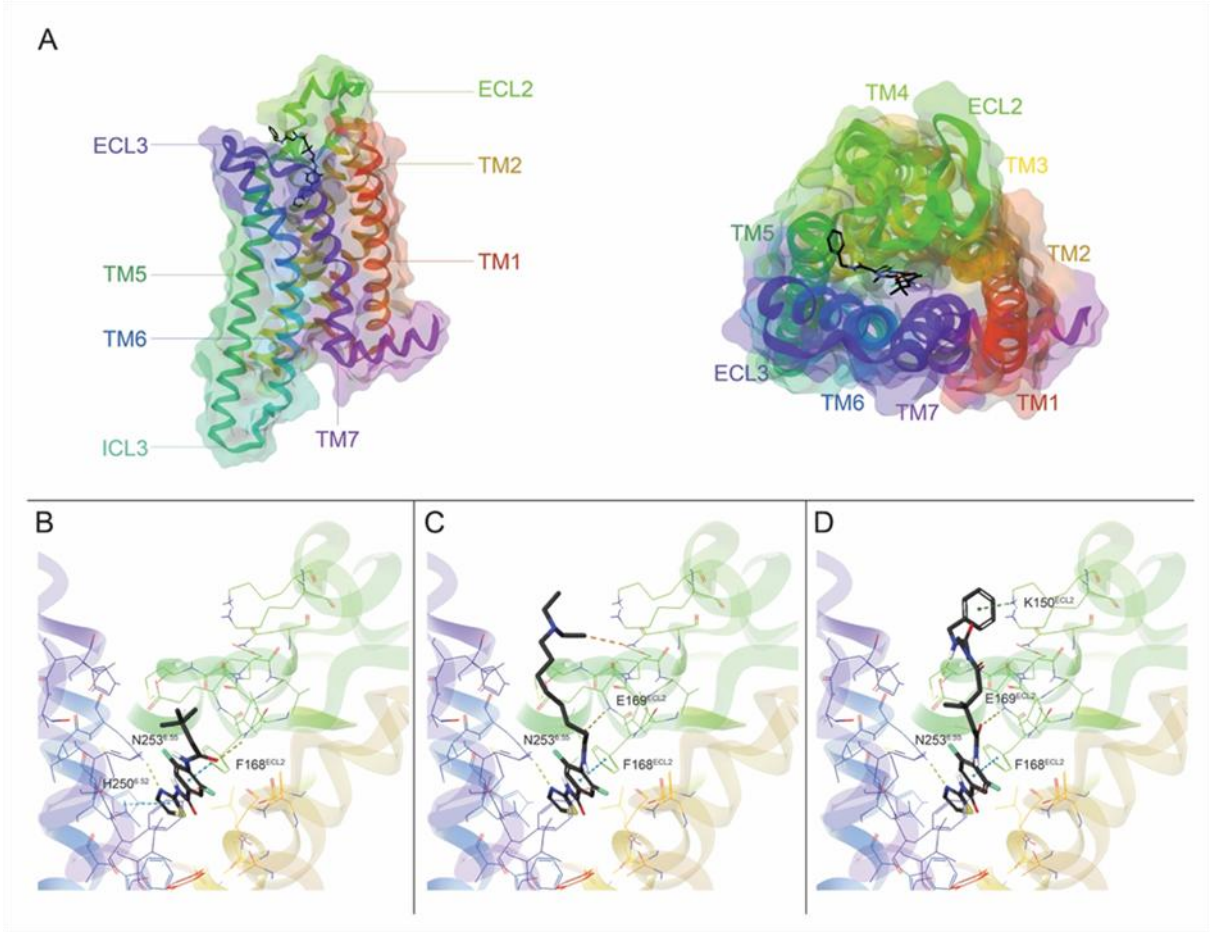


Figura 3.18. Modo general de unión de los ligandos modelos y los nuevos derivados sintetizados. A) Vista lateral y aérea del ligando **3d** en el sitio ortostérico del $A_{2A}R$. B) Modo de unión y patrones de interacción de las moléculas modelo **LuAA-41063** y C) **Xe**. D) Modelo de unión y patrones de interacción de la molécula **3d**. Las líneas discontinuas verdes, cian y naranjas representan los enlaces de hidrógeno, las interacciones de apilamiento tipo π-π y las interacciones no favorables, respectivamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.5.2 Simulaciones de dinámica molecular

Para investigar el impacto de la elongación de la cadena lateral en la afinidad, y el modo de unión de los nuevos antagonistas, se seleccionaron todos los compuestos pertenecientes a las series I-III y se compararon con las moléculas modelo **VII** y **Xe**. Se realizó una extensa simulación de dinámica molecular (DM) de 25 ns utilizando el software GROMACS 2021. Los resultados, como se mostrará a continuación, proporcionan perspectivas clarificadoras sobre el comportamiento de estos compuestos en el sitio de unión ortostérico del $A_{2A}R$.

En primer lugar, estudiamos el número promedio de enlaces de hidrógeno (EH) entre el ligando y el receptor durante la simulación (25 ns) para cada serie de compuestos, excluyendo las moléculas de agua, en comparación con los ligandos modelo. Como se muestra en la Figura 3.19, los compuestos de la serie I (**1a-f**) y la serie II (**2a-f**) presentan un número menor de enlaces de hidrógeno, similar al ligando modelo de baja afinidad **Xe**, en comparación con los compuestos de la serie III (**3a-f**), que son similares al ligando modelo de alta afinidad **VII**. Estos resultados correlacionan bastante bien con la afinidad de las diferentes series: $EH_{Serie\ I} = 0.97 \pm 0.25$, $EH_{Serie\ II} = 0.85 \pm 0.5$, $EH_{Serie\ III} = 1.50 \pm 0.33$, $EH_{Xe} = 0.64 \pm 0.38$ y $EH_{VII} = 0.84 \pm 0.50$. Esto no solo confirma la estabilización del ligando por las cadenas laterales de los nuevos compuestos (**1a-f, 3a-f**), sino que también indica que la estrategia de utilizar cadenas completamente alifáticas (**Xe**) para la elongación del ligando no es particularmente ventajosa.

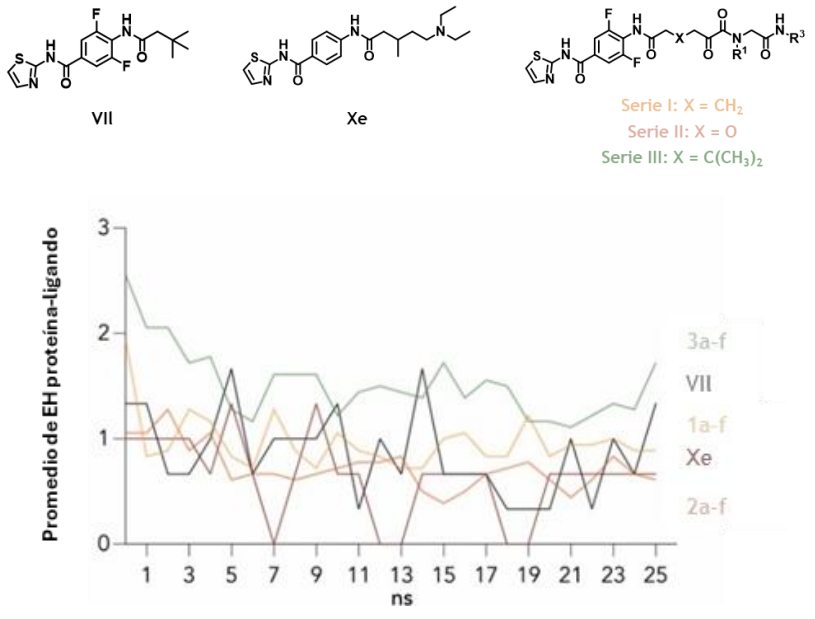


Figura 3.19. Resultados de la simulación de dinámica molecular (25 ns) de las series I-III. Comparación del promedio de los enlaces de hidrógeno proteína-ligando de las series I-III y las moléculas modelo.

A continuación, se ha analizado la Desviación Cuadrática Media (RMSD, por sus siglas en inglés) de la subestructura del *scaffold* (SCS, acrónimo en inglés; resaltada en rojo en la Figura 3.20) para cada compuesto a lo largo de la simulación, comparándolos con los ligandos modelo. La decisión de centrarnos en el SCS en lugar de en todo el ligando permite una comparación más precisa de la estabilidad de la estructura central, minimizando la influencia de las cadenas laterales flexibles que pueden distorsionar la RMSD general. La Figura 3.20A muestra un gráfico de dispersión que sugiere que el *scaffold* central de los compuestos de la serie I (**1a-f**) y III (**3a-f**) experimentan desviaciones estructurales más bajas en comparación con la serie II (**2a-f**), que son similares al ligando modelo **VII**. Esto sugiere un modo de unión más robusto para las series I y III. Al analizar cada ligando por separado (Figura 3.20B), se elaboró un mapa de calor que ilustra el RMSD del SCS por fotograma para cada ligando. Esta vista detallada de la estabilidad temporal de las conformaciones de los ligandos dentro del sitio de unión revela una baja variabilidad, particularmente para los ligandos de la serie III (**3a-f**). Este análisis ayuda a confirmar la conformación de unión estable de estos ligandos, indicando una interacción consistente con el sitio de unión a lo largo de la simulación. El RMSD promedio del SCS para los últimos 10 ns de la simulación (Figura 3.20C) confirma la dominancia de la serie III (RMSD = 0.54 ± 0.12) sobre la serie II (RMSD = 1.17 ± 0.13) y la serie I (RMSD = 0.69 ± 0.21).

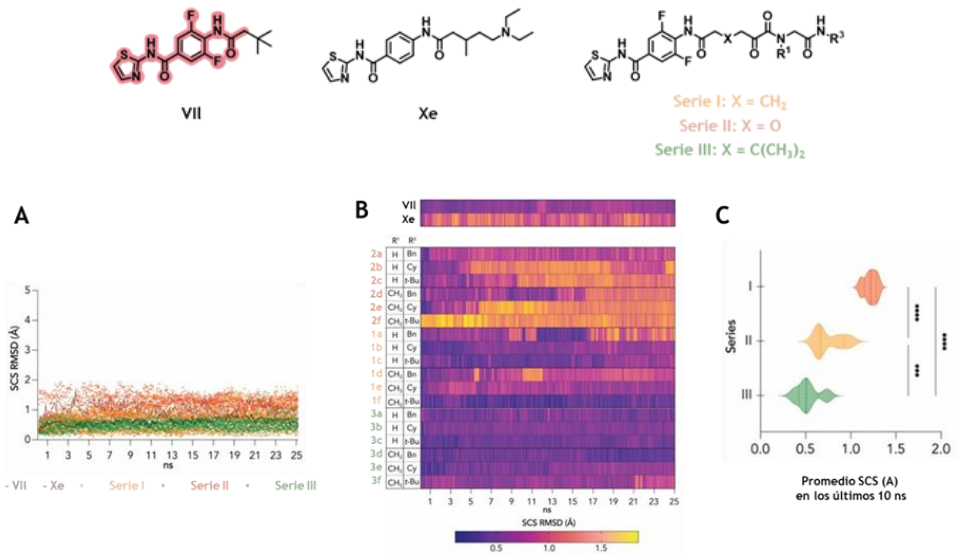


Figura 3.20. Resultados de la simulación de dinámica molecular (25 ns) de las series I-III. A) Gráfico de dispersión que muestra la comparación de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) de la Subestructura del *Scaffold* (SCS, en rojo) entre las series I-III y los ligandos modelo. B) Mapa de calor que ilustra la RMSD de la SCS por fotograma para cada ligando. C) Gráfico de violín que muestra la RMSD promedio en los últimos 3 ns para cada serie, resaltando diferencias significativas entre las series I y III ($p < 0,0001$).

Finalmente, evaluamos la Fluctuación Cuadrática Media (RMSF, por sus siglas en inglés) del $A_{2A}R$ para comprender el impacto de la unión de los ligandos en la flexibilidad del receptor. La Figura 3.21 muestra los valores promedio de RMSF, resaltando en azul los residuos asociados con el sitio de unión y los elementos de la estructura secundaria. Este análisis no revela diferencias significativas en los valores de RMSF entre los compuestos de las series I, II y III. Esto sugiere que el cambio en la afinidad observado para estos compuestos no se debe a alteraciones en la conformación del receptor, sino más bien a las propiedades intrínsecas de los ligandos.

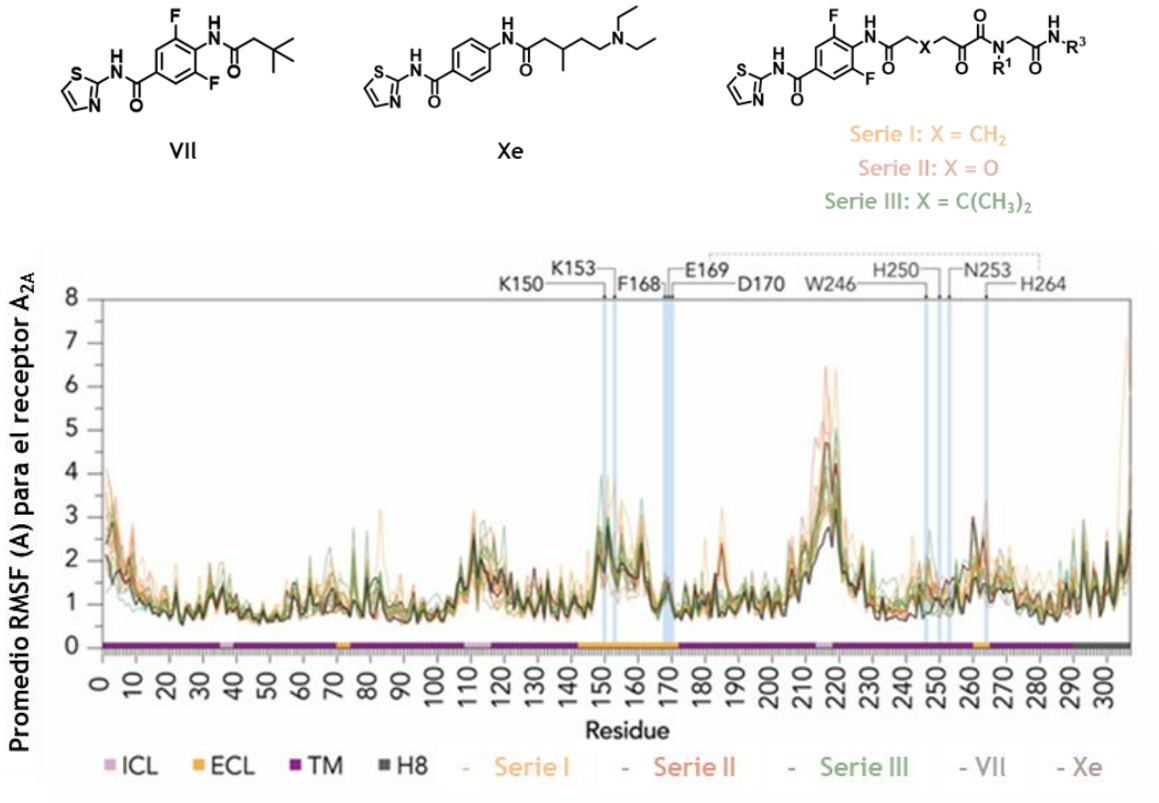
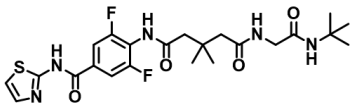


Figura 3.21. Resultados de la simulación de dinámica molecular (25 ns) de las series I-III. Fluctuación Cuadrática Media Promedio (RMSF) para el $A_{2A}R$, con la estructura secundaria y los residuos relacionados con el sitio de unión indicados en azul.

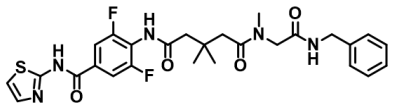
3.1.6 Resumen de los principales hallazgos del Capítulo I

- Se ha validado la reacción de Ugi-4CR como una herramienta sintética útil para la obtención de antagonistas del $A_{2A}R$ potentes y selectivos de forma rápida y eficiente.
- El espaciador con el grupo **X = C(CH₃)₂** proporciona los mejores resultados en cuanto a términos de afinidad y selectividad.
- Con el diseño de los ligandos de este capítulo se ha logrado mejorar la selectividad del ligando de referencia **LuAA-41063** sin llegar a sacrificar en gran medida la afinidad por el $A_{2A}R$ (compuestos **3b** y **3d**) (K_i < **25 nM)** (Figura 3.22).
- Cuando $R^1 = CH_3$ y R^3 = Bn o Cy (**1a, 1c, 3a** y **3c**), los ligandos son ligeramente más potentes y selectivos por el $A_{2A}R$ que sus análogos con R^1 = H (**1d**, **1f, 3d** y **3f**).
- Cuando R^1 = H y R^3 = *t*-Bu (**1b** y **3b**), los ligandos son ligeramente más potentes y selectivos por el $A_{2A}R$ que sus análogos con $R^1 = CH_3$ (**1e** y **3e**).
- Se ha obtenido un compuesto novedoso por su incipiente perfil dual sobre los $A_{2A}R$-$A_{2B}R$ (**3a**) (Figura 3.22).
- Los datos de afinidad han sido validados mediante ensayos de *docking* y simulaciones de dinámica molecular.



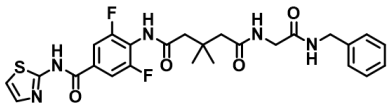
3b

K_i (nM) $hA_{2A}R$ = 23.4 nM
K_i (%) hA_1R = 6 %
K_i (%) $hA_{2B}R$ = 18 %
K_i (%) hA_3R = 3 %



3d

K_i (nM) $hA_{2A}R$ = 17.3 nM
K_i (%) hA_1R = 21 %
K_i (%) $hA_{2B}R$ = 28 %
K_i (%) hA_3R = 8 %



3a

K_i (nM) $hA_{2A}R$ = 24.8 nM
K_i (nM) $hA_{2B}R$ = 307 nM
K_i (%) hA_1R = 40 %
K_i (%) hA_3R = 11 %

Figura 3.22. Estructura y datos farmacológicos de los mejores compuestos obtenidos en el Capítulo I.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2 CAPÍTULO II

3.2.1 Diseño de los ligandos

Los resultados presentados en el Capítulo I permitieron identificar el espaciador ramificado [X = $C(CH_3)_2$] como el elemento estructural más adecuado para alargar la cadena alquílica del fármaco **LuAA-41063** y, al mismo tiempo, explorar nuevos sitios de interacción próximos a la región extracelular del $A_{2A}R$. Esta modificación no solo conservó una alta afinidad por el receptor, sino que también mejoró de forma significativa la selectividad de los compuestos diseñados (Figura 3.23). En este contexto, la reacción U-4CR se consolidó como una herramienta sintética robusta y versátil, que facilitó tanto la obtención de nuevos antagonistas del $A_{2A}R$ como la exploración eficiente del entorno de unión del farmacóforo secundario.

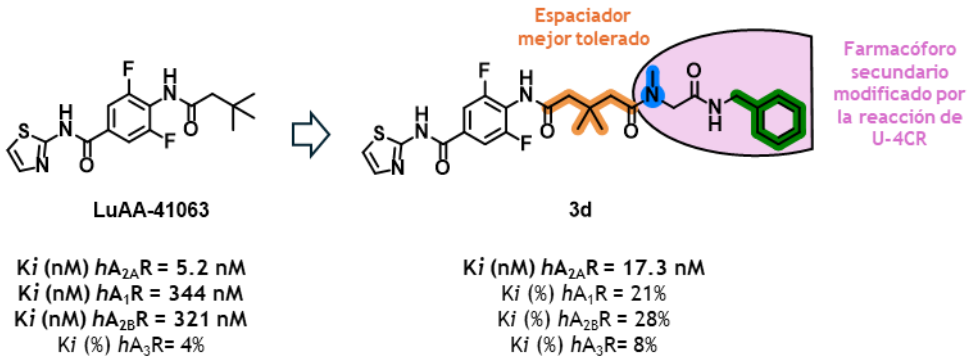


Figura 3.23. Comparación de los datos de afinidad del ligando de referencia y el mejor compuesto obtenido en la serie III mediante la U-4CR.

Sobre la base de esos datos y del soporte estructural proporcionado por los estudios computacionales, el Capítulo II se centró en una exploración sistemática del potencial modulador de los nuevos elementos estructurales incorporados (en R^1, R^2 y R^3) mediante la reacción de U-4CR en el farmacóforo secundario. Este elemento estructural se consideró clave para modular distintas propiedades de los compuestos. Uno de los objetivos fundamentales de este capítulo consistió en aprovechar las interacciones en dicha región para optimizar los perfiles de potencia y selectividad, mejorar las propiedades fisicoquímicas (como la solubilidad) y, en última instancia, generar nuevos perfiles farmacológicos diferenciados, incluyendo la afinidad dual por el $A_{2A}R$ y el $A_{2B}R$.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En este capítulo se desarrollaron dos series de compuestos (**series IV-V**), estructuralmente bien diferenciados, que han proporcionado un total de 38 nuevos derivados (Figura 3.24). Cada una de estas series está orientada a obtener información complementaria a distintos niveles.

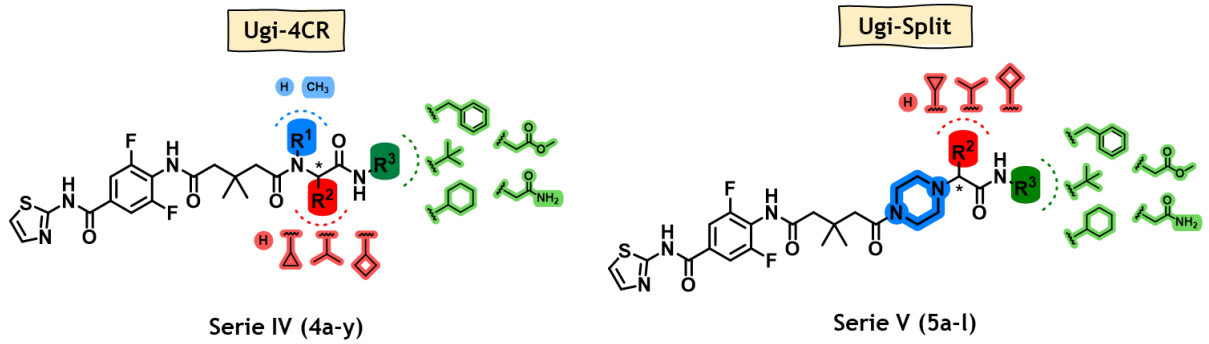


Figura 3.24. Estructuras generales de las series IV (Ugi-4CR, izquierda) y V (Ugi-Split, derecha) y diversidades introducidas durante la exploración del farmacóforo secundario.

Serie IV

En línea con la estrategia seguida en el Capítulo I, en la serie IV se procedió a una ampliación de la exploración estructural del farmacóforo secundario, mediante la incorporación de mayor diversidad estructural, si bien en R^1 se conservaron los sustituyentes previamente empleados (hidrógeno y metilo) (Figura 3.24). Una de las principales novedades de esta serie fue la modificación en la posición R^2 donde, además del hidrógeno empleado en el Capítulo I, se introdujeron sustituyentes alifáticos que aportan cierto grado de volumen estérico (isopropilo, ciclopropilo y ciclobutilo) (Figura 3.24). Esta modificación, no solo incrementó la diversidad estructural, sino que también dio lugar a la aparición de un centro estereogénico en los compuestos. De esta forma conseguimos un aumento en la complejidad molecular, además de abrir nuevas posibilidades en términos de ajuste estérico y selectividad por el $A_{2A}R$. En cuanto a la posición R^3, además de los grupos introducidos en el capítulo anterior (bencilo, ciclohexilo y *terc*-butilo), se incorporaron dos nuevos grupos polares (CH_2-$COOCH_3$ y CH_2-$CONH_2$) con el propósito de explorar interacciones de distinta naturaleza en el $A_{2A}R$ (Figura 3.24). El conjunto de modificaciones estructurales dio lugar a 26 nuevos derivados (**4a–y**), cuyo objetivo fue profundizar en el estudio de la REA y avanzar en la optimización de los perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos de los antagonistas del $A_{2A}R$.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Serie V

Inspirados por la elevada selectividad hacia el $A_{2A}R$ observada en los ligandos de la serie IV con sustitución R^1 = CH_3, decidimos explorar nuevas arquitecturas moleculares que mantuvieran dicho patrón de sustitución (amida disustituida), pero que derivaran de quimiotipos alternativos. Con este objetivo, en la serie V se empleó la reacción de Ugi-Split, una variante de la reacción de U-4CR que utiliza bis-aminas secundarias. En este caso se utilizó piperazina como bis-amina, ya que, tal como se ilustra en la Figura 3.25, su inclusión confiere cierta analogía estructural con los compuestos de la serie IV. Cabe destacar que, además de preservar la afinidad y selectividad observadas en los compuestos con R^1 = CH_3 de la serie IV, se espera que la incorporación del anillo de piperazina mejore significativamente la solubilidad de los nuevos derivados, debido a su naturaleza básica y su elevada hidrosolubilidad.

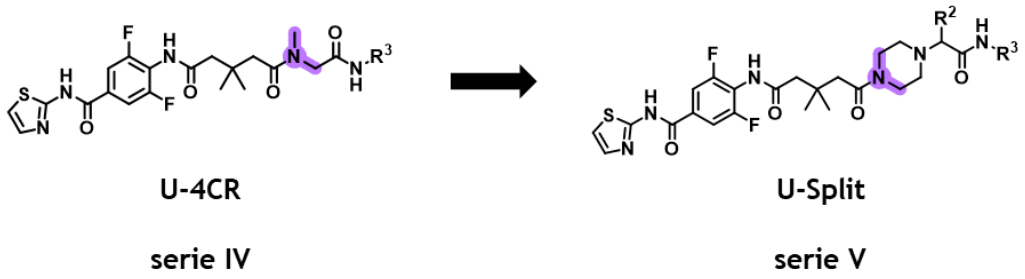
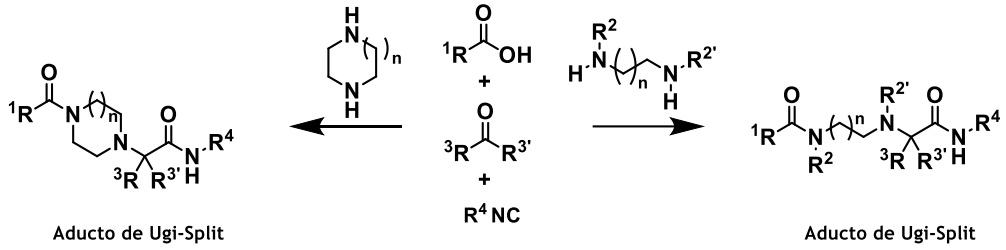


Figura 3.25. Analogía estructural entre los ligandos de la serie IV y la serie V.

Se mantuvo una estrategia de diseño análoga a la empleada en la serie IV, enfocada en la modificación del farmacóforo secundario con el fin de optimizar las propiedades farmacológicas y la selectividad de los compuestos resultantes. En R^2 se exploraron sustituyentes alifáticos de tamaño variable (H, *i*-Pr, *c*-Pr y *c*-Bu) (Figura 3.24) esto dio lugar, al igual que en la Serie IV, a la generación de compuestos con un centro estereogénico. En la posición R^3 se evaluaron tanto los sustituyentes previamente utilizados (Bn, Cy y *t*-Bu) como los nuevos grupos polares introducidos en este capítulo (CH_2-$COOCH_3$ y CH_2-$CONH_2$) (Figura 3.24), con el objetivo de favorecer nuevas interacciones con el $A_{2A}R$ y potenciar la interacción ligando-receptor. Como resultado de esta nueva aproximación sintética, se obtuvieron 12 compuestos (**5a–l**), cuyo análisis permitirá establecer comparaciones directas con los derivados previamente estudiados, profundizar en la comprensión de la REA y avanzar en la identificación de nuevos antagonistas del $A_{2A}R$ con un perfil farmacológico mejorado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La reacción de Ugi-Split es una modificación de la reacción de U-4CR, desarrollada por el Prof. Cesare Tron (Univ. del Piamonte Oriental), e implica la combinación de cuatro precursores: un ácido carboxílico, una bis-amina secundaria (lineal o cíclica), un aldehído o cetona, y un isonitrilo, dando lugar a dos tipos diferentes de aductos de Ugi, dependiendo de la bis-amina utilizada (lineal o cíclica) (Esquema 3.5). Esta variante sintética ofrece una alternativa eficiente y versátil a la reacción de U-4CR para la generación rápida de quimiotecas de derivados de **LuAA-41063** estructuralmente diversos.



Esquema 3.5. Esquema general de la reacción de Ugi-Split.

3.2.2 Química

Los precursores utilizados para la exploración del perfil farmacológico de los nuevos derivados diseñados en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral se muestran en la Figura 3.26. Todos los precursores son comerciales a excepción del ácido carboxílico **A18**, cuya síntesis se ha descrito en el Capítulo I apartado 3.1.2. (Química).

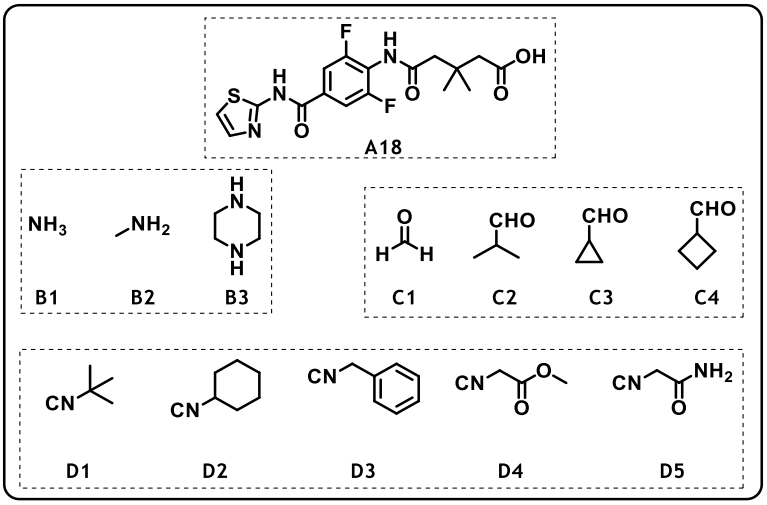
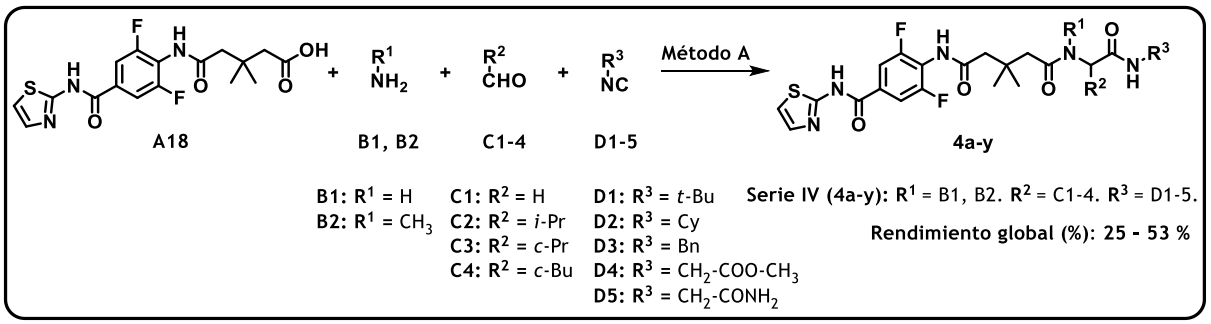


Figura 3.26. Precursores sintéticos utilizados en el Capítulo II. A: ácido carboxílico, B: aminas, C: aldehídos, y D: isonitrilos.

La síntesis de los 26 derivados de la serie IV (**4a-y**) se realizó siguiendo las condiciones descritas en el esquema que se muestra a continuación.



Esquema 3.6. Ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos **4a-y** pertenecientes a la serie IV del Capítulo II basada en la reacción de Ugi-4CR. Método A: MeOH, T.A, 48 h.

Los nuevos análogos de LuAA-41063 (**4a-y**) se obtuvieron según se muestra en el Esquema 3.6. La síntesis tuvo lugar en una sola etapa, combinando el ácido carboxílico (**A18**), con una amina [amoníaco (**B1**) o metilamina (**B2**)], un aldehído [formaldehído (**C1**), isopropilaldehído (**C2**), ciclopropilaldehído (**C3**) o ciclobutilaldehído (**C4**)] y el correspondiente isonitrilo [*terc*-butilisonitrilo (**D1**), ciclohexilisonitrilo (**D2**), bencilisonitrilo (**D3**), 2-isocianoacetato de metilo (**D4**) o 2-isocianoacetamida (**D5**)]. Los precursores reactivos se disolvieron en MeOH y se sometieron a agitación orbital a temperatura ambiente durante 48 horas (Método A). Tras la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida, obteniéndose un residuo oleoso que posteriormente se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice, utilizando una mezcla de DCM:MeOH en gradiente. Todas las reacciones fueron monitorizadas mediante TLC. La reacción de Ugi-4CR permitió obtener los productos deseados con rendimientos que oscilan entre el 25 y el 53 %. La pureza de todos los compuestos sintetizados se determinó de forma rutinaria mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), obteniéndose valores siempre superiores al 95 %.

En el apartado 5 (Experimental section) se proporciona una descripción detallada de los métodos sintéticos empleados, así como los datos estructurales, espectroscópicos y analíticos completos de todos los compuestos descritos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La estructura de la colección de 26 compuestos **4a-y** sintetizados en la serie IV se muestran a continuación.

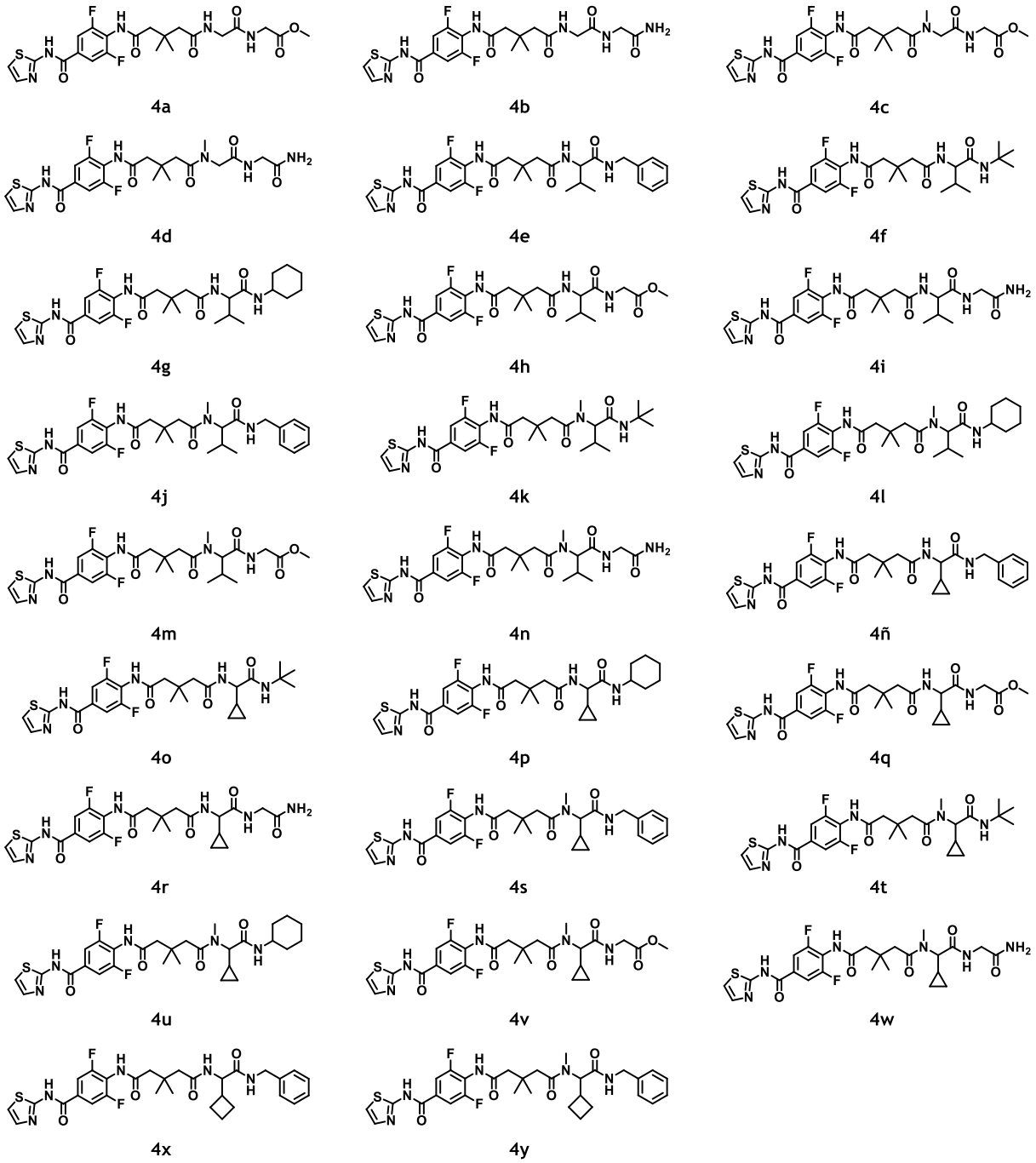


Figura 3.27. Estructura de los 26 compuestos pertenecientes a la serie IV.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A modo de ejemplo, se muestran espectros de RMN representativos de los compuestos sintetizados en la serie IV.

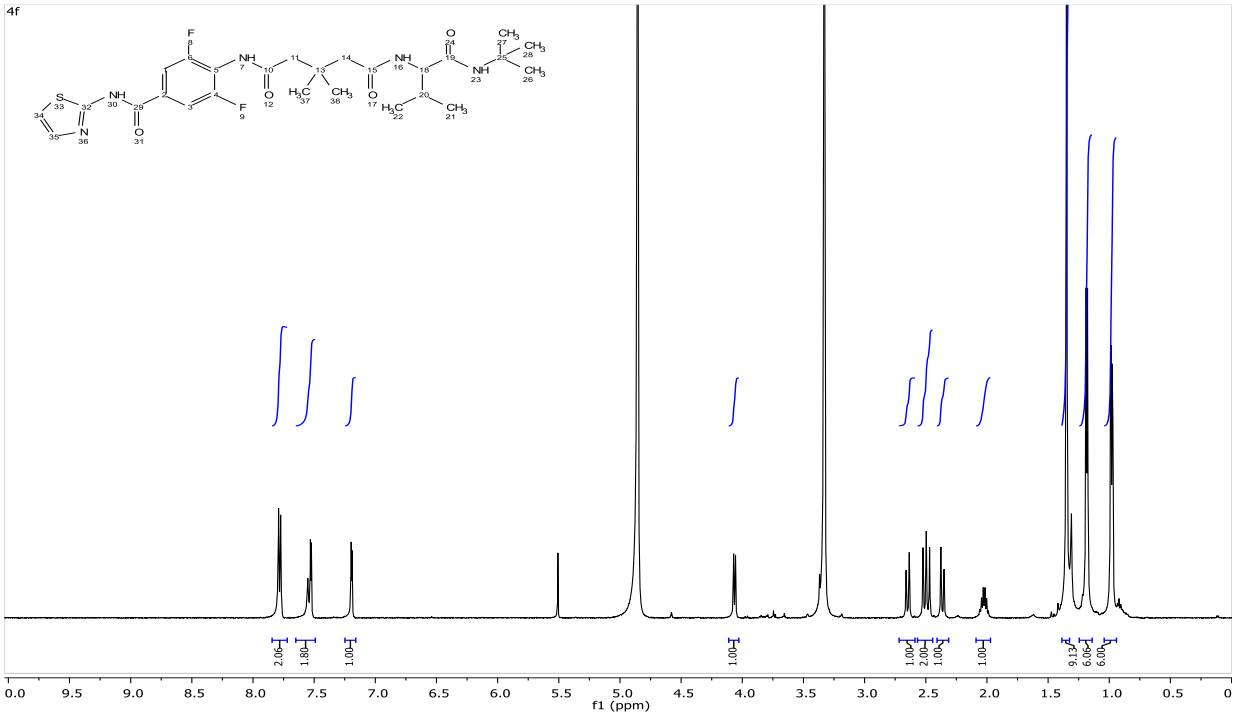


Figura 3.28. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto **4f** en MeOD (500 MHz).

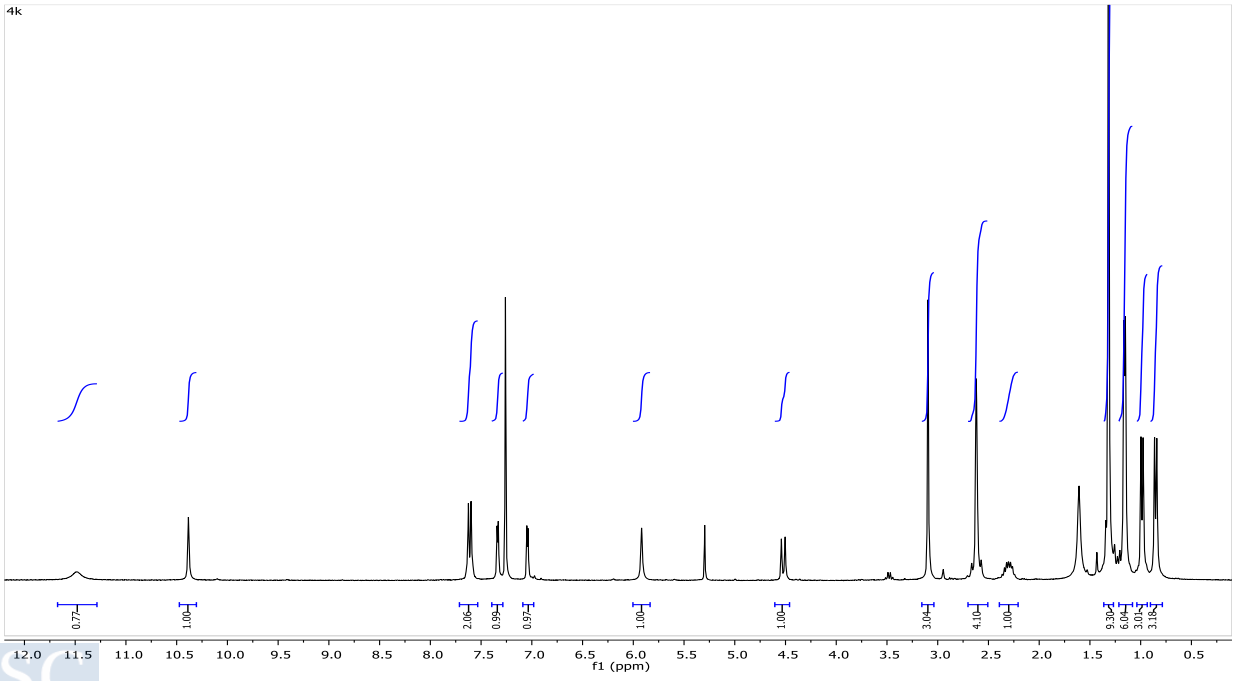


Figura 3.29. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto **4k** en $CDCl_3$ (300 MHz).

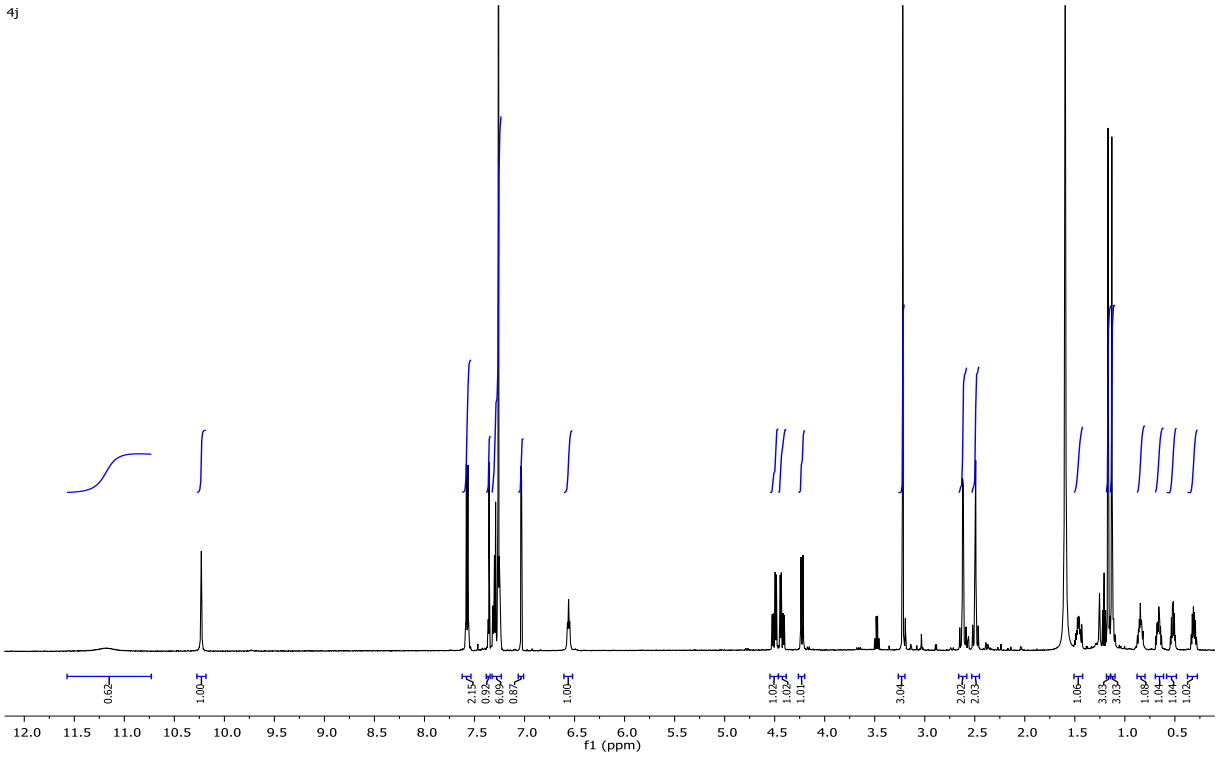


Figura 3.30. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto **4j** en $CDCl_3$ (500 MHz).

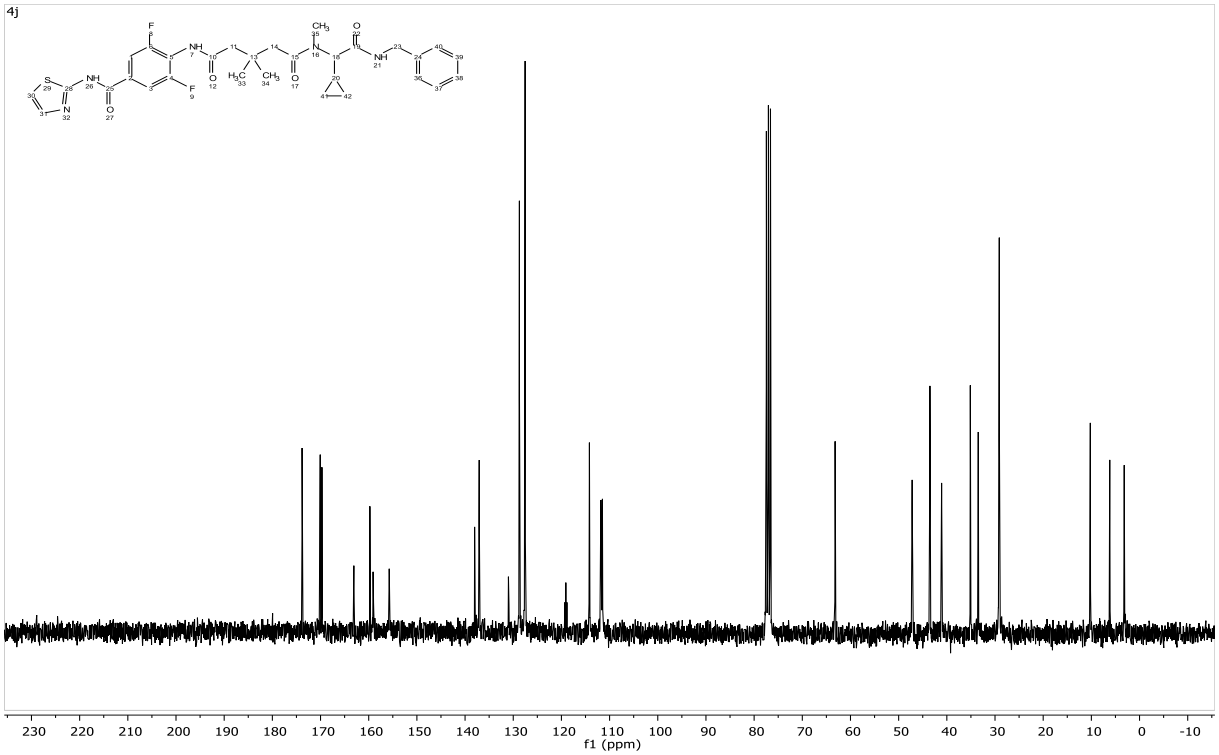
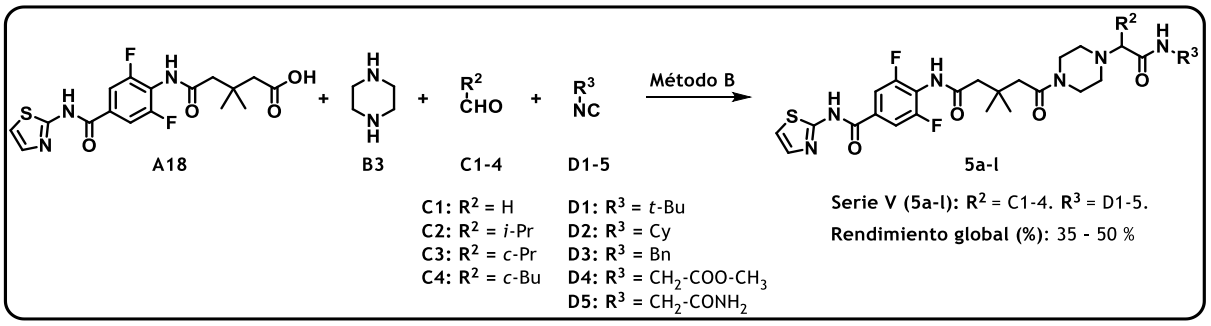


Figura 3.31. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **4j** en $CDCl_3$ (500 MHz).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La síntesis de los 12 derivados de la serie V **5a-l** se realizó siguiendo las condiciones que se muestran a continuación.



Esquema 3.7. Ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos **5a-l** pertenecientes a la Serie V del Capítulo II basada en la reacción de Ugi-Split. Método B: MeOH, 60 ºC, 24 h.

Los nuevos derivados de LuAA-41063 (**5a-l**) se obtuvieron según se muestra en el Esquema 3.7. Para realizar la reacción de Ugi-Split, se emplearon como precursores reactivos, el ácido carboxílico (**A18**) en combinación con piperazina (**B3**), un aldehído [formaldehído (**C1**), isopropilaldehído (**C2**), ciclopropilaldehído (**C3**) o ciclobutilaldehído (**C4**)], y el correspondiente isonitrilo [*terc*-butilisonitrilo (**D1**), ciclohexilisonitrilo (**D2**), bencilisonitrilo (**D3**), 2-isocianoacetato de metilo (**D4**) o 2-isocianoacetamida (**D5**)]. Los materiales de partida se disolvieron en MeOH y se sometieron a agitación orbital a 60 ºC durante 24 horas (Método B). Tras la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida, obteniéndose un residuo oleoso que posteriormente se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando una mezcla de DCM:MeOH en gradiente. Todas las reacciones fueron monitorizadas mediante TLC. La reacción de Ugi-Split permitió obtener los productos deseados con rendimientos que oscilaron entre el 35 y el 50 %. La pureza de todos los compuestos sintetizados se determinó de forma rutinaria mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), obteniéndose valores siempre superiores al 95 %.

En el apartado 5 (Experimental section) se proporciona una descripción detallada de los métodos sintéticos empleados, así como los datos estructurales, espectroscópicos y analíticos completos de todos los compuestos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La estructura de la colección de los 12 compuestos **5a-l** sintetizados en la serie V se muestra a continuación.

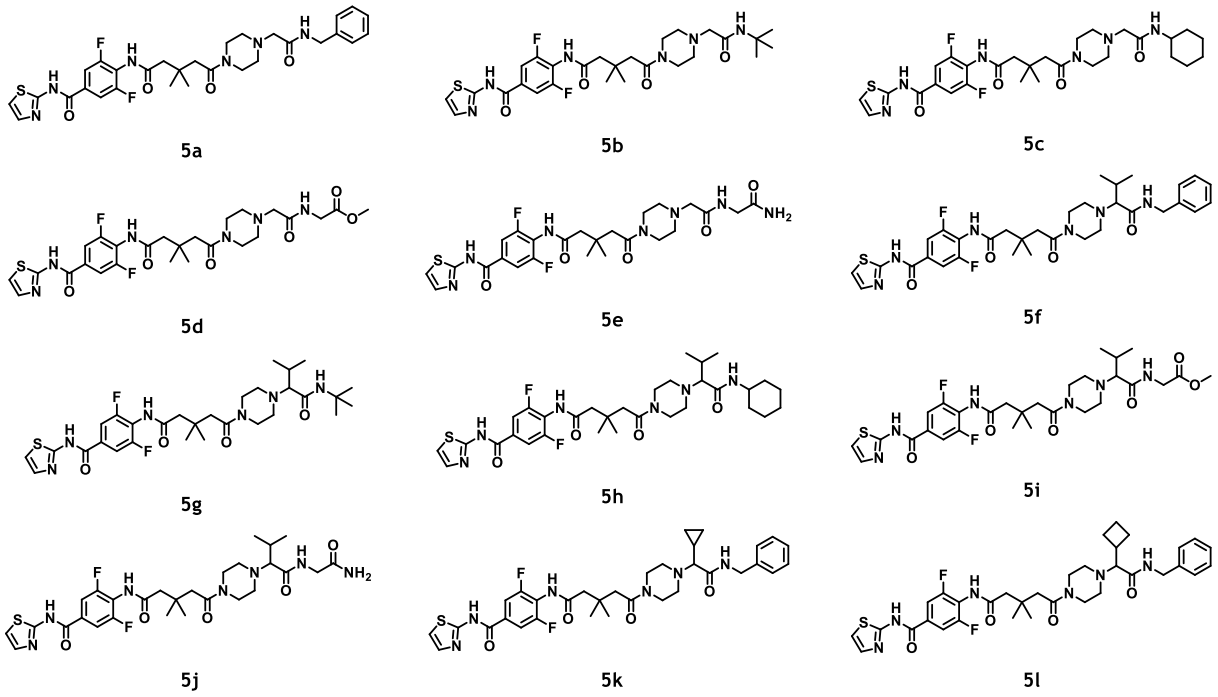


Figura 3.32. Estructura de los 12 compuestos pertenecientes a la serie V.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A modo de ejemplo, se muestran espectros de RMN representativos de los compuestos sintetizados en la serie V.

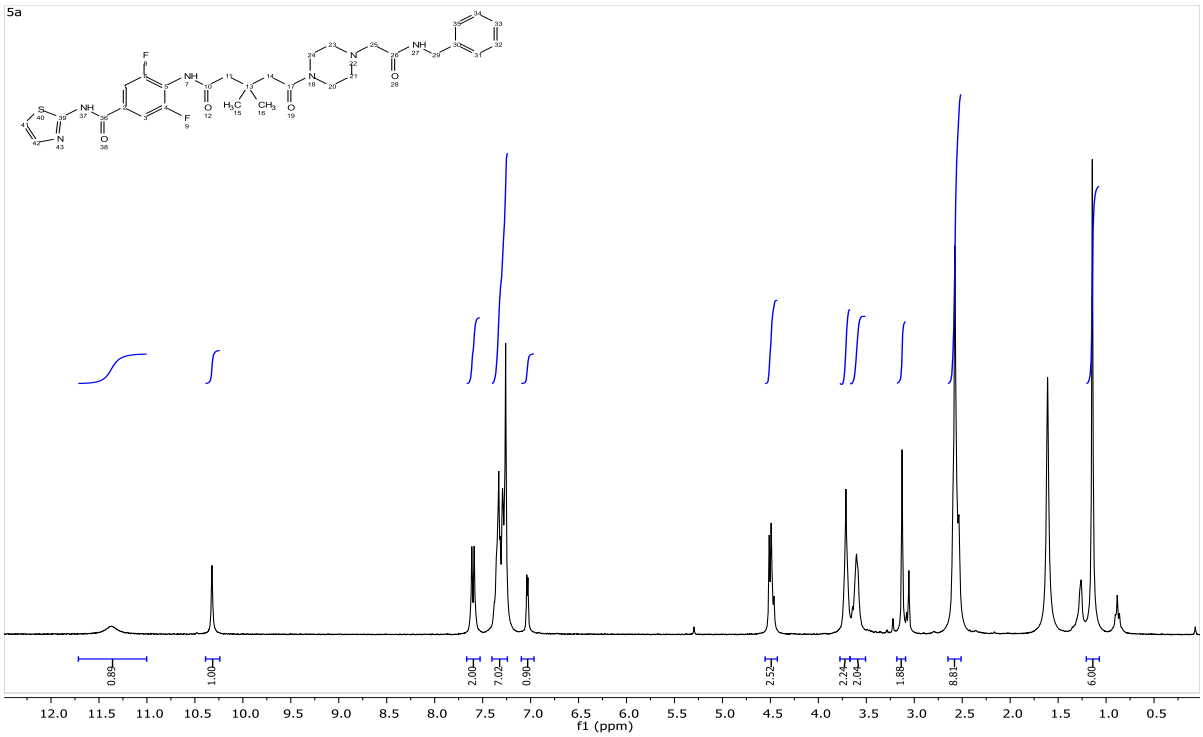


Figura 3.33. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto **5a** en $CDCl_3$ (300 MHz).

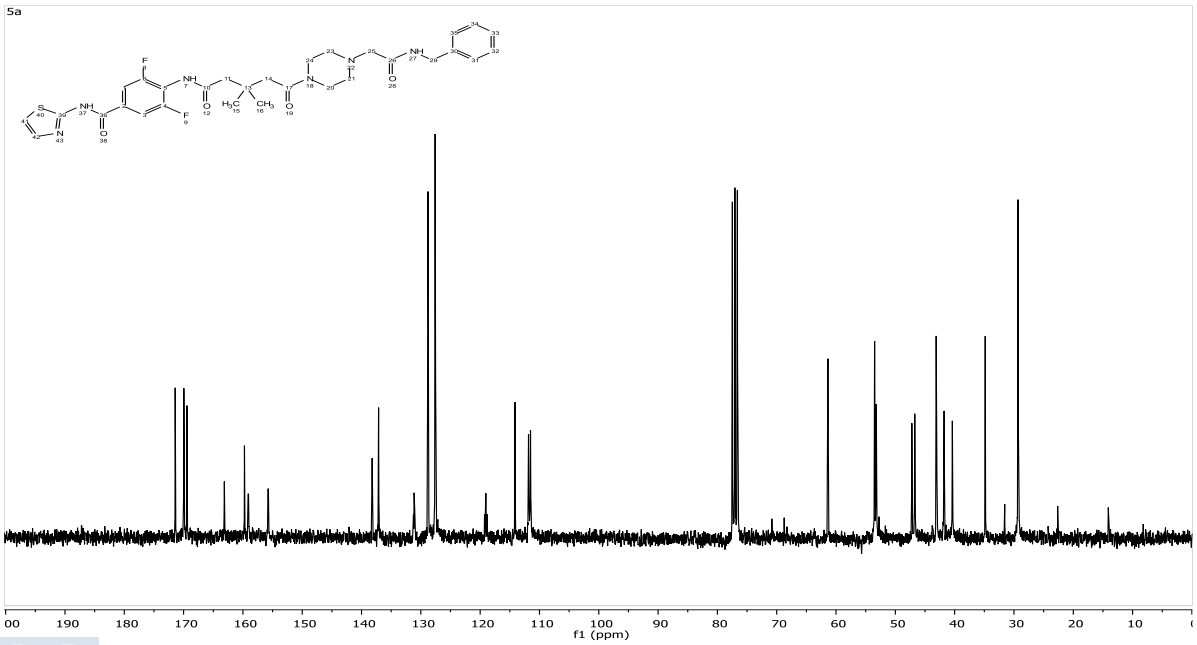


Figura 3.34. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **5a** en $CDCl_3$ (300 MHz).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

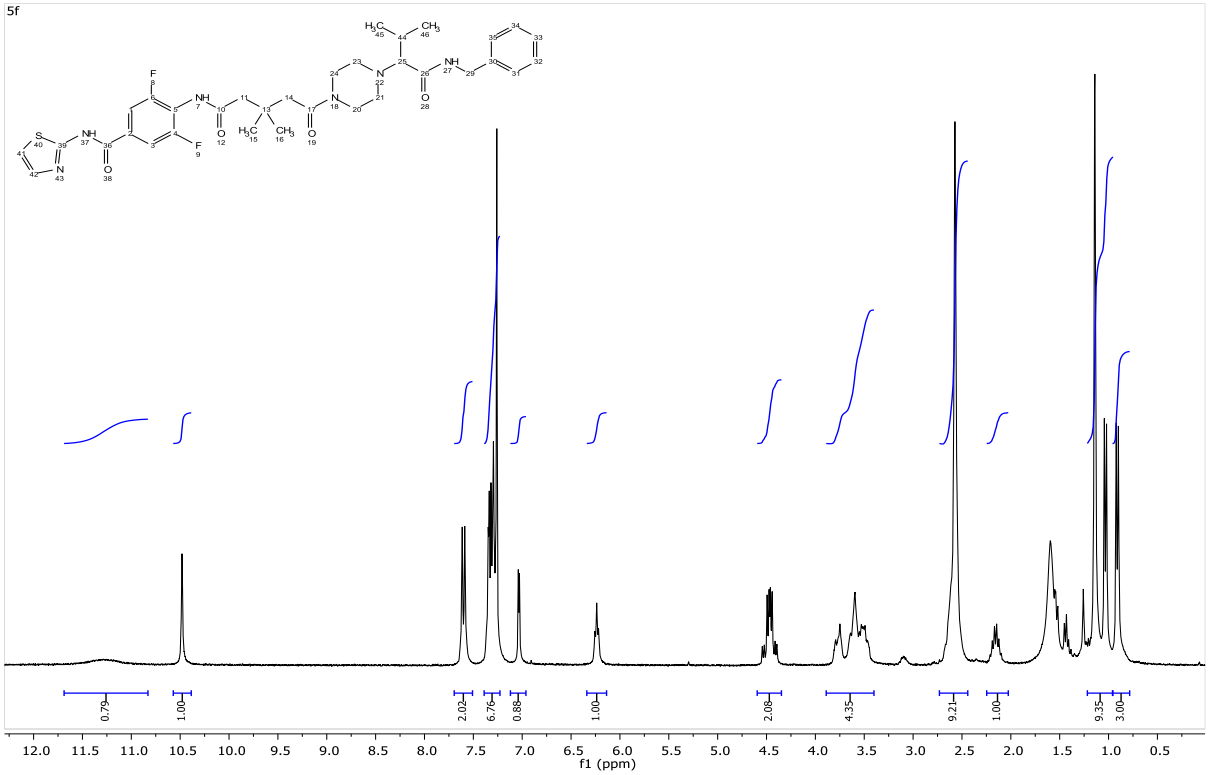


Figura 3.35. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto **5f** en $CDCl_3$ (300 MHz).

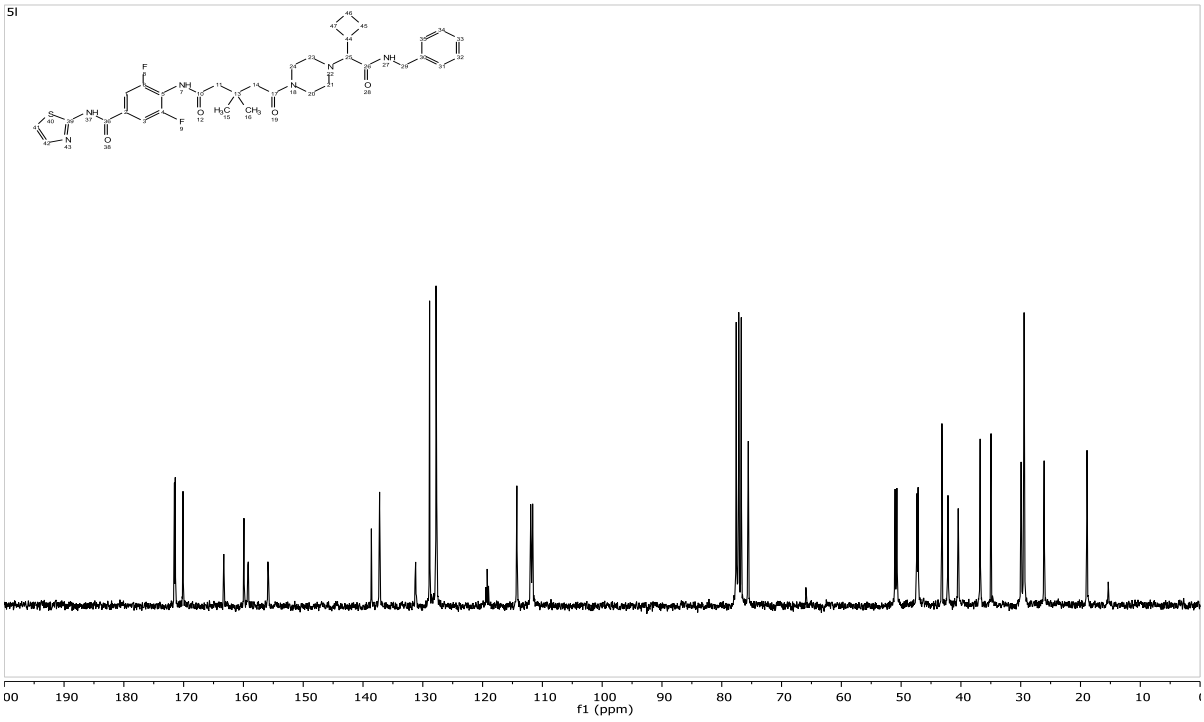


Figura 3.36. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **5l** en $CDCl_3$ (300 MHz).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.3 Evaluación farmacológica

3.2.3.1 Ensayos de afinidad

El perfil adenosinérgico (afinidad y selectividad) de los 38 nuevos derivados de la 3,5-difluoro-*N*-(tiazol-2-il)benzamida (**4a-y; 5a-l**), de las **series IV** y **V**, fue evaluado *in vitro* mediante ensayos de competición con radioligandos en los cuatro subtipos de receptores de adenosina (A_1R, $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ y A_3R). La evaluación farmacológica fue realizada en el grupo BioFarma (USC) en colaboración con los profesores María I. Loza y José Brea. Para estos estudios, los receptores de adenosina humanos fueron expresados en líneas celulares transfectadas, utilizando, células de ovario de hámster chino (CHO) para A_1R; células de carcinoma epitelial humano (HeLa) para $A_{2A}R$ y A_3R y células de riñón embrionario humano (HEK-293) para $A_{2B}R$. Los radioligandos empleados en los ensayos de unión fueron: [^{3}H]DPCPX para A_1R y $A_{2B}R$; [^{3}H]NECA para A_3R y [^{3}H]ZM241385 para $A_{2A}R$. Todos los compuestos fueron inicialmente evaluados a 1 μM y los resultados de esos estudios se muestran en la Tabla 3.2 y la Tabla 3.3. Con el fin de facilitar el análisis de la REA, los compuestos **3a-f** de la Serie III del Capítulo I fueron incluidos también en la Tabla 3.2.

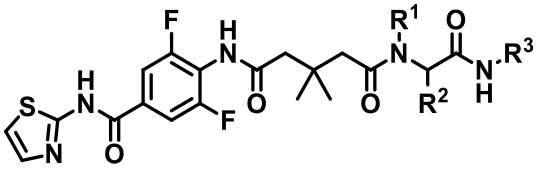
Los datos de afinidad se presentan como K_i ± SEM (nM, n = 3), obtenidos mediante ajuste por regresión no lineal utilizando el software Prism 10.0 (GraphPad, San Diego, CA). Para aquellos compuestos que no desplazaron completamente el radioligando (< 60 %), debido a su baja afinidad o solubilidad, los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la unión específica a 1 μM (n = 2, promedio).

Como control interno, empleamos diferentes antagonistas ($A_{2A}R$) de referencia (**ZM241385**, **LuAA-41063** y **Etrumadenant**) que fueron evaluados simultáneamente y bajo los mismos protocolos experimentales que nuestros ligandos. Los datos obtenidos para estos fármacos se presentan en las correspondientes tablas.

En el apartado 5 (Experimental section) se proporciona una descripción detallada de los protocolos experimentales y estadísticos empleados para la determinación de la afinidad de los compuestos en cada subtipo de receptor de adenosina.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

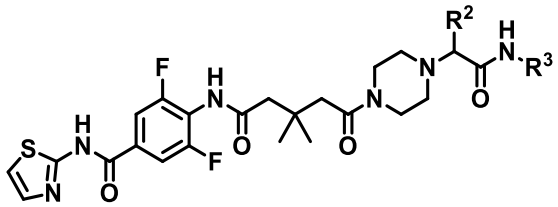
Tabla 3.2. Estructura general y datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina de los compuestos pertenecientes a la serie IV (**4a-y**).



Compuesto	R^1	R^2	R^3	K_i (nM) o % a 1 µM			
				hA_1 [a)]	hA_{2A} [b)]	hA_{2B} [c)]	hA_3 [d)]
3a	H	H	Bn	40%	24.8 ± 1.2	307 ± 11	11%
3b	H	H	*t*-Bu	6%	23.4 ± 1.3	18%	3%
3c	H	H	Cy	18%	45.7 ± 2.9	12%	18%
4a	H	H	CH_2COOCH_3	2%	45.9 ± 1.8	33%	2%
4b	H	H	CH_2CONH_2	26%	20.9 ± 1.6	37%	2%
3d	CH_3	H	Bn	21%	17.3 ± 1.5	28%	8%
3e	CH_3	H	*t*-Bu	25%	41.9 ± 2.1	22%	17%
3f	CH_3	H	Cy	13%	42.4 ± 3.5	33%	31%
4c	CH_3	H	CH_2COOCH_3	16%	36.7 ± 2.3	21%	2%
4d	CH_3	H	CH_2CONH_2	12%	24.1 ± 1.2	18%	5%
4e	H	*i*-Pr	Bn	32%	18.7 ± 1.4	201 ± 9	7%
4f	H	*i*-Pr	*t*-Bu	3%	7.10 ± 0.9	31%	14%
4g	H	*i*-Pr	Cy	12%	17.9 ± 3.1	30%	17%
4h	H	*i*-Pr	CH_2COOCH_3	9%	16.2 ± 1.2	19%	34%
4i	H	*i*-Pr	CH_2CONH_2	6%	47.5 ± 2.1	23%	3%
4j	CH_3	*i*-Pr	Bn	32%	5.40 ± 0.8	390 ± 12	2%
4k	CH_3	*i*-Pr	*t*-Bu	41%	16.5 ± 1.0	23%	16%
4l	CH_3	*i*-Pr	Cy	45%	9.90 ± 0.9	28%	20%
4m	CH_3	*i*-Pr	CH_2COOCH_3	11%	33.7 ± 2.1	10%	2%
4n	CH_3	*i*-Pr	CH_2CONH_2	50%	10.9 ± 1.2	22%	12%
4ñ	H	*c*-Pr	Bn	42%	7.90 ± 1.1	224 ± 6	28%
4o	H	*c*-Pr	*t*-Bu	9%	26.2 ± 2.1	43%	2%
4p	H	*c*-Pr	Cy	10%	10.8 ± 0.9	43%	9%
4q	H	*c*-Pr	CH_2COOCH_3	16%	26.7 ± 2.3	35%	2%
4r	H	*c*-Pr	CH_2CONH_2	12%	28.8 ± 1.4	13%	6%
4s	CH_3	*c*-Pr	Bn	34%	9.60 ± 0.7	30%	10%
4t	CH_3	*c*-Pr	*t*-Bu	20%	13.1 ± 1.2	17%	8%
4u	CH_3	*c*-Pr	Cy	44%	7.10 ± 0.6	16%	23%
4v	CH_3	*c*-Pr	CH_2COOCH_3	15%	56.8 ± 2.6	25%	12%
4w	CH_3	*c*-Pr	CH_2CONH_2	29%	8.80 ± 1.3	37%	20%
4x	H	*c*-Bu	Bn	96.3 ± 3	10.6 ± 1.2	258 ± 7	18%
4y	CH_3	*c*-Bu	Bn	37%	7.70 ± 0.9	31%	11%
LuAA-41063*	-	-	-	409	4.9	-	-
LuAA-41063**	-	-	-	344 ± 12	5.2 ± 0.6	321 ± 8	4%
Etrumadenant	-	-	-	65.0 ± 4	1.50 ± 0.3	2.00 ± 0.9	489 ± 10
ZM241385	-	-	-	683 ± 4.0	1.9 ± 0.1	65.7 ± 1.0	863 ± 4.0

[a)] Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células CHO humanas expresado como K*i* (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). [b)] Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol en células HeLa humanas expresado como K*i* (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). [c)] Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células HEK-293 humanas expresado como K*i* (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). [d)] Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]NECA en células HeLa humanas expresado como K*i* (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). [*)] Datos de afinidad extraídos de la referencia bibliográfica 237. [**)] Datos de afinidad experimentales obtenidos en nuestros ensayos.

