



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

“Diseño, síntesis y estudios *in silico* de profármacos de adenosina”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Eduardo Hernández Vázquez



TUTOR: Dr. Francisco Hernández Luis AÑO: 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal Dr. Gabriel Eduardo Cuevas González-Bravo
Vocal Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano
Vocal Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez
Secretario Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Departamento de Farmacia, Laboratorio 122, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM; Parte del presente trabajo se presentó en el 44° Congreso Mexicano de Química, Puebla, 26-30 septiembre de 2009 y en el QuimiUNAM 2009, México D.F., 18-20 de noviembre de 2009.

ASESOR:

Dr. Francisco Hernández Luis

SUSTENTANTE:

Q.F.B. Eduardo Hernández Vázquez

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar durante más de 9 años, dándome todo lo necesario para forjarme personal y profesionalmente, así como también ser el lugar donde maduré y encontré la verdadera amistad, valores y prácticamente todo lo que necesito para mi vida futura.

Al Dr. Francisco Hernández Luis por aceptarme en su grupo de investigación, por los consejos que me dio durante la realización de mis estudios de maestría y por iniciarme en el maravilloso y gratificante mundo de la investigación y la docencia, muchas gracias.

A mi familia por ser el sostén de mi vida y por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida. A mis padres por darme la vida y apoyarme económica y espiritualmente en mis estudios. A mis hermanos Judith, Virginia y Daniel por compartir aventuras y toda una vida juntos. A mis sobrinos Montserrat, Carlos, Rebeca, Ana, Nahomi y Katherine por alegrar mi día en su visitas a mi cuarto. Finalmente a la mini, parte muy importante de mi vida, siendo la única que se desvela conmigo y me acompaña en los buenos y malos momentos.

A mis amigos y hermanos de carrera y vida: Cynthia, Cynthia M., Ismael y Sitali (ordenados de acuerdo como los conocí para evitar reclamos): el espacio me es insuficiente para describir lo agradecido que estoy con la vida por haberlos puesto en mi camino, así como también todas las gratas y malas experiencias que hemos pasado y las que nos faltan; ¡Viva la élite QFB 2004! Un especial agradecimiento a Ángel Valencia Moreno, parte fundamental de mi formación personal y haber compartido tantos momentos de diversión, estudio y cartas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A los miembros del jurado por la revisión oportuna y exhaustiva del presente escrito, así como por los consejos, correcciones y observaciones del mismo.

A los integrantes del laboratorio 122 del conjunto E por sus consejos, compañerismo y amistad generados a lo largo de mi estancia. Especial mención merece Antonio Romo Macillas por ser mi instructor en la parte computacional, y Georgina Ledezma y Fernando López por hacer más divertidas las horas de columna y purificación.

Al personal técnico de la USAI por la asistencia técnica en la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas e infrarrojo.

A la Dr. Victoria Chagoya por la realización de las pruebas biológicas y mostrar gran interés en la realización de este proyecto.

Y a todas las personas que han contribuido directa o indirectamente a la realización de esta tesis y en general a mi formación personal y profesional, muchas gracias.

Dedicatoria

A mis padres, hermanos, sobrinos, amigos y panda que sin ellos no sería posible la realización de este trabajo, les debo más que mi vida, mi profesión y mi felicidad.

ABREVIATURAS

4-DMAP	4-dimetilaminopiridina
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
Asp	ácido aspártico
Glu	ácido glutámico
<i>p</i> -TsOH	ácido <i>p</i> -toluensulfónico
TFA	ácido trifluoroacético
AK	adenosina cinasa
ADA	adenosina desaminasa
Cbz	benciloxicarbonil
FAB	bombardero rápido por átomos
KBr	bromuro de potasio
BuOH	n-butanol
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -butanol
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
CDI	carbonyldiimidazol
hCE1	carboxilesterasa humana 1
CAT	catalasa
CHCl ₃	cloroformo
HSQC	correlación cuántica heteronuclear simple
ccf	cromatografía en capa fina
DCI	dicilohexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
DIPEA	diisopropiletilamina
DMF	dimetilformamida
DiFAC	diseño de fármacos asistido por computadora
ROS	especies reactivas de oxígeno
COSY	espectroscopía de correlación
EM	espectrometría de masas
EMFAB ⁺	espectrometría de masas (técnica de FAB iones positivos)
IR	espectroscopia Infrarrojo
HR-FAB ⁺	FAB de alta resolución
R _f	factor de retención
Phe	fenilalanina
Ph	fenilo

ABREVIATURAS

GSH	glutación
°C	grado Celsius
G	gramos
Gly	glicina
His	histidina
H	hora
Leu	leucina
MM	masa molar
MeOH	metanol
Met	metionina
mL	mililitros
%ar	porcentaje de abundancia relativa
p.f.	punto de fusión
RMN- ¹³ C	resonancia magnética nuclear de Carbono
RMN- ¹ H	resonancia magnética nuclear de Hidrógeno
Ser	serina
SOD	superóxido dismutasa
MAOS	síntesis orgánica asistida por microondas
TEA	trietilamina

RESUMEN

En este trabajo se diseñaron sintetizaron y evaluaron cinco profármacos de adenosina utilizando los aminoácidos prolina, tioprolina, glicina, alanina y β -alanina como porciones modificadoras, entidades químicas empleadas para resolver diversos problemas farmacéuticos que son eliminados posteriormente por el metabolismo. El diseño consideró que los profármacos liberarían a la adenosina por hidrólisis enzimática de un grupo funcional éster. El propósito fue contar con moléculas que retarden el metabolismo de la adenosina, por la adenosina desaminasa, para ponerla en perspectiva de utilizarla en una de las actividades biológicas que esta molécula presenta —la cirrosis hepática. La síntesis de los profármacos se llevó a cabo con rendimientos del 40 al 60% y la mayoría de ellos se obtuvieron como sustancias líquidas. Las estructuras fueron establecidas por procedimientos espectroscópicos y espectrométricos. De los compuestos obtenidos, el profármaco constituido por adenosina y tioprolina fue el que presentó el mejor comportamiento, así como también mostró menor toxicidad en un modelo *in vivo* con respecto a la adenosina. Para tratar de explicar los resultados obtenidos frente a la enzima adenosina desaminasa y conocer si los profármacos se hidrolizarán por una esterasa (carboxilesterasa humana 1), se realizaron estudios exploratorios de acoplamiento molecular.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. La adenosina como sustancia bioactiva	2
2.2. Los profármacos en la Química Farmacéutica	10
2.3. Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC)	14
2.4.1. Acoplamiento molecular (Docking)	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	17
5.1. Objetivo General	17
5.2. Objetivos Particulares	17
6. METODOLOGÍA	18
6.1. Parte Química	18
6.1.1. Consideraciones para el diseño de los profármacos	18
6.1.1.1 Aminoácidos	19
6.1.1.2 Compuestos con azufre	19
6.1.1.3 Profármacos a sintetizar	20
6.1.2. Síntesis de los profármacos	22
6.1.2.1. Protección de la adenosina	22
6.1.2.2. Protección de los aminoácidos	22
6.1.2.3. Síntesis de (<i>S</i>)-pirrolidín-2-carboxilato de adenosin-5'-ilo (I) y (<i>S</i>)-pirrolidín-2-carboxilato de 2',3'- <i>O</i> - isopropilidenadenosin-5'-ilo (VI)	23
6.1.2.4. Síntesis de (<i>R</i>)-tiazolidín-4-carboxilato de adenosin-5'-ilo (II) y (<i>R</i>)-tiazolidín-4-carboxilato de 2',3'- <i>O</i> - isopropilidenadenosin-5'-ilo (VII)	23
6.1.2.5. Síntesis de glicinato de adenosin-5'-ilo (III) y glicinato de 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosin-5'-ilo (VIII)	24
6.1.2.6. Síntesis de 3-aminopropanoato de adenosin-5'-ilo (IV) y 3-aminopropanoato de 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosin-5'- ilo (IX)	25
6.1.2.7. Síntesis de (<i>S</i>)-alaninato de adenosin-5'-ilo (V) y (<i>S</i>)- alaninato de 2'-3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosin-5'-ilo (X)	25
6.2. Parte biológica	26
6.3. Parte computacional	26

6.3.1. Elección de las estructuras cristalizadas de las enzimas	26
6.3.2. Estudio de acoplamiento molecular	27
6.3.2.1. Preparación del ligando.	27
6.3.2.2. Preparación de la proteína	27
6.3.2.3. Acoplamiento molecular	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1. Parte Química	28
7.1.1. Obtención y caracterización de 2',3'-O-isopropilidenadenosina.	33
7.1.2. Protección de los aminoácidos.	38
7.1.3. Obtención y caracterización de los profármacos I y VI.	39
7.1.4. Obtención y caracterización de los profármacos II y VII	46
7.1.5. Obtención y caracterización de los profármacos III y VIII.	48
7.1.6. Obtención y caracterización de los profármacos IV y IX.	49
7.1.7. Obtención y caracterización de los profármacos V y X.	50
7.2. Parte biológica	52
7.3. Parte computacional	53
7.3.1. Metabolismo por adenosina desaminasa	54
7.3.2. Hidrólisis de los profármacos	59
7.3.3. Evaluación de las energías de unión de los profármacos XI-XIV.	62
8. CONCLUSIONES	65
PERSPECTIVAS	67
REFERENCIAS	68
APÉNDICE I. Parte experimental	74
APÉNDICE II. Espectros	95
APÉNDICE III. MAOS	145

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónico-degenerativas son padecimientos que transcurren de manera progresiva y disminuyen la calidad de vida de los pacientes. Enfermedades como la obesidad, la diabetes mellitus, diferentes tipos de cáncer y cirrosis hepática se ubican en este grupo de padecimientos. La cirrosis hepática constituye un problema de salud pública a nivel mundial, originando más de ciento veinte mil defunciones anualmente en todo el planeta. En el caso de México, la cirrosis ocupa la tercera causa de mortalidad en el hombre adulto, generando además pérdidas económicas debido a la hospitalización, que en cuadros avanzados, es muy frecuente. La prevención de este padecimiento resulta ser complicada debido a la multi-etilogía que presenta, desde infecciones virales hasta el consumo y exposición crónica a ciertos xenobióticos.

La etapa clave del proceso cirrótico es la fibrosis, fase reversible del mismo. Sin embargo y a pesar de los adelantos en áreas de la biología molecular y la medicina, no existen avances significativos en el tratamiento de la fibrosis, aunque se ha demostrado que compuestos como la colchicina y el α -tocoferol pueden llegar a revertirlo. En este contexto, recientemente se demostró que la adenosina protege del daño hepático inducido por tetracloruro de carbono e incluso puede revertir el proceso cirrótico. Sin embargo presenta la desventaja de su rápido metabolismo hepático, situación que limita su uso en el campo clínico.

Para tratar de resolver el inconveniente farmacéutico de la adenosina, el presente trabajo tuvo como objetivo el diseño, síntesis y evaluación de profármacos de esta sustancia con el propósito de contar con moléculas de mayor estabilidad metabólica. Para alcanzar el objetivo planteado, la adenosina se modificó en la posición carbinólica del nucleósido con aminoácidos como la prolina, tioprolina, glicina, alanina y β -alanina y así abatir el metabolismo por la adenosina desaminasa. Después de realizar las evaluaciones de los profármacos sintetizados frente a la enzima, se realizaron estudios exploratorios de acoplamiento molecular para tratar de explicar los resultados experimentales obtenidos.

2. ANTECEDENTES

En este capítulo se presenta la información previa que da lugar al problema planteado e hipótesis del presente trabajo de tesis. La información está organizada en tres apartados principales: la adenosina como sustancia bioactiva, los profármacos en la Química Farmacéutica y el diseño de fármacos asistido por computadora.

2.1. La adenosina como sustancia bioactiva

La adenosina es el nucleósido de la base púrica adenina que se obtiene por dos vías dentro del organismo humano (Figura 1). Debido a su participación fisiológica en varios órganos y tejidos, se le considera una sustancia de interés profiláctico o terapéutico en diversos padecimientos.

En el sistema circulatorio se han estudiado sus efectos cardioprotectores y se ha demostrado que genera incrementos de la función microvascular;¹ también produce inhibición de la activación y acumulación de neutrófilos y reduce significativamente la intensidad del infarto al miocardio.²⁻⁴ Clínicamente, la adenosina se emplea como auxiliar en el tratamiento de taquicardias supraventriculares (SVT) con una dosis intravenosa de 6 a 12 mg.⁵

En el sistema nervioso central, la adenosina participa en la regulación de la presión cerebral, y actúa como modulador de la neurotransmisión, donde se le atribuyen acciones de neuroprotección.⁵⁻⁷ Por otro lado, la adenosina protege del daño citotóxico ocasionado por peroxinitrilo y peróxido de hidrógeno, y disminuye los efectos generados por padecimientos crónicos neurodegenerativos.^{8,9}

La adenosina también participa en la homeostasis fisiológica, se reporta que un incremento en la concentración de adenosina e inosina, producto de degradación de la primera, inducen al sueño fisiológico, reflejándose claramente durante la realización de ejercicio exhaustivo.⁹ También se ha informado el uso de adenosina en la profilaxis y tratamiento de la apoplejía debido a sus efectos como inhibidor de neurotransmisores excitadores, vasorelajación, y atenuación de receptores de NMDA (ácido *N*-metil-D-aspártico) y disminución del metabolismo.¹⁰ Cabe señalar que la adenosina presenta efectos adversos como la hipotensión cuando se administra por tiempos prolongados.

La actividad de la adenosina en el sistema inmunológico es bien conocida; interviene para aminorar los procesos inflamatorios que resultan de la exacerbación de este sistema y la

liberación de sustancias proinflamatorias como las citocinas o radicales libres. Entre estos padecimientos inflamatorios se encuentran la artritis reumatoide, shock por endotoxinas e inflamación pleural.¹¹⁻¹⁵ De hecho, se reporta que la adenosina y la inosina, a concentraciones basales, inhiben a las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-2, IL-12) e inducen la producción de sustancias antiinflamatorias como IL-10.¹³