Tabla 3.3. Estructura general y datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina de los compuestos pertenecientes a la serie V (**5a-l**).



Compuesto	R^2	R^3	Ki (nM) o % a 1 µM			
			hA_1 [a)]	hA_{2A} [b)]	hA_{2B} [c)]	hA_3 [d)]
5a	H	Bn	22%	5.60 ± 0.5	33%	9%
5b	H	*t*-Bu	4%	14.2 ± 1.9	23%	13%
5c	H	Cy	26%	13.1 ± 1.1	37%	27%
5d	H	CH_2COOCH_3	1%	28.8 ± 1.3	30%	10%
5e	H	CH_2CONH_2	2%	46.4 ± 2.0	13%	1%
5f	*i*-Pr	Bn	28%	14.9 ± 2.1	26%	8%
5g	*i*-Pr	*t*-Bu	12%	24.8 ± 1.3	19%	2%
5h	*i*-Pr	Cy	18%	16.5 ± 0.8	30%	19%
5i	*i*-Pr	CH_2COOCH_3	16%	30.6 ± 2.6	32%	14%
5j	*i*-Pr	CH_2CONH_2	11%	37.0 ± 1.9	15%	2%
5k	*c*-Pr	Bn	24%	6.80 ± 0.6	26%	6%
5l	*c*-Bu	Bn	38%	6.80 ± 1.1	23%	14%
LuAA-41063*	-	-	409	4.9	-	-
LuAA-41063**	-	-	344 ± 12	5.2 ± 0.6	321 ± 8	4%
Etrumadenant	-	-	65.0 ± 4	1.50 ± 0.3	2.00 ± 0.9	489 ± 10
ZM241385	-	-	683 ± 4.0	1.9 ± 0.1	65.7 ± 1.0	863 ± 4.0

a) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células CHO humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). b) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol en células HeLa humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). c) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células HEK-293 humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). d) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]NECA en células HeLa humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). *) Datos de afinidad extraídos de la referencia bibliográfica 237. **) Datos de afinidad experimentales obtenidos en nuestros ensayos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.3.2 Validación funcional de los ligandos

Cuatro compuestos representativos (**3a**, **3d**, **4ñ** y **5k**) fueron seleccionados para obtener información acerca del perfil funcional (agonismo o antagonismo) de las series obtenidas. Para analizar su capacidad para bloquear la actividad intrínseca del agonista del $A_{2A}R$ y del $A_{2B}R$, se evaluó el efecto sobre la acumulación de AMPc mediada por ambos receptores.

Con este fin, utilizamos células HEK-293 que sobreexpresan el $A_{2A}R$ y el $A_{2B}R$. Posteriormente, evaluamos el efecto de los compuestos **3a**, **3d**, **4ñ** y **5k** en la señalización del $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$ (experimentos separados) mediante la monitorización de la acumulación de AMPc en las células tratadas con NECA, un agonista no selectivo de los receptores de adenosina. NECA indujo una acumulación de AMPc dependiente de la concentración en las células HEK-293, con un EC_{50} $A_{2A}R$ de 257 ± 94 nM y EC_{50} $A_{2B}R$ de 356 ± 96 nM. Luego se evaluó a una concentración fija de NECA (1 μM) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de los compuestos **3a**, **3d**, **4ñ y 5k** y se calculó el valor de K_B para cada compuesto, en cada receptor, los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.4.

En general, los compuestos **3a**, **3d**, **4ñ**, y **5k** mostraron una potencia en el rango nanomolar al bloquear la acumulación de AMPc mediada por el $A_{2A}R$ y el $A_{2B}R$ en las células HEK-293, lo que confirma la actividad intrínseca antagonista de los compuestos evaluados. Los datos comparativos de K_B y K*i* para los compuestos seleccionados se muestran en la Tabla 3.4.

En el apartado 5 (Experimental section) se proporciona una descripción detallada de los protocolos empleados para la determinación de la actividad funcional sobre el $A_{2A}R$ y el $A_{2B}R$ de los compuestos seleccionados.

Tabla 3.4. Datos de actividad funcional de los compuestos **3a**, **3d, 4ñ** y **5k**.

Compuesto y selectividad	K_i *h*$A_{2A}R$ (nM)	K_B h$A_{2A}R$ (nM)	K_i *h*$A_{2B}R$ (nM)	K_B h$A_{2B}R$ (nM)
3a ($A_{2A}R$ + $A_{2B}R$)	24.8 ± 1.2	10 ± 0.9	307 ± 11	40 ± 4.2
3d ($A_{2A}R$)	17.3 ± 1.5	7.0 ± 0.5	-	-
4ñ ($A_{2A}R$ + $A_{2B}R$)	7.90 ± 1.1	3.0 ± 0.3	224 ± 6	25 ± 3.3
5k ($A_{2A}R$)	6.80 ± 0.6	1.1 ± 0.4	-	-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.3.3 Ensayos de solubilidad

Como se expuso en el apartado 2.1 (Antecedentes), una de las principales limitaciones de la molécula modelo **LuAA-41063** y de sus derivados (además de su falta de selectividad), es su bajísima solubilidad en medio acuoso (3.07 μM). La solubilidad es un parámetro fundamental en el desarrollo de fármacos (especialmente para administración por vía oral), ya que influye en su absorción, biodisponibilidad y eficacia terapéutica. Optimizar la solubilidad es esencial para garantizar que el medicamento cumpla con su propósito terapéutico de manera segura y efectiva. Para evaluar la solubilidad de los compuestos obtenidos en la presente Tesis Doctoral, se ha hecho una selección de siete antagonistas del $A_{2A}R$. Los compuestos elegidos para este propósito son: **3a**, **3d**, **4ñ**, **4s**, **4y**, **5f** y **5k**.

Para este estudio se usó la técnica de nefelometría y como se recoge en la Tabla 3.5, todos los compuestos evaluados presentan una buena solubilidad, con valores comprendidos entre 26.2 y 81.3 μM. En todos los casos, la solubilidad supera ampliamente la del compuesto de referencia. Cabe destacar especialmente los compuestos **5f** y **5k** (serie V), cuya solubilidad es aproximadamente 25 veces superior a la de LuAA-41063. Estos resultados muestran que las modificaciones en el farmacóforo secundario no solo permiten obtener ligandos potentes y selectivos frente al $A_{2A}R$, sino que también resuelven de forma eficaz los problemas de solubilidad asociados a la molécula original. En este sentido, la estrategia empleada en la serie V (basada en la reacción de Ugi-Split), incorporando una piperazina en los compuestos, ha resultado especialmente ventajosa, evidenciando un impacto muy positivo tanto en la solubilidad como en la afinidad de los compuestos. Como se observa en la Tabla 3.5, los compuestos de la serie IV presentan ya una buena solubilidad (> 30 μM), pero los ligando de la serie V con piperazina presentan más del doble de solubilidad (> 70 μM).

En el apartado 5 (Experimental section) se proporciona una descripción detallada del protocolo empleado para la determinación de la solubilidad de los compuestos.

Tabla 3.5. Solubilidad de los antagonistas $A_{2A}R$ seleccionados.

Compuesto	**LuAA-41063**	**3a**	**3d**	**4ñ**	**4s**	**4y**	**5f**	**5k**
Solubilidad* (μM)	3.07	26.2	32.6	37.8	41.8	36.9	75.6	81.3
K_i *h*$A_{2A}R$ (nM)	5.1	24.8	17.3	7.90	9.60	7.70	14.9	6.80
* Solubilidad en un buffer 1:99 DMSO/PSB								

USC SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.4 Análisis de la relación estructura-actividad

Una vez analizado en el Capítulo I el efecto de la elongación de la cadena alquílica y seleccionado el espaciador con mejores resultados [X = $C(CH_3)_2$], en esta sección se aborda de forma exhaustiva el análisis de la relación estructura-actividad derivada del patrón de sustituciones introducidas en el farmacóforo secundario (R^1, R^2 y R^3). Para ello, se emplearán los datos farmacológicos recogidos en la Tabla 3.2 y la Tabla 3.3 correspondientes a las series IV y V. Para este estudio y con fines comparativos, además de los 38 nuevos derivados, se han incluido también los 6 compuestos sintetizados en la prueba de concepto, pertenecientes a la serie III (**3a-f**).

Los ligandos que presentan un centro estereogénico han sido evaluados como mezclas racémicas y los estudios comparativos se han realizado utilizando como referencia el ligando modelo **LuAA-41063** (**VII**). En primer lugar, se analizarán los datos correspondientes a cada serie y posteriormente, se realizará un análisis comparativo entre ambas series.

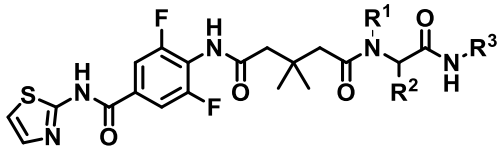


Figura 3.37.Estructura general de los ligandos de la serie IV

Empezaremos con el análisis de los datos farmacológicos obtenidos en la **serie IV** (Tabla 3.2) en busca de las tendencias que permitan identificar patrones estructurales clave que influyan en su afinidad y selectividad hacia el $A_{2A}R$. Se analizará de forma independiente la influencia de cada sustituyente y al finalizar se hará una valoración conjunta de las mejores combinaciones de sustituyentes para obtener antagonistas selectivos del $A_{2A}R$.

En base a su perfil de afinidad frente a los ARs (Tabla 3.2), los compuestos sintetizados en la serie IV pueden agruparse de la siguiente forma:

1) **Antagonistas selectivos del $A_{2A}R$**: 22 compuestos. Todos con una K_i < 60 nM, entre ellos, merecen especial atención 9 antagonistas, los cuales presentan una K_i $A_{2A}R$ < 15 nM (marcados en verde en la Figura 3.38).
2) **Antagonistas duales A_{2A}/A_{2B}**: 4 compuestos. Todos presentan una buena afinidad por el $A_{2A}R$ (K_i < 25 nM) además de una incipiente afinidad por el $A_{2B}R$ (K_i entre 201 y 390 nM) (Figura 3.38).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

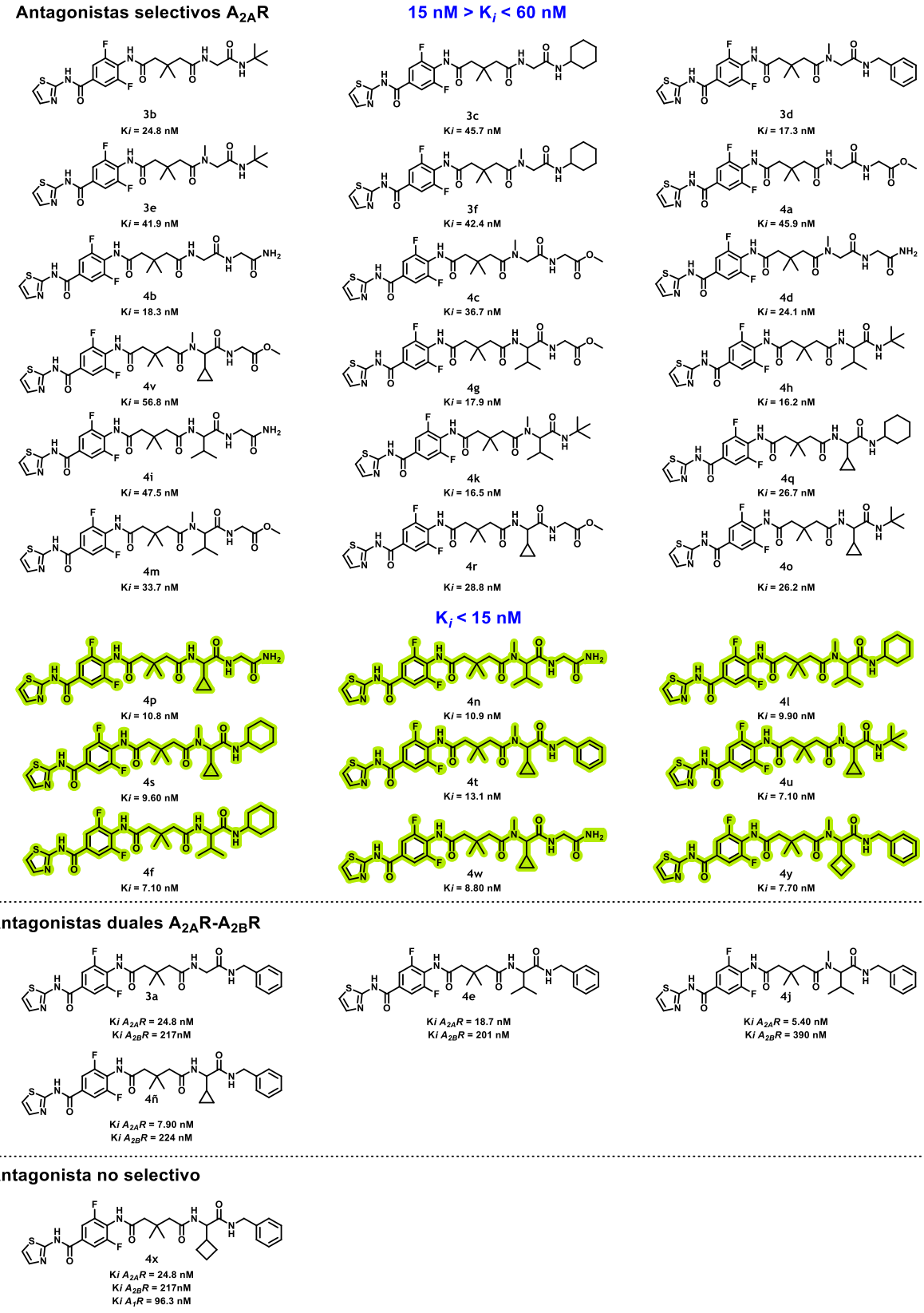


Figura 3.38. Ligandos de la serie IV agrupados en base a su afinidad $A_{2A}R$. Resaltados en verde los 9 antagonistas con una K_i $A_{2A}R$ < 15 nM.

Efecto del sustituyente en R^1

En la serie IV se mantuvieron los sustituyentes empleados en R^1 durante la prueba de concepto del Capítulo I (un átomo de hidrógeno y un grupo metilo). No obstante, los resultados obtenidos no permiten establecer una tendencia general inequívoca en cuanto a qué sustituyente confiere una mejor afinidad por el $A_{2A}R$. Aunque en general los datos de K_i $A_{2A}R$ son mejores cuando $R^1 = CH_3$, el efecto parece estar condicionado por la naturaleza del grupo presente en R^3.

De esta forma tenemos que, cuando R^3 = Bn, Cy o CH_2CONH_2 los derivados con $R^1 = CH_3$ (compuestos **4j**, **4l**, **4u** y **4n**) generalmente muestran una mayor afinidad por el $A_{2A}R$ que sus análogos con R^1 = H (compuestos **4e**, **4g**, **4p** y **4i**) (Tabla 3.2) (Figura 3.39A). Por otro lado, cuando R^3 = *t*-Bu o CH_2COOCH_3 los derivados con R^1 = H presentan mayor afinidad $A_{2A}R$ [(**4f**, **4h**, **4i**, **4o**, y **4q**) que sus análogos con $R^1 = CH_3$ (**4k**, **4m**, **4n**, **4t** y **4v**)] (Figura 3.39B) (Tabla 3.2). Cabe destacar que la tendencia anteriormente mencionada se observa únicamente cuando R^2 = *i*-Pr, *c*-Pr o *c*-Bu, ya que, cuando R^2 = H esta tendencia no se cumple.

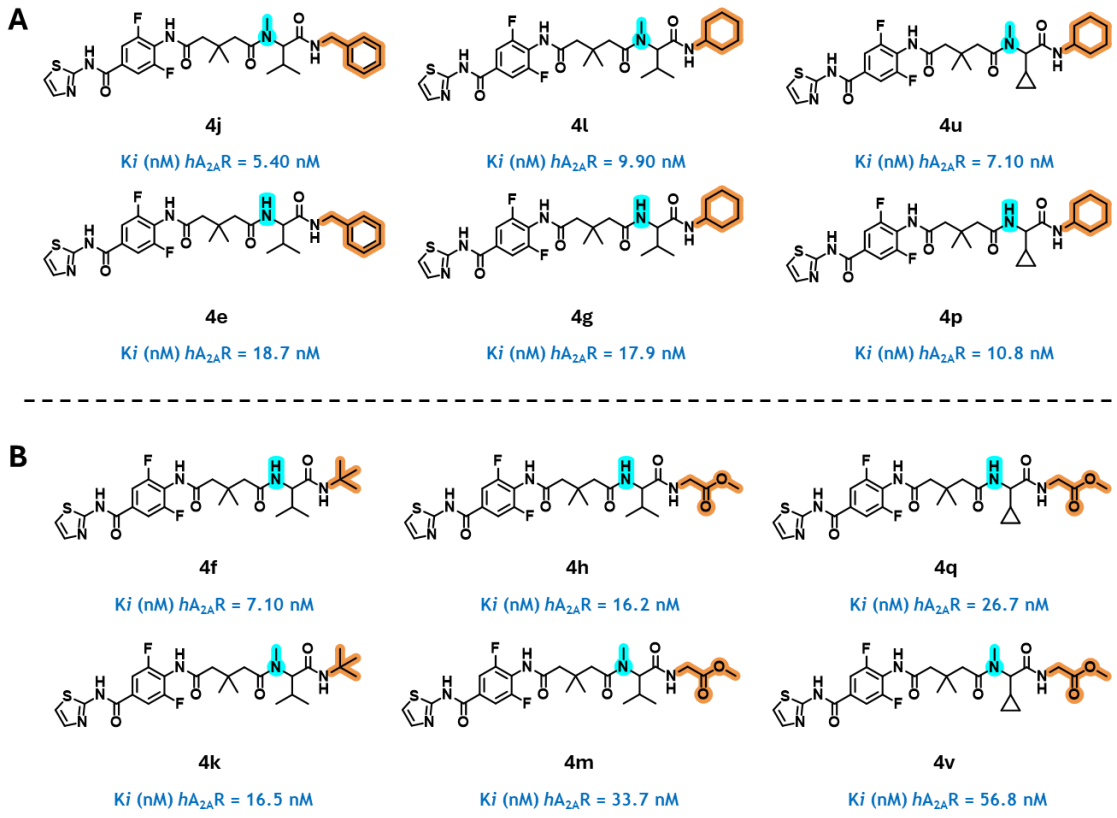


Figura 3.39. Comparación de la variación del efecto del sustituyente en R^1 dependiendo del R^3 utilizado. A) En los derivados con Bn y Cy los compuestos con $R^1 = CH_3$ tienen mayor afinidad. B) En los derivados con *t*-Bu y CH_2-$COOCH_3$ los compuestos con R^1 = H tienen mayor afinidad.

El análisis de los datos recogidos en la Tabla 3.2 revela una tendencia adicional. En los compuestos en los que R^1 = H y R^3 = Bn, se observa una incipiente afinidad por el $A_{2B}R$, como es el caso de los compuestos **3a**, **4ñ** y **4x**. Esta afinidad, sin embargo, desaparece en los análogos correspondientes con R^1 = CH_3 (**3d**, **4s** y **4y**), lo que sugiere que la presencia de un grupo metilo en R^1 podría limitar una interacción clave con el $A_{2B}R$ (Figura 3.40A). Una excepción a esta tendencia la constituyen los compuestos **4e** y **4j**, que presentan afinidad dual frente a $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$ independientemente del sustituyente en R^1, aunque cuando R^1 = CH_3 (**4e**), dicha afinidad hacia $A_{2B}R$ es menos pronunciada (Figura 3.40B) (Tabla 3.2).

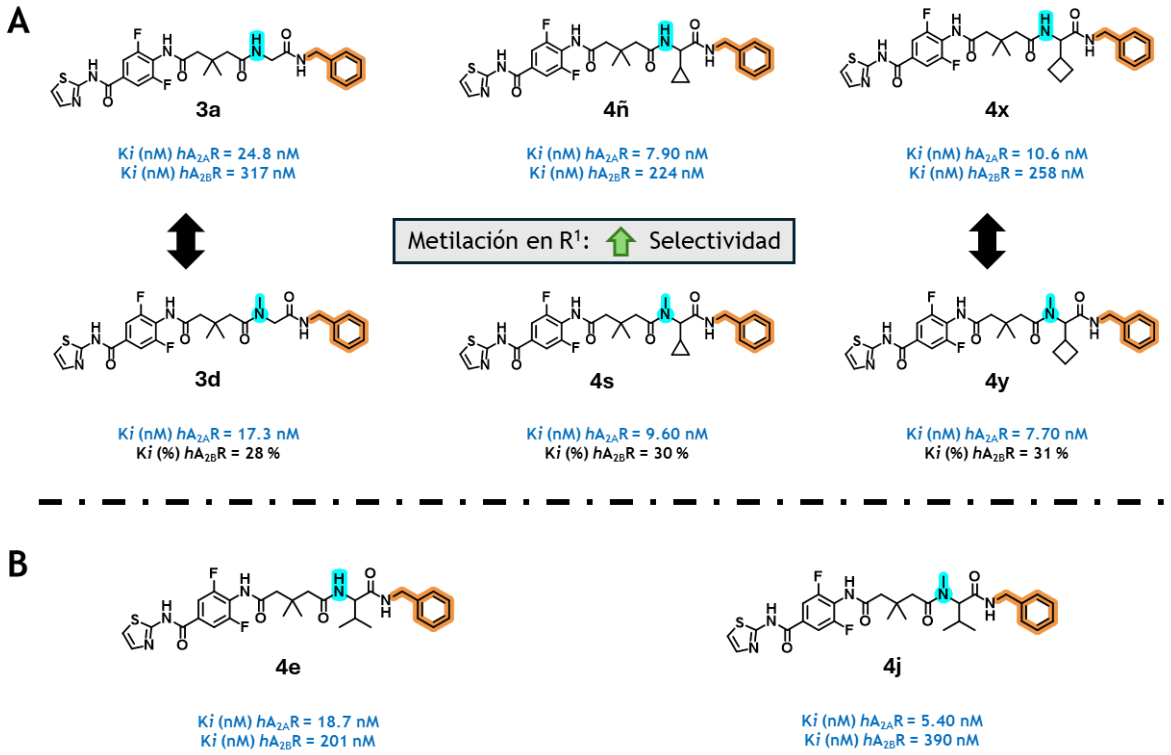


Figura 3.40. Aumento de la selectividad de los derivados mediante *N*-metilación en la posición R^1.

Efecto del sustituyente en R^2

Como parte de la estrategia de optimización estructural aplicada en la Serie IV, se introdujeron cuatro diversidades en la posición R^2. Además del hidrógeno, previamente evaluado en la prueba de concepto descrita en el Capítulo I, se incorporaron tres nuevos sustituyentes: isopropilo (*i*-Pr), ciclopropilo (*c*-Pr) y ciclobutilo (*c*-Bu). La selección de estos grupos se realizó siguiendo un criterio de incremento tanto en volumen estérico como en

USC

rigidez, con el objetivo de evaluar de forma sistemática el impacto del entorno estérico e hidrofóbico sobre la afinidad y selectividad hacia el $A_{2A}R$. A continuación, se analizará de manera individual el efecto de cada sustituyente sobre la afinidad de los compuestos, para posteriormente realizar una valoración comparativa que permita identificar cuál de ellos resulta más favorable para alcanzar una buena afinidad y selectividad por el $A_{2A}R$. Es importante señalar que la introducción de los grupos *i*-Pr, *c*-Pr y *c*-Bu confiere un centro estereogénico a los derivados. Los datos recopilados en la Tabla 3.2 corresponden a la evaluación de los compuestos como mezclas racémicas.

Cuando R^2 = H (compuestos **3a-f** y **4a-d**), los compuestos muestran una afinidad moderada por $A_{2A}R$, con valores de K_i comprendidos entre 17.3 y 45.9 nM. Todos estos derivados, con la excepción del compuesto **3a** (K_i $A_{2B}R$ = 307 nM), poseen una excelente selectividad frente al $A_{2A}R$ (Tabla 3.2). Este sustituyente es el que peores resultados de afinidad demuestra entre todos los sustituyentes explorados en R^2.

Con la introducción del grupo isopropilo en R^2 (compuestos **4e-n**), se observa una mejora general en la afinidad de los compuestos respecto a sus análogos con R^2 = H, obteniéndose valores de K_i entre 5.40 y 47.5 nM (Tabla 3.2). Este resultado sugiere que la incorporación de grupos con mayor tamaño en dicha posición favorece interacciones adicionales, presumiblemente de tipo hidrofóbico, o cambios tridimensionales en el compuesto que favorezcan alguna interacción con su sitio de unión en el $A_{2A}R$. Todos los compuestos a excepción de **4e** y **4j** (Tabla 3.2), mostraron una excelente selectividad por el $A_{2A}R$.

Al introducir un grupo ciclopropilo en R^2 (compuestos **4ñ-w**), se observó nuevamente una mejora global en la afinidad por el $A_{2A}R$, en comparación con sus análogos con R^2 = H, obteniéndose valores de K_i entre 7.10 y 56.8 nM (Tabla 3.2). Si comparamos los compuestos donde R^2 = *i*-Pr observamos que ambos presentan una afinidad $A_{2A}R$ similar. Estos datos sugieren que la volver más rígido el grupo no afecta en gran medida a la interacción con el $A_{2A}R$. Todos los compuestos, a excepción del **4ñ** (K_i $A_{2B}R$ = 224 nM), mostraron una completa selectividad frente al $A_{2A}R$ (Tabla 3.2).

Para evaluar de forma preliminar el impacto de la expansión del anillo de ciclopropilo decidimos obtener análogos con un anillo de ciclobutilo. Solo se han sintetizado dos derivados de este tipo, ya que se observó que, cuando R^2 = *c*-Bu y R^1 = H (**4x**), el compuesto presentaba también afinidad frente al A_1R (K_i A_1R = 96.3 nM), comportándose como un ligando no

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

selectivo (Tabla 3.2). Sin embargo, se pudo comprobar nuevamente como la metilación en R^1 restauraba la selectividad por el $A_{2A}R$ (compuesto **4y**) (Tabla 3.2).

Al comparar globalmente los cuatro sustituyentes introducidos en R^2, se puede establecer el siguiente orden de afinidad por el $A_{2A}R$: *i*-Pr = *c*-Pr > *c*-Bu > H (Figura 3.41). Se puede concluir que, tanto el isopropilo como el ciclopropilo resultan ser los sustituyentes más favorables en términos de afinidad por el $A_{2A}R$. Ambos permiten mejorar la afinidad de los compuestos por el $A_{2A}R$, probablemente debido a una combinación adecuada de volumen, flexibilidad (isopropilo) o rigidez conformacional (ciclopropilo). Por el contrario, aunque el grupo ciclobutilo presenta un perfil aceptable, su mayor tamaño podría estar limitando la eficacia de la interacción.

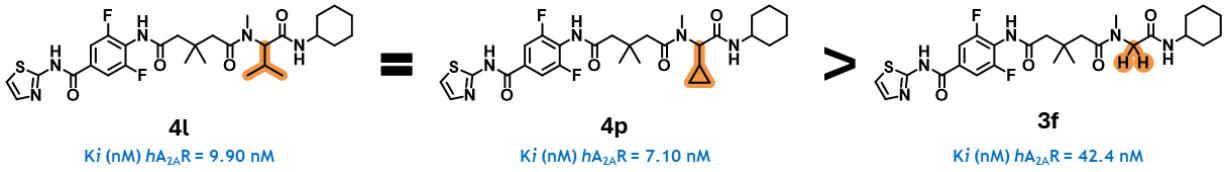


Figura 3.41. Comparación del impacto del sustituyente en R^2 en la afinidad de los derivados.

Efecto del sustituyente en R^3

Se realizaron cinco modificaciones estructurales con el objetivo de evaluar la influencia del grupo R^3 en la unión a $A_{2A}R$. Para ello, se conservaron los tres sustituyentes apolares introducidos en la prueba de concepto del Capítulo I (Bn, *t*-Bu y Cy), y se incorporaron además dos nuevos grupos de naturaleza más polar (CH_2-$COOCH_3$ y CH_2-$CONH_2$).

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 3.2, se observa que los sustituyentes apolares (Bn, Cy y *t*-Bu) presentan, en general, una mayor afinidad por el $A_{2A}R$, en comparación con los sustituyentes polares (CH_2-$COOCH_3$ y CH_2-$CONH_2$).

Entre los grupos apolares, el ciclohexilo es el que ofrece los resultados más consistentes en términos de afinidad y selectividad hacia el $A_{2A}R$ (Figura 3.42). En particular, cuando R^3 = Cy y R^2 = *i*-Pr o *c*-Pr, se obtienen valores de afinidad comprendidos entre 7.10 y 17.3 nM (compuestos **4g**, **4l**, **4p** y **4u**) (Tabla 3.2). Por el contrario, cuando R^3 = Cy y R^2 = H, la afinidad disminuye entre 3 y 7 veces, como se observa en los compuestos **3c** y **3f** (K_i $A_{2A}R$ = 45.7 y 42.4 nM, respectivamente) (Tabla 3.2). Esto sugiere que el grupo en Cy funciona mejor cuando $R^2 \neq$ H.

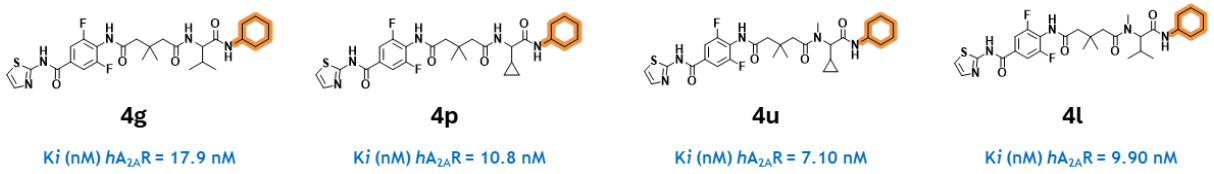


Figura 3.42. Resultados de afinidad de compuestos con R^3 = Cy

El segundo grupo apolar que ofrece resultados más satisfactorios, en términos de afinidad y selectividad hacia el $A_{2A}R$, es el *terc*-butilo (Figura 3.43). Se observa una tendencia muy similar a la descrita para el ciclohexilo: cuando R^3 = *t*-Bu y R^2 = *i*-Pr o *c*-Pr, los compuestos presentan una elevada afinidad por el $A_{2A}R$, con valores de K_i comprendidos entre 7.10 y 26.2 nM (compuestos **4f**, **4k**, **4o** y **4t**) (Tabla 3.2). Por el contrario, cuando R^3 = *t*-Bu y R^2 = H, la afinidad disminuye de forma significativa, como se aprecia en los compuestos **3b** y **3e** (K_i $A_{2A}R$ = **23.4** y **41.9 nM**, respectivamente) (Tabla 3.2) (Figura 3.43). Estos resultados sugieren, de nuevo, que la eficacia del sustituyente en R^3 depende también del volumen del grupo presente en R^2, lo que sugiere una combinación sinérgica de efectos estéricos-hidrofóbicos entre ambas posiciones.

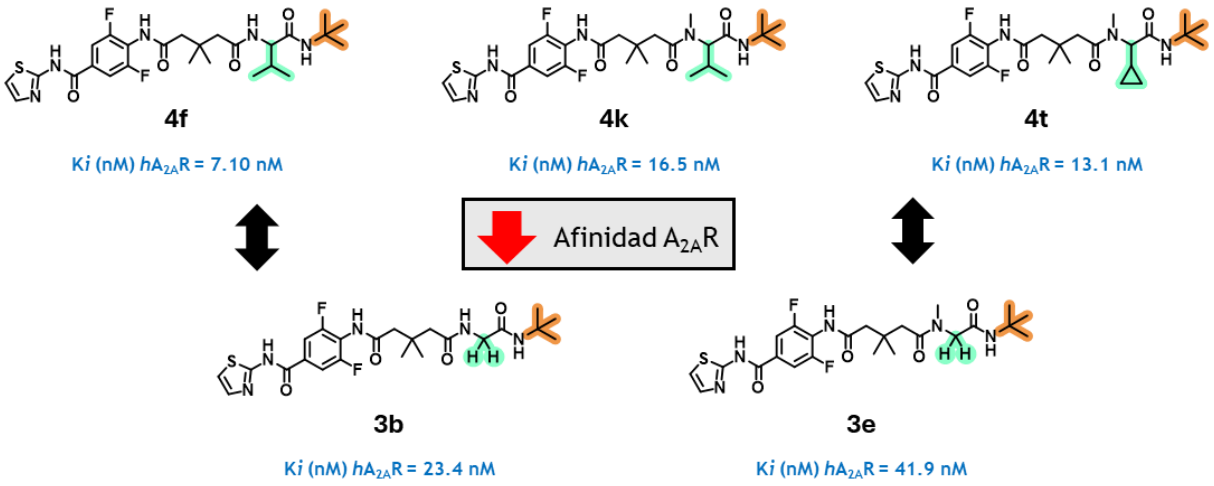


Figura 3.43. Resultados de afinidad de los compuestos con R^3 = *t*-Bu.

El último grupo apolar analizado fue el Bn, el cual mostró el comportamiento más interesante y diverso entre los tres sustituyentes apolares evaluados. Tal y como se mencionó previamente (cuando se analizó R^1), cuando R^3 = Bn y R^1 = H, se observa una incipiente y sistemática afinidad frente al $A_{2B}R$, con valores de K_i comprendidos entre 201 y 224 nM (Tabla

3.2). Estos compuestos, además, mantienen una buena afinidad hacia el $A_{2A}R$, con valores de K_i que oscilan entre 5.40 y 24.8 nM, lo que genera un perfil de afinidad dual (compuestos **3a**, **4e**, **4ñ** y **4x**) (Tabla 3.2) (Figura 3.40). Este patrón de afinidad dual parece estar fuertemente influido por la naturaleza del sustituyente en R^1 y en R^3, mientras que el grupo en R^2 no ejerce un efecto significativo. En particular, cuando $R^1 = CH_3$ se elimina la afinidad por el $A_{2B}R$, favoreciendo la selectividad hacia el $A_{2A}R$. Este último comportamiento se evidencia en los compuestos **3d**, **4s** y **4y**, los cuales presentan una afinidad considerable por el $A_{2A}R$ con valores de K_i comprendidos entre 7.70 y 24.8 nM, pero carecen de afinidad frente al $A_{2B}R$ (Tabla 3.2) (Figura 3.40A). La única excepción a esta tendencia es el compuesto **4j**, que, a pesar de presentar $R^1 = CH_3$, posee una ligera afinidad por el $A_{2B}R$ (K_i = 390 nM), si bien es la menor observada dentro de este subgrupo (Figura 3.40B). Este resultado sugiere que, aunque la metilación en R^1 tiende a abolir el perfil dual, otros factores estructurales pueden contribuir marginalmente a la retención de la unión por el $A_{2B}R$.

Dentro de la serie IV, el grupo CH_2CONH_2 en posición R^3 ha demostrado ser especialmente favorable en términos de afinidad y selectividad $A_{2A}R$, proporcionando valores de K_i comprendidos entre 8.80 y 47.5 nM. Este grupo (polar y flexible) proporciona los mejores datos dentro de esta serie. Se confirma la tendencia observada anteriormente: cuando $R^3 = CH_2COONH_2$, R^2 = *i*-Pr o *c*-Pr, y $R^1 = CH_3$ (compuestos **4n** y **4w**) (K_i $A_{2A}R$ = 10.9 y 8.80 nM, respectivamente), los derivados presentan una afinidad 2–4 veces superior a la de sus análogos con R^1 = H (compuestos **4i** y **4r**) (K_i $A_{2A}R$ = 47.5 y 28.8 nM, respectivamente) (Tabla 3.2) (Figura 3.44). Este comportamiento sugiere que el grupo metilo en R^1 favorece una disposición óptima del grupo amida de R^3, pero solo cuando el grupo en R^2 es voluminoso. La presencia de *i*-Pr o *c*-Pr probablemente contribuye a un entorno estérico adecuado que estabiliza la interacción del ligando con el receptor. Por el contrario, cuando R^2 = H, este efecto se anula: el compuesto con R^1 = H (**4b**) presenta mayor afinidad (K_i $A_{2A}R$ = 18.3 nM) que su análogo metilado (**4d**) (K_i $A_{2A}R$ = 24.1 nM) (Tabla 3.2) (Figura 3.44). Esto sugiere que, en ausencia de un sustituyente voluminoso en R^2, el grupo metilo en R^1 puede generar una orientación menos favorable del ligando en el sitio de unión, posiblemente por pérdidas en interacciones clave o cambios conformacionales.

Una posible explicación para el efecto observado en relación con el grupo R^1 se basa en la naturaleza del enlace amida. Cuando R^1 = H tenemos una amida secundaria del tipo [R–CO–NH–R'], la estructura resultante tiende a ser más rígida y plana, debido a la mayor

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

conjugación entre el orbital del nitrógeno y el sistema carbonílico. Esta conjugación favorece una geometría coplanar y permite, además, la formación de enlaces de hidrógeno tanto intra- como intermoleculares, lo cual puede estabilizar conformaciones específicas y favorecer la interacción con el sitio de unión del $A_{2A}R$.

En cambio, cuando $R^1 = CH_3$ tenemos una amida terciaria del tipo [R–CO–NMe–R'], la presencia del grupo metilo en el nitrógeno impide la formación de enlaces de hidrógeno y reduce la eficiencia de la conjugación con el carbonilo. Esta disminución de la conjugación incrementa la flexibilidad conformacional del enlace amida, permitiendo una mayor rotación alrededor del eje C–N. Como consecuencia, la orientación del grupo amida puede ajustarse mejor al sitio de unión del receptor $A_{2A}R$, lo que podría afectar tanto la afinidad como la selectividad del ligando.

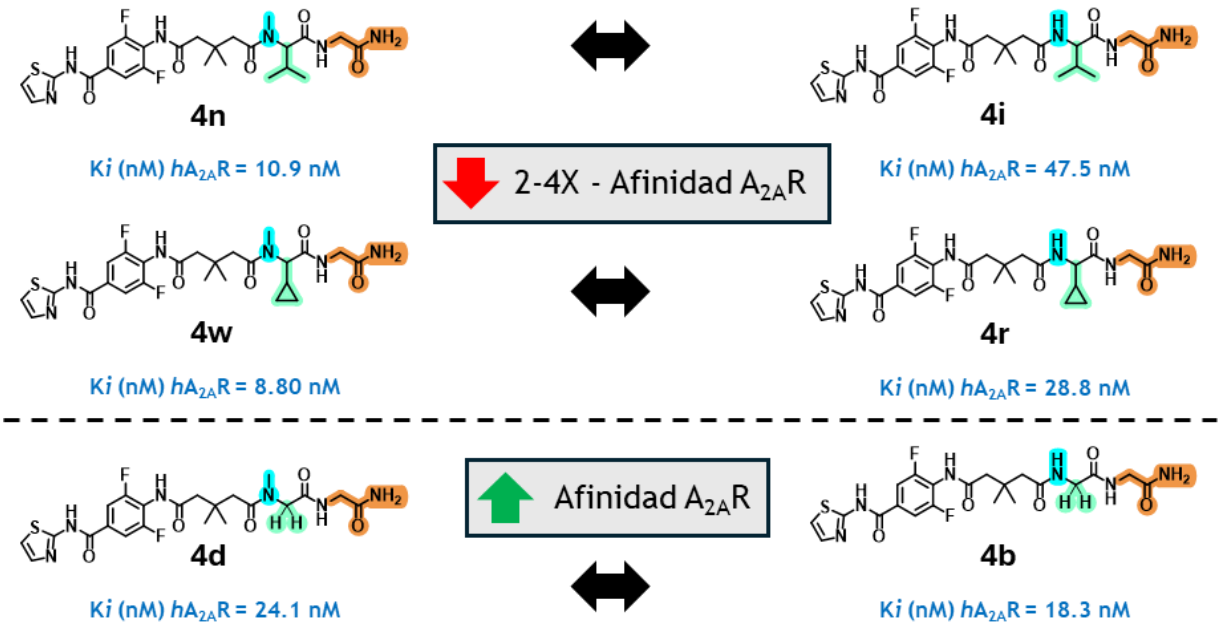


Figura 3.44. Representación gráfica de la tendencia observada en la afinidad debida al efecto de los sustituyentes en R^1 y R^2 cuando $R^3 = CH_3\text{-}CONH_2$.

En contraste con el comportamiento observado para el grupo CH_2CONH_2, el sustituyente CH_2COOCH_3 en posición R^3 es el que peores resultados proporciona en términos de afinidad y selectividad hacia el $A_{2A}R$, con valores de K_i comprendidos entre 16.2 y 56.8 nM. Con el grupo éster, se observa una tendencia inversa a la comentada previamente (con CH_2CONH_2): cuando $R^3 = CH_2COOCH_3$, $R^2 = i\text{-Pr}$ o $c\text{-Pr}$, y $R^1 = CH_3$ (compuestos **4m** y **4v**)

(K_i $A_{2A}R$ = 33.7 y 56.8 nM, respectivamente), los derivados presentan una afinidad aproximadamente 2 veces inferior a la de sus análogos con R^1 = H (compuestos **4h** y **4q**) (K_i $A_{2A}R$ = 16.2 y 26.7 nM, respectivamente) (Tabla 3.2) (Figura 3.45). Estos resultados sugieren que el grupo metilo en R^1, en este contexto, no favorece una orientación óptima del sustituyente en R^3 dentro del bolsillo de unión del receptor cuando el grupo en R^2 es voluminoso. Es probable que el aumento en el volumen global del ligando comprometa las interacciones necesarias para una unión eficaz. Por el contrario, cuando R^2 = H, el efecto del grupo metilo en R^1 se revierte nuevamente: el compuesto con R^1 = CH_3 (**4c**) (K_i $A_{2A}R$ = 36.7 nM) muestra una afinidad ligeramente mayor que su análogo no metilado (**4a**) (K_i $A_{2A}R$ = 45.9 nM) (Tabla 3.2), lo que indica que en ausencia de impedimento estérico en R^2, el grupo metilo puede recuperar un papel estabilizador en la orientación del ligando (Figura 3.45). Este efecto observado con el sustituyente en R^1 puede ser debido a la flexibilidad (o no) del enlace amida comentado anteriormente, o a la capacidad (o no) de formar enlaces de hidrógeno.

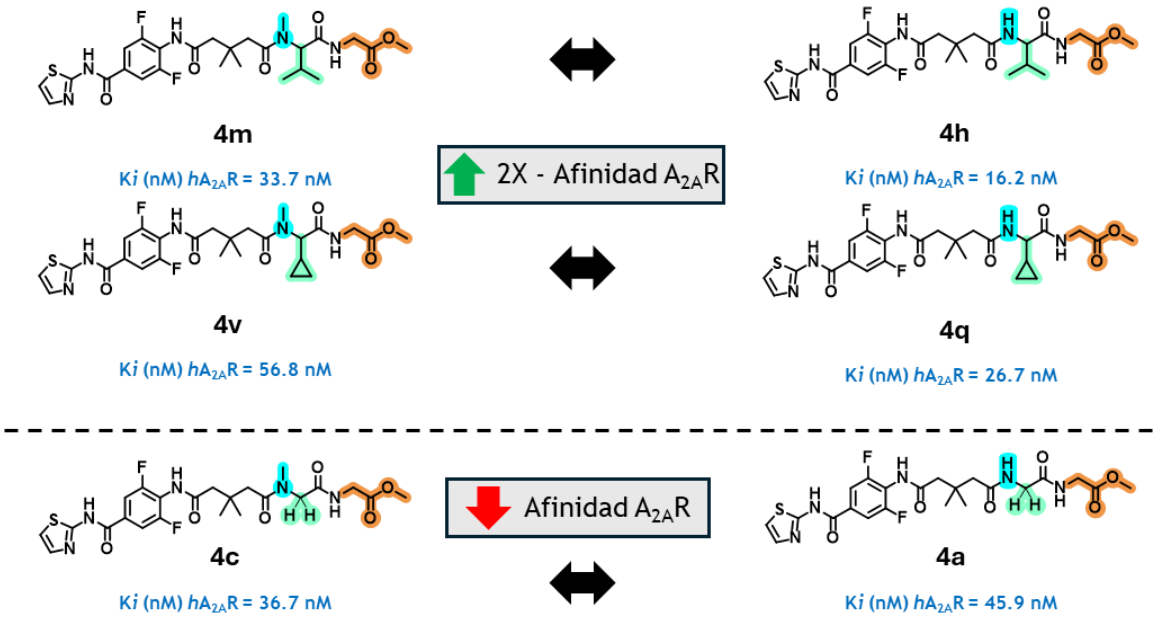


Figura 3.45. Representación gráfica de la tendencia observada en la afinidad debida al efecto de los sustituyentes en R^1 y R^2 cuando R^3 = CH_3COOCH_3.

Una vez analizada la REA de la serie IV, podemos concluir que se han sintetizado varios ligandos que no solo mantienen una afinidad comparable a la del ligando de referencia, **LuAA-41063** por el $A_{2A}R$, sino que además presentan una mejora significativa en términos de selectividad (Tabla 3.2). Estos resultados ponen de manifiesto que es posible optimizar el perfil

de afinidad y selectividad del compuesto original mediante modificaciones en el farmacóforo secundario empleando la reacción U-4CR. En la Figura 3.46 se muestra, a modo de ejemplo, una comparación entre tres de los mejores ligandos obtenidos en la serie IV y el ligando de referencia, donde se hacen evidentes las mejoras alcanzadas tanto en afinidad como en perfil de selectividad de los nuevos derivados.

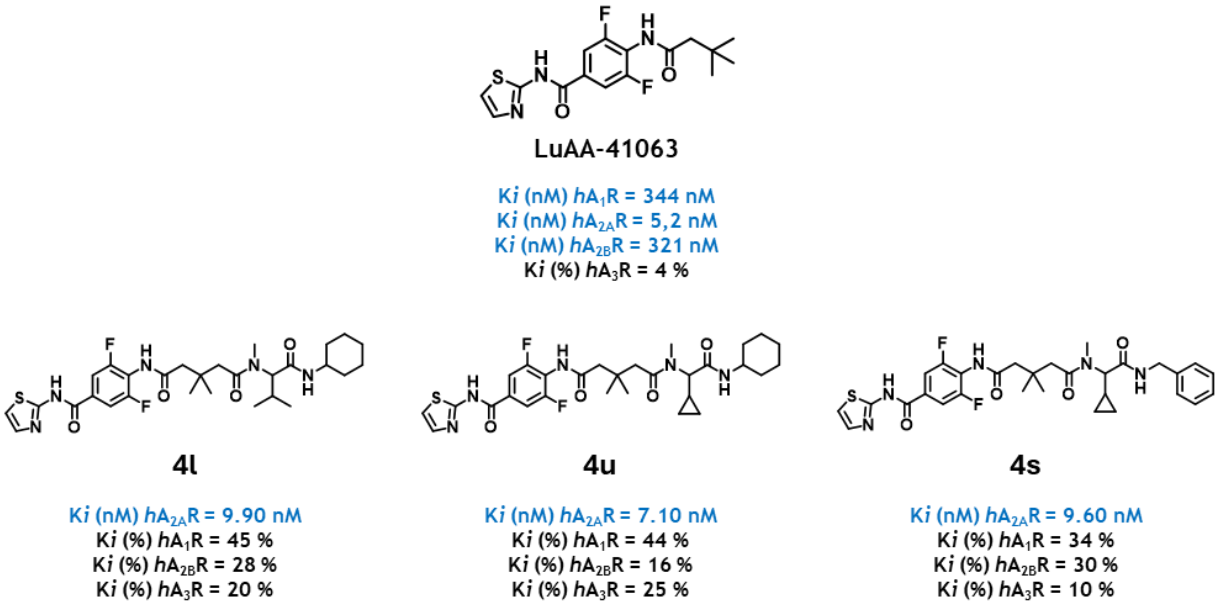


Figura 3.46. Selección de los mejores ligandos del $A_{2A}R$ de la serie IV y su comparación con el ligando de referencia.

Después de analizar la influencia de cada sustituyente de manera individual y de comparar los datos de afinidad con los del ligando modelo, a modo de resumen se muestra un análisis de las combinaciones más favorables de sustituyentes en el farmacóforo secundario, con el objetivo de identificar aquellos patrones que conducen a la obtención de ligandos selectivos del $A_{2A}R$. Debido a la aparición de compuestos con afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$, se realizará también un breve análisis de la mejor combinación para la obtención de este tipo de compuestos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ligandos selectivos A_{2A}

La combinación más favorable de sustituyentes para obtener compuestos potentes y selectivos por el $A_{2A}R$ se observa cuando R^1 = CH_3, R^2 = *i*-Pr o *c*-Pr y R^3 = Cy, *t*-Bu o CH_2CONH_2 (**4k**, **4l**, **4n**, **4t**, **4u** y **4w**), donde los compuestos poseen todos una K_i $A_{2A}R$ < 16.5 nM, además de una excelente selectividad. En la Figura 3.47 se muestran los resultados farmacológicos de los derivados sintetizados con la mejor combinación de sustituciones para obtener ligandos con gran afinidad y selectivos por el $A_{2A}R$ sintetizados en la serie IV.

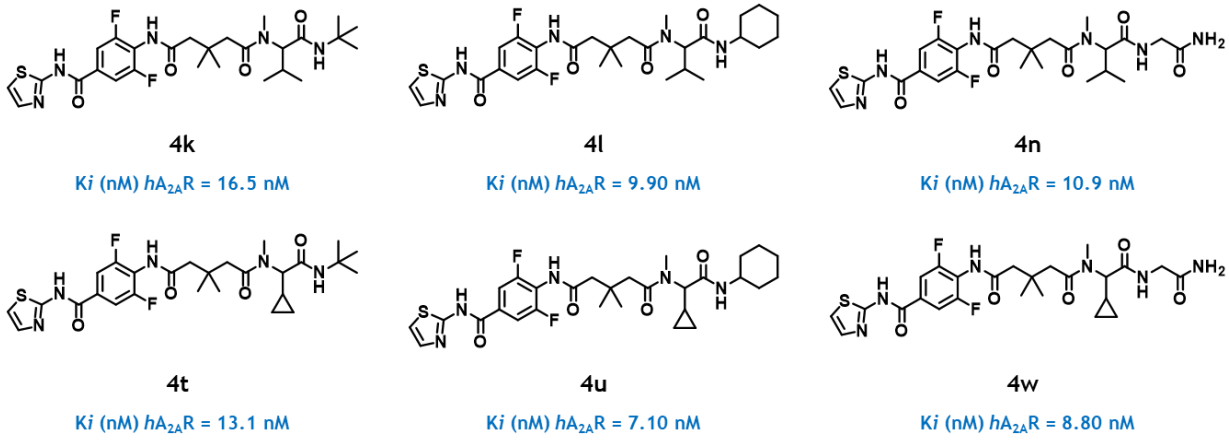


Figura 3.47. Mejores antagonistas selectivos del $A_{2A}R$ obtenidos en la serie IV.

Ligandos duales A_{2A}/A_{2B}

La combinación más favorable de sustituyentes para obtener compuestos con afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ se observa cuando R^1 = H, R^2 = H, *i*-Pr y *c*-Pr y R^3 = Bn (**3a**, **4e**, y **4ñ**), donde los compuestos poseen todos una K_i $A_{2A}R$ < 25.0 nM, y una K_i $A_{2B}R$ < 225 nM. En la Figura 3.48 se muestran los resultados farmacológicos de los derivados con la mejor combinación de sustituciones para obtener ligandos con afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ sintetizados en la serie IV.

La identificación de esta tendencia motivó la síntesis una nueva serie exploratoria (**serie VI**) en el Capítulo III. Como se discutirá en el siguiente capítulo, en esta serie se llevará a cabo una exploración que permita conocer en detalle y potenciar el perfil dual $A_{2A}R/A_{2B}R$.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

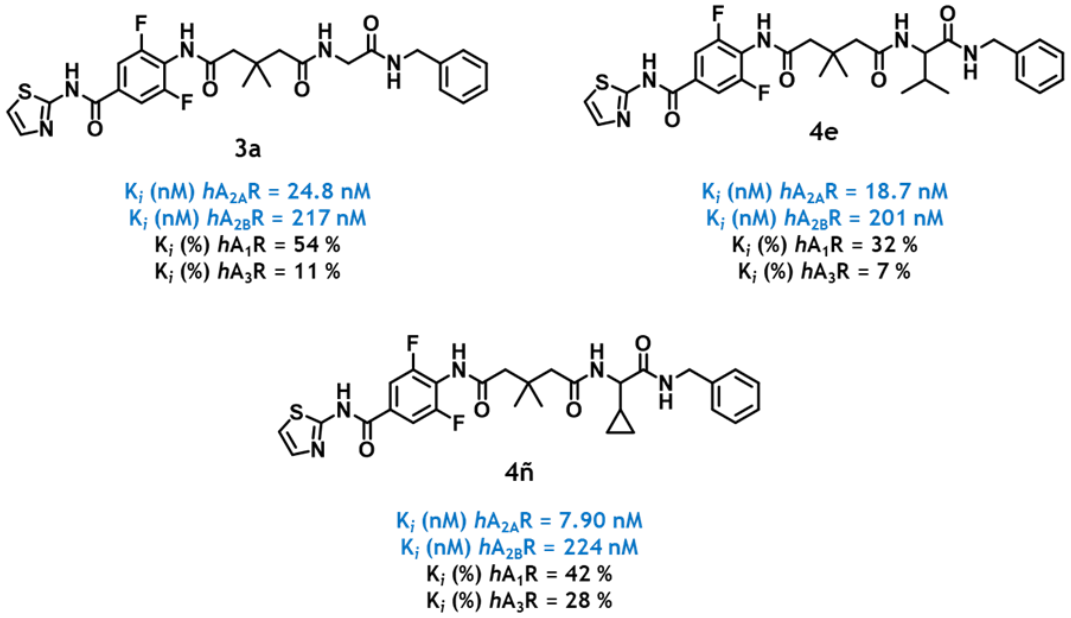


Figura 3.48. Mejores antagonistas con afinidad dual A_{2A}/A_{2B} obtenidos en la serie IV.

A continuación, se analizarán los datos farmacológicos correspondientes a la **serie V** (Tabla 3.3). Cabe recordar que esta serie fue diseñada con el objetivo de disponer de nuevos quimiotipos que faciliten el desarrollo de antagonistas selectivos del $A_{2A}R$ con mayor solubilidad. Para ello, se incorporó un anillo de piperazina en la estructura de los compuestos, empleando una variante sintética de la U-4CR, la Ugi-Split. La serie V está formada por 12 compuestos (**5a-l**), que presentan una gran selectividad por el $A_{2A}R$ y unos valores de K_i $A_{2A}R$ comprendidos entre **5.60** y **46.4 nM**. Debido al menor número de compuestos analizaremos la REA de forma conjunta.

Como es evidente, en esta serie no tenemos un grupo en R^1, sin embargo, la incorporación de un anillo de piperazina hace que los compuestos se asemejen estructuralmente a los derivados de la serie IV con $R^1 = CH_3$ (Figura 3.49). A pesar de esto, la incorporación de la piperazina a los compuestos aumenta la distancia entre los dos grupos carbonilos (Figura 3.49), por lo que, se deduce que las interacciones de la amida terminal sean, a priori, diferentes entre las dos series.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

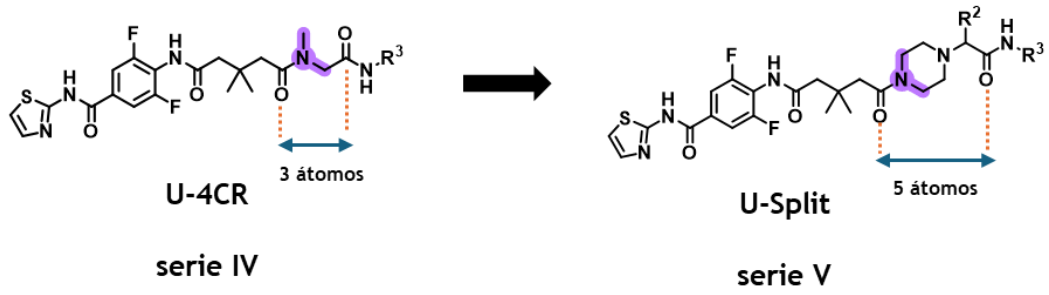


Figura 3.49. Analogía estructural entre los compuestos $R^1 = CH_3$ de la serie IV y los compuestos de la serie V.

En la serie V, las sustituciones en R^2 actúan de forma opuesta a lo observado en la serie IV, así los compuestos con R^2 = H (**5a–d**) presentan, en general, mejor afinidad por el $A_{2A}R$ que los compuestos con sustituyentes R^2 (Figura 3.50). La excepción a esta tendencia es el compuesto **5e** (R^2 = H; K_i $A_{2A}R$ = 46.4 nM), ligeramente con menos afín que el compuesto **5j** (R^2 = *i*-Pr; K_i $A_{2A}R$ = 37.0 nM) (Tabla 3.3). La presencia del anillo de piperazina podría modificar la disposición espacial, haciendo que el sitio de unión tolere mejor sustituyentes pequeños como el hidrógeno, mientras que grupos más voluminosos como *i*-Pr o *c*-Pr resulten menos favorables.

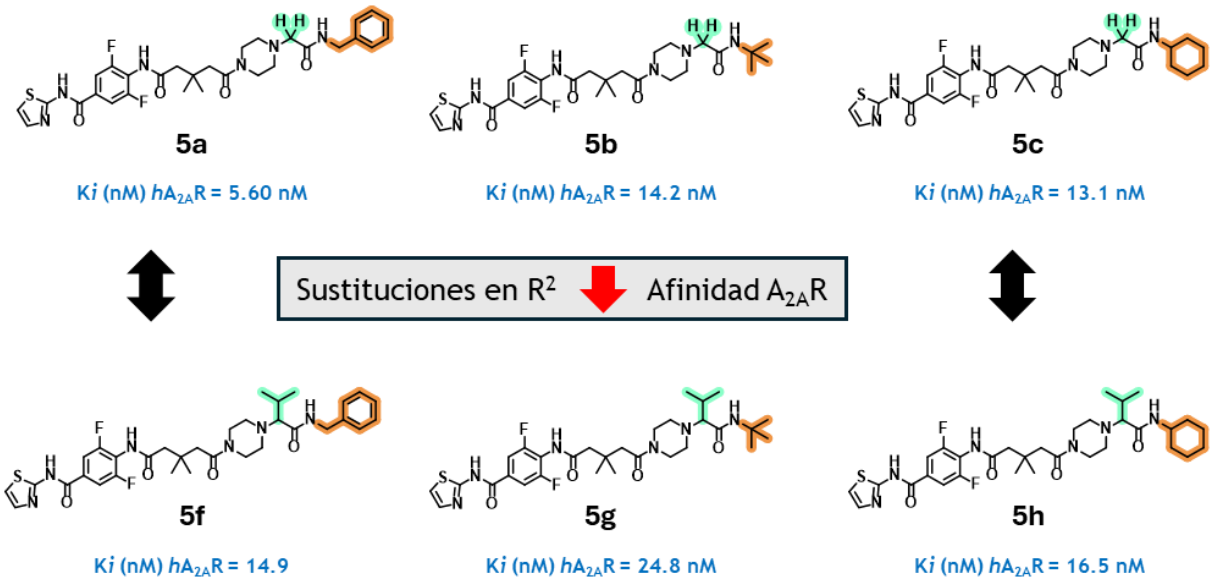


Figura 3.50. Comparación en la afinidad por el $A_{2A}R$ en base a la sustitución en R^2.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Respecto a R^3, los grupos apolares siguen siendo los más efectivos, proporcionando K_is entre 5.60 y 24.8 nM. El grupo bencilo (**5a**, **5f**, **5k**, **5l**) es el mejor sustituyente, con afinidades < 14.9 nM. En particular, **5a**, **5k** y **5l** (K_i $A_{2A}R$ = 6–7 nM) (Tabla 3.3) (Figura 3.51A) muestran una alta afinidad independientemente del R^2, lo que sugiere una unión preferente del grupo bencilo con el receptor. Cuando R^3 = Cy, la afinidad es buena independientemente de R^2, como se observa en **5c** (R^2 = H; K_i $A_{2A}R$ = 13.1 nM) y **5h** (R^2 = *i*-Pr; K_i $A_{2A}R$ = 16.5 nM) (Figura 3.51B). En el caso del *t*-Bu la afinidad parece depender más del sustituyente R^2, **5b** (R^2 = H, K_i $A_{2A}R$ = 14.2 nM) muestra el doble de afinidad que su análogo **5g** (R^2 = *i*-Pr, K_i $A_{2A}R$ = 24.8 nM) (Figura 3.51C). En contraste, los grupos polares generan compuestos con menor afinidad (K_i $A_{2A}R$ entre 28.8 y 46.4 nM) (Tabla 3.3), sin diferencias marcadas entre los sustituyentes H e *i*-Pr en R^2.

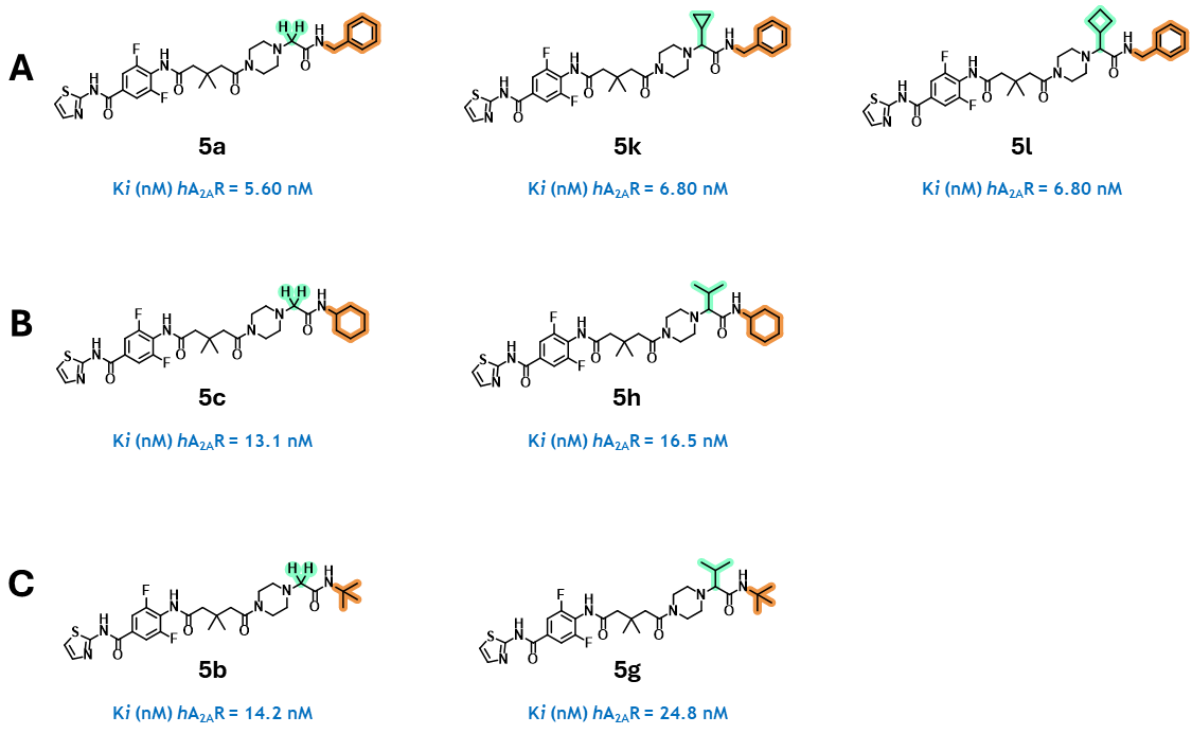


Figura 3.51. Tendencias observadas durante el análisis de la influencia del sustituyente en R^3.

Una vez analizada la REA, se puede concluir, que, en la serie V se han sintetizado varios ligandos que no solo mantienen una afinidad por $A_{2A}R$ comparable a la del ligando de referencia, **LuAA-41063**, sino que además presentan una mejora significativa en términos de selectividad (Tabla 3.3). Estos resultados ponen de manifiesto que es posible optimizar los

perfiles de afinidad y selectividad del compuesto original mediante modificaciones racionales en el farmacóforo secundario empleando en este caso la reacción Ugi-Split. En la Figura 3.52 se muestran, a modo de ejemplo, una comparación entre tres de los mejores ligandos obtenidos en la serie V y el ligando de referencia, donde se hacen evidentes las mejoras alcanzadas tanto en afinidad como en perfil de selectividad de los nuevos derivados. Cabe destacar que esta mejora en el perfil de selectividad se complementa con un incremento muy marcado de la solubilidad de los ligandos.

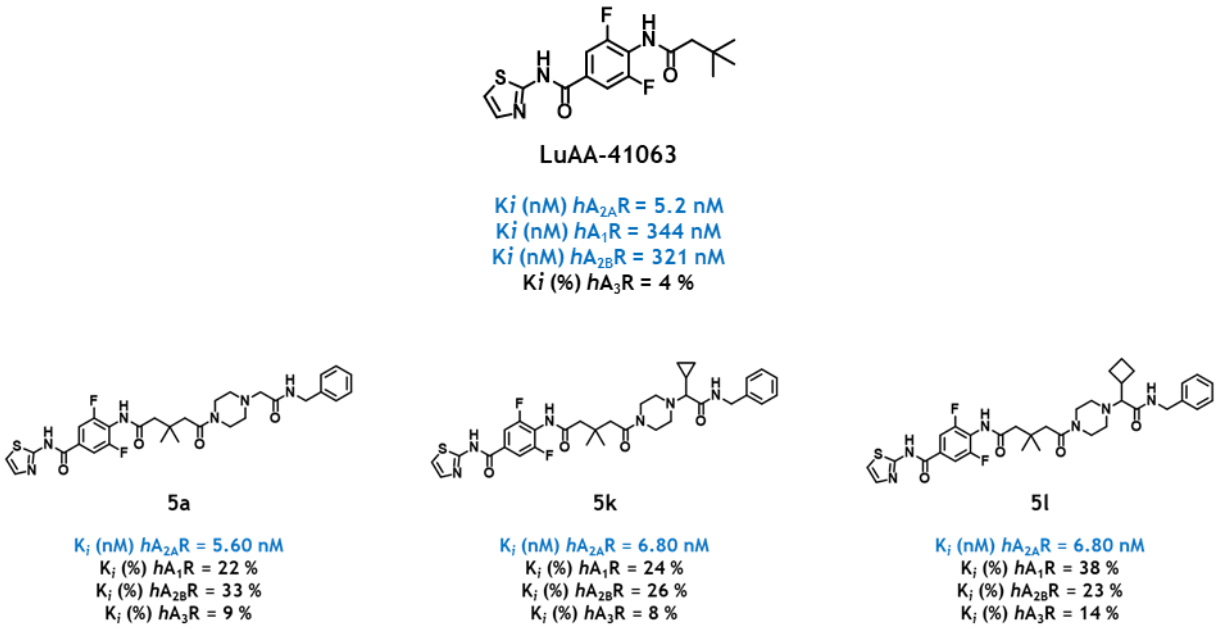


Figura 3.52. Comparación de los datos de afinidad y selectividad entre los mejores derivados obtenidos en la serie V y el ligando de referencia.

3.2.5 Estudios preliminares de los modelos de unión

3.2.5.1 Estudios de docking

Al igual que en el estudio descrito en el Capítulo I, procedimos a estudiar los posibles modelos de unión de los nuevos derivados de 3,5-difluoro-*N*-(tiazol-2-il)benzamida (**serie V**) en el sitio de unión ortostérico del $A_{2A}R$. Para ello, se empleó una combinación de *docking* y simulaciones de dinámica molecular.

En estos estudios de *docking*, se seleccionó como ligando representativo, el compuesto **5c** (serie V) Figura 3.53). El estudio se llevó a cabo utilizando el software Maestro (Schrödinger, versión 2024-2) y la estructura cristalográfica del $A_{2A}R$ (código PDB: 4EIY). El ligando **5c** conservó un modelo de unión coherente con los compuestos previamente estudiados (**3c**, Figura 3.53), conservando las interacciones clave asociadas al farmacóforo primario y que son esenciales para la unión al receptor (azul Figura 3.53). Entre estas interacciones se destacan: un enlace de hidrógeno con $Asn253^{6.65}$ aportada por el nitrógeno del anillo de tiazol, la cual contribuye a la orientación y estabilización del ligando dentro del bolsillo de unión; una interacción de apilamiento π-π con el residuo $His250^{6.52}$ favoreciendo la fijación del núcleo aromático central mediante interacciones no covalentes; e interacciones mediante enlaces de hidrógeno y apilamiento π-π con el residuo $Phe168^{ECL2}$ (**3c**, Figura 3.54A). Asimismo, en la serie V, se identificaron nuevas interacciones electrostáticas altamente estables orientadas hacia la región extracelular del $A_{2A}R$, provenientes del farmacóforo secundario (verde, Figura 3.53), concretamente, originadas por el anillo de piperazina protonado (**5c**, Figura 3.54B). Entre estas encontramos: una interacción π-catión con el residuo $His264^{ECL3}$ (Azul, Figura 3.54B), y puentes salinos con los residuos $Glu169^{ECL2}$ (Verde oscuro, Figura 3.54B) y $Asp170^{ECL2}$ (Verde claro, Figura 3.54B). Estas interacciones, como se detallará a continuación, podrían explicar la mayor afinidad de los ligandos de la Serie V en comparación con los de las series anteriores (I-III), sugiriendo un modo de unión más fuerte y eficiente.

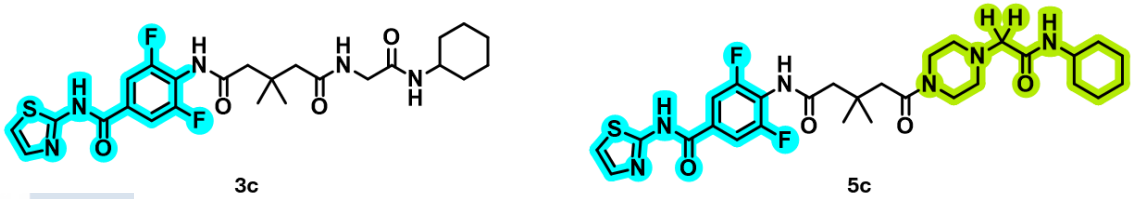


Figura 3.53. Ligandos seleccionados para el estudio de docking del Capítulo II.

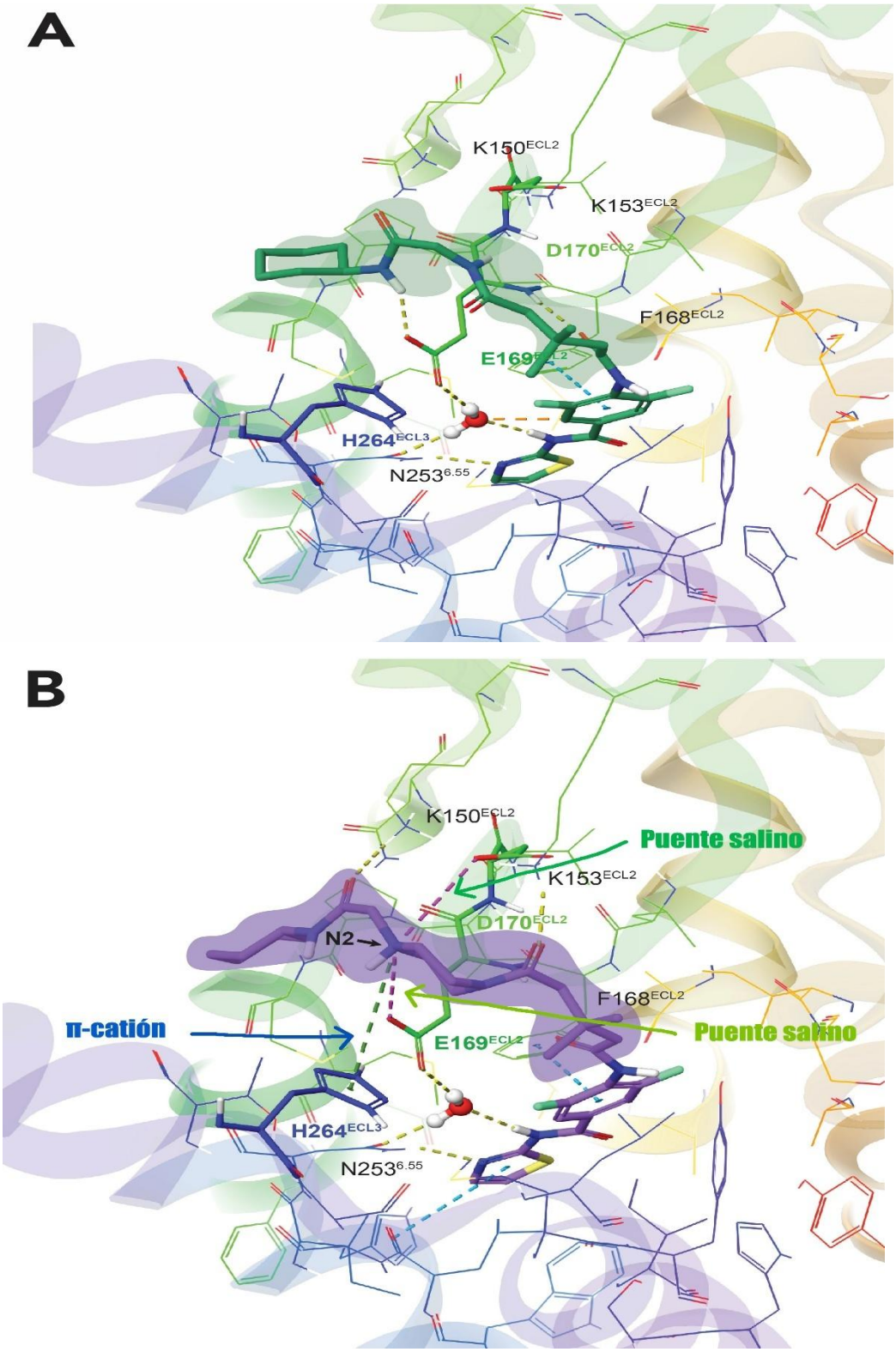


Figura 3.54. Visualización de las interacciones con el sitio de unión ortostérico para el compuesto **3c** (serie III) y B) **5c** (serie V) mostrando la molécula de agua introducida durante la simulación de *docking* molecular. Las líneas discontinuas en amarillo, cian, verde y púrpura representan los enlaces de hidrógeno, las interacciones de apilamiento π-π, interacciones π-catión, puentes salinos, respectivamente.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

3.2.5.2 Estudios de dinámica molecular

Una vez analizada la influencia del mejor espaciador en los modelos de unión estudiados en el Capítulo I (Serie III), en este apartado se propone un análisis comparativo entre los ligandos de la serie V y los de la serie III, cabe destacar que la principal diferencia estructural entre ambas series es la presencia de una piperazina en la serie V. Se realizó una extensa simulación de dinámica molecular (DM) de 25 ns utilizando el software GROMACS 2021. Los resultados, como se mostrará a continuación, proporcionan perspectivas clarificadoras sobre el comportamiento de estos compuestos en el sitio de unión ortostérico del $A_{2A}R$.

En primer lugar, se ha llevado a cabo un análisis detallado del RMSD con el objetivo de evaluar la estabilidad conformacional de los ligandos en el sitio de unión del $A_{2A}R$. A diferencia de lo expuesto en el Capítulo I, en esta ocasión el análisis se ha centrado en el comportamiento del ligando completo, incluyendo el espaciador. Esta aproximación permite una evaluación más realista del efecto del espaciador en la estabilidad global del complejo ligando-receptor, proporcionando así una perspectiva más precisa sobre el comportamiento dinámico de los compuestos dentro del sitio de unión. Para ello, se compararon los perfiles de RMSD de los ligandos pertenecientes a la serie V con los de la serie III (compuestos **3a–f**), así como con la molécula modelo **LuAA-41063**. La Figura 3.55muestra un gráfico de dispersión que representa la evolución temporal del RMSD para cada uno de los ligandos, permitiendo visualizar comparativamente la estabilidad estructural mantenida durante la simulación. Los resultados obtenidos indican que tanto los ligandos de la serie III (verde, Figura 3.55) como la molécula modelo (negro, Figura 3.55) presentan, en términos generales, mayores desviaciones estructurales a lo largo del tiempo en comparación con los ligandos de la serie V (violeta, Figura 3.55). Este comportamiento sugiere que los compuestos de la serie V mantienen una unión más estable, lo que apunta a una interacción más consistente con el sitio de unión del $A_{2A}R$ durante la simulación. Este hallazgo se ve reforzado por el cálculo del RMSD promedio durante los últimos 10 ns de la simulación (Figura 3.55). Los valores obtenidos confirman una menor fluctuación estructural para los ligandos de la serie V (RMSD = 0.34 ± 0.9 Å) en comparación con los de la serie III (RMSD = 0.54 ± 0.12 Å) y con el ligando de referencia LuAA-41063 (RMSD = 0.58 ± 0.24 Å). En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis de que las modificaciones estructurales introducidas en la serie V favorecen una unión más estable al $A_{2A}R$, lo cual podría estar asociado a un perfil farmacológico mejorado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

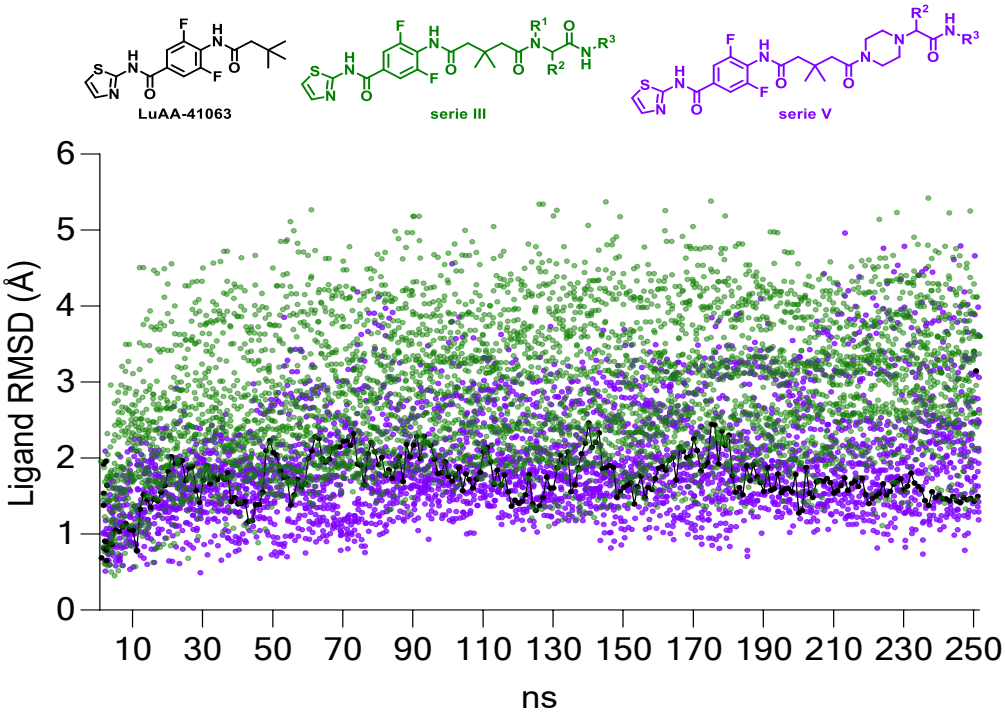


Figura 3.55. Gráfico de dispersión que muestra la comparación de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) de los ligandos de las series III (verde), V (violeta) y el ligando modelo (negro).

En segundo lugar, se analizó el número promedio de enlaces de hidrógeno (EH) formados entre el ligando y el receptor durante la simulación de 25 ns, centrándonos exclusivamente en las interacciones directas, es decir, sin considerar las moléculas de agua como intermediarias. Este análisis se llevó a cabo para los compuestos representativos de las series III y V con el objetivo de evaluar el posible papel de estas interacciones en la estabilidad y afinidad de unión observadas. Tal como se muestra en la Figura 3.56, tanto los ligandos de la serie III ($EH_{Serie\ III}$ = 1.50 ± 0.33) como los de la serie V ($EH_{Serie\ V}$ = 1.85 ± 0.42) presentan un número promedio de enlaces de hidrógeno comparable a lo largo de toda la simulación. Esta similitud en la cantidad de interacciones de tipo EH indica que dicho parámetro no explica, por sí solo, la mejora en la afinidad observada para los compuestos de la serie V. Por tanto, aunque los ligandos de la serie V muestran una unión más estable al $A_{2A}R$ (como se discutió previamente en el análisis de RMSD), el número de enlaces de hidrógeno no parece ser un factor determinante en esta diferencia. Esto sugiere que otras contribuciones, podrían estar teniendo influencia en la mejora de afinidad de unión de los compuestos de la serie V.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

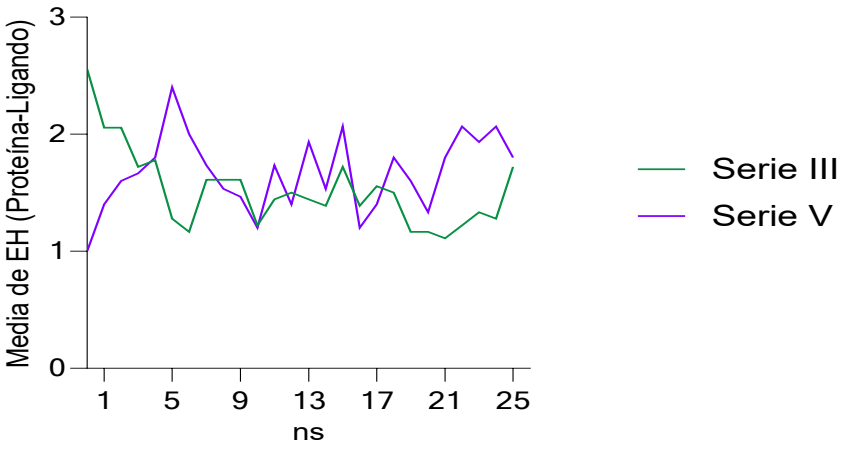


Figura 3.56. Resultados de la simulación de dinámica molecular (25 ns) de las series III y V. Comparación del promedio de los enlaces de hidrógeno proteína-ligando de las series III y V.

Por último, se evaluaron las nuevas interacciones entre los ligandos (**5a**, **5b**, **5c**, **5d** y **5e**) y los tres residuos clave, con el objetivo de caracterizar el tipo y la estabilidad de las interacciones no covalentes responsables del reconocimiento molecular. En concreto, se analizó la distancia entre la piperazina cargada positivamente (a pH fisiológico) y los residuos con potencial para establecer interacciones de tipo π-catión e iónicas, como His264, el Glu169 y el Asp170. Las distancias observadas a lo largo de la simulación sugieren que los ligandos se mantienen preferentemente dentro del rango característico de interacción π-catión (entre 4 y 6 Å) en el caso de la His264 (Figura 3.57A), y dentro del intervalo típico para interacciones iónicas o puentes salinos (entre 2 y 4 Å) con residuos cargados negativamente como Glu169 (Figura 3.57B). Las nuevas interacciones mayoritarias identificadas corresponden principalmente a la His264, mediante un acoplamiento de tipo π-catión, y a Glu169, a través de un puente salino con la amina protonada de la piperazina. Por el contrario, la interacción con Asp170, que se había propuesto como un posible punto de anclaje electrostático, se presenta de forma menos frecuente y con distancias menos compatibles con una interacción iónica estable (Figura 3.57C). Estos resultados sugieren que las modificaciones estructurales introducidas en los compuestos, particularmente la piperazina, podrían haber favorecido un nuevo patrón de interacciones, priorizando contactos más persistentes, fuertes y energéticamente favorables con His264 y Glu169, lo que explicaría la mayor estabilidad y afinidad de los compuestos de la serie V.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

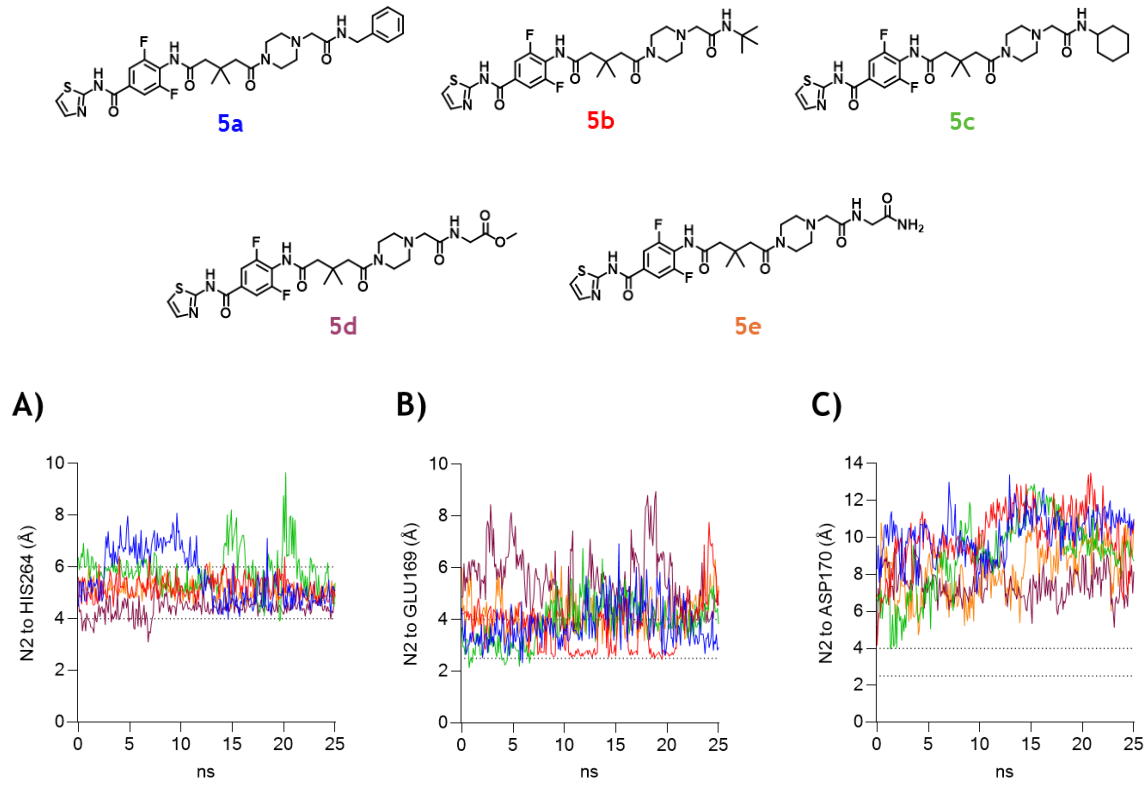


Figura 3.57. Resultados de la simulación de dinámica molecular (25 ns) de los compuestos **5a**, **5b**, **5c**, **5d** y **5e**. A) Análisis de las interacciones π-catión e iónicas con el residuo His264. B Análisis de las interacciones π-catión e iónicas con el residuo Glu169. C) Análisis de las interacciones π-catión e iónicas con el residuo Asp170.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.6 Separación de racematos y evaluación de enantiómeros

Muchos de los antagonistas selectivos A_{2A} y duales $A_{2A}R/A_{2B}R$ obtenidos en este trabajo poseen un centro estereogénico en el farmacóforo secundario. Además, se ha comprobado que la introducción de un sustituyente en la posición R^2 (especialmente un grupo *c*-Pr) mejora de forma significativa el perfil adenosinérgico de los compuestos. Con el objetivo de evaluar el impacto de la configuración del centro estereogénico sobre la afinidad y la selectividad frente al $A_{2A}R$ y al $A_{2B}R$, se seleccionaron tres ligandos representativos de las series IV-V. Los compuestos elegidos fueron los ligandos **4s** y **5k** (antagonistas selectivos del receptor $A_{2A}R$) y el compuesto **4ñ** (antagonista dual $A_{2A}R/A_{2B}R$) (Figura 3.58). Estos compuestos no solo mostraron perfiles farmacológicos prometedores cuando fueron evaluados como mezclas racémicas, sino que también representan adecuadamente la diversidad estructural presente en la colección de moléculas sintetizadas en este trabajo.

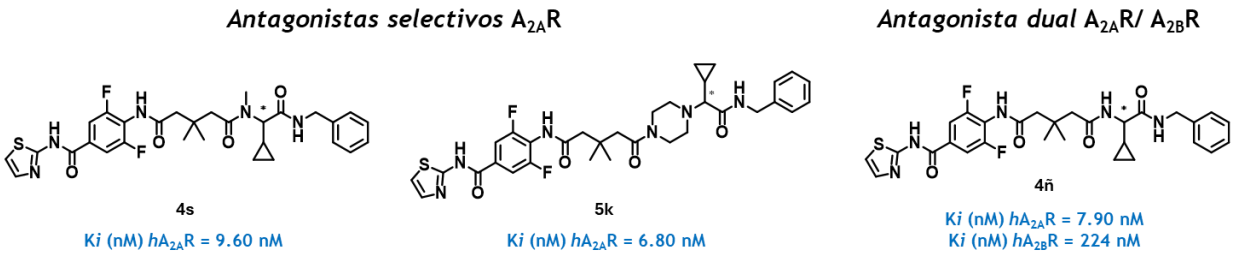
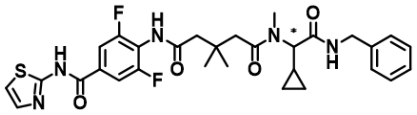


Figura 3.58. Compuestos seleccionados para la separación y evaluación enantiomérica.

La separación de los racematos **(±)-4s**, **(±)-4ñ** y **(±)-5k** se llevó a cabo mediante HPLC quiral semipreparativo empleando el equipo Waters Alliance, equipado con un módulo de separación e2695, un detector de fotodiodo modelo 2998 y las separaciones fueron realizadas con una columna Chiralpak IE (20 mm de diámetro interno × 250 mm de longitud, tamaño de partícula de 5 µm; DAICEL Corp.). Se emplearon las siguientes condiciones experimentales **(±)-4s** (DCM:IPA-30% isocrático, 25 min.), **(±)-4ñ** (DCM:IPA-30% isocrático, 30min.) y **(±)-5k** (DCM:IPA-15% isocrático, 35 min.).

Las Figura 3.59-3.61 muestran los cromatogramas obtenidos durante las separaciones, donde se indican los tiempos de retención correspondientes a cada enantiómero. En todos los casos, se lograron aislar los enantiómeros con una pureza enantiomérica superior al 95 %. Cabe destacar que el pico que se observa con un t_R = 10,4 min. se corresponde con un componente de los filtros utilizados para la preparación de la muestras y no ha sido tenido en cuenta.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



4s

Ki (nM) $hA_{2A}R$ = 9.60 nM

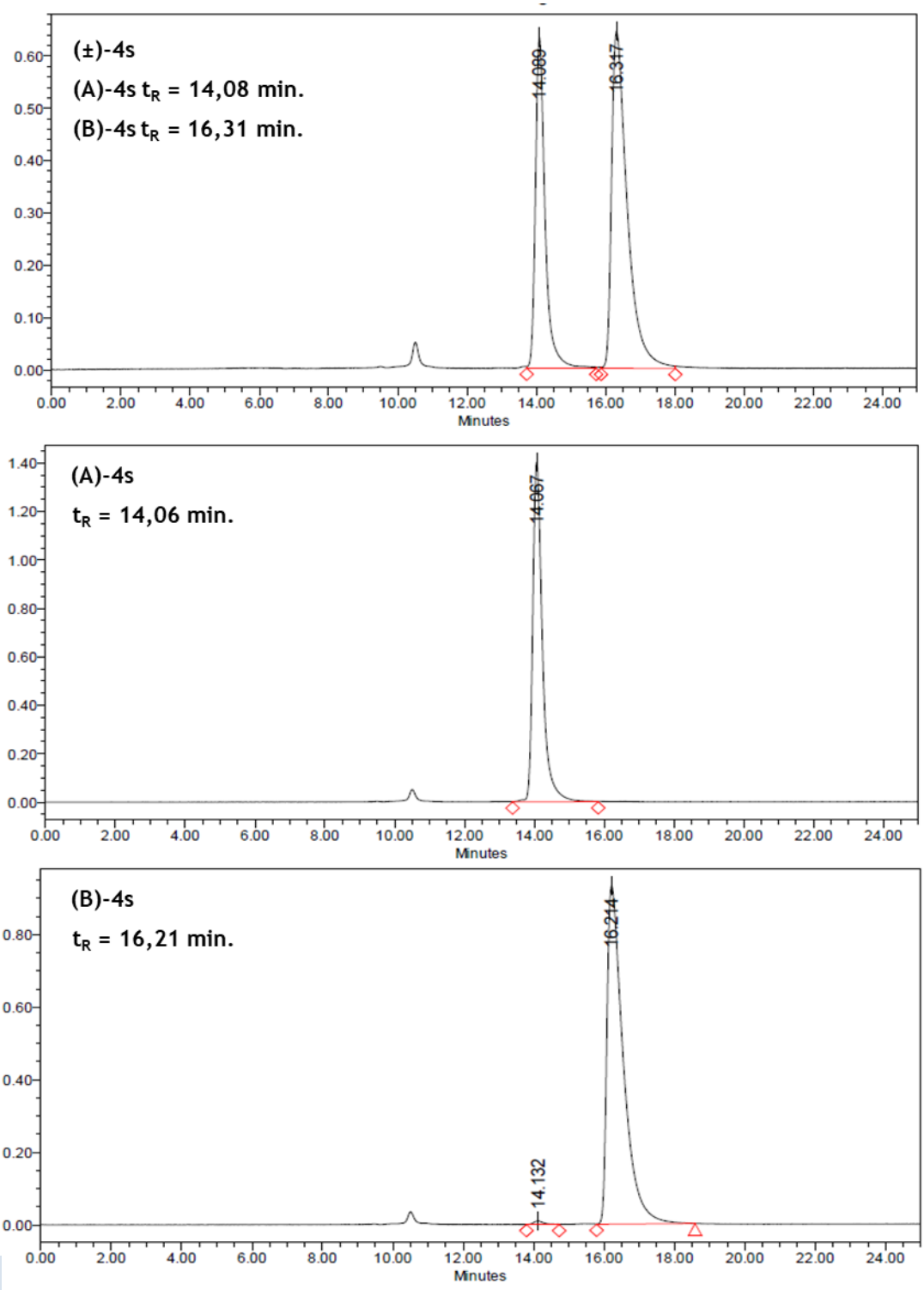
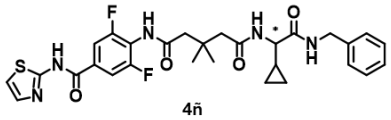


Figura 3.59. Cromatogramas de la mezcla racémica y enantiómeros del compuesto **4s**.



4ñ

Ki (nM) $hA_{2A}R$ = 7.90 nM
Ki (nM) $hA_{2B}R$ = 224 nM

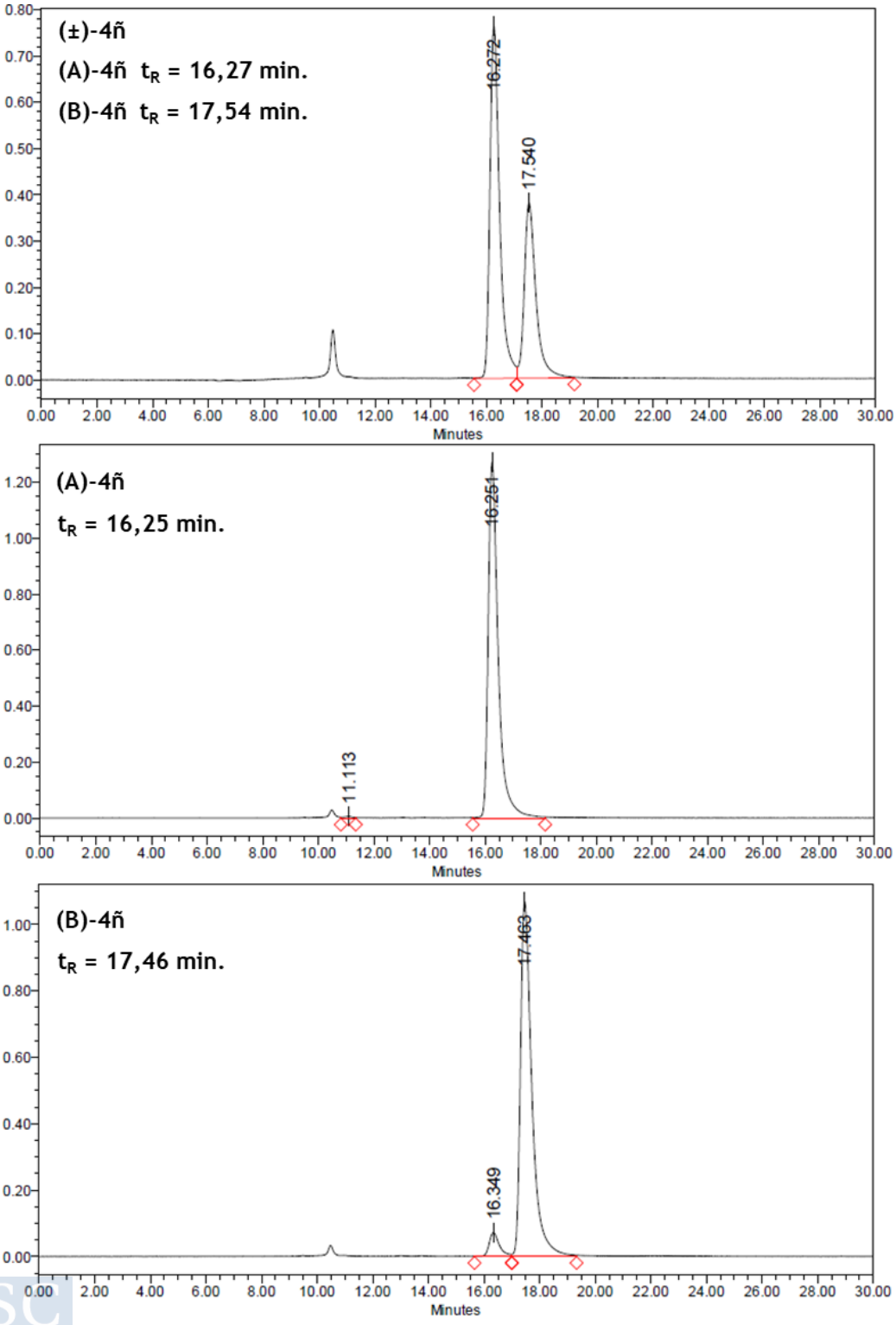
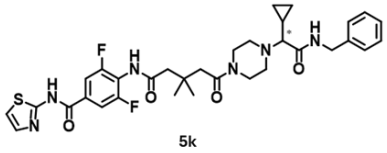


Figura 3.60. Cromatogramas de la mezcla racémica y enantiómeros del compuesto **4ñ**.



5k

Ki (nM) $hA_{2A}R$ = 6.80 nM

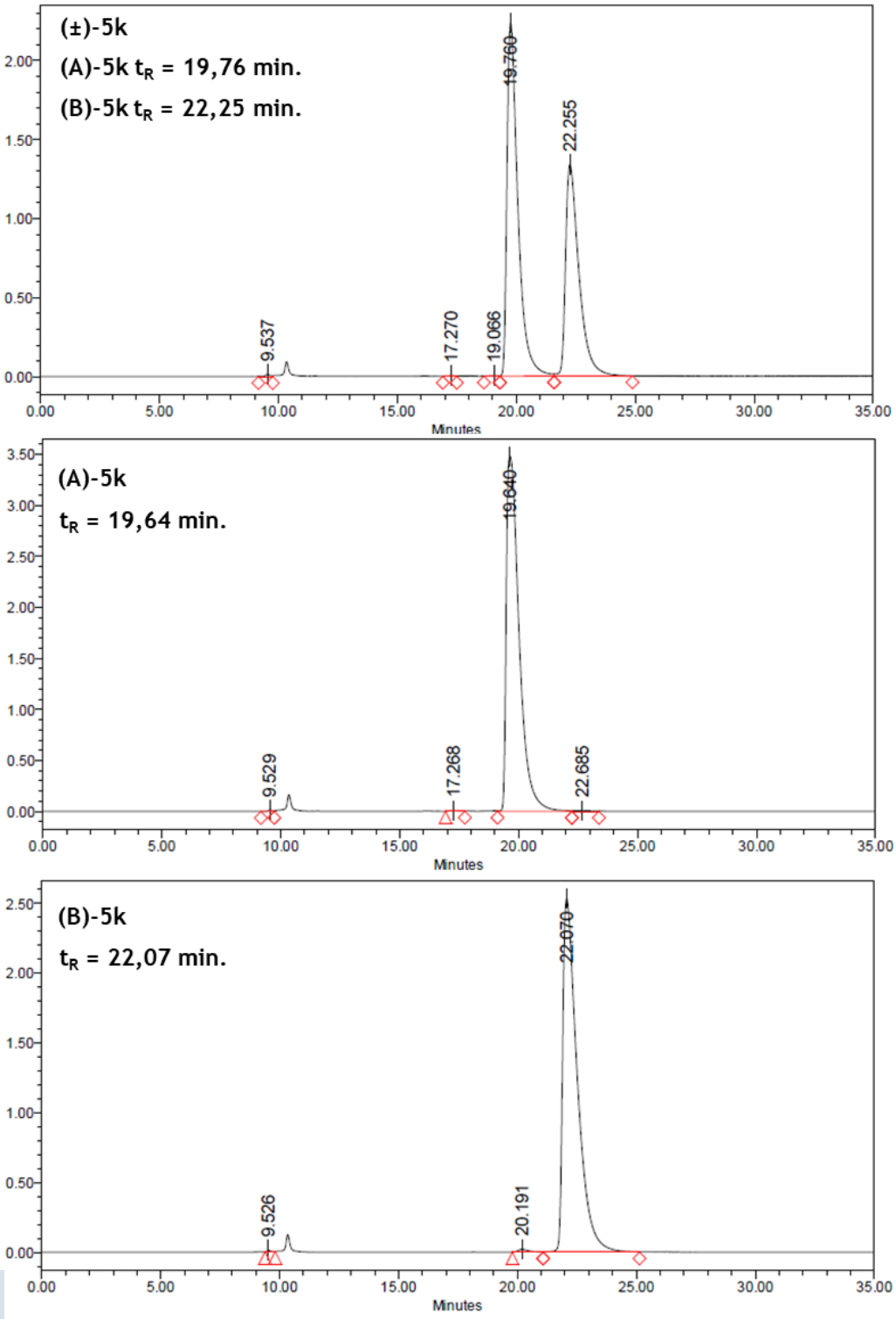
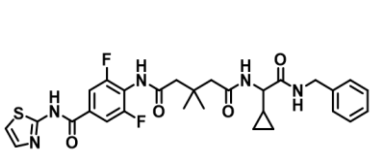


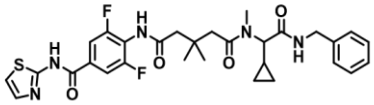
Figura 3.61. Cromatogramas de la mezcla racémica y enantiómeros del compuesto **5k**.

La separación de los enantiómeros mediante HPLC quiral nos permitió obtener los 2 estereoisómeros de cada racemato **(±)-4s**, **(±)-4ñ** y **(±)-5k**. Sin embargo, después de varios intentos no ha sido posible obtener cristales adecuados para su caracterización mediante difracción de rayos X y tampoco se dispone de datos espectroscópicos en la literatura para compuestos estructuralmente análogos que permitieran una comparación concluyente. Por tanto, en ausencia de métodos directos, o referencias para establecer la estereoquímica absoluta, los estereoisómeros se denominaron de forma arbitraria como isómero (**A**) (el primero en resolverse) e isómero (**B**) (el segundo en resolverse), manteniéndose dicha nomenclatura a lo largo de todo el estudio farmacológico.

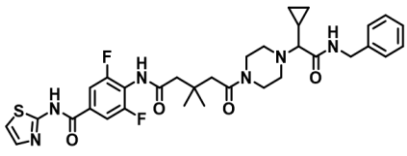
En la Tabla 3.6 se muestra el resultado de la evaluación farmacológica de las formas enantiopuras frente a los 4 subtipos de receptores de adenosina.



4ñ



4s



5k

Tabla 3.6. Datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina de los compuestos resueltos enantioméricamente.

				K_i (nM) o % a 1 µM			
Compuesto	**R^1**	**R^2**	**R^3**	**hA_1[a)]**	**hA_{2A}[b)]**	**hA_{2B}[c)]**	**hA_3[d)]**
(±)-4s	CH_3	*c*-Pr	Bn	34%	9.60 ± 0.7	30%	10%
(A)-4s	CH_3	*c*-Pr	Bn	40%	8.71 ± 0.3	26%	18%
(B)-4s	CH_3	*c*-Pr	Bn	34%	3.10 ± 0.5	16%	30%
(±)-5k	piperazina	*c*-Pr	Bn	24%	6.80 ± 0.6	26%	6%
(A)-5k	piperazina	*c*-Pr	Bn	35%	5.25 ± 0.3	26%	24%
(B)-5k	piperazina	*c*-Pr	Bn	45%	9.10 ± 0.4	28%	36%
(±)-4ñ	H	*c*-Pr	Bn	42%	7.90 ± 1.1	224 ± 6.0	28%
(A)-4ñ	H	*c*-Pr	Bn	39%	3.33 ± 0.7	16%	21%
(B)-4ñ	H	*c*-Pr	Bn	44%	16.7 ± 1.6	101 ± 4	33%
LuAA-41063*	-	-	-	409	4.9	-	-
LuAA-41063**	-	-	-	344 ± 12	5.2 ± 0.6	321 ± 8	4%
Etrumadenant	-	-	-	65.0 ± 4	1.50 ± 0.3	2.00 ± 0.9	489 ± 10
ZM241385	-	-	-	683 ± 4.0	1.9 ± 0.1	65.7 ± 1.0	863 ± 4.0

[a)] Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células CHO humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). [b)] Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol en células HeLa humanas expresado como Ki (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). [c)] Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células HEK-293 humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). [d)] Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]NECA en células HeLa humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). [*)] Datos de afinidad extraídos de la bibliografía 237. [**)]Datos de afinidad experimentales obtenidos en nuestros ensayos.

Los resultados presentados en la Tabla 3.6 para los cuatro subtipos de receptores de adenosina permiten verificar que los estereoisómeros de los compuestos **4s** y **5k**, a pesar de su diferencia estructural presentan perfil similar y cierto reconocimiento enantioselectivo hacia el $A_{2A}R$.

En el caso del compuesto **(±)-4s (**antagonista selectivo de $A_{2A}R$ de la serie IV), el enantiómero al que se ha nombrado como (A) presenta una disposición espacial del sustituyente en R^2 más favorable para la interacción con $A_{2A}R$. Así, el compuesto **(A)-4s** muestra un valor de afinidad de K_i = 3.10 nM, mientras que su correspondiente enantiómero **(B)-4s** presenta un valor de afinidad significativamente superior K_i $A_{2A}R$ = 8.71 nM. Por otro lado, en el caso del compuesto **5k** (antagonista selectivo de $A_{2A}R$, de la serie V), es el enantiómero **(B)-5k** el que presenta una disposición espacial más favorable para la interacción con el $A_{2A}R$ (K_i $A_{2A}R$ = 5.25 nM) mientras que su pareja **(A)-5k** posee una afinidad menor (K_i $A_{2A}R$ = 9.10 nM). Como se ha dicho anteriormente estes dos compuestos presentan un cierto comportamiento enantioselectivo ya que un isómero posee una afinidad $A_{2A}R$ entre 2 y 3 veces superior que su imagen especular.

El compuesto **4ñ**, ligando con afinidad dual por $A_{2A}R/A_{2B}R$, los resultados muestran un comportamiento marcadamente enantioselectivo. El enantiómero al que se ha nombrado como **(A)-4ñ** solo muestra afinidad por el $A_{2A}R$ (K_i = 3.33 nM). Por su parte, su imagen especular **(B)-4ñ** es capaz de unirse tanto al $A_{2A}R$ (K_i = 16.7 nM) como al $A_{2B}R$ (K_i = 101 nM). Esto significa que el comportamiento dual observado por el racemato es consecuencia exclusivamente del enantiómero **(B)-4ñ**. De esta forma, la disposición espacial del grupo ciclopropilo presente en R^2 de **(B)-4ñ** permite el reconocimiento por ambos subtipos de receptores. Sin embargo, la disposición contraria del ciclopropilo del enantiómero **(A)-4ñ** elimina el reconocimiento del $A_{2B}R$. El comportamiento demostrado refuerza el papel de la estereoquímica como determinante clave en la selectividad entre subtipos de receptores de adenosina. Nuevos estudios se están desarrollando en el laboratorio para ampliar las evidencias de este comportamiento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.7 Evaluación del efecto antiproliferativo en líneas tumorales

3.2.7.1 Efecto antiproliferativo en la línea tumoral de melanoma HTB-70

En el marco de esta investigación, se evaluó la capacidad antiproliferativa de antagonistas del $A_{2A}R$ representativos como nueva aproximación en el desarrollo de fármacos para en el tratamiento del cáncer. Para ello, se han seleccionado dos líneas celulares: una de origen tumoral y otra de tejido sano. La línea tumoral seleccionada fue **HTB-70**, derivada de un melanoma maligno de piel humana (SK-MEL-5), mientras que, como control, se empleó la línea celular **MRC-5**, compuesta por fibroblastos pulmonares humanos (CCL-171), la cual representa un modelo de tejido no tumoral. Este diseño experimental permitió realizar un análisis comparativo del efecto antiproliferativo de los compuestos sobre células cancerosas, así como evaluar su selectividad y seguridad en células sanas, aspectos críticos para el desarrollo de terapias antitumorales eficaces y específicas.

Los 5 compuestos seleccionados para este estudio (**4j**, **4s**, **4y** y **5a**) y el compuesto de referencia **LuAA-41063**, fueron estudiados *in vitro* para determinar su capacidad antiproliferativa. El estudio se realizó en el grupo de la Prof. Concepción Alonso de la Universidad del País Vasco (UPV). Los resultados, expresados como valores de IC_{50} se detallan en la Tabla 3.7. Como fármaco de referencia para este estudio, hemos utilizado la colchicina, un quimioterápico clásico.

Como se observa, ninguno de los compuestos mostró un efecto antiproliferativo sobre la línea celular de control MRC-5, lo que confirma su perfil de seguridad en células no tumorales. De los cuatro compuestos evaluados, solo dos exhibieron actividad antiproliferativa en la línea celular de melanoma HTB-70, dos compuestos representativos de los dos quimiotipos explorados en este trabajo: el compuesto **4j**, con un valor de $IC_{50} = 12.73 \pm 0.73$ μM, y el compuesto **5a**, con un valor de $IC_{50} = 47.02 \pm 0.73$ μM. Como se puede observar en la Tabla 3.7, estos dos compuestos muestran un perfil antiproliferativo superior al obtenido para el compuesto modelo **LuAA-41063** ($IC_{50} > 50$ μM). Una de las causas probables de este mejor desempeño podría ser la mayor solubilidad que presentan los ligandos sintetizados en este trabajo. Esto pone de manifiesto que las modificaciones estructurales introducidas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han logrado una mejorar sustancial del ligando modelo en su perfil antiproliferativo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

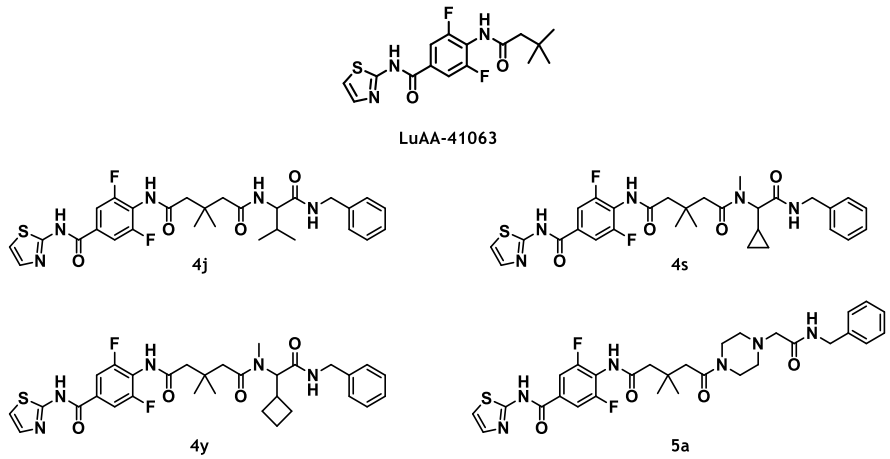


Tabla 3.7. Resultados obtenidos en los ensayos de antiproliferación realizados en la línea celular tumoral HTB-70.

	Antiproliferación IC_{50} (μM)*		
Compuesto	**(HTB-70)**	**(MRC-5)**	**K_i $hA_{2A}R$ (nM)**
4j	12.73 ± 3.30	>50	5.40 ± 0.8
4s	>50	>50	9.60 ± 0.7
4y	>50	>50	7.70 ± 0.9
5a	47.02 ± 0.73	>50	5.60 ± 0.5
LuAA-41063	>50	>50	5.2 ± 0.6
Colchicina	7.58 ± 1.25	5.72 ± 2.1	-

*Los valores de IC_{50} de antiproliferación enumerados son las concentraciones correspondientes a la inhibición del 50% del crecimiento celular.

3.2.7.2 Efecto antiproliferativo en la línea tumoral de cáncer de mama T47D

Tres antagonistas $A_{2A}R$ representativos (**4j**, **4s** y **4y**) y el ligando modelo **LuAA-41063** fueron evaluados farmacológicamente mediante ensayos de antiproliferación *in vitro* en cultivos de la línea celular T47D, un modelo de adenocarcinoma mamario luminal. En el protocolo experimental se establecieron dos concentraciones de evaluación (5 y 10 μM) para los compuestos en estudio y se evaluaron, en el mismo ensayo y a las mismas concentraciones, los compuestos de referencia **AZD-4635** (antagonista $A_{2A}R$ no selectivo) y **LuAA-41063** para efectos comparativos. El efecto antiproliferativo se midió a las 24 y 48 horas post-tratamiento. Los datos obtenidos han sido representados en la Figura 3.62 mediante un gráfico de barras, y cuantifican la inhibición de la proliferación celular expresada en porcentaje con respecto al control.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A la concentración de 5 μM, todos los compuestos evaluados mostraron un efecto inhibidor significativo ($p < 0.0001$) sobre la proliferación celular en comparación con el control, tanto a las 24 horas (Figura 3.62A) como a las 48 horas (Figura 3.62A). Entre ellos, el compuesto **4s** presenta la mayor reducción en la viabilidad celular, alcanzando un 43.5 % a las 24 h y un 43.1 % a las 48 h (Figura 3.62A). El perfil antiproliferativo observado en los compuestos ensayados resultó comparable al del fármaco de referencia **AZD-4635** (24 h = 39.6 % y 48 h = 59.02 %), así como al compuesto modelo **LuAA-41063** (24 h = 33.5 % y 48 h = 34.2 %), sin que se detectaran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre ellos. Asimismo, el análisis temporal no reveló variaciones significativas ($p > 0.05$) en la disminución de la viabilidad celular entre las 24 y las 48 horas, lo que sugiere un efecto inhibitorio sostenido en el tiempo.

A una concentración de 10 μM, todos los compuestos evaluados exhibieron una inhibición significativa ($p < 0.0001$) de la proliferación celular en comparación con el control, tanto a las 24 h (Figura 3.62B) como a las 48 h (Figura 3.62B). Entre ellos, el compuesto **4s** demostró la mayor eficacia a las 24 h, reduciendo la viabilidad celular en un 47.3 %, mientras que, a las 48 h, el compuesto **4y** presentó el efecto más pronunciado, con una disminución del 53.8 % (Figura 3.62B). El perfil antiproliferativo de los compuestos ensayados fue comparable al del fármaco de referencia **AZD-4635** (24 h = 41.6 % y 48 h = 57.6 %) así como al compuesto modelo **LuAA-41063** (24 h = 33.5 % y 48 h = 34.2 %), sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0.05$). El análisis comparativo de los tiempos de exposición (24 h vs. 48 h) no reveló cambios significativos ($p > 0.05$) en la reducción de la viabilidad celular, lo que sugiere que el efecto inhibitorio se mantiene estable en este intervalo temporal.

En la Figura 3.62C se observa como el análisis tampoco reveló diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el efecto antiproliferativo observado a ambas dosis por lo que sugiere que a la concentración de 5 μM ya existe saturación de los $A_{2A}R$ observándose el efecto máximo.

En el apartado 5 (Experimental section) se proporciona una descripción detallada de los protocolos empleados para la determinación de la citotoxicidad de los compuestos sobre la línea celular T47D.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

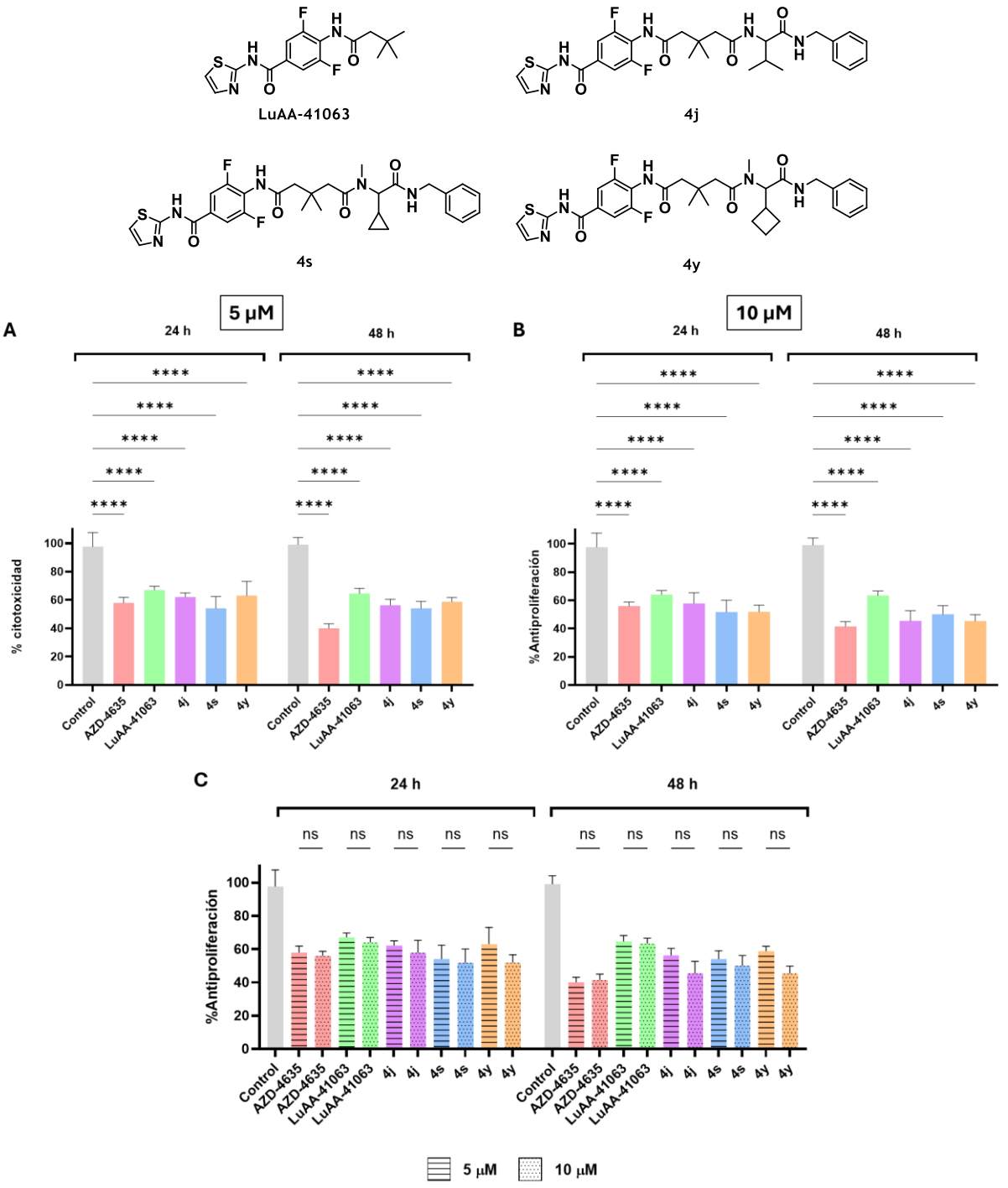


Figura 3.62. Efecto antiproliferativo de los compuestos LuAA-41063, AZD-4635, 4j, 4s y 4y, expresado en porcentaje de la inhibición de la proliferación celular en la línea T47D. A) y B) Comparación del efecto antiproliferativo de los compuestos respeto al control, evaluado a las 24 y 48 horas, en las concentraciones de 5 µM y 10 µM, respectivamente. C) Comparación entre las dosis de 5 µM y 10 µM a las 24 horas y a las 48 horas. ****) diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.0001$); ns) no existe diferencia significativa entre ambas dosis ($p > 0.05$).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.8 Ensayos de reactivación del sistema inmunitario

Para la evaluación de la actividad inmunomoduladora de los compuestos sintetizados, se han empleado como modelo biológico las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Aisladas a partir de donantes sanos, estas células constituyen un sistema *ex vivo* que refleja con alta fidelidad el compartimento inmunitario sistémico del individuo. Dentro de las PBMCs encontramos células inmunitarias como: linfocitos T, linfocitos B, células NK y células dendríticas. En consecuencia, las PBMCs representan el modelo canónico para realizar un seguimiento de los mecanismos fundamentales de la respuesta inmunitaria y en este caso, para la caracterización de la respuesta celular frente a nuevos agentes farmacológicos.

En la Figura 3.63 se muestra la estructura de los compuestos seleccionados para realizar los ensayos de reactivación inmunitaria, como se observa hemos escogido dos de nuestros antagonistas selectivos $A_{2A}R$ y el fármaco de referencia AZD-4635.

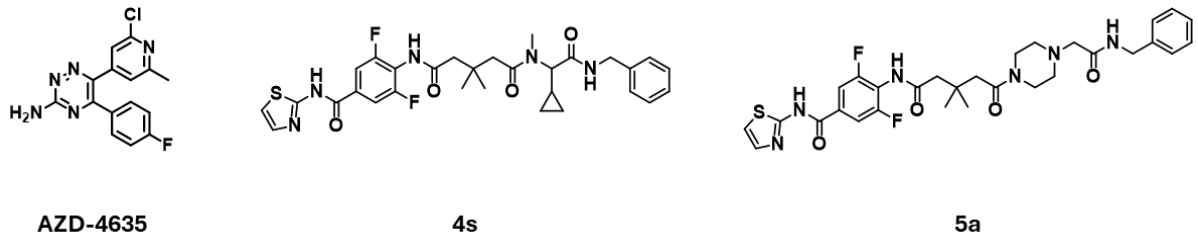


Figura 3.63. Estructura de los antagonistas $A_{2A}R$ seleccionados (**4s** y **5a**) y el compuesto de referencia **AZD-4635**.

El estudio se realizó en el grupo de la Prof. Iria Gómez Touriño de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), utilizando PBMCs obtenidas de donantes sanos. El primer ensayo consistió en la evaluación de la viabilidad celular de las PBMCs tras la exposición a un rango de concentraciones de los antagonistas en estudio (10 μM, 1 μM y 0.1 μM) en presencia de ADO a una concentración de 100 μM. Este estudio es fundamental para identificar y excluir aquellos compuestos y/o dosis que puedan inducir citotoxicidad, garantizando así la validez y fiabilidad de los resultados obtenidos en ensayos posteriores. Se estableció un umbral de citotoxicidad del 15%, lo que implica que las concentraciones que resultaran en un porcentaje de PBMCs viables inferior al 85% serían descartadas para la continuación de los experimentos. Como se ilustra en la Figura 3.64, los compuestos seleccionados no mostraron evidencia de citotoxicidad a las concentraciones empleadas. Los resultados obtenidos confirman que todas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

las concentraciones de los compuestos evaluadas se encuentran por debajo del límite establecido, lo que permite asegurar que los antagonistas estudiados no afectan a la viabilidad celular de las PBMCs y, por lo tanto, podemos avanzar en el estudio sin interferencias por efectos citotóxicos inespecíficos.

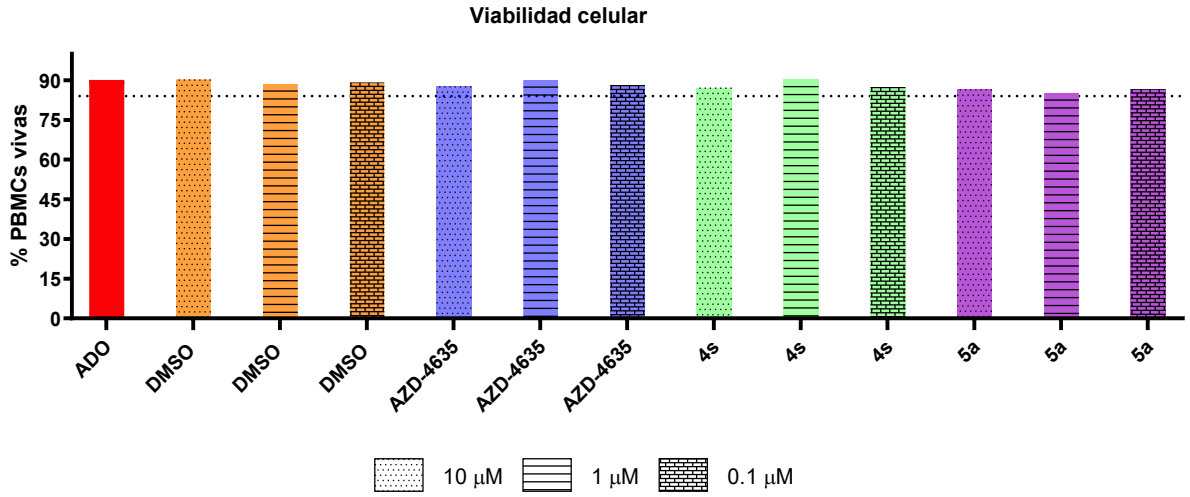


Figura 3.64. Gráfico de barras con los resultados del ensayo de viabilidad celular en PBMCs.

A continuación, se procedió a evaluar la capacidad de nuestros antagonistas para revertir la inmunosupresión inducida por adenosina. Para ello, las PBMCs fueron inicialmente activadas mediante coestimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, lo que induce una activación robusta de las PBMCs. Tras esta activación, las células se incubaron con adenosina a una concentración de 100 µM con el objetivo de establecer un fenotipo inmunosupresor, observándose como las PBMCs reducen su actividad. Posteriormente, se añadieron los compuestos en estudio (**4s** y **5a**) a una concentración de 10 µM sobre las PBMCs inmunosuprimidas. La recuperación de la actividad inmunitaria se evaluó mediante la cuantificación de la expresión de los marcadores CD25 y CD69, asociados a la activación tardía y temprana, respectivamente y cuya expresión se ve reducida en presencia de adenosina.

En la Figura 3.65 se muestra el análisis comparativo de la expresión del marcador de activación tardía CD25 en PBMCs a las que se le ha inducido inmunosupresión con ADO. Los compuestos **4s** y **5a** lograron revertir de manera significativa el efecto inmunosupresor de la adenosina. En la mayoría de los donantes, se han logrado niveles de expresión de CD25 similares a los que había antes de inducir la inmunosupresión, no obstante, en algunos casos puntuales no se observó una recuperación tan marcada (Figura 3.65, donante azul). Si lo

USC DE COMPOSTELA

comparamos con el fármaco de referencia **AZD-4635**, los compuestos **4s** y **5a**, mostraron una recuperación similar en la expresión de CD25, lo que indica una eficacia similar a la hora de contrarrestar la inmunosupresión mediada por adenosina.

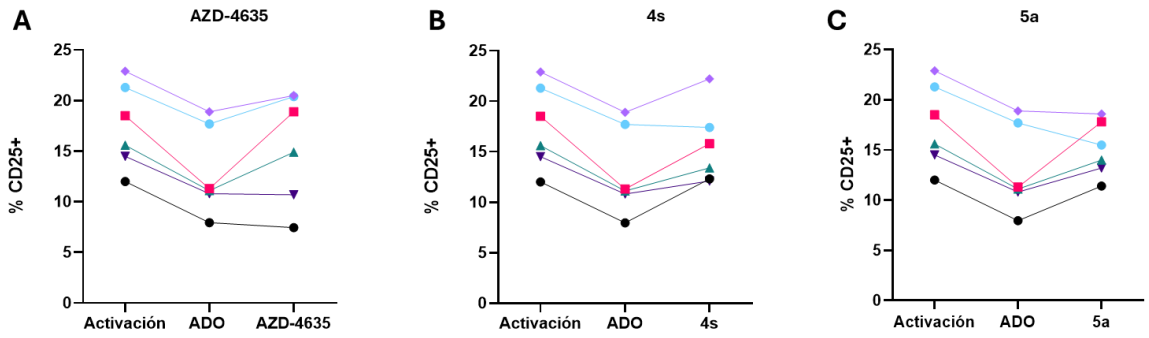


Figura 3.65. Resultados de la reactivación de la actividad inmunitaria expresada en % de la expresión del marcador CD25 para los compuestos: A) **AZD-4635**, B) **4s** y C) **5a**.

En la Figura 3.66 se muestra el análisis comparativo de la expresión del marcador de activación temprana CD69 en PBMCs a las que se le ha inducido inmunosupresión con ADO. Los compuestos **4s** y **5a** no lograron revertir de manera significativa el efecto inmunosupresor en la mayoría de los donantes. En algunos casos puntuales se observó una ligera recuperación, esta fue inconsistente y claramente inferior a la inducida por el compuesto de referencia **AZD-4635**. En contraste, **AZD-4635** mostró una recuperación parcial pero reproducible de la expresión de CD69 en cinco de los seis donantes evaluados, lo que indica una mayor eficacia en contrarrestar la inmunosupresión mediada por adenosina que los antagonistas **4s** y **5a**.

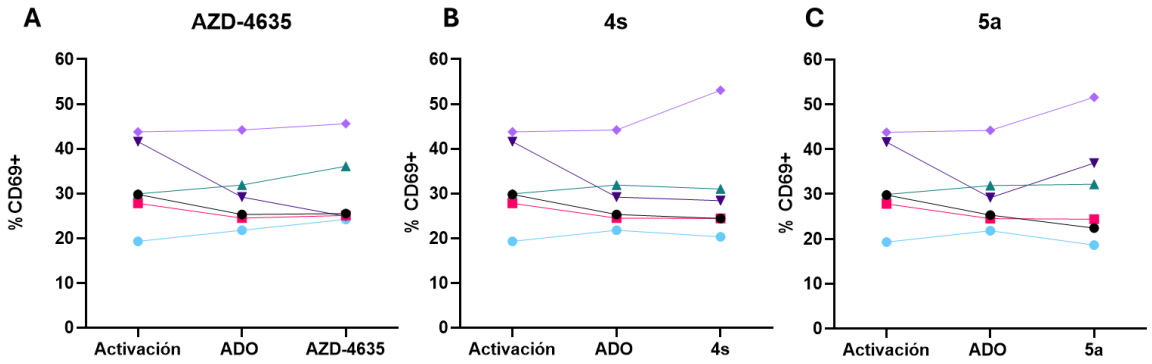


Figura 3.66. Resultados de la reactivación de la actividad inmunitaria expresada en % de la expresión del marcador CD69 para los compuestos: A) **AZD-4635**, B) **4s** y C) **5a**

Las diferencias observadas en la recuperación de la expresión de CD25 y CD69 podrían deberse a la participación de vías inmunorreguladoras distintas. La expresión de CD25, además de estar influida por la señalización del $A_{2A}R$, se regula también por señales autocrinas de IL-2 y por la vía JAK/STAT5, las cuales no se ven tan intensamente afectadas por la inmunosupresión inducida por adenosina. En cambio, la expresión de CD69 depende principalmente de señales que se activan tras el reconocimiento antigénico a través del TCR/CD28, por lo que su inducción requiere, además del bloqueo del $A_{2A}R$, una coestimulación adecuada para activarse de forma eficiente. Por otra parte, la variabilidad observada entre donantes puede estar inducida por la densidad de receptores A_{2A} en las PMBCs así como por la diferente respuesta celular basal.

Como parte final del estudio, se evaluó la capacidad de los antagonistas **4s** y **5a** para reducir la expresión del punto de control inmunitario CTLA-4 mediante el bloqueo del $A_{2A}R$. La activación del $A_{2A}R$ en células inmunitarias se ha asociado con un aumento en la expresión de estos puntos de control negativos, que desempeñan un papel clave en la regulación de la respuesta inmune. Esta sobreexpresión inducida por adenosina contribuye significativamente al establecimiento de un microambiente inmunosupresor, favoreciendo un fenotipo tolerogénico que facilita la evasión inmunitaria y la supervivencia de las células tumorales. Por tanto, la disminución de CTLA-4 mediante el bloqueo del $A_{2A}R$ representa una estrategia prometedora para restaurar la funcionalidad de las células efectoras, promoviendo un entorno inmunológico más favorable para su activación, proliferación y actividad citotóxica frente a células tumorales.

En la Figura 3.67 se muestra el análisis comparativo de la expresión del punto de control inmunitario CTLA-4 en PBMCs expuestas a adenosina. Los compuestos **4s** y **5a** lograron, en la mayoría de los donantes, reducir la expresión de CTLA-4 a niveles inferiores incluso a los observados antes de la exposición a ADO. Esta disminución sugiere una capacidad potencial para revertir el estado de inmunosupresión presente en el microentorno tumoral. Aunque la reducción fue consistente en la mayoría de los casos, en algunos donantes (azul Figura 3.67C y verde, Figura 3.67B-C) el efecto fue menos pronunciado. Al comparar los resultados obtenidos con los compuestos **4s** y **5a** con los del fármaco de referencia **AZD-4635**, se observa que el grado de reducción en la expresión de CTLA-4 es similar, lo que indica que nuestros antagonistas presentan una eficacia comparable en la modulación de este punto de control inmunitario.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

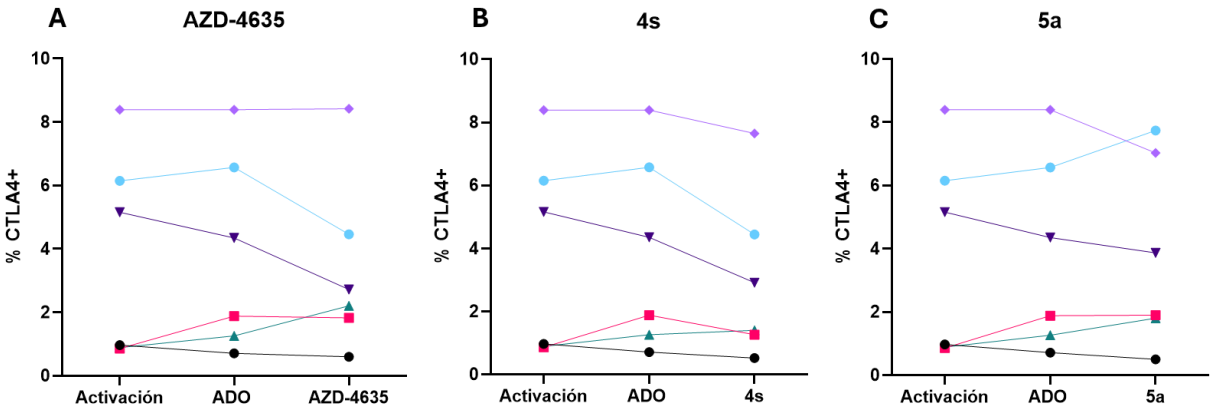


Figura 3.67. Resultados de la reactivación de la actividad inmunitaria expresada en % de la expresión del marcador CTLA-4 para los compuestos: A) **AZD-4635**, B) **4s** y C) **5a**.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.9 Resumen de los principales hallazgos del Capítulo II

- Se han sintetizado un total de 38 nuevos antagonistas $A_{2A}R$ que se agrupan en dos quimiotipos distintos.
- Hemos estudiado la REA de las dos series (IV-V) e identificado los mejores sustituyentes para R^1, R^2 y R^3 en cada una de ellas.
- Hemos identificado los patrones de sustitución que generan ligandos con afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$.
- Se han identificado 7 compuestos que exhiben una K_i < 10 nM y una completa selectividad por el $A_{2A}R$ (Figura 3.68).
- Los compuestos **5f** y **5k** (Serie V) han mejorado 25 veces la solubilidad del ligando modelo.
- Se han estudiado y propuesto los posibles modo de unión de 2 compuestos representativos (**3c** y **5d**).
- Se ha estudiado el efecto antiproliferativo de varios de los compuestos sintetizados en este capítulo en líneas tumorales de melanoma y cáncer de mama.
- Hemos demostrado el potencial de los compuestos **4s** y **5a** para revertir el efecto inmunosupresor causado por la ADO.

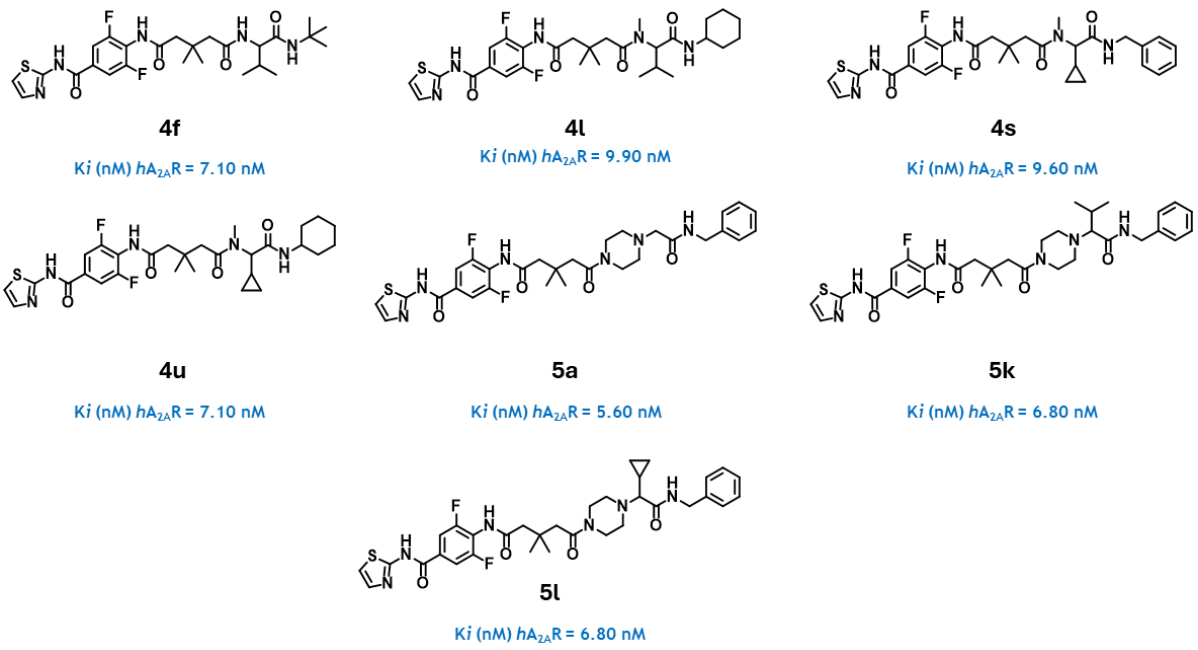


Figura 3.68. Selección de los mejores antagonistas selectivos y con afinidad K_i $A_{2A}R$ < 10 nM obtenidos en el Capítulo II.

3.3 CAPÍTULO III

3.3.1 Antagonistas duales A_{2A}/A_{2B}

3.3.1.1 Diseño de los ligandos

Tal como se expuso en el apartado 1.3 (Adenosina: implicación en el sistema inmune y aplicaciones en el contexto del cáncer), el eje adenosinérgico desempeña un papel fundamental en la fisiopatología del cáncer. En particular, en los últimos años se ha validado a nivel pre-clínico y clínico la implicación de los $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$ en distintos procesos asociados a la progresión tumoral. La activación del receptor $A_{2A}R$ no solo induce una profunda inmunosupresión en el microambiente tumoral, inhibiendo la respuesta antitumoral de linfocitos T citotóxicos y células NK, sino que también favorece la proliferación de las células tumorales (Figura 3.69). Por su parte, la activación del receptor $A_{2B}R$ se ha asociado con mecanismos clave en la progresión del cáncer, como la proliferación celular, la inmunosupresión, la metástasis y la angiogénesis (Figura 3.69). En este contexto, la modulación farmacológica del eje adenosinérgico mediante el empleo de antagonistas selectivos para $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$ se ha consolidado como una estrategia terapéutica emergente en oncología. Estos antagonistas permiten contrarrestar los efectos inmunosupresores y protumorales mediados por la adenosina, restableciendo la actividad del sistema inmunitario e interfiriendo con procesos biológicos esenciales para el crecimiento y diseminación del tumor.

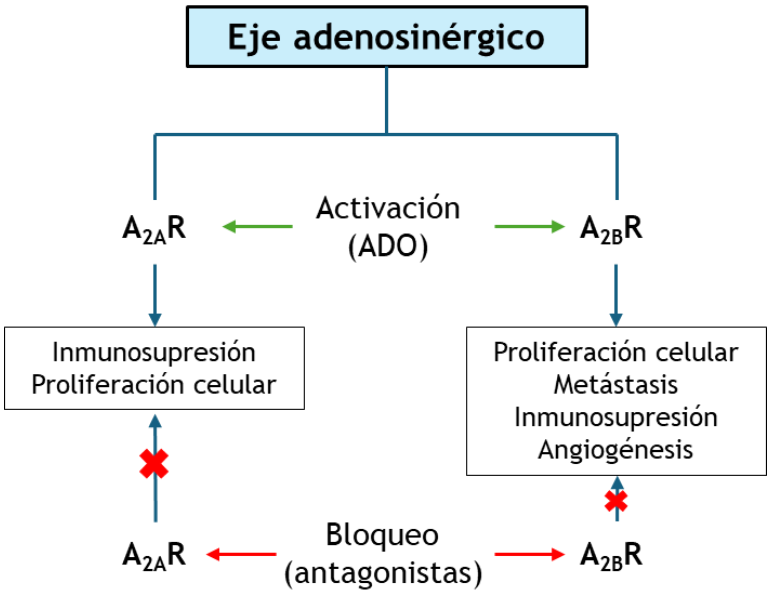


Figura 3.69. Efectos derivados de la regulación del eje adenosinérgico en el contexto del cáncer.

El diseño de la serie VI se fundamenta en la tendencia observada durante el análisis de la REA llevada a cabo en el Capítulo II. Tal como se ha comentado previamente, cuando se introduce un grupo bencilo en la posición R^3 y tenemos en las posiciones R^1 = H y R^2 = H, *i*-Pr o *c*-Pr, los compuestos resultantes presentan un perfil de afinidad dual sobre $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$. Esta observación se identificó inicialmente en la serie III del Capítulo I, particularmente con el compuesto **3a** (K_i $A_{2A}R$ = 24.8 nM y K_i $A_{2B}R$ = 307 nM), y fue posteriormente corroborada en la serie IV con los compuestos **4e**, **4ñ y 4x** (Figura 3.70), lo que sugiere una REA prometedora para el diseño de antagonistas con un perfil dual.

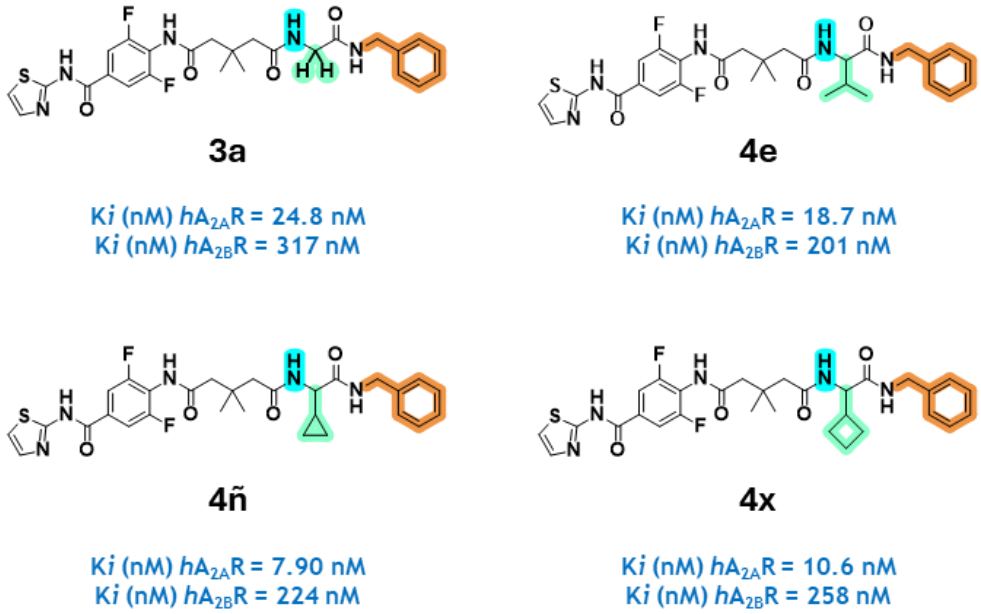


Figura 3.70. Estructuras de los compuestos con afinidad dual obtenidos en las series III y IV

A partir de este hallazgo, se ha planteado una estrategia de diseño con el objetivo de profundizar en esta tendencia dual. Para ello, se decidió conservar las sustituciones previamente mencionadas en las posiciones R^1 (H) y R^2 (H, *i*-Pr y *c*-Pr) (se descartó el *c*-Bu ya que también proporciona actividad sobre el A_1R), y centrar la atención en la exploración sistemática de modificaciones estructurales en la posición R^3, concretamente mediante la incorporación de diversos elementos estructurales alrededor del grupo bencilo (Figura 3.71). Esta aproximación tiene como objetivo evaluar de forma más detallada el impacto que ejercen las distintas sustituciones en R^3 (con el anillo de benceno como estructura central) sobre la afinidad y selectividad hacia ambos receptores. Cabe destacar que, a modo de comprobación, se han

sintetizado también los análogos con $R^1 = CH_3$, esos compuestos nos permitirán corroborar la tendencia observada en la serie IV de que este grupo confiere selectividad por el $A_{2A}R$, además de mejorar su afinidad.

Con el fin de llevar a cabo la exploración estructural propuesta, se ha utilizado la reacción U-CR4 como metodología sintética, dada su eficiencia, versatilidad y compatibilidad demostrada con una amplia diversidad de sustratos. A través de esta estrategia sintética se ha diseñado y sintetizado la **serie VI**, compuesta por un total de 27 nuevos derivados, todos ellos con estructuras diversificadas en la posición R^3. Esta colección está orientada al estudio de la afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ y proporciona una base sólida para complementar el análisis de la REA, detallado en las secciones posteriores. En la Figura 3.71 se muestra los elementos de diversidad introducidos en la serie VI.