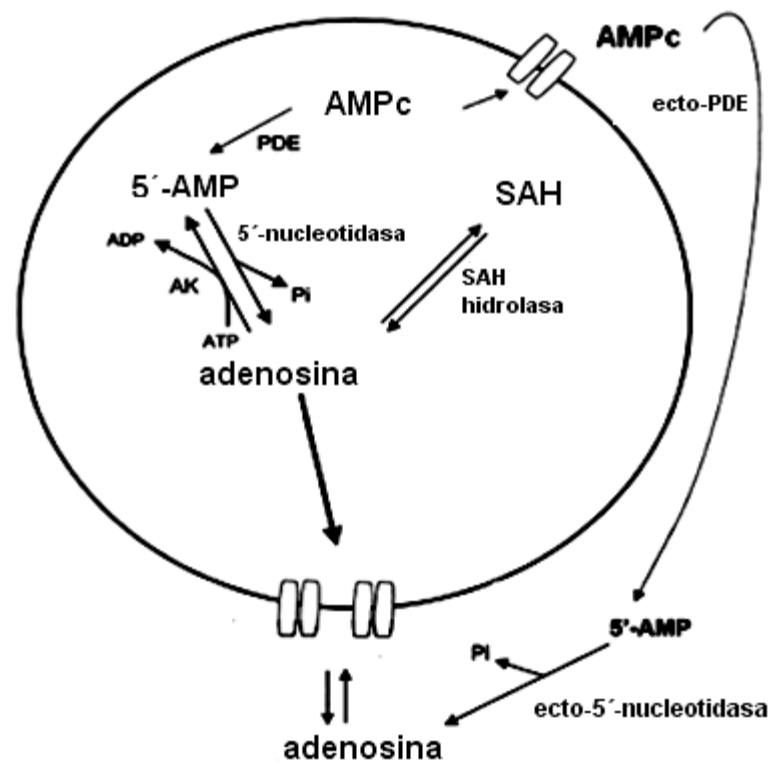


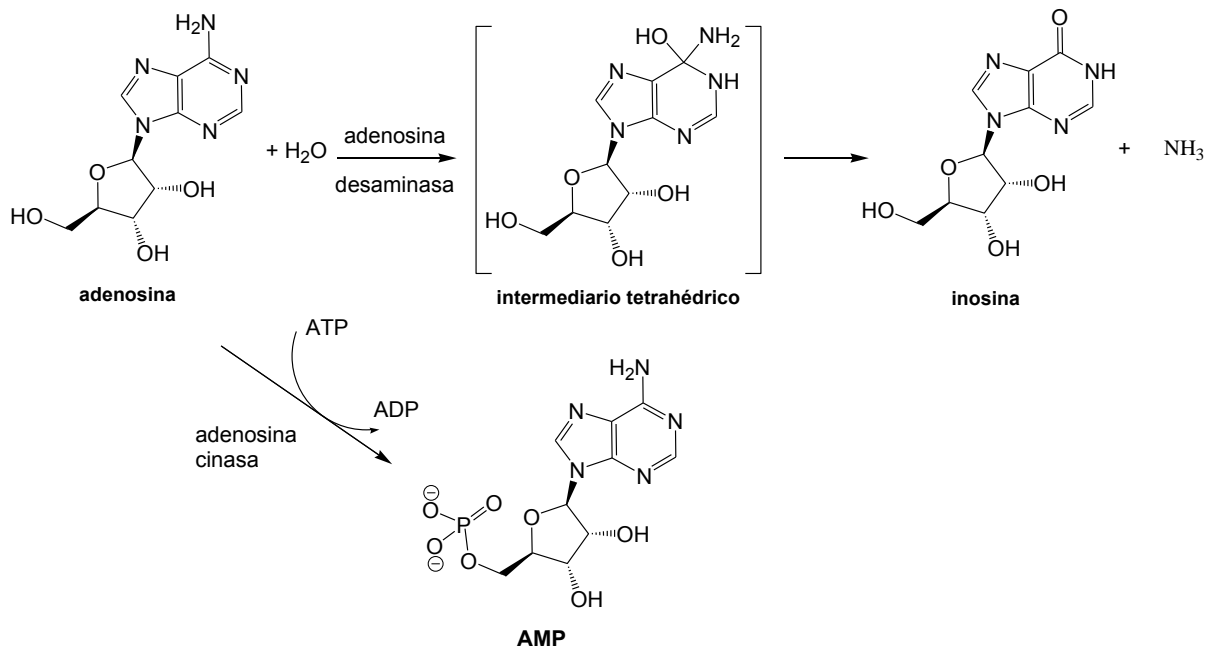
Figura 1. Vías metabólicas de síntesis de adenosina. La vía intracelular involucra la degradación del AMPc a adenosina 5'-fosfato (5'-AMP) catalizada por la enzima Fosfodiesterasa (PDE) con la posterior biotransformación a adenosina por la 5'-nucleotidasa. Otra ruta conocida es a partir de S-adenosil homocisteína (SAH) por acción de la enzima SAH hidrolasa. Por otra parte, la vía extracelular involucra la conversión de AMPc a 5'-AMP por la ecto-fosfodiesterasa (ecto-PDE) y la subsecuente desfosforilación por la enzima ecto-5'-nucleotidasa.

Por otro lado, la acumulación de adenosina, debida a mutaciones de la adenosina desaminasa o por administración de inhibidores de esta enzima, genera inmunodeficiencia grave ocasionada por los efectos apoptóticos que este compuesto ocasiona en los timocitos y células T periféricas.¹⁴ Estudios *in vitro* demostraron que la apoptosis detectada fue ocasionada por la

generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial.^{15,16}

En el campo de la investigación sobre cirrosis, se demostró que la adenosina protegió del daño hepático a los animales que previamente fueron tratados con tetracloruro de carbono.^{18–20} Adicionalmente, impidió la progresión de la fibrosis, bloqueó la esplenomegalia, disminuyó en un 60 % el colágeno depositado en el hígado y restableció la capacidad proliferativa de los hepatocitos. Posteriormente se demostró que la adenosina mantuvo el potencial redox celular de los hepatocitos al incrementar el metabolismo del nitrógeno (concentración de glutamina en orina) y equilibrar el poder reductor celular (NAD⁺/NADH).¹⁹ Con estos resultados se propuso que el efecto protector de la adenosina en el modelo de cirrosis, es debido a la regulación del flujo arterial hepático (disminución de la hipoxia) y a la regulación del potencial redox por parte del nucleósido o bien por interacción con los receptores de adenosina. Posteriores hallazgos demostraron que la administración intraperitoneal de adenosina en ratas bloqueó la fibrogenesis e incrementó la actividad colagenolítica.¹⁸

A pesar de todos los efectos fisiológicos y farmacológicos atribuidos a la adenosina, presenta un problema farmacéutico. En concentraciones fisiológicas (0.1 a 1 μ M), la vida media de esta sustancia es muy corta (0.6 y 1.4 s).²¹ El metabolismo de la adenosina involucra principalmente a dos enzimas intracelulares: adenosina cinasa (AK) y la adenosina desaminasa (ADA). La primera fosforila a la adenosina para convertirla en AMP; la segunda provoca la desaminación oxidativa de la adenosina para convertirla en inosina (Esquema 1). Se conoce una ADA de acción extracelular, ectoADA, localizada en el cerebro y otros tejidos. Se sugiere una tercer ruta catabólica que involucra a la enzima SAH hidrolasa aunque resulta ser poco característica (18). La entrada de la adenosina al citosol está mediada por dos tipos de transportadores, uno a favor de un gradiente de concentración (transportadores equilibrados) y el otro acoplado a un gradiente de cationes de sodio. La desaminación de adenosina elimina significativamente la acciones fisiológicas (y farmacológicas) de la adenosina dado que la inosina no es un agonista total de los receptores de la adenosina.²²



Esquema 1. Metabolismo intracelular de la Adenosina.

La cirrosis hepática es una patología crónica que se sitúa entre los principales problemas de salud a nivel mundial donde constituye la tercera causa de las defunciones. La Secretaría de Salud en el 2008 informó que la cirrosis y otras enfermedades hepáticas ocupan la tercera causa de muerte en hombres, con 20 848 decesos anuales y una tasa de 39.4 por cada cien mil, mientras que en la población femenina ocupa el octavo lugar de defunciones, con 6 714 fallecimientos, lo que representa una tasa de 12.5 por cada cien mil mujeres.²³

La cirrosis es una enfermedad progresiva, difusa, fibrótica y nodular que afecta la estructura, función y proliferación hepática, definida como el daño crónico del parénquima del hígado con pérdida de la estructura y función hepática, manifestando la formación de cicatrices y fibrosis, así como nódulos de regeneración.²⁴ La cirrosis genera disfunción hepatocelular, e incremento de la resistencia intrahepática al flujo sanguíneo, provocando insuficiencia hepática e hipertensión portal lo que posteriormente puede conllevar a complicaciones graves como la ascitis, peritonitis bacteriana, encefalopatía hepática, sangrado varicoso e incluso el síndrome hepatorenal, que consiste en una falla renal en ausencia de un daño intrínseco en los riñones.^{25,26}

En la denominada cirrosis compensada se puede permanecer sin complicaciones por varios años, pero en el caso de ocurrir la descompensación, la esperanza de vida es muy corta,

maximizando el factor de riesgo a padecer carcinoma hepatocelular y cuyo único tratamiento efectivo consiste en el trasplante de hígado.²⁷ Otras complicaciones incluyen la falla hepática y la hipertensión portal. La etiología de la cirrosis es diversificada; dentro de las principales causas se encuentran el abuso del consumo de etanol, infección crónica por hepatitis C, obesidad y el síndrome metabólico. También se considera la exposición prolongada a toxinas y fármacos como el Metotrexato, Isoniazida, α -Metildopa, entre otros.²⁴

Se sabe que la fibrosis hepática es el punto determinante de la progresión de un daño hepático crónico a cirrosis. La fibrosis consiste en la sustitución reversible del parénquima hepático por tejido denso y con alto contenido de colágena (Figura 2);²⁸ por ello, el tratamiento de la cirrosis primordialmente consiste en la reversión de la fibrosis hepática.

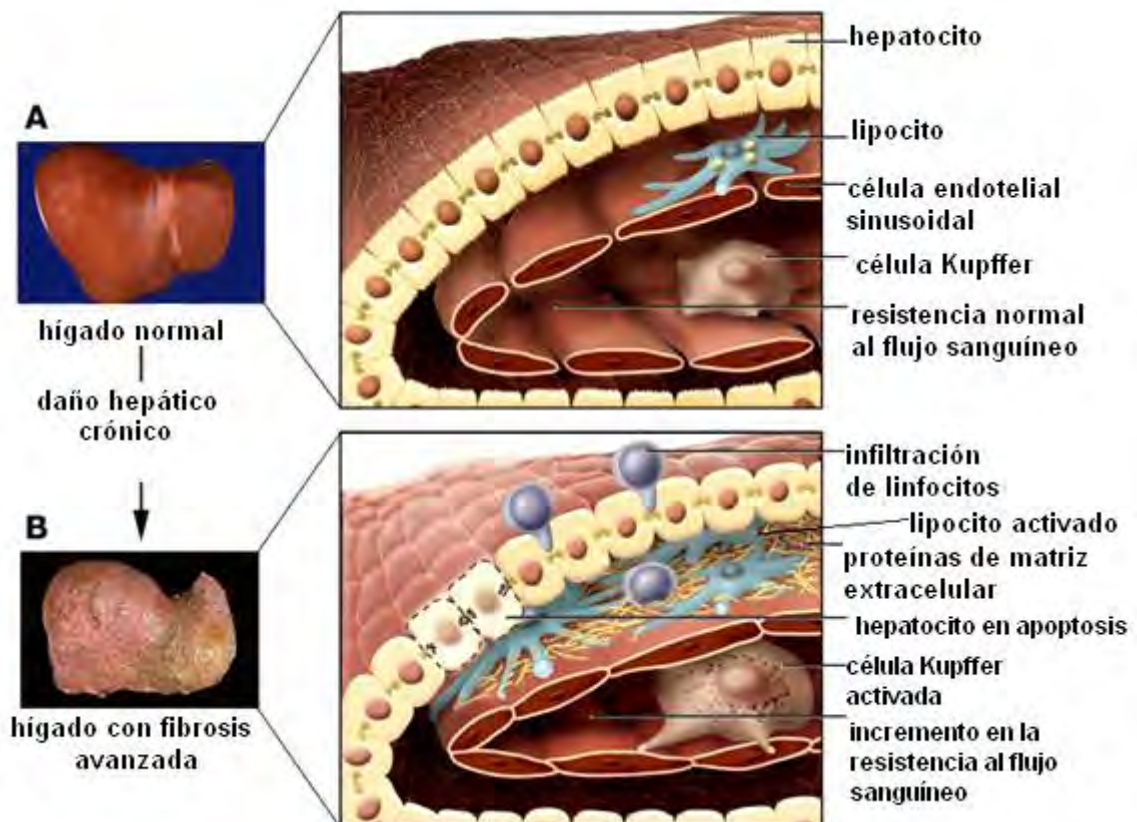


Figura 2. Cambios morfológicos del hígado originados por la fibrogénesis. A) Morfología del parénquima hepático en condiciones normales. B) Morfología del parénquima con fibrosis avanzada, los linfocitos circulantes se infiltran al lumen del sinusoides con incremento de las proteínas de la matriz extracelular, activación de los lipocitos y células de Kupffer así como también se observan hepatocitos en apoptosis y resistencia al flujo sanguíneo, lo que origina disfunción hepática e hipertensión respectivamente. La reducción de la porosidad del sinusoides se denomina *Capilarización* y debido a este fenómeno se genera una disminución en el transporte de los solutos solubles de la sangre al endotelio.

La patogénesis de la fibrosis es un mecanismo complejo; cuando se provoca un daño agudo en el hígado, las células del parénquima se regeneran reemplazando las células necrosadas o en apoptosis. En un daño crónico, los hepatocitos se sustituyen por matriz extracelular. Se producen cambios en la composición y contenido de la matriz, incrementando la cantidad de colágena (I, III y IV), fibronectina, undulina, elastina, laminina y proteoglicanos. También disminuye la actividad de las MMPs (proteasas denominadas metaloproteinasas de matriz) y se incrementa la expresión de sus inhibidores denominados TIMPs (Inhibidores tisulares de metaloproteinasas). Estos dos últimos eventos conllevan a la degradación de la matriz extracelular normal.²⁶

Las células que principalmente producen la colágena son los lipocitos (HSCs), aunque se reporta que también los miofibroblastos hepáticos son productores activos de colágena.^{29,30} En condiciones normales, los lipocitos son un reservorio de vitamina A y constituyen cerca del 5 a 10 % de las células hepáticas, pero después de su activación se diferencian a células con fenotipo similar a miofibroblasto (o simplemente lipocitos activados), que adquieren nuevas propiedades fenotípicas que originan el proceso fibrogénico. La activación de las HSCs involucra dos etapas: la primera, llamada etapa de *iniciación*, consiste en la estimulación paracrina de hepatocitos dañados y células vecinas, o bien puede inducirse por la infiltración de las células de Kupffer, la lipoperoxidación de lípidos y el acetaldehído. La segunda etapa es la *perpetuación*, en la cual existe un incremento en el número de los lipocitos, así como un notable cambio fenotípico y funcional. Se sabe que el principal factor mitógeno que incrementa la población celular de los lipocitos, es el PDGF o factor de crecimiento derivado de plaquetas. Además de la proliferación, los lipocitos sufren cambios fenotípicos que contribuyen a la patogénesis de la fibrosis. La contractibilidad, proliferación y disminución de su apoptosis, fibrogénesis, degradación de la matriz extracelular, quimiotaxis, liberación de citocinas y la pérdida de retionoides, son los principales de estos cambios.

En el caso de la generación de fibrosis por consumo excesivo de etanol, los lipocitos (células productoras de colágena) son activados por dos vías principales (Figura 3);^{29,30} la primera consiste en la generación de aductos tóxicos por parte del acetaldehído, producto principal del metabolismo del etanol producido por la alcohol deshidrogenasa (ADH). El segundo efecto tóxico es mediado por el citocromo P450; el etanol se oxida por la isoforma inducible CYP2E1, la cual produce el radical hidroxilo e incremento en el estrés oxidante.

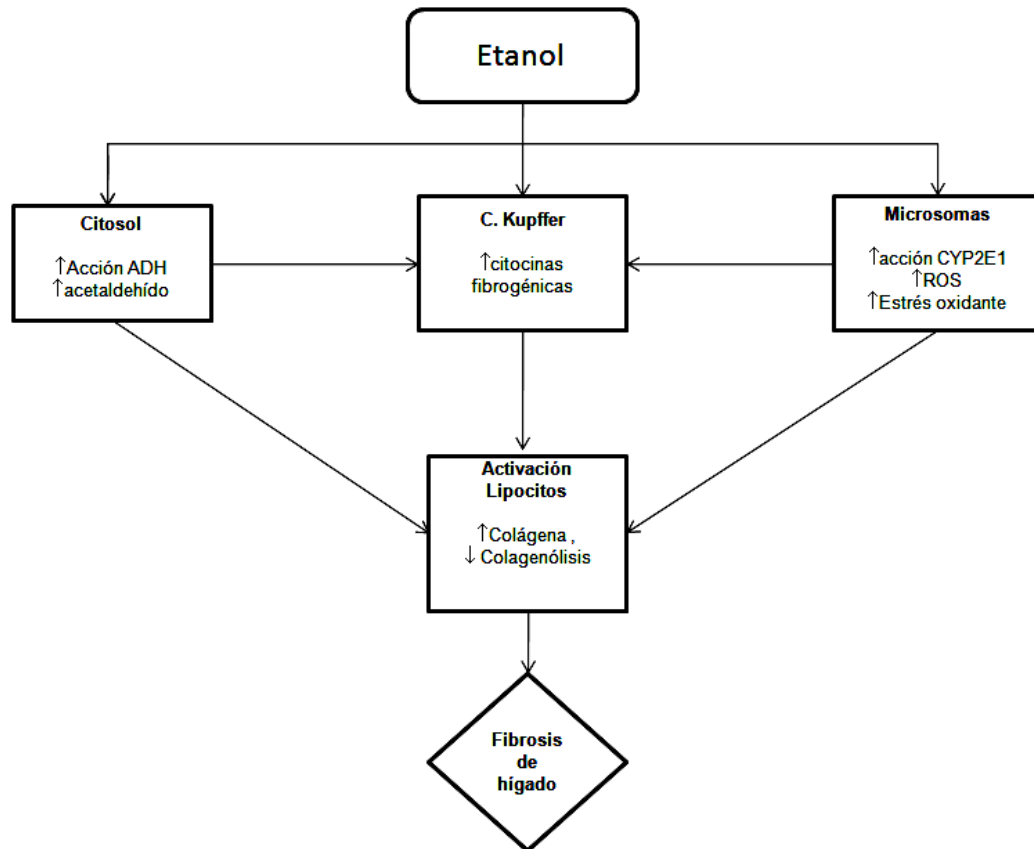


Figura 3. Representación esquemática de la fibrosis inducida por etanol.