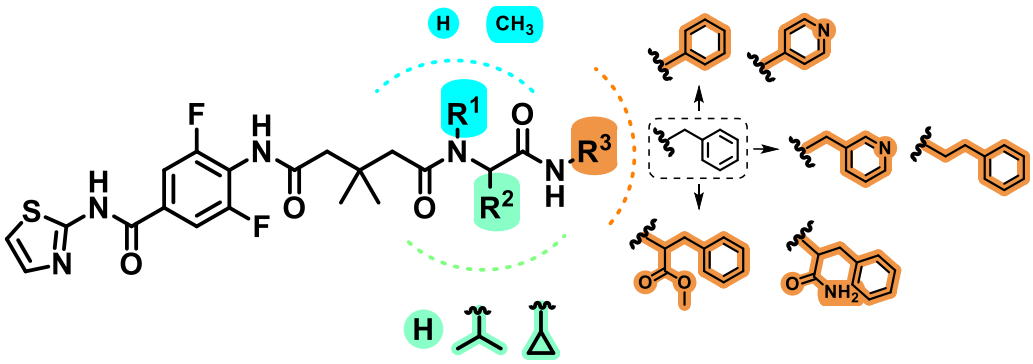


Figura 3.71. Estructura general de la Serie VI y diversidades introducidas durante la búsqueda de compuestos duales A_{2A}/A_{2B} realizada en el Capítulo III.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.1.2 Química

Los precursores empleados para la síntesis de los compuestos propuestos en este capítulo (fármacos duales antagonistas del $A_{2A}R$ y del $A_{2B}R$), derivados de la estructura 3,5-difluoro-*N*-(tiazol-2-il)benzamida, se muestran en la Figura 3.72. Todos los precursores son comerciales a excepción del ácido carboxílico A18, cuya síntesis se ha descrito en el Capítulo I dentro del apartado 3.1.2.

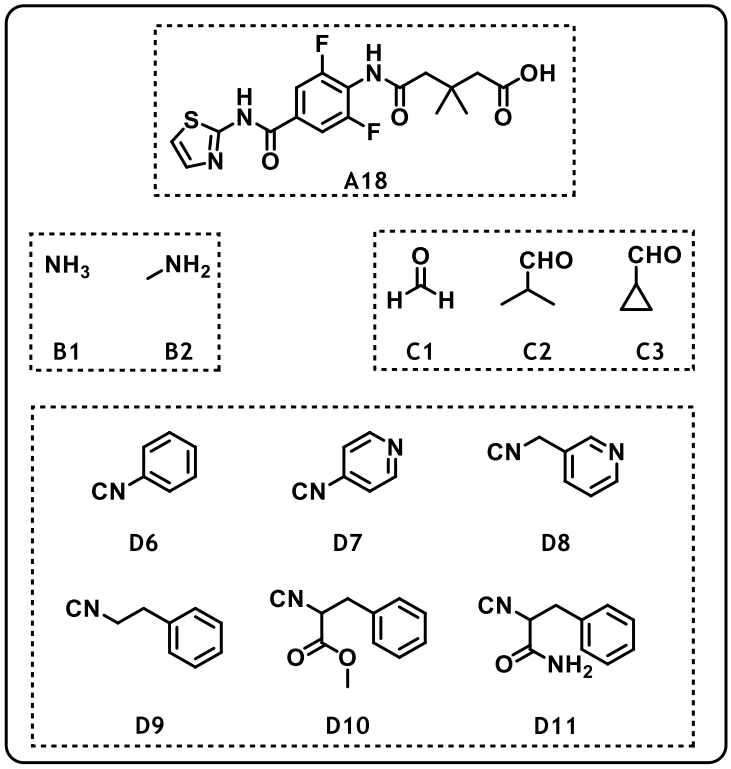
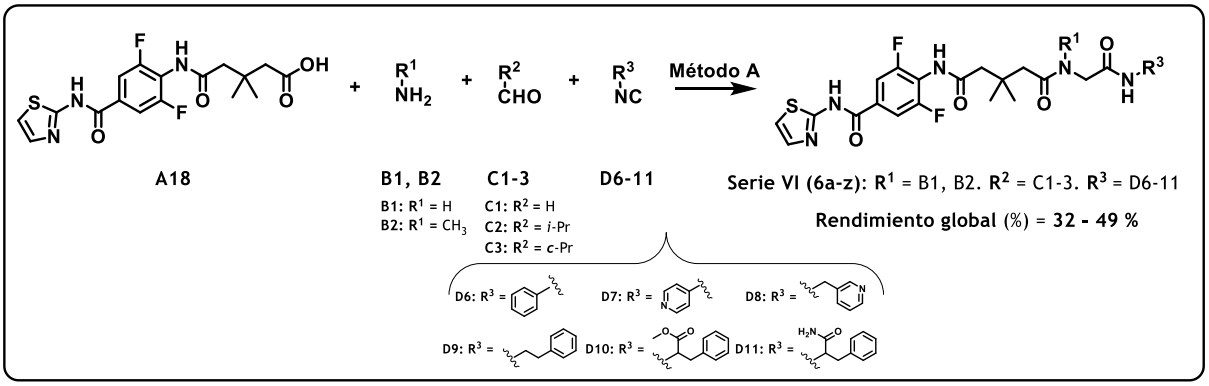


Figura 3.72. Precursores sintéticos utilizados en la serie VI del Capítulo III. A: ácido carboxílico, B: aminas, C: aldehídos, y D: isonitrilos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La síntesis de los 27 derivados de la serie VI **6a-z** se realizó siguiendo las condiciones descritas en el esquema que se muestra a continuación.



Esquema 3.8. Ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos **6a-z** pertenecientes a la serie VI del Capítulo III basada en la reacción de Ugi-4CR. Método A: MeOH, T.A., 48 h

El ácido carboxílico (**A18**), en combinación con una amina [amoníaco (**B1**) o metilamina (**B2**)], un aldehído [formaldehído (**C1**), isopropilaldehído (**C2**) o ciclopropilaldehído (**C3**)], y el correspondiente isonitrilo [isocianobenceno (**D6**), 4-isocianopiridina (**D7**), 3-(isocianometil)piridina (**D8**), (2-isocianoetil)benceno (**D9**), metil 2-isociano-3-fenilpropanoato (**D10**) y 2-isociano-3-fenilpropanamida (**D11**)], se emplearon como precursores para la síntesis de los compuestos diseñados (fármacos duales $A_{2A}R/A_{2B}R$) en la serie VI. Los derivados deseados **6a-z** se obtuvieron según se muestra en el Esquema 3.8. Los precursores se disolvieron en MeOH y se sometieron a agitación orbital a temperatura ambiente durante 48 horas (Método A). Tras la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida, obteniéndose un residuo oleoso que posteriormente se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando una mezcla de DCM:MeOH en gradiente como eluyente. Todas las reacciones fueron monitorizadas mediante TLC. La reacción de Ugi-4CR permitió obtener los productos deseados con rendimientos de entre el 32 y el 49 %. La pureza de todos los compuestos sintetizados se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), obteniéndose valores superiores al 95 %.

En el apartado 5 (Experimental section) se proporciona una descripción detallada de los métodos sintéticos empleados, así como los datos estructurales, espectroscópicos y analíticos de todos los compuestos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La colección de los 27 derivados **6a-z** sintetizados en la serie VI se muestra a continuación.

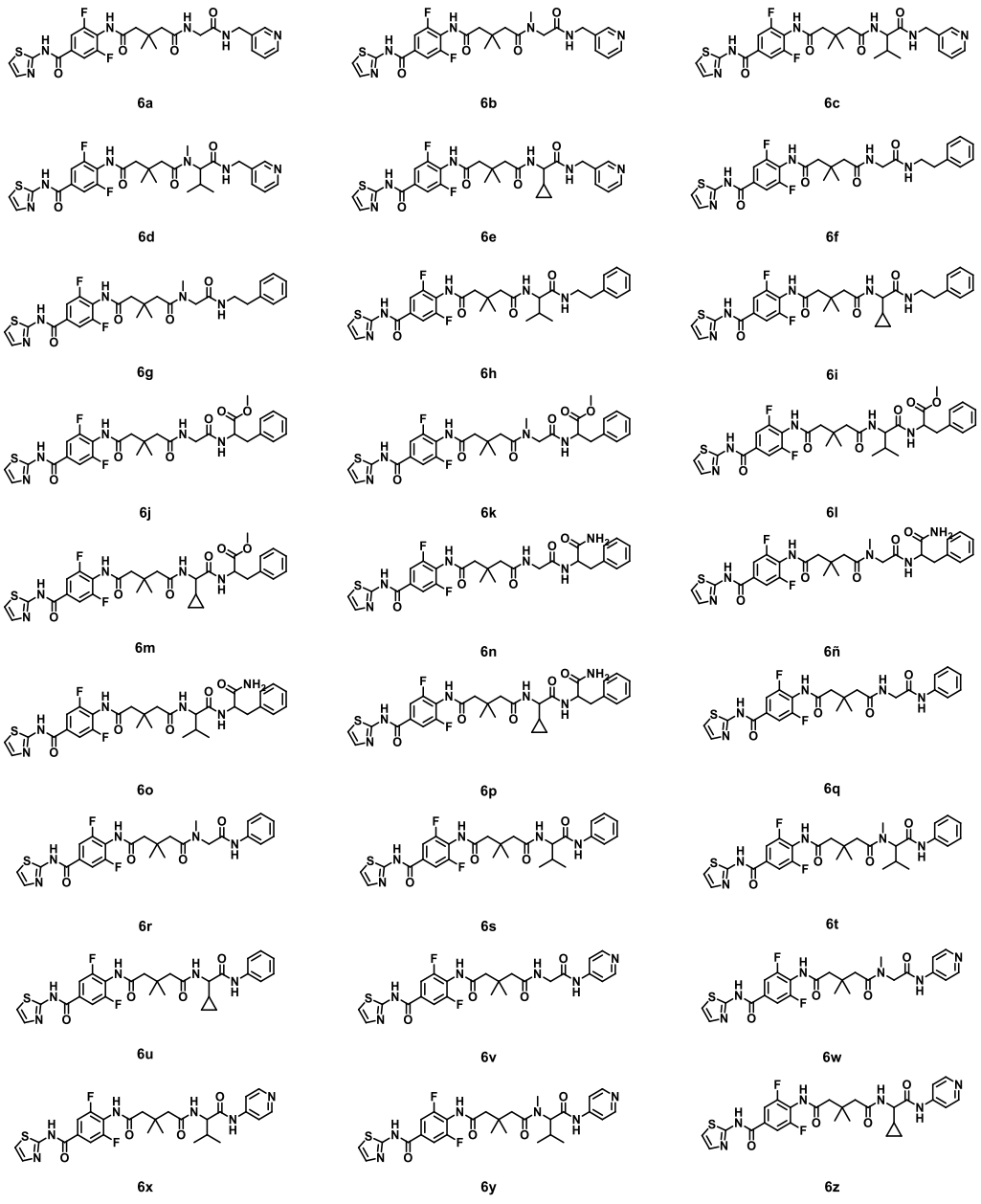


Figura 3.73. Estructura de los 27 compuestos pertenecientes a la serie VI.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A continuación, a modo de ejemplo, se muestran espectros de RMN representativos de los compuestos sintetizados en la serie VI.

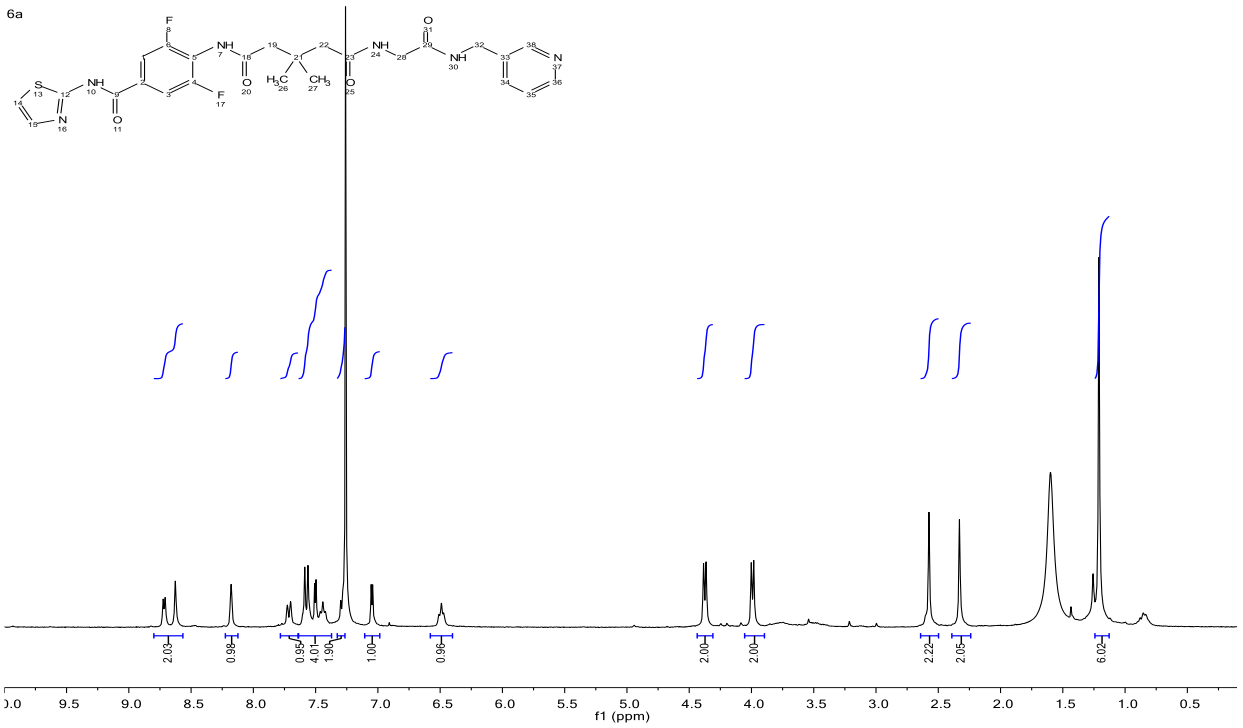


Figura 3.74. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto **6a** en $CDCl_3$ (300 MHz).

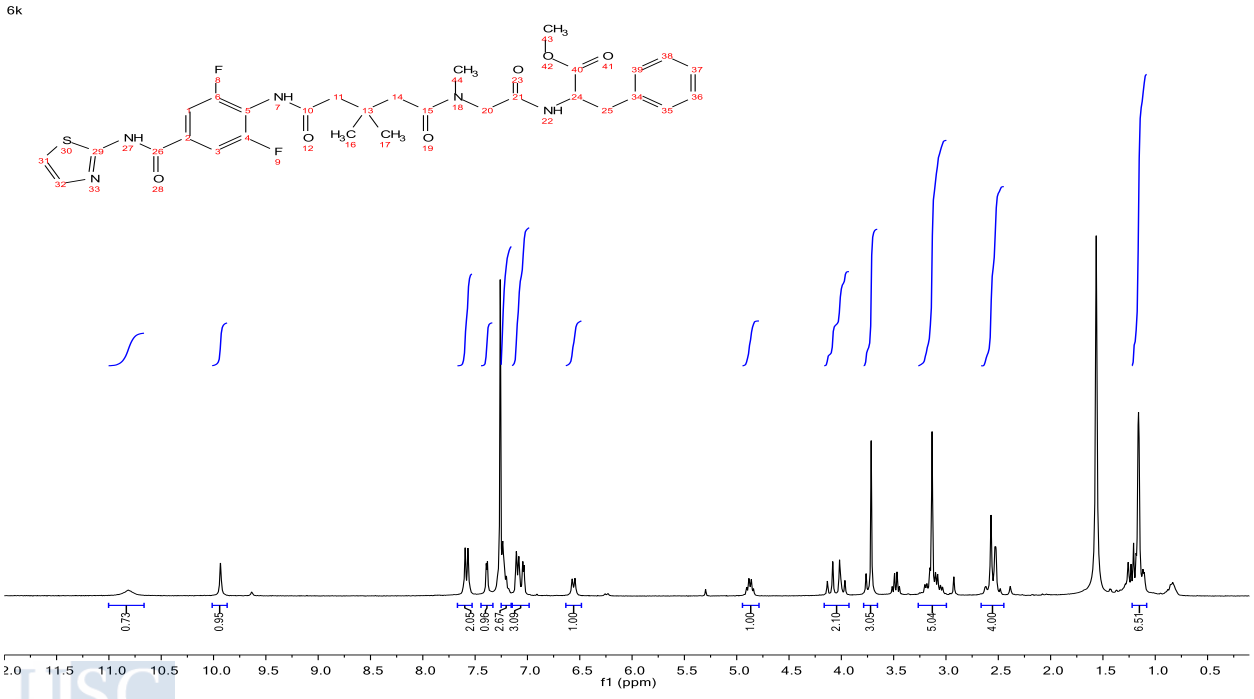


Figura 3.75. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto **6k** en $CDCl_3$ (300 MHz).

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

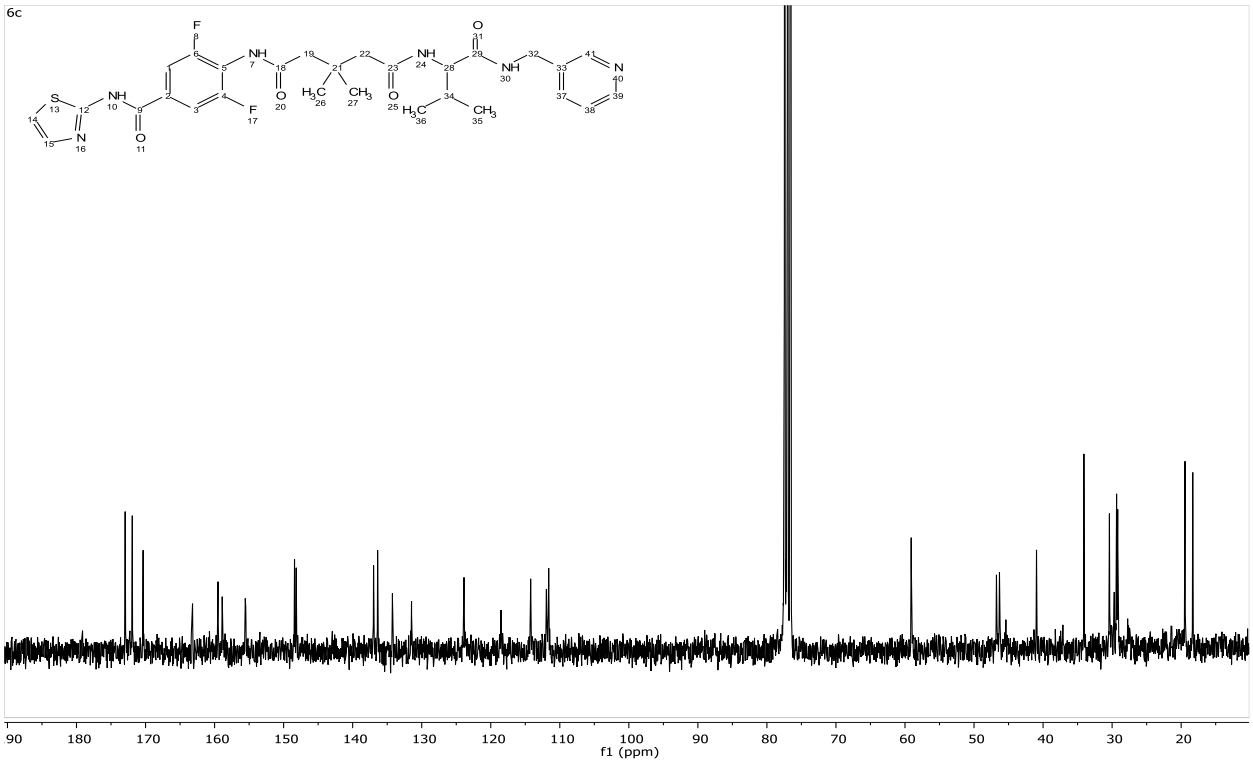


Figura 3.76. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **6c** en $CDCl_3$ (300 MHz).

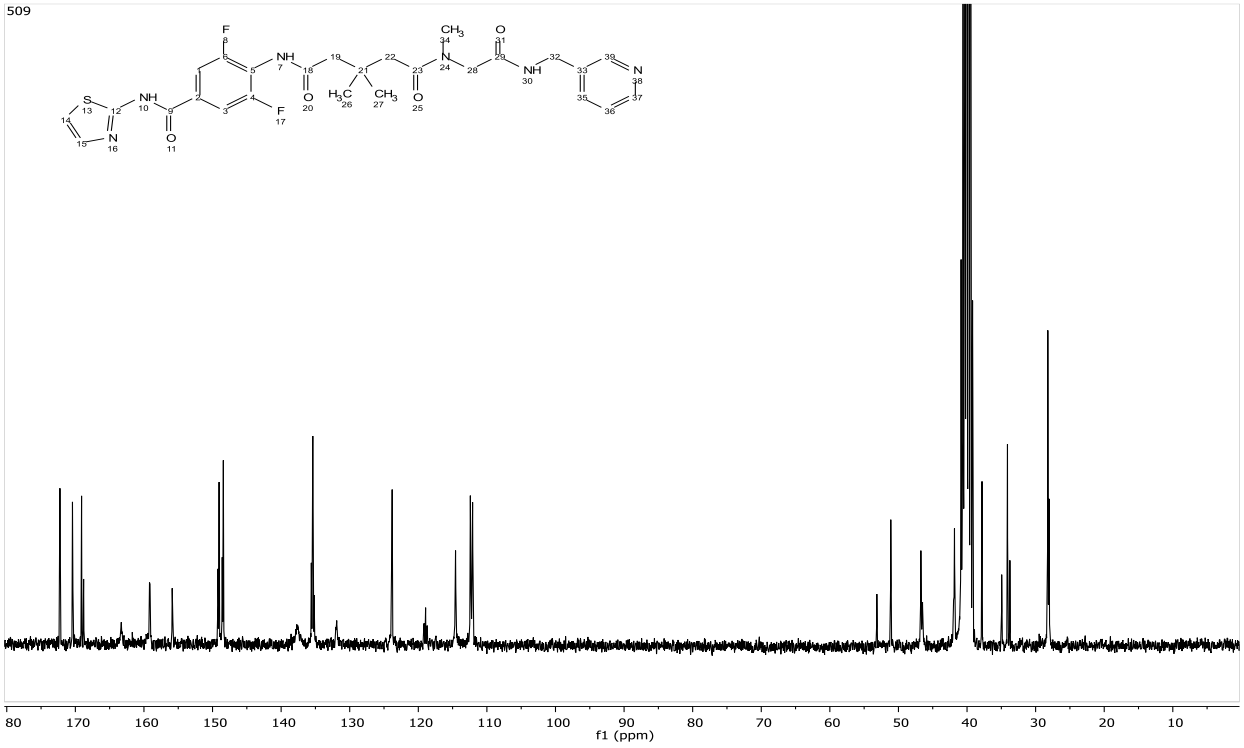


Figura 3.77. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **6b** en DMSO-d_6 (300 MHz).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.1.3 Evaluación farmacológica

Ensayos de afinidad

El perfil adenosinérgico (afinidad y selectividad) de los 27 nuevos derivados de 3,5-difluoro-*N*-(tiazol-2-il)benzamida (**6a-z**), de la **serie VI**, fue evaluado *in vitro* mediante ensayos competitivos con radioligandos en los cuatro subtipos de receptores de adenosina (A_1R, $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ y A_3R). La evaluación farmacológica fue realizada en colaboración con los profesores Maria I. Loza y José Brea, en el grupo BioFarma (USC). Para estos estudios, los receptores de adenosina humanos fueron expresados en líneas celulares transfectadas, utilizando, células de ovario de hámster chino (CHO) para A_1R; células de carcinoma epitelial humano (HeLa) para $A_{2A}R$ y A_3R y células de riñón embrionario humano (HEK-293) para $A_{2B}R$. Los radioligandos empleados en los ensayos de unión fueron: [^{3}H]DPCPX para A_1R y $A_{2B}R$; [^{3}H]NECA para A_3R y [^{3}H]ZM241385 para $A_{2A}R$. Todos los compuestos fueron inicialmente evaluados a 1 μM y los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 3.8. Con el objetivo de poder proporcionar una comparación más rápida, se han incluido seis compuestos previamente sintetizados en la serie III (compuestos **3a** y **3d**), así como cuatro compuestos de la serie IV (**4e**, **4j**, **4ñ** y **4s**).

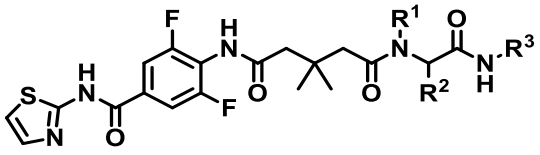
Los datos de unión se presentan como K_i ± SEM (nM, n = 3), obtenidos mediante ajuste por regresión no lineal utilizando el software Prism 10.0 (GraphPad, San Diego, CA). Para aquellos compuestos que no desplazaron completamente el radioligando (< 60 %), debido a su baja afinidad o solubilidad, los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la unión específica a 1 μM (n = 2, promedio).

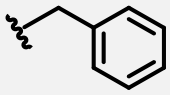
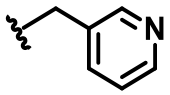
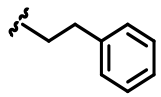
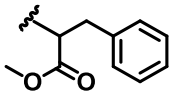
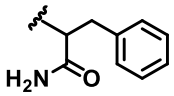
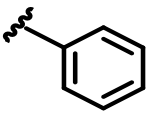
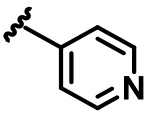
Como control interno, en estos estudios empleamos antagonistas $A_{2A}R$ de referencia (**ZM241385**, **LuAA-41063** y **Etrumadenant**) que fueron evaluados simultáneamente y con los mismos protocolos experimentales que nuestros ligandos. Los datos obtenidos para esos fármacos de referencia se presentan en las correspondientes tablas.

En el apartado 5 (Experimental section) se proporciona una descripción detallada de los protocolos experimentales y estadísticos empleados para la determinación de la afinidad de los compuestos en cada subtipo de receptor de adenosina.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.8. Estructura general y datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina de los compuestos pertenecientes a la serie VI **6a-z**.



Compuesto	R^1	R^2	R^3	K_i (nM) o % a 1 µM			
				hA_1[a)]	hA_{2A}[b)]	hA_{2B}[c)]	hA_3[d)]
3a	H	H		40%	24.8 ± 1.2	307 ± 5	11%
3d	CH_3	H		21%	17.3 ± 1.5	28%	8%
4e	H	*i*-Pr		32%	18.7 ± 1.4	201 ± 4.7	7%
4j	CH_3	*i*-Pr		32%	5.40 ± 0.8	390 ± 12	2%
4ñ	H	*c*-Pr		42%	7.90 ± 1.1	224 ± 6.0	28%
4s	CH_3	*c*-Pr		34%	9.60 ± 0.7	30%	10%
6a	H	H		17%	21.4 ± 1.8	17%	5%
6b	CH_3	H		16%	23.8 ± 1.2	16%	13%
6c	H	*i*-Pr		25%	8.00 ± 0.9	40%	4%
6d	CH_3	*i*-Pr		29%	5.71 ± 1.0	31%	4%
6e	H	*c*-Pr		18%	7.00 ± 1.2	246 ± 6	1%
6f	H	H		29%	7.90 ± 0.7	30%	29%
6g	CH_3	H		41%	12.3 ± 1.0	27%	21%
6h	H	*i*-Pr		20%	8.10 ± 1.6	29%	21%
6i	H	*c*-Pr		29%	4.10 ± 0.8	188 ± 4	24%
6j	H	H		12%	27.6 ± 1.5	26%	7%
6k	CH_3	H		33%	25.0 ± 1.2	19%	28%
6l	H	*i*-Pr		29%	15.4 ± 1.2	28%	7%
6m	H	*c*-Pr		11%	23.4 ± 1.5	163 ± 4	29%
6n	H	H		35%	10.9 ± 0.9	470 ± 12	13%
6ñ	CH_3	H		25%	32.7 ± 1.7	24%	10%
6o	H	*i*-Pr		16%	22.8 ± 1.8	29%	11%
6p	H	*c*-Pr		25%	23.1 ± 1.5	219 ± 5	4%
6q	H	H		38%	5.30 ± 0.5	258 ± 8	21%
6r	CH_3	H		22%	22.0 ± 1.3	661 ± 14	55%
6s	H	*i*-Pr		23%	20.9 ± 1.2	380 ± 9	10%
6t	CH_3	*i*-Pr		23%	7.10 ± 0.8	36%	9%
6u	H	*c*-Pr		22%	27.1 ± 1.9	121 ± 3	6%
6v	H	H		32%	15.8 ± 0.8	276 ± 9	4%
6w	CH_3	H		46%	13.0 ± 1.1	364 ± 10	10%
6x	H	*i*-Pr		21%	11.9 ± 1.3	28%	12%
6y	CH_3	*i*-Pr		29%	9.00 ± 0.9	10%	5%
6z	H	*c*-Pr		5%	14.5 ± 1.1	40%	6%
LuAA-41063*	-	-	-	409	4.9	-	-
LuAA-41063**	-	-	-	344 ± 12	5.2 ± 0.6	321 ± 8	4%
Etrumadenant	-	-	-	65.0 ± 4	1.50 ± 0.3	2.00 ± 0.9	489 ± 10
ZM241385	-	-	-	683 ± 4.0	1.9 ± 0.1	65.7 ± 1.0	863 ± 4.0

a) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células CHO humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). b) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol en células HeLa humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). c) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células HEK-293 humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). d) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]NECA en células HeLa humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). *) Datos de afinidad extraídos de la referencia bibliográfica 237. **) Datos de afinidad experimentales obtenidos en nuestros ensayos.

USC DE COMPOSTELA

3.3.1.4 Relación estructura-actividad

Una vez confirmada en el Capítulo II la tendencia observada para los ligandos con sustituyentes en R^1 = H, R^2 = H, *i*-Pr o *c*-Pr y R^3 = Bn, los cuales mostraron una afinidad dual frente a los subtipos $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$, en esta sección se llevará a cabo un análisis detallado de la REA centrado específicamente en las modificaciones estructurales introducidas en el farmacóforo secundario, concretamente en la posición R^3. Para este estudio comparativo, se utilizarán los datos farmacológicos recopilados en la Tabla 3.8 correspondientes a los compuestos de la serie VI.

Cabe destacar que los ligandos que presentan un centro estereogénico han sido evaluados como mezclas racémicas, y los estudios comparativos se han realizado utilizando como referencia el ligando modelo **LuAA-41063** (**VII**).

El análisis se realizará en grupos en base a la sustitución presente en R^3 y finalmente se realizará una valoración conjunta destacando los mejores patrones de sustitución para obtener el perfil de afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$.

Efecto del sustituyente en R^3

Se llevaron a cabo seis modificaciones estructurales con el objetivo de evaluar la influencia del grupo R^3 en la unión al $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$. Tal como se expuso en el apartado de diseño de ligandos, se incorporaron diversos análogos del grupo bencilo, entre los que se incluyen: (3-piridil)metilo, 2-fenetilo, 2-metil-3-fenilpropanamida-2-ilo, 2-metil-3-fenilpropanoato-2-ilo, fenilo y piridilo. Los compuestos con afinidad dual obtenidos serán comparados con sus correspondientes análogos con R^3 = Bn de las series anteriores, con el fin de determinar cómo afecta la introducción de estos nuevos sustituyentes a la afinidad por ambos subtipos de receptores.

El primer sustituyente en R^3 analizado corresponde al grupo **(3-piridil)metilo** (compuestos **6a**, **6b**, **6c**, **6d** y **6e**), únicamente se ha observado afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ en el compuesto **6e**, el cual presenta R^1 = H y R^2 = *c*-Pr. Este ligando mostró valores de K_i $A_{2A}R$ = 7.00 nM y K_i $A_{2B}R$ = 246 nM (Tabla 3.8). Al comparar estos resultados con los obtenidos para el compuesto **4ñ** de la serie IV (análogo con R^3 = Bn), se observa una afinidad dual de magnitud comparable (Figura 3.78A). Esto sugiere que, bajo este patrón de sustituciones, ambos grupos en R^3 ejercen una influencia similar sobre la afinidad dual. En contraste, el resto de las combinaciones obtenidas conducen mayoritariamente a ligandos con alta afinidad y

USC DE COMPOSTELA

selectividad por el $A_{2A}R$. Destacan los compuestos **6b** y **6d** exhiben unos valores de K_i $A_{2A}R$ = 8.00 nM y 5.71 nM, respectivamente (Figura 3.78B).

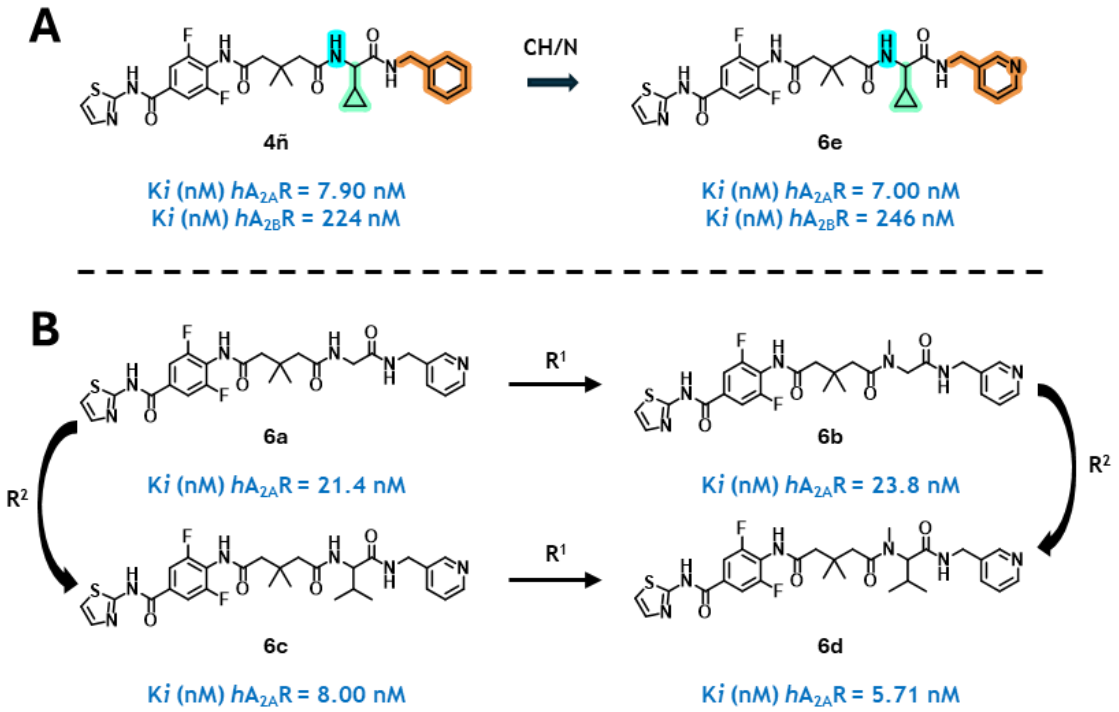


Figura 3.78. Datos de afinidad obtenidos para el grupo con R^3 = (3-piridil)metilo. A) Comparación entre la afinidad dual del compuesto **6e** y su análogo con R^3 = Bn (**4ñ**). B) Compuestos selectivos y con afinidad $A_{2A}R$ obtenidos dentro de este grupo de la serie VI.

Cuando el sustituyente en R^3 corresponde al grupo **2-fenetilo** (compuestos **6f**, **6g**, **6h**, **6i**), únicamente se ha observado afinidad dual ($A_{2A}R/A_{2B}R$) en el compuesto **6i**, el cual presenta nuevamente el patrón de sustituciones R^1 = H y R^2 = *c*-Pr. Este ligando mostró valores de K_i $A_{2A}R$ = 4.10 nM y K_i $A_{2B}R$ = 188 nM (Tabla 3.8). Al comparar estos resultados con los obtenidos para el compuesto **4ñ** de la serie IV (análogo con R^3 = Bn), se observa una mejora en afinidad por ambos receptores (Figura 3.79A). Esta mejora sugiere que el grupo 2-fenetilo se adapta de forma más favorable al sitio de unión de ambos receptores, posiblemente por una mejor acomodación estérica o por interacciones adicionales dentro del bolsillo hidrofóbico compartido por $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$. En contraste, el resto de las combinaciones obtenidas conducen a ligandos con alta afinidad y selectividad por el $A_{2A}R$. Los compuestos **6f**, **6g** y **6h** exhiben unos valores de K_i $A_{2A}R$ = 7.90 nM, 12.3 nM y 8.10 nM, respectivamente (Figura 3.79B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

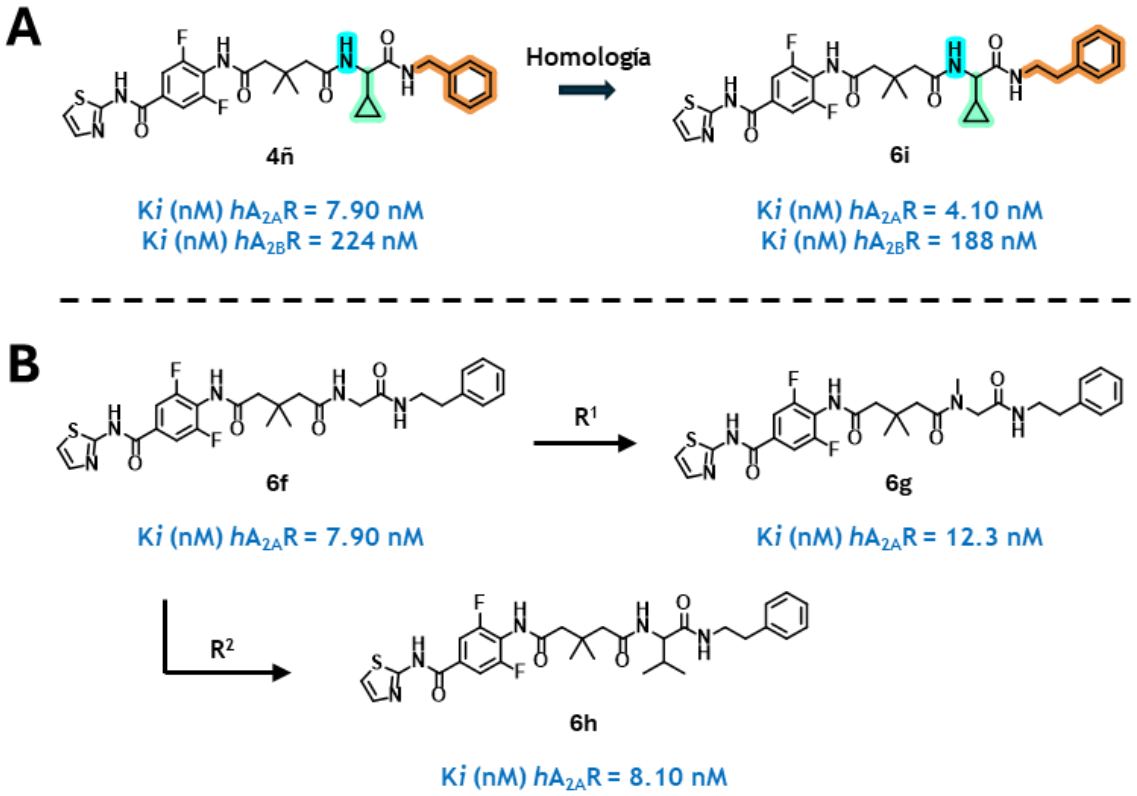


Figura 3.79. Datos de afinidad obtenidos para el grupo con R^3 = fenetilo. A) Comparación entre la afinidad dual del compuesto **6i** y su homólogo con R^3 = Bn (**4ñ**). B) Compuestos selectivos y con afinidad $A_{2A}R$ obtenidos dentro de este grupo de la serie VI.

Cuando el sustituyente en R^3 corresponde al grupo **2-metil-3-fenilpropanoato-2-ilo** (compuestos **6j**, **6k**, **6l**, **6m**), únicamente se ha observado afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ en el compuesto **6m**, el cual presenta nuevamente el patrón de sustituciones R^1 = H y R^2 = *c*-Pr. Este ligando mostró valores de K_i $A_{2A}R$ = 23.4 nM y K_i $A_{2B}R$ = 163 nM (Tabla 3.8). Al comparar estos resultados con los obtenidos para el compuesto **4ñ** de la serie IV (análogo con R^3 = Bn), se observa un descenso de 3 veces en la afinidad $A_{2A}R$ (Figura 3.80A) y una mejora clara en la afinidad $A_{2B}R$. Esta tendencia sugiere que este grupo en R3 favorece la interacción con el sitio de unión del $A_{2B}R$, pero es ligeramente peor tolerado en su sitio de unión en el $A_{2A}R$. El resto de las combinaciones obtenidas conducen a ligandos con alta afinidad y selectividad por el $A_{2A}R$. Los compuestos **6j**, **6k** y **6l** exhiben unos valores de K_i $A_{2A}R$ = 27.6 nM, 25.0 nM y 15.4 nM, respectivamente (Figura 3.80B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

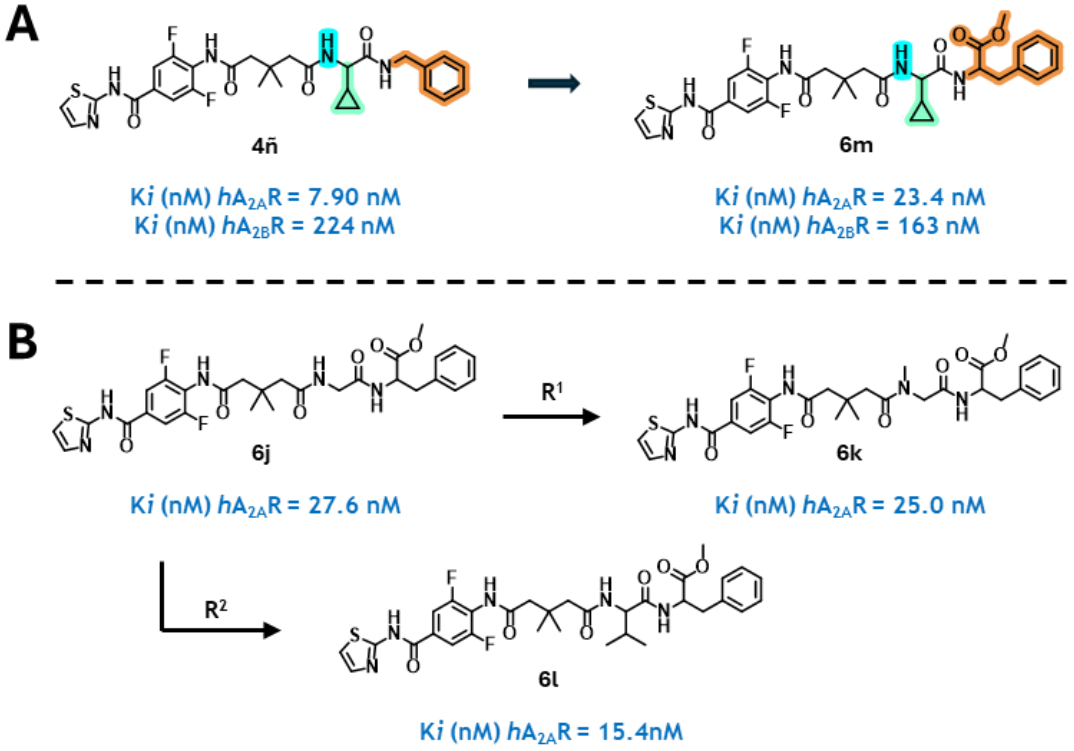


Figura 3.80. Datos de afinidad obtenidos para el grupo con R^3 = 2-metil-3-fenilpropanoato-2-ilo. A) Comparación entre la afinidad dual del compuesto **6m** y su análogo con R^3 = Bn (**4ñ**). B) Compuestos selectivos y con afinidad $A_{2A}R$ obtenidos dentro de este grupo de la serie VI.

Cuando el sustituyente en R^3 corresponde al grupo **2-metil-3-fenilpropanamida-2-ilo**, (compuestos **6n**, **6ñ**, **6o** y **6p)**, se identificaron dos ligandos con perfil dual $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$: los compuestos **6n** y **6o**. El compuesto **6o**, mantiene el patrón de sustitución R^1 = H y R^2 = *c*-Pr y presentó valores de K_i = 23.1 nM frente al $A_{2A}R$ y K_i = 219 nM $A_{2B}R$ (Tabla 3.8). Por su parte, el compuesto **6n**, con un patrón de sustitución R^1 = H y R^2 = H, mostró valores de K_i $A_{2A}R$ = 10.9 nM y K_i $A_{2B}R$ = 470 nM (Tabla 3.8). Al comparar el compuesto **6n** con su análogo con R^3 = Bn (**3a**), se observa una mejora de aproximadamente 2 veces en la afinidad por el $A_{2A}R$, acompañada de una pérdida cercana a 1,5 veces en la afinidad por el $A_{2B}R$ (Figura 3.81A). Asimismo, el análisis comparativo entre **6p** y su análogo con R^3 = Bn (**4ñ**) muestra una pérdida de aproximadamente 3 veces en la afinidad por el $A_{2A}R$, mientras que la afinidad por el $A_{2B}R$ permanece prácticamente sin variaciones significativas (Figura 3.81A). El resto de las combinaciones en este grupo condujo a ligandos con alta afinidad y selectividad por el $A_{2A}R$. En concreto, los compuestos **6ñ** y **6p** presentaron valores de K_i = 32.7 nM y 22.8 nM, respectivamente (Figura 3.81B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Cabe destacar que tanto los compuestos con R^3 = 2-metil-3-fenilpropanoato-2-ilo y R^3 = 2-metil-3-fenilpropanamida-2-ilo, contienen dos centros estereogénicos y, por lo tanto, es esperable que la separación y evaluación de los diasteroisómeros permita mejorar los datos de afinidad presentados.

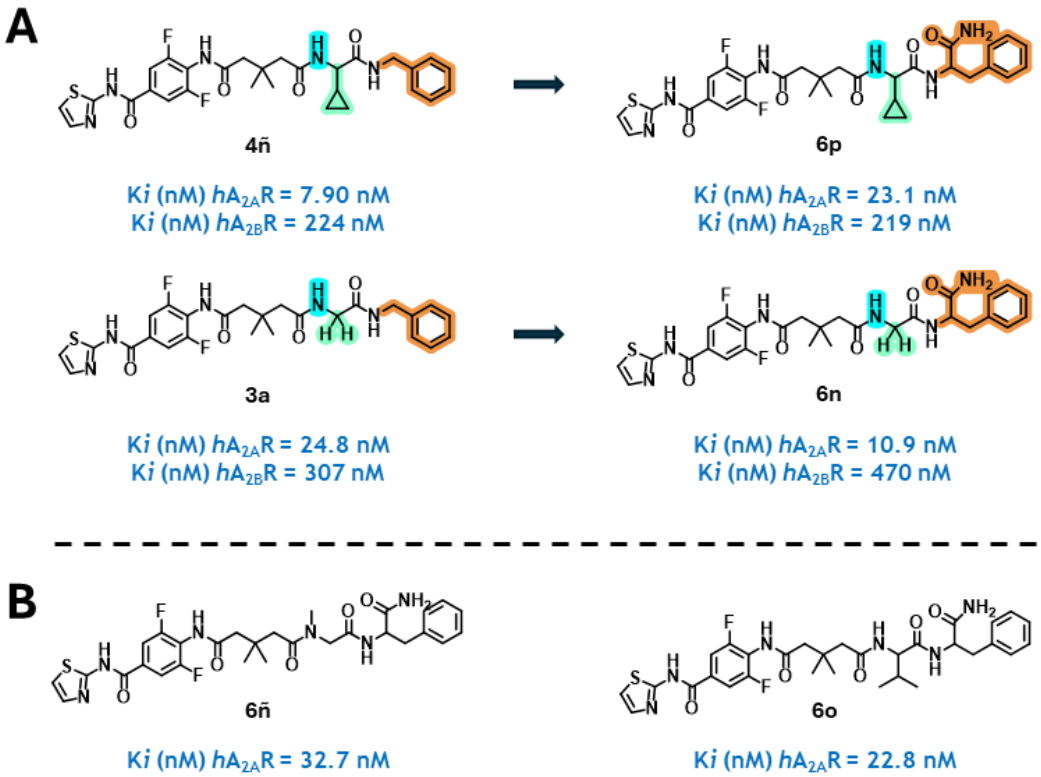


Figura 3.81. Datos de afinidad obtenidos para el grupo con R^3 = 2-metil-3-fenilpropanamida-2-ilo. A) Comparación entre la afinidad dual del compuesto **6p** y su análogo con R^3 = Bn (**4ñ**) y el compuesto **6n** con su análogo **3a**. B) Compuestos selectivos y con afinidad $A_{2A}R$ obtenidos dentro de este grupo de la serie VI.

Cuando el sustituyente en R^3 corresponde al grupo **fenilo**, (compuestos **6q**, **6r**, **6s**, **6t** y **6u**), se obtuvieron 3 compuestos con afinidad dual $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$: los compuestos **6q**, **6r** y **6u**. El mejor compuesto obtenido fue el **6u**, el cual mantiene el patrón de sustitución observado con anterioridad, R^1 = H y R^2 = *c*-Pr y presentó valores de K_i $A_{2A}R$ = 27.1 nM y K_i $A_{2B}R$ = 121 nM (Tabla 3.8). El segundo mejor compuesto obtenido en este grupo fue el compuesto **6q**, en el cual R^1 = H y R^2 = H y presenta unos valores de K_i $A_{2A}R$ = 5.30 nM y K_i $A_{2B}R$ = 219 nM (Tabla 3.8). El peor de los compuestos obtenidos fue el **6r,** (R^1 = CH_3 y R^2 = H) y presenta unos valores de K_i $A_{2A}R$ = 22.0 nM y K_i $A_{2B}R$ = 661 nM (Tabla 3.8).

Si comparamos el compuesto **6u** con su homólogo superior **4ñ** (R^3 = Bn) observamos que se ha producido un descenso en la afinidad $A_{2A}R$ de aproximadamente 3 veces, mientras que se ha producido un aumento de casi dos veces en su afinidad por $A_{2B}R$ (Figura 3.82A). Por otra parte, si comparamos el compuesto **6q** con su homólogo superior **3a** (R^3 = Bn) observamos que se ha producido un aumento en la afinidad $A_{2A}R$ de 5 veces, mientras que la afinidad por $A_{2B}R$ se ha mantenido prácticamente igual (Figura 3.82A). El resto de las modificaciones de este grupo condujo a compuestos con alta afinidad y selectividad por el $A_{2A}R$. En concreto los compuestos **6s** y **6t** presentaron valores de K_i = 20.9 nM y 7.10 nM, respectivamente (Figura 3.82B).

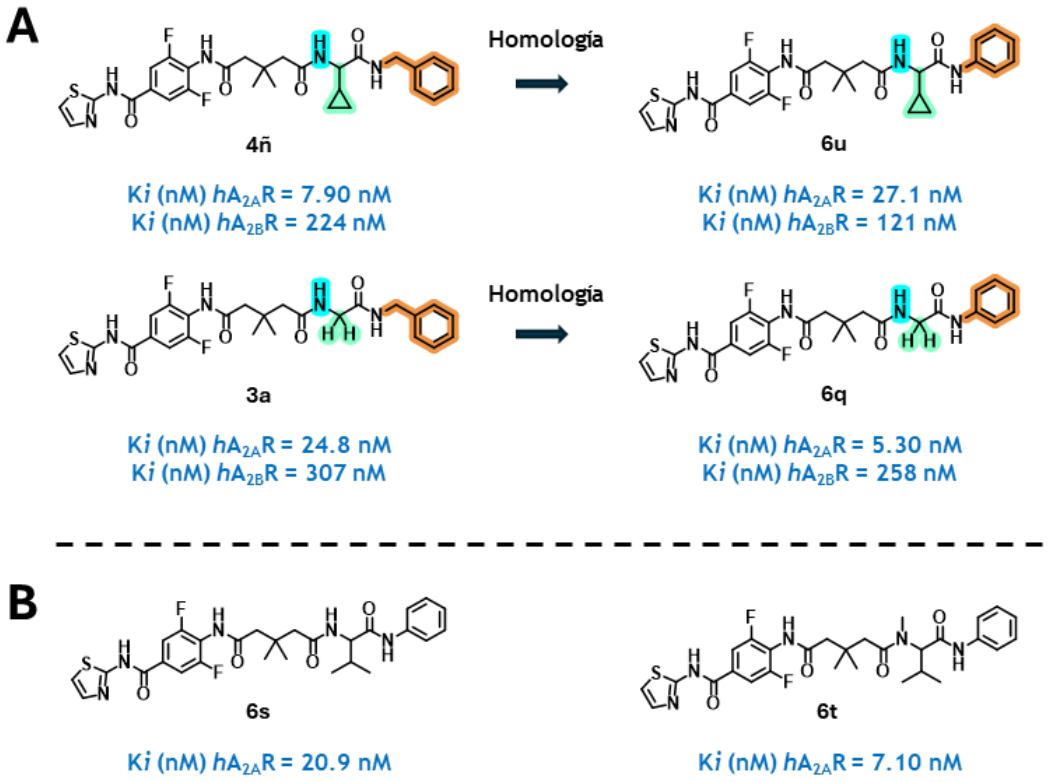


Figura 3.82. Datos de afinidad obtenidos para el grupo con R^3 = fenilo. A) Comparación entre la afinidad dual del compuesto **6u** y su homólogo con R^3 = Bn (**4ñ**) y el compuesto **6q** con su homólogo **3a**. B) Compuestos selectivos y con afinidad $A_{2A}R$ obtenidos dentro de este grupo de la serie VI.

Cuando el sustituyente en R^3 es un grupo **4-piridilo**, (compuestos **6v**, **6w**, **6x**, **6y** y **6z**), se obtuvieron 2 derivados con afinidad dual $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$: los compuestos **6u** y **6w**. Esta es la única sustitución en R^3 que no ha proporcionado compuestos con afinidad dual con la

USC DE COMPOSTELA

combinación R^1 = H y R^2 = *c*-Pr. El compuesto **6v** (R^1 = H y R^2 = H), presentó valores de K_i $A_{2A}R$ = 15.8 nM y K_i $A_{2B}R$ = 258 nM (Tabla 3.8). Por otra parte, el compuesto **6w** (R^1 = CH_3 y R^2 = H), presentó unos valores de K_i $A_{2A}R$ = 13.0 nM y K_i $A_{2B}R$ = 364 nM (Tabla 3.8). Si comparamos el compuesto **6v** con su análogo con R^3 = Bn (**3a**) observamos que se ha producido un aumento en la afinidad $A_{2A}R$ de aproximadamente 2 veces, mientras que la afinidad por $A_{2B}R$ se ha mejorado ligeramente (Figura 3.83A). Por otra parte, si comparamos el compuesto **6w** con su análogo con R^3 = Bn (**3d**) observamos que se ha producido un ligero aumento en la afinidad $A_{2A}R$ y ha demostrado afinidad por $A_{2B}R$ a diferencia de su análogo (Figura 3.83A). El resto de las combinaciones de este grupo condujo a compuestos con alta afinidad y selectividad por el $A_{2A}R$. En concreto los compuestos **6x**, **6y** y **6z** presentaron valores de K_i = 11.9 nM, 9.00 nM y 14.5 nM, respectivamente (Figura 3.83B)

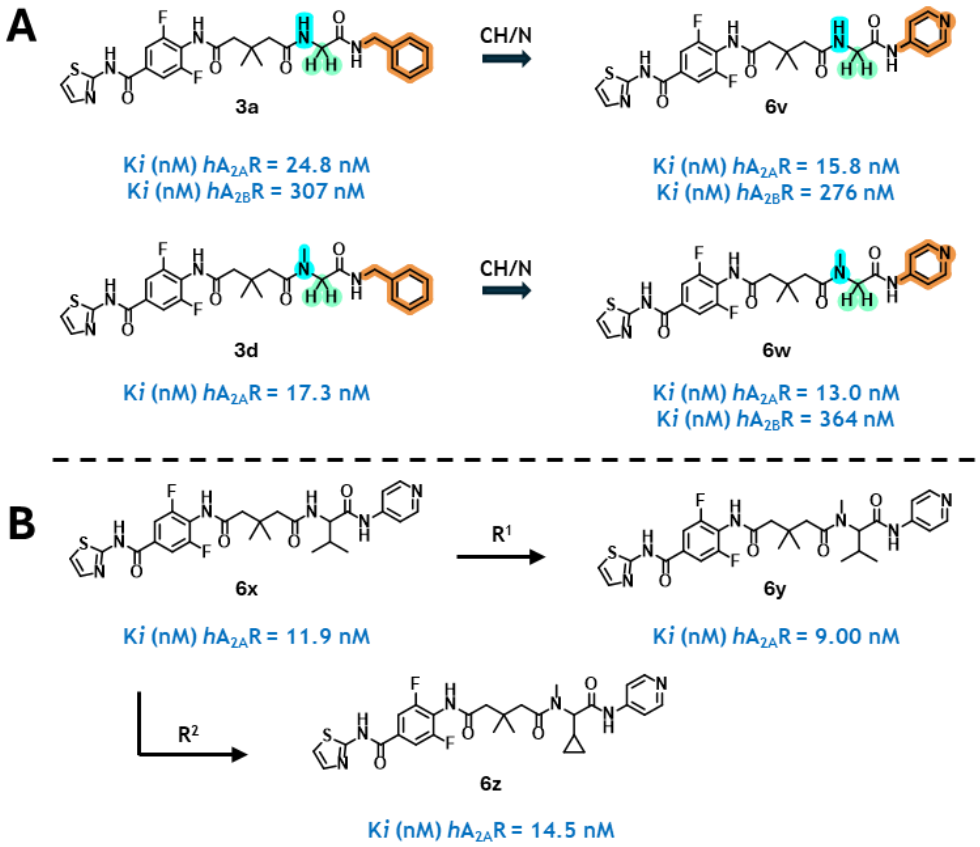


Figura 3.83. Datos de afinidad obtenidos para el grupo con R^3 = 4-piridilo. A) Comparación entre la afinidad dual del compuesto **6v** y su análogo con R^3 = Bn (**3a**) y el compuesto **6w** con su análogo **3d**. B) Compuestos selectivos y con afinidad $A_{2A}R$ obtenidos dentro de este grupo de la serie VI.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una vez analizada la REA, se puede concluir, que, en la serie VI se han sintetizado varios ligandos que muestran un perfil de afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ (Tabla 3.8). Independientemente del sustituyente introducido en R^3, los mejores compuestos obtenidos en esta serie muestran un patrón de sustitución en el que R^1 = H y R^2 = *c*-Pr (compuestos **6e**, **6i**, **6m**, **6p** y **6u**) (Figura 3.84), la única excepción a esta tendencia se produce cuando R^3 = 4-piridilo (**6z**) (Tabla 3.8). Estos resultados ponen de manifiesto que es posible optimizar los perfiles de afinidad dual de los ligandos derivados de LuAA-41063 mediante modificaciones en el farmacóforo secundario empleando la reacción U-4CR. En la Figura 3.84 se muestran, los mejores compuestos obtenidos en la serie VI, donde se hacen evidentes las mejoras alcanzadas en el perfil dual de los nuevos derivados.

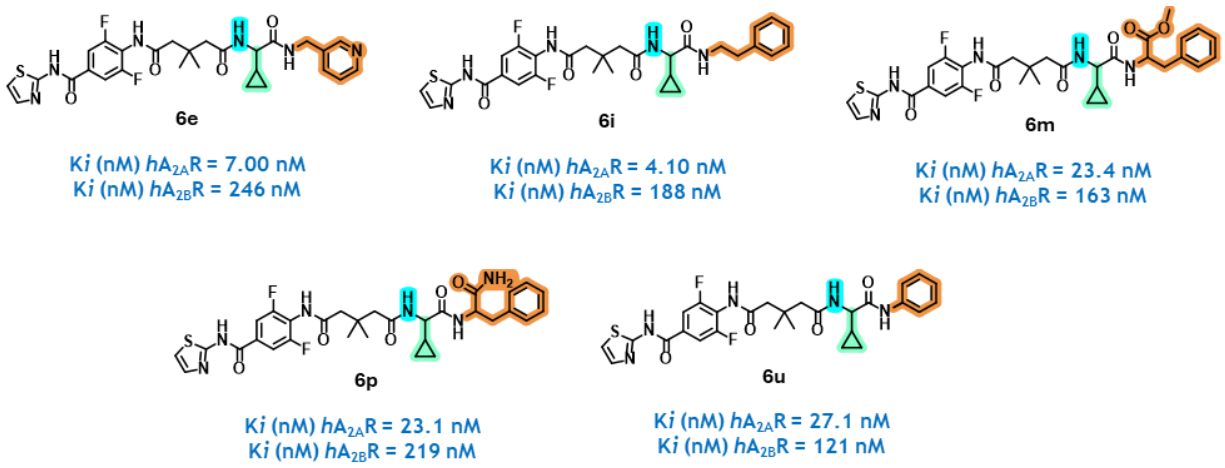


Figura 3.84. Mejores ligandos con afinidad dual obtenidos en la serie VI.

3.3.2 Compuestos duales A_{2A}-PARP-1

3.3.2.1 Diseño de los ligandos

El cáncer se caracteriza por una elevada complejidad biológica, en la que interactúan múltiples factores, como alteraciones genéticas, distintos tipos celulares, vías de señalización y dianas terapéuticas. Esta red de procesos interconectados dificulta el éxito de tratamientos dirigidos exclusivamente a una única diana terapéutica. La práctica clínica del tratamiento del cáncer ha demostrado de forma inequívoca las ventajas del uso combinado de fármacos con distintos mecanismos de acción. Por ello, en los últimos años se ha promovido el desarrollo de estrategias terapéuticas más integrales, como los fármacos multidiana, que actúan simultáneamente sobre varias dianas farmacológicas. Este enfoque permite abordar de forma más eficaz la heterogeneidad tumoral y mejorar la respuesta terapéutica, reduciendo el riesgo de aparición de resistencias y aumentando las posibilidades de controlar la enfermedad a largo plazo.

En consonancia con la línea de investigación desarrollada en la presente Tesis Doctoral, nos hemos propuesto la síntesis de ligandos duales A_{2A}/PARP1. Hasta la fecha no se han descrito fármacos que modulen simultáneamente estas dos dianas, por lo que nos hemos planteado la obtención de los primeros *first-in-class* A_{2A}/PARP1como reto para culminar este trabajo.

La implicación del A_{2A}R en la fisiopatología del cáncer ha sido ampliamente abordada a lo largo de esta Tesis Doctoral. Este receptor desempeña un papel clave en la inmunosupresión del microambiente tumoral, además de participar en procesos relacionados con la proliferación y supervivencia de las células tumorales (Figura 3.85). Por su parte, la enzima PARP1 pertenece a la familia de las poli(ADP-ribosa) polimerasas (PARPs), compuesta por 16 isoformas que intervienen en mecanismos esenciales como la reparación del ADN y la regulación de la muerte celular (Figura 3.85). En el contexto del cáncer, PARP1 permite a las células tumorales reparar el daño genético, favoreciendo así su supervivencia. Su inhibición se ha consolidado como una estrategia terapéutica eficaz, especialmente en tumores con deficiencias en otras vías de reparación, como los que presentan mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2. Actualmente, existen varios inhibidores de PARP1 aprobados para su uso clínico, siendo el más ampliamente empleado **Olaparib** (Lynparza®), indicado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer asociados a mutaciones en BRCA1/2, como el de mama, ovario o próstata.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

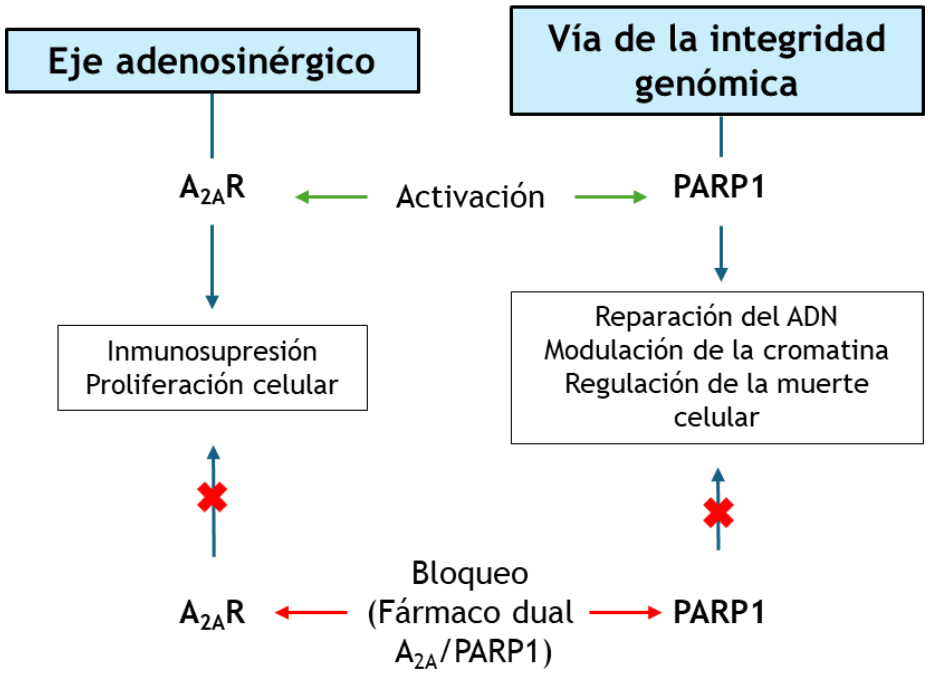


Figura 3.85. Efectos derivados de la regulación del eje adenosinérgico y de la vía de la integridad genómica en el contexto del cáncer.

En los capítulos anteriores de esta Tesis Doctoral se ha demostrado la notable robustez estructural de nuestros antagonistas A_{2A}, así como su versatilidad química. Mediante la elongación de la cadena alquílica lateral de LuAA-41063 y la incorporación de otros elementos estructurales, hemos obtenido compuestos con una alta afinidad y selectividad por el $A_{2A}R$ y compuestos con un perfil de afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$, además de una mejora sustancial en la solubilidad (Figura 3.86). Esto refuerza su potencial como punto de partida para el diseño racional de ligandos duales. Como exploración de ese potencial se procedió a la unión del farmacóforo dirigido a PARP1 a nuestros compuestos antagonistas $A_{2A}R$. Como farmacóforo de la enzima PARP1 se seleccionó el fármaco Olaparib (Figura 3.86), un potente inhibidor que, como se ha mencionado previamente, se encuentra actualmente en uso clínico en diversos tipos de cáncer asociados a mutaciones en BRCA1/2,(mama, ovario o próstata). En la literatura se han reportado numerosos ejemplos de derivados de Olaparib que incorporan espaciadores y conservan una actividad comparable a la del fármaco original (Figura 3.86). Este hecho, en parte, motivó la selección de dicho farmacóforo como base estructural para el diseño de compuestos con actividad dual A_{2A}/PARP1.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

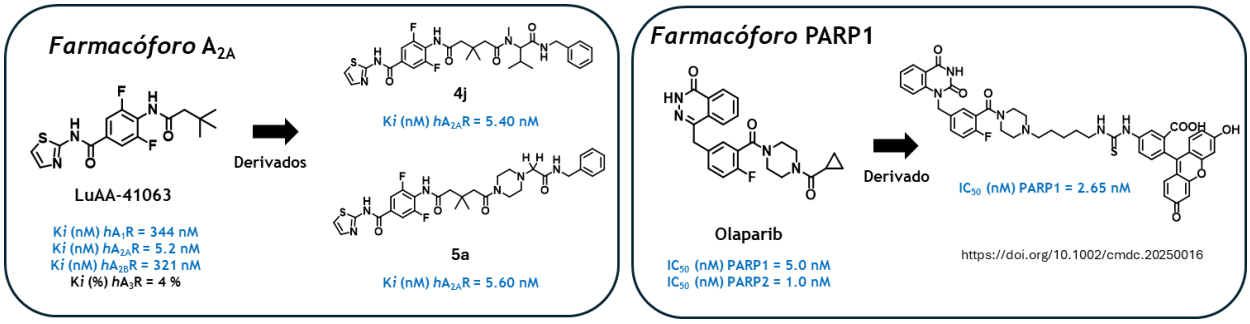


Figura 3.86. Farmacóforos seleccionados y ligandos derivados de los mismos.

Una vez seleccionados los farmacóforos de ambas dianas, hemos elegido la estrategia de diseño de *linking* para la obtención de los fármacos multidiana. Esta técnica se plantea como la opción más directa para combinarlos en una sola entidad molecular; sin embargo, no está exenta de complejidad sintética. La arquitectura molecular de los compuestos duales diseñados se muestra en la Figura 3.87. Como se puede observar, el farmacóforo de PARP1 se unirá a través de un espaciador variable (2,5 u 8 átomos) que se conecta al farmacóforo de A_{2A} a través del grupo R^3.

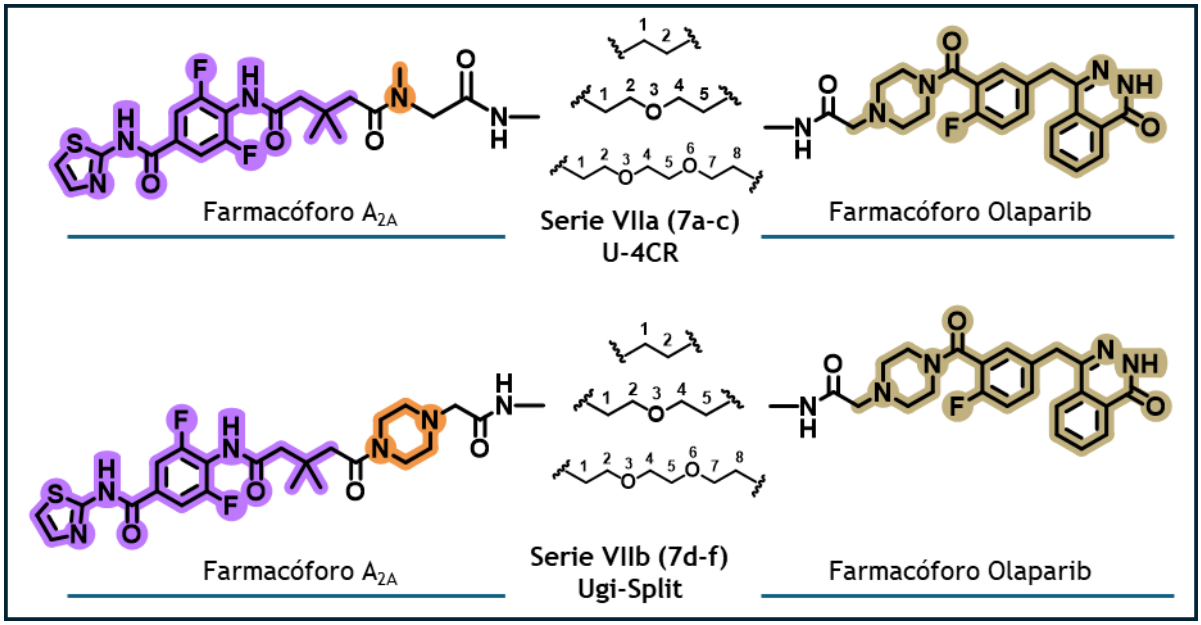
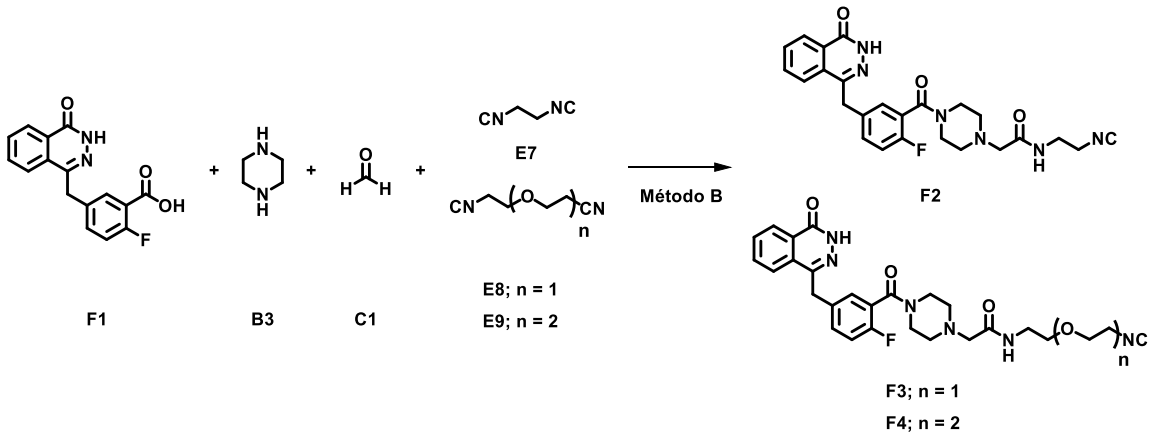


Figura 3.87. Estructuras generales de las series VIIa (Ugi-4CR, arriba) y la serie VIIb (Ugi-Split, abajo) sintetizadas en el Capítulo III. En violeta resaltado el farmacóforo A_{2A} y en marrón el farmacóforo de Olaparib.

De esta manera, para la serie VII, se diseñó una colección de **6 derivados**, distribuidos en dos subseries (**VIIa-VIIb**). Las series están organizadas en base a la reacción de Ugi empleada para el ensamblaje de los compuestos finales. Para la subserie VIIa se ha empleado la reacción de U-4CR y para la serie VIIb la Ugi-Split (Figura 3.87). Los compuestos finales entre cada subserie se diferencian en la amina empleada en la reacción de Ugi (naranja, Figura 3.87) y dentro de cada subserie se diferencian en el espaciador utilizado que contiene 2, 5 u 8 átomos (Figura 3.87).

3.3.2.2 Química

El diseño de los ligandos duales propuestos en este apartado (Figura 3.87) se inspiró en una estrategia sintética multicomponente altamente convergente, basada en la realización de dos reacciones de Ugi consecutivas. Como paso inicial, fue necesario obtener los derivados del Olaparib con el espaciador incorporado y funcionalizados como isonitrilos. La síntesis propuesta para la obtención de estos derivados aprovecha la disponibilidad comercial del precursor ácido del Olaparib y se muestra en el Esquema 3.9. En la primera reacción Ugi-Split se emplearon el ácido (**F1**), la piperazina (**B3**), el formaldehído (**C1**) y tres bis-isonitrilos de diferente longitud (**E7–E9**). Esta transformación permitió ensamblar en un solo paso y de manera eficiente los derivados del Olaparib con el espaciador y funcionalizarlos como isonitrilos (**F2–F4**).



Esquema 3.9. Reacción empleada para la obtención de los derivados de Olaparib funcionalizados F2-4. III) Método B: MeOH, 60 ºC, 24 h.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una vez obtenidos los derivados del Olaparib funcionalizados, el siguiente paso consistió en su ensamblaje con el farmacóforo del receptor A_{2A} mediante la segunda reacción de Ugi, lo que permitió la obtención de los compuestos finales **7a–f**. Para ello, se emplearon los precursores mostrados en la Figura 3.88. Todos los precursores utilizados son de origen comercial, con excepción del ácido carboxílico **A18** (cuya síntesis se ha detallado previamente en el Capítulo I), así como de los derivados funcionalizados del Olaparib **F2–F4**.

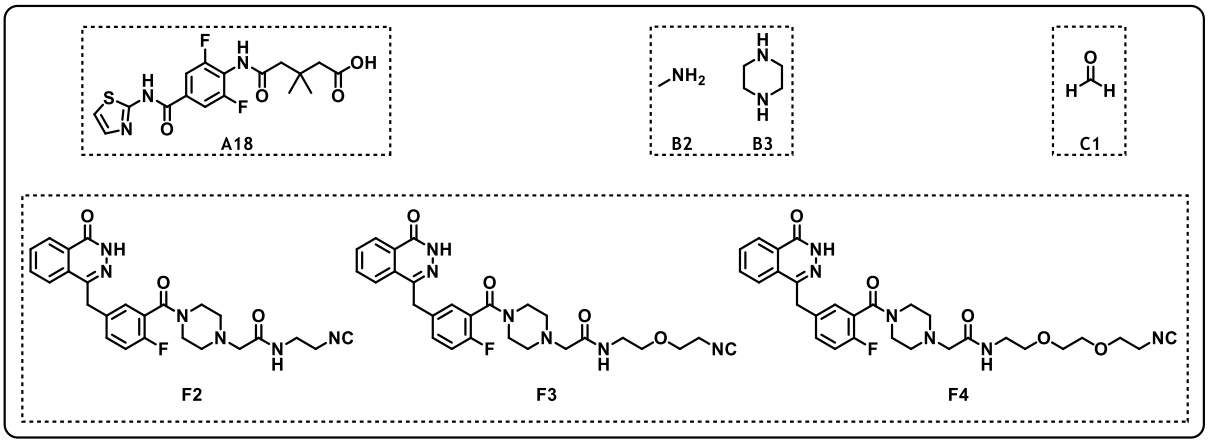
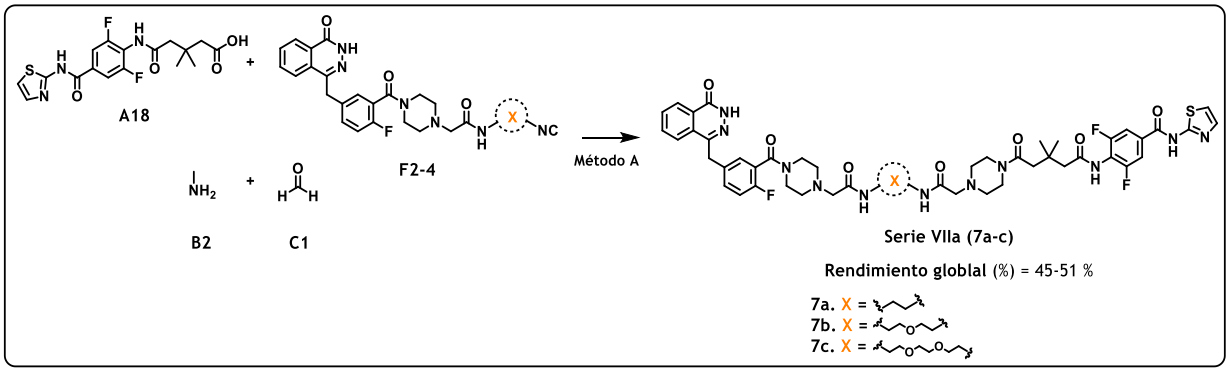


Figura 3.88. Precursores sintéticos utilizados en la serie VII del Capítulo III. A: ácido carboxílico, B: aminas, C: aldehído, y F: derivados del Olaparib funcionalizados como isonitrilos.

La síntesis de los 3 compuestos de la subserie VIIa **7a-c** se realizó siguiendo las condiciones descritas en el esquema que se muestra a continuación.

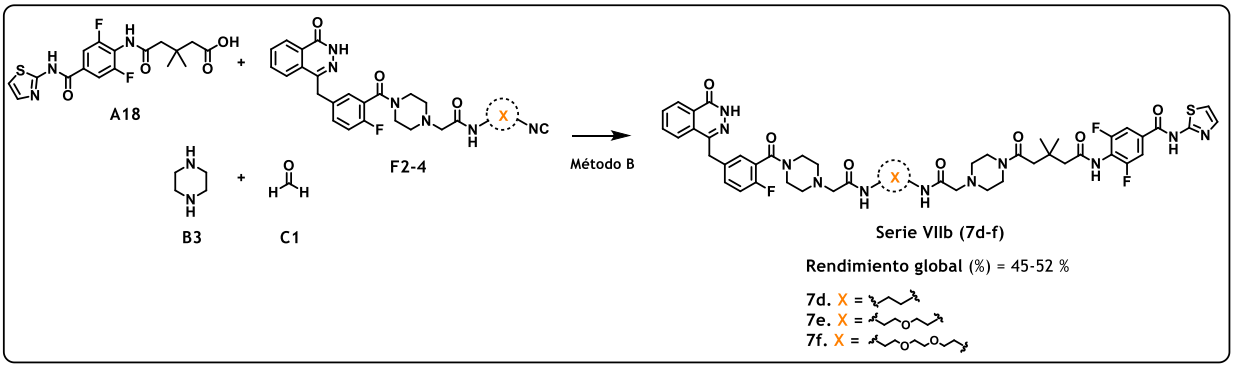


Esquema 3.10. Ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos **7a-c** pertenecientes a la subserie VIIa del Capítulo III basada en la reacción de Ugi-4CR. Método A: MeOH, T.A., 48 h.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El ácido carboxílico (**A18**), en combinación con metilamina (**B2**), formaldehído (**C1**), y con el correspondiente derivado del Olaparib funcionalizado como isonitrilo (**F2-4**), se emplearon como precursores para obtener los compuestos con actividad dual A_{2A}/PARP1 diseñados en la serie VIIa. Los derivados deseados (**7a-c**) se obtuvieron según se muestra en el Esquema 3.10. Los materiales de partida se disolvieron en MeOH y se sometieron a agitación orbital a temperatura ambiente durante 48 horas (Método A). Tras la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida, obteniéndose un residuo oleoso que posteriormente se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando una mezcla de DCM:MeOH en gradiente como eluyente. Todas las reacciones fueron monitorizadas mediante TLC. La reacción de Ugi-4CR permitió obtener los productos deseados con rendimientos entre el 45-51 %. La pureza de todos los compuestos sintetizados se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), obteniéndose valores superiores al 95 %.

La síntesis de los 3 derivados de la subserie VIIb **7d-f** se realizó siguiendo las condiciones descritas en el esquema que se muestra a continuación.



Esquema 3.11 Ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos **7d-f** pertenecientes a la subserie VIIb del Capítulo III basada en la reacción de Ugi-Split. Método B: MeOH, 60 ºC, 24 h.

El ácido carboxílico (**A18**), en combinación con piperazina (**B3**), formaldehído (**C1**), y con el correspondiente derivado del Olaparib funcionalizado como isonitrilo (**F2-4**), se emplearon como precursores para la obtención de los compuestos con actividad dual A_{2A}/PARP1 diseñados en la serie VIIb. Los derivados deseados (**7d-f**) se obtuvieron según se muestra en el Esquema 3.11. Los materiales de partida se disolvieron en MeOH y se sometieron a agitación orbital a 60 ºC durante 24 horas (Método B). Tras la finalización de la reacción, el

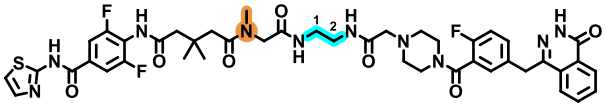
disolvente se evaporó a presión reducida, obteniéndose un residuo oleoso que posteriormente se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando una mezcla de DCM:MeOH en gradiente como eluyente. Todas las reacciones fueron monitorizadas mediante TLC. La reacción de Ugi-Split permitió obtener los productos deseados con rendimientos comprendidos entre el 45 y el 52 %. La pureza de todos los compuestos sintetizados se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), obteniéndose valores superiores al 95 %.

En el apartado 5 (Experimental Section) se proporciona una descripción detallada de los métodos sintéticos empleados, así como los datos estructurales, espectroscópicos y analíticos completos de todos los compuestos.

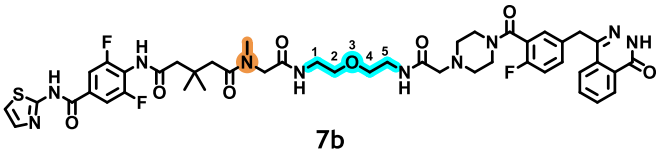
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La colección de los 6 derivados **7a-f** sintetizados en la serie VII se muestran a continuación.

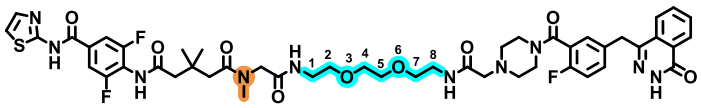
subserie VIIa



7a

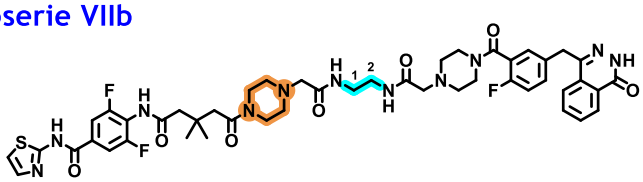


7b

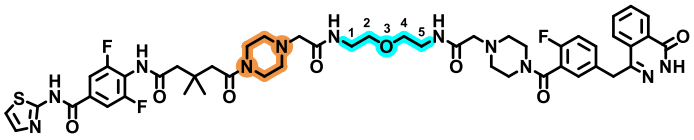


7c

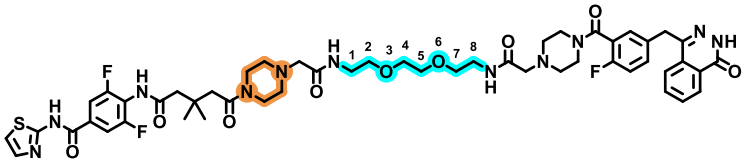
subserie VIIb



7d



7e



7f

Figura 3.89. Estructura de los 6 ligandos duales A_{2A}/PARP1 sintetizados en cada subserie. En color naranja marcada la diferencia estructural entre cada subserie y en color azul la diferencia estructural dentro de cada subserie.

A continuación, a modo de ejemplo, se muestran espectros de RMN representativos de los compuestos sintetizados en la serie VII.

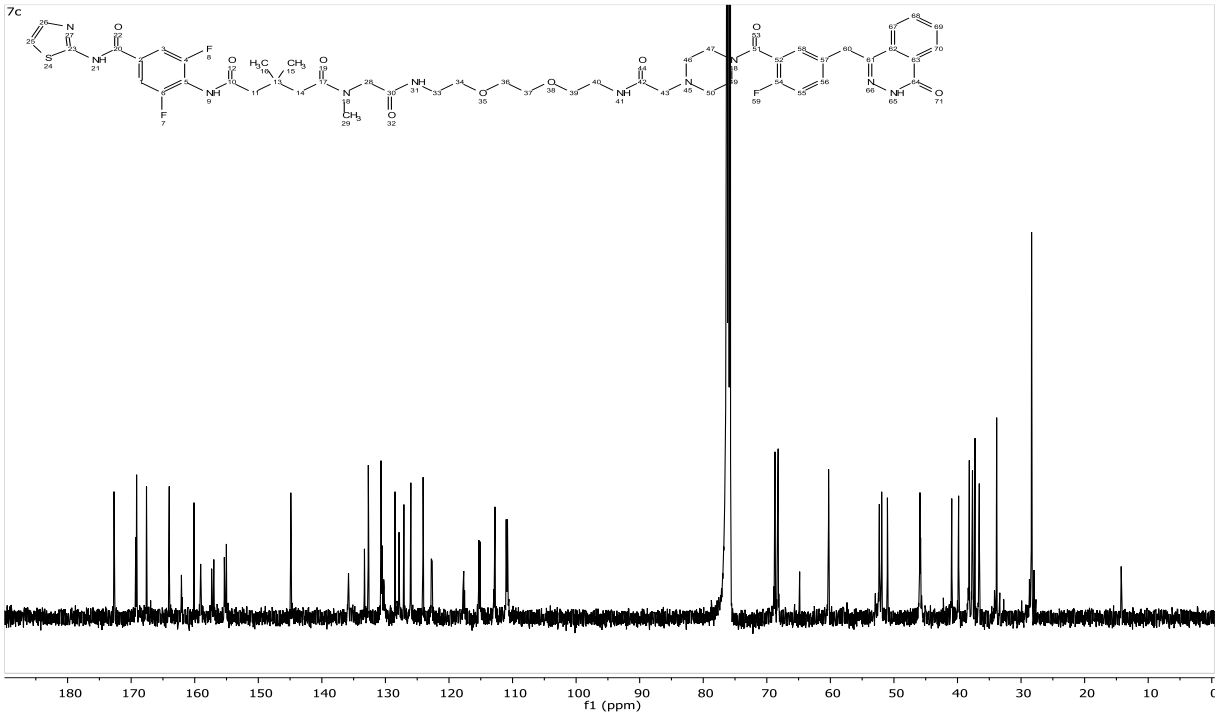


Figura 3.90. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **7c** en $CDCl_3$ (300 MHz).

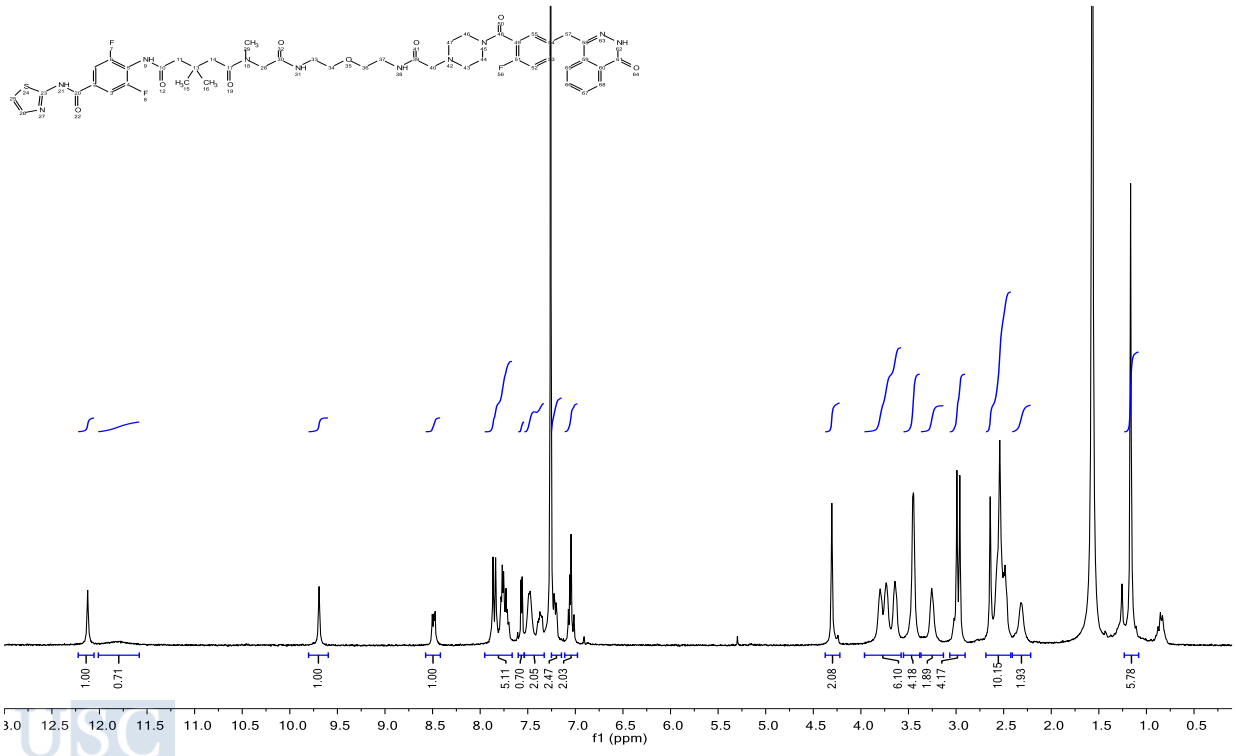


Figura 3.91. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto **7d** en $CDCl_3$ (300 MHz).

3.3.2.3 Evaluación farmacológica

Ensayos de afinidad

El perfil adenosinérgico (afinidad y selectividad) de los 6 nuevos derivados (**7a-f**), de la **serie VIIa-VIIb**, fue evaluado *in vitro* mediante ensayos competitivos con radioligandos en los cuatro subtipos de receptores de adenosina (A_1R, $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ y A_3R). La evaluación farmacológica fue realizada en colaboración con los profesores María I. Loza y José Brea, en el grupo BioFarma (USC). Para estos estudios, los receptores de adenosina humanos fueron expresados en líneas celulares transfectadas, utilizando células de ovario de hámster chino (CHO) para A_1R; células de carcinoma epitelial humano (HeLa) para $A_{2A}R$ y A_3R y células de riñón embrionario humano (HEK-293) para $A_{2B}R$. Los radioligandos empleados en los ensayos de unión fueron: [^{3}H]DPCPX para A_1R y $A_{2B}R$; [^{3}H]NECA para A_3R y [^{3}H]ZM241385 para $A_{2A}R$. Todos los compuestos fueron inicialmente evaluados a 1 μM y los resultados de esos estudios se muestran en la Tabla 3.9 y la Tabla 3.10.

Los datos de unión se presentan como K_i ± SEM (nM, n = 3), obtenidos mediante ajuste por regresión no lineal utilizando el software Prism 10.0 (GraphPad, San Diego, CA). Para aquellos compuestos que no desplazaron completamente el radioligando (< 60 %), debido a su baja afinidad o solubilidad, los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la unión específica a 1 μM (n = 2, promedio).

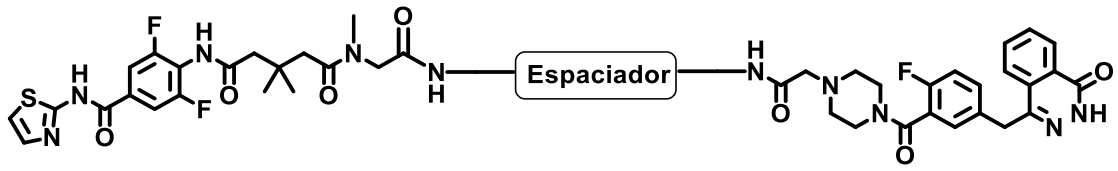
Los ensayos de inhibición enzimática de PARP1 han sido realizados en colaboración con el Profesor José María Zapico Rodríguez de la Universidad San Pablo de Madrid (CEU). Para estos estudios se usó el kit comercial *Abcam PARP1 Activity Assay Kit* (Abcam). Todos los compuestos han sido evaluados a 6 concentraciones y se obtenido una curva de dosis-respuesta, los datos se expresan como IC_{50} ± SEM (nM, n = 3), obtenidos mediante ajuste por regresión no lineal utilizando el software Prism 10.0 (GraphPad, San Diego, CA).

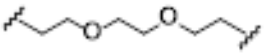
Como control interno, en estos estudios empleamos antagonistas $A_{2A}R$ de referencia (**ZM241385**, **LuAA-41063** y **Etrumadenant**) y un inhibidor de la PARP1 (**Olaparib**) que fueron evaluados simultáneamente y bajo los mismos protocolos experimentales que nuestros ligandos. Los datos obtenidos para esos fármacos de referencia se presentan en las correspondientes tablas.

En el apartado 5 (Experimental section) se proporciona una descripción detallada de los protocolos experimentales y estadísticos empleados para la determinación de la afinidad de los compuestos en cada subtipo de receptor de adenosina.

USC DE COMPOSTELA

Tabla 3.9. Estructura general y datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina y la enzima PARP1 de los compuestos pertenecientes a la serie VIIa **7a-c**.

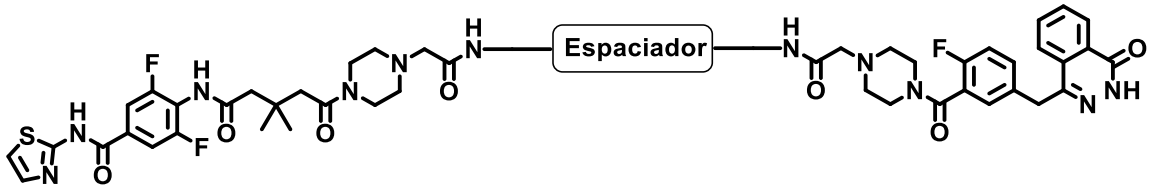


Compuesto	Espaciador	Ki (nM) o % a 1 µM				IC_{50} (nM)
		hA_1R[a)]	*h*$A_{2A}R$[b)]	*h*$A_{2B}R$[c)]	*h*A_3R[d)]	PARP1[e)]
7a		6%	71.7 ± 3.6	12%	39%	83.1 ± 6.0
7b		17%	58.2 ± 2.0	1%	25%	101 ± 8
7c		11%	93.4 ± 3.3	15%	33%	122 ± 8
LuAA-41063*	-	409	4.9	-	-	-
LuAA-41063**	-	344 ± 12	5.2 ± 0.6	321 ± 8	4%	-
Etrumadenant	-	65.0 ± 4	1.50 ± 0.3	2.00 ± 0.9	489 ± 10	-
ZM241385	-	683 ± 4.0	1.9 ± 0.1	65.7 ± 1.0	863 ± 4.0	-
Olaparib	-	-	-	-	-	9.2 ± 1.1

a) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células CHO humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). b) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol en células HeLa humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). c) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células HEK-293 humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). d) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]NECA en células HeLa humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). *) Datos de afinidad extraídos de la bibliografía 237. **) Datos de afinidad experimentales obtenidos en nuestros ensayos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.10. Estructura general y datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina y la enzima PARP1 de los compuestos pertenecientes a la serie VIIb **7d-f**.



Compuesto	Espaciador	Ki (nM) o % a 1 µM				IC_{50} (nM)
		hA_1R[a)]	*h*$A_{2A}R$[b)]	*h*$A_{2B}R$[c)]	*h*A_3R[d)]	PARP1[e)]
7d		21%	29.3 ± 1.5	1%	25%	51.7 ± 2.7
7e		7%	28.7 ± 1.6	39%	31%	63.2 ± 3.1
7f		5%	24.4 ± 0.9	19%	11%	69.0 ± 3.4
LuAA-41063*	-	409	4.9	-	-	-
LuAA-41063**	-	344 ± 12	5.2 ± 0.6	321 ± 8	4%	-
Etrumadenant	-	65.0 ± 4	1.50 ± 0.3	2.00 ± 0.9	489 ± 10	-
ZM241385	-	683 ± 4.0	1.9 ± 0.1	65.7 ± 1.0	863 ± 4.0	-
Olaparib	-	-	-	-	-	9.2 ± 1.1

a) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células CHO humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). b) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol en células HeLa humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). c) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]DPCPX en células HEK-293 humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). d) Desplazamiento de la unión específica de [^{3}H]NECA en células HeLa humanas expresado como K_i (n = 3) o porcentaje de desplazamiento de la unión específica a una concentración de 1 µM (n = 2). *) Datos de afinidad extraídos de la bibliografía 237. **) Datos de afinidad experimentales obtenidos en nuestros ensayos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.2.4 Relación estructura-actividad

En esta sección se analiza la REA de los seis ligandos duales A_{2A}/PARP1 pertenecientes a la serie VII. Dado que se trata de compuestos con actividad dual, se realizará primero un análisis individual de la afinidad y/o actividad frente a cada una de las dos dianas farmacológicas. Posteriormente, se llevará a cabo una valoración conjunta que permita identificar los compuestos con un perfil más equilibrado y eficaz en ambas dianas. El análisis se hará en base a los datos recogidos en la Tabla 3.9 y en la Tabla 3.10.

En relación con la afinidad por el receptor $A_{2A}R$, los compuestos de la subserie VIIb son los que presentan una mayor afinidad (**7d**, **7e** y **7f**) K_i $A_{2A}R$ = 29.3, 28.7 y 24.4 nM, respectivamente (Tabla 3.10), concretamente destacan por ser entre 2 y 3 veces más potentes que los compuestos de la subserie VIIa (**7a, 7b y 7c**) K_i $A_{2A}R$ = 71.7, 58.2 y 93.4 nM, respectivamente (Tabla 3.9). Estos resultados son coherentes con los observados en el apartado 3.2.5 Estudios preliminares de los modelos de unión (Capítulo II), donde se evidenció que los ligandos que incorporan una piperazina en su estructura muestran una mejor unión al $A_{2A}R$, estableciendo interacciones fuertes y específicas gracias a ese elemento estructural. Esta característica, junto con la mejor solubilidad podrían explicar los mejores datos de afinidad observados en la subserie VIIb.

Al comparar la influencia del tamaño del espaciador en la afinidad por el $A_{2A}R$, se observan dos tendencias diferenciadas según la subserie analizada. En la subserie VIIa, el espaciador parece ejercer una influencia moderada sobre el perfil de afinidad. El compuesto con mejor afinidad es el que contiene el espaciador intermedio (PEG-1) (**7b**, K_i $A2_AR$ = 58.2 nM), seguido por el que presenta el espaciador más corto (dos metilenos) (**7a**, K_i $A_{2A}R$ = 71.7 nM), mientras que el compuesto con el espaciador más largo (PEG-2) (**7c**, K_i $A_{2A}R$ = 93.4 nM) muestra la menor afinidad (Tabla 3.9). En contraste, en la subserie VIIb, la variación en el tamaño del espaciador tiene un impacto menos marcado, y todos los compuestos presentan valores de afinidad similares, con K_i comprendidos entre 24.4 y 29.3 nM (Tabla 3.10).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la Figura 3.92 se muestra el mejor ligando obtenido en la serie VII en relación con la afinidad por el $A_{2A}R$.

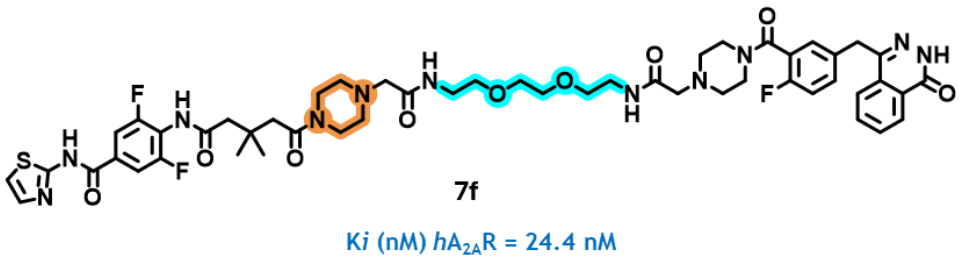


Figura 3.92. Estructura del compuesto con mayor afinidad hacia el $A_{2A}R$.

En cuanto a la inhibición de la proteína PARP1, los compuestos de la subserie VIIb son los que mejores datos de actividad proporcionan (**7d**, **7e** y **7f**) IC_{50} PARP1 = 51.7, 63.2 y 69.0 nM, respectivamente (Tabla 3.10), siendo aproximadamente casi el doble de potentes que sus análogos de la subserie VIIa (**7a, 7b y 7c**) IC_{50} PARP1 = 83.1, 101 y 122 nM, respectivamente (Tabla 3.9). A diferencia de lo observado en el caso del $A_{2A}R$, en la inhibición de PARP1 los cambios de actividad pueden atribuirse exclusivamente al tamaño del espaciador, ya que el fragmento farmacóforo derivado del Olaparib se mantiene constante en ambas subseries. En este caso, se observa una correlación clara entre el incremento del tamaño del espaciador y una pérdida progresiva de actividad. Así, el espaciador más corto (dos grupos metileno) proporciona los mejores resultados (**7a** y **7d**), seguido del PEG-1 (**7b** y **7e**), y finalmente del PEG-2 (**7c** y **7f**), que presenta los valores de IC_{50} más elevados (Figura 3.93).

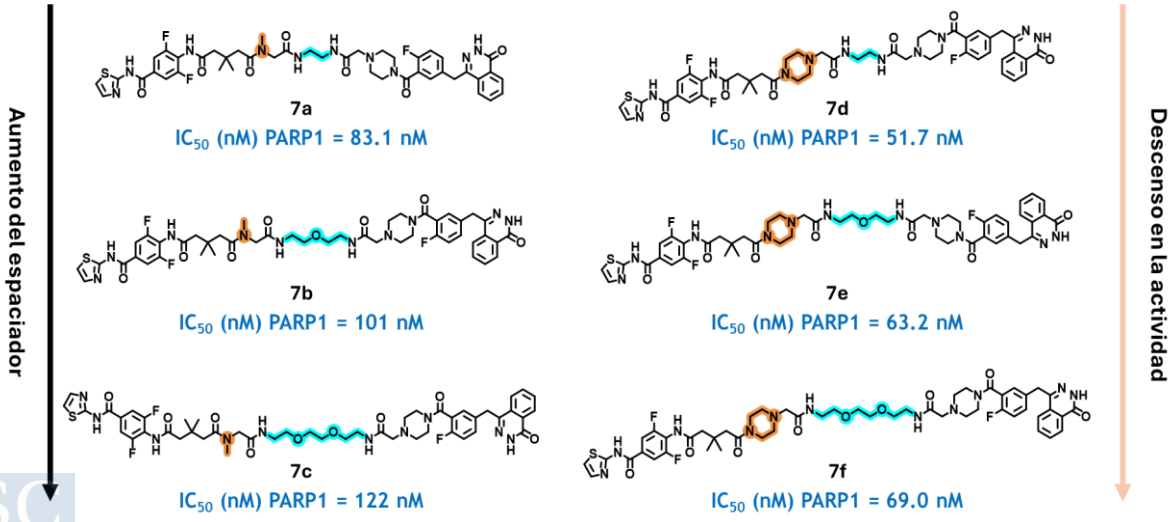


Figura 3.93. Comparación del efecto del espaciador en la inhibición de la enzima PARP1.

En la Figura 3.94 se muestra el mejor ligando obtenido en la serie VII basándonos exclusivamente en su actividad en la enzima PARP1.

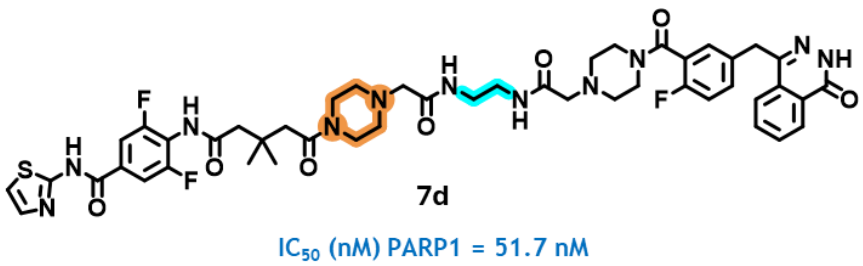


Figura 3.94. Estructura del compuesto con mejor actividad sobre la enzima PARP1.

Una vez analizados los resultados correspondientes a la serie VII, se puede concluir que se han sintetizado diversos ligandos con actividad dual frente A_{2A}/PARP1. En la Figura 3.95 se presentan los dos compuestos más prometedores de esta serie, junto con un análisis comparativo estructural y funcional respecto a las moléculas modelo. Estos hallazgos ponen de manifiesto que la estrategia de diseño basada en la técnica de *linking* y empleando las reacciones U-4CR y Ugi-Split permite obtener compuestos con actividad dual A_{2A}/PARP1. Cabe destacar que estos resultados son especialmente relevantes, ya que, estos compuestos representan los primeros compuestos sintetizados con esta doble actividad farmacológica, lo que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de fármacos multidiana en el contexto del cáncer.

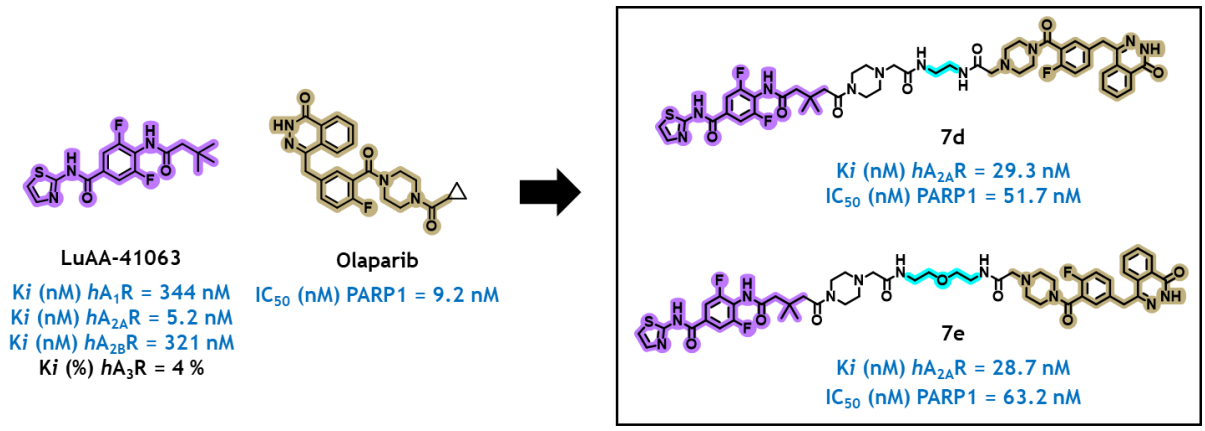


Figura 3.95. Estructura de los dos mejores ligandos duales A_{2A}/PARP1 obtenidos en la serie VII y su comparación con las moléculas modelo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.3 Resumen de los principales hallazgos del Capítulo III

• En la serie VI se han sintetizado un total de 27 nuevos compuestos de los cuales 11 han demostrado afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ y 16 han sido selectivos por el $A_{2A}R$.

• En el estudio de la REA de la serie VI se ha identificado el mejor patrón de sustituyentes para R^1, R^2 y R^3 que proporciona compuestos con afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$.

• El empleo de la estrategia de diseño *linking*, ha permitido obtener en la serie VII 6 compuestos con actividad dual $A_{2A}R$/PARP1.

• Los compuestos de la serie VII constituyen los primeros fármacos con actividad $A_{2A}R$/PARP1 descritos en la literatura.

. • En la Figura 3.96 se muestran los mejores compuestos con actividad dual obtenidos en este capítulo.

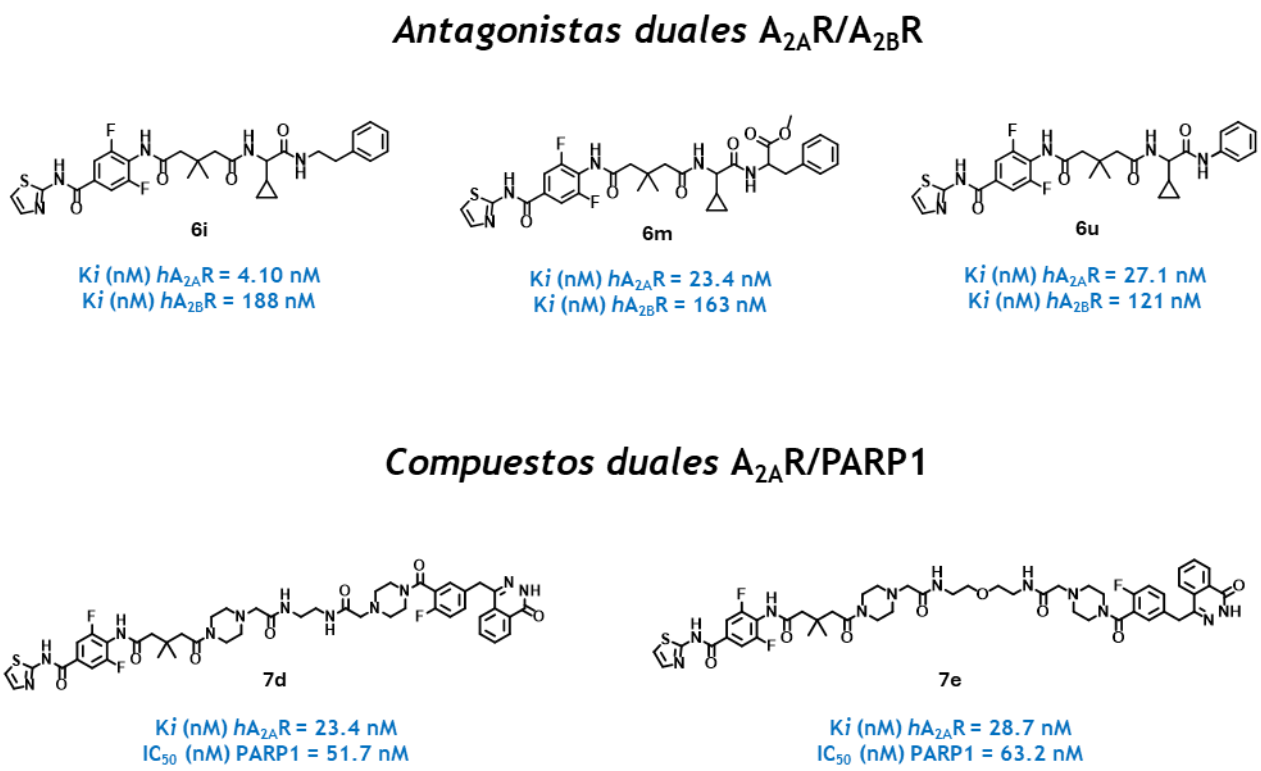


Figura 3.96. Estructura de los mejores compuestos con afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ (arriba) y con actividad dual $A_{2A}R$/PARP1 (abajo).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4 CONCLUSIONS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

- Herein, we describe novel and potent A_{2A}-selective and dual A_{2A}/A_{2B} antagonists as promising candidates for cancer immunotherapy.
- A focused library of **18 compounds** (Series I–III) was synthesized, enabling the identification of the [X = $C(CH_3)_2$] moiety as the most suitable linker for the elongation of the model compound LuAA-41063, as well as for the development of $A_{2A}R$ antagonists.
- The Ugi four component reaction was validated as a versatile, rapid, and efficient synthetic strategy for the generation of novel $A_{2A}R$ antagonists.
- Compounds **3b** and **3d** from (Series III) demonstrated enhanced selectivity toward $A_{2A}R$ without significantly compromising binding affinity, thereby improving upon the pharmacological profile of the model molecule **LuAA-41063**.
- A novel compound, **3a**, exhibiting dual affinity for both $A_{2A}R$ (K_i = 24.08 nM) and $A_{2B}R$ (K_i = 307 nM), was identified. This compound represents a promising lead for the development of dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ antagonists, of particular interest in the context of cancer immunotherapy.
- The comprehensive exploration of the secondary pharmacophore carried out in Chapter II led to the identification of a total of 38 novel $A_{2A}R$ ligands, with **26 compounds** in Series IV and **12 compounds** in Series V.
- A total of 22 ligands from Series IV exhibited selectivity toward the $A_{2A}R$, with K_i values below 60 nM. Among these, nine of these compounds (**4f, 4l**, **4n**, **4p**, **4s**, **4t**, **4u**, **4w** and **4y**) displayed K_i values below 15 nM, showing affinity comparable to that of the model ligand.
- Three compounds from Series IV (**4e**, **4j** and **4ñ**) demonstrated dual affinity for both A_{2A} and A_{2B} receptors. This dual binding profile was associated with substitution at the R^1 position with hydrogen, in combination with R^2 = H, *i*-Pr, or *c*-Pr, and R^3 = Bn, suggesting that this specific substitution pattern promotes balanced affinity toward both receptor subtypes.
- All twelve compounds synthesized in Series V (**5a–l**) demonstrated selectivity for the $A_{2A}R$, with K_i values below 50 nM. Specifically, compounds **5a**, **5k** and **5l** exhibited particularly high affinity, with K_i values below 7 nM for the $A_{2A}R$.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- These findings demonstrate that the Ugi-Split reaction is a versatile, rapid, and efficient synthetic approach for the development of $A_{2A}R$ antagonists, as evidenced by the results obtained in Series V.
- Functional assays confirmed that the synthesized ligands act as antagonists of the $A_{2A}R$ and $A_{2B}R$.
- The modifications introduced in the secondary pharmacophore resulted in improved pharmacological properties of the ligands. Solubility assays demonstrated that compounds **3a**, **3d**, **4ñ**, **4s**, **4y**, **5f**, and **5k** exhibit enhanced solubility compared to the model ligand. In particular, ligands **5f** (75.6 μM) and **5k** (81.3 μM) displayed a 25-fold increase in solubility relative to **LuAA-41063** (3.02 μM).
- Preliminary biological assays demonstrated that compounds **4j** and **5a** exert antiproliferative effects on the HTB-70 melanoma cell line, while showing no cytotoxicity toward healthy MRC-5 fibroblast cells, indicating a favorable safety profile. Furthermore, both compounds exhibited greater antiproliferative activity than the reference compound LuAA-41063.
- Preliminary biological assays demonstrated that compounds **4j**, **4s**, and **4y** exert antiproliferative effects on the T47D breast cancer cell line. Moreover, all three compounds exhibited antiproliferative activity comparable to that of the reference compounds **LuAA-41063** and **AZD-4635**.
- Preliminary biological assays demonstrated that compounds **4s** and **5a** exert immunomodulatory effects on ex vivo isolated PBMCs. These compounds were able to restore immune activity following adenosine-induced immunosuppression.
- Series VI, focused on developing dual-affinity $A_{2A}R/A_{2B}R$ ligands, led to the synthesis of 27 new compounds. Among these, 11 compounds demonstrated dual affinity for receptors, while 16 showed potent and selective affinity toward the $A_{2A}R$.
- Of the 11 compounds with dual affinity, compounds **6e**, **6i**, **6m**, **6p**, and **6u** have demonstrated good affinity for both receptors, with K_i values for $A_{2A}R$ between 4.10 and 27.1 nM, and K_i values for $A_{2B}R$ between 121 and 246 nM. These compounds are of great value for cancer immunotherapy.
- A focused series of six novel compounds was synthesized and characterized by combining the model $A_{2A}R$ pharmacophore with the Olaparib pharmacophore, aiming to develop dual $A_{2A}R$/PARP1 ligands (Series VII).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- All the compounds obtained demonstrated dual $A_{2A}R$/PARP1 activity. Among them, compounds **7e** and **7d** stand out, with K_i values for $A_{2A}R$ of 23.4 and 28.7 nM, respectively, and PARP1 IC_{50} values of 57.1 and 63.2 nM, respectively.
- The compounds from Series VII are of great significance, being the first dual-active ligands reported in the literature targeting both $A_{2A}R$ and PARP1.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5 EXPERIMENTAL SECTION

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5.1 GENERAL CONSIDERATIONS

5.1.1 Synthesis and purification

All starting materials, reagents, and solvents were purchased and used without further purification. The UGI-4CR and UGI-SPLIT reactions were performed in a coated Kimble vials on a PLS (6 x 4) Organic Synthesizer with orbital stirring. The reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on 2.5 mm Merck silica gel GF 254 strips, and the purified compounds each showed a single spot, unless stated otherwise, UV light or a solution of K_2MnO_4 were used to detect compounds. After extraction from aqueous phases, the organic solvents were dried over anhydrous magnesium sulfate. The purity and identity of all tested compounds were stablished by a combination of HPLC, mass spectrometry and NMR spectroscopy. Purification of isolated compounds was carried out by column chromatography (Kieselgel 0.040-0.063 mm, E. Merck) or preparative chromatography (Uniplate^{TM} Techware 20x20 cm Silica G 1000mm Thick 15 μm). The solvent mixtures used in the purification are shown in the description of each procedure using the following abbreviatures for the solvents: Hex, Hexane; EtOAc, ethyl acetate; MeOH, methanol and DCM, dichloromethane.

5.1.2 Structural characterization

Melting points were determined on a Stuart Scientific melting point apparatus SMP3 and are uncorrected. Samples were dissolved in deuterated solvent ($CDCl_3$, DMSO-d_6 or CD_3OD) and NMR spectra were recorded on Bruker AM300 and/or XM500 spectrometers. Chemical shifts are given as δ values against tetramethylsilane as internal standard, and *J* values are given in Hertz (Hz). The signal multiplicity shown with the abbreviatures, s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; quint, pentuplet; hept, heptuplet; dd, doublet of doublets dt, doublet of triplets; td, triplet of doublets; tt, triplet of triplets; dq, doublet of quartets; br, broad; and m, multiplet, followed by number of protons deduced by integration. The coupling constants *J* are measured in Hz.

High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained on an AutoSpec Micromass spectrometer. Analytical HPLC and Low-resolution mass spectra (LRMS) were performed on a Waters ACQUITY UPLC H-Class system combined with a Photodiode Array detector (PDA) and ACQUITY QDa Mass detector, using a XBrigde® C18 3.5 μm 4.6 x 50 mm column with gradient elution using the mobile phases (A) water containing 0.1% Formic acid and (B)

USC DE COMPOSTELA

Acetonitrile (MeCN) containing 0.1% Formic acid, and a flow rate of 1 mL/min. The purity of all tested compounds was determined to be >95%.

The structural and spectroscopic data obtained for all the compounds described can be found in "*Spectroscopic and analytical data*" in the section corresponding to each chapter.

Given the number of compounds obtained within the scope of this Doctoral Thesis, and in accordance with the general criteria recognized by the scientific community for the characterization of large chemical libraries, the following general guidelines have been adhered to in the structural characterization of the compounds:

All compounds have been routinely characterized including:

a) ^{1}H-NMR.

b) Mass Spectroscopy (LRMS).

c) Melting point (Mp).

The representative compounds of each series have been chosen for exhaustive structural determination of (additionally to what has been previously described):

a) ^{13}C-NMR.

b) HRMS.

5.1.3 Pharmacological evaluation

5.1.3.1 Radioligand binding competition assays

Radioligand binding competition assays were performed *in vitro* by the group of Professor María I. Loza (University of Santiago de Compostela, Spain) using human ARs expressed in transfected Chinese hamster ovary (CHO, A_1AR), Human embryonic kidney (HEK-293, A_{2B}AR) and Human Cervix (HeLa, A_{2A}AR and A_3AR) cells.

A_1AR competition binding experiments were carried out in a multiscreen GF/C 96-well plate (Millipore, Madrid, Spain) pretreated with binding buffer (Hepes 20 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, adenosine deaminase 2 U/mL, pH:7,4). Each well was incubated 5 with µg of membrans from Euroscreen CHO-A_1 cell line (protein concentration = 5864 µg/mL), 1 nM [^{3}H]-DPCPX (140 Ci/mmol, 1 mCi/mL, Perkin Elmer NET974001MC), compounds studied and standard. Non-specific binding was determined in the presence of R-PIA 10µM (Sigma P4532). The reaction mixture (Vt: 200 µL/well) was incubated at 25 °C for 60 min, it was filtered and washed four times with 250 µL wash buffer (Hepes 20 mM, NaCl 100 mM,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$MgCl_2$ 10 mM pH:7,4). Radioactivity measuring was performed in a microplate beta scintillation counter (Microbeta Trilux, PerkinElmer, Madrid, Spain).

A_{2A}AR receptor competition binding experiments were carried out in a multiscreen GF/C 96-well plate (Millipore, Madrid, Spain) pretreated with binding buffer (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 10 mM, adenosine deaminase 2 U/mL, pH:7,4). In each well was incubated with 5µg of membranes from Euroscreen Hela-A_{2A} cell line (protein concentration = 2837.7 µg/mL), 1 nM [^{3}H]-ZM241385 (50 Ci/mmol, 1 mCi/mL, ARC-ITISA 0884), compounds studied and standard. Non-specific binding was determined in the presence of NECA 50 µM (Sigma E2387). The reaction mixture (Vt: 200 µL/well) was incubated at 25 °C for 30 min. It was then filtered and washed four times with 250 µL wash buffer (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH:7,4). Radioactivity measuring was performed in a microplate beta scintillation counter (Microbeta Trilux, PerkinElmer, Madrid, Spain).

A_{2B}AR competition binding experiments were carried out in a multiscreen GF/C 96-well plate (Millipore, Madrid, Spain) pretreated with binding buffer (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Bacitracin 100µg/µL, adenosine deaminase 2 U/mL, pH:6,5). In each well was incubated 25 µg of membranes from Euroscreen HEK-A_{2B} cell line (protein concentration = 5254.8 µg/mL), 25 nM [^{3}H]-DPCPX (140 Ci/mmol, 1 mCi/mL, Perkin Elmer NET974001MC), compounds studied and standard. Non-specific binding was determined in the presence of NECA 1000 µM (Sigma E2397). The reaction mixture (Vt: 250 µL/well) was incubated at 25 °C for 30 min, after that it was filtered and washed four times with 200 µL buffer (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, pH:6,5). Radioactivity measuring was performed in a microplate beta scintillation counter (Microbeta Trilux, PerkinElmer, Madrid, Spain).

A_3AR competition binding experiments were carried out in a multiscreen GF/B 96-well plate (Millipore, Madrid, Spain) pretreated with binding buffer (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, adenosine deaminase 2 U/mL, pH:7,4). In each well was incubated 30 µg of membranes from Euroscreen Hela-A_3 cell line and (protein concentration = 5121 µg/mL), 10 nM [^{3}H]-NECA (29.6 Ci/mmol, 1 mCi/mL, Perkin Elmer NET811250UC), compounds studied and standard. Non-specific binding was determined in the presence of R-PIA 100 µM (Sigma P4532). The reaction mixture (Vt: 200 µL/well) was incubated at 25 °C for 180 min It then was filtered and washed six times with 250 µL wash buffer (Tris-HCl 50 mM pH:7,4).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Radioactivity measuring was performed in a microplate beta scintillation counter (Microbeta Trilux, PerkinElmer, Madrid, Spain).

Data were fitted to 4-parameter logistic equation by employing GraphPad Prism software (V10.0) and K_i data was calculated with the equation:

$$K_i = IC_{50} / [1 + (F/K_D)]$$

where IC_{50} was the concentration of the ligand that displaced the specific binding of the radioligand in a 50%; K_D is the dissociation constant of the radioligand, and F is the concentration of the radioligand employed in the assay.

5.1.3.2 Determination of PARP1 activity

Biological assays were performed *in vitro* by the group of the Professor Beatriz de Pascual-Teresa (University of CEU San Pablo, Spain). The ability of a test compound to inhibit PARP1 enzyme activity was assessed using Abcam PARP1 Activity Assay Kit (Abcam) following the manufacturer's instruction. IC_{50} values were calculated using GraphPad Prism 10 software (San Diego, CA, USA).

5.1.3.3 Functional experiments

cAMP assays were performed at human $A_{2A}R$ using a cAMP enzyme immunoassay kit (Amersham Biosciences). HEK-293 cells were seeded (10000cells/well) in 96-well culture plates and incubated at 37 ºC in an atmosphere with 5% CO_2 in Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 (EMEM F-12), containing 10% fetal calf serum (FCS) and 1% L-glutamine. Cells were washed 3 × with 200 µL assay medium (EMEM-F12 and 25 mM HEPES pH = 7.4) and preincubated with assay medium containing 30 µM rolipram and test compounds at 37 ºC for 15 min. NECA (10µM) was incubated for 15 min at 37 ºC (total incubation time 30 min). Reaction was stopped with lysis buffer supplied in the kit, and the enzyme immunoassay was carried out for detection of intracellular cAMP at 450 nm in an Ultra 155 Evolution detector (Tecan). IC_{50} values were obtained by fitting the data with nonlinear regression using Prism 10.0 software (GraphPad, San Diego, CA). For those compounds that showed either little affinity or poor solubility, a percentage inhibition of specific binding was reported. Results are the mean of 3 experiments (n = 3), each performed in duplicate.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1.4 Solubility determinations

A 10 mM stock solution of the compound was serially diluted in 100% DMSO and 2.5 µL of this solution was added to a 384-well UV-transparent plate (Greiner) containing 47.5 µL of PBS (pH=7). The plate was incubated at 37 ºC for 4 h and the light scattering was measured in a Nephelostar plus reader (BMG LABTECH). The data was fitted to a segmented linear regression for measuring the compound solubility.

5.1.5 Computational studies: docking and molecular dynamics simulations

Docking and molecular dynamics simulations were performed by Dr. Rubén Prieto Díaz (University of Santiago de Compostela, Spain). The studies were performed using the crystallographic structure of the $A_{2A}R$ (PDB: 4EIY) as a template. The model was processed using the Protein Preparation Wizard pipeline in Maestro (Schrödinger ver. 2024-2), where the protonation states of key residues were optimized at pH 7 ± 2 using Epik, followed by energy minimization with the OPLS4 force field. The molecules **3d** and **5c** from the series synthesized in this thesis were selected to conduct a comparative study of the binding modes in the $A_{2A}R$, using the ligand LuAA-41063 and Xe as a model. These molecules were prepared with LigPrep, generating their possible tautomers, and the lowest energy conformation was selected for docking. The docking box was defined based on the centre of mass of the active site, using the default scaling parameters for the Van der Waals radius. Docking was performed with Glide XP, obtaining protein-ligand complexes that were used to analyse the binding mode and as a starting point for molecular dynamics simulations. The complexes were stabilized into the membrane using PyMemDyn, and to evaluate the structural stability of the ligands within the binding site of the $A_{2A}R$, triplicate 25 ns molecular dynamics simulations were performed using GROMACS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1.6 Biological evaluation

5.1.6.1 Antiproliferative assays on HTB-70 tumour cells

Biological assays were performed *in vitro* by the group of Professor Concepción Alonso (University of the Basque Country, Spain). All cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cell culture was carried out according to the supplier's recommendations for each cell line, using the corresponding culture media, which were supplemented with 10% v/v Fetal Bovine Serum (FBS), previously inactivated for 1 hour at 60 °C, and 1 mL of the antimicrobial agent Normocin™ (InvivoGen). The culture media used are listed below:

• **HTB-70**: Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Corning)

• **MRC-5**: Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Corning)

The cells used are adherent, meaning they grow in a monolayer by attaching to a solid surface, such as tissue culture flasks made of plastic material (Corning©). These cells firmly adhere to the bottom of the container, and their growth is monitored and regulated over several days to ensure optimal conditions for proliferation and viability. The experimental phases followed in this study were as follows: first, the thawing of cells stored in a dewar at -196 °C in a solution of 5% DMSO in culture medium. Next, the cells were grown and subsequently subcultured. Finally, the planned experiments were conducted. Cells were thawed and seeded into 25, 75, or 175 cm^2 culture flasks (Corning), and incubated under standard mammalian cell culture conditions (37 °C, 5 % CO_2, and 95% relative humidity). During incubation, cells adhered to the flask surface and proliferated until the available space was fully occupied. The culture medium was replaced every 2-3 days to maintain optimal growth conditions. Subculturing was performed when cells reached 70-75% confluency. Adherent cells were detached using trypsinization with a 0.25% trypsin-EDTA solution (GIBCO). After neutralizing the trypsin with culture medium, the cells were collected and reseeded in new flasks. Once an adequate number of cells was obtained, *in vitro* assays were performed. The *in vitro* cytotoxic activity of the synthesized compounds was evaluated against selected cell lines, including one cancerous and one non-cancerous line, to assess selectivity. The colorimetric assay using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was employed, a widely used method to measure cell viability. The kit's main compound, WST-8, is reduced by dehydrogenases in viable cells, producing the water-soluble orange dye WST-8 Formazan. The amount of formazan produced is proportional to the number of viable cells, and absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader

(Thermo Scientific Multiskan FC). This method enabled the quantification of cell viability and, consequently, the cytotoxic activity of the compounds. For the experiments, cells were seeded in 96-well plates at a density of 2500-3000 cells per well in 100 µL of culture medium and incubated for 24 hours at 37 °C in controlled conditions (5% CO_2 and 95% relative humidity). The test compounds were then added, with stock solutions in DMSO prepared to achieve final concentrations of 50 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, and 1 µM. Negative controls (cells with DMSO only) were also included.

The plates were incubated for 48 hours. Afterward, 10 µL of CCK-8 reagent was added, and the plates were incubated for 2 hours. Absorbance was measured at 450 nm, and the data were processed using the negative control as a reference for 100% cell viability. IC_{50} values, representing the concentration inhibiting cell growth by 50%, were calculated. Experiments were conducted in quadruplicate, and results were expressed as mean ± standard deviation. Cells were counted using a Neubauer chamber and Trypan Blue to exclude dead cells. In each plate, two compounds were tested at seven different concentrations, with quadruplicate wells per concentration.

5.1.6.2 Antiproliferative assays on T47D tumour cells

Biological assays were performed *in vitro* by the group of Professor Manuel Freire-Garabal Nuñez and Prof. M. Jesús Nuñez Nuñez(University of the Santiago de Compostela, Spain). Cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cell culture was carried out according to the supplier's recommendations, using the corresponding culture media, which were supplemented with 10% v/v Fetal Bovine Serum (FBS), previously inactivated for 1 hour at 60 °C, and 1 mL of the antimicrobial agent Pen/Strep (100x) (Lonza). The culture media used was Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Corning©).

The cells used are adherent, meaning they grow in a monolayer by attaching to a solid surface, such as tissue culture flasks made of plastic material (Corning©). These cells firmly adhere to the bottom of the container, and their growth is monitored and regulated over several days to ensure optimal conditions for proliferation and viability. The experimental phases followed in this study were as follows: first, the thawing of cells stored in a dewar at -196 °C in a solution of 5% DMSO in culture medium. Next, the cells were grown and subsequently subcultured. Finally, the planned experiments were conducted. Cells were thawed and seeded into 25, 75, or 175 cm² culture flasks (Corning©), and incubated under standard mammalian

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

cell culture conditions (37 °C, 5% CO_2, and 95% relative humidity). During incubation, cells adhered to the flask surface and proliferated until the available space was fully occupied. The culture medium was replaced every 2-3 days to maintain optimal growth conditions. Subculturing was performed when cells reached 70-75% confluency. Adherent cells were detached using trypsinization with a 0.25% trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich). After neutralizing the trypsin with culture medium, the cells were collected and reseeded in new flasks. Once an adequate number of cells was obtained, *in vitro* assays were performed. The *in vitro* cytotoxic activity of the synthesized compounds was evaluated against T47D cell line.

The colorimetric assay using the MTT Cell Proliferation Assay Kit (Biovision) was employed, a widely used method to measure cell viability. The kit's main compound, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, is reduced by dehydrogenases in viable cells, producing the insoluble purple formazan crystals. The amount of formazan produced is proportional to the number of viable cells, and absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Thermo Scientific Multiskan FC). This method enabled the quantification of cell viability and, consequently, the cytotoxic activity of the compounds. For the experiments, cells were seeded in 96-well plates at a density of 2500-3000 cells per well in 100 µL of culture medium and incubated for 24 hours at 37 °C in controlled conditions (5% CO_2 and 95% relative humidity). The test compounds were then added, with stock solutions in DMSO prepared to achieve final concentrations of 5 µM and 10 µM. Negative controls (cells with DMSO only) were also included.

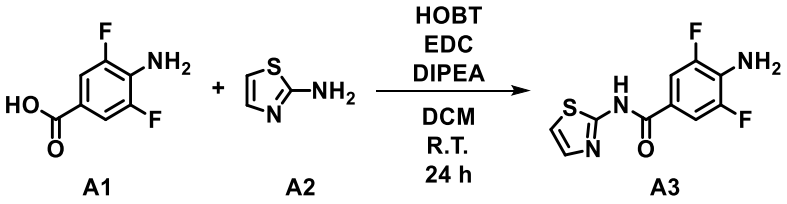
The plates were incubated for 24 and 48 hours. Afterward, 10 µL of MTT reagent was added, and the plates were incubated for 4 hours in same condition as the cells. During this period, viable cells will reduce MTT to insoluble purple formazan crystals. After incubation, the supernatant was carefully removed without disturbing the crystals. DMSO (100 µL) was added to each well to dissolve the formazan. Then it was incubated for 10–15 minutes at room temperature, shaking gently. Absorbance was measured at 570 nm, and the data were processed using the negative control as a reference for 100% cell viability. Cell viability was calculated using the following formula: [Absorbance of treated cells / Absorbance of control cells] × 100%. Experiments were conducted in triplicate, and results were expressed as mean ± standard deviation. Cells were counted using a Neubauer chamber and Trypan Blue to exclude dead cells.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2 CHAPTER I

5.2.1 Synthesis of carboxylic acids used as precursors A16-A18

Step I. General procedure for the synthesis of 4-amino-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (**A3**).

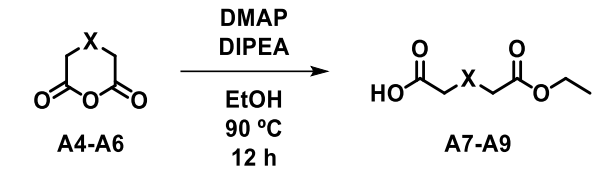


To a solution of 4-amino-3,5-difluorobenzoic acid (**A1**, 1 equiv.) in DCM (20 mL), HOBT (1.5 equiv.), EDC (1.5 equiv.), and DIPEA (2 equiv.) were added. After 30 minutes, 2-aminothiazole (**A2**, 1.5 equiv.) was added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours. Upon completion of the reaction, as indicated by TLC (DCM:AcOEt, 93:7), water was added, and the mixture was extracted with DCM (3 × 20 mL). The organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered, and the solvent was removed by evaporation. The obtained oily product was purified by column chromatography on silica gel using DCM:AcOEt to yield the desired pure product (**A3**) as a white solid.

4-Amino-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (A3). Yield: 72 %. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.34 (s, 1H), 7.75 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 6.11 (s, 2H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{10}H_8F_2N_3OS$ $[M+H]^+$ 256.01; found 256.02.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Step II. General procedure for the synthesis of carboxylic acids **A7-A9**.



A4. X = CH_2
A5. X = O
A6. X = $C(CH_3)_2$

A7. X = CH_2
A8. X = O
A9. X = $C(CH_3)_2$

To a solution of the corresponding lactone **A4-A6**, (1 equiv.) in EtOH (30 mL), DIPEA (1 equiv.) and DMAP (0.1 equiv.) were added, and the mixture was stirred at 90 °C for 24 hours. Upon completion of the reaction, as indicated by TLC (DCM:MeOH, 97:3), EtOH was removed. The resulting oily product was purified by column chromatography on silica gel using MeOH:DCM gradient to yield the desired pure products **A7-A9** as colourless oils.

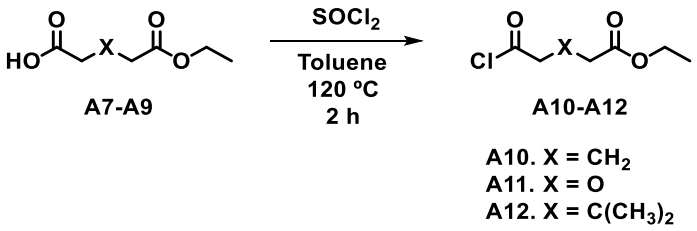
5-Ethoxy-5-oxopentanoic acid (A7). Yield: 87 %. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.87 (s, 1H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.40 (dt, *J* = 14.0, 7.3 Hz, 4H), 1.95 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_7H_{13}O_4$ $[M+H]^+$ 161.12; found 161.13.

2-(2-Ethoxy-2-oxoethoxy)acetic acid (A8). Yield: 83 %. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.50 (s, 1H), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.48 (s, 4H), 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_6H_{11}O_5$ $[M+H]^+$ 163.13; found 163.13.

5-Ethoxy-3,3-dimethyl-5-oxopentanoic acid (A9). Yield: 85 %. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.27 (s, 1H), 4.13 (qt, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.44 (d, *J* = 12.6 Hz, 4H), 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.14 (d, *J* = 1.3 Hz, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_9H_{17}O_4$ $[M+H]^+$ 189.17; found 189.17.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

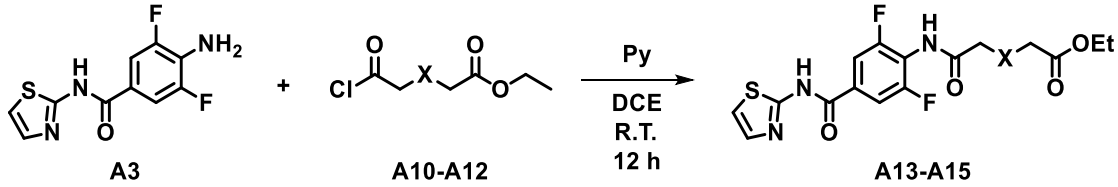
Step III. General procedure for the synthesis of acyl chloride derivatives **A10-A12**.



To a solution of the corresponding carboxylic acid **A7-A9** (1 equiv.) in toluene (20 mL), thionyl chloride (3 equiv.) was added dropwise. The mixture was stirred at 120 ºC for 2 hours. Upon completion of the reaction, the solvent was removed under vacuum. The resulting oily products **A10-A12** were used in the next step without further purification.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Step IV. General procedure for synthesis of ethyl esters derivatives **A13-A15**.



A13. X = CH_2
A14. X = O
A15. X = $C(CH_3)_2$

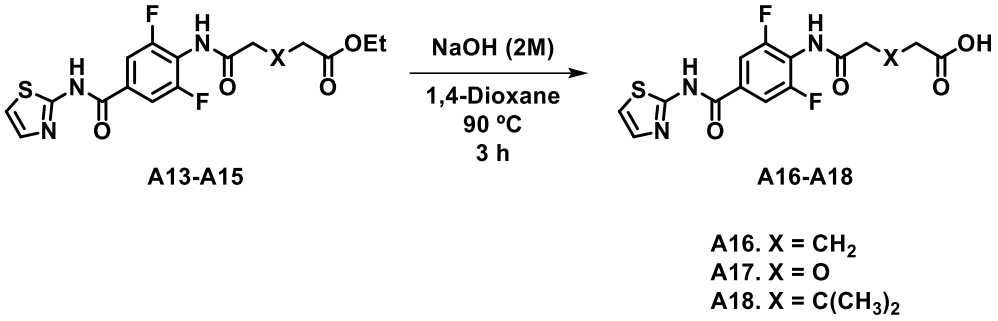
To a solution of 4-amino-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (**A3**, 1 equiv.) and pyridine (3 equiv.) in DCE (20 mL) under an argon atmosphere, the corresponding acyl chloride **A10-A12** (1.5 equiv.) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 24 hours. Upon completion of the reaction, as indicated by TLC (DCM:MeOH, 96:4), the solvent was removed by evaporation. The resulting oily product was purified by column chromatography on silica gel using MeOH:DCM gradient to yield the corresponding pure products **A13-A15** as white solids.

Ethyl 5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-5-oxopentanoate (A13). Yield: 81 %. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.74 (s, 1H), 9.93 (s, 1H), 7.86 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 7.9 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.05 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.37 (dt, *J* = 20.4, 7.7 Hz, 4H), 1.82 (p, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.18 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{17}H_{18}F_2N_3O_4S$ $[M+H]^+$ 398.09; found 398.08.

Ethyl 2-(2-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-2-oxoethoxy)acetate (A14). Yield: 77 %. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.73 (s, 1H), 7.69 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 7.8 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.39 (s, 4H), 4.31 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{16}H_{16}F_2N_3O_5S$ $[M+H]^+$ 400.07; found 400.08.

Ethyl 5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-3,3-dimethyl-5-oxo-pentanoate (A15). Yield: 79 %. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.04 (bs, 1H) 8.84 (s, 1H), 7.65 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 7.8 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.23 (qt, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.53 (dd, *J* = 3.9 Hz 4H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.16 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{19}H_{22}F_2N_3O_4S$ $[M+H]^+$ 426.12; found 426.12.

Step V. General procedure for the synthesis of carboxylic acids used as key precursors. **A16-18**.



To a solution of the corresponding ethyl esters **A13-A15** (1 equiv.) in 15 mL of 1,4-dioxane, NaOH (4 equiv.) was added, and the mixture was stirred at 90 ºC for 3 hours. Upon completion of the reaction, as indicated by TLC (DCM:MeOH, 92:8), the obtained residue was brought to pH 4 with citric acid and extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered, and the solvent was removed by evaporation. The resulting oily product was purified by column chromatography on silica gel using DCM:MeOH gradient to yield the corresponding pure carboxylic acids **A16-A18** as off-white solids.

5-((2,6-Difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-5-oxopentanoic acid (A16). Yield: 97 %. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.43 (s, 1H), 9.93 (s, 1H), 7.87 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 8.7 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 2.41 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.28 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.80 (p, J = 7.6 Hz, 2H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{15}H_{14}F_2N_3O_4S$ $[M+H]^+$ 370.1; found 370.1.

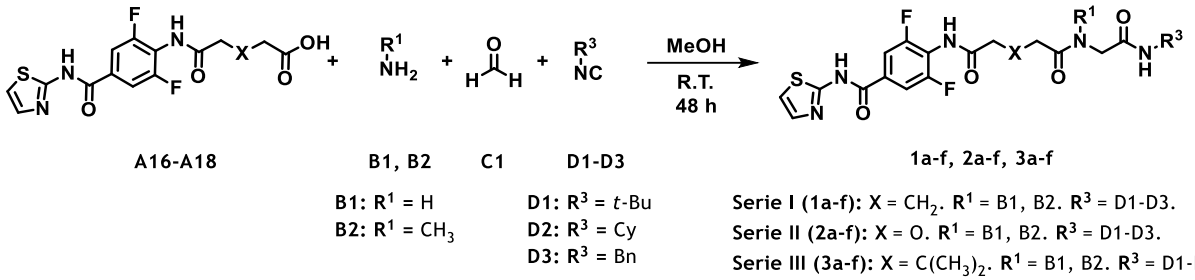
2-(2-((2,6-Difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-2-oxoethoxy)acetic acid (A17). Yield: 93 %. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): δ 12.79 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 7.86 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 8.7 Hz, 2H), 7.55 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 4.21 (d, J = 18.9 Hz, 4H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{14}H_{12}F_2N_3O_5S$ $[M+H]^+$ 372.0; found 372.0.

5-((2,6-Difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-3,3-dimethyl-5-oxopentanoic acid (A18). Yield: 95 %. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.44 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 7.87 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 8.8 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 2.46 (d, J = 12.9 Hz, 4H), 1.11 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{17}H_{18}F_2N_3O_4S$ $[M+H]^+$ 398.1; found 398.1.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.2 Synthesis of final compounds.

METHOD A. UGI-4CR (Series I-III): General procedure for the synthesis of 3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide derivatives **1a-f, 2a-f, 3a-f**.



A mixture of the corresponding carboxylic acid **A16-A18** (1 equiv.), amine **B1-B2** (1.1 equiv.), formaldehyde (**C1**, 1.1 equiv.) and isocyanide **D1-D3** (1 equiv.) in MeOH (1 mL) was stirred with orbital stirring at room temperature for 48 h. Upon completion of the reaction, as indicated by TLC (DCM:MeOH, 95:5), the solvent was removed under vacuum. The obtained oily residue was purified by column chromatography on silica gel using DCM:MeOH, to yield the pure desired compounds **1a-f, 2a-f, 3a-f** as white solids.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.2.1 Spectroscopic and analytical for all compounds described

***N*^{1}-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)-phenyl)glutaramide (1a).** Yield: 20 %. Mp: 165 – 168 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.74 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.4 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.33 – 7.20 (m, 5H), 7.17 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.39 (s, 2H), 3.90 (s, 2H), 2.52 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.41 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.04 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{24}H_{24}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 516.14; found 516.14.

***N*^{1}-(2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)-phenyl)glutaramide (1b).** Yield: 22 %. Mp: 178 – 180 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.75 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.3 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 3.78 (s, 2H), 2.54 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.39 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.04 (qt, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.33 (s, 9H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{21}H_{26}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 482.16; found 482.16.