No existe un tratamiento idóneo para la cirrosis hepática. Hay evidencias de que algunos compuestos, como la colchicina, fosfatidilcolina, corticosteroides y el tocoferol, son capaces de disminuir la progresión del proceso fibrótico en roedores (Figura 4).^{26,31} Cuando se quieren realizar estudios en seres humanos, se presenta un problema operativo ya que el monitoreo para seguir la eficacia de un tratamiento de investigación requiere de varias biopsias, proceso que resulta ser invasivo y cuyos resultados presentan una variabilidad en la respuesta debido a la distribución heterogénea de la fibrosis, que ocurre sobretodo en casos avanzados (15 a 25 % de los casos).³¹

En el caso de la cirrosis avanzada, la única alternativa terapéutica consiste en el trasplante de hígado. Es por ello que diversos grupos de investigación, enfocan su trabajo a la búsqueda de nuevos compuestos para la prevención o tratamiento de la cirrosis hepática. Se han descubierto varios blancos biológicos y estrategias para el tratamiento de este padecimiento (Tabla 1).

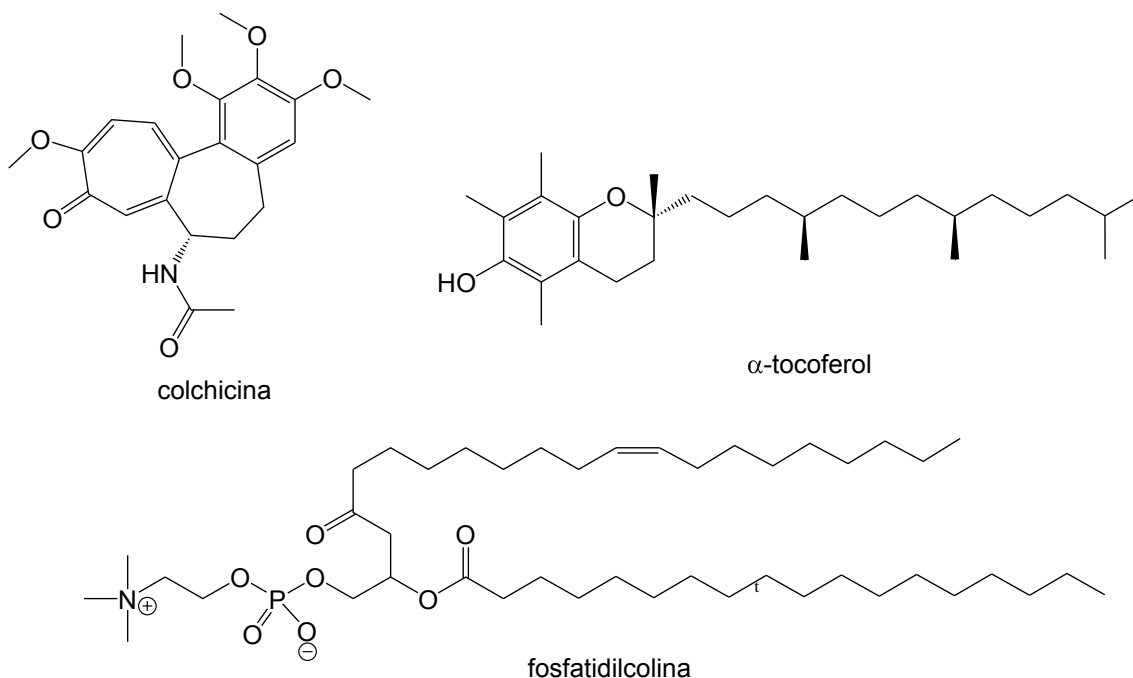


Figura 4. Compuestos con actividad antifibrótica demostrada en roedores.

Debido a que la fibrogénesis es mediada por el proceso inflamatorio, se han propuesto fármacos antiinflamatorios para su tratamiento; los corticosteroides y S-adenosil metionina figuran como los mejores candidatos.³³ Otra estrategia se relaciona con los lipocitos (HSCs), ya sea para evitar su activación (inhibidores de angiotensina o interferón α), disminuir su proliferación o promover su apoptosis (productos de la enzima esfingomielinasa como la ceramida, esfingosina y esfingosina 1-fosfato).³⁴ Los antioxidantes han generado expectativas en el tratamiento de cirrosis ocasionada por etanol o NASH,^{35,36} el fundamento es que el estrés oxidante regula ciertas propiedades fibrogénicas de las HSCs, así como su activación. La Silamarina, Vitamina E, y Fosfatidilcolina se han probado y evaluado satisfactoriamente como inhibidores de la activación de los lipocitos, la protección de la apoptosis de los hepatocitos y la atenuación de la fibrosis hepática.³⁷ Por otro lado, se ha realizado la búsqueda de moléculas inhibitoras de las vías de señalización correspondientes a la activación de los lipocitos o del proceso fibrogénico; siendo las más importantes las vías de señalización relacionadas al factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) debido a su notable participación en el proceso fibrogénico, activación de células fibrogénicas e incremento de la proliferación celular.³¹ Otros compuestos que inhiben las vías de señalización en la transducción de las señales de la fibrogénesis, se han propuesto para el tratamiento de la cirrosis;²⁶ entre estos se incluyen la pentoxifilina (inhibidor de fosfodiesterasa), amilorida (inhibidor de la bomba Na^+/H^+) o incluso inhibidores del sistema renina-angiotensina, que han demostrado efectos antifibróticos.⁶

Tabla 1. Estrategias farmacéuticas en desarrollo para el tratamiento de la fibrosis.

Estrategia	Compuestos	Estrategia	Compuestos
<i>Inhibición de la activación de lipocitos</i>	inhibidores de angiotensina	<i>Antioxidantes</i>	<i>N</i> -acetilcisteína
	interferón- α		tocoferol
	pentoxifilina	<i>Hepatoprotectores</i>	tiopronina
<i>Inhibición de la respuesta inmune</i>	colchicina		silimarina
	corticosteroides		ácido ursodeoxicólico
	interleucina 10		zinc

2.2. Los profármacos en la Química Farmacéutica

Una de las estrategias de la Química Farmacéutica para resolver problemas de estabilidad que presentan moléculas con actividad biológica de interés terapéutico es el diseño y síntesis de profármacos. El término profármaco se refiere a aquellas moléculas que requieren biotransformarse *in vivo* para ejercer un efecto farmacológico. La molécula carece de actividad farmacológica, es inactiva al administrarse, disolverse y en ocasiones, al absorberse, pero al transformarse por medio de reacciones químicas o enzimáticas dentro del organismo, adquiere el efecto farmacológico deseado.^{38,39} Hoy en día, la estrategia de profármacos es muy empleada en la industria farmacéutica y se estima que del 5–7% de los fármacos aprobados mundialmente, pueden clasificarse como profármacos.⁴⁰

Por su estructuración, los profármacos se clasifican en bioprecusores y derivados biorreversibles (Figura 5). El derivado biorreversible consiste en una molécula activa unida covalentemente a una entidad denominada modificador, que al hidrolizarse libera al principio activo.⁴¹ Por su parte, el bioprecursor no posee un modificador y no contiene la estructura del fármaco, pero después de una modificación estructural (principalmente oxidación o reducción) se transforma en el agente activo.⁴⁰

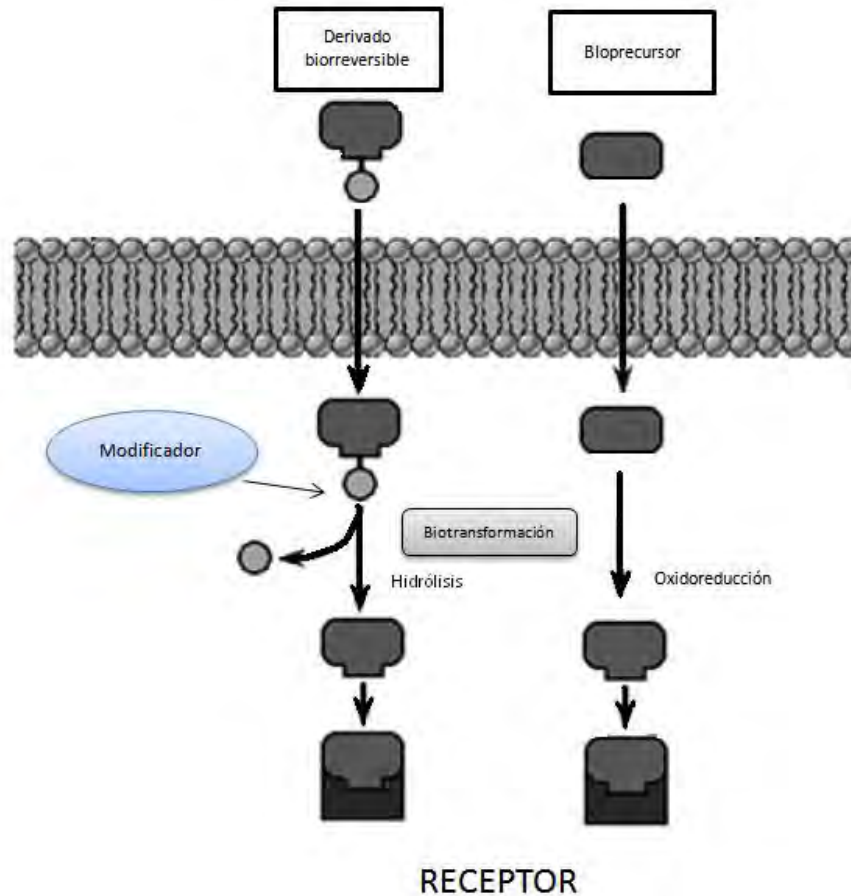


Figura 5. Esquematización de un derivado biorreversible y un bioprecursor.

La mayor parte del trabajo realizado en este campo ha sido con los derivados biorreversibles; de aquí que actualmente se conocen diferentes variantes de los mismos. En la Figura 6 se presentan los tipos derivados biorreversibles clasificados según la estructuración de los mismos. De todos ellos, los bipartitas son los más usados en el área farmacéutica.

Los modificadores que forman parte de los derivados biorreversibles deben ajustarse a los parámetros siguientes:

- La unión debe ser covalente entre el principio activo y el modificador.
- La unión debe hidrolizarse dentro del organismo.
- El modificador carecer de efectos tóxicos una vez liberado.

Si el modificador posee actividad biológica *per se*, se dice que se trata de un profármaco mutuo o co-fármaco y cuando al liberarse el modificador genera un segundo profármaco (es decir, se

requieren dos etapas metabólicas para generar el principio activo), se denomina pre-profármaco.^{38,42}

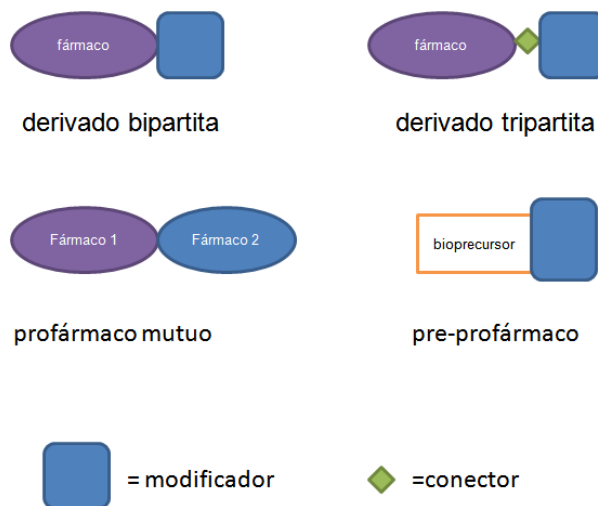
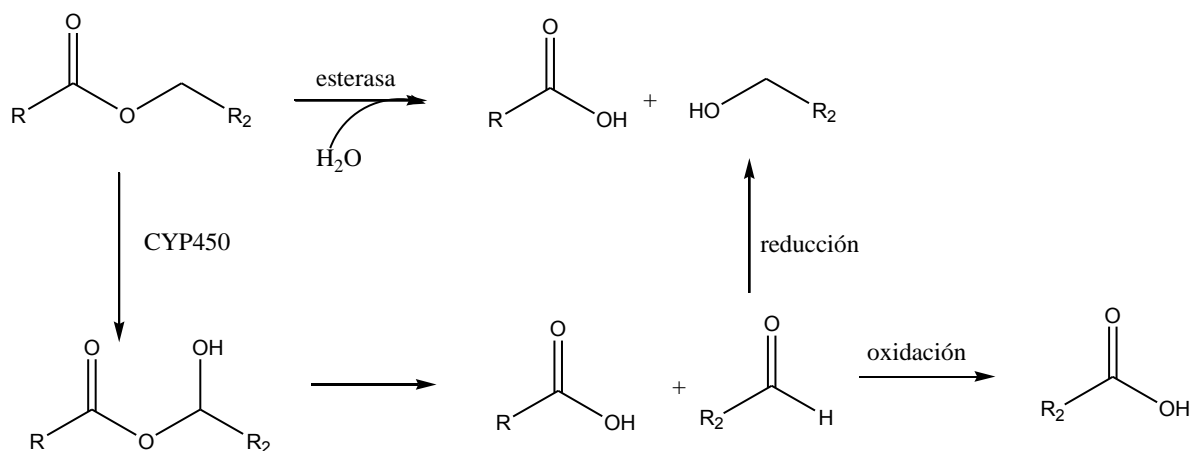


Figura 6. Tipos de derivados biorreversibles.

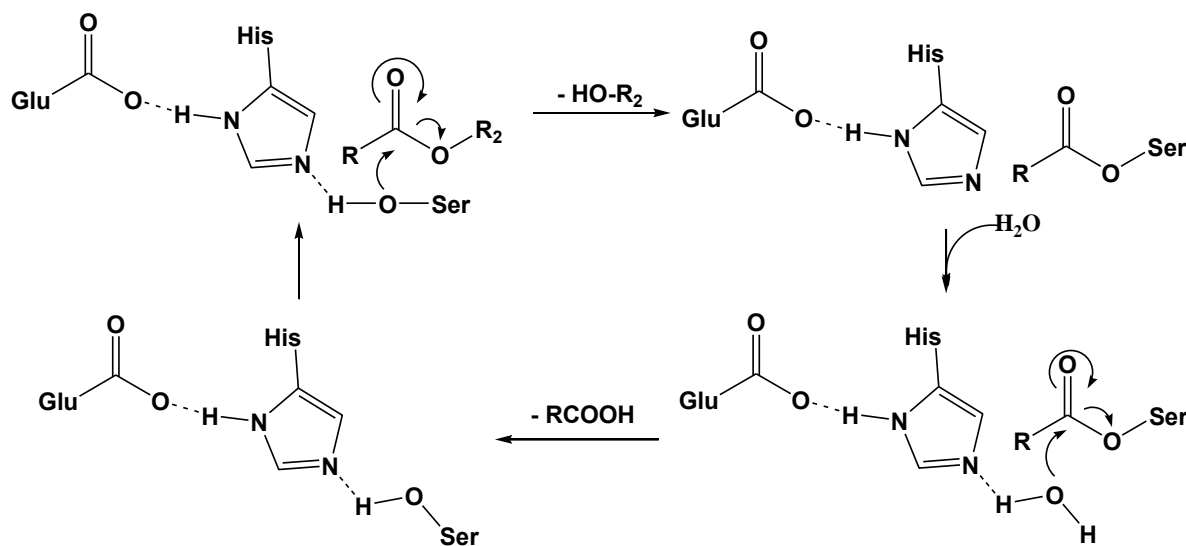
Se tiene reportado que el grupo funcional éster es el más ampliamente implicado en el diseño de los profármacos;⁴³ se estima que el 49 % de los profármacos comerciales se activan por hidrólisis enzimática. La activación de este tipo de profármacos está mediada por esterasas no específicas (carboxilesterasas, acetilcolinesterasas, butirilcolinesterasas o arilesterasas) o incluso se reporta la hidrólisis vía citocromo P450 (Esquema 2).^{40,44}



Esquema 2. Mecanismos de bioconversión de derivados biorreversibles.

Las esterasas se clasifican en tres grupos de acuerdo a su interacción con sustratos organofosforados: tipo A (que requieren Ca^{2+} como cofactor, y no se inhiben con sustratos organofosforados pero si los hidrolizan), tipo B (se inhiben con sustratos organofosforados), y tipo C (no se inhiben con sustratos organofosforados ni tampoco los hidrolizan).^{43,45}

De especial interés para profármacos dirigidos al hígado son las esterasas tipo B (llamadas también serina hidrolasas). Aunque estas enzimas se localizan en la sangre, intestino y cerebro, su ubicación mayoritaria es en el hígado; incluyen enzimas como la carboxilesterasa, acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.⁴⁴ El mecanismo de estas enzimas es bien conocido e involucra un mecanismo denominado “ping-pong”, donde participan tres aminoácidos: ácido glutámico (o en ocasiones ácido aspártico) histidina y serina. Esta última lleva a cabo el ataque nucleofílico hacia el éster del sustrato (Esquema 3).



Esquema 3. Ciclo catalítico de las esterasas tipo B, donde participa la triada Glu (o Asp), His y Ser.

Las carboxilesterasas (E. C. 3.1.1.1.) deben considerarse durante el diseño de derivados biorreversibles debido al amplio espectro de sustratos que pueden hidrolizar.⁴⁶ En particular, la carboxilesterasa humana 1 (hCE1) es una enzima con 523 residuos distribuida principalmente en el hígado, macrófagos y pulmones que presenta baja selectividad y es capaz de hidrolizar una gran variedad de estructuras (ésteres, tioésteres, amidas, carbamatos) e incluso pueden llevar a cabo reacciones de transesterificación.⁴⁶ Estudios previos demostraron que la hCE1 existe en equilibrio trímero-hexámero y cada trímero posee tres sitios catalíticos (Figura 7).⁴⁷ El dominio catalítico consiste en la triada Ser 221, Glu354 e His468.⁴⁸ El sitio catalítico tiene una cavidad pequeña (aproximadamente 1300 Å) con regiones específicas para la unión de porciones estructurales metilo o etilo, y una región flexible (cavidad grande) que puede interactuar con grupos funcionales más voluminosos, lo que explica el amplio espectro de sustratos.⁴⁹ Así mismo, se presentan dos dominios adicionales: el sitio Z, que funge como regulador alostérico y la compuerta o “side door”, que permite el libre tránsito de sustratos y productos.

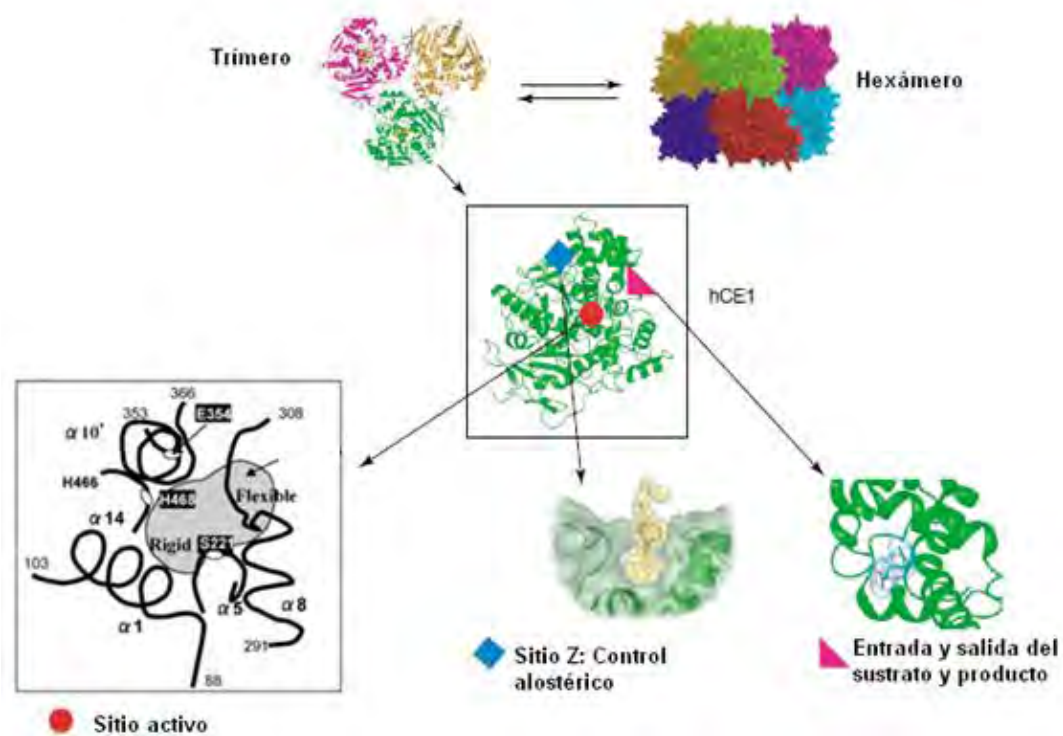


Figura 7. La enzima hCE1 existe en equilibrio trímero-hexámero. Se distinguen tres dominios: sitio activo, sitio Z y la compuerta de tránsito.

2.3. Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC)

Con el reciente avance de la computación, las técnicas y metodologías aplicadas a la Química Farmacéutica para el descubrimiento de nuevos prototipos y optimización de estos, han cobrado una gran importancia y se establecen como una de las más poderosas estrategias para el desarrollo de nuevas moléculas con potencial actividad biológica. Hopfinger define al DiFAC como el empleo de diversas técnicas, métodos y algoritmos computacionales para relacionar la actividad biológica de una molécula en base a su estructura química;⁵¹ esto se fundamenta en el hecho de que el mecanismo de acción de las moléculas con actividad biológica se desencadena por la unión con su receptor por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o estéricas.⁵² Con base a ello, se conocen dos tipos de estrategias para el descubrimiento y optimización de prototipos: aquellos en los cuales se conoce la estructura del receptor, conocido como *diseño basado en el receptor* (acoplamiento molecular y el diseño de novo) y aquellos en los cuales no se conoce la estructura del receptor, pero se conoce la estructura y de una serie de moléculas con la misma actividad biológica, conocido como *diseño basado en el ligando* (relaciones estructura-actividad).⁵³

2.3.1. Acoplamiento molecular (Docking)

Cuando se conoce la estructura del receptor (ya sea por rayos X, resonancia magnética nuclear o modelado por homología) el acoplamiento molecular es la técnica para el escaneo virtual más frecuentemente empleada.⁵⁴ Con esta estrategia se busca predecir la estructura y energía de un complejo intermolecular formado por dos o más moléculas: dadas las coordenadas espaciales de dos moléculas, se predice la geometría y energía de unión aproximada.⁵⁵

Mediante la metodología de acoplamiento molecular, se predice la conformación del ligando y orientación dentro de un sitio activo (Figura 8). La energía de unión (ΔG) o energía del complejo ligando-receptor, debe considerar factores estéricos, electrostáticos, rigidez de la macromolécula, formación de puentes de hidrógeno así como desolvatación y factores entrópicos rotacionales y traslacionales.

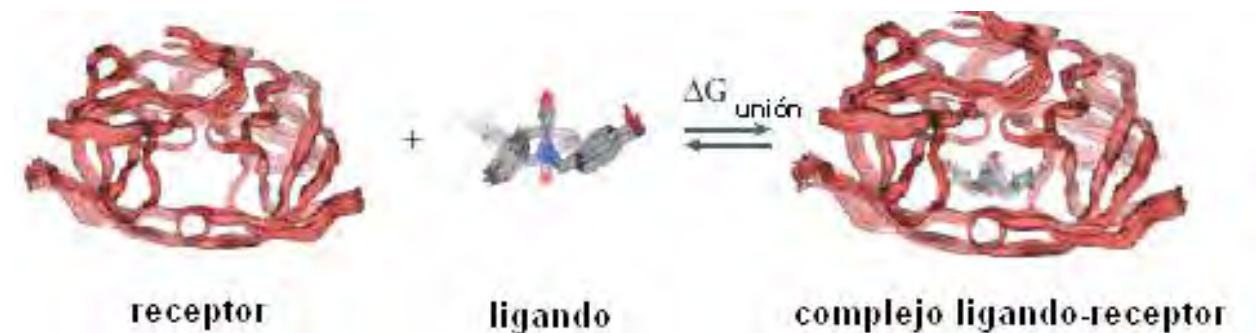


Figura 8. Ejemplificación de la metodología del Docking. Se busca obtener la conformación y energía del complejo ligando-receptor.

El acoplamiento molecular consiste en básicamente tres pasos:^{56,57} primero se representa el sistema en el espacio, por medio de mallas (grid) que guarda información de la contribución energética del receptor para la unión del ligando,⁵⁸ posteriormente se realiza la búsqueda del espacio conformacional accesible al ligando (lo cual permite encontrar las diferentes conformaciones y orientaciones del ligando al sitio de unión) y finalmente se evalúan las posibles soluciones. Para esto último, se emplean funciones de evaluación, calculando la energía libre de unión del complejo. A menor valor numérico, más afinidad tendrá el ligando por el receptor.

La búsqueda de las conformaciones para el acoplamiento molecular, tratando al ligando como flexible, se puede realizar con tres algoritmos principales:⁵⁹

- a) Búsqueda sistemática: Se busca explorar todos los grados de libertad en una molécula, en ocasiones se logra al dividir a la molécula en fragmentos rígidos y partes flexibles. Programas como DOCK, FLOG y FlexX emplean esta metodología.
- b) Búsqueda aleatoria (método estocástico): operan al realizar cambios aleatorios obteniéndose nuevas conformaciones y se evalúan por medio de una función de probabilidad. Estos algoritmos incluyen al método Monte Carlo y algoritmos genéticos. Programas como Autodock, DOCK y GOLD usan este tipo de algoritmo.
- c) Métodos de simulación: emplean métodos de dinámica molecular, pero tienen la desventaja de demandar un mayor costo computacional. Autodock, Glide y Mol-Dock emplean esta búsqueda de conformeros.

La energía de unión puede ser descrita en términos aditivos de varios componentes que contribuyen a la energía de formación del complejo ligando-receptor, mostrados en la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta G_{\text{disolvente}} + \Delta G_{\text{conformación}} + \Delta G_{\text{interacción}} + \Delta G_{\text{rotación}} + \Delta G_{\text{tr}} + \Delta G_{\text{vibración}}$$

donde:

$\Delta G_{\text{disolvente}}$ es la contribución debida a efectos del disolvente, como interacciones disolvente-ligando, disolvente proteína y disolvente complejo ligando-receptor.

$\Delta G_{\text{conformación}}$ es la energía debida a cambios conformacionales en la proteína y el ligando.

$\Delta G_{\text{interacción}}$ es la energía libre asociada a las interacciones ligando-receptor.

$\Delta G_{\text{rotación}}$ es la pérdida de energía asociada a la pérdida de grados de libertad de rotación interna (congelamiento) de la proteína y el ligando.

ΔG_{tr} es la pérdida energética traslacional y rotacional debida a la asociación de dos moléculas.

$\Delta G_{\text{vibración}}$ corresponde a los cambios de energía libre debidos a cambios en los modos vibracionales.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque la adenosina presenta un potencial antifibrótico de interés en el tratamiento de la cirrosis, su rápido metabolismo provoca su inactivación y pérdida de eficacia, situación que limita su utilidad como agente de interés terapéutico, ¿Será posible que mediante algún recurso de modificación estructural se pueda lograr un incremento en la estabilidad metabólica de la adenosina para considerarlo un antifibrótico con perspectiva de utilidad clínica?

4. HIPÓTESIS

Si se realiza la síntesis de profármacos bipartitas de adenosina por medio de la esterificación en la posición carbinólica, se podrá disminuir su metabolismo oxidativo y con ello mejorar las perspectivas para su utilidad farmacéutica. Adicionalmente, si el diseño de los profármacos considera utilizar modificadores con acción hepatoprotectora o antioxidante se incrementará el beneficio obtenido por el uso de dichas entidades moleculares.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

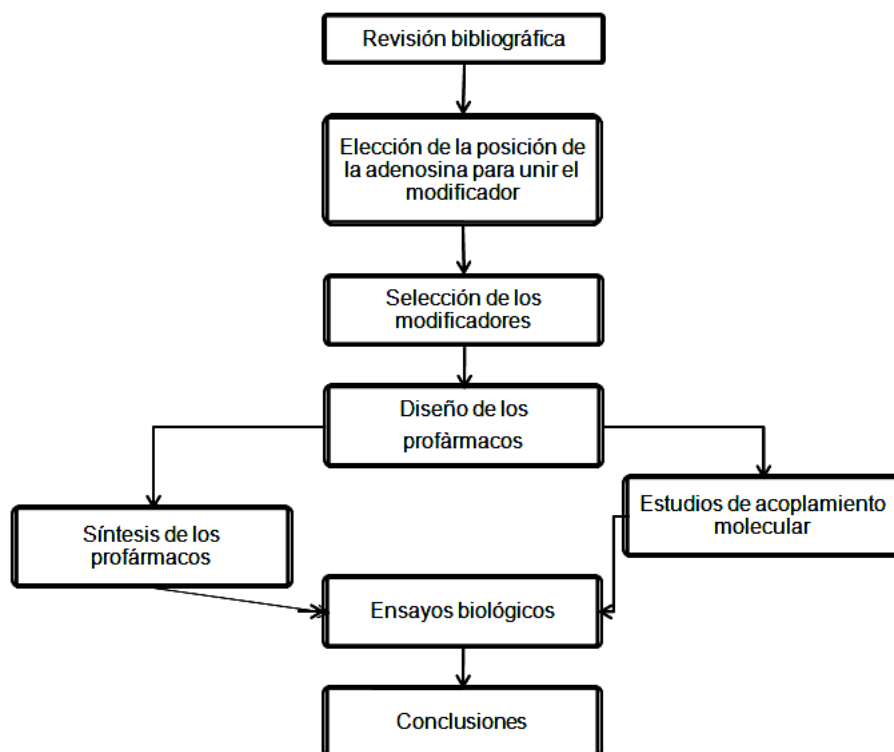
- Diseñar, sintetizar y evaluar profármacos de adenosina utilizando diferentes aminoácidos como porciones modificadoras.

5.2. Objetivos particulares

- Diseñar profármacos de adenosina utilizando como modificadores aminoácidos antioxidantes o hepatoprotectores.
- Sintetizar y caracterizar estructuralmente (espectroscópica y espectrométrica) los profármacos diseñados.
- Evaluar el metabolismo *in vitro* de los profármacos frente a la enzima adenosina desaminasa.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular (docking) con las enzimas adenosina desaminasa y carboxilesterasa humana 1.

6. METODOLOGÍA

El trabajo realizado se dividió en tres partes operativas, la química, la biológica y la computacional, realizando las actividades mostradas en el siguiente diagrama de flujo.