***N*^{1}-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)-phenyl)glutaramide (1c).** Yield: 23 %. Mp: 153 – 155 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.77 (d, $^3J_{H,F}$ = 9.0 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 3.83 (s, 2H), 3.74 – 3.60 (m, 1H), 2.55 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.05 (qt, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.90 – 1.58 (m, 5H), 1.44 – 1.12 (m, 5H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{23}H_{28}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 508.17; found 508.17.

***N*^{1}-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)-phenyl)-*N*^{1}-methylglutaramide (1d).** Yield: 20 %. Mp: 169 – 171 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 1.7:1 mixture of rotamers) δ (ppm): 12.73 (s, 1H, NH), 9.92 and 8.89 (2s, 1H, NH), 8.54 and 8.33 (2t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH) 7.88 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.6 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.28 (m, 6H, Ar-H), 4.30 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.03 and 3.98 (2s, 2H), 3.01 and 2.82 (2s, 3H), 2.48-2.27 (m, 4H), 1.83 (m, 2H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{25}H_{26}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 530.16; found: 530.16.

***N*^{1}-(2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)-phenyl)-*N*^{1}-methylglutaramide (1e).** Yield: 30 %. Mp: 198 – 200 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 6.7:1 mixture of rotamers) (main rotamer) δ (ppm): 11.38 (s, 1H, NH), 8.64 (s, 1H, NH), 7.62 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.4 Hz, 2H, ArH), 7.35 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, ArH), 7.04 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H,

ArH), 5.85 (s, 1H, NH), 3.89 (s, 2H, NCH_2CO), 3.11 (s, 3H, NCH_3), 2.57 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2$), 2.10 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2$), 1.32 (s, 9H, $C(CH_3)_3$). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{22}H_{28}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 496.17; found 496.17.

***N*^{1}-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-yl-carbamoyl)-phenyl)-*N*^{1}-methylglutaramide (1f).** Yield: 32 %. Mp: 222 – 224 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD, 2:1 mixture of rotamers) δ (ppm): 7.76 and 7.75 (2d, $^3J_{H,F}$ = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.51 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, ArH), 4.06 and 4.02 (2s, 2H, NCH_2CO), 3.70 – 3.61 (m, 1H, NCH), 3.09 and 2.93 (2s, 3H, NCH_3), 2.60 – 2.51 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2$), 2.02 (dp, *J* = 14.3, 7.2 Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2$), 1.88 – 1.81 (m, 2H, Cy), 1.77 –1.71 (m, 2H, Cy), 1.66 – 1.60 (m, 1H, Cy), 1.41 – 1.15 (m, 5H, Cy). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{24}H_{30}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 522.19; found 522.19.

4-(2-(2-((2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)amino)-2-oxoethoxy)acetamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (2a). Yield: 29 %. Mp: 170 – 172 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.78 (s, 1H, NH), 10.00 (s, 1H, NH), 8.40 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 8.32 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 7.91 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.58 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, ArH), 7.34 – 7.19 (m, 6H, ArH), 4.29 (d, *J* = 4.7 Hz, 4H, OCH_2, NCH_2Ph), 4.12 (s, 2H, OCH_2), 3.82 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, NCH_2CO). HRMS (APCI) *m/z* calcd for $C_{23}H_{22}F_2N_5O_5S$ $[M+H]^+$ 518.1304; found 518.1307.

4-(2-(2-((2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)amino)-2-oxoethoxy)acetamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (2b). Yield: 30 %. Mp: 142 – 144 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.82 (s, 1H, NH), 10.02 (s, 1H, NH), 8.13 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 7.91 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.4 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H, NH), 7.31 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.28 (s, 2H), 4.09 (s, 2H), 3.72 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 1.25 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 169.8, 168.5, 168.2, 163.2, 157.7 (dd, J_{C-F} = 253.3, 5.0 Hz), 136.7, 132.5, 113.8, 111.5 (d, J_{C-F} = 25.4 Hz), 70.4, 70.4, 51.2, 42.3, 28.1. HRMS (APCI) *m/z* calcd for $C_{20}H_{24}F_2N_5O_5S$ $[M+H]^+$ 484.1461; found 484.1461.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4-(2-(2-((2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)amino)-2-oxoethoxy)acetamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (2c). Yield: 42 %. Mp: 230 – 232 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.73 (s, 1H, NH), 9.93 (s, 1H, NH), 8.12 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NH), 7.83 (d, $^{3}J_{H,F}$ = 8.4 Hz, 2H, ArH), 7.65 (d, J = 7.9 Hz, 1H, NH), 7.49 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 4.20 (s, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.65 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.44 (m, 1H), 1.65 – 1.54 (m, 4H), 1.48 – 1.41 (m, 1H), 1.21 – 0.99 (m, 5H). HRMS (APCI) *m/z* calcd for $C_{22}H_{26}F_2N_5O_5S$ $[M+H]^+$ 510.1617; found 510.1616.

4-(2-(2-((2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)acetamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (2d). Yield: 39 %. Mp: 122 – 124 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 1.7:1 mixture of rotamers) δ (ppm): 12.75 (br s, 1H, NH), 10.0 and 10.17 (2s, 1H, NH), 8.59 and 8.39 (2t, J = 6.0 Hz, 1H, NH), 7.90 (d, $^{3}J_{H,F}$ = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.58 (d, J = 3.6 Hz, 1H, ArH), 7.36-7.19 (m, 6H, ArH), 4.47 and 4.34 (2s, 2H, CH_2O), 4.34-4.20 (m, 4H, CH_2O, NCH_2Ph), 4.02 and 4.00 (2s, 2H, NCH_2CO), 2.97 and 2.84 (2s, 3H, NCH_3). HRMS (APCI) *m/z* calcd for $C_{24}H_{24}F_2N_5O_5S$ $[M+H]^+$ 532.1461; found 532.1460.

4-(2-(2-((2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)acetamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (2e). Yield: 42 %. Mp: 131 – 133 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 1.1:1 mixture of rotamers) δ (ppm): 12.77 (br s, 1H, NH), 10.23 and 10.19 (2s, 1H, NH), 7.89 (d, $^{3}J_{H,F}$ = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.69 and 7.46 (2s, 1H, NH), 7.58 (d, J = 3.6 Hz, 1H, ArH), 7.31 (d, J = 3.6 Hz, 1H, ArH), 4.45 and 4.23 (2s, 2H, CH_2O), 4.30 and 4.27 (2s, 2H, CH_2O), 3.87 and 3.84 (2s. 2H, NCH_2CO), 2.91 and 2.80 (2s, 3H, NCH_3), 1.26 and 1.25 (2s, 9H, $C(CH_3)_3$). HRMS (APCI) *m/z* calcd for $C_{21}H_{26}F_2N_5O_5S$ $[M+H]^+$ 498.1617; found 498.1618.

4-(2-(2-((2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)(methyl)amino)-2-oxoethoxy)acetamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (2f). Yield: 35 %. Mp: 193 – 195 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 1.2:1 mixture of rotamers) δ (ppm): 12.80 (br s, 1H, NH), 10.22 and 10.18 (2s, 1H, NH), 7.96 and 7.72 (2d, J = 7.8 Hz, 1H, NH), 7.89 (d, $^{3}J_{H,F}$ = 8.4 Hz, 2H, ArH), 7.36 (d, J = 3.6 Hz, 1H, ArH), 7.31 (d, J = 3.6 Hz, 1H, ArH), 4.45 and 4.30 (2s, 2H, CH_2O), 4.26 and 4.22 (2s, 2H, CH_2O), 3.90 and 3.89 (2s, 2H, NCH_2CO), 3.53 (m, 1H, NCH), 2.92 and 2.80 (2s, 3H, NCH_3), 1.77-1.63 (m, 4H, Cy), 1.54 (m, 1H, Cy), 1.30-1.08 (m, 5H, Cy). ^{13}C NMR (75

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.4, 168.4, 167.1, 163.0, 159.7, 157.5 (dd, J_{C-F} = 254.3, 5.1 Hz), 137.2, 131.8, 118.1, 114.4, 111.9 (d, J_{C-F} = 24.6 Hz), 72.6, 70.1, 52.6, 48.7, 35.7, 33.0, 25.6, 24.9. HRMS (APCI) *m/z* calcd for $C_{23}H_{28}F_2N_5O_5S$ $[M+H]^+$ 524.1774; found 524.1774.

***N*^{1}-[2-(Benzylamino)-2-oxoethyl]-*N*^{5}-[2,6-difluoro-4-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyl)-phenyl]-3,3-dimethylpentanediamide (3a).** Yield: 27 %. Mp: 160 – 162 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.64 (s, 1H, NH), 7.58 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.9 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.37 – 7.20 (m, 5H), 7.04 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 6.87 (br s, 1H, NH), 6.22 (br s, 1H, NH), 4.47 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 3.99 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 2.52 (s, 2H), 2.40 (s, 2H), 1.14 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{26}H_{28}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 544.17; found 544.17.

***N*^{1}-[2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl]-*N*^{5}-[2,6-difluoro-4-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyl)-phenyl]-3,3-dimethylpentanediamide (3b).** Yield: 45 %. Mp: 110 – 112 ºC.^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 8:1 mixture of rotamers) (main rotamer) δ (ppm): 12.79 (s, 1H, NH), 10.15 (s, 1H, NH), 8.08 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH), 7.88 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.5 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H, NH), 7.31 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 3.64 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 2.44 (s, 2H), 2.25 (s, 2H), 1.24 (s, 9H), 1.09 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{23}H_{30}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 510.19; found 510.20.

***N*^{1}-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)-phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (3c).** Yield: 37 %. Mp: 114 – 116 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.90 (s, 1H), 7.66 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.1 Hz, 2H), 7.40 (br s, 1H), 7.14 – 6.98 (m, 2H), 5.81 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 3.93 (d, J = 5.1 Hz, 2H), 3.76 (m, 1H), 2.57 (s, 2H), 2.39 (s, 2H), 1.90 (m, 2H), 1.76 – 1.55 (m, 3H), 1.43 – 1.11 (m, 11H). LRMS (5CI) *m/z* calcd for $C_{25}H_{32}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 536.20; found 536.19.

***N*^{1}-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)-phenyl)-*N*^{1},3,3-trimethylpentanediamide (3d).** Yield: 42 %. Mp: 120 – 122 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.83 (s, 1H, NH), 7.59 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.27 (m, 5H), 7.04 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.52 (t, J = 5.8 Hz,1H, NH), 4.44 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 4.09 (s, 2H), 3.24 (s, 3H), 2.59 (s, 2H), 2.51 (s, 2H), 1.16 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 174.1, 170.3, 168.4, 163.2, 159.9, 157.5 (dd, J_{C-F} = 251.9, 6.1 Hz), 138.0, 137.1, 131.3 (t, J_{C-F} = 8.5 Hz), 128.8, 127.8, 127.7, 119.1 (t, J_{C-F} = 16.7 Hz), 114.3, 111.8 (d, J_{C-F} = 24.9 Hz),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

52.7, 47.0, 43.6, 40.9, 38.5, 35.1, 29.4. LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{27}H_{30}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 558.20; found 558.20.

***N*^{1}-[2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl]-*N*^{5}-[2,6-difluoro-4-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyl)-phenyl]-*N*^{1},3,3-trimethylpentanediamide (3e).** Yield: 48 %. Mp: 100 – 102 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 8:1 mixture of rotamers) (main rotamer) δ (ppm): 10.17 and 9.83 (2s, 1H, NH), 7.64 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.9 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.96 and 5.61 (2s, 1H, NH), 3.96 (s, 2H), 3.22 and 3.03 (2s, 3H), 2.61 (d, *J* = 3.4 Hz, 4H), 1.83 (s, 9H, CH_3), 1.20 (s, 6H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 174.0, 170.1, 167.6, 163.3, 159.9, 157.5 (dd, J_{C-F} = 252.2, 5.6 Hz), 137.2, 131.2 (t, J_{C-F} = 8.6 Hz), 119.2 (t, J_{C-F} = 16.9 Hz), 114.3, 111.8 (d, J_{C-F} = 24.8 Hz), 53.6, 51.6, 47.2, 40.8, 38.4, 35.3, 29.4, 28.8. LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{24}H_{32}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 524.21; found 524.22.

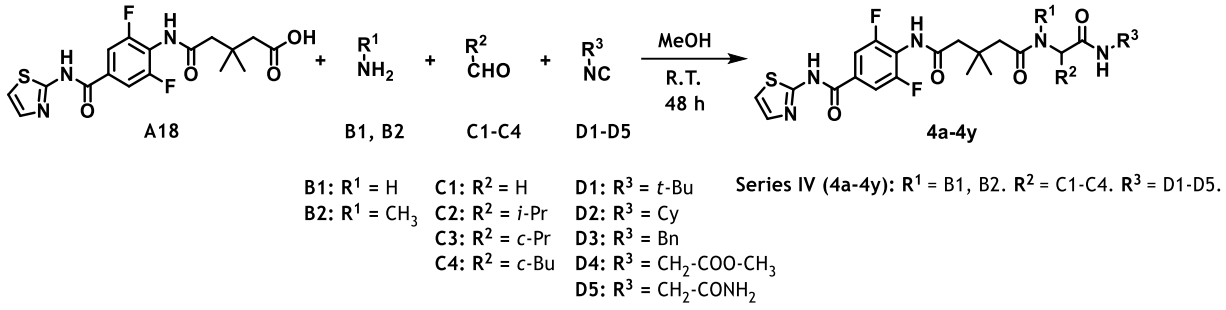
***N*^{1}-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)-phenyl)-*N*^{1},3,3-trimethylpentanediamide (3f).** Yield: 36 %. Mp: 180 – 182 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 7:1 mixture of rotamers) (main rotamer) δ (ppm): 9.82 and 9.41 (2s, 1H, NH), 7.57 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 5.96 and 5.63 (2d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 4.02 (s, 2H), 3.76 (m, 1H), 3.22 and 3.05 (2s, 3H), 2.61 (d, *J* = 2.5 Hz, 4H), 1.89 (m, 2H), 1.69 (m, 2H), 1.60 (m, 1H), 1.36 (m, 2H), 1.21 (s, 6H), 1.14 (m, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{26}H_{34}F_2N_5O_4S[M+H]^+$ 550.22; found 550.21.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3 CHAPTER II

5.3.1 Synthesis of final compounds.

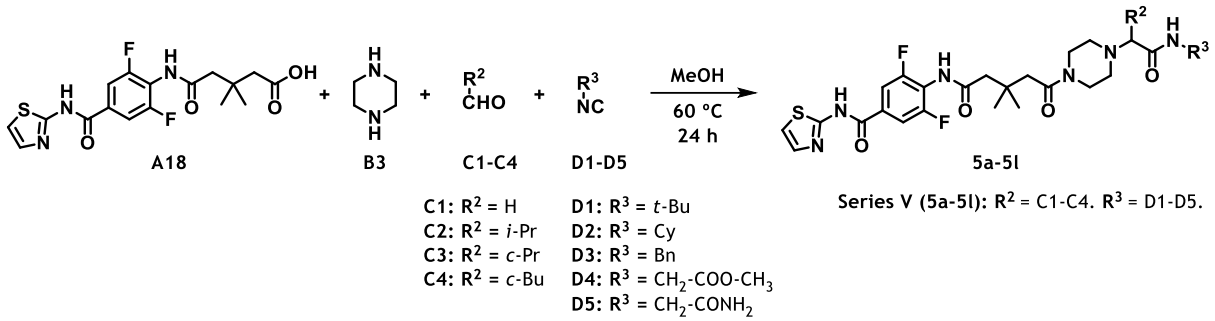
METHOD A. UGI-4CR (Series IV): General procedure for the synthesis of 3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide derivatives **4a-4y**.



A mixture of the carboxylic acid **A18** (1 equiv.), amine **B1-B2** (1.1 equiv.), aldehyde **C1-C4** (1.1 equiv.), and isocyanide **D1-D5** (1 equiv.) in MeOH (1 mL) was stirred with orbital stirring at room temperature for 48 h. Upon completion of the reaction, as indicated by TLC (DCM:MeOH, 95:5), the solvent was removed under vacuum. The obtained oily residue was purified by column chromatography on silica gel using DCM:MeOH gradient to yield the pure desired compounds **4a-4y** as white solids.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

METHOD B. UGI-SPLIT (Series V): General procedure for the synthesis of 3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide derivatives **5a-5l**.



A mixture of the carboxylic acid **A18** (1 equiv.), piperazine (**B3**, 1.3 equiv.), aldehyde **C1-C4** (1.3 equiv.), and isocyanide **D1-D5** (1 equiv.) in MeOH (1 mL) was stirred with orbital shaking at 60 ºC for 24 h. Upon completion of the reaction, as indicated by TLC (DCM:MeOH, 94:4), the solvent was removed under vacuum. The obtained oily residue was purified by column chromatography on silica gel using DCM:MeOH gradient to yield the pure desired compounds **5a-5l** as white solids.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3.1.1 Spectroscopic and analytical data for all compounds described

Methyl (5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-3,3-dimethyl-5-oxopentanoyl)glycylglycinate (4a). Yield: 30 %. Mp: 160 – 162 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 9.61 (s, 1H), 7.61 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.1 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 6.93 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.62 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.08 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 4.04 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 2.58 (s, 2H), 2.40 (s, 2H), 1.17 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{22}H_{26}F_2N_5O_6S$ $[M+H]^+$ 526.11; found 526.11.

***N*^{1}-(2-((2-Amino-2-oxoethyl)amino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (4b).** Yield: 37 %. Mp: 182 – 184 ºC.^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.76 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.51 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, ArH), 3.90 (s, 2H, NCH_2CO), 3.84 (s, 2H, NCH_2CO), 2.57 (s, 2H, $CH_2C(CH_3)_2CH_2$), 2.42 (s, 2H, $CH_2C(CH_3)_2CH_2$), 1.20 (s, 6H, $CH_2C(CH_3)_2CH_2$). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{21}H_{25}F_2N_6O_5S$ $[M+H]^+$ 511.14; found 511.14.

Methyl *N*-(5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-3,3-dimethyl-5-oxopentanoyl)-*N*-methylglycylglycinate (4c). Yield: 36 %. Mp: 170 – 172 ºC . ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 12:1 mixture of rotamers) (main rotamer) δ (ppm): 9.83 (s, 1H), 7.68 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.8 Hz, 2H), 7.49 (br s, 1H), 7.12 (br s, 1H), 6.74 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.12 (s, 2H), 4.05 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.23 (s, 3H), 2.62 (d, *J* = 7.3 Hz, 4H), 1.21 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{23}H_{28}F_2N_5O_6S$ $[M+H]^+$ 540.16; found 540.16.

***N*^{1}-(2-((2-Amino-2-oxoethyl)amino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{1},3,3-trimethylpentanediamide (4d).** Yield: 41 %. Mp: 195 – 197 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 2:1 mixture of rotamers) δ (ppm): 12.69 (br s, 1H, NH), 10.01 and 9.98 (2s, 1H, NH), 8.15 and 8.05 (2t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 7.88 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.6 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.19 and 7.04 (br s, 2H, NH_2), 4.08 and 3.97 (2s, 2H), 3.67 and 3.62 (2d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.04 and 2.82 (2s, 3H), 2.50 (s, 2H), 2.47 and 2.37 (2s, 2H), 1.14 and 1.10 (2s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{22}H_{27}F_2N_6O_5S$ $[M+H]^+$ 525.16; found 525.16.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(±) N^1-(1-(Benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (4e). Yield: 31 %. Mp: 145 – 147 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.98 (s, 1H, NH), 9.86 (s, 1H, NH), 7.58 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.1 Hz, 2H, ArH), 7.40 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, ArH), 7.34 – 7.22 (m, 5H, ArH), 7.04 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, ArH), 6.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH), 6.28 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 4.47 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.27 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 2.59 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 2.51 – 2.29 (m, 3H), 2.14 (m, 1H), 1.12 (d, *J* = 9.7 Hz, 6H), 0.99 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{29}H_{34}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 586.22; found 586.22.

(±) N^1-(1-(*Tert*-butylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (4f). Yield: 39 %. Mp: 131 – 132 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.76 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.51 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, ArH), 4.04 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NCHCO), 2.63 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, $CH_2C(CH_3)_2CH$), 2.52 – 2.44 (m, 2H, $CH_2C(CH_3)_2CH_2$), 2.34 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, $CH_2C(CH_3)_2CH$), 2.00 (dq, *J* = 13.8, 6.8 Hz, 1H, $CH(CH_3)_2$), 1.33 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.16 (d, *J* = 5.9 Hz, 6H, $C(CH_3)_2$), 0.96 (dd, *J* = 6.8, 2.5 Hz, 6H, $CH(CH_3)_2$). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{26}H_{36}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 552.23, found 552.23.

(±) N^1-(1-(Cyclohexylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (4g). Yield: 38 %. Mp: 203 – 205 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.77 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.3 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.17 (d, *J*= 3.7 Hz, 1H), 4.11 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.63 (tt, *J* = 10.8, 3.8 Hz, 1H), 2.65 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 2.47 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H), 2.34 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 2.04 (dq, *J* = 13.7, 6.8 Hz, 1H), 1.87 – 1.79 (m, 2H), 1.74 (dt, *J* = 13.5, 3.6 Hz, 2H), 1.62 (dt, *J* = 12.8, 3.7 Hz, 1H), 1.42 – 1.28 (m, 2H), 1.28 – 1.13 (m, 9H), 0.96 (dd, *J* = 6.8, 1.8 Hz, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{28}H_{38}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 578.25; found 578.25.

(±) Methyl (5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-3,3-dimethyl-5-oxopentanoyl)valylglycinate (4h). Yield: 39 %. Mp: 264 – 266 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.56 (br s, 1H, NH), 9.77 (s, 1H, NH), 7.58 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.8 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NH), 6.41 (s, 1H, NH), 4.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.19 – 3.95 (m, 2H), 3.76 (s, 3H, OMe), 2.64 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 2.54 –

USC SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.40 (m, 2H), 2.34 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 2.16 (m, 1H), 1.16 (s, 6H), 1.00 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H). HRMS (APCI) *m/z* calcd for $C_{25}H_{32}F_2N_5O_6S$ $[M+H]^+$ 568.1963; found 568.1964.

(±) *N*^{1}-(1-((2-amino-2-oxoethyl)amino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (4i). Yield: 29 %. Mp: 199 – 201 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.77 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.3 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.05 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.95 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H), 3.73 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H), 2.68 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 2.49 (d, *J* = 14.2 Hz, 2H), 2.35 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 2.09 (hept, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.17 (d, *J* = 4.8 Hz, 6H), 1.00 (t, *J* = 6.3 Hz, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{24}H_{31}F_2N_6O_5S$ $[M+H]^+$ 553.21; found 553.21.

(±) *N*^{1}-(1-(Benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{1},3,3-trimethylpentanediamide (4j). Yield: 45 %. Mp: 187 – 189 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.25 (br s, 1H, NH), 10.14 (s, 1H, NH), 7.57 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.9 Hz, 2H), 7.27 (m, 6H), 7.03 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.52 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 4.68 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 4.47 (dd, *J* = 14.9, 6.1 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 14.7, 5.7 Hz, 1H), 3.10 (s, 3H), 2.58 (d, *J* = 3.3 Hz, 2H), 2.51 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 2.38 (m, 1H), 1.13 (s, 3H, CH_3), 1.05 (s, 3H, CH_3), 1.01 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH_3), 0.88 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 174.7, 170.1, 169.5, 163.2, 159.9, 157.4 (dd, J_{C-F} = 252.2, 5.4 Hz), 138.2, 137.2, 131.2 (t, J_{C-F} = 8.2 Hz), 128.8, 127.7, 119.1 (t, J_{C-F} = 16.7 Hz), 114.4, 111.80 (d, J_{C-F} = 24.6 Hz), 63.1, 47.4, 43.4, 41.3, 35.2, 32.1, 29.2, 29.2, 26.0, 19.8, 18.9. HRMS (APCI) *m/z* calcd for $C_{30}H_{36}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 600.2446; found 600.2447.

(±) *N*^{1}-(1-(*Tert*-butylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{1},3,3-trimethylpentanediamide (4k). Yield: 39 %. Mp: 140 – 142 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.48 (s, 1H, NH), 10.38 (s, 1H, NH), 7.61 (d, $J^3_{\text{H-F}}$= 7.8 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.92 (s, 1H, NH), 4.52 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 3.10 (s, 3H), 2.62 (m, 4H), 2.42 – 2.21 (m, 1H), 1.32 (s, 9H), 1.16 (d, *J* = 4.4 Hz, 6H), 0.99 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H).^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 174.6, 170.0, 168.9, 163.2, 159.8, 157.4 (dd, *J* = 252.3, 5.5 Hz), 137.3, 131.0 (t, *J* = 8.4 Hz), 119.4 (t, *J* = 24.9 Hz), 114.4, 111.8 (d, *J* = 24.9 Hz), 63.7, 51.5, 47.5, 41.2, 35.4, 32.0, 29.3, 28.8, 25.8, 19.7, 18.8. LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{27}H_{38}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 566.25; found 566.24.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(±) N^1-(1-(Cyclohexylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-N^1,3,3-trimethylpentanediamide (4l). Yield: 45 %. Mp: 113 – 115 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.75 (s, 1H, NH), 10.34 (s, 1H, NH), 7.63 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 4.58 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, NCH), 3.74 (tdd, *J* = 10.3, 7.2, 4.1 Hz, 1H, CHNH), 3.10 (s, 3H, NCH_3), 2.66 – 2.56 (m, 4H, 2 x CH_2), 2.40 – 2.29 (m, 1H, CH), 1.94 – 1.85 (m, 1H), 1.82 – 1.54 (m, 7H), 1.41 – 1.28 (m, 2H), 1.16 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.86 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{29}H_{40}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 592.27; found 592.26.

(±) Methyl *N*-(5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-3,3-dimethyl-5-oxopentanoyl)-*N*-methylvalylglycinate (4m). Yield: 43 %. Mp: 186 – 188 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, mixture of rotamers 11:1) main rotamer δ (ppm): 11.20 (br s, 1H, NH), 10.08 (s, 1H, NH), 7.60 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.8 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 6.68 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 4.75 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.10 (dd, *J* = 18.1, 6.4 Hz, 1H), 3.89 (dd, *J* = 18.1, 5.1 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.08 (s, 3H, NCH_3), 2.62 (m, 4H), 2.35 (dt, *J* = 12.2, 6.4 Hz, 1H), 1.17 (s, 6H), 1.01 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.88 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 174.9, 170.2, 170.1, 163.1, 159.8, 157.5 (dd, J_{C-F} = 252.6, 5.5 Hz), 137.3, 131.1 (t, J_{C-F} = 8.5 Hz), 119.3 (t, J_{C-F} = 17.2 Hz), 114.4, 111.8 (d, J_{C-F} = 24.8 Hz), 62.6, 52.4, 47.3, 41.5, 41.0, 35.2, 32.1, 29.3, 25.8, 19.8, 18.8. HRMS (APCI) *m/z* calcd for $C_{26}H_{34}F_2N_5O_6S$ $[M+H]^+$ 581.2120; found 582.2192.

(±) N^1-(1-((2-Amino-2-oxoethyl)amino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-N^1,3,3-trimethylpentanediamide (4n). Yield: 38 %. Mp: 185 – 187 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.07 (br s, 1H, NH), 10.06 (s, 1H, NH) 7.67 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.2 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.04 (br s, 2H, NH_2), 6.64 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 4.75 (d, *J* = 10.89 Hz, 1H), 3.79 – 3.66 (m, 2H), 2.99 (s, 3H, NCH_3), 2.54 (m, 4H), 2.20 (dt, *J* = 10.9, 6.6 Hz, 1H), 1.14 (d, *J* = 5.7 Hz, 6H), 0.93 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{25}H_{33}F_2N_6O_5S$ $[M+H]^+$ 567.21; found 567.23.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(±) N^1-(2-(Benzylamino)-1-cyclopropyl-2-oxoethyl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (4ñ). Yield: 53 %. Mp: 117 – 119 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.88 (s, 1H, NH), 7.60 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.38 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.34-7.23 (m, 6H, Ar-H+NH), 7.09 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 7.04 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, Ar-H), 6.42 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 4.49 (dd, *J* = 5.8, 2.2 Hz, 2H), 3.87 (dd, *J* = 9.3, 7.7 Hz, 1H), 2.57 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 2.44 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 2.42 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 2.33 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 1.23 (m, 1H), 1.14 y 1.13 (2s, 6H, CH_3), 0.69 (m, 1H), 0.61 (m, 1H), 0.53-0.43 (m, 2H). HRMS (APCI) *m/z* calcd for $C_{29}H_{32}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 584.2144; found 584.2143.

(±) N^1-(2-(*tert*-Butylamino)-1-cyclopropyl-2-oxoethyl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (4o). Yield: 46 %. Mp: 123 – 125 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 10.21 (s, 1H, NH), 8.14 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 7.89 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.5 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H, NH), 7.31 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 3.78 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 2.47 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 2.39 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 2.26 (s, 2H), 1.24 (s, 9H), 1.07 (d, *J* = 2.3 Hz, 6H), 1.05 – 0.98 (m, 1H), 0.46 – 0.38 (m, 3H), 0.25 – 0.21 (m, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) (δ) ppm: 172.8, 170.2, 163.0, 159.6, 157.5 (dd, J_{C-F} = 252.3, 5.4 Hz), 137.2, 131.1 (t, J_{C-F} = 8.1 Hz), 119.2 (t, J_{C-F} = 17.0 Hz), 114.4, 111.7 (d, J_{C-F} = 24.5 Hz), 57.9, 51.9, 47.1, 46.6, 34.4, 29.5, 28.9, 14.5, 4.1, 3.3. LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{26}H_{34}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 550.22; found 550.23.

(±) N^1-(2-(Cyclohexylamino)-1-cyclopropyl-2-oxoethyl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (4p). Yield: 38 %. Mp: 173 – 175 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.25 (br s, 1H, NH), 10.03 (s, 1H, NH), 7.61 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.0 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H, NH), 5.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 3.83 (dd, *J* = 9.1, 7.8 Hz, 1H), 3.80 – 3.72 (m, 1H), 2.62 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 2.49 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 2.42 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 2.33 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 1.90 (td, *J* = 8.4, 4.2 Hz, 2H), 1.70 (dq, *J* = 13.1, 4.2 Hz, 2H), 1.59 (m, 5H), 1.42 – 1.31 (m, 2H), 1.15 (s, 6H), 0.72 – 0.64 (m, 1H), 0.64 – 0.56 (m, 1H), 0.51 (dq, *J* = 10.2, 5.1 Hz, 1H), 0.43 (dq, *J* = 9.7, 4.9 Hz,1H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{28}H_{36}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 576.23; found 576.23.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(±) Methyl (2-cyclopropyl-2-(5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)-phenyl)-amino)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)acetyl)glycinate (4q). Yield: 25 %. Mp: 141 – 143 ºC ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, mixture of rotamers 5:1) (main rotamer) δ (ppm): 9.84 (s, 1H, NH), 7.77 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.0 Hz, 2H), 7.52 (br s, 1H), 7.11 (br s, 1H), 6.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 6.61 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.11 (dd, *J* = 18.5, 5.3 Hz, 1H), 4.06 (dd, *J* = 18.4, 5.2 Hz, 1H), 3.91 (dd, *J* = 9.2, 7.6 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.60 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 2.50 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 2.42 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 2.35 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 1.21 (m, 1H), 1.17 (s, 6H), 0.75 – 0.70 (m, 1H), 0.66 – 0.59 (m, 1H), 0.57 – 0.45 (m, 2H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{25}H_{30}F_2N_5O_6S$ $[M+H]^+$ 566.18; found 566.19.

(±) *N*^{1}-(2-((2-Amino-2-oxoethyl)amino)-1-cyclopropyl-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (4r). Yield: 40 %. Mp: 150 – 152 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.86 (s, 1H, NH), 7.69 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.3 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.89 (br s, 2H, NH_2), 6.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 6.63 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.97 (d, *J* = 7.10, 1H), 3.88 (d, *J* = 7.10 Hz, 1H), 2.60 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 2.50 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 2.42 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 2.35 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 1.23 (m, 1H), 1.10 (s, 6H), 0.76 – 0.71 (m, 1H), 0.68 – 0.59 (m, 1H), 0.55 – 0.42 (m, 2H) LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{24}H_{29}F_2N_6O_5S$ $[M+H]^+$: 551.18; found 551.18.

(±) *N*^{1}-(2-(Benzylamino)-1-cyclopropyl-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{1},3,3-trimethylpentanediamide (4s). Yield: 37 %. Mp: 112 – 114 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.18 (br s, 1H, NH), 10.23 (s, 1H, NH), 7.57 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.33 – 7.23 (m, 5H), 7.03 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.56 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 4.50 (dd, *J* = 14.8, 6.1 Hz, 1H), 4.42 (dd, *J* = 14.8, 5.6 Hz, 1H), 4.23 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 3.22 (s, 3H, NCH_3), 2.62 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 2.49 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 1.46 (m, 1H), 1.17 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 0.85 (m, 1H), 0.66 (m, 1H), 0.52 (dq, *J* = 9.9, 4.9 Hz, 1H), 0.31 (m, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 174.0, 170.2, 169.8, 163.2, 159.9, 157.6 (dd, J_{C-F} = 252.3, 5.8 Hz), 138.1, 137.2, 131.2 (t, J_{C-F} = 8.4 Hz), 128.8, 127.7, 127.7, 119.2 (t, J_{C-F} = 16.9 Hz), 114.3, 111.8 (d, J_{C-F} = 25.0 Hz), 63.3, 47.3, 43.6, 41.2, 35.3, 33.6, 29.2, 10.3, 6.3, 3.3. HRMS (APCI) *m/z* calcd for $C_{30}H_{34}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 598.2300, found 598.2300.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(±) N^1-(2-(*Tert*-butylamino)-1-cyclopropyl-2-oxoethyl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-N^1,3,3-trimethylpentanediamide (4t). Yield: 32 %. Mp: 147 – 149 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.56 (br s, 1H), 10.31 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.99 (s, 1H), 4.06 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 3.12 (s, 3H), 2.60 – 2.46 (m, 4H), 1.46 (m, 1H), 1.27 (s, 9H), 1.12 (s, 6H), 0.76 (tt, *J* = 9.0, 5.3 Hz, 1H), 0.56 (tt, *J* = 9.1, 5.3 Hz, 1H), 0.42 (dq, *J* = 10.1, 5.0 Hz, 1H), 0.21 (dq, *J* = 10.3, 5.2 Hz, 1H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{27}H_{36}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 564.24; found 564.25.

(±) N^1-(2-(Cyclohexylamino)-1-cyclopropyl-2-oxoethyl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-N^1,3,3-trimethylpentanediamide (4u). Yield: 48 %. Mp: 138 – 140 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.24 (br s, 1H, NH), 10.34 (s, 1H, NH), 7.63 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NH), 4.21 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 3.76 (dddd, *J* = 14.3, 12.0, 6.3, 3.5 Hz, 1H), 3.19 (s, 3H), 2.67 – 2.52 (m, 4H), 1.95 – 1.78 (m, 2H), 1.63 (dddt, *J* = 36.1, 17.2, 8.3, 4.3 Hz, 3H), 1.45 – 1.29 (m, 3H), 1.24 – 1.07 (m, 9H), 0.87 – 0.78 (m, 1H), 0.63 (ddt, *J* = 13.7, 8.8, 5.0 Hz, 1H), 0.50 (dq, *J* = 10.1, 4.9 Hz, 1H), 0.29 (dq, *J* = 10.1, 5.1 Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 173.9, 170.2, 168.7, 163.2, 159.9, 157.5 (dd, *J* = 252.4, 5.4 Hz), 137.3, 131.1 (t, *J* = 8.3 Hz), 119.3 (t, *J* = 16.7 Hz), 114.4, 111.8 (d, *J* = 25.4 Hz), 63.0, 48.3, 47.4, 41.1, 35.3, 33.4, 33.1, 33.0, 29.3, 25.6, 24.8, 15.4, 10.3, 6.3, 3.2. LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{29}H_{38}F_2N_5O_4S$ $M+H]^+$ 590.25; found 590.25.

(±) Methyl (2-Cyclopropyl-2-(5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-*N*,3,3-trimethyl-5-oxopentanamido)acetyl)glycinate (4v). Yield: 42 %. Mp: 147 – 149 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.79 (s, 1H, NH), 7.60 (d, $J^3_{H\text{-}F}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.75 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 4.12 (s, 2H), 4.04 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.23 (s, 3H, NMe), 2.63 (s, 2H), 2.61 (s, 2H), 1.22 (s, 6H), 0.71 – 0.62 (m, 1H), 0.60 – 0.56 (m, 1H), 0.48 (dq, *J* = 10.2, 5.1 Hz, 1H), 0.41 (dq, *J* = 9.7, 4.9 Hz, 1H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{26}H_{31}F_2N_5O_6S$ $[M+H]^+$ 580.19; found 580.20.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(±) N^1-(2-((2-Amino-2-oxoethyl)amino)-1-cyclopropyl-2-oxoethyl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-N^1,3,3-trimethylpentanediamide (4w). Yield: 31 %. Mp: 166 – 168 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 9.82 (s, 1H, NH), 7.61 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.77 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 6.05 (br s, 2H, NH_2), 4.16 (s, 2H), 4.05 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.24 (s, 3H, NMe), 2.64 (s, 2H), 2.62 (s, 2H), 1.17 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{25}H_{31}F_2N_6O_5S$ $[M+H]^+$ 565.20; found 565.20.

(±) N^1-(2-(Benzylamino)-1-cyclobutyl-2-oxoethyl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (4x). Yield: 32 %. Mp: 187 – 189 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.77 (s, 1H, NH), 10.20 (s, 1H, NH), 8.48 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 8.10 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.89 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.5 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.31 – 7.26 (m, 3H), 7.24 – 7.19 (m, 3H), 4.32 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.26 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH_2), 2.61 – 2.52 (m, 1H), 2.46 (s, 1H), 2.40 (s, 1H), 2.28 (s, 2H, CH_2), 1.95 – 1.71 (m, 6H), 1.07 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{30}H_{34}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 598.22; found 598.22.

(±) N^1-(2-(Benzylamino)-1-cyclobutyl-2-oxoethyl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-N^1,3,3-trimethylpentanediamide (4y). Yield: 38 %. Mp: 105 – 107 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.20 (s, 1H, NH), 7.63 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.30 – 7.20 (m, 5H), 7.05 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.54 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 5.07 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.46 (dd, *J* = 14.8, 6.2 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 14.8, 5.5 Hz, 1H), 3.01 (m, 4H), 2.59 (s, 2H), 2.53 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 2.46 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 2.25 (m, 1H), 2.05 – 1.87 (m, 3H), 1.85 – 1.76 (m, 1H), 1.72 – 1.66 (m, 1H), 1.12 (s, 3H), 1.07 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 174.6, 170.1, 169.6, 163.2, 159.9, 157.5 (dd, $J_{C\text{-}F}$ = 252.2, 5.6 Hz), 138.2, 137.2, 131.2 (t, $J_{C\text{-}F}$ = 8.7 Hz), 128.8, 127.7, 127.7, 119.2 (t, $J_{C\text{-}F}$ = 16.8 Hz), 114.3, 111.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 24.8 Hz), 62.3, 47.3, 43.5, 41.3, 35.2, 33.1, 32.6, 29.2, 26.4, 25.0, 18.1. HRMS (APCI) *m/z* calcd for $C_{31}H_{36}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 612.2459; found 612.2458.

4-(5-(4-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (5a). Yield: 40 %. Mp: 85 – 87 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.37 (br s, 1H, NH), 10.32 (s, 1H, NH), 7.60 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.41 – 7.21 (m, 7H), 7.03 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.76 – 3.55 (m, 4H), 3.13 (s, 2H), 2.64 – 2.51 (m, 8H), 1.14 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.5,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

170.1, 169.5, 163.2, 159.8, 157.5 (dd, J_{C-F} = 252.4, 5.3 Hz), 138.3, 137.2, 131.2 (t, J_{C-F} = 8.2 Hz), 128.9, 127.7, 127.7, 119.1 (t, J_{C-F} = 16.7 Hz), 114.2, 111.8 (d, J_{C-F} = 25.0 Hz), 61.5, 53.6, 53.3, 47.3, 46.8, 43.2, 41.9, 40.5, 34.9, 29.4. LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{30}H_{35}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 613.23; found 613.23.

4-(5-(4-(2-(*tert*-Butylamino)-2-oxoethyl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (5b). Yield: 42 %. Mp: 136 – 138 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.17 (br s, 1H), 7.63 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.08 (br s, 1H, NH), 7.04 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 3.92 – 3.65 (m, 4H), 3.09 (s, 2H), 2.83 – 2.52 (m, 8H), 1.38 (s, 9H), 1.16 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{27}H_{37}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 579.24; found 579.24.

4-(5-(4-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (5c). Yield: 37 %. Mp: 83 – 85 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.15 (br s, 1H, NH), 10.34 (s, 1H, NH), 7.61 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.8 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NH), 3.90 – 3.72 (m, 3H), 3.65 (m, 2H), 3.04 (s, 2H), 2.63 – 2.52 (m, 8H), 1.90 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 1.82 – 1.06 (m, 14H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{29}H_{39}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 579.24; found 579.24.

Methyl (2-(4-(5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-3,3-dimethyl-5-oxopentanoyl)piperazin-1-yl)acetyl)glycinate (5d). Yield: 45 %. Mp: 77 – 79 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.33 (br s, 1H, NH), 10.37 (s, 1H, NH), 7.60 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.50 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 7.34 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.11 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.81 – 3.75 (m, 5H), 3.68 (m, 2H), 3.12 (s, 2H), 2.67 – 2.57 (m, 8H), 1.16 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.6, 170.6, 170.1, 163.2, 159.9, 157.6 (dd, J_{C-F} = 252.2, 5.5 Hz), 137.2, 131.2 (t, J_{C-F} = 8.4 Hz), 119.2 (t, J_{C-F} = 16.7 Hz), 114.3, 111.8 (d, J_{C-F} = 24.5 Hz), 61.2, 53.6, 53.5, 53.3, 52.5, 47.4, 47.0, 42.0, 40.7, 40.5, 35.0, 29.4. LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{26}H_{33}F_2N_6O_6S$ $[M+H]^+$ 595.20; found 595.20.

4-(5-(4-(2-((2-Amino-2-oxoethyl)amino)-2-oxoethyl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (5e). Yield: 36 %. Mp: 97 – 99 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD, mixture of rotamers, 1.6:1) δ (ppm): 7.78 – 7.74 (m,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2H), 7.51 and 7.41 (2d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.17 and 7.10 (2d, J = 3.6 Hz, 1H), 3.92 (d, J = 0.9 Hz, 2H), 3.75 – 3.69 (m, 4H), 3.11 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 2.64 – 2.54 (m, 8H), 1.20 and 1.15 (2s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{25}H_{32}F_2N_7O_5S$ $[M+H]^+$ 580.20; found 580.20.

(±) 4-(5-(4-(1-(Benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (5f). Yield: 50 %. Mp: 101 – 102 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.28 (s, 1H, NH), 10.48 (s, 1H, NH), 7.60 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.38 – 7.23 (m, 6H), 7.03 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 6.24 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH), 4.55 – 4.38 (m, 2H), 3.83 – 3.44 (m, 4H), 2.71 – 2.46 (m, 9H), 2.15 (hept, J = 6.4 Hz, 1H), 1.14 (d, J = 2.0 Hz, 6H), 1.03 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.6 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{33}H_{41}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 655.28; found 655.28.

(±) 4-(5-(4-(1-(tert-Butylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (5g). Yield: 37 %. Mp: 130 – 132 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.54 (s, 1H, NH), 7.58 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.6 Hz, 2H), 7.43 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.76 (s, 1H, NH), 3.86 (m, 1H), 3.67 (m, 1H), 3.60 – 3.47 (m, 2H), 2.70 – 2.65 (m, 1H), 2.63-2.52 (m, 7H), 2.40 (d, J = 7.7 Hz, 1H, CH), 2.10 (m, 1H, CH), 1.36 (s, 9H), 1.14 (d, J = 2.6 Hz, 6H), 1.00 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.92 (d, J = 6.6 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{30}H_{43}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 621.29; found 621.29.

(±) 4-(5-(4-(1-(Cyclohexylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (5h). Yield: 40 %. Mp: 117 – 119 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.01 (br s, 1H, NH), 10.50 (s, 1H, NH), 7.59 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.6 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.83 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH), 3.88 – 3.80 (m, 2H), 3.70 – 3.64 (m, 1H), 3.60 – 3.48 (m, 2H), 2.69 – 2.51 (m, 8H), 2.49 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 2.13 (dp, J = 13.6, 7.1 Hz, 1H), 1.90 (m, 2H), 1.73 – 1.67 (m, 2H), 1.44 – 1.33 (m, 2H), 1.25 (br s, 2H), 1.23 – 1.11 (m, 8H), 1.01 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.6 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{32}H_{45}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 647.31; found 647.31.

(±) *M*ethyl (2-(4-(5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-3,3-dimethyl-5-oxopentanoyl)piperazin-1-yl)-3-methylbutanoyl)glycinate (5i). Yield: 42 %. Mp: 107 – 109 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.52 (s, 1H, NH), 7.61 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.7 Hz,

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2H), 7.41 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.63 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 4.20 (dd, *J* = 18.3, 6.0 Hz, 1H), 4.01 (dd, *J* = 18.3, 4.9 Hz, 1H), 3.96 – 3.86 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.75 – 3.52 (m, 3H), 2.82 – 2.71 (m, 1H), 2.70 – 2.52 (m, 8H), 2.17 (h, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.17 (s, 6H), 1.05 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{29}H_{39}F_2N_6O_6S$ $[M+H]^+$:637.25; found 637.25.

(±) 4-(5-(4-(1-((2-Amino-2-oxoethyl)amino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (5j). Yield: 35 %. Mp: 120 – 122 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.79 – 7.72 (m, 2H), 7.51 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 3.87 (s, 2H), 3.71 – 3.55 (m, 4H), 2.75 – 2.51 (m, 9H), 2.16 – 2.06 (m, 1H), 1.18 (s, 6H), 1.02 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{28}H_{38}F_2N_7O_5S$ $[M+H]^+$ 622.25; found 622.25.

(±) 4-(5-(4-(2-(Benzylamino)-1-cyclopropyl-2-oxoethyl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (5k). Yield: 40 %. Mp: 96 – 98 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.77 (s, 1H, NH), 10.09 (s, 1H, NH), 8.29 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, NH), 7.88 (d, $^3J_{H,F}$ = 8.4 Hz, 2H, ArH), 7.58 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, ArH), 7.33 – 7.19 (m, 6H, ArH), 4.29 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, NCH_2Ph), 3.56 – 3.48 (m, 2H), 2.71 – 2.62 (m, 2H), 2.47 – 2.33 (m, 8H), 2.04 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, NCHCO), 1.10 (s, 6H, 2 x CH_3), 1.03 – 0.93 (m, 1H, *c*-Pr), 0.63 - 0.57 (m, 1H, *c*-Pr), 0.47 – 0.41 (m, 1H, *c*-Pr), 0.26 (0.26 (d, *J* = 3.3 Hz, 2H, *c*-Pr). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{33}H_{39}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 653.26; found 653.26.

(±) 4-(5-(4-(2-(Benzylamino)-1-cyclobutyl-2-oxoethyl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-3,5-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (5l). Yield: 45 %. Mp: 108 – 110 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.29 (s, 1H, NH), 10.41 (s, 1H, NH), 7.59 (d, $^3J_{H,F}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.38 – 7.22 (m, 6H), 7.04 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.81 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 4.44 (dd, *J* = 6.0, 2.1 Hz, 2H), 3.73 – 3.47 (m, 4H), 2.85 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 2.63 – 2.42 (m, 9H), 2.15 – 1.76 (m, 6H), 1.13 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.5, 171.4, 170.1, 163.3, 159.9, 157.6 (dd, J_{C-F} = 252.4, 5.5 Hz), 138.6, 137.2, 131.2 (t, J_{C-F} = 8.3 Hz), 128.9, 127.8, 127.7, 119.2 (t, J_{C-F} = 16.7 Hz), 114.3, 111.8 (d, J_{C-F} = 24.8 Hz), 75.6, 51.0, 50.7, 47.4, 47.2, 43.2, 42.2, 40.5, 36.8, 35.0, 29.9, 29.4, 26.1, 18.9. LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{34}H_{41}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 667.28; found 667.28.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

5.3.2 Chiral HPLC separation of enantiomers 4ñ, 4s and 5k.

The chiral resolution was performed using a Waters Alliance e2695 system (Waters, USA), equipped with an e2695 separation module, a photodiode array (PDA) detector model 2998, and a thermostatted column oven. System control and data acquisition were conducted using Empower 3 software. Chromatographic separations were achieved using a Chiralpak IE column (20 mm i.d. × 250 mm length, 5 µm particle size; DAICEL Corp.), maintained at 25 °C. The mobile phase was a binary solvent system: (A) dichloromethane (DCM, HPLC grade) and (B) isopropanol (IPA, HPLC grade). Isocratic elution was employed with two different compositions: 15 % and 30 % IPA in DCM, at constant flow rate of 6 mL/min. The injection volume was 200 µL. Detection was performed using the PDA detector, with spectra recorded over the 200–600 nm range, and quantification carried out at 254 nm, corresponding to the analyte's maximum absorbance. All samples were filtered through 0.45 µm Nylon membranes and degassed by ultrasonication prior to injection.

The enantiomers [**(A)-4s** (1 mg, t_R = 14.06 min), **(R)-4s** (1 mg, t_R = 16.21 min) (isocratic mobile phase DCM-IPA 30 %)], [**(A)-4ñ** (1 mg, t_R = 16.25 min), **(B)-4ñ** (1 mg, t_R = 17.46 min) (isocratic mobile phase DCM–IPA 30 %)] and [**(A)-5k** (1 mg, t_R = 19.64 min), **(B)-5k** (1 mg, t_R = 22.07 min) (isocratic mobile phase DCM–IPA 15 %)] were isolated, their stereochemical purity analyzed by chiral HPLC (e.e.: >95% for each enantiomer, reports showed below, chromatogram at 254 nM).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

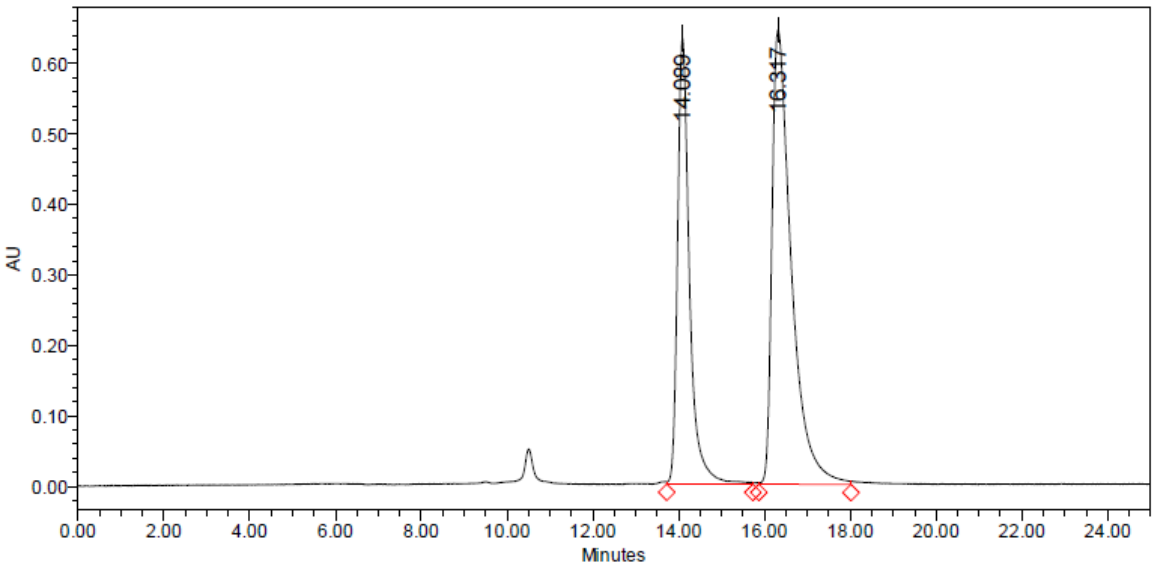
Empower 3 SOFTWARE

SON

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	4s Racemic	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	4s Racemic IE
Vial:	1	Acq. Method Set:	Prep ISO 30% IPA_F6
Injection #:	1	Processing Method:	4s Racemic
Injection Volume:	200.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Run Time:	25.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Date Acquired:	30/06/2025 15:20:57 CEST		
Date Processed:	01/07/2025 17:02:20 CEST		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height
1		14.089	12256096	632355
2		16.317	20217247	644738

Peak Results

	% Area
1	37.74

	% Area
2	62.26

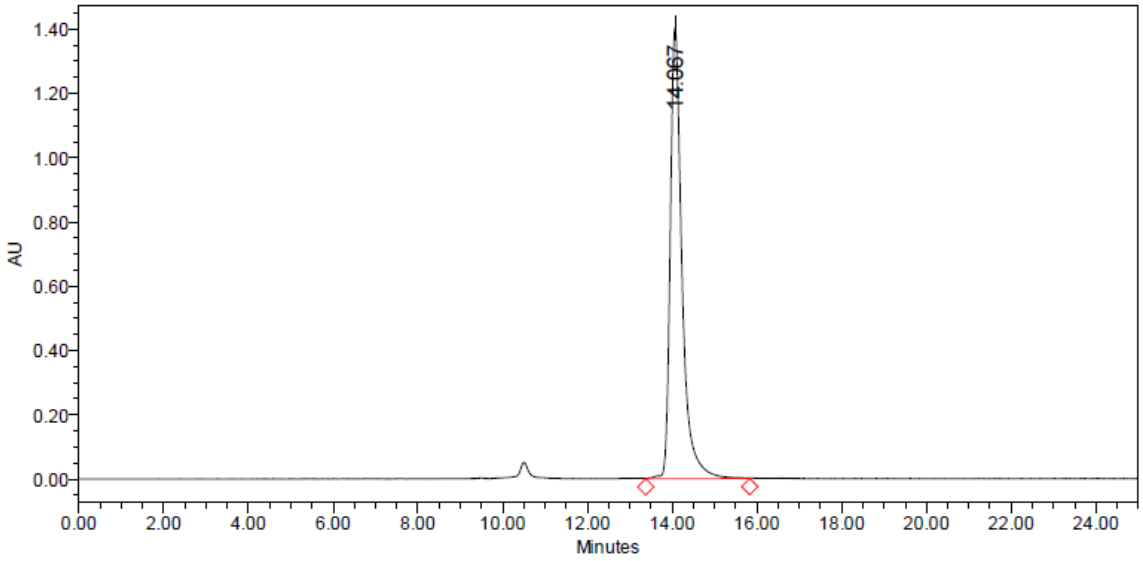
Empower 3 SOFTWARE

SON

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	4s A	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	4s Racemic IE
Vial:	2	Acq. Method Set:	Prep ISO 30% IPA_F6
Injection #:	1	Processing Method:	4s Racemic
Injection Volume:	200.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Run Time:	25.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Date Acquired:	30/06/2025 15:48:49 CEST		
Date Processed:	01/07/2025 17:03:08 CEST		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height
1		14.067	26962559	1402224

Peak Results

	% Area
1	100.00

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

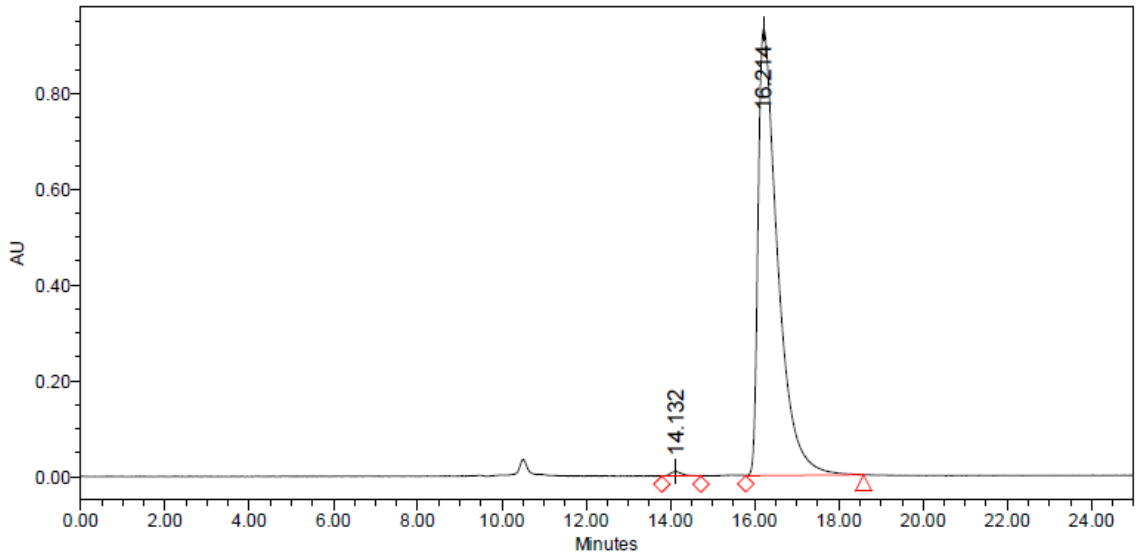
Empower 3 SOFTWARE

SON

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	4s B	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	4s Racemic IE
Vial:	3	Acq. Method Set:	Prep ISO 30% IPA_F6
Injection #:	1	Processing Method:	4s Racemic
Injection Volume:	200.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Run Time:	25.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Date Acquired:	30/06/2025 16:16:40 CEST		
Date Processed:	01/07/2025 17:04:17 CEST		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height
1		14.132	195827	9670
2		16.214	30053543	933117

Peak Results

	% Area
1	0.65

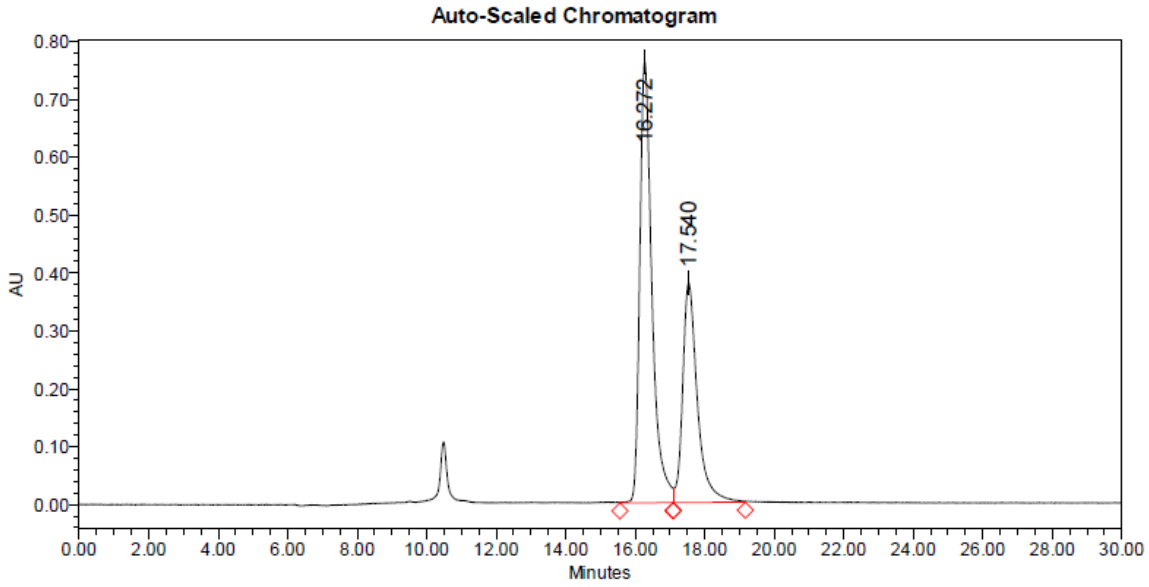
	% Area
2	99.35

Empower 3 SOFTWARE

SON

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	4ñ Racemico	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	4ñ Racemic
Vial:	1	Acq. Method Set:	Prep ISO 30% IPA_F6
Injection #:	1	Processing Method:	4ñ Racemic
Injection Volume:	200.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Date Acquired:	01/07/2025 14:12:58 CEST		
Date Processed:	01/07/2025 17:12:55 CEST		



Peak Results

	Name	RT	Area	Height
1		16.272	18502249	761624
2		17.540	11124571	379420

Peak Results

	% Area
1	62.45

	% Area
2	37.55

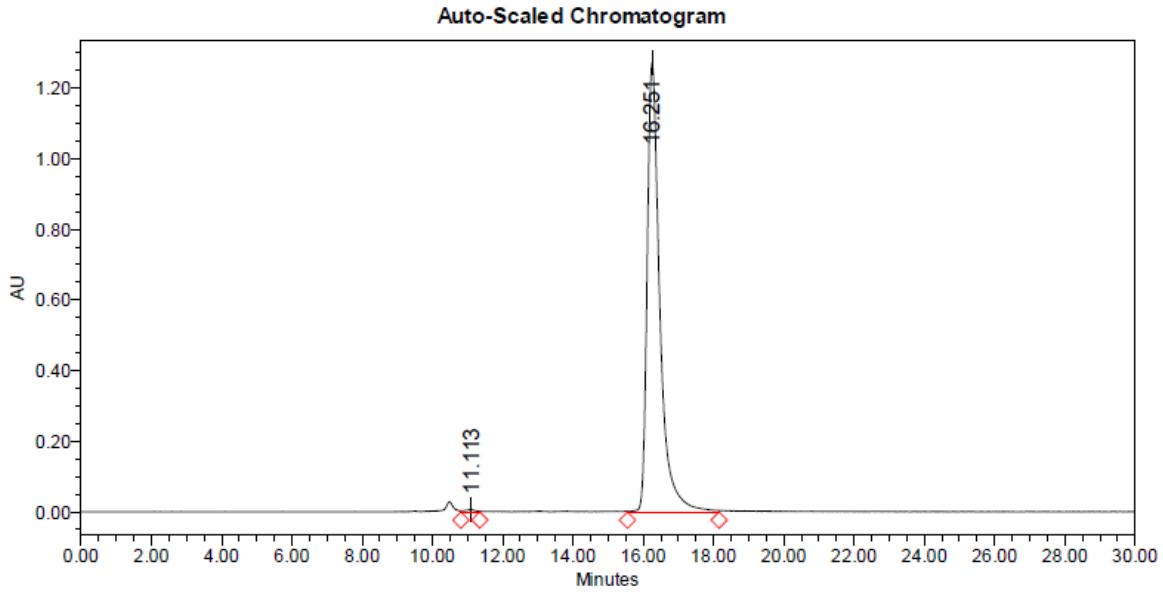
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Empower 3 SOFTWARE

SON

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	4ñ A	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	4ñ Racemic
Vial:	2	Acq. Method Set:	Prep ISO 30% IPA_F6
Injection #:	1	Processing Method:	4ñ Racemic
Injection Volume:	200.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Date Acquired:	01/07/2025 14:45:49 CEST		
Date Processed:	01/07/2025 17:08:51 CEST		



Peak Results

	Name	RT	Area	Height
1		11.113	138398	6590
2		16.251	31851636	1271952

Peak Results

	% Area
1	0.43

	% Area
2	99.57

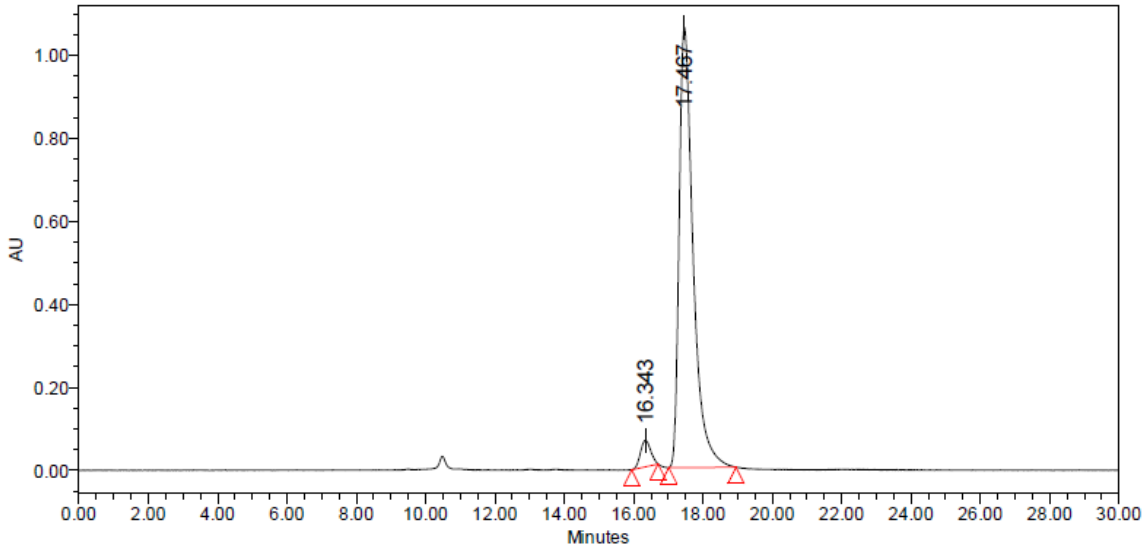
Empower 3 SOFTWARE

SON

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	4ñ B	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	4ñ Racemic
Vial:	3	Acq. Method Set:	Prep ISO 30% IPA_F6
Injection #:	1	Processing Method:	4ñb
Injection Volume:	200.00 ul	Channel Name:	254.0nm@1
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 PDA 254.0 nm (2998
Date Acquired:	01/07/2025 15:18:40 CEST		
Date Processed:	08/07/2025 13:56:34 CEST		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height
1		16.343	1301405	63722
2		17.467	29618941	1060856

Peak Results

	% Area
1	4.21

	% Area
2	95.79

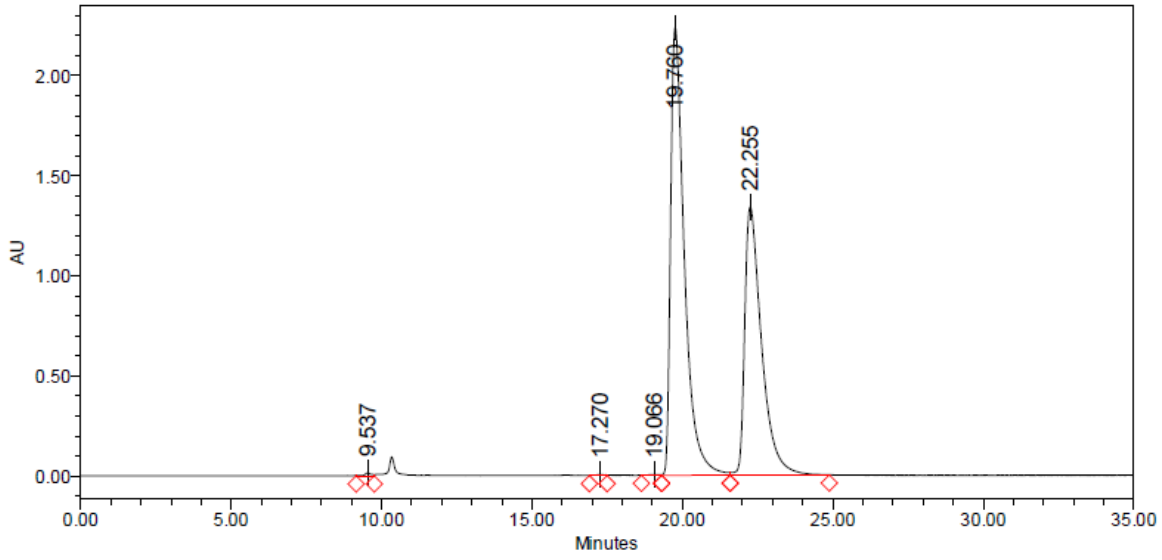
Empower 3 SOFTWARE

SON

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	5k Racemic	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	5k racemic
Vial:	1	Acq. Method Set:	Prep ISO 15% IPA_F6
Injection #:	1	Processing Method:	5k Racemic
Injection Volume:	200.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Date Acquired:	01/07/2025 11:29:52 CEST		
Date Processed:	01/07/2025 17:05:08 CEST		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height
1		9.537	197625	14011
2		17.270	80026	3527
3		19.066	102848	3769
4		19.760	71134564	2235774
5		22.255	52191316	1339637

Peak Results

	% Area
1	0.16
2	0.06
3	0.08
4	57.50
5	42.19

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

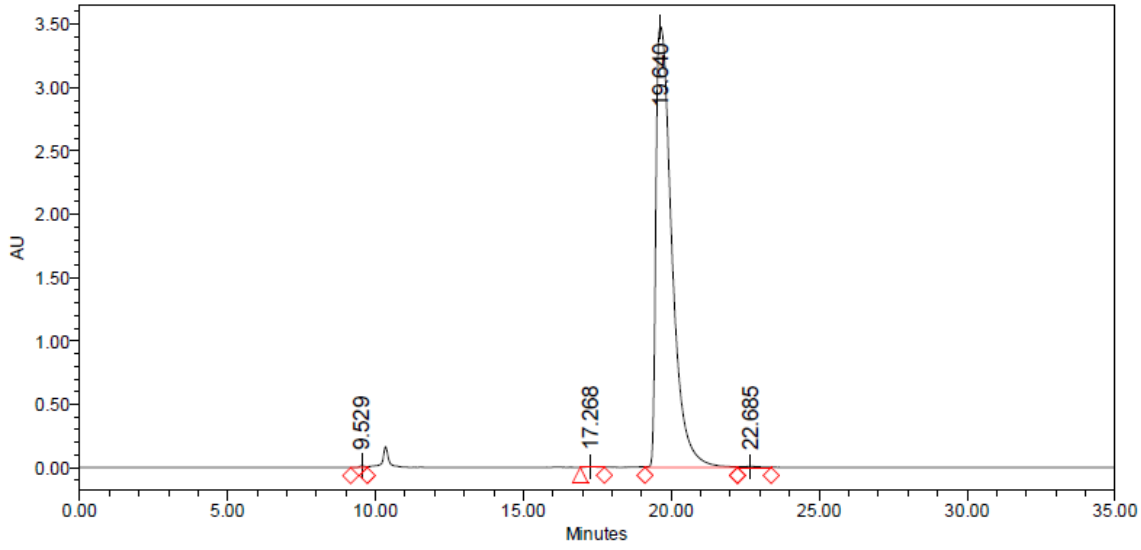
Empower 3 SOFTWARE

SON

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	5k A	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	5k racemic
Vial:	2	Acq. Method Set:	Prep ISO 15% IPA_F6
Injection #:	1	Processing Method:	5k Racemic
Injection Volume:	200.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Date Acquired:	01/07/2025 12:07:45 CEST		
Date Processed:	01/07/2025 17:05:55 CEST		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height
1		9.529	196574	14336
2		17.268	144478	5780
3		19.640	130202170	3476724
4		22.685	320336	7267

Peak Results

	% Area
1	0.15
2	0.11
3	99.49
4	0.24

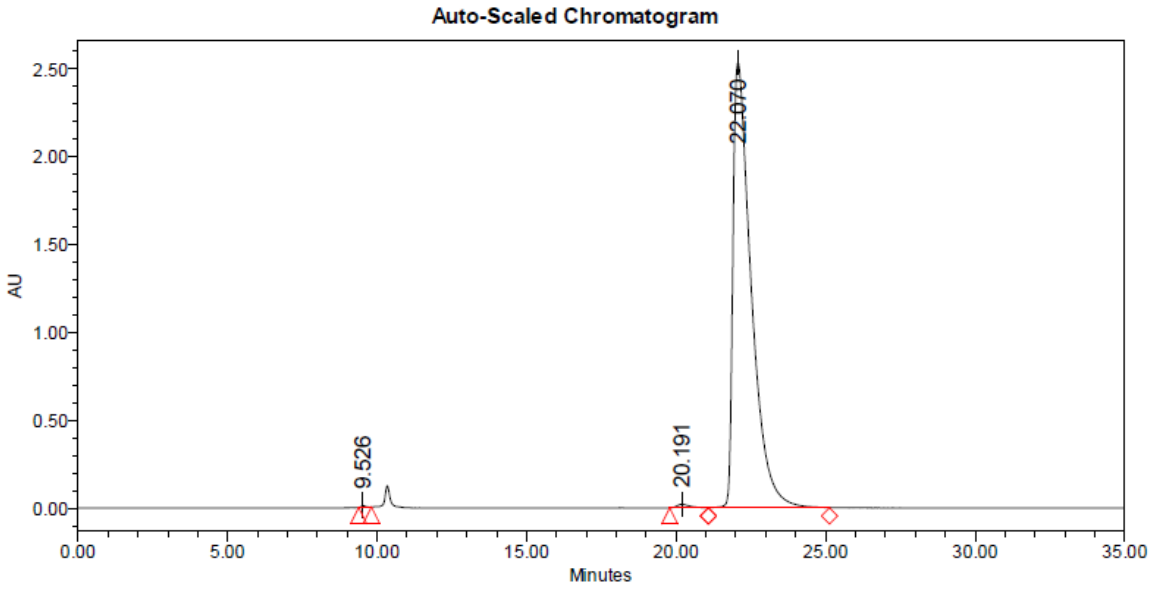
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Empower 3 SOFTWARE

SON

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	5k B	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	5k racemic
Vial:	3	Acq. Method Set:	Prep ISO 15% IPA_F6
Injection #:	1	Processing Method:	5k Racemic
Injection Volume:	200.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 254nm@4.8nm
Date Acquired:	01/07/2025 12:45:35 CEST		
Date Processed:	01/07/2025 17:06:53 CEST		



Peak Results

	Name	RT	Area	Height
1		9.526	95675	10897
2		20.191	647995	20600
3		22.070	107547257	2534775

Peak Results

	% Area
1	0.09

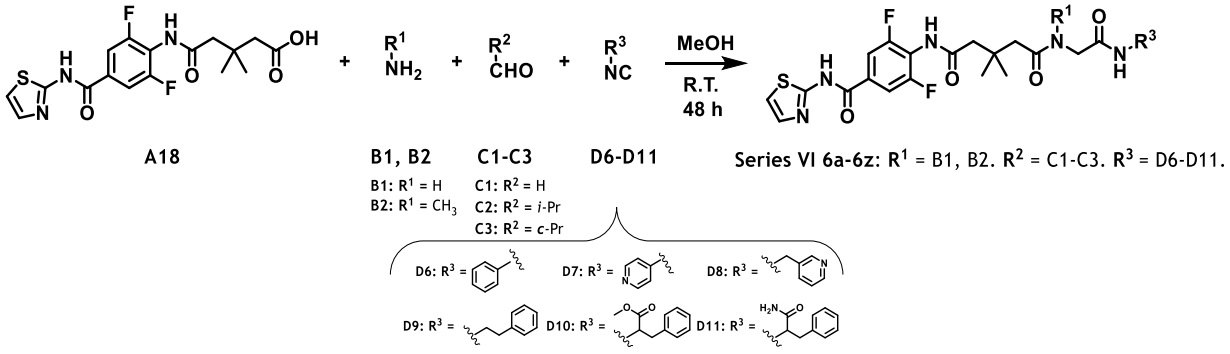
	% Area
2	0.60

	% Area
3	99.31

5.4 CHAPTER III

5.4.1 Synthesis of dual antagonist A_{2A}-A_{2B}

METHOD A. UGI-4CR (Series VI): General procedure for the synthesis of 2,6-difluoro-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide derivatives **6a-6z**.