6.1 Parte Química

6.1.1. Consideraciones para el diseño de los profármacos

Los profármacos diseñados son del tipo bipartita (fármaco unido a un modificador) y se estructuraron de acuerdo a la Figura 9.

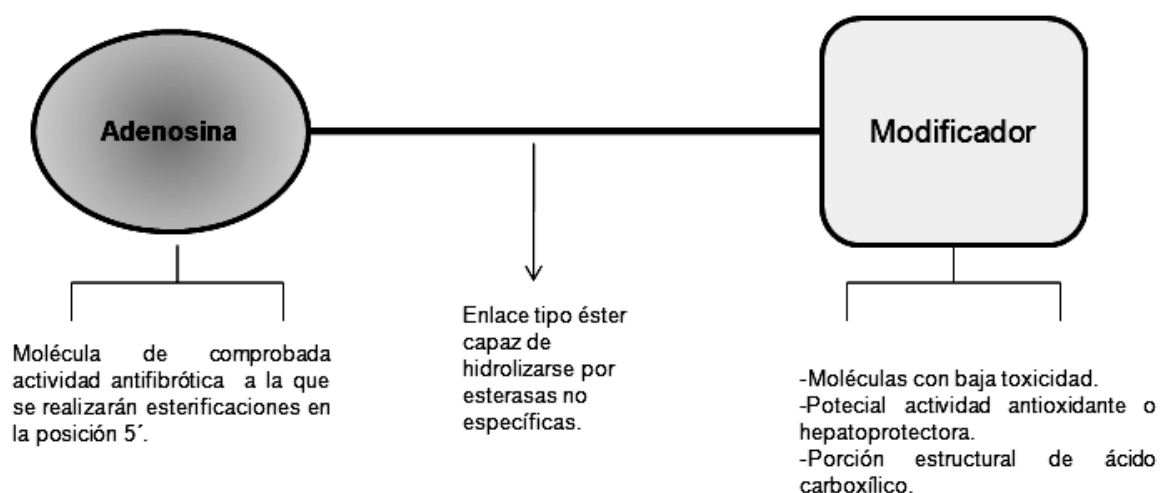


Figura 9. Ejemplificación de los de profármacos a sintetizar.

6.1.1.1. Aminoácidos

En el diseño de profármacos se han utilizado los aminoácidos como modificadores de principios activos. Generalmente se usan para incrementar la solubilidad acuosa de principios activos o como acarreadores para favorecer la permeabilidad de los compuestos activos.³⁸ En este trabajo se han elegido este tipo de compuestos para contar con moléculas solubles en agua, baja toxicidad, y por la actividad antioxidante que presentan algunos de ellos, situación que actuará favorablemente al diseño, ya que podrán funcionar como hepatoprotectores. Se ha descrito que la glicina incrementa los niveles de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión (GSH);⁶⁰ también disminuye el daño en la mucosa gástrica después de la exposición con metanol, actuando como secuestrador (scavenger) de radicales libres.⁶¹ Por su parte, la L-alanina ejerce un efecto hepatoprotector en el modelo de daño hepático inducido por D-galactosamina y se piensa que su efecto es debido al incremento intracelular del ATP y como posible modulador metabólico.⁶²

Otra molécula con un poder antioxidante muy poderoso, es la carnosina, formado por la unión de la β -alanina (ácido 3-aminopropanoico) y la histidina. Esta molécula que se sintetiza endógenamente del músculo esquelético, ha demostrado inhibir la lipoperoxidación, así como también resulta ser un quelante de metales de transición y es capaz de inactivar radicales como el superóxido y el hidroxilo. Incluso se ha encontrado que posee una actividad tipo enzima (superóxido dismutasa y lipoperoxidasa).⁶³

6.1.1.2. Compuestos con azufre

Desde hace ya mucho tiempo se conoce el papel de los compuestos con azufre como antioxidantes, debido a sus capacidades de regenerar el poder reductor celular o actuar como secuestradores de radicales libres, siendo una opción adecuada para considerarse en el diseño. Algunos de los aminoácidos que presentan esta característica se presentan en la Figura 10.^{64—71}

El análogo azufrado de la prolina, ácido (*R*)-tiazolidín 4-carboxílico (tioprolina) es una molécula formada por la condensación de cisteína y formaldehído, la cual puede poseer efectos hepatoprotectores debido a la presencia del átomo de azufre en la molécula.

Recientemente investigadores japoneses descubrieron que la tioprolina es capaz de prevenir la carcinogénesis en el estómago al reaccionar con especies reactivas, motivo por el cual se ha considerado a esta molécula para el diseño de los compuestos.⁷²

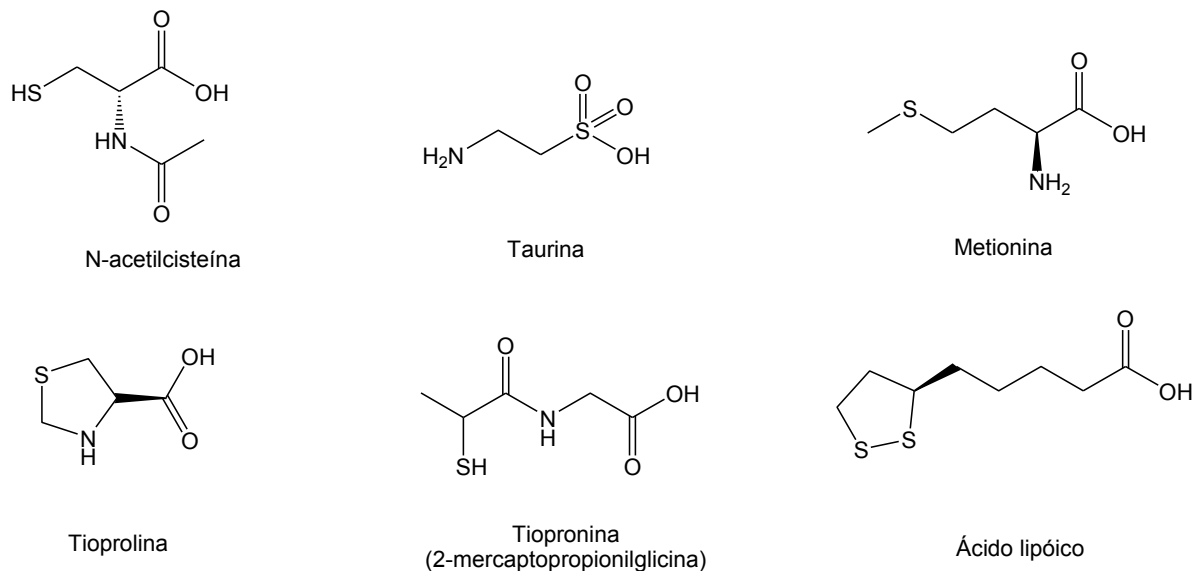


Figura 10. Moléculas antioxidantes que contienen azufre como candidatos en el diseño de los profármacos.

6.1.1.3. Profármacos a sintetizar

De acuerdo a la literatura revisada, y con base en lo estipulado en el diseño de la sección 6.1.1., se seleccionaron como modificadores, a aquellas moléculas con posible actividad antioxidante o hepatoprotectora, y que por cuestiones de facilidad sintética, tuvieran presente el grupo carboxilo. Dentro de estas moléculas, se escogió al aminoácido hepatoprotector tioprolina y a su análogo prolina, y también aminoácidos que resultan tener propiedades antioxidantes en diversos modelos, como la glicina y alanina y el ácido 3-aminopropanoico. Las moléculas a sintetizar se muestran en la Figura 11.

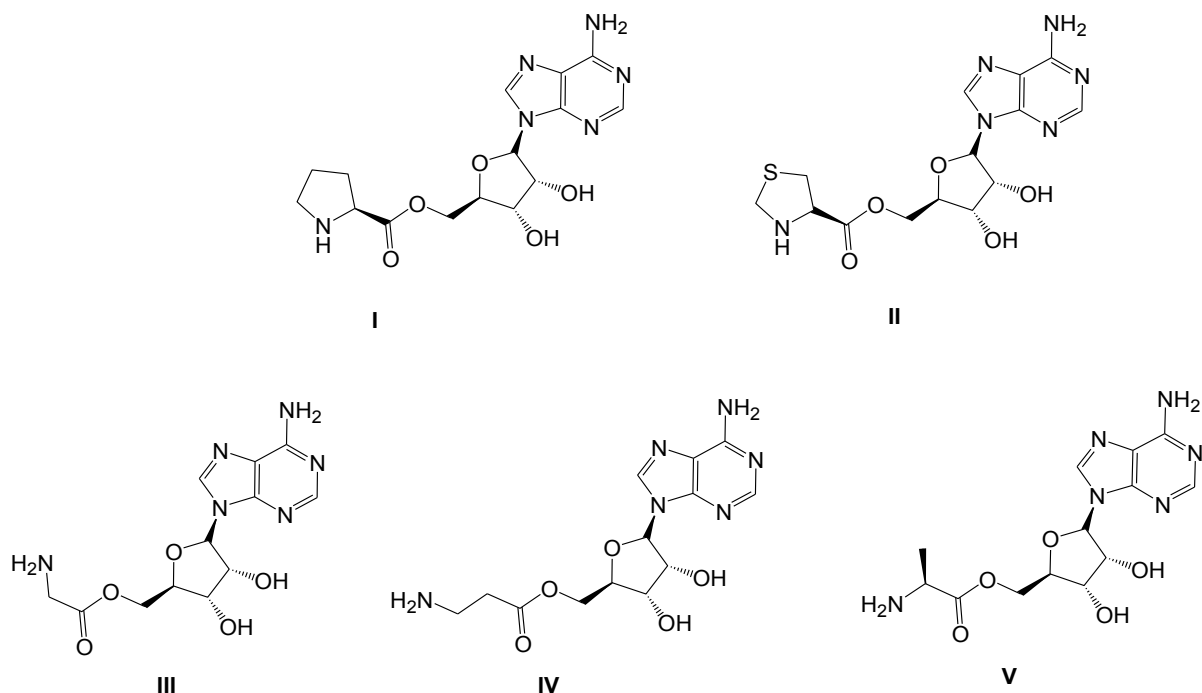


Figura 11. Profármacos de adenosina a sintetizar para probarse frente a la enzima adenosina desaminasa.

De la misma forma, los análogos cetales de los compuestos I–V pueden emplearse para comprender los requerimientos estructurales para la disminución de la actividad catalítica de la adenosina desaminasa y al mismo tiempo, se explorará su potencial actividad citotóxica (Figura 12).

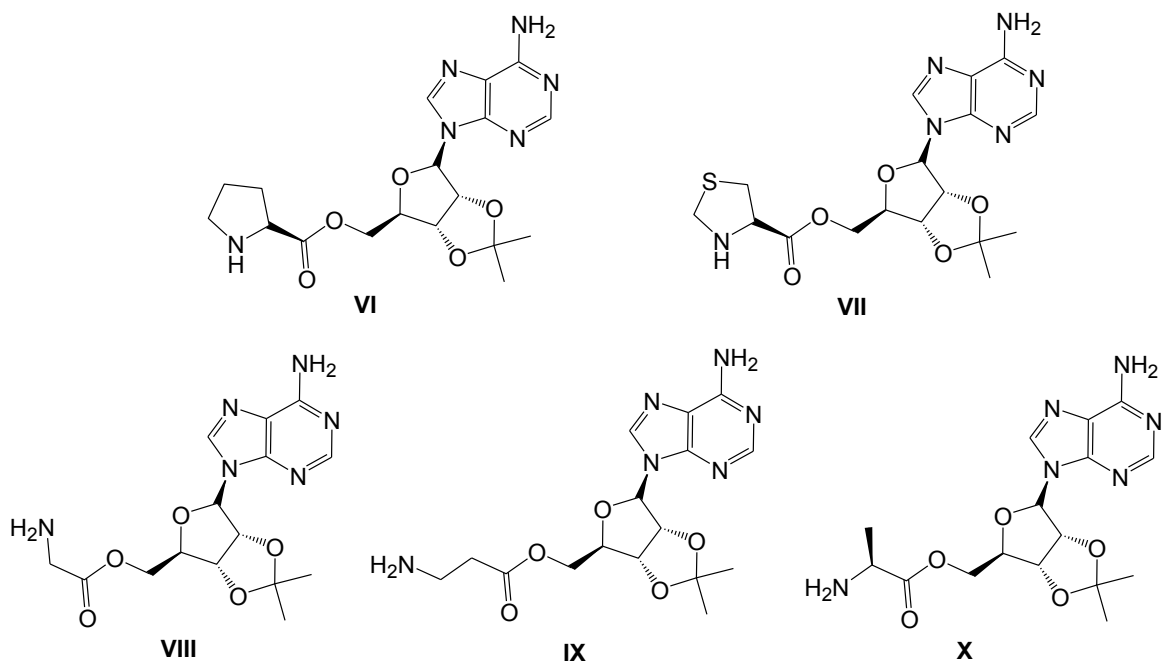
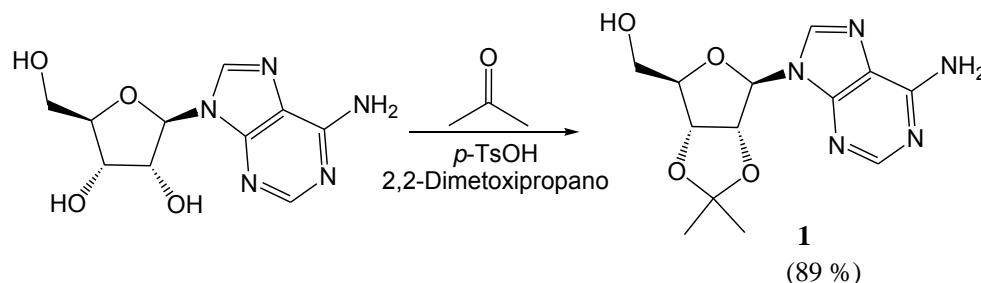


Figura 12. Profármacos a sintetizar para evaluarse eventualmente como citotóxicos.

6.1.2. Síntesis de los profármacos

6.1.2.1. Protección de la adenosina

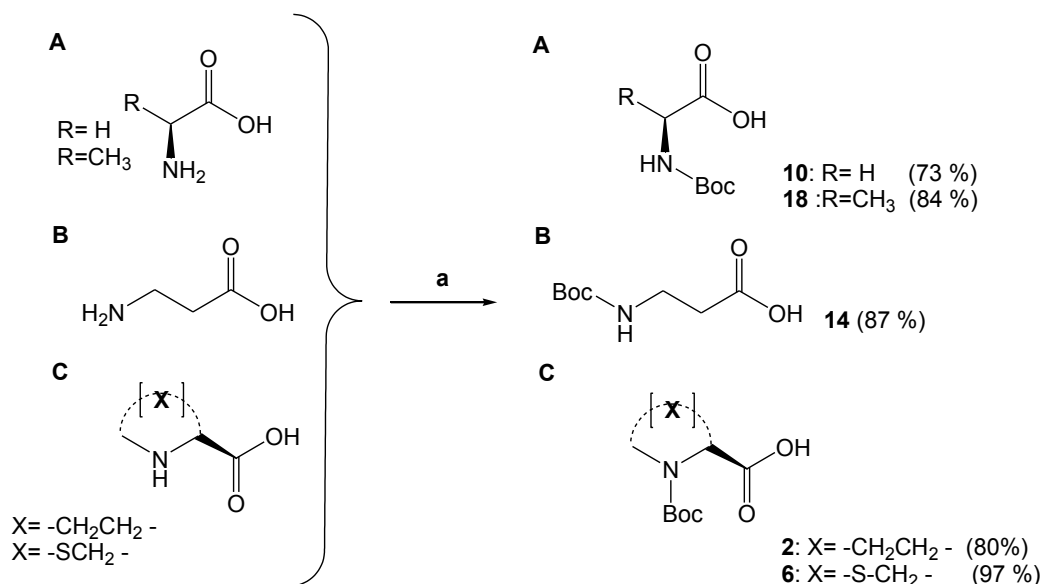
Dado que las esterificaciones se requieren en el hidroxilo carbinólico, es necesario el empleo de grupos protectores para lograrlo. La adenosina se protegió en el *cis*-1,2-diol como se muestra en el Esquema 4; esto se logró mediante la formación del cetal en presencia de acetona, ácido *p*-toluensulfónico y un desecante (2,2-dimetoxipropano) para desplazar el equilibrio a la formación del cetal originando el compuesto **1**.



Esquema 4. Síntesis de 2',3'-O-isopropilidenadenosina.

6.1.2.2. Protección de los aminoácidos

Los aminoácidos se protegieron el extremo amino con el grupo Boc (*tert*butoxicarbonilo) con métodos ya descritos de acuerdo al Esquema 5. Los aminoácidos se disolvieron en solución básica de *tert*butanol:agua y posteriormente se agregó dicarbonato de *tert*butilo agitándose vigorosamente por varias horas generando los intermediarios **2**, **6**, **10**, **14**, **18** que se emplearán posteriormente para el acoplamiento con la adenosina.

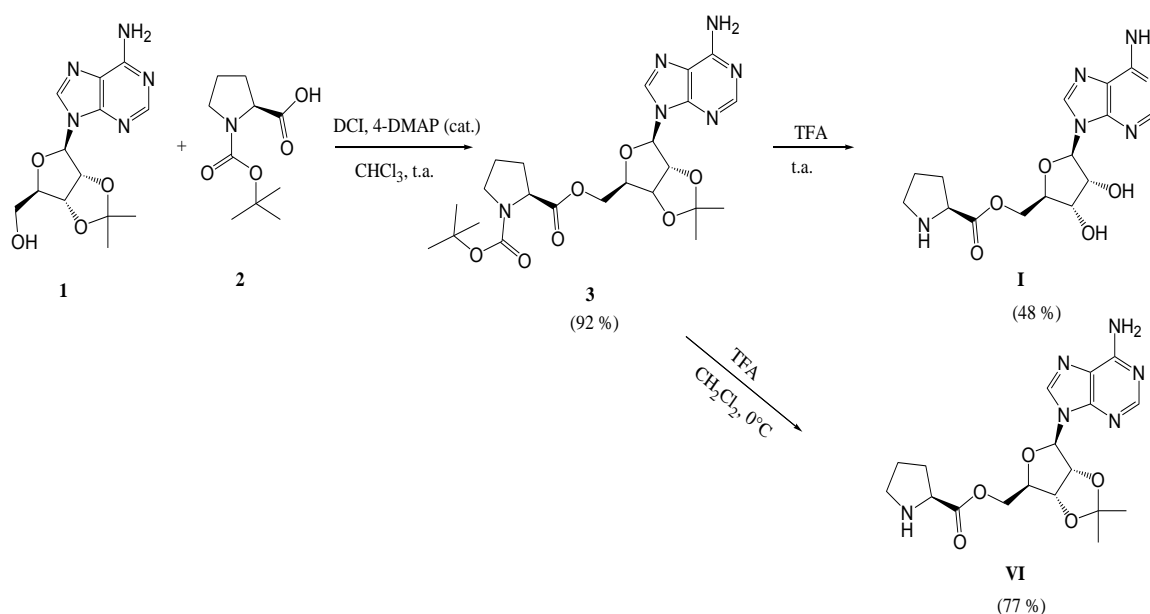


Reactivos y condiciones: a) Boc₂O, NaOH, *t*BuOH: H₂O (7:3); 18 -20 h, t.a.

Esquema 5. Protección de los aminoácidos empleados.

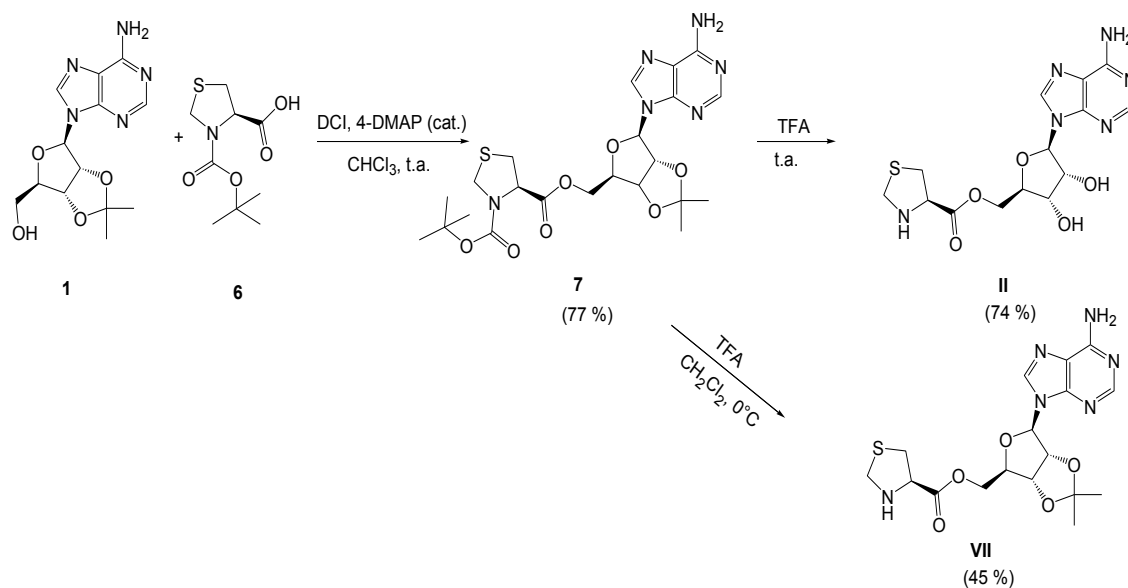
6.1.2.3. Síntesis de (S)-pirrolidín-2-carboxilato de adenosin-5'-ilo (I) y (S)-pirrolidín-2-carboxilato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (VI)

Los productos **I** y **VI** se obtienen a partir del mismo intermediario éster **3**, el cual se genera al realizar el acoplamiento entre **1** y **2** en presencia de diciclohexilcarbodiimida como activador del ácido carboxílico y cantidades catalíticas de 4-dimetilaminopiridina empleando como disolvente cloroformo con excelente rendimiento (Esquema 6). El tratamiento de **3** con ácido trifluoroacético sin disolvente a temperatura ambiente, genera el producto **I** después de 3 días. Por otro lado, la desprotección selectiva del grupo Boc se logra al disolver **3** en DCM a 0 °C y posteriormente agregar el ácido trifluoroacético obteniéndose **VI**.



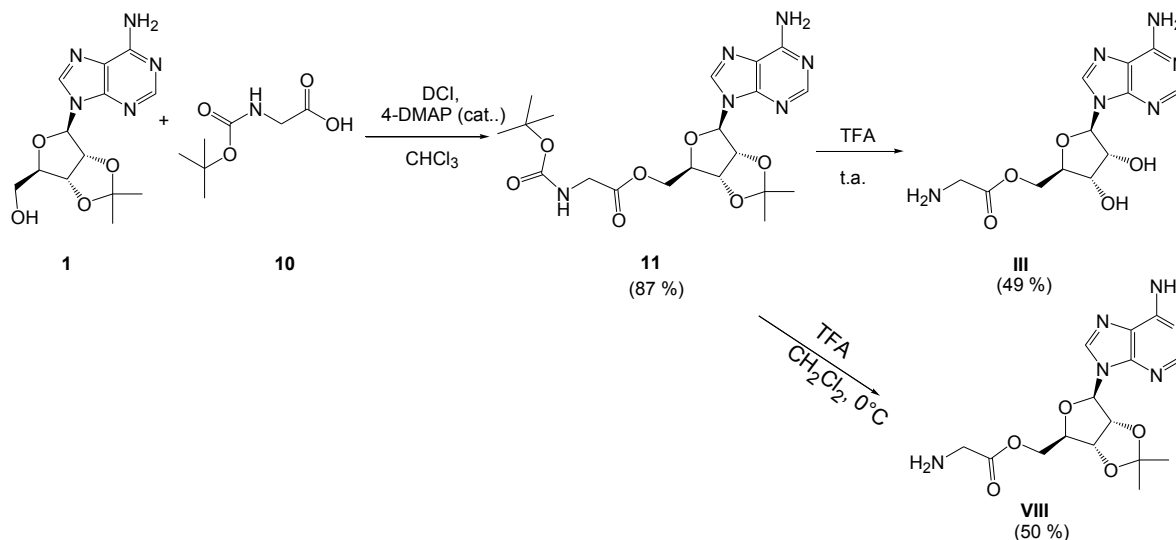
6.1.2.4. Síntesis de (R)-tiazolidín-4-carboxilato de adenosin-5'-ilo (II) y (R)-tiazolidín-4-carboxilato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (VII)

El acoplamiento de **1** y **6**, en presencia de diciclohexilcarbodiimida con cantidades catalíticas de 4-dimetilaminopiridina en cloroformo, generó el compuesto **7**. La desprotección simultánea del cetal y el grupo Boc se logra al reaccionar **7** con ácido trifluoroacético formando el profármaco **II**. El producto **VII** se obtuvo al tratar el éster **7** disuelto en DCM a 0°C con el mismo agente desprotector (Esquema 7).

Esquema 7. Ruta sintética para la obtención de **II** y **VII**.

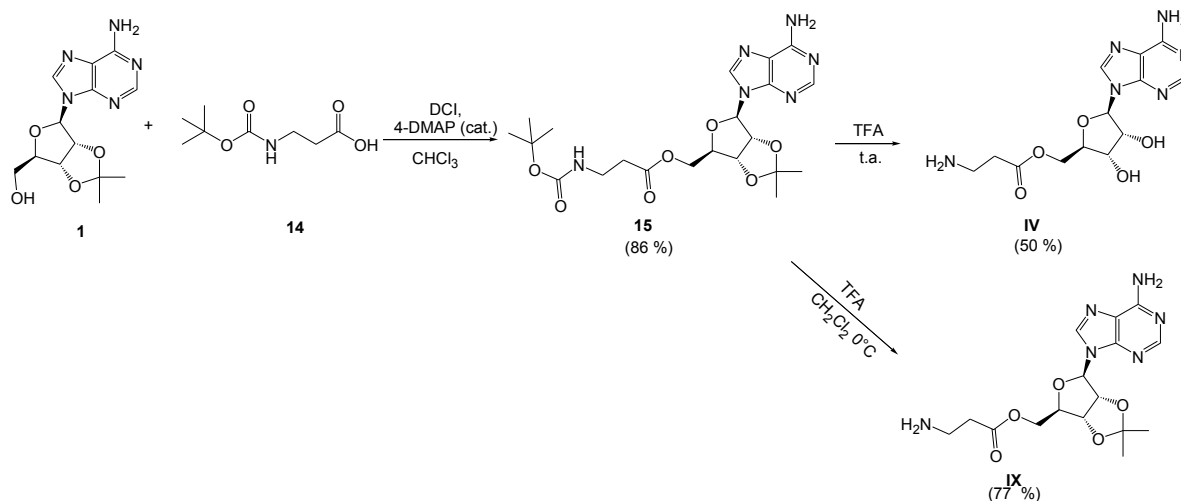
6.1.2.5. Síntesis de glicinato de adenosin-5'-ilo (**III**) y glicinato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**VIII**)

El acoplamiento de **1** y **10** con diciclohexilcarbodiimida catalizado por 4-dimetilaminopiridina genera el intermediario **11**, el cual al someterse a condiciones ácidas con ácido trifluoroacético da origen al producto final **III**. El éster **VII** se obtiene de **11**, mediante la desprotección del grupo Boc con ácido trifluoroacético a 0°C (Esquema 8).

Esquema 8. Ruta sintética para la obtención de **III** y **VIII**.

6.1.2.6. Síntesis de 3-aminopropanoato de adenosin-5'-ilo (IV) y 3-aminopropanoato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (IX)

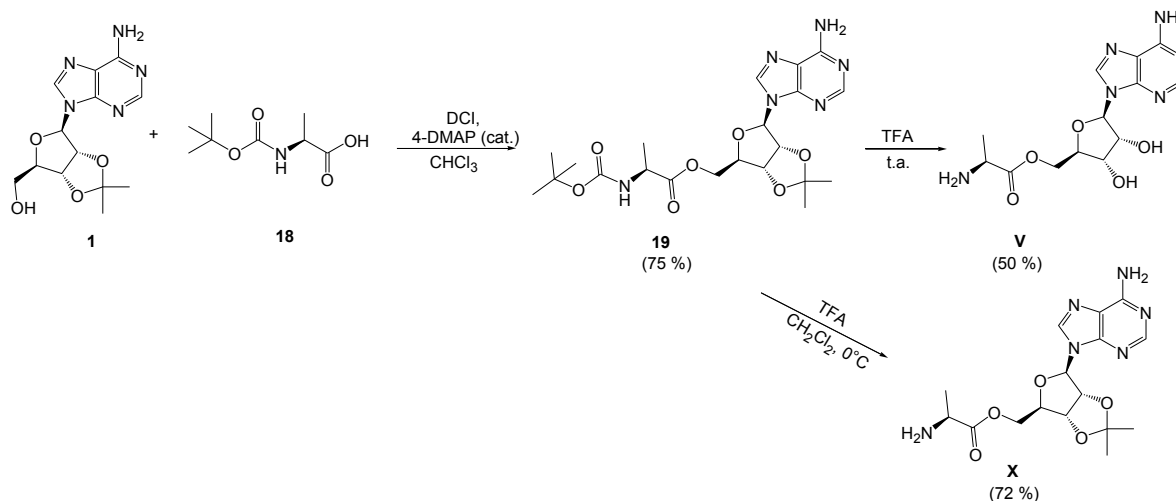
El compuesto **15**, obtenido por medio del acoplamiento de **1** y **14** en cloroformo, genera los productos finales **IV** y **IX**. Cuando **15** se trató con ácido trifluoroacético en ausencia de disolvente se obtiene el producto **IV**, y disminuyendo el tiempo de reacción y la temperatura se obtiene el éster **IX** (Esquema 9).



Esquema 9. Ruta sintética para la obtención de **IV** y **IX**.

6.1.2.7. Síntesis de (S)-alaninato de adenosin-5'-ilo (V) y (S)-alaninato de 2'-3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (X)

El intermediario **19** se sintetizó por acoplamiento de **1** y **18** con diciclohexilcarbodiimida y 4-dimetilaminopiridina en cloroformo (Esquema 10) y dio origen a los productos finales **V** y **X**. El producto **V** se genera del tratamiento ácido de **19** con TFA a temperatura ambiente por 3 días, mientras que el producto **X** se obtuvo con el mismo reactivo pero en condiciones más diluidas y a bajas temperaturas.



Esquema 10. Ruta sintética para la obtención de **V** y **X**.

6.2. Parte biológica

El metabolismo de los profármacos frente a la enzima adenosina desaminasa se evaluó en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México por el grupo de la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, siguiendo la metodología propuesta por Kizaki y Sakurada.⁷³

6.3. Parte computacional

Esta parte del proyecto se realizó en el laboratorio 122 del departamento de Farmacia de la Facultad de Química, bajo la supervisión del M. en C. Antonio Romo Mancillas.

6.3.1. Elección de las estructuras cristalizadas de las enzimas

Las enzimas de estudio se localizaron en el Protein Data Bank (PDB), empleándose aquellas moléculas cristalizadas de la especie *Homo sapiens* con mejor resolución (debajo de 2.5 Å), o que estén co-cristalizadas con sustratos parecidos a los diseñados. En este sentido, se emplearon las siguientes proteínas:

- Adenosina desaminasa humana (E.C. 3.5.4.4): ID PDB 3IAR
- Carboxilesterasa humana 1 (E.C. 3.1.1.1); ID PDB 1MX1
- Adenosina cinasa (E.C. 2.7.1.20); ID PDB 1BX4.