A mixture of the carboxylic acid **A18** (1 equiv.), amine **B1**-**B2** (1.1 equiv.), aldehyde **C1**-**C3** (1.1 equiv.), and isocyanide **D6**-**D11** (1 equiv.) in MeOH (1 mL) was stirred with orbital stirring at room temperature for 48 h. Upon completion of the reaction, as indicated by TLC (DCM:MeOH, 95:5), the solvent was removed under vacuum. The obtained oily residue was purified by column chromatography on silica gel using DCM:MeOH gradient to yield the pure desired compounds **6a-6z** as white solids.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.1.1 Spectroscopic and analytical data for all compounds described

***N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethyl-*N*^{5}-(2-oxo-2-((pyridin-3-ylmethyl)amino)ethyl)pentanediamide (6a)**. Yield: 36 %. Mp: 160 – 162 ºC.^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.72 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.57 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 7.8 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 7.31-7.22 (m, 2H), 7.05 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.49 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 4.37 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.99 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.58 (s, 2H), 2.33 (s, 2H), 1.21 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{25}H_{27}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 545.17; found 545.17.

***N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{5},3,3-trimethyl-*N*^{5}-(2-oxo-2-((pyridin-3-ylmethyl)amino)ethyl)pentanediamide (6b)**. Yield: 43 %. Mp: 148 – 150 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 8.42 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.40 (dd, *J* = 4.9, 1.6 Hz, 1H), 7.78 – 7.71 (m, 3H), 7.51 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.34 (ddd, *J* = 7.9, 4.9, 0.9 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.39 (s, 2H), 4.09 (s, 2H), 3.15 (s, 3H), 2.59 (s, 2H), 2.56 (s, 2H), 1.24 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) (mixture of rotamers) δ (ppm): 171.7, 169.9, 168.6, 168.3, 162.8, 157.0 (dd, *J* = 249.3, 5.7 Hz), 148.7 and 148.5, 148.1 and 147.9, 137.1, 135.1, 134.9 and 134.7, 131.4, 123.4 and 123.3, 118.4 (t, *J* = 17.4 Hz), 114.1, 111.7 (d, *J* = 24.7 Hz), 52.6 and 50.6, 46.2 and 46.0, 41.3, 39.7, 37.3 and 34.4, 33.6 and 33.2, 27.7 and 27.5. LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{26}H_{29}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 559.60; found 559.59.

(±) *N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethyl-*N*^{5}-(3-methyl-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)butan-2-yl)pentanediamide (6c). Yield: 49 %. Mp: 156 – 158 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.71 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.65 (t, *J* = 8.8 Hz, 3H), 7.50 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.37 – 7.21 (m, 3H), 7.06 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.53 (dd, *J* = 15.1, 6.1 Hz, 1H), 4.44 – 4.32 (m, 2H), 2.66 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 2.53 – 2.28 (m, 3H), 2.21 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.15 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 0.96 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.1, 172.1, 170.5, 163.4, 159.7, 157.4 (d, *J* = 252.2 Hz), 148.6, 148.3, 137.1, 136.5, 134.4, 131.6, 124.0, 118.7, 114.4, 111.9 (d, *J* = 24.9 Hz), 59.3, 46.9, 46.5, 41.1, 34.2, 30.5, 29.5, 29.3, 19.6, 18.5. LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{28}H_{33}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 587.22; found 587.23.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(±) N^1-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-N^5,3,3-trimethyl-N^5-(3-methyl-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)butan-2-yl)pentanediamide (6d). Yield: 44 %. Mp: 190 – 192 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) (ppm): δ 12.77 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 8.66 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.51 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 8.48 – 8.38 (m, 3H), 7.88 (dd, *J* = 8.5, 3.9 Hz, 2H), 7.61 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.33 – 7.30 (m, 2H), 7.28 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.25 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.96 (s, 3H), 2.23 – 2.01 (m, 1H), 1.12 (s, 6H), 0.84 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.77 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{29}H_{35}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 601.23; found 601.22.

(±) N^1-(1-cyclopropyl-2-oxo-2-((pyridin-3-ylmethyl)amino)ethyl)-N^5-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (6e). Yield: 40 %. Mp: 187 – 189 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.77 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 8.50 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 8.43 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.66 (dt, *J* = 7.9, 2.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.37 – 7.28 (m, 2H), 4.33 (dd, *J* = 6.3, 2.2 Hz, 2H), 3.71 (dd, *J* = 9.0, 7.4 Hz, 1H), 2.49 – 2.37 (m, 2H), 2.28 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 1.08 (s, 6H), 0.48 (dd, *J* = 7.8, 2.6 Hz, 4H), 0.33 – 0.20 (m, 1H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{28}H_{31}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 585.20; found 585.19.

N^1-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethyl-N^5-(2-oxo-2-(phenethylamino)ethyl)pentanediamide (6f). Yield: 32 %. Mp: 174 – 176 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.69 (br s, 1H), 7.56 (d, $J_{H\text{-}F}$ = 7.9 Hz, 2H), 7.35 (br s, 1H), 7.28 – 7.20 (m, 7H), 6.98 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.04 (p, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.89 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 2.43 (s, 2H), 2.31 (s, 2H), 1.43 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.05 (d, *J* = 10.6 Hz, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{27}H_{30}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 558.19; found 558.19.

N^1-(2,6-Difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-N^5,3,3-trimethyl-N^5-(2-oxo-2-(phenethylamino)ethyl)pentanediamide (6g). Yield: 42 %. Mp: 147 – 149 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.43 (s, 1H, NH), 9.86 (s, 1H, NH), 7.60 (d, $J^3_{\text{H-F}}$ = 7.7 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.29 – 7.24 (m, 2H), 7.21 – 7.11 (m, 3H), 7.03 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.13 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 4.01 (s, 2H), 3.53 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.14 (s, 3H), 2.80 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.55 (s, 2H), 2.53 (s, 2H), 1.17 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.9, 170.2, 168.4, 167.5, 163.1, 157.5 (dd, *J* = 252.5, 5.3 Hz), 138.7, 136.6, 131.0, 128.9, 128.8,

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

128.8, 126.7, 119.4 (t, *J* = 16.4 Hz), 111.82 (d, *J* = 25.4 Hz), 52.5, 47.1, 40.8, 40.6, 38.2, 35.6, 35.1, 29.4. LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{28}H_{32}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 572.64; found 572.65.

(±) *N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethyl-*N*^{5}-(3-methyl-1-oxo-1-(phenethylamino)butan-2-yl)pentanediamide (6h). Yield: 48 %. Mp: 112 – 114 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 12.75 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 8.05 – 7.82 (m, 4H), 7.58 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 7.33 – 7.12 (m, 5H), 4.12 (dd, *J* = 8.7, 6.7 Hz, 1H), 2.71 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.39 (s, 2H), 2.31 (s, 4H), 2.02 – 1.83 (m, 1H), 1.08 (s, 6H), 0.81 (dd, *J* = 6.8, 4.6 Hz, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{30}H_{36}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 572.22; found 572.23.

(±) *N*^{1}-(1-cyclopropyl-2-oxo-2-(phenethylamino)ethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (6i). Yield: 42 %. Mp: 151 – 153 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.77 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 8.04 – 7.83 (m, 4H), 7.58 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.40 – 7.10 (m, 5H), 3.71 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 2.72 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.44 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H), 2.27 (s, 2H), 1.08 (s, 6H), 0.50 – 0.36 (m, 4H), 0.30 – 0.16 (m, 1H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{30}H_{34}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 598.22; found 598.21.

Methyl (5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-3,3-dimethyl-5-oxopentanoyl)glycylphenylalaninate (6j). Yield: 41 %. Mp: 135 – 136 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.63 (s, 1H), 7.55 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 7.8 Hz, 2H), 7.23 – 7.13 (m, 5H), 7.04 – 6.99 (m, 2H), 6.98 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.70 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 6.37 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.82 (dt, *J* = 7.8, 5.8 Hz, 1H), 3.96 – 3.81 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.16 – 2.98 (m, 2H), 2.46 (s, 2H), 2.31 (s, 2H), 1.07 (d, *J* = 2.6 Hz, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{29}H_{32}F_2N_5O_6S$ $[M+H]^+$ 616.20; found 616.21.

Methyl *N*-(5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-3,3-dime-thyl-5-oxopentanoyl)-*N*-methylglycylphenylalaninate (6k). Yield: 36 %. Mp: 166 – 168 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.81 (s, 1H, NH), 9.93 (s, 1H, NH), 7.58 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 7.6 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.30 – 7.16 (m, 3H), 7.09 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.87 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.11 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 3.99 (d, *J* =

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

15.2 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.22 – 3.01 (m, 5H), 2.65 – 2.46 (m, 4H), 1.16 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{30}H_{34}F_2N_5O_6S$ $[M+H]^+$ 630.68; found 630.69.

(±) Methyl (5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)amino)-3,3-dimethyl-5-oxopentanoyl)valylphenylalaninate (6l). Yield: 39 %. Mp: 157 – 159 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.72 (s, 1H), 7.56 (d, $^3J_{H-F}$ = 7.8 Hz, 2H), 7.21 – 7.13 (m, 5H), 7.02 – 6.97 (m, 2H), 6.96 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.67 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 6.36 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.81 (dt, *J* = 7.8, 5.8 Hz, 1H), 3.96 – 3.81 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.17 – 2.99 (m, 2H), 2.42 (s, 2H), 2.28 (s, 2H), 1.19 (s, 6H) 0.83 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.76 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{32}H_{38}F_2N_5O_6S$ $[M+H]^+$ 658.24; found 658.25.

(±) Methyl (2-cyclopropyl-2-(5-((2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-amino)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)acetyl)phenylalaninate (6m). Yield: 45 %. Mp: 145 – 147 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.83 (s, 1H), 7.61 (d, $^3J_{H-F}$ = 7.8 Hz, 2H), 7.26 – 7.18 (m, 5H), 7.08 – 7.01 (m, 2H), 6.99 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.69(t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.87 (dt, *J* = 7.8, 5.8 Hz, 1H), 3.99 – 3.83 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.11 – 2.99 (m, 1H), 2.40 (s, 2H), 2.26 (s, 2H), 1.15 (s, 6H) 1.03 – 0.93 (m, 1H), 0.63 - 0.57 (m, 1H), 0.47 – 0.41 (m, 1H), 0.26 (d, *J* = 3.3 Hz, 2H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{32}H_{36}F_2N_5O_6S$ $[M+H]^+$ 656.23; found 656.23.

***N*^{1}-(2-((1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (6n)**. Yield: 33 %. Mp: 197 – 199 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.86 (d, $^3J_{H-F}$ = 7.5 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.33 – 7.12 (m, 3H), 7.07 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.01 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.92 (qt, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.19 (s, 1H), 4.01 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 3.22 – 3.01 (m, 2H), 2.72 – 2.48 (m, 4H), 1.17 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{28}H_{31}F_2N_6O_5S$ $[M+H]^+$ 601.20; found 601.20.

***N*^{1}-(2-((1-Amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{1},3,3-trimethylpentanediamide (6ñ)**. Yield: 37 %. Mp: 178 – 180 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.68 (d, J^3_{H-F} = 7.6 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.30 – 7.16 (m, 3H), 7.09 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* =

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.9 Hz, 1H), 4.87 (qt, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.11 (s, 1H), 3.99 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 3.22 – 3.01 (m, 5H), 2.65 – 2.46 (m, 4H), 1.16 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{29}H_{33}F_2N_6O_5S$ $[M+H]^+$ 615.67; found 615.66.

(±) *N*^{1}-(1-((1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-3-methyl-1-oxobutan-2yl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (6o). Yield: 47 %. Mp: 156 – 158 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 8.02 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 7.5 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.35 – 7.15 (m, 4H), 6.98 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.95 (qt, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.15 (s, 1H), 4.00 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 3.15 – 2.99 (m, 2H), 2.69 – 2.52 (m, 4H), 1.17 (s, 6H), 1.04 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.6 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{31}H_{37}F_2N_6O_5S$ $[M+H]^+$ 643.24; found 643.23.

(±) *N*^{1}-(2-((1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-cyclopropyl-2-oxoethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (6p). Yield: 44 %. Mp: 165 – 167 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.90 (d, $^3J_{H\text{-}F}$ = 7.5 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.35 – 7.11 (m, 4H), 7.06 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.89 (qt, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.15 (s, 1H), 4.00 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 3.19 – 3.01 (m, 2H), 2.75 – 2.50 (m, 4H), 1.18 (s, 6H), 0.70 – 0.62 (m, 1H), 0.61 – 0.56 (m, 1H), 0.50 (dq, *J* = 10.2, 5.1 Hz, 1H), 0.43 (dq, *J* = 9.7, 4.9 Hz, 1H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{25}H_{31}F_2N_6O_5S$ $[M+H]^+$ 565.60; found 565.61.

***N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethyl-*N*^{5}-(2-oxo-2-(phenylamino)ethyl)pentanediamide (6q)**. Yield: 37 %. Mp: 179 – 181 ºC. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.41 (br s, 1H), 8.01 (br s, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H), 7.36 (br s, 1H), 7.24 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.08 – 7.02 (m, 2H), 6.99 (s, 1H), 4.05 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.50 (s, 2H), 2.37 (s, 2H), 1.11 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{25}H_{26}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 530.16; found 530.16.

***N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{5},3,3-trimethyl-*N*^{5}-(2-oxo-2-(phenylamino)ethyl)pentanediamide (6r)**. Yield: 32 %. Mp: 122 – 124 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.91 (br s, 1H, NH), 9.67 (s, 1H, NH), 8.21 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.38 (s, 1H), 7.34 – 7.22 (m, 2H), 7.10 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 7.03

USC SANTIAGO DE COMPOSTELA

(s, 1H), 4.21 (s, 2H), 3.28 (s, 3H), 2.64 (s, 4H), 1.22 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{26}H_{28}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 544.59; found 544.60.

(±) *N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethyl-*N*^{5}-(3-methyl-1-oxo-1-(phenylamino)butan-2-yl)pentanediamide (6s). Yield: 28 %. Mp: 138 – 140 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.71 (s, 1H), 9.87 (d, *J* = 15.1 Hz, 2H), 7.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.66 – 7.52 (m, 3H), 7.32 – 7.17 (m, 3H), 7.01 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.85 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 2.70 (s, 2H), 2.63 (s, 2H), 2.20 (dt, *J* = 11.7, 6.2 Hz, 1H), 1.17 (s, 6H), 0.90 (dd, *J* = 33.0, 6.7 Hz, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{28}H_{32}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 572.21; found 572.20.

(±) *N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{5},3,3-trimethyl-*N*^{5}-(3-methyl-1-oxo-1-(phenylamino)butan-2-yl)pentanediamide (6t). Yield: 35 %. Mp: 170 – 172 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.74 (s, 1H), 9.95 (d, *J* = 15.2 Hz, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.64 – 7.50 (m, 3H), 7.34 – 7.21 (m, 3H), 7.04 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.88 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 3.06 (s, 3H), 2.65 (s, 2H), 2.60 (s, 2H), 2.20 (dt, *J* = 11.5, 6.3 Hz, 1H), 1.14 (s, 6H), 0.88 (dd, *J* = 32.9, 6.7 Hz, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{29}H_{34}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 586.22; found 586.22.

(±) *N*^{1}-(1-cyclopropyl-2-oxo-2-(phenylamino)ethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (6u). Yield: 48 %. Mp: 181 – 183 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 10.13 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.42 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.64 – 7.59 (m, 2H), 7.58 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.38 – 7.24 (m, 3H), 7.05 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.87 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 2.46 – 2.38 (m, 2H), 2.30 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 1.09 (s, 6H), 0.63 – 0.55 (m, 2H), 0.55 – 0.44 (m, 2H), 0.38 – 0.26 (m, 1H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{28}H_{30}F_2N_5O_4S$ $[M+H]^+$ 570.63; found 570.64.

***N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethyl-*N*^{5}-(2-oxo-2-(pyridin-4-ylamino)ethyl)pentanediamide (6v)**. Yield: 29 %. Mp: 139 – 141 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 8.41 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.67 – 7.58 (m, 2H), 7.47 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.31 (s, 2H), 2.68 (s, 2H), 2.62 (s, 2H), 1.17 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{24}H_{25}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 531.16; found 531.17.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

***N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{5},3,3-trimethyl-*N*^{5}-(2-oxo-2-(pyridin-4-ylamino)ethyl)pentanediamide (6w)**. Yield: 38 %. Mp: 145 – 147 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 8.35 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.67 – 7.58 (m, 2H), 7.50 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.25 (s, 2H), 3.22 (s, 3H), 2.67 (s, 2H), 2.61 (s, 2H), 1.27 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{25}H_{27}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 545.58; found 545.59.

(±) *N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethyl-*N*^{5}-(3-methyl-1-oxo-1-(pyridin-4-ylamino)butan-2-yl)pentanediamide (6x). Yield: 37 %. Mp: 173 – 175 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.73 (s, 1H), 10.44 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 8.42 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 8.23 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.58 (dd, *J* = 4.9, 3.0 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 2.68 (s, 2H), 2.63 (s, 2H), 2.06 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.09 (s, 6H), 0.92 (dd, *J* = 6.8, 2.5 Hz, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{27}H_{30}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 572.20; found 572.21.

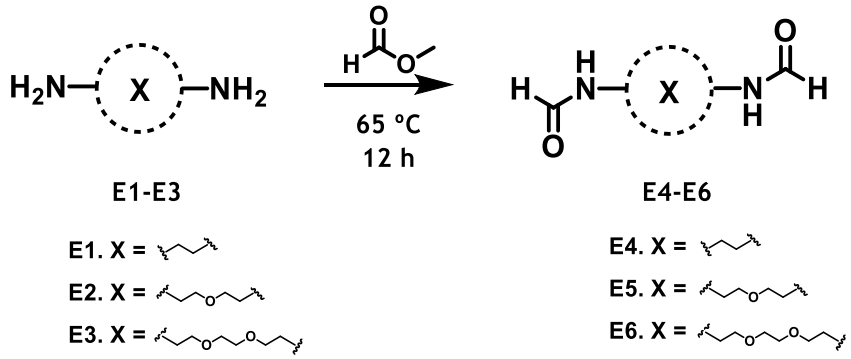
(±) *N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{5},3,3-trimethyl-*N*^{5}-(3-methyl-1-oxo-1-(pyridin-4-ylamino)butan-2-yl)pentanediamide (6y). Yield: 31 %. Mp: 132 – 134 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.74 (s, 1H), 10.38 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.39 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.64 – 7.47 (m, 3H), 7.31 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.89 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 3.04 (s, 3H), 2.70 (s, 2H), 2.65 (s, 2H), 2.21 (dq, *J* = 11.3, 6.5 Hz, 1H), 1.14 (s, 6H), 0.93 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.83 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{28}H_{33}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 586.22; found 586.23.

(±) *N*^{1}-(1-cyclopropyl-2-oxo-2-(pyridin-4-ylamino)ethyl)-*N*^{5}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-3,3-dimethylpentanediamide (6z). Yield: 39 %. Mp: 169 – 171 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 12.21 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 8.20 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.54 – 7.51 (m, 3H), 7.25 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.77 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 2.70 (s, 2H), 2.65 (s, 2H), 2.21 (dq, *J* = 11.3, 6.5 Hz, 1H), 1.14 (s, 6H), 0.85 (m, 1H), 0.66 (m, 1H), 0.52 (dq, *J* = 9.9, 4.9 Hz, 1H), 0.31 (m, 1H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{27}H_{29}F_2N_6O_4S$ $[M+H]^+$ 571.19; found 571.21.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.2 Synthesis of key precursors for dual antagonist A_{2A}-PARP1

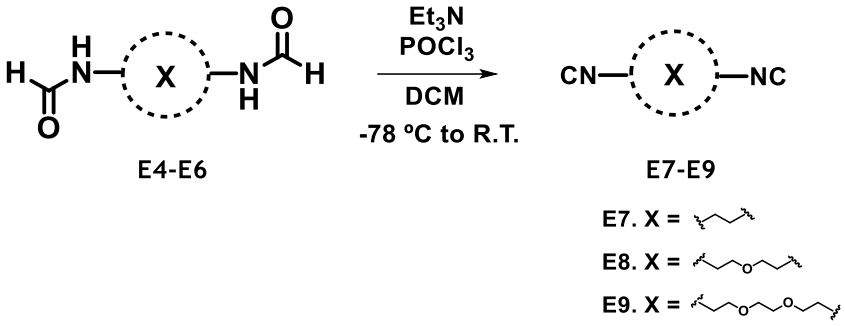
Step I. General procedure for the synthesis of bis-formamides **E4-E6**.



In a round-bottomed flask, 75 mL of ethyl formiate was charged, and the corresponding diamine **E1-E3** was added. The reaction mixture was stirred at 65 ºC for 12 hours. Upon completion of the reaction, the desired product precipitated. The solvent was removed under vacuum, and the solid was resuspended in ethyl ether and washed twice. After filtration under vacuum, the resulting products **E4-E6** were yield as white solids and used in the next step without further purification.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Step II. General procedure for the synthesis of bis-isocyanides **E7-E9**.



To a solution of the corresponding bis-formamide **E4-E6** (1 equiv.) in DCM (30 mL), under an argon atmosphere, Et_3N (8 equiv.) was added. The solution was then cooled to -78 ºC, and a solution of $POCl_3$ (3 equiv.) in DCM (5 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Upon completion of the reaction, as indicated by TLC (DCM:MeOH, 99:1), the mixture was quenched with an aqueous saturated solution of $NaHCO_3$ (25 mL). The aqueous phase was extracted with DCM (2 x 25 mL), and the combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over Na_2SO_4, filtered, and concentrated under reduced pressure. The obtained oily residues were purified by column chromatography on silica gel using DCM to yield the pure desired compounds **E7-E9** as brown oils.

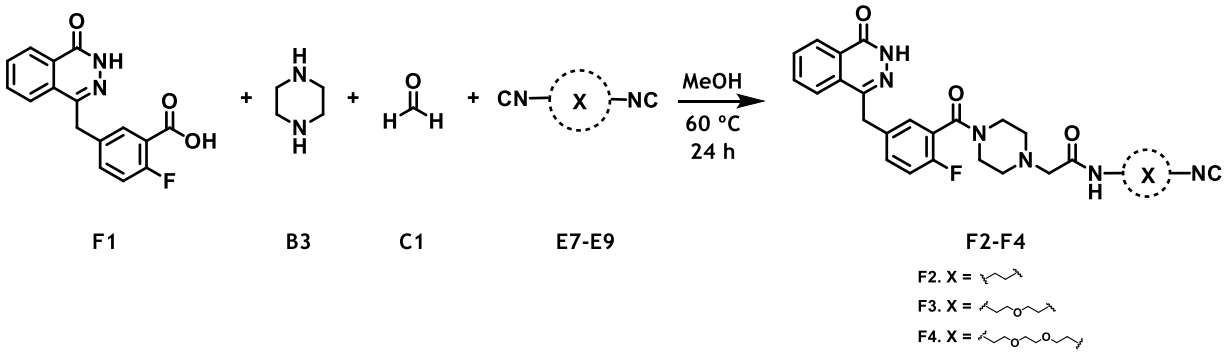
1,2-diisocyanoethane (E7). Yield: 74 %. Oil at RT. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3.72 (s, 4H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_4H_5N_2$ [M+H]+ 81.03; found 81.04.

1-isocyano-2-(2-isocyanoethoxy)ethane (E8). Yield: 81 %. Oil at RT. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3.85 – 3.70 (m, 4H), 3.69 – 3.55 (m, 4H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_6H_9N_2O$ $[M+H]^+$ 125.06; found 125.07.

1,2-bis(2-isocyanoethoxy)ethane (E9). Yield: 85 %. Oil at RT. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3.81 – 3.66 (m, 8H), 3.64 – 3.54 (m, 4H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_8H_{13}N_2O_2$ $[M+H]^+$ 169.09; found 169.08.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Step III. General procedure for the synthesis of isocyanides used as key precursors **F2-F4**. **METHOD B. UGI-SPLIT**.



A mixture of carboxylic acid **F1** (0.33 equiv.), piperazine (**B3**, 0.33 equiv.), formaldehyde (**C1**, 0.33 equiv.) and the corresponding isocyanide **E7-E9** (1 equiv.) in MeOH (2 mL), was stirred with orbital stirring at 60 ºC for 24 h. Upon completion of the reaction, as indicated by TLC (DCM:MeOH, 95:5), the solvent was removed under vacuum. The obtained oily residue was purified by column chromatography on silica gel using DCM:MeOH gradient to yield the pure desired compounds **F2-F4** as pale-yellow solids.

2-(4-(2-Fluoro-5-((4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)methyl)benzoyl)piperazin-1-yl)-*N*-(2-isocyanoethyl)acetamide (F2). Yield: 79 %. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.54 (s, 1H), 8.50 – 8.43 (m, 1H), 7.81 – 7.69 (m, 3H), 7.60 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 7.33 – 7.27 (m, 2H), 7.02 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.28 (s, 2H), 3.84 (br s, 2H), 3.63 – 3.48 (m, 4H), 3.36 (br s, 2H), 3.09 (s, 2H), 2.65 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 2.50 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{25}H_{26}FN_6O_3$ $[M+H]^+$ 477.20; found 477.19.

2-(4-(2-Fluoro-5-((4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)methyl)benzoyl)piperazin-1-yl)-*N*-(2-(2-isocyanoethoxy)ethyl)acetamide (F3). Yield: 73 %. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.04 (s, 1H), 8.52 – 8.43 (m, 1H), 7.82 – 7.68 (m, 3H), 7.41 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.34 – 7.27 (m, 2H), 7.02 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.27 (s, 2H), 3.83 (br s, 2H), 3.69 – 3.46 (m, 8H), 3.35 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.07 (s, 2H), 2.61 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.48 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{27}H_{30}FN_6O_4$ $[M+H]^+$ 521.22; found 521.21.

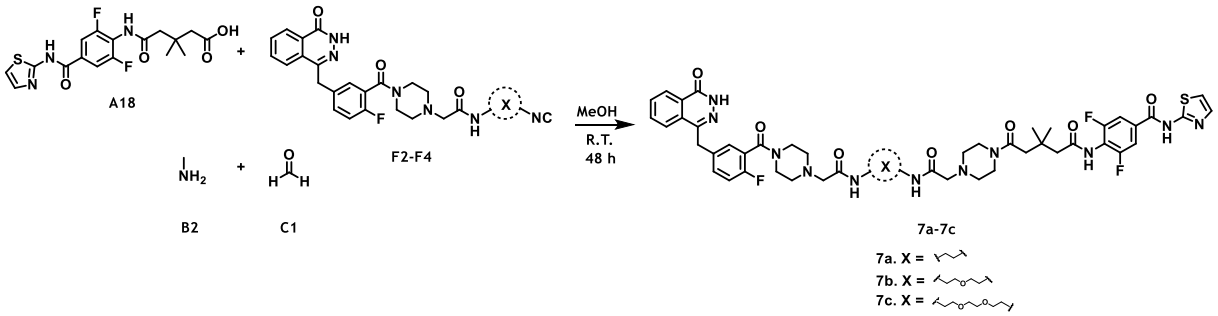
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2-(4-(2-Fluoro-5-((4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)methyl)benzoyl)piperazin-1-yl)-*N*-(2-(2-(2-isocyanoethoxy)ethoxy)ethyl)acetamide (F4). Yield: 69 %. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.39 (s, 1H), 8.53 – 8.41 (m, 1H), 7.83 – 7.67 (m, 3H), 7.42 – 7.29 (m, 3H), 7.03 (t, J = 8.7 Hz, 1H), 4.28 (s, 2H), 3.82 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.74 – 3.45 (m, 12H), 3.34 (br s, 2H), 3.06 (s, 2H), 2.60 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 2.48 (br s, J = 5.2 Hz, 2H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{28}H_{32}FN_6O_5$ $[M+H]^+$ 551.23; found 551.24.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.3 Synthesis of dual antagonist A_{2A}-PARP1

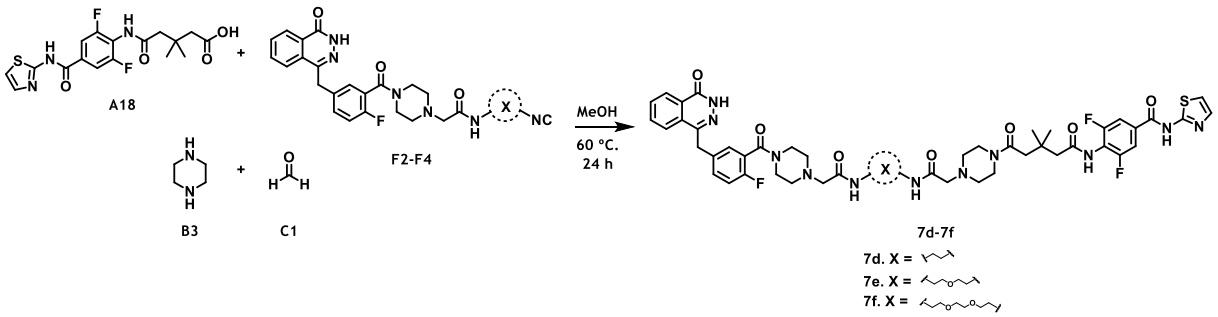
METHOD A. UGI-4CR (Series VIIa). General procedure for the synthesis of compounds **7a-7c**.



A mixture of the carboxylic acid **A18** (1 equiv.), methylamine (**B2**, 1.2 equiv.), formaldehyde (**C1**, 1.2 equiv.), and the corresponding isocyanide **F2-F4** (1 equiv.) in MeOH (1 mL) was stirred with orbital stirring at room temperature for 48 h. Upon completion of the reaction, as indicated by TLC (DCM:MeOH, 96:4), the solvent was removed under vacuum. The obtained oily residue was purified by column chromatography on silica gel using DCM:MeOH gradient to yield the pure desired compounds **7a-7c** as white solids.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

METHOD B. UGI-SPLIT (Series VIIb). General procedure for the synthesis of compounds **7d-7f**.



A mixture of the carboxylic acid **A18** (1 equiv.), piperazine (**B3**, 1.2 equiv.), formaldehyde (**C1**, 1.2 equiv.), and the corresponding isocyanide **F2-4** (1 equiv.) in MeOH (1 mL) was stirred with orbital stirring at 60 ºC for 24 h. Upon completion of the reaction, as indicated by TLC (DCM:MeOH, 92:8), the solvent was removed under vacuum. The obtained oily residue was purified by column chromatography on silica gel using DCM:MeOH gradient to yield the pure desired compounds **7d-7f** as white solids.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.3.1 Spectroscopic and analytical data for all compounds described

***N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{5}-(2-((2-(2-(4-(2-fluoro-5-((4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)methyl)benzoyl)piperazin-1-yl)acetamido)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-*N*^{5},3,3-trimethylpentanediamide (7a).** Yield: 45 %. Mp: 137 – 139 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.13 (br s, 1H), 11.77 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 8.47 (dd, *J* = 6.1, 3.3 Hz, 1H), 7.85 – 7.64 (m, 6H), 7.55 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.41 – 7.30 (m, 2H), 7.18 – 6.99 (m, 3H), 4.28 (s, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.74 (br s, 2H), 3.35 (t, *J* = 2.7 Hz, 4H), 3.17 (m, 2H), 3.13 (s, 3H), 2.99 (s, 2H), 2.71 – 2.43 (m, 6H), 2.21 (br s, 2H), 1.22 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{44}H_{48}F_3N_{10}O_7S$ $[M+H]^+$ 917.98; found 917.99.

***N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{5}-(2-((2-(2-(2-(4-(2-fluoro-5-((4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)methyl)benzoyl)piperazin-1-yl)acetamido)ethoxy)ethyl)-amino)-2-oxoethyl)-*N*^{5},3,3-trimethylpentanediamide (7b).** Yield: 49 %. Mp: 124 – 126 ºC. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.21 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 8.48 (m, 1H), 7.93 – 7.61 (m, 6H), 7.56 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.34 (m, 2H), 7.11 – 6.98 (m, 3H), 6.82 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 4.26 (s, 2H), 4.08 (s, 2H), 3.73 (br s, 2H), 3.60 – 3.31 (m, 8H), 3.22 (s, 3H), 3.07 (m, 4H), 2.57 (m, 6H), 2.27 (br s, 2H), 1.22 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{46}H_{52}F_3N_{10}O_8S$ $[M+H]^+$ 962.03; found 962.02.

***N*^{1}-(2,6-difluoro-4-(thiazol-2-ylcarbamoyl)phenyl)-*N*^{5}-(14-(4-(2-fluoro-5-((4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)methyl)benzoyl)piperazin-1-yl)-2,13-dioxo-6,9-dioxa-3,12-diaza-tetradecyl)-*N*^{5},3,3-trimethylpentanediamide (7c).** Yield: 51 %. Mp: 125 – 127 ºC ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.29 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 8.45 (dd, *J* = 6.2, 3.0 Hz, 1H), 7.88 – 7.62 (m, 5H), 7.51 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.36 – 7.28 (m, 2H), 7.14 (dd, *J* = 6.2, 2.4 Hz, 1H), 7.06 – 6.98 (m, 2H), 6.93 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.25 (s, 2H), 4.08 (s, 2H), 3.83 – 3.67 (br s, 2H), 3.57 – 3.32 (m, 12H), 3.20 (s, 5H), 3.07 – 2.99 (m, 2H), 2.67 – 2.46 (m, 6H), 2.31 (br s, 2H), 1.21 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.8, 170.4, 170.3, 168.7, 165.2, 163.2, 161.3, 160.2, 157.5 (dd, *J* = 251.1, 5.7 Hz), 157.2 (d, *J* = 248 Hz), 146.0, 137.0 (ArH), 134.4 (d, *J* = 3.6 Hz), 133.8 (ArH), 131.8 (ArH), 131.7 (d, *J* = 8.3 Hz, ArH), 131.4 (t, *J* = 9.0 Hz), 129.6, 129.0 (ArH), 128.2, 127.1 (ArH), 125.2 (ArH), 123.9 (d, *J* = 18.2 Hz, C), 118.8 (t, *J* = 16.9 Hz, C), 116.4 (d, *J* = 21.4 Hz, ArH), 113.9 (ArH), 112.0 (d, *J* = 23.2 Hz, ArH),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

69.9 (CH_2O), 69.4 (CH_2O), 61.4 (CH_2), 53.4, 53.1, 52.2, 47.0, 46.9, 42.0, 41.0, 39.3, 38.8, 38.4 (NMe), 37.7 (CH_2Ph), 35.0 (C), 29.5 (2xCH_3). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{48}H_{56}F_3N_{10}O_9S$ $[M+H]^+$ 1005.38; found 1005.38.

3,5-difluoro-4-(5-(4-(2-((2-(2-(4-(2-fluoro-5-((4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)methyl)benzoyl)piperazin-1-yl)acetamido)ethyl)amino)-2-oxoethyl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (7d). Yield: 52 %. Mp: 114 – 116 ºC. ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.12 (s, 1H), 11.81 (br s, 1H), 9.69 (s, 1H), 8.54 – 8.45 (m, 1H), 7.90 – 7.67 (m, 5H), 7.57 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.53 – 7.33 (m, 2H), 7.26 – 7.18 (m, 2H), 7.10 – 6.99 (m, 2H), 4.31 (s, 2H), 3.86 – 3.58 (m, 6H), 3.45 (t, *J* = 2.7 Hz, 4H), 3.25 (s, 2H), 2.98 (d, *J* = 9.2 Hz, 4H), 2.68 – 2.25 (m, 12H), 1.17 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{47}H_{53}F_3N_{11}O_7S$ $[M+H]^+$ 973.06; found 973.05.

3,5-difluoro-4-(5-(4-(2-((2-(2-(2-(4-(2-fluoro-5-((4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)methyl)benzoyl)piperazin-1-yl)acetamido)ethoxy)ethyl)amino)-2-oxoethyl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (7e) Yield: 47 %. Mp: 167 – 169 ºC ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.18 (s, 1H), 11.89 (br s, 1H), 9.83 (s, 1H), 8.49 (m, 1H), 7.93 – 7.66 (m, 5H), 7.56 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.42 – 7.13 (m, 4H), 7.11 – 6.98 (m, 2H), 4.29 (s, 2H), 3.82 – 3.42 (m, 12H), 3.20 (br s, 2H), 3.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H), 2.67 – 2.48 (m, 12H), 2.36 (br s, 2H), 1.18 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{49}H_{57}F_3N_{11}O_8S$ $[M+H]^+$ 1017.11; found 1017.11.

3,5-difluoro-4-(5-(4-(14-(4-(2-fluoro-5-((4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)methyl)-benzoyl)piperazin-1-yl)-2,13-dioxo-6,9-dioxa-3,12-diazatetradecyl)piperazin-1-yl)-3,3-dimethyl-5-oxopentanamido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (7f). Yield: 45 %. Mp: 155 – 157 ºC ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.11 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 8.49 (dd, *J* = 6.1, 3.3 Hz, 1H), 7.86 – 7.59 (m, 5H), 7.55 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.41 –7.16 (m, 4H), 7.10 – 6.95 (m, 2H), 4.29 (s, 2H), 3.84 – 3.41 (m, 16H), 3.22 (br s, 2H), 3.04 (d, *J* = 13.0 Hz, 4H), 2.58 (d, *J* = 10.5 Hz, 12H), 2.37 (br s, 2H), 1.16 (s, 6H). LRMS (CI) *m/z* calcd for $C_{51}H_{61}F_3N_{11}O_9S$ $[M+H]^+$ 1060.42; found 1060.43.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6 REFERENCIAS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

(1) Drury, A. N.; Szent-Györgyi, A. The Physiological Activity of Adenine Compounds with Especial Reference to Their Action upon the Mammalian Heart1. *J. Physiol.* **1929**, *68*, 213–237.

(2) Holton, P. The Liberation of Adenosine Triphosphate on Antidromic Stimulation of Sensory Nerves. *J. Physiol.* **1959**, *145*, 494–504.

(3) Burnstock G. Purinergic Nerves. *Pharmacol. Rev.* **1972**, *24*, 509–581.

(4) Burnstock, G. The Use Of The Slowly Degradable Analog, α,β-Methylene ATP, To Produce Desentitation Of The P2-Purinoceptor: Effect On Non-Adrenergic, Non-Cholinergic Responses Of The Guinea-Pig Urinary Bladder. *Eur. J. Pharmacol.* **1983**, *86*, 291–297.

(5) Daly JW. Adenosine Receptors. *Adv Cycl. Nucleotide Protein Phosphorylation Res* **1985**, *19*, 29–46.

(6) Webb, T. E.; Simon, J.; Krishek, B. J.; Bateson, A. N.; Smart, T. G.; King, B. F.; Burnstock, G.; Barnard, E. A. Cloning and Functional Expression of a Brain G-protein-coupled ATP Receptor. *FEBS Lett.* **1993**, *324*, 219–225.

(7) Fredholm, B. B.; Ijzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K.-N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53* (4), 527–552.

(8) Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63* (1), 1–34.

(9) Huang, Z.; Xie, N.; Illes, P.; Di Virgilio, F.; Ulrich, H.; Semyanov, A.; Verkhratsky, A.; Sperlagh, B.; Yu, S.-G.; Huang, C.; Tang, Y. From Purines to Purinergic Signalling: Molecular Functions and Human Diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 162.

(10) Layland, J.; Carrick, D.; Lee, M.; Oldroyd, K.; Berry, C. Adenosine. *JACC Cardiovasc. Interv.* **2014**, *7*, 581–591.

(11) Blackburn, M. R.; Vance, C. O.; Morschl, E.; Wilson, C. N. Adenosine Receptors and Inflammation. In *Adenosine Receptors in Health and Disease*; Wilson, C. N., Mustafa, S. J., Eds.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2009; Vol. 193, pp 215–269.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(12) Vincenzi, F.; Pasquini, S.; Contri, C.; Cappello, M.; Nigro, M.; Travagli, A.; Merighi, S.; Gessi, S.; Borea, P. A.; Varani, K. Pharmacology of Adenosine Receptors: Recent Advancements. Biomolecules **2023**, *13*, 1387.

(13) Effendi, W. I.; Nagano, T.; Kobayashi, K.; Nishimura, Y. Focusing on Adenosine Receptors as a Potential Targeted Therapy in Human Diseases. *Cells* **2020**, *9*, 785–802.

(14) Hermes, M.; Von Hippel, S.; Osswald, H.; Kloor, D. S-Adenosylhomocysteine Metabolism in Different Cell Lines: Effect of Hypoxia and Cell Density. *Cell. Physiol. Biochem.* **2005**, *15*, 233–244.

(15) Broch, O. J.; Ueland, P. M. Regional and Subcellular Distribution of *S* -Adenosylhomocysteine Hydrolase in the Adult Rat Brain. *J. Neurochem.* **1980**, *35*, 484–488.

(16) Vizán, P.; Di Croce, L.; Aranda, S. Functional and Pathological Roles of AHCY. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 654344–654360.

(17) Spychala, J.; Datta, N. S.; Takabayashi, K.; Datta, M.; Fox, I. H.; Gribbin, T.; Mitchell, B. S. Cloning of Human Adenosine Kinase cDNA: Sequence Similarity to Microbial Ribokinases and Fructokinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 1232–1237.

(18) Blackburn, M. R.; Kellems, R. E. Regulation and Function of Adenosine Deaminase in Mice. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2005**, *79*, 1–37.

(19) Beal, P. R.; Yao, S. Y. M.; Baldwin, S. A.; Young, J. D.; King, A. E.; Cass, C. E. The Equilibrative Nucleoside Transporter Family, SLC29. *Pflögers Arch. Eur. J. Physiol.* **2004**, *447*, 735–743.

(20) Gray, J. H.; Owen, R. P.; Giacomini, K. M. The Concentrative Nucleoside Transporter Family, SLC28. *Pflögers Arch. Eur. J. Physiol.* **2004**, *447*, 728–734.

(21) Kirley, T. L.; Crawford, P. A.; Smith, T. M. The Structure of the Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases (NTPDases) as Revealed by Mutagenic and Computational Modeling Analyses. *Purinergic Signal.* **2006**, *2* (4), 379–389.

(22) Huang, Y.; Gu, Z.; Fan, Y.; Zhai, G.; Zhao, X.; Sun, Q.; Shi, Y.; Lin, G. Inhibition of the Adenosinergic Pathway: The Indispensable Part of Oncological Therapy in the Future. *Purinergic Signal.* **2019**, *15*, 53–67.

(23) Resta, R.; Yamashita, Y.; Thompson, L. F. Ecto-enzyme and Signaling Functions of Lymphocyte CD 7 3. *Immunol. Rev.* **1998**, *161*, 95–109.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(24) Colgan, S. P.; Eltzschig, H. K.; Eckle, T.; Thompson, L. F. Physiological Roles for Ecto-5'-Nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.* **2006**, *2*, 351–360.

(25) Zhang, B. CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 6407–6411.

(26) Boison, D.; Yegutkin, G. G. Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. *Cancer Cell* **2019**, *36*, 582–596.

(27) Hashikawa, T.; Hooker, S. W.; Maj, J. G.; Knott-Craig, C. J.; Takedachi, M.; Murakami, S.; Thompson, L. F. Regulation of Adenosine Receptor Engagement by Ecto-adenosine Deaminase. *FASEB J.* **2004**, *18*, 131–133.

(28) PubMed https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/ (accessed 2024 -10 -01).

(29) Borea, P. A.; Gessi, S.; Merighi, S.; Vincenzi, F.; Varani, K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 1591–1625.

(30) Stockwell, J.; Jakova, E.; Cayabyab, F. Adenosine A_1 and A_{2A} Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. *Molecules* **2017**, *22* (5), 676–693.

(31) Sawynok, J. Adenosine Receptor Targets for Pain. *Neuroscience* **2016**, *338*, 1–18.

(32) Stenberg, D.; Litonius, E.; Halldner, L.; Johansson, B.; Fredholm, B. B.; Porkka-Heiskanen, T. Sleep and Its Homeostatic Regulation in Mice Lacking the Adenosine A_1 Receptor. *J. Sleep Res.* **2003**, *12*, 283–290.

(33) Porkka-Heiskanen, T.; Strecker, R. E.; Thakkar, M.; Bjørkum, A. A.; Greene, R. W.; McCarley, R. W. Adenosine: A Mediator of the Sleep-Inducing Effects of Prolonged Wakefulness. *Science* **1997**, *276*, 1265–1268.

(34) Prystowsky, E. N.; Niazi, I.; Curtis, A. B.; Wilber, D. J.; Bahnson, T.; Ellenbogen, K.; Dhala, A.; Bloomfield, D. M.; Gold, M.; Kadish, A.; Fogel, R. I.; Gonzalez, M. D.; Belardinelli, L.; Shreeniwas, R.; Wolff, A. A. Termination of Paroxysmal Supraventricular Tachycardia by Tecadenoson (CVT-510),a Novel A1-Adenosine Receptor Agonist. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2003**, *42*, 1098–1102.

(35) Vallon, V.; Mühlbauer, B.; Osswald, H. Adenosine and Kidney Function. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 901–940.

(36) Vallon, V.; Miracle, C.; Thomson, S. Adenosine and Kidney Function: Potential Implications in Patients with Heart Failure. *Eur. J. Heart Fail.* **2008**, *10*, 176–187.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(37) Rabadi, M. M.; Lee, H. T. Adenosine Receptors and Renal Ischaemia Reperfusion Injury. *Acta Physiol.* **2015**, *213*, 222–231.

(38) Dhalla, A. K.; Chisholm, J. W.; Reaven, G. M.; Belardinelli, L. A_1 Adenosine Receptor: Role in Diabetes and Obesity. In *Adenosine Receptors in Health and Disease*; Wilson, C. N., Mustafa, S. J., Eds.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2009; Vol. 193, pp 271–295.

(39) Kara, F. M.; Chitu, V.; Sloane, J.; Axelrod, M.; Fredholm, B. B.; Stanley, E. R.; Cronstein, B. N. Adenosine A_1 Receptors (A_1Rs) Play a Critical Role in Osteoclast Formation and Function. *FASEB J.* **2010**, *24*, 2325–2333.

(40) Hua, X.; Erikson, C. J.; Chason, K. D.; Rosebrock, C. N.; Deshpande, D. A.; Penn, R. B.; Tilley, S. L. Involvement of A_1 Adenosine Receptors and Neural Pathways in Adenosine-Induced Bronchoconstriction in Mice. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **2007**, *293*, L25–L32.

(41) Ponnoth, D. S.; Nadeem, A.; Tilley, S.; Mustafa, S. J. Involvement of A_1 Adenosine Receptors in Altered Vascular Responses and Inflammation in an Allergic Mouse Model of Asthma. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2010**, *299*, H81–H87.

(42) Fredholm, B. B.; Chen, J.-F.; Masino, S. A.; Vaugeois, J.-M. Aactions of Adenosine at its Receptors in the CNS: Insights from Knockouts and Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 385–412.

(43) Falsini, M.; Catarzi, D.; Varano, F.; Ceni, C.; Dal Ben, D.; Marucci, G.; Buccioni, M.; Volpini, R.; Di Cesare Mannelli, L.; Lucarini, E.; Ghelardini, C.; Bartolucci, G.; Menicatti, M.; Colotta, V. Antioxidant-Conjugated 1,2,4-Triazolo[4,3- *a*]Pyrazin-3-One Derivatives: Highly Potent and Selective Human A_{2A} Adenosine Receptor Antagonists Possessing Protective Efficacy in Neuropathic Pain. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8511–8531.

(44) Orr, A. G.; Hsiao, E. C.; Wang, M. M.; Ho, K.; Kim, D. H.; Wang, X.; Guo, W.; Kang, J.; Yu, G.-Q.; Adame, A.; Devidze, N.; Dubal, D. B.; Masliah, E.; Conklin, B. R.; Mucke, L. Astrocytic Adenosine Receptor A_{2A} and Gs-Coupled Signaling Regulate Memory. *Nat. Neurosci.* **2015**, *18*, 423–434.

(45) Varano, F.; Catarzi, D.; Vigiani, E.; Dal Ben, D.; Buccioni, M.; Marucci, G.; Di Cesare Mannelli, L.; Lucarini, E.; Ghelardini, C.; Volpini, R.; Colotta, V. Design and Synthesis of Novel Thiazolo[5,4-d]Pyrimidine Derivatives with High Affinity for Both the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Adenosine A_1 and A_{2A} Receptors, and Efficacy in Animal Models of Depression. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 657.

(46) Wang, M.; Li, P.; Li, Z.; Da Silva, B. S.; Zheng, W.; Xiang, Z.; He, Y.; Xu, T.; Cordeiro, C.; Deng, L.; Dai, Y.; Ye, M.; Lin, Z.; Zhou, J.; Zhou, X.; Ye, F.; Cunha, R. A.; Chen, J.; Guo, W. Lateral Septum Adenosine A_{2A} Receptors Control Stress-Induced Depressive-like Behaviors via Signaling to the Hypothalamus and Habenula. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 1880–1893.

(47) Guilherme, A.; Henriques, F.; Bedard, A. H.; Czech, M. P. Molecular Pathways Linking Adipose Innervation to Insulin Action in Obesity and Diabetes Mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 207–225.

(48) Cunha, R.; Ferre, S.; Vaugeois, J.-M.; Chen, J.-F. Potential Therapeutic Interest of Adenosine A_{2A} Receptors in Psychiatric Disorders. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 1512–1524.

(49) Atif, M.; Alsrhani, A.; Naz, F.; Imran, M.; Imran, M.; Ullah, M. I.; Alameen, A. A. M.; Gondal, T. A.; Raza, Q. Targeting Adenosine Receptors in Neurological Diseases. *Cell. Reprogramming* **2021**, *23*, 57–72.

(50) Arosio, B.; Casati, M.; Gussago, C.; Ferri, E.; Abbate, C.; Scortichini, V.; Colombo, E.; Rossi, P. D.; Mari, D. Adenosine Type A_{2A} Receptor in Peripheral Cell from Patients with Alzheimer's Disease, Vascular Dementia, and Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus: A New/Old Potential Target. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, *54*, 417–425.

(51) Arendash, G. W.; Schleif, W.; Rezai-Zadeh, K.; Jackson, E. K.; Zacharia, L. C.; Cracchiolo, J. R.; Shippy, D.; Tan, J. Caffeine Protects Alzheimer's Mice against Cognitive Impairment and Reduces Brain β-Amyloid Production. *Neuroscience* **2006**, *142*, 941–952.

(52) Stockwell, J.; Jakova, E.; Cayabyab, F. Adenosine A_1 and A_{2A} Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. *Molecules* **2017**, *22*, 676.

(53) Cunha, R.; Ferre, S.; Vaugeois, J.-M.; Chen, J.-F. Potential Therapeutic Interest of Adenosine A_{2A} Receptors in Psychiatric Disorders. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 1512–1524.

(54) Cacciari, B.; Spalluto, G.; Federico, S. A_{2A} Adenosine Receptor Antagonists as Therapeutic Candidates: Are They Still an Interesting Challenge? *Mini-Rev. Med. Chem.* *18*, 1168–1174.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(55) Viana Da Silva, S.; Haberl, M. G.; Zhang, P.; Bethge, P.; Lemos, C.; Gonçalves, N.; Gorlewicz, A.; Malezieux, M.; Gonçalves, F. Q.; Grosjean, N.; Blanchet, C.; Frick, A.; Nägerl, U. V.; Cunha, R. A.; Mulle, C. Early Synaptic Deficits in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease Involve Neuronal Adenosine A_{2A} Receptors. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11915–11927.

(56) Konishi, H.; Kanou, S.-E.; Yukimatsu, R.; Inui, M.; Sato, M.; Yamamoto, N.; Nakano, M.; Koshiba, M. Adenosine Inhibits TNFα-Induced MMP-3 Production in MH7A Rheumatoid Arthritis Synoviocytes via A_{2A} Receptor Signaling. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 6033–6042.

(57) Xiao, Q.; Han, X.; Liu, G.; Zhou, D.; Zhang, L.; He, J.; Xu, H.; Zhou, P.; Yang, Q.; Chen, J.; Zhou, J.; Jiang, G.; Yao, Z. Adenosine Restrains ILC2-Driven Allergic Airway Inflammation via A_{2A} Receptor. *Mucosal Immunol.* **2022**, *15*, 338–350.

(58) Remley, V. A.; Linden, J.; Bauer, T. W.; Dimastromatteo, J. Unlocking Antitumor Immunity with Adenosine Receptor Blockers. *Cancer Drug Resist.* **2023**, *6*, 748–767.

(59) Vijayan, D.; Young, A.; Teng, M. W. L.; Smyth, M. J. Targeting Immunosuppressive Adenosine in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 709–724.

(60) Corciulo, C.; Lendhey, M.; Wilder, T.; Schoen, H.; Cornelissen, A. S.; Chang, G.; Kennedy, O. D.; Cronstein, B. N. Endogenous Adenosine Maintains Cartilage Homeostasis and Exogenous Adenosine Inhibits Osteoarthritis Progression. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15019–15028.

(61) Ray, C. J.; Marshall, J. M. The Cellular Mechanisms by Which Adenosine Evokes Release of Nitric Oxide from Rat Aortic Endothelium. *J. Physiol.* **2006**, *570*, 85–96.

(62) Mediero, A.; Wilder, T.; Perez-Aso, M.; Cronstein, B. N. Direct or Indirect Stimulation of Adenosine A_{2A} Receptors Enhances Bone Regeneration as Well as Bone Morphogenetic Protein-2. *FASEB J.* **2015**, *29*, 1577–1590.

(63) Vecchio, E. A.; Chuo, C. H.; Baltos, J.-A.; Ford, L.; Scammells, P. J.; Wang, B. H.; Christopoulos, A.; White, P. J.; May, L. T. The Hybrid Molecule, VCP746, Is a Potent Adenosine A_{2B} Receptor Agonist That Stimulates Anti-Fibrotic Signalling. *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *117*, 46–56.

(64) Philipp, S.; Yang, X.; Cui, L.; Davis, A.; Downey, J.; Cohen, M. Postconditioning Protects Rabbit Hearts through a Protein Kinase C-Adenosine A_{2B} Receptor Cascade. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *70*, 308–314.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(65) Kuno, A.; Critz, S. D.; Cui, L.; Solodushko, V.; Yang, X.-M.; Krahn, T.; Albrecht, B.; Philipp, S.; Cohen, M. V.; Downey, J. M. Protein Kinase C Protects Preconditioned Rabbit Hearts by Increasing Sensitivity of Adenosine A_{2B}-Dependent Signaling during Early Reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2007**, *43*, 262–271.

(66) Koupenova, M.; Johnston-Cox, H.; Vezeridis, A.; Gavras, H.; Yang, D.; Zannis, V.; Ravid, K. A_{2B} Adenosine Receptor Regulates Hyperlipidemia and Atherosclerosis. *Circulation* **2012**, *125*, 354–363.

(67) Ferre, S.; Von Euler, G.; Johansson, B.; Fredholm, B. B.; Fuxe, K. Stimulation of High-Affinity Adenosine A2 Receptors Decreases the Affinity of Dopamine D2 Receptors in Rat Striatal Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 7238–7241.

(68) Pedata, F.; Dettori, I.; Coppi, E.; Melani, A.; Fusco, I.; Corradetti, R.; Pugliese, A. M. Purinergic Signalling in Brain Ischemia. *Neuropharmacology* **2016**, *104*, 105–130.

(69) Theparambil, S. M.; Kopach, O.; Braga, A.; Nizari, S.; Hosford, P. S.; Sagi-Kiss, V.; Hadjihambi, A.; Konstantinou, C.; Esteras, N.; Gutierrez Del Arroyo, A.; Ackland, G. L.; Teschemacher, A. G.; Dale, N.; Eckle, T.; Andrikopoulos, P.; Rusakov, D. A.; Kasparov, S.; Gourine, A. V. Adenosine Signalling to Astrocytes Coordinates Brain Metabolism and Function. *Nature* **2024**, *632*, 139–146.

(70) Borea, P. A.; Varani, K.; Vincenzi, F.; Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Merighi, S.; Gessi, S. The A_3 Adenosine Receptor: History and Perspectives. *Pharmacol. Rev.* **2015**, *67*, 74–102.

(71) Hinze, A. V.; Mayer, P.; Harst, A.; Von Kügelgen, I. Adenosine A_3 Receptor-Induced Proliferation of Primary Human Coronary Smooth Muscle Cells Involving the Induction of Early Growth Response Genes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2012**, *53*, 639–645.

(72) Grandoch, M.; Hoffmann, J.; Röck, K.; Wenzel, F.; Oberhuber, A.; Schelzig, H.; Fischer, J. W. Novel Effects of Adenosine Receptors on Pericellular Hyaluronan Matrix: Implications for Human Smooth Muscle Cell Phenotype and Interactions with Monocytes during Atherosclerosis. *Basic Res. Cardiol.* **2013**, *108*, 340–353.

(73) Varani, K.; Massara, A.; Vincenzi, F.; Tosi, A.; Padovan, M.; Trotta, F.; Borea, P. A. Normalization of A_{2A} and A_3 Adenosine Receptor Up-regulation in Rheumatoid Arthritis Patients by Treatment with Anti–Tumor Necrosis Factor α but Not Methotrexate. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 2880–2891.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(74) Gessi, S.; Merighi, S.; Stefanelli, A.; Mirandola, P.; Bonfatti, A.; Fini, S.; Sensi, A.; Marci, R.; Varani, K.; Borea, P. A.; Vesce, F. Downregulation of A_1 and A_{2B} Adenosine Receptors in Human Trisomy 21 Mesenchymal Cells from First-Trimester Chorionic Villi. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822*, 1660–1670.

(75) Chen, Y.; Corriden, R.; Inoue, Y.; Yip, L.; Hashiguchi, N.; Zinkernagel, A.; Nizet, V.; Insel, P. A.; Junger, W. G. ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A_3 Receptors. *Science* **2006**, *314*, 1792–1795.

(76) Corriden, R.; Self, T.; Akong-Moore, K.; Nizet, V.; Kellam, B.; Briddon, S. J.; Hill, S. J. Adenosine-A_3 Receptors in Neutrophil Microdomains Promote the Formation of Bacteria-tethering Cytonemes. *EMBO Rep.* **2013**, *14*, 726–732.

(77) Varani, K.; Maniero, S.; Vincenzi, F.; Targa, M.; Stefanelli, A.; Maniscalco, P.; Martini, F.; Tognon, M.; Borea, P. A. A_3 Receptors Are Overexpressed in Pleura from Patients with Mesothelioma and Reduce Cell Growth via Akt/Nuclear Factor-κB Pathway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *183*, 522–530.

(78) Mulloy, D. P.; Sharma, A. K.; Fernandez, L. G.; Zhao, Y.; Lau, C. L.; Kron, I. L.; Laubach, V. E. Adenosine A_3 Receptor Activation Attenuates Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann. Thorac. Surg.* **2013**, *95*, 1762–1767.

(79) Varani, K.; Vincenzi, F.; Tosi, A.; Targa, M.; Masieri, F.; Ongaro, A.; Mattei, M. D.; Massari, L.; Borea, P. A. Expression and Functional Role of Adenosine Receptors in Regulating Inflammatory Responses in Human Synoviocytes. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 100–113.

(80) Cabrera-Vera, T. M.; Vanhauwe, J.; Thomas, T. O.; Medkova, M.; Preininger, A.; Mazzoni, M. R.; Hamm, H. E. Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 765–781.

(81) Schulte, G.; Fredholm, B. B. Human Adenosine A_1, A_{2A}, A_{2B}, and A_3 Receptors Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells All Mediate the Phosphorylation of Extracellular-Regulated Kinase 1/2. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 477–482.

(82) Schulte, G.; Fredholm, B. B. Signalling from Adenosine Receptors to Mitogen-Activated Protein Kinases. *Cell. Signal.* **2003**, *15*, 813–827.

(83) Kull, B.; Svenningsson, P.; Fredholm, B. B. Adenosine A_{2A} Receptors Are Colocalized with and Activate G_{olf} in Rat Striatum. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 771–777.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(84) Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Gessi, S.; Borea, P. A. Adenosine Receptor Antagonists: Translating Medicinal Chemistry and Pharmacology into Clinical Utility. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 238–263.

(85) Chen, J.-F.; Eltzschig, H. K.; Fredholm, B. B. Adenosine Receptors as Drug Targets — What Are the Challenges? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 265–286.

(86) Preti, D.; Baraldi, P. G.; Moorman, A. R.; Borea, P. A.; Varani, K. History and Perspectives of A_{2A} Adenosine Receptor Antagonists as Potential Therapeutic Agents: A_{2A} Adenosine Receptor Antagonists. *Med. Res. Rev.* **2015**, *35*, 790–848.

(87) Sun, Y.; Huang, P. Adenosine A_{2B} Receptor: From Cell Biology to Human Diseases. *Front. Chem.* **2016**, *4*, 49–61.

(88) Bader, A.; Bintig, W.; Begandt, D.; Klett, A.; Siller, I. G.; Gregor, C.; Schaarschmidt, F.; Weksler, B.; Romero, I.; Couraud, P.; Hell, S. W.; Ngezahayo, A. Adenosine Receptors Regulate Gap Junction Coupling of the Human Cerebral Microvascular Endothelial Cells hCMEC/D3 by Ca^{2+} Influx through Cyclic Nucleotide-gated Channels. *J. Physiol.* **2017**, *595*, 2497–2517.

(89) Fishman, P.; Bar-Yehuda, S.; Madi, L.; Cohn, I. A_3 Adenosine Receptor as a Target for Cancer Therapy: *Anticancer. Drugs* **2002**, *13*, 437–443.

(90) Canals, M.; Burgueño, J.; Marcellino, D.; Cabello, N.; Canela, E. I.; Mallol, J.; Agnati, L.; Ferré, S.; Bouvier, M.; Fuxe, K.; Ciruela, F.; Lluis, C.; Franco, R. Homodimerization of Adenosine A_{2A} Receptors: Qualitative and Quantitative Assessment by Fluorescence and Bioluminescence Energy Transfer. *J. Neurochem.* **2004**, *88*, 726–734.

(91) Vidi, P.-A.; Chen, J.; Irudayaraj, J. M. K.; Watts, V. J. Adenosine A_{2A} Receptors Assemble into Higher-order Oligomers at the Plasma Membrane. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 3985–3990.

(92) Vidi, P.-A.; Chemel, B. R.; Hu, C.-D.; Watts, V. J. Ligand-Dependent Oligomerization of Dopamine D_2 and Adenosine A_{2A} Receptors in Living Neuronal Cells. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 544–551.

(93) Fernandez-Duenas, V.; Ferré, S.; Ciruela, F. Adenosine A_{2A}-Dopamine D2 Receptor Heteromers Operate Striatal Function: Impact on Parkinson's Disease Pharmacotherapeutics. *Neural Regen. Res.* **2018**, *13*, 241–246.

(94) Sahlholm, K.; Gómez-Soler, M.; Valle-León, M.; López-Cano, M.; Taura, J. J.; Ciruela, F.; Fernández-Dueñas, V. Antipsychotic-Like Efficacy of Dopamine D2 Receptor-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Biased Ligands Is Dependent on Adenosine A_{2A} Receptor Expression. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 4952–4958.

(95) Carriba, P.; Ortiz, O.; Patkar, K.; Justinova, Z.; Stroik, J.; Themann, A.; Müller, C.; Woods, A. S.; Hope, B. T.; Ciruela, F.; Casadó, V.; Canela, E. I.; Lluis, C.; Goldberg, S. R.; Moratalla, R.; Franco, R.; Ferré, S. Striatal Adenosine A_{2A} and Cannabinoid CB1 Receptors Form Functional Heteromeric Complexes That Mediate the Motor Effects of Cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *32*, 2249–2259.

(96) Hinz, S.; Navarro, G.; Borroto-Escuela, D.; Seibt, B. F.; Ammon, Y.-C.; De Filippo, E.; Danish, A.; Lacher, S. K.; Červinková, B.; Rafehi, M.; Fuxe, K.; Schiedel, A. C.; Franco, R.; Müller, C. E. Adenosine A_{2A} Receptor Ligand Recognition and Signaling Is Blocked by A_{2B} Receptors. *Oncotarget* **2018**, *9*, 13593–13611.

(97) Hauser, A. S.; Attwood, M. M.; Rask-Andersen, M.; Schiöth, H. B.; Gloriam, D. E. Trends in GPCR Drug Discovery: New Agents, Targets and Indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 829–842.

(98) Jaakola, V.-P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y. T.; Lane, J. R.; IJzerman, A. P.; Stevens, R. C. The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A_{2A} Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science* **2008**, *322*, 1211–1217.

(99) Claff, T.; Schlegel, J. G.; Voss, J. H.; Vaaßen, V. J.; Weiße, R. H.; Cheng, R. K. Y.; Markovic-Mueller, S.; Bucher, D.; Sträter, N.; Müller, C. E. Crystal Structure of Adenosine A_{2A} Receptor in Complex with Clinical Candidate Etrumadenant Reveals Unprecedented Antagonist Interaction. *Commun. Chem.* **2023**, *6*, 106–115.

(100) Rucktooa, P.; Cheng, R. K. Y.; Segala, E.; Geng, T.; Errey, J. C.; Brown, G. A.; Cooke, R. M.; Marshall, F. H.; Doré, A. S. Towards High Throughput GPCR Crystallography: In Meso Soaking of Adenosine A_{2A} Receptor Crystals. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 41–50.

(101) Claff, T.; Klapschinski, T. A.; Tiruttani Subhramanyam, U. K.; Vaaßen, V. J.; Schlegel, J. G.; Vielmuth, C.; Voß, J. H.; Labahn, J.; Müller, C. E. Single Stabilizing Point Mutation Enables High-Resolution Co-Crystal Structures of the Adenosine A_{2A} Receptor with Preladenant Conjugates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202115545.

(102) Lebon, G.; Warne, T.; Edwards, P. C.; Bennett, K.; Langmead, C. J.; Leslie, A. G. W.; Tate, C. G. Agonist-Bound Adenosine A_{2A} Receptor Structures Reveal Common Features of GPCR Activation. *Nature* **2011**, *474*, 521–525.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(103) Xu, F.; Wu, H.; Katritch, V.; Han, G. W.; Jacobson, K. A.; Gao, Z.-G.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structure of an Agonist-Bound Human A_{2A} Adenosine Receptor. *Science* **2011**, *332*, 322–327.

(104) Lebon, G.; Edwards, P. C.; Leslie, A. G. W.; Tate, C. G. Molecular Determinants of CGS21680 Binding to the Human Adenosine A_{2A} Receptor. *Mol. Pharmacol.* **2015**, *87*, 907–915.

(105) Shiriaeva, A.; Park, D.; Kim, G.; Lee, Y.; Hou, X.; Jarhad, D. B.; Kim, G.; Yu, J.; Hyun, Y. E.; Kim, W.; Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A.; Han, G. W.; Stevens, R. C.; Jeong, L. S.; Choi, S.; Cherezov, V. GPCR Agonist-to-Antagonist Conversion: Enabling the Design of Nucleoside Functional Switches for the A $_{2A}$ Adenosine Receptor. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 11648–11657.

(106) Zhukov, A.; Andrews, S. P.; Errey, J. C.; Robertson, N.; Tehan, B.; Mason, J. S.; Marshall, F. H.; Weir, M.; Congreve, M. Biophysical Mapping of the Adenosine A_{2A} Receptor. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4312–4323.

(107) Jespers, W.; Schiedel, A. C.; Heitman, L. H.; Cooke, R. M.; Kleene, L.; Van Westen, G. J. P.; Gloriam, D. E.; Müller, C. E.; Sotelo, E.; Gutiérrez-de-Terán, H. Structural Mapping of Adenosine Receptor Mutations: Ligand Binding and Signaling Mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39*, 75–89.

(108) Kimiz-Gebologlu, I.; Gulce-Iz, S.; Biray-Avci, C. Monoclonal Antibodies in Cancer Immunotherapy. *Mol. Biol. Rep.* **2018**, *45*, 2935–2940.

(109) Pardoll, D. M. The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 252–264.

(110) Garber, K. Adenosine Checkpoint Agent Blazes a Trail, Joins Immunotherapy Roster. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 805–806.

(111) Allard, B.; Allard, D.; Buisseret, L.; Stagg, J. The Adenosine Pathway in Immuno-Oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 611–629.

(112) Pellegatti, P.; Raffaghello, L.; Bianchi, G.; Piccardi, F.; Pistoia, V.; Di Virgilio, F. Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: In Vivo Imaging with Plasma Membrane Luciferase. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2599.

(113) Aymeric, L.; Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Tesniere, A.; Martins, I.; Kroemer, G.; Smyth, M. J.; Zitvogel, L. Tumor Cell Death and ATP Release Prime Dendritic Cells and Efficient Anticancer Immunity. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 855–858.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(114) Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Kepp, O.; Zitvogel, L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu. Rev. Immunol.* **2013**, *31*, 51–72.

(115) Di Virgilio, F.; Sarti, A. C.; Falzoni, S.; De Marchi, E.; Adinolfi, E. Extracellular ATP and P2 Purinergic Signalling in the Tumour Microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 601–618.

(116) Allard, B.; Beavis, P. A.; Darcy, P. K.; Stagg, J. Immunosuppressive Activities of Adenosine in Cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2016**, *29*, 7–16.

(117) Vijayan, D.; Young, A.; Teng, M. W. L.; Smyth, M. J. Targeting Immunosuppressive Adenosine in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 709–724.

(118) Allard, B.; Longhi, M. S.; Robson, S. C.; Stagg, J. The Ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel Checkpoint Inhibitor Targets. *Immunol. Rev.* **2017**, *276*, 121–144.

(119) Clayton, A.; Al-Taei, S.; Webber, J.; Mason, M. D.; Tabi, Z. Cancer Exosomes Express CD39 and CD73, Which Suppress T Cells through Adenosine Production. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 676–683.

(120) Eltzschig, H. K.; Köhler, D.; Eckle, T.; Kong, T.; Robson, S. C.; Colgan, S. P. Central Role of Sp1-Regulated CD39 in Hypoxia/Ischemia Protection. *Blood* **2009**, *113*, 224–232.

(121) Synnestvedt, K.; Furuta, G. T.; Comerford, K. M.; Louis, N.; Karhausen, J.; Eltzschig, H. K.; Hansen, K. R.; Thompson, L. F.; Colgan, S. P. Ecto-5′-Nucleotidase (CD73) Regulation by Hypoxia-Inducible Factor-1 Mediates Permeability Changes in Intestinal Epithelia. *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 993–1002.

(122) Kong, T.; Westerman, K. A.; Faigle, M.; Eltzschig, H. K.; Colgan, S. P. HIF-dependent Induction of Adenosine A_{2B} Receptor in Hypoxia. *FASEB J.* **2006**, *20*, 2242–2250.

(123) Ahmad, A.; Ahmad, S.; Glover, L.; Miller, S. M.; Shannon, J. M.; Guo, X.; Franklin, W. A.; Bridges, J. P.; Schaack, J. B.; Colgan, S. P.; White, C. W. Adenosine A_{2A} Receptor Is a Unique Angiogenic Target of HIF-2α in Pulmonary Endothelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2016**, *54* (2), 266–276.

(124) Bowser, J. L.; Lee, J. W.; Yuan, X.; Eltzschig, H. K. The Hypoxia-Adenosine Link during Inflammation. *J. Appl. Physiol.* **2017**, *123*, 1303–1320.

(125) Ryzhov, S. V.; Pickup, M. W.; Chytil, A.; Gorska, A. E.; Zhang, Q.; Owens, P.; Feoktistov, I.; Moses, H. L.; Novitskiy, S. V. Role of TGF-β Signaling in Generation of $CD39^{+}CD73^{+}$ Myeloid Cells in Tumors. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 3155–3164.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(126) Regateiro, F. S.; Howie, D.; Nolan, K. F.; Agorogiannis, E. I.; Greaves, D. R.; Cobbold, S. P.; Waldmann, H. Generation of Anti-inflammatory Adenosine Byleukocytes Is Regulated by TGF-β. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 2955–2965.