Las moléculas se descargaron por medio del programa Sybyl 8.0., donde se removieron las moléculas de agua, iones (salvo el catión zinc en el caso de la adenosina desaminasa)

y ligandos. Posteriormente se agregaron las cargas de Gasteiger e hidrógenos polares, se minimizaron con mecánica molecular empleando el campo de fuerza AMBER FF02 a una constante dieléctrica de 20 Debyes y guardaron en formato pdb para su posterior empleo en el estudio de acoplamiento molecular.

6.3.2. Estudio de acoplamiento molecular

6.3.2.1. Preparación del ligando

Los ligandos se modelaron y minimizaron a un nivel semiempírico empleando la base AM1 en el programa Spartan 02 Linux y finalmente se guardaron en formato mol2. Posteriormente, se prepararon en el programa Autodock tools 1.5.2., en donde se detectó automáticamente el centro de torsión y los enlaces rotables.

6.3.2.2. Preparación de la proteína

Las proteínas se prepararon empleando la herramienta Autodock Tools 1.5.2., donde se agregaron los hidrógenos polares capaces de formar puentes de hidrógeno y se quitaron las cargas de las histidinas.

6.3.2.3. Acoplamiento molecular

Se empleó la herramienta Autogrid 4 para la generación de las mallas, mientras que para el acoplamiento molecular se empleó el programa Autodock 4 y la visualización y análisis de los resultados generados se realizó empleando nuevamente Autodock tools 1.5.2. y Pymol viewer v0.99.

La generación de la malla se realizó en el sitio activo reportado de las enzimas en estudio.

- La malla de la adenosina desaminasa fue de 40 x 40 x 40 Å centrada en el catión zinc del sitio catalítico.
- La malla para la carboxilesterasa humana 1 se centró en el sitio catalítico del monómero 6, con un tamaño de malla de 50 x 50 x 50 Å.

Para la búsqueda de las conformaciones se empleó un algoritmo aleatorio del tipo Lamarckiano, con tamaño de población de 150 y 5000000 evaluaciones, fijando un valor de operador de recombinación de 0.8 y de mutación de 0.02. Se escogió la conformación energéticamente más favorable del conjunto más abundante.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Parte Química

Los resultados generados al realizar la síntesis de los profármacos diseñados así como los intentos para la realización de estos, se reportan en esta sección.

En la Tabla 2, se resumen las características fisicoquímicas más importantes de los compuestos sintetizados y en la Tabla 3 se muestran datos espectroscópicos exclusivamente de los productos finales.

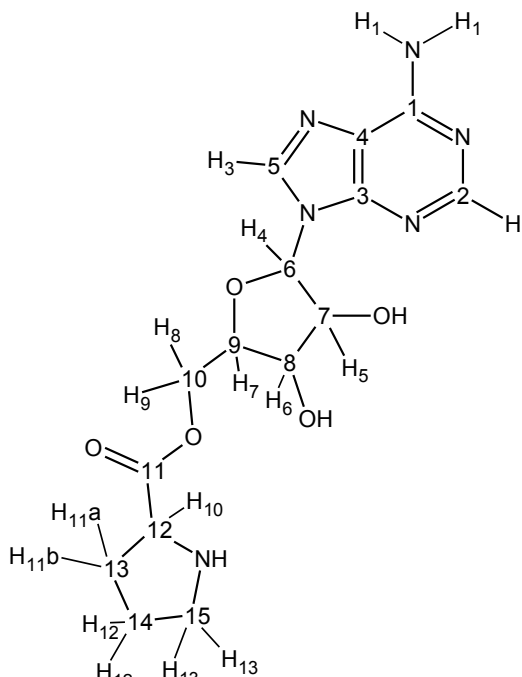
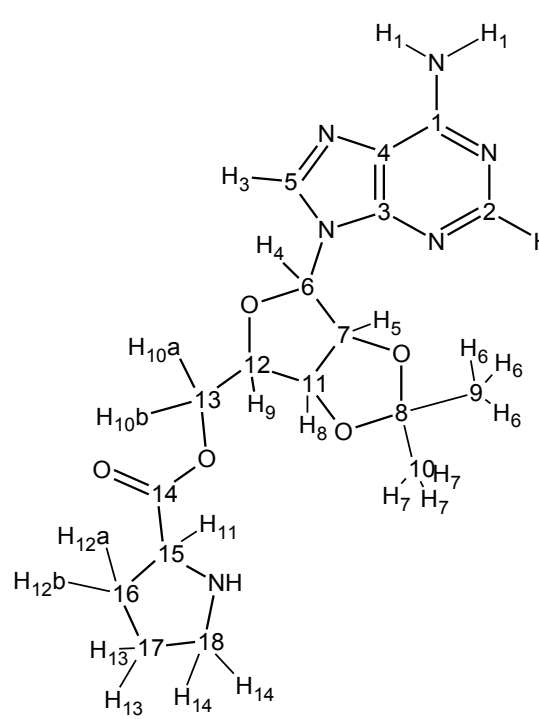
Tabla 2. Características fisicoquímicas de los compuestos obtenidos.

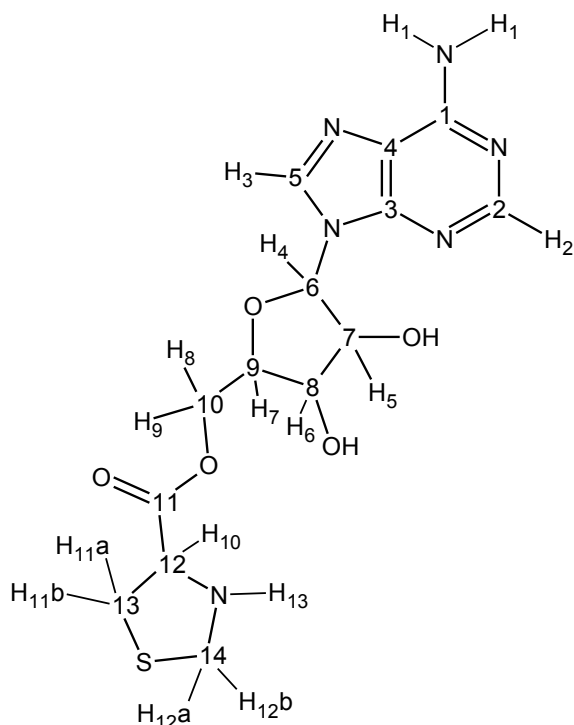
Compuesto	Apariencia	% Rendimiento	Punto de fusión	Factor de retención	Sistema de elución
1	sólido blanco cristalino	89.1	201.5-202.8	0.67	I
2	sólido blanco cristalino	79.6	133.2-134.0	0.57	III
3	sólido blanco cristalino	91.6	113.1-115.4	0.58	IV
4	aceite amarillo claro	48.2	n.d.	0.33	VI
5	aceite amarillo claro	77.2	n.d.	0.67	V
6	sólido blanco cristalino	96.7	132.1-133.4	0.75	III
7	sólido blanco cristalino	77.0	107.8-109.1	0.60	II
8	sólido café claro higroscópico	74.3	n.d.	0.38	VI
9	aceite café	45.0	n.d.	0.52	V
10	sólido blanco cristalino	73.0	75.9-76.5	n.o.	III
11	polvo blanco	87.0	110.3-112.1	0.56	IV
12	aceite amarillo	49.4	n.d.	0.15	VI
13	aceite amarillo	50.4	n.d.	0.54	V
14	sólido blanco	87.0	77.9-78.7	n.o.	III
15	aceite blanco	86.4	n.d.	0.49	IV
16	aceite blanco	50.4	n.d.	0.38	VI
17	aceite amarillo claro	77.2	n.d.	0.43	V
18	sólido blanco cristalino	84.0	83.1-83.5	0.82	III
19	polvo fino blanco	75.0	86.5-88.8	0.51	IV
20	aceite amarillo	50.4	n.d.	0.33	VI
21	aceite amarillo	72.5	n.d.	0.64	V

n.d. No determinado.

n.o. no se aprecia mancha de producto en ccf (en lámpara de luz UV y solución de ninhidrina)

Tabla 3. Datos espectroscópicos de los productos finales.

Compuesto	Características espectroscópicas
	<p>IR (película MeOH) cm^{-1}: 3337.85, 1651.47 (-NH₂), 3214.11 (-OH), 2946.23 (C alifático), 1681.28 (C=O), 1132.91 (C-O-C).</p> <p>EMFAB m/z: 365 [M+1]⁺.</p> <p>HR-EMFAB [M+1]⁺: C₁₅H₂₁O₅N₆.</p> <p>RMN-¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz, δ ppm): 1.88 (m, 3H, H₁₂, H_{11b}), 2.22 (m, 1H, H_{11a}), 3.19 (m, 2H, H₁₃), 4.12 (m, 1H, H₇), 4.27 (t, 1H, H₁₀, J= 5.2 Hz), 4.41 (m, 2H, H₈, H₉), 4.57 (t, 1H, H₆, J= 6 Hz), 4.68 (t, 1H, H₅, J= 5.2 Hz), 5.89 (d, 1H, H₄, J= 5.2 Hz), 7.45 (sa, 2H, H₁), 8.14 (s, 1H, H₃), 8.34 (s, 1H, H₂).</p> <p>RMN-¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 100 MHz, δ ppm): 23.4 (C₁₄), 28.1 (C₁₃), 45.9 (C₁₅), 59.1 (C₁₂), 66.2 (C₁₀), 81.6 (C₈), 86.3 (C₇), 88.3 (C₉), 91.2 (C₆), 119.6 (C₄), 140.5 (C₅), 149.7 (C₃), 152.7 (C₂), 156.2 (C₁), 169.2 (C₁₁).</p>
	<p>IR (película MeOH) en cm^{-1}: 3380.86, 1204.7 (-NH₂), 2954.39 (C alifático), 1681.6 (C=O), 1137.10 (C-O-C).</p> <p>EMFAB m/z: 405 [M+1]⁺.</p> <p>HR-EMFAB: C₁₅H₂₁O₅N₆.</p> <p>RMN-¹H (Acetona-<i>d</i>₆, 400 MHz, δ ppm): 1.40 (s, 3H, H₆), 1.56 (s, 3H, H₇), 1.85 (m, 3H, H₁₂, H_{12a}), 2.20 (m, 1H, H_{12b}), 3.35 (m, 2H, H₁₄), 4.18 (m, 1H, H₁₁), 4.28 (m, 1H, H_{10a}), 4.38 (m, 1H, H_{10b}), 4.43 (m, 1H, H₉), 5.14 (ddd, 1H, H₈, J₁= 17.1 Hz, J₂= 6.2 Hz, J₃= 3.6 Hz), 5.54 (ddd, 1H, H₅, J₁= 16.3 Hz, J₂= 6.2 Hz, J₃= 2 Hz), 6.23 (sa, 1H, H₄), 6.70 (sa, 2H, H₁), 8.18 (s, 1H, H₃), 8.21 (s, 1H, H₂).</p> <p>RMN-¹³C (Acetona-<i>d</i>₆, 100 MHz): 23.9 (C₁₆), 26.6 (C₉), 27.5 (C₁₀), 30.5 (C₁₇), 46.1 (C₁₈), 58.9 (C₁₅), 64.5 (C₁₃), 81.8 (C₁₁), 84.0 (C₇), 84.6 (C₁₂), 90.1 (C₆), 113.4 (C₈), 113.8 (C₄), 139.8 (C₅), 152.5 (C₃), 152.8 (C₂), 156.4 (C₁), 172.6 (C₁₄).</p>

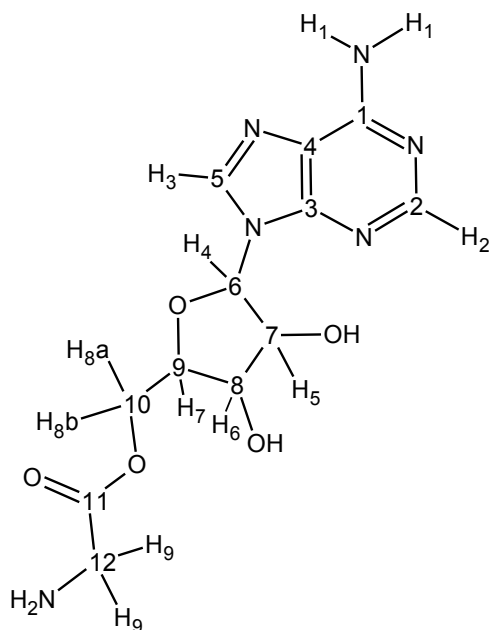


IR (película MeOH) en cm^{-1} : 3199.75, 1194.02 (-NH₂), 3071.48 (-OH), 2897.29 (C alifático), 1672.69 (C=O), 1129.00 (C-O-C).

EMFAB m/z: 383 [M+1]⁺.

RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 2.89 (dd, 1H, H_{11a}, J₁= 10.4 Hz, J₂= 6.8 Hz), 3.16 (dd, 1H, H_{11b}, J₁= 10.4 Hz, J₂= 7.2 Hz), 4.01 (t, 1H, H₁₀, J= 7.2 Hz), 4.10 (d, 1H, H_{12a}, J= 9.2 Hz), 4.30 (d, 1H, H_{12b}, J= 9.2 Hz), 4.30 (m, 1H, H₇), 4.42 (dd, 1H, H₈, J₁= 12 Hz, J₂=4.8 Hz), 4.49 (dd, 1H, H₉, J₁= 12 Hz, J₂=4 Hz), 4.57 (t, 1H, H₆, J= 5.2 Hz), 4.93 (t, 1H, H₇, J= 5.2 Hz), 5.62 (s, 1H, H₁₃), 5.86 (s, 2H, H₁), 6.06 (d, 1H, H₄, J= 4.8 Hz), 8.21 (s, 1H, H₃), 8.25 (s, 1H, H₁).

RMN-¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 41.3 (C₁₃), 59.2 (C₁₄), 69.6 (C₁₀), 70.4 (C₁₂), 76.0 (C₈), 78.8 (C₇), 87.1 (C₉), 94.0 (C₆), 118.2 (C₄), 145.1 (C₅), 154.9 (C₃), 157.8 (C₂), 161.3 (C₁), 176.2 (C₁₁).



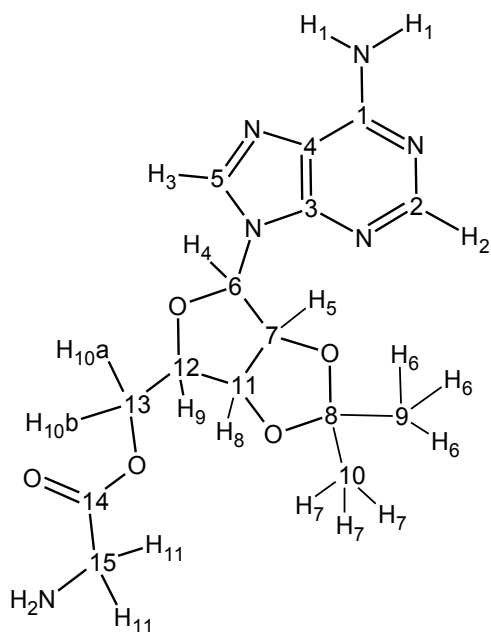
IR (película MeOH) en cm^{-1} : 3324.08, 1206.04 (-NH₂), 3155.14 (-OH), 2932.04 (C alifático), 1668.56 (C=O), 1134.80 (C-O-C).

EMFAB m/z: 325 [M+1]⁺.

HR-EMFAB [M+1]⁺: C₁₂H₁₇O₅N₆.

RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 3.63 (s, 2H, H₉), 4.16 (dd, 1H, H_{8a}, J₁= 11.6 Hz, J₂= 6.4 Hz), 4.25 (dd, 1H, H_b, J₁= 11.8 Hz, J₂= 4.8 Hz), 4.32 (m, 1H, H₇), 5.02 (dd, 1H, H₆, J₁= 6 Hz, J₂= 3.2 Hz), 5.42 (dd, 1H, H₅, J₁= 6.2 Hz, J₂= 2.8 Hz), 6.16 (d, 1H, H₄, J= 2.4 Hz), 7.31 (sa, 2H, H₁), 8.14 (s, 1H, H₃), 8.28 (s, 1H, H₂).