(127) Li, J.; Wang, L.; Chen, X.; Li, L.; Li, Y.; Ping, Y.; Huang, L.; Yue, D.; Zhang, Z.; Wang, F.; Li, F.; Yang, L.; Huang, J.; Yang, S.; Li, H.; Zhao, X.; Dong, W.; Yan, Y.; Zhao, S.; Huang, B.; Zhang, B.; Zhang, Y. CD39/CD73 Upregulation on Myeloid-Derived Suppressor Cells via TGF-β-mTOR-HIF-1 Signaling in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *OncoImmunology* **2017**, *6*, e1320011.

(128) Horenstein, A. L.; Quarona, V.; Toscani, D.; Costa, F.; Chillemi, A.; Pistoia, V.; Giuliani, N.; Malavasi, F. Adenosine Generated in the Bone Marrow Niche Through a CD38-Mediated Pathway Correlates With Progression of Human Myeloma. *Mol. Med.* **2016**, *22*, 694–704.

(129) Morandi, F.; Morandi, B.; Horenstein, A. L.; Chillemi, A.; Quarona, V.; Zaccarello, G.; Carrega, P.; Ferlazzo, G.; Mingari, M. C.; Moretta, L.; Pistoia, V.; Malavasi, F. A Non-Canonical Adenosinergic Pathway Led by CD38 in Human Melanoma Cells Induces Suppression of T Cell Proliferation. *Oncotarget* **2015**, *6*, 25602–25618.

(130) Song, Y.; Song, C.; Yang, S. Tumor-Suppressive Function of *miR-30d-5p* in Prostate Cancer Cell Proliferation and Migration by Targeting *NT5E*. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2018**, *33*, 203–211.

(131) Wang, H.; Lee, S.; Nigro, C. L.; Lattanzio, L.; Merlano, M.; Monteverde, M.; Matin, R.; Purdie, K.; Mladkova, N.; Bergamaschi, D.; Harwood, C.; Syed, N.; Szlosarek, P.; Briasoulis, E.; McHugh, A.; Thompson, A.; Evans, A.; Leigh, I.; Fleming, C.; Inman, G. J.; Hatzimichael, E.; Proby, C.; Crook, T. NT5E (CD73) Is Epigenetically Regulated in Malignant Melanoma and Associated with Metastatic Site Specificity. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 1446–1452.

(132) Spychala, J.; Lazarowski, E.; Ostapkowicz, A.; Ayscue, L. H.; Jin, A.; Mitchell, B. S. Role of Estrogen Receptor in the Regulation of Ecto-5′-Nucleotidase and Adenosine in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 708–717.

(133) Zhu, J.; Zeng, Y.; Li, W.; Qin, H.; Lei, Z.; Shen, D.; Gu, D.; Huang, J.; Liu, Z. CD73/NT5E Is a Target of miR-30a-5p and Plays an Important Role in the Pathogenesis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 34–45.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(134) Bonnin, N.; Armandy, E.; Carras, J.; Ferrandon, S.; Battiston-Montagne, P.; Aubry, M.; Guihard, S.; Meyronet, D.; Foy, J.-P.; Saintigny, P.; Ledrappier, S.; Jung, A.; Rimokh, R.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Poncet, D. *MiR-422a* Promotes Loco-Regional Recurrence by Targeting NT5E/CD73 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 44023–44038.

(135) Mousavi, S.; Panjehpour, M.; Izadpanahi, M. H.; Aghaei, M. Expression of Adenosine Receptor Subclasses in Malignant and Adjacent Normal Human Prostate Tissues. *The Prostate* **2015**, *75*, 735–747.

(136) Ntantie, E.; Gonyo, P.; Lorimer, E. L.; Hauser, A. D.; Schuld, N.; McAllister, D.; Kalyanaraman, B.; Dwinell, M. B.; Auchampach, J. A.; Williams, C. L. An Adenosine-Mediated Signaling Pathway Suppresses Prenylation of the GTPase Rap1B and Promotes Cell Scattering. *Sci. Signal.* **2013**, *6*, ra12.

(137) Stagg, J.; Divisekera, U.; McLaughlin, N.; Sharkey, J.; Pommey, S.; Denoyer, D.; Dwyer, K. M.; Smyth, M. J. Anti-CD73 Antibody Therapy Inhibits Breast Tumor Growth and Metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 1547–1552.

(138) Beavis, P. A.; Divisekera, U.; Paget, C.; Chow, M. T.; John, L. B.; Devaud, C.; Dwyer, K.; Stagg, J.; Smyth, M. J.; Darcy, P. K. Blockade of A_{2A} Receptors Potently Suppresses the Metastasis of $CD73^{+}$ Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 14711–14716.

(139) Zhou, J. Z.; Riquelme, M. A.; Gao, X.; Ellies, L. G.; Sun, L. Z.; Jiang, J. X. Differential Impact of Adenosine Nucleotides Released by Osteocytes on Breast Cancer Growth and Bone Metastasis. *Oncogene* **2015**, *34*, 1831–1842.

(140) Desmet, C. J.; Gallenne, T.; Prieur, A.; Reyal, F.; Visser, N. L.; Wittner, B. S.; Smit, M. A.; Geiger, T. R.; Laoukili, J.; Iskit, S.; Rodenko, B.; Zwart, W.; Evers, B.; Horlings, H.; Ajouaou, A.; Zevenhoven, J.; Van Vliet, M.; Ramaswamy, S.; Wessels, L. F. A.; Peeper, D. S. Identification of a Pharmacologically Tractable Fra-1/$ADORA_{2B}$ Axis Promoting Breast Cancer Metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 5139–5144.

(141) Zhi, X.; Wang, Y.; Zhou, X.; Yu, J.; Jian, R.; Tang, S.; Yin, L.; Zhou, P. RNAi-mediated CD73 Suppression Induces Apoptosis and Cell-cycle Arrest in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 2561–2569.

(142) Ma, X.-L.; Shen, M.-N.; Hu, B.; Wang, B.-L.; Yang, W.-J.; Lv, L.-H.; Wang, H.; Zhou, Y.; Jin, A.-L.; Sun, Y.-F.; Zhang, C.-Y.; Qiu, S.-J.; Pan, B.-S.; Zhou, J.; Fan, J.; Yang, X.-R.; Guo, W. CD73 Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression and Metastasis

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

via Activating PI3K/AKT Signaling by Inducing Rap1-Mediated Membrane Localization of P110β and Predicts Poor Prognosis. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 37–48.

(143) Sadej, R.; Skladanowski, A. C. Dual, Enzymatic and Non-Enzymatic, Function of Ecto-5'-Nucleotidase (eN, CD73) in Migration and Invasion of A375 Melanoma Cells. *Acta Biochim. Pol.* **2012**, *59*, 595–601.

(144) Gao, Z.; Wang, H.; Lin, F.; Wang, X.; Long, M.; Zhang, H.; Dong, K. CD73 Promotes Proliferation and Migration of Human Cervical Cancer Cells Independent of Its Enzyme Activity. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 135–144.

(145) Wang, L.; Fan, J.; Thompson, L. F.; Zhang, Y.; Shin, T.; Curiel, T. J.; Zhang, B. CD73 Has Distinct Roles in Nonhematopoietic and Hematopoietic Cells to Promote Tumor Growth in Mice. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 2371–2382.

(146) Zhou, L.; Jia, S.; Chen, Y.; Wang, W.; Wu, Z.; Yu, W.; Zhang, M.; Ding, G.; Cao, L. The Distinct Role of CD73 in the Progression of Pancreatic Cancer. *J. Mol. Med.* **2019**, *97*, 803–815.

(147) Yu, M.; Guo, G.; Huang, L.; Deng, L.; Chang, C.-S.; Achyut, B. R.; Canning, M.; Xu, N.; Arbab, A. S.; Bollag, R. J.; Rodriguez, P. C.; Mellor, A. L.; Shi, H.; Munn, D. H.; Cui, Y. CD73 on Cancer-Associated Fibroblasts Enhanced by the A2B-Mediated Feedforward Circuit Enforces an Immune Checkpoint. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 515.

(148) Turcotte, M.; Spring, K.; Pommey, S.; Chouinard, G.; Cousineau, I.; George, J.; Chen, G. M.; Gendoo, D. M. A.; Haibe-Kains, B.; Karn, T.; Rahimi, K.; Le Page, C.; Provencher, D.; Mes-Masson, A.-M.; Stagg, J. CD73 Is Associated with Poor Prognosis in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 4494–4503.

(149) Costa, A.; Kieffer, Y.; Scholer-Dahirel, A.; Pelon, F.; Bourachot, B.; Cardon, M.; Sirven, P.; Magagna, I.; Fuhrmann, L.; Bernard, C.; Bonneau, C.; Kondratova, M.; Kuperstein, I.; Zinovyev, A.; Givel, A.-M.; Parrini, M.-C.; Soumelis, V.; Vincent-Salomon, A.; Mechta-Grigoriou, F. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 463-479.

(150) Sorrentino, C.; Miele, L.; Porta, A.; Pinto, A.; Morello, S. Activation of the A_{2B} Adenosine Receptor in B16 Melanomas Induces CXCL12 Expression in FAP-Positive Tumor Stromal Cells, Enhancing Tumor Progression. *Oncotarget* **2016**, *7*, 64274–64288.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(151) Thompson, L. F.; Eltzschig, H. K.; Ibla, J. C.; Van De Wiele, C. J.; Resta, R.; Morote-Garcia, J. C.; Colgan, S. P. Crucial Role for Ecto-5′-Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage during Hypoxia. *J. Exp. Med.* **2004**, *200*, 1395–1405.

(152) Liu, Z.; Yan, S.; Wang, J.; Xu, Y.; Wang, Y.; Zhang, S.; Xu, X.; Yang, Q.; Zeng, X.; Zhou, Y.; Gu, X.; Lu, S.; Fu, Z.; Fulton, D. J.; Weintraub, N. L.; Caldwell, R. B.; Zhang, W.; Wu, C.; Liu, X.-L.; Chen, J.-F.; Ahmad, A.; Kaddour-Djebbar, I.; Al-Shabrawey, M.; Li, Q.; Jiang, X.; Sun, Y.; Sodhi, A.; Smith, L.; Hong, M.; Huo, Y. Endothelial Adenosine A_{2A} Receptor-Mediated Glycolysis Is Essential for Pathological Retinal Angiogenesis. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 584.

(153) Desai, A.; Victor-Vega, C.; Gadangi, S.; Montesinos, M. C.; Chu, C. C.; Cronstein, B. N. Adenosine A $_{2A}$ Receptor Stimulation Increases Angiogenesis by Down-Regulating Production of the Antiangiogenic Matrix Protein Thrombospondin 1. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1406–1413.

(154) Airas, L.; Niemelä, J.; Jalkanen, S. CD73 Engagement Promotes Lymphocyte Binding to Endothelial Cells Via a Lymphocyte Function-Associated Antigen-1-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 5411–5417.

(155) Takedachi, M.; Qu, D.; Ebisuno, Y.; Oohara, H.; Joachims, M. L.; McGee, S. T.; Maeda, E.; McEver, R. P.; Tanaka, T.; Miyasaka, M.; Murakami, S.; Krahn, T.; Blackburn, M. R.; Thompson, L. F. CD73-Generated Adenosine Restricts Lymphocyte Migration into Draining Lymph Nodes. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 6288–6296.

(156) Wang, L.; Tang, S.; Wang, Y.; Xu, S.; Yu, J.; Zhi, X.; Ou, Z.; Yang, J.; Zhou, P.; Shao, Z. Ecto-5′-Nucleotidase (CD73) Promotes Tumor Angiogenesis. *Clin. Exp. Metastasis* **2013**, *30*, 671–680.

(157) Allard, B.; Turcotte, M.; Spring, K.; Pommey, S.; Royal, I.; Stagg, J. Anti-CD73 Therapy Impairs Tumor Angiogenesis. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 1466–1473.

(158) Allard, B.; Cousineau, I.; Allard, D.; Buisseret, L.; Pommey, S.; Chrobak, P.; Stagg, J. Adenosine A_{2A} Receptor Promotes Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis. *OncoImmunology* **2019**, *8*, 1601481.

(159) Ramanathan, M.; Luo, W.; Csóka, B.; Haskó, G.; Lukashev, D.; Sitkovsky, M. V.; Leibovich, S. J. Differential Regulation of HIF-1α Isoforms in Murine Macrophages by TLR4 and Adenosine A2A Receptor Agonists. *J. Leukoc. Biol.* **2009**, *86*, 681–689.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(160) Cohen, H. B.; Ward, A.; Hamidzadeh, K.; Ravid, K.; Mosser, D. M. IFN-γ Prevents Adenosine Receptor ($A_{2B}R$) Upregulation To Sustain the Macrophage Activation Response. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 3828–3837.

(161) Csóka, B.; Selmeczy, Z.; Koscsó, B.; Németh, Z. H.; Pacher, P.; Murray, P. J.; Kepka-Lenhart, D.; Jr., S. M. M.; Gause, W. C.; Leibovich, S. J.; Haskó, G. Adenosine Promotes Alternative Macrophage Activation *via* A_{2A} and A_{2B} Receptors. *FASEB J.* **2012**, *26*, 376–386.

(162) Ferrante, C. J.; Pinhal-Enfield, G.; Elson, G.; Cronstein, B. N.; Hasko, G.; Outram, S.; Leibovich, S. J. The Adenosine-Dependent Angiogenic Switch of Macrophages to an M2-Like Phenotype Is Independent of Interleukin-4 Receptor Alpha (IL-4Rα) Signaling. *Inflammation* **2013**, *36*, 921–931.

(163) Novitskiy, S. V.; Ryzhov, S.; Zaynagetdinov, R.; Goldstein, A. E.; Huang, Y.; Tikhomirov, O. Y.; Blackburn, M. R.; Biaggioni, I.; Carbone, D. P.; Feoktistov, I.; Dikov, M. M. Adenosine Receptors in Regulation of Dendritic Cell Differentiation and Function. *Blood* **2008**, *112*, 1822–1831.

(164) Challier, J.; Bruniquel, D.; Sewell, A. K.; Laugel, B. Adenosine and cAMP Signalling Skew Human Dendritic Cell Differentiation towards a Tolerogenic Phenotype with Defective $CD8^+$ T-cell Priming Capacity. *Immunology* **2013**, *138*, 402–410.

(165) Barletta, K. E.; Ley, K.; Mehrad, B. Regulation of Neutrophil Function by Adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 856–864.

(166) Chen, Y.; Corriden, R.; Inoue, Y.; Yip, L.; Hashiguchi, N.; Zinkernagel, A.; Nizet, V.; Insel, P. A.; Junger, W. G. ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A3 Receptors. *Science* **2006**, *314*, 1792–1795.

(167) Fredholm, B. B.; Zhang, Y.; Van Der Ploeg, I. Adenosine A2A Receptors Mediate the Inhibitory Effect of Adenosine on Formyl-Met-Leu-Phe-Stimulated Respiratory Burst in Neutrophil Leucocytes. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1996**, *354*, 262–267.

(168) Yago, T.; Tsukamoto, H.; Liu, Z.; Wang, Y.; Thompson, L. F.; McEver, R. P. Multi-Inhibitory Effects of A2A Adenosine Receptor Signaling on Neutrophil Adhesion Under Flow. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 3880–3889.

(169) Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A. Purinergic Signaling in Mast Cell Degranulation and Asthma. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 947.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(170) Sorrentino, C.; Miele, L.; Porta, A.; Pinto, A.; Morello, S. Myeloid-Derived Suppressor Cells Contribute to A_{2B} Adenosine Receptor-Induced VEGF Production and Angiogenesis in a Mouse Melanoma Model. *Oncotarget* **2015**, *6*, 27478–27489.

(171) Fleming, V.; Hu, X.; Weber, R.; Nagibin, V.; Groth, C.; Altevogt, P.; Utikal, J.; Umansky, V. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 398.

(172) Raskovalova, T.; Huang, X.; Sitkovsky, M.; Zacharia, L. C.; Jackson, E. K.; Gorelik, E. Gs Protein-Coupled Adenosine Receptor Signaling and Lytic Function of Activated NK Cells. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 4383–4391.

(173) Raskovalova, T.; Lokshin, A.; Huang, X.; Jackson, E. K.; Gorelik, E. Adenosine-Mediated Inhibition of Cytotoxic Activity and Cytokine Production by IL-2/NKp46-Activated NK Cells: Involvement of Protein Kinase A Isozyme I (PKA I). *Immunol. Res.* **2006**, *36*, 91–100.

(174) Wallace, K. L.; Linden, J. Adenosine A2A Receptors Induced on iNKT and NK Cells Reduce Pulmonary Inflammation and Injury in Mice with Sickle Cell Disease. *Blood* **2010**, *116*, 5010–5020.

(175) Leone, R. D.; Sun, I.-M.; Oh, M.-H.; Sun, I.-H.; Wen, J.; Englert, J.; Powell, J. D. Inhibition of the Adenosine A2a Receptor Modulates Expression of T Cell Coinhibitory Receptors and Improves Effector Function for Enhanced Checkpoint Blockade and ACT in Murine Cancer Models. *Cancer Immunol. Immunother.* **2018**, *67*, 1271–1284.

(176) Minguet, S.; Huber, M.; Rosenkranz, L.; Schamel, W. W. A.; Reth, M.; Brummer, T. Adenosine and cAMP Are Potent Inhibitors of the NF-κB Pathway Downstream of Immunoreceptors. *Eur. J. Immunol.* **2005**, *35*, 31–41.

(177) Gourdin, N.; Bossennec, M.; Rodriguez, C.; Vigano, S.; Machon, C.; Jandus, C.; Bauché, D.; Faget, J.; Durand, I.; Chopin, N.; Tredan, O.; Marie, J. C.; Dubois, B.; Guitton, J.; Romero, P.; Caux, C.; Ménétrier-Caux, C. Autocrine Adenosine Regulates Tumor Polyfunctional CD73+CD4+ Effector T Cells Devoid of Immune Checkpoints. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 3604–3618.

(178) Mastelic-Gavillet, B.; Navarro Rodrigo, B.; Décombaz, L.; Wang, H.; Ercolano, G.; Ahmed, R.; Lozano, L. E.; Ianaro, A.; Derré, L.; Valerio, M.; Tawadros, T.; Jichlinski, P.; Nguyen-Ngoc, T.; Speiser, D. E.; Verdeil, G.; Gestermann, N.; Dormond, O.; Kandalaft, L.; Coukos, G.; Jandus, C.; Ménétrier-Caux, C.; Caux, C.; Ho, P.-C.; Romero,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

P.; Harari, A.; Vigano, S. Adenosine Mediates Functional and Metabolic Suppression of Peripheral and Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 257.

(179) Romio, M.; Reinbeck, B.; Bongardt, S.; Hüls, S.; Burghoff, S.; Schrader, J. Extracellular Purine Metabolism and Signaling of CD73-Derived Adenosine in Murine Treg and Teff Cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2011**, *301*, C530–C539.

(180) Zarek, P. E.; Huang, C.-T.; Lutz, E. R.; Kowalski, J.; Horton, M. R.; Linden, J.; Drake, C. G.; Powell, J. D. A_{2A} Receptor Signaling Promotes Peripheral Tolerance by Inducing T-Cell Anergy and the Generation of Adaptive Regulatory T Cells. *Blood* **2008**, *111*, 251–259.

(181) Klotz, K.-N. Adenosine Receptors and Their Ligands. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2000**, *362*, 382–391.

(182) Siddiqi, S. M.; Jacobson, K. A.; Esker, J. L.; Olah, M. E.; Ji, X.; Melman, N.; Tiwari, K. N.; Secrist, J. A., III; Schneller, S. W.; Cristalli, G.; Stiles, G. L.; Johnson, C. R.; IJzerman, A. P. Search for New Purine- and Ribose-Modified Adenosine Analogues as Selective Agonists and Antagonists at Adenosine Receptors. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1174–1188.

(183) Yan, L.; Burbiel, J. C.; Maaß, A.; Müller, C. E. Adenosine Receptor Agonists: From Basic Medicinal Chemistry to Clinical Development. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (3), 998–1057. (184) De Lera Ruiz, M.; Lim, Y.-H.; Zheng, J. Adenosine A_{2A} Receptor as a Drug Discovery Target. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3623–3650.

(185) Cristalli, G.; Müller, C. E.; Volpini, R. Recent Developments in Adenosine A_{2A} Receptor Ligands. In *Adenosine Receptors in Health and Disease*; Wilson, C. N., Mustafa, S. J., Eds.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2009; Vol. 193, pp 59–98.

(186) Abdel-Hamid, M.; Novotny, L.; Hamza, H. Stability Study of Selected Adenosine Nucleosides Using LC and LC/MS Analyses. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 745–755.

(187) Jacobson, K. A.; Tosh, D. K.; Jain, S.; Gao, Z.-G. Historical and Current Adenosine Receptor Agonists in Preclinical and Clinical Development. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 124.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(188) Borah, P.; Deka, S.; Mailavaram, R. P.; Deb, P. K. P1 Receptor Agonists/Antagonists in Clinical Trials - Potential Drug Candidates of the Future. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *25*, 2792–2807.

(189) Armentero, M. T.; Pinna, A.; Ferré, S.; Lanciego, J. L.; Müller, C. E.; Franco, R. Past, Present and Future of A_{2A} Adenosine Receptor Antagonists in the Therapy of Parkinson's Disease. *Pharmacol. Ther.* **2011**, *132*, 280–299.

(190) Hoare, S. R. J.; Coldwell, M. C.; Armstrong, D.; Strange, P. G. Regulation of Human D_1 , $D_{2(long)}$, $D_{2(short)}$, D_3 and D_4 Dopamine Receptors by Amiloride and Amiloride Analogues. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 1045–1059.

(191) Garritsen, A.; Ijzerman, A. P.; Th. Tulp, M. M.; Cragoe, E. J.; Soudijn, W. Receptor Binding Profiles of Amiloride Analogues Provide No Evidence for a Link Between Receptors and the Na^+ /H^+ Exchange But Indicate a Common Structure on Receptor Proteins. *J. Recept. Res.* **1991**, *11*, 891–907.

(192) Massink, A.; Louvel, J.; Adlere, I.; Van Veen, C.; Huisman, B. J. H.; Dijksteel, G. S.; Guo, D.; Lenselink, E. B.; Buckley, B. J.; Matthews, H.; Ranson, M.; Kelso, M.; IJzerman, A. P. 5′-Substituted Amiloride Derivatives as Allosteric Modulators Binding in the Sodium Ion Pocket of the Adenosine A_{2A} Receptor. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 4769–4777.

(193) Mishra, C. B.; Sharma, D.; Prakash, A.; Kumari, N.; Kumar, N.; Luthra, P. M. Design and Synthesis of (4E)-4-(4-Substitutedbenzylideneamino)-3-Substituted-2,3-Dihydro-2-Thioxothiazole-5-Carbonitrile as Novel A_{2A} Receptor Antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6077–6083.

(194) Yuan, G.; Jones, G. B. Towards Next Generation Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 3918–3935.

(195) Shamim, M. T.; Ukena, D.; Padgett, W. L.; Daly, J. W. Effects of 8-Phenyl and 8-Cycloalkyl Substituents on the Activity of Mono-, Di, and Trisubstituted Alkylxanthines with Substitution at the 1-, 3-, and 7-Positions. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1231–1237.

(196) Sauer, R.; Maurinsh, J.; Reith, U.; Fülle, F.; Klotz, K.-N.; Müller, C. E. Water-Soluble Phosphate Prodrugs of 1-Propargyl-8-Styrylxanthine Derivatives, A_{2A}-Selective Adenosine Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 440–448.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(197) Müller, C. E.; Sauer, R.; Maurinsh, Y.; Huertas, R.; Fülle, F.; Klotz, K.-N.; Nagel, J.; Hauber, W. A_{2A}-Selective Adenosine Receptor Antagonists: Development of Water-Soluble Prodrugs and a New Tritiated Radioligand. *Drug Dev. Res.* **1998**, *45*, 190–197.

(198) Hauber, W.; Nagel, J.; Sauer, R.; Müller, C. E. Motor Effects Induced by a Blockade of Adenosine A_{2A} Receptors in the Caudate-Putamen: *NeuroReport* **1998**, *9*, 1803–1806.

(199) Vollmann, K.; Qurishi, R.; Hockemeyer, J.; Müller, C. E. Synthesis and Properties of a New Water-Soluble Prodrug of the Adenosine A_{2A} Receptor Antagonist MSX-2. *Molecules* **2008**, *13*, 348–359.

(200) Francis, J. E.; Cash, W. D.; Psychoyos, S.; Ghai, G.; Wenk, P.; Friedmann, R. C.; Atkins, C.; Warren, V.; Furness, P. Structure-Activity Profile of a Series of Novel Triazoloquinazoline Adenosine Antagonists. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1014–1020.

(201) Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; Moro, S.; Klotz, K.-N.; Leung, E.; Varani, K.; Gessi, S.; Merighi, S.; Borea, P. A. Pyrazolo[4,3-*e*]1,2,4-Triazolo[1,5- *c*]Pyrimidine Derivatives as Highly Potent and Selective Human A_3 Adenosine Receptor Antagonists: Influence of the Chain at the N^8 Pyrazole Nitrogen. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4768–4780.

(202) Neustadt, B. R.; Hao, J.; Lindo, N.; Greenlee, W. J.; Stamford, A. W.; Tulshian, D.; Ongini, E.; Hunter, J.; Monopoli, A.; Bertorelli, R.; Foster, C.; Arik, L.; Lachowicz, J.; Ng, K.; Feng, K.-I. Potent, Selective, and Orally Active Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists: Arylpiperazine Derivatives of Pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-Triazolo[1,5-c]Pyrimidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1376–1380.

(203) Shook, B. C.; Rassnick, S.; Hall, D.; Rupert, K. C.; Heintzelman, G. R.; Hansen, K.; Chakravarty, D.; Bullington, J. L.; Scannevin, R. H.; Magliaro, B.; Westover, L.; Carroll, K.; Lampron, L.; Russell, R.; Branum, S.; Wells, K.; Damon, S.; Youells, S.; Li, X.; Osbourne, M.; Demarest, K.; Tang, Y.; Rhodes, K.; Jackson, P. F. Methylene Amine Substituted Arylindenopyrimidines as Potent Adenosine A_{2A}/A_1 Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2864–2867.

(204) Federico, S.; Paoletta, S.; Cheong, S. L.; Pastorin, G.; Cacciari, B.; Stragliotto, S.; Klotz, K. N.; Siegel, J.; Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A.; Moro, S.; Spalluto, G. Synthesis and Biological Evaluation of a New Series of 1,2,4-Triazolo[1,5-*a*]-1,3,5-Triazines as Human A_{2A} Adenosine Receptor Antagonists with Improved Water Solubility. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 877–889.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(205) Minetti, P.; Tinti, M. O.; Carminati, P.; Castorina, M.; Di Cesare, M. A.; Di Serio, S.; Gallo, G.; Ghirardi, O.; Giorgi, F.; Giorgi, L.; Piersanti, G.; Bartoccini, F.; Tarzia, G. 2-*n* -butyl-9-methyl-8-[1,2,3]triazol-2-yl-9*H*-purin-6-ylamine and Analogues as A_{2A} Adenosine Receptor Antagonists. Design, Synthesis, and Pharmacological Characterization. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6887–6896.

(206) Yang, M.; Soohoo, D.; Soelaiman, S.; Kalla, R.; Zablocki, J.; Chu, N.; Leung, K.; Yao, L.; Diamond, I.; Belardinelli, L.; Shryock, J. C. Characterization of the Potency, Selectivity, and Pharmacokinetic Profile for Six Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2007**, *375*, 133–144.

(207) Gillespie, R. J.; Cliffe, I. A.; Dawson, C. E.; Dourish, C. T.; Gaur, S.; Jordan, A. M.; Knight, A. R.; Lerpiniere, J.; Misra, A.; Pratt, R. M.; Roffey, J.; Stratton, G. C.; Upton, R.; Weiss, S. M.; Williamson, D. S. Antagonists of the Human Adenosine A_{2A} Receptor. Part 3: Design and Synthesis of Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidines, Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidines and 6-Arylpurines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2924–2929.

(208) Gütschow, M.; Schlenk, M.; Gäb, J.; Paskaleva, M.; Alnouri, M. W.; Scolari, S.; Iqbal, J.; Müller, C. E. Benzothiazinones: A Novel Class of Adenosine Receptor Antagonists Structurally Unrelated to Xanthine and Adenine Derivatives. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3331–3341.

(209) Stößel, A.; Schlenk, M.; Hinz, S.; Küppers, P.; Heer, J.; Gütschow, M.; Müller, C. E. Dual Targeting of Adenosine A_{2A} Receptors and Monoamine Oxidase B by 4 *H* -3,1-Benzothiazin-4-Ones. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4580–4596.

(210) Langmead, C. J.; Andrews, S. P.; Congreve, M.; Errey, J. C.; Hurrell, E.; Marshall, F. H.; Mason, J. S.; Richardson, C. M.; Robertson, N.; Zhukov, A.; Weir, M. Identification of Novel Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists by Virtual Screening. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1904–1909.

(211) Congreve, M.; Andrews, S. P.; Doré, A. S.; Hollenstein, K.; Hurrell, E.; Langmead, C. J.; Mason, J. S.; Ng, I. W.; Tehan, B.; Zhukov, A.; Weir, M.; Marshall, F. H. Discovery of 1,2,4-Triazine Derivatives as Adenosine A_{2A} Antagonists Using Structure Based Drug Design. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1898–1903.

(212) Yu, F.; Zhu, C.; Xie, Q.; Wang, Y. Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists for Cancer I mmunotherapy: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 12196–12212.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(213) Zheng, J.; Yang, Z.; Li, X.; Li, L.; Ma, H.; Wang, M.; Zhang, H.; Zhen, X.; Zhang, X. Optimization of 6-Heterocyclic-2-(1*H*-Pyrazol-1-yl)-*N*-(Pyridin-2-yl)Pyrimidin-4-Amine as Potent Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists for the Treatment of Parkinson's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 674–682.

(214) Yang, Z.; Li, X.; Ma, H.; Zheng, J.; Zhen, X.; Zhang, X. Replacement of Amide with Bioisosteres Led to a New Series of Potent Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 152–155.

(215) Research, C. for D. E. and. https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/la-fda-aprueba-un-nuevo-medicamento-complementario-para-tratar-los-episodios-en-adultos-que-padecen (accessed 2024 -11 -19).

(216) ClinicalTrials.gov https://clinicaltrials.gov/study/NCT03051607 (accessed 2024 -11 -13).

(217) ClinicalTrials.gov https://clinicaltrials.gov/study/NCT01227265 (accessed 2024 -11 -13).

(218) ClinicalTrials.gov https://clinicaltrials.gov/study/NCT00442780 (accessed 2024 -11 -13).

(219) ClinicalTrials.gov https://clinicaltrials.gov/study/NCT02111330 (accessed 2024 -11 -13).

(220) ClinicalTrials.gov https://clinicaltrials.gov/study/NCT02655822 (accessed 2024 -11 -13).

(221) ClinicalTrials.gov https://clinicaltrials.gov/study/NCT05501054 (accessed 2024 -12 -02).

(222) ClinicalTrials.gov https://clinicaltrials.gov/study/NCT04089553 (accessed 2024 -11 -13).

(223) ClinicalTrials.gov https://clinicaltrials.gov/study/NCT04660812 (accessed 2024 -11 -13).

(224) ClinicalTrials.gov https://clinicaltrials.gov/study/NCT02403193 (accessed 2024 -12 -04).

(225) ClinicalTrials.gov https://clinicaltrials.gov/study/NCT05403385 (accessed 2024 -11 -13).

(226) Yu, F.; Zhu, C.; Ze, S.; Wang, H.; Yang, X.; Liu, M.; Xie, Q.; Lu, W.; Wang, Y. Design, Synthesis, and Bioevaluation of 2-Aminopteridin-7(8*H*)-One Derivatives as Novel

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Potent Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists for Cancer Immunotherapy. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 4367–4386.

(227) Zhu, C.; Ze, S.; Zhou, R.; Yang, X.; Wang, H.; Chai, X.; Fang, M.; Liu, M.; Wang, Y.; Lu, W.; Xie, Q. Discovery of Pyridinone Derivatives as Potent, Selective, and Orally Bioavailable Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists for Cancer Immunotherapy. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 4734–4754.

(228) Zhou, J.; Jiang, X.; He, S.; Jiang, H.; Feng, F.; Liu, W.; Qu, W.; Sun, H. Rational Design of Multitarget-Directed Ligands: Strategies and Emerging Paradigms. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8881–8914.

(229) Proschak, E.; Stark, H.; Merk, D. Polypharmacology by Design: A Medicinal Chemist's Perspective on Multitargeting Compounds. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 420–444.

(230) Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6523–6543.

(231) Savelieff, M. G.; Nam, G.; Kang, J.; Lee, H. J.; Lee, M.; Lim, M. H. Development of Multifunctional Molecules as Potential Therapeutic Candidates for Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Last Decade. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 1221–1322.

(232) Jiang, X.-Y.; Chen, T.-K.; Zhou, J.-T.; He, S.-Y.; Yang, H.-Y.; Chen, Y.; Qu, W.; Feng, F.; Sun, H.-P. Dual GSK-3β/AChE Inhibitors as a New Strategy for Multitargeting Anti-Alzheimer's Disease Drug Discovery. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 171–176.

(233) Renton, P.; Green, B.; Maddaford, S.; Rakhit, S.; Andrews, J. S. NOpiates: Novel Dual Action Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitors with μ-Opioid Agonist Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 227–231.

(234) Yan, W.; Ling, L.; Wu, Y.; Yang, K.; Liu, R.; Zhang, J.; Zhao, S.; Zhong, G.; Zhao, S.; Jiang, H.; Xie, C.; Cheng, J. Structure-Based Design of Dual-Acting Compounds Targeting Adenosine A_{2A} Receptor and Histone Deacetylase as Novel Tumor Immunotherapeutic Agents. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 16573–16597.

(235) Zhang, J.; Luo, Z.; Duan, W.; Yang, K.; Ling, L.; Yan, W.; Liu, R.; Wüthrich, K.; Jiang, H.; Xie, C.; Cheng, J. Dual-Acting Antitumor Agents Targeting the A2A Adenosine Receptor and Histone Deacetylases: Design and Synthesis of 4-(Furan-2-Yl)-1H-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-6-Amine Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *236*, 114326.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(236) Wang, H.; Yang, X.; Li, Y.; Ze, S.; Feng, B.; Weng, Y.; Gao, A.; Song, G.; Liu, M.; Xie, Q.; Wang, Y.; Lu, W. Subtle Structural Changes across the Boundary between A_{2A} R/A_{2B} R Dual Antagonism and A_{2B} R Antagonism: A Novel Class of 2-Aminopyrimidine-Based Derivatives. *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 5075–5092.

(237) Sams, A. G.; Mikkelsen, G. K.; Larsen, M.; Langgård, M.; Howells, M. E.; Schrøder, T. J.; Brennum, L. T.; Torup, L.; Jørgensen, E. B.; Bundgaard, C.; Kreilgård, M.; Bang-Andersen, B. Discovery of Phosphoric Acid Mono-{2-[(*E* / *Z*)-4-(3,3-Dimethyl-Butyrylamino)-3,5-Difluoro-Benzoylimino]-Thiazol-3-Ylmethyl} Ester (Lu AA47070): A Phosphonooxymethylene Prodrug of a Potent and Selective hA_{2A} Receptor Antagonist. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 751–764.

(238) Mikkelsen, G. K.; Langgård, M.; Schrøder, T. J.; Kreilgaard, M.; Jørgensen, E. B.; Brandt, G.; Griffon, Y.; Boffey, R.; Bang-Andersen, B. Synthesis and SAR Studies of Analogues of 4-(3,3-dimethyl-butyrylamino)-3,5-difluoro-*N*-thiazol-2-yl-benzamide (Lu AA41063) as Adenosine A_{2A} Receptor Ligands with Improved Aqueous Solubility. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1212–1216.

(239) Wang, H.; Yang, X.; Li, Y.; Ze, S.; Feng, B.; Weng, Y.; Gao, A.; Song, G.; Liu, M.; Xie, Q.; Wang, Y.; Lu, W. Subtle Structural Changes across the Boundary between A_{2A} R/A_{2B} R Dual Antagonism and A_{2B} R Antagonism: A Novel Class of 2-Aminopyrimidine-Based Derivatives. *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 5075–5092.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7 ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.1 ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 1. Immunosuppressive effects of ADO in immune system.. viii
Figure 2. Selection of $A_{2A}R$ antagonists that are currently in clinical trials for their use in cancer immunotherapy. viii
Figure 3. Design of the synthetic strategy carried out in Chapter I. ix
Figure 4. Structure of the 3 best compounds obtained in Chapter I and comparison of their pharmacological activity with the model compound. x
Figure 5. Design of the synthetic strategy carried out in Chapter II. xi
Figure 6. Structure of the 9 best selective $A_{2A}R$ antagonist obtained in Series IV (Chapter II) and comparison of their pharmacological activity with the model compound. xi
Figure 7. Structure of dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ antagonist obtained in series IV (Chapter II) and comparison of their pharmacological activity with the model compound. xii
Figure 8. Structure of the 3 best selective and potent $A_{2A}R$ antagonist obtained in Series V (Chapter II) and comparison of their pharmacological activity with the model compound. .. xiii
Figure 9. Results obtained from antiproliferative assays performed on the T47D tumor cell line. xiv
Figure 10. Results obtained from the immunomodulatory effects of the selected $A_{2A}R$ antagonist (4s and 5a) and the reference compound AZD-4635. xv
Figure 11. Design of the synthetic strategy carried out in Chapter III. xvi
Figure 12. Most potent dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ antagonists from Series VI obtained in Chapter III. xvii
Figure 13. Dual $A_{2A}R$/PARP1 ligands from Subseries VIIa. xviii
Figure 14. Dual $A_{2A}R$/PARP1 ligands from Subseries VIIb. xviii

Figura 1.1. Sistema purinérgico y sus integrantes. 3
Figura 1.2. Implicación de los receptores purinérgicos en el desarrollo de diversas patologías. 4
Figura 1.3. Estructura química de la ADO. 5
Figura 1.4. Síntesis, transporte y degradación de la adenosina. 6
Figura 1.5. Estructura general de los GPCR, concretamente del $A_{2A}R$. 7
Figura 1.6. Resumen de la señalización mediada por el A_1R. 14
Figura 1.7. Señalización mediada por el $A_{2A}R$. 15

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 1.8. Señalización mediada por el $A_{2B}R$ 15
Figura 1.9. Señalización mediada por el A_3R. 16
Figura 1.10. Ejemplos de oligómeros del $A_{2A}R$. 19
Figura 1.11. Estructura del A_{2A}RAR-StaR2-bRIL formando un complejo con el compuesto LJ-4517.. 21
Figura 1.12. Disposición del residuo de ribosa en el antagonista LJ-4517 y el agonista NECA unidos al A_{2A}RAR-StaR2-bRIL 22
Figura 1.13. Comparación de los sitios de unión del $A_{2A}R$ formando complejos con agonistas nucleosídicos, antagonistas nucleosídicos y antagonistas no nucleosídicos. 23
Figura 1.14. Puntos de control inmunitario. 25
Figura 1.15. Composición celular del MAT. 27
Figura 1.16. Comparación en la expresión media del $A_{2A}R$ entre el tejido sano y sus correspondientes tumores. 28
Figura 1.17. Resumen de las acciones derivadas de la ADO en las células tumorales y estromales. 30
Figura 1.18. Resumen de las acciones derivadas de la ADO en las diferentes células del sistema inmune. 34
Figura 1.19. ADO y sus principales rutas de metabolización. 35
Figura 1.20. Estructura de la ADO con los puntos de modificación resaltados (primera línea). Estructura de los primeros agonistas no selectivos del $A_{2A}R$ (segunda línea), agonistas selectivos obtenidos por modificación en el C-2 (tercera línea) y agonistas derivados de NECA obtenidos por modificación en la posición C-2 (cuarta línea).. 37
Figura 1.21. Moduladores alostéricos del $A_{2A}R$. 40
Figura 1.22. Antagonistas del $A_{2A}R$ xantínicos. 42
Figura 1.23. Principales derivados no xantínicos con estructura tricíclica. 44
Figura 1.24. Principales derivados no xantínicos con estructura bicíclica. 45
Figura 1.25. Principales derivados no xantínicos con estructura monocíclica. 47
Figura 1.26. Primer ensayo de evaluación de la actividad inmunomoduladora del compuesto VIIa 52
Figura 1.27. Segundo ensayo de evaluación de la actividad inmunomoduladora del compuesto VIIa 53
Figura 1.28. Evaluación de la actividad inmunomoduladora del compuesto VIIb. 55

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 1.29. Representación gráfica de las estrategias para el tratamiento multidiana 56
Figura 1.30. Estrategias de diseño racional de fármacos multidiana. 57
Figura 1.31.Diseño racional de un ligando multidiana mediante la técnica de *linking*. 58
Figura 1.32. Diseño racional de un ligando multidiana la técnica de *fusing*. 59
Figura 1.33. Diseño racional de un ligando multidiana mediante la técnica de *merging*. 60
Figura 1.34. Fármacos duales A_{2A}/HDAC. 62
Figura 1.35. Estructuras químicas de los mejores ligandos con actividad dual A_{2A}/A_{2B}..... 63
Figura 2.1. Estructura de LuAA-41063 y su profármaco LuAA-47070. 66
Figura 2.2. Análogos de LuAA-41063 con la solubilidad acuosa mejorada..... 67
Figura 2.3. Estrategia de diseño y diversidad explorada en el Capítulo I de la tesis. 69
Figura 2.4. Estrategia de diseño y diversidad empleada para la exploración exhaustiva de la molécula modelo en base a los resultados del Capítulo I. 70
Figura 2.5. Estrategia de diseño para los compuestos duales de las series VI-VII pertenecientes al Capítulo III. 71
Figura 3.1. Estrategia de diseño empleada para la obtención de nuevos derivados de LuAA-41063..... 73
Figura 3.2. Estructura general de los ligandos y puntos de diversidad explorados en este estudio. 76
Figura 3.3. Precursores sintéticos utilizados en el Capítulo I. 77
Figura 3.4. Estructura de los compuestos pertenecientes a la Serie I. 81
Figura 3.5. Estructura de los compuestos pertenecientes a la Serie II. 81
Figura 3.6. Estructura de los compuestos pertenecientes a la Serie III. 81
Figura 3.7. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto 1b en MeOD (300 MHz) (serie I)..... 82
Figura 3.8. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto 2e en DMSO-d_6 (500 MHz) (serie II). 82
Figura 3.9. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto 3e en $CDCl_3$ (300 MHz) (serie III)..... 83
Figura 3.10. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 3e en $CDCl_3$ (300 MHz) (serie III). 83
Figura 3.11. Comparación de los datos farmacológicos bibliográficos *vs* experimentales del ligando LuAA-41063. 86
Figura 3.12. Diagrama de barras evaluando la influencia del espaciador utilizado en el perfil adenosinérgico de los compuestos. 88
Figura 3.13. Comparación entre el mejor y el peor compuesto de la serie I con la molécula modelo..... 89

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 3.14. Comparación entre el mejor y el peor compuesto de la serie II con la molécula modelo. 89
Figura.3.15. Comparación entre el mejor y el peor compuesto de la serie III con la molécula modelo. 90
Figura 3.16. Comparación del efecto de *N*-metilación de la amida (R^1) para los compuestos de las series I y III. 91
Figura 3.17. Estructura general de los compuestos seleccionados para realizar las simulaciones de *docking* molecular. 93
Figura 3.18. Modo general de unión de los ligandos modelos y los nuevos derivados sintetizados. 94
Figura 3.19. Resultados de la simulación de dinámica molecular (25 ns) de las series I-III. Comparación del promedio de los enlaces de hidrógeno proteína-ligando de las series I-III y las moléculas modelo. 95
Figura 3.20. Resultados de la simulación de dinámica molecular (25 ns) de las series I-III. A) Gráfico de dispersión que muestra la comparación de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) de la Subestructura del *Scaffold* (SCS, en rojo) entre las series I-III y los ligandos modelo. B) Mapa de calor que ilustra la RMSD de la SCS por fotograma para cada ligando. C) Gráfico de violín que muestra la RMSD promedio en los últimos 3 ns para cada serie, resaltando diferencias significativas entre las series I y III. 96
Figura 3.21. Resultados de la simulación de dinámica molecular (25 ns) de las series I-III. Fluctuación Cuadrática Media Promedio (RMSF) para el $A_{2A}R$, con la estructura secundaria y los residuos relacionados con el sitio de unión indicados en azul. 97
Figura 3.22. Estructura y datos farmacológicos de los mejores compuestos obtenidos en el Capítulo I. 98
Figura 3.23. Comparación de los datos de afinidad del ligando de referencia y el mejor compuesto obtenido en la serie III mediante la U-4CR 99
Figura 3.24. Estructuras generales de las series IV (Ugi-4CR, izquierda) y V (Ugi-Split, derecha) y diversidades introducidas durante la exploración del farmacóforo secundario. 100
Figura 3.25. Analogía estructural entre los ligandos de la serie IV y la serie V. 101
Figura 3.26. Precursores sintéticos utilizados en el Capítulo II. 102
Figura 3.27. Estructura de los 26 compuestos pertenecientes a la serie IV. 104
Figura 3.28. Espectro de ^1H RMN del compuesto 4f en MeOD (500 MHz). 105

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Figura 3.29. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto 4k en $CDCl_3$ (300 MHz)..... 105
Figura 3.30. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto 4j en $CDCl_3$ (500 MHz). 106
Figura 3.31. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 4j en $CDCl_3$ (500 MHz). 106
Figura 3.32. Estructura de los 12 compuestos pertenecientes a la serie V. 108
Figura 3.33. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto 5a en $CDCl_3$ (300 MHz)..... 109
Figura 3.34. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 5a en $CDCl_3$ (300 MHz)..... 109
Figura 3.35. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto 5f en $CDCl_3$ (300 MHz). 110
Figura 3.36. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 5l en $CDCl_3$ (300 MHz). 110
Figura 3.37.Estructura general de los ligandos de la serie IV.....116
Figura 3.38. Ligandos de la serie IV agrupados en base a su afinidad $A_{2A}R$. Resaltados en verde los 9 antagonistas con una K_i $A_{2A}R$ < 15 nM. 117
Figura 3.39. Comparación de la variación del efecto del sustituyente en R^1 dependiendo del R^3 utilizado. A) En los derivados con Bn y Cy los compuestos con $R^1 = CH_3$ tienen mayor afinidad. B) En los derivados con *t*-Bu y CH_2-$COOCH_3$ los compuestos con R^1 = H tienen mayor afinidad. 118
Figura 3.40. Aumento de la selectividad de los derivados mediante *N*-metilación en la posición R^1. 119
Figura 3.41. Comparación del impacto del sustituyente en R^2 en la afinidad de los derivados. 121
Figura 3.42. Resultados de afinidad de compuestos con R^3 = Cy 122
Figura 3.43. Resultados de afinidad de los compuestos con R^3 = *t*-Bu. 122
Figura 3.44. Representación gráfica de la tendencia observada en la afinidad debida al efecto de los sustituyentes en R^1 y R^2 cuando $R^3 = CH_3$-$CONH_2$. 124
Figura 3.45. Representación gráfica de la tendencia observada en la afinidad debida al efecto de los sustituyentes en R^1 y R^2 cuando $R^3 = CH_3COOCH_3$. 125
Figura 3.46. Selección de los mejores ligandos del $A_{2A}R$ de la serie IV y su comparación con el ligando de referencia. 126
Figura 3.47. Mejores antagonistas selectivos del $A_{2A}R$ obtenidos en la serie IV. 127
Figura 3.48. Mejores antagonistas con afinidad dual A_{2A}/A_{2B} obtenidos en la serie IV. 128
Figura 3.49. Analogía estructural entre los compuestos $R^1 = CH_3$ de la serie IV y los compuestos de la serie V. 129
Figura 3.50. Comparación en la afinidad por el $A_{2A}R$ en base a la sustitución en R^2. 129

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 3.51. Tendencias observadas durante el análisis de la influencia del sustituyente en R^3. 130
Figura 3.52. Comparación de los datos de afinidad y selectividad entre los mejores derivados obtenidos en la serie V y el ligando de referencia. 131
Figura 3.53. Ligandos seleccionados para el estudio de docking del Capítulo II. 132
Figura 3.54. Visualización de las interacciones con el sitio de unión ortostérico para el compuesto 3c (serie III) y B) 5c (serie V) mostrando la molécula de agua introducida durante la simulación de *docking* molecular..... 133
Figura 3.55. Gráfico de dispersión que muestra la comparación de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) de los ligandos de las series III (verde), V (violeta) y el ligando modelo (negro). 135
Figura 3.56. Resultados de la simulación de dinámica molecular (25 ns) de las series III y V. Comparación del promedio de los enlaces de hidrógeno proteína-ligando de las series III y V. 136
Figura 3.57. Resultados de la simulación de dinámica molecular (25 ns) de los compuestos 5a, 5b, 5c, 5d y 5e..... 137
Figura 3.58. Compuestos seleccionados para la separación y evaluación enantiomérica. 138
Figura 3.59. Cromatogramas de la mezcla racémica y enantiómeros del compuesto 4s. 139
Figura 3.60. Cromatogramas de la mezcla racémica y enantiómeros del compuesto 4ñ. 140
Figura 3.61. Cromatogramas de la mezcla racémica y enantiómeros del compuesto 5k. 141
Figura 3.62. Efecto antiproliferativo de los compuestos LuAA-41063, AZD-4635, 4j, 4s y 4y, expresado en porcentaje de la inhibición de la proliferación celular en la línea T47D.. 147
Figura 3.63. Estructura de los antagonistas $A_{2A}R$ seleccionados (4s y 5a) y el compuesto de referencia AZD-4635. 148
Figura 3.64. Gráfico de barras con los resultados del ensayo de viabilidad celular en PBMCs. 149
Figura 3.65. Resultados de la reactivación de la actividad inmunitaria expresada en % de la expresión del marcador CD25 para los compuestos: A) AZD-4635, B) 4s y C) 5a. 150
Figura 3.66. Resultados de la reactivación de la actividad inmunitaria expresada en % de la expresión del marcador CD69 para los compuestos: A) AZD-4635, B) 4s y C) 5a 150
Figura 3.67. Resultados de la reactivación de la actividad inmunitaria expresada en % de la expresión del marcador CTLA-4 para los compuestos: A) AZD-4635, B) 4s y C) 5a..... 152

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 3.68. Selección de los mejores antagonistas selectivos y con afinidad K_i $A_{2A}R$ < 10 nM obtenidos en el Capítulo II. 153
Figura 3.69. Efectos derivados de la regulación del eje adenosinérgico en el contexto del cáncer. 154
Figura 3.70. Estructuras de los compuestos con afinidad dual obtenidos en las series III y IV 155
Figura 3.71. Estructura general de la Serie VI y diversidades introducidas durante la búsqueda de compuestos duales A_{2A}/A_{2B} realizada en el Capítulo III. 156
Figura 3.72. Precursores sintéticos utilizados en la serie VI del Capítulo III. 157
Figura 3.73. Estructura de los 27 compuestos pertenecientes a la serie VI. 159
Figura 3.74. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto 6a en $CDCl_3$ (300 MHz). 160
Figura 3.75. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto 6k en $CDCl_3$ (300 MHz)..... 160
Figura 3.76. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 6c en $CDCl_3$ (300 MHz)..... 161
Figura 3.77. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 6b en DMSO-d_6 (300 MHz). 161
Figura 3.78. Datos de afinidad obtenidos para el grupo con R^3 = (3-piridil)metilo. 165
Figura 3.79. Datos de afinidad obtenidos para el grupo con R^3 = fenetilo. 166
Figura 3.80. Datos de afinidad obtenidos para el grupo con R^3 = 2-metil-3-fenilpropanoato-2-ilo.. 167
Figura 3.81. Datos de afinidad obtenidos para el grupo con R^3 = 2-metil-3-fenilpropanamida-2-ilo. 168
Figura 3.82. Datos de afinidad obtenidos para el grupo con R^3 = fenilo.. 169
Figura 3.83. Datos de afinidad obtenidos para el grupo con R^3 = 4-piridilo.. 170
Figura 3.84. Mejores ligandos con afinidad dual obtenidos en la serie VI. 171
Figura 3.85. Efectos derivados de la regulación del eje adenosinérgico y de la vía de la integridad genómica en el contexto del cáncer. 173
Figura 3.86. Farmacóforos seleccionados y ligandos derivados de los mismos. 174
Figura 3.87. Estructuras generales de las series VIIa (Ugi-4CR, arriba) y la serie VIIb (Ugi-Split, abajo) sintetizadas en el Capítulo III.. 174
Figura 3.88. Precursores sintéticos utilizados en la serie VII del Capítulo III..... 176
Figura 3.89. Estructura de los 6 ligandos duales A_{2A}/PARP1 sintetizados en cada subserie..179
Figura 3.90. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 7c en $CDCl_3$ (300 MHz)..... 180
Figura 3.91. Espectro de ^{1}H RMN del compuesto 7d en $CDCl_3$ (300 MHz)..... 180

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 3.92. Estructura del compuesto con mayor afinidad hacia el $A_{2A}R$. 185
Figura 3.93. Comparación del efecto del espaciador en la inhibición de la enzima PARP1.. 185
Figura 3.94. Estructura del compuesto con mejor actividad sobre la enzima PARP1..... 186
Figura 3.95. Estructura de los dos mejores ligandos duales A_{2A}/PARP1 obtenidos en la serie VII y su comparación con las moléculas modelo. 186
Figura 3.96. Estructura de los mejores compuestos con afinidad dual $A_{2A}R/A_{2B}R$ (arriba) y con actividad dual $A_{2A}R$/PARP1 (abajo). 187

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.2 ÍNDICE DE TABLAS

Table 1. Results obtained from antiproliferative assays performed on the HTB-70 tumor cell line..... xiii

Tabla 1.1. Características moleculares de los receptores de ADO. 8
Tabla 1.2. Efecto de la activación de los 4 subtipos de receptores ADO sobre la adenilato ciclasa..... 13
Tabla 1.3. Datos de afinidad de los agonistas del $A_{2A}R$. 38
Tabla 1.4. Ejemplos del desempeño en ensayos clínicos de los agonistas del $A_{2A}R$. 39
Tabla 1.5. Datos de afinidad de los antagonistas xantínicos. 42
Tabla 1.6. Datos de afinidad de los antagonistas no xantínicos. 48
Tabla 1.7. Desempeño de los antagonistas del $A_{2A}R$ en ensayos clínicos para la enfermedad de Parkinson. 49
Tabla 1.8. Situación actual de algunos antagonistas del $A_{2A}R$ en ensayos clínicos para la inmunoterapia contra el cáncer. 50
Tabla 1.9. Actividad biológica de los compuestos en las dianas GSK-3β, hAChE y hBuChE.58
Tabla 1.10. Actividad biológica de los compuestos en las dianas hAChE, MAO-A y MAO-B. 59
Tabla 1.11. Actividad biológica de los compuestos en las dianas MOP y NOS. 60
Tabla 1.12. Datos de actividad biológica de los farmacóforos de partida y de los mejores ligandos obtenidos en ambos trabajos. 62
Tabla 1.13. Datos de actividad biológica de los antagonistas duales A_{2A}/A_{2B}. 64
Tabla 3.1. Estructura general y datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina de los compuestos pertenecientes a las series I-III (1a-f-3a-f). 85
Tabla 3.2. Estructura general y datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina de los compuestos pertenecientes a la serie IV (4a-y). 112
Tabla 3.3. Estructura general y datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina de los compuestos pertenecientes a la serie V (5a-l). 113
Tabla 3.4. Datos de actividad funcional de los compuestos 3a, 3d, 4ñ y 5k. 114
Tabla 3.5. Solubilidad de los antagonistas $A_{2A}R$ seleccionados. 115
Tabla 3.6. Datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina de los compuestos resueltos enantioméricamente. 142

USC DE COMPOSTELA

Tabla 3.7. Resultados obtenidos en los ensayos de antiproliferación realizados en la línea celular tumoral HTB-70.....145
Tabla 3.8. Estructura general y datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina de los compuestos pertenecientes a la serie VI 6a-z.....163
Tabla 3.9. Estructura general y datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina y la enzima PARP1 de los compuestos pertenecientes a la serie VIIa 7a-c. 182
Tabla 3.10. Estructura general y datos de afinidad obtenidos sobre los cuatro subtipos de receptores de adenosina y la enzima PARP1 de los compuestos pertenecientes a la serie VIIb 7d-f. 183

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.3 ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 3.1. Representación de la reacción de U-4CR. 74
Esquema 3.2. Representación del mecanismo más aceptado para la reacción de U-4CR. 75
Esquema 3.3. Ruta sintética empleada para la obtención de los ácidos carboxílicos empleados como precursores para la reacción de Ugi-4CR. 78
Esquema 3.4. Ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos 1a-f-3a-f pertenecientes al Capítulo I basada en la reacción de Ugi-4CR.. 80
Esquema 3.5. Esquema general de la reacción de Ugi-Split. 102
Esquema 3.6. Ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos 4a-y pertenecientes a la serie IV del Capítulo II basada en la reacción de Ugi-4CR. 103
Esquema 3.7. Ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos 5a-l pertenecientes a la Serie V del Capítulo II basada en la reacción de Ugi-Split.. 107
Esquema 3.8. Ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos 6a-z pertenecientes a la serie VI del Capítulo III basada en la reacción de Ugi-4CR. 158
Esquema 3.9. Reacción empleada para la obtención de los derivados de Olaparib funcionalizados. 175
Esquema 3.10. Ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos 7a-c pertenecientes a la subserie VIIa del Capítulo III basada en la reacción de Ugi-4CR..... 176
Esquema 3.11 Ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos 7d-f pertenecientes a la subserie VIIb del Capítulo III basada en la reacción de Ugi-Split.. 177

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8 APÉNDICES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8.1 APÉNDICE 1. CONFLICTO DE INTERESES

El doctorando, Hugo Fojo Carballo, afirma que no existe ningún conflicto de intereses asociados a esta Tesis Doctoral.

Santiago de Compostela, 09 de Julio, 2025.

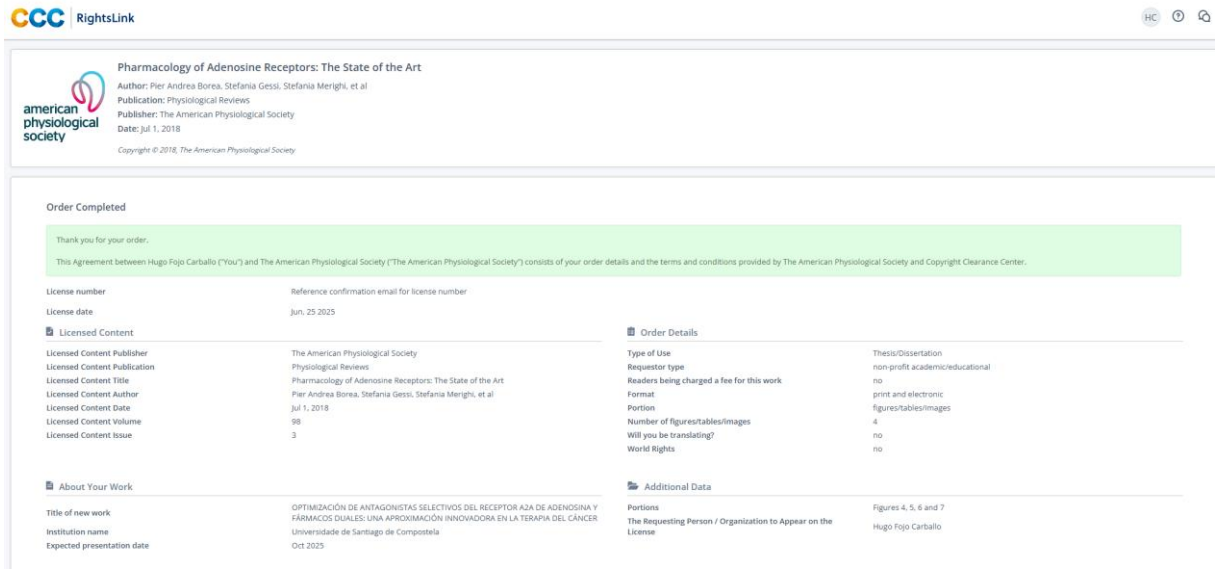
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8.2 APÉNDICE 2. PERMISO DE REPRODUCCIÓN DE IMÁGENES Y FIGURAS

Figura 1.2. reproducida sin modificar de la referencia 9: (Imagen de: Huang, Z.; Xie, N.; Illes, P.; Di Virgilio, F.; Ulrich, H.; Semyanov, A.; Verkhratsky, A.; Sperlagh, B.; Yu, S.-G.; Huang, C.; Tang, Y. From Purines to Purinergic Signalling: Molecular Functions and Human Diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 162. DOI: https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z). Copyright© 2021. This publication is licensed under CC BY 4.0. https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figuras 1.6, 1.7, 1.8 y 1.9 reproducidas sin modificar de la referencia 29: (Imagen de: Borea, P. A.; Gessi, S.; Merighi, S.; Vincenzi, F.; Varani, K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 1591–1625. DOI: 10.1152/physrev.00049.2017). Copyright© 2018. The American Physiological Society



CCC RightsLink

american physiological society

Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art

Author: Pier Andrea Borea, Stefania Gessi, Stefania Merighi, et al
Publication: Physiological Reviews
Publisher: The American Physiological Society
Date: Jul 1, 2018

Copyright © 2018, The American Physiological Society

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Hugo Fojo Carballo ("You") and The American Physiological Society ("The American Physiological Society") consists of your order details and the terms and conditions provided by The American Physiological Society and Copyright Clearance Center.

License number	Reference confirmation email for license number
License date	Jun, 25 2025

Licensed Content

Licensed Content Publisher	The American Physiological Society
Licensed Content Publication	Physiological Reviews
Licensed Content Title	Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art
Licensed Content Author	Pier Andrea Borea, Stefania Gessi, Stefania Merighi, et al
Licensed Content Date	Jul 1, 2018
Licensed Content Volume	98
Licensed Content Issue	3

Order Details

Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	non-profit academic/educational
Readers being charged a fee for this work	no
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/images
Number of figures/tables/images	4
Will you be translating?	no
World Rights	no

About Your Work

Title of new work	OPTIMIZACIÓN DE ANTAGONISTAS SELECTIVOS DEL RECEPTOR A2A DE ADENOSINA Y FÁRMACOS DUALES: UNA APROXIMACIÓN INNOVADORA EN LA TERAPIA DEL CÁNCER
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Oct 2025

Additional Data

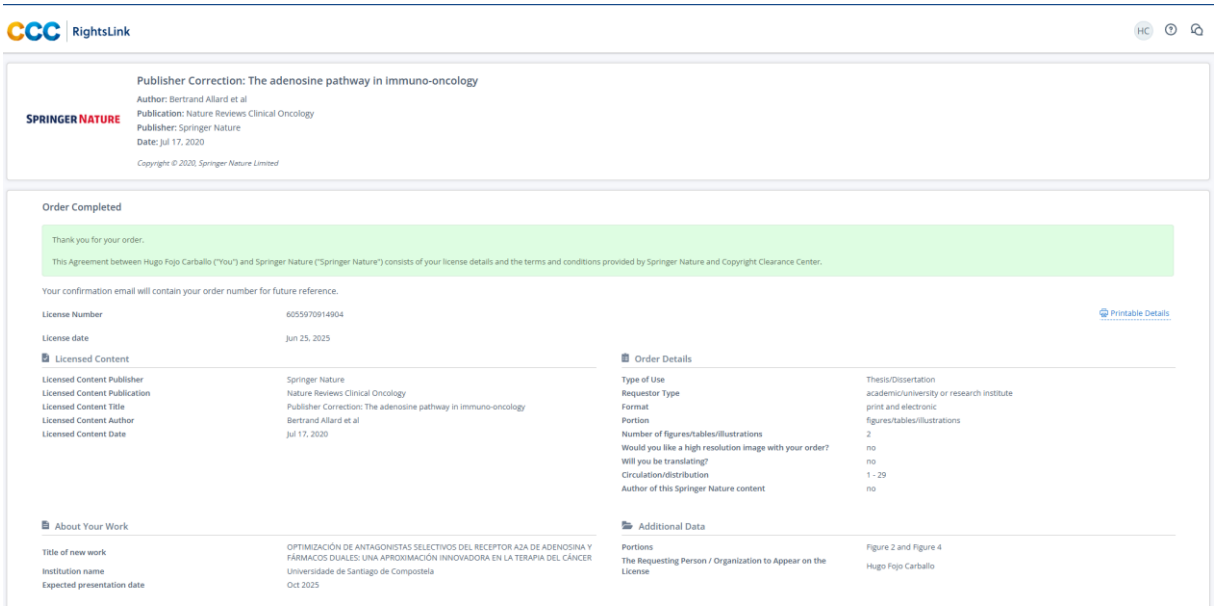
Portions	Figures 4, 5, 6 and 7
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Hugo Fojo Carballo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figuras 1.11, 1.12 y 1.13 reproducidas sin modificar de la referencia 105: (Imágenes de: Shiriaeva, A.; Park, D.; Kim, G.; Lee, Y.; Hou, X.; Jarhad, D. B.; Kim, G.; Yu, J.; Hyun, Y. E.; Kim, W.; Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A.; Han, G. W.; Stevens, R. C.; Jeong, L. S.; Choi, S.; Cherezov, V. GPCR Agonist-to-Antagonist Conversion: Enabling the Design of Nucleoside Functional Switches for the A_{2A} Adenosine Receptor. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, (17) 11648–11657. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00462). Copyright© 2022 The Authors. Published by American Chemical Society. This publication is licensed under CC-BY-NC-ND 4.0. https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figuras 1.16 y 1.18 reproducidas sin modificar de la referencia 111: (Imágenes de: Allard, B.; Allard, D.; Buisseret, L.; Stagg, J. The Adenosine Pathway in Immuno-Oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 611–629. DOI: https://doi.org/10.1038/ s41571-020-0382-2). Copyright© 2020 Springer Nature Limited.



CCC RightsLink

SPRINGER NATURE

Publisher Correction: The adenosine pathway in immuno-oncology

Author: Bertrand Allard et al
Publication: Nature Reviews Clinical Oncology
Publisher: Springer Nature
Date: Jul 17, 2020

Copyright © 2020, Springer Nature Limited

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Hugo Fojo Carballo ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

Printable Details

License Number	6055970914904
License date	Jun 25, 2025

Licensed Content

Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Clinical Oncology
Licensed Content Title	Publisher Correction: The adenosine pathway in immuno-oncology
Licensed Content Author	Bertrand Allard et al
Licensed Content Date	Jul 17, 2020

Order Details

Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor Type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Would you like a high resolution image with your order?	no
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no

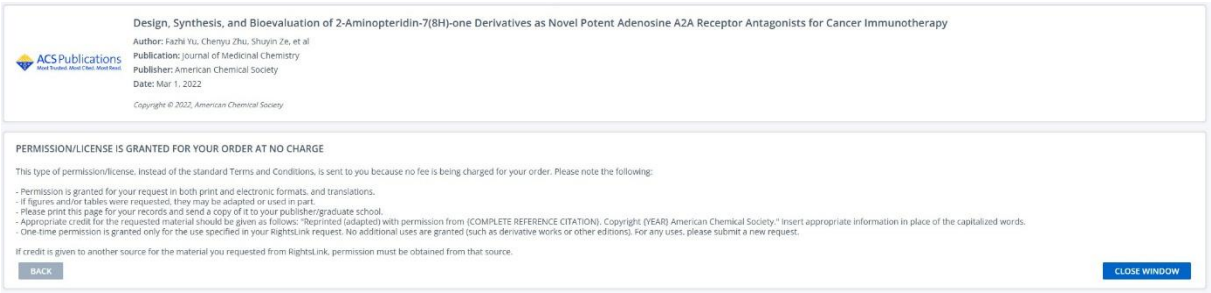
About Your Work

Title of new work	OPTIMIZACIÓN DE ANTAGONISTAS SELECTIVOS DEL RECEPTOR A2A DE ADENOSINA Y FÁRMACOS DUALES: UNA APROXIMACIÓN INNOVADORA EN LA TERAPIA DEL CÁNCER
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Oct 2025

Additional Data

Portions	Figure 2 and Figure 4
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Hugo Fojo Carballo

Figuras 1.26 y 1.27 reproducidas sin modificar de la referencia 226: (Imágenes de: Yu, F.; Zhu, C.; Ze, S.; Wang, H.; Yang, X.; Liu, M.; Xie, Q.; Lu, W.; Wang, Y. Design, Synthesis, and Bioevaluation of 2-Aminopteridin-7-(*8H*)-One Derivatives as Novel Potent Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists for Cancer Immunotherapy. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, (5) 4367–4386. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c02199). Copyright© 2022 American Chemical Society.



ACS Publications

Design, Synthesis, and Bioevaluation of 2-Aminopteridin-7(8H)-one Derivatives as Novel Potent Adenosine A2A Receptor Antagonists for Cancer Immunotherapy

Author: Fazhi Yu, Chenyu Zhu, Shuyin Ze, et al
Publication: Journal of Medicinal Chemistry
Publisher: American Chemical Society
Date: Mar 1, 2022

Copyright © 2022, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

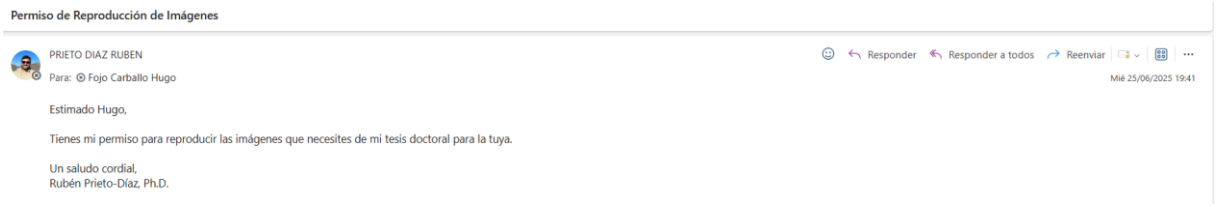
BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 1.28 reproducida sin modificar de la referencia 227. (Imagen de: Zhu, C.; Ze, S.; Zhou, R.; Yang, X.; Wang, H.; Chai, X.; Fang, M.; Liu, M.; Wang, Y.; Lu, W.; Xie, Q. Discovery of Pyridinone Derivatives as Potent, Selective, and Orally Bioavailable Adenosine A_{2A} Receptor Antagonists for Cancer Immunotherapy. *J. Med. Chem*. **2023**, *66*, (7) 4734–4754. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01860). Copyright© 2023 American Chemical Society.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figuras 1, 1.4, 1.14, 1.15 y 1.17, reproducidas de Prieto-Díaz, R.; A_{2B} adenosine receptor as a novel target in cancer immunotherapy: validation and optimization of new ligands; Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 2022.

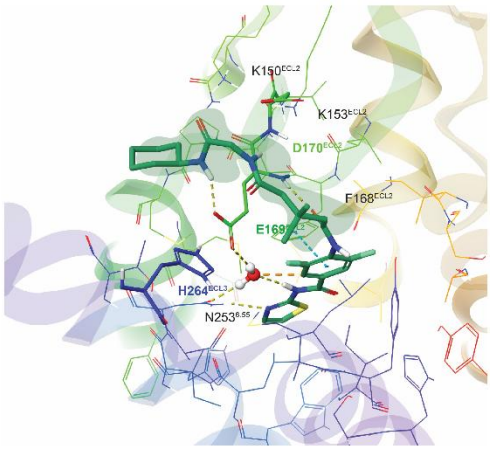


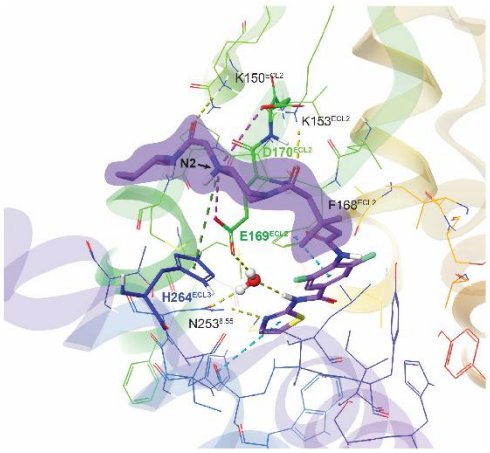
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El doctorando Hugo Fojo Carballo, afirma que el resto de las imágenes, esquemas y figuras presentadas en esta Tesis Doctoral han sido elaboradas por él.

Santiago de Compostela, 09 de Julio, 2025.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA





La presente tesis doctoral se centra en el diseño, síntesis y caracterización de nuevas entidades químicas dirigidas al receptor de adenosina A_{2A} ($A_{2A}R$), incluyendo antagonistas selectivos de $A_{2A}R$, antagonistas duales $A_{2A}R/A_{2B}R$ y compuestos con actividad dual $A_{2A}R$ /PARP1. El trabajo aborda el desarrollo de una colección diversa de compuestos mediante estrategias de diseño racional, su evaluación farmacológica avanzada, estudios de relación estructura-actividad y computacionales. La investigación permitió identificar moléculas con alta afinidad y selectividad, capaces de revertir la inmunosupresión mediada por adenosina en células mononucleares de sangre periférica humana, así como de reducir la proliferación en líneas celulares tumorales.