RMN-¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 42.2 (C₁₂), 64.5 (C₁₀), 81.1 (C₈), 83.5 (C₇), 83.9 (C₉), 89.5 (C₆), 119.5 (C₄), 140.2 (C₅), 149.2 (C₃), 153.2 (C₂), 156.6 (C₁), 170.6 (C₁₁).



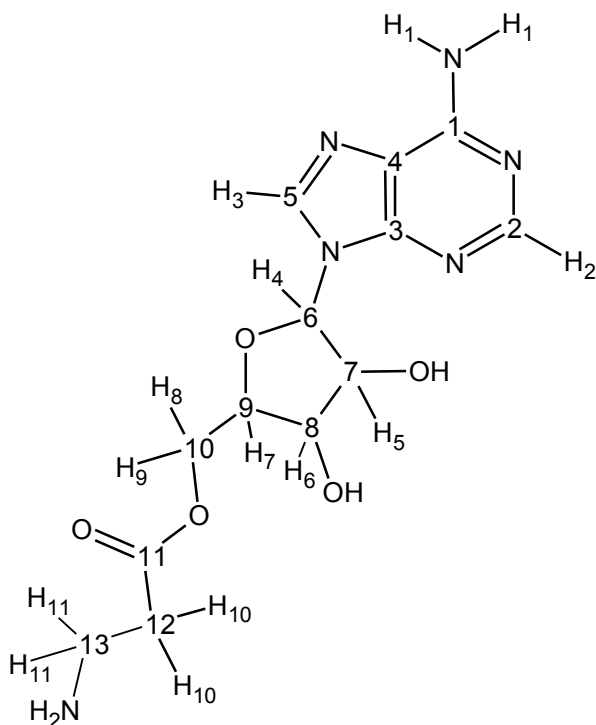
IR (película MeOH) en cm^{-1} : 3353.80, 1204.08 (-NH₂), 2992.99 (C alifático), 1678.53 (C=O), 1135.08 (C-O-C).

EMFAB m/z : 365 [M+1]⁺.

HR-EMFAB [M+1]⁺: C₁₅H₂₁O₅N₆.

RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 1.36 (s, 3H, H₆), 1.57 (s, 3H, H₇), 3.81 (s, 2H, H₁₁), 4.29 (dd, 1H, H_{10a}), 4.38 (dd, 1H, H_{10b}), 4.42 (m, 1H, H₉), 5.14 (dd, 1H, H₈), 5.54 (dd, 1H, H₅), 6.22 (d, 1H, H₄), 6.68 (sa, 2H, H₁), 8.20 (s, 1H, H₃), 8.22 (2, 1H, H₂).

RMN-¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 24.7 (C₉), 26.6 (C₁₀), 41.9 (C₁₅), 64.2 (C₁₃), 81.6 (C₁₁), 83.8 (C₇), 84.3 (C₁₂), 90.0 (C₆), 113.8 (C₈), 119.9 (C₄), 140.0 (C₅), 149.3 (C₃), 152.9 (C₂), 156.3 (C₁), 170.1 (C₁₄).



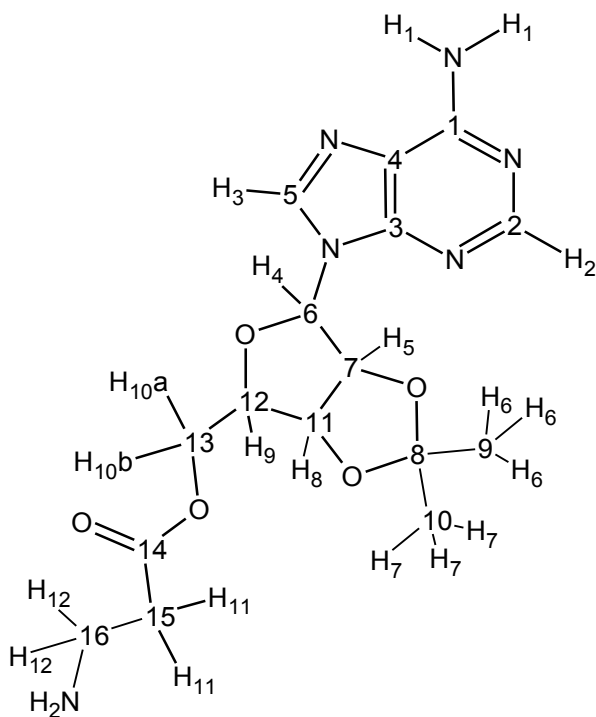
IR (película MeOH) en cm^{-1} : 3339.25, 1203.03 (-NH₂), 3199.06 (-OH), 1677.85 (C=O), 1132.67 (C-O-C).

EMFAB+ m/z : 339 [M+1]⁺.

HR-EMFAB [M+1]⁺: C₁₃H₁₉O₅N₆.

RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 2.48 (t, 2H, H₁₀, J= 2.8 Hz), 3.30 (m, 2H, H₁₁), 4.24 (dd, 1H, H₈, J₁= 11.8 Hz, J₂= 6.4 Hz), 4.32 (dd, 1H, H₈, J₁= 11.6 Hz, J₂= 4.8 Hz), 4.42 (m, 1H, H₇), 5.17 (dd, H₆, J₁= 6.2 Hz, J₂=3.6 Hz), 5.56 (dd, 1H, H₅, J₁= 6.4 Hz, J₂=2.4 Hz), 6.22 (d, 1H, H₄, J= 2 Hz), 6.71 (sa, 2H, H₁), 8.19 (s, 1H, H₃), 8.22 (s, 1H, H₂).

RMN-¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 34.3 (C₁₂), 36.2 (C₁₃), 63.8 (C₁₀), 81.7 (C₈), 83.9 (C₇), 84.4 (C₉), 90.2 (C₆), 113.8 (C₄), 140.0 (C₅), 149.3 (C₃), 152.9 (C₂), 156.4 (C₁), 171.0 (C₁₁).



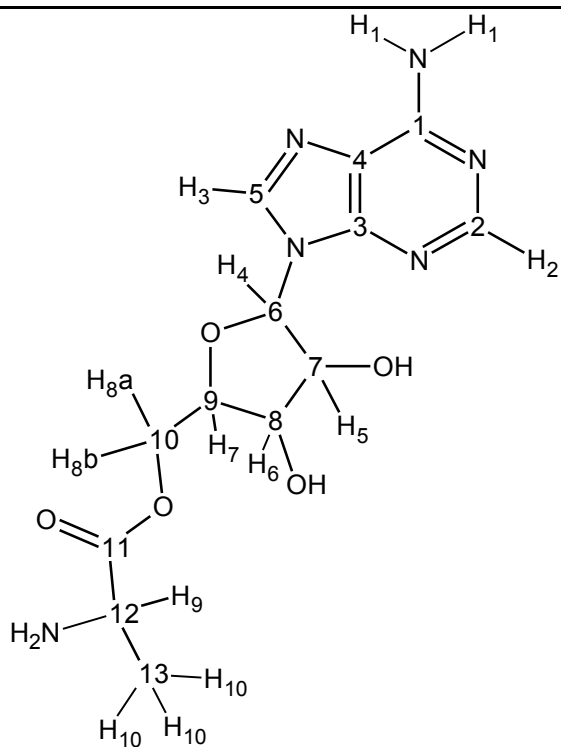
IR (película MeOH) en cm^{-1} : 3431.76, 1207.65 (-NH₂), 1684.68 (C=O), 1136.62 (C-O-C).

EMFAB m/z (%ar): 379 [M+1]⁺.

HR-EMFAB [M+1]⁺: C₁₆H₂₃O₅N₆.

RMN-¹H (Acetona-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 1.80 (s, 1H, H₆), 2.00 (s, 1H, H₇), 2.51 (2H, H₁₁), 3.33 (t, 2H, H₁₂, J= 6.8 Hz), 4.74 (dd, 1H, H_{10a}, J₁= 11.8 Hz, J₂= 6 Hz), 4.81 (dd, 1H, H_{10b}, J₁= 11.4 Hz, J₂= 4.4 Hz), 4.89 (m, 1H, H₉), 5.60 (dd, 1H, H₈, J₁= 6 Hz, J₂= 3.2 Hz), 5.97 (dd, 1H, H₅, J₁= 5.6 Hz, J₂= 2.4 Hz), 6.68 (d, 1H, H₄, J= 2.4 Hz), 6.73 (sa, 2H, H₁), 8.72 (s, 1H, H₃), 8.76 (s, 1H, H₂).

RMN-¹³C (Acetona-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 24.6 (C₉), 26.5 (C₁₀), 30.1 (C₁₅), 31.0 (C₁₆), 64.3 (C₁₃), 81.5 (C₁₁), 84.1 (C₉), 84.4 (C₁₂), 90.2 (C₆), 113.9 (C₈), 115.7 (C₄), 140.6 (C₅), 149.1 (C₃), 151.6 (C₂), 155.4 (C₁), 170.5 (C₁₄).



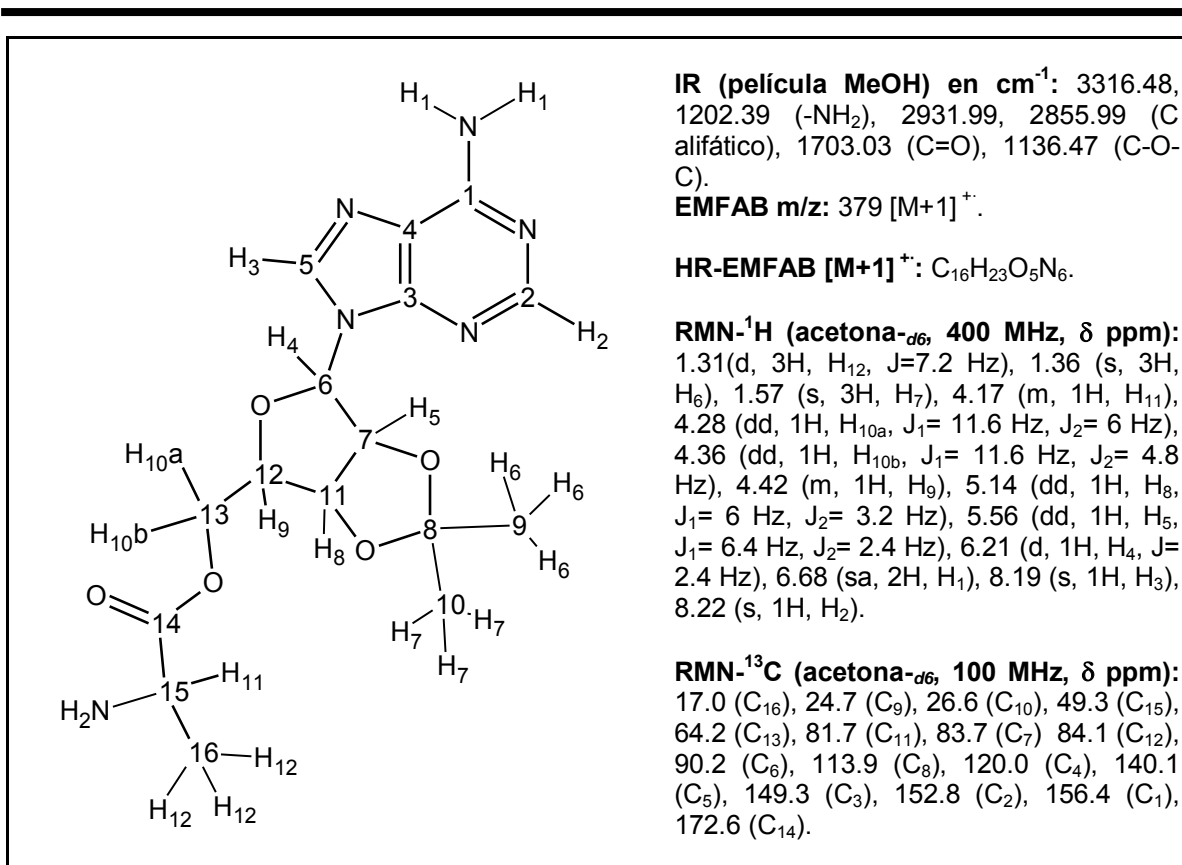
IR (película MeOH) en cm^{-1} : 3095.97, 1201.83 (-NH₂), 1676.80 (C=O), 1134.99 (C-O-C).

EMFAB m/z: 339 [M+1]⁺.

HR-EMFAB [M+1]⁺: C₁₃H₁₉O₅N₆.

RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 1.26 (d, 3H, H₁₀, J= 13.6 Hz), 3.17 (m, 1H, H₉), 4.14 (m, 1H, H₇), 4.28 (t, 1H, H₈, J= 5.2 Hz), 2.38 (dd, 1H, H_{8a}, J₁= 12 Hz, J₂= 6.4 Hz), 4.47 (dd, 1H, H_{8b}, J₁= 11.8 Hz, J₂= 3.6 Hz), 4.68 (t, 1H, H₅, J= 5.2 Hz), 5.93 (d, 1H, H₄, J= 4.8 Hz), 7.88 (sa, 2H, H₁), 8.25 (s, 1H, H₃), 8.43 (s, 1H, H₂).

RMN-¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 17.1 (C₁₃), 31.1 (C₁₂), 65.9 (C₁₀), 70.6 (C₈), 73.2 (C₇), 81.9 (C₉), 88.3 (C₆), 119.5 (C₄), 141.5 (C₅), 149.5 (C₃), 151.2 (C₂), 155.1 (C₁), 168.0 (C₁₁).

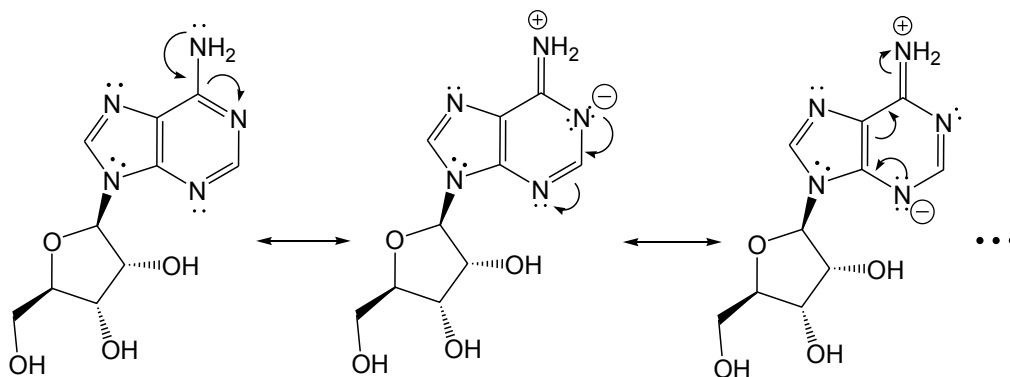


* Los átomos de carbono e hidrógeno se numeraron arbitrariamente para mejor comprensión.

7.1.1. Obtención y caracterización de 2',3'-O-isopropilidenadenosina

El núcleo común de todos los profármacos diseñados es la adenosina. Dicha molécula presenta cuatro grupos nucleofílicos (amina en la posición 1 del anillo de purina, hidroxilo carbinólico de la ribosa y el *cis*-diol), lo cual representa un reto sintético que necesitará el empleo de grupos protectores puesto que las modificaciones estructurales se requieren únicamente en el hidroxilo primario (posición 5').

En el caso del grupo amino de la adenina, de acuerdo a la teoría de resonancia, podemos predecir su bajo poder nucleofílico debido a que el par electrónico del nitrógeno se encuentra en resonancia con el anillo de purina, de acuerdo al Esquema 11, disminuyendo así la densidad electrónica necesaria para llevar a cabo un ataque nucleofílico.



Esquema 11. Formas resonantes del anillo de purina. Debido a la resonancia, disminuye del poder nucleofílico del nitrógeno.

Lo anterior descrito se puede corroborar con un estudio de modelado molecular, donde es posible obtener el potencial electrostático mapeado en la densidad electrónica (Figura 13) y así comprobar visualmente que átomos de la molécula poseen alta densidad electrónica y cuales una deficiencia de ella.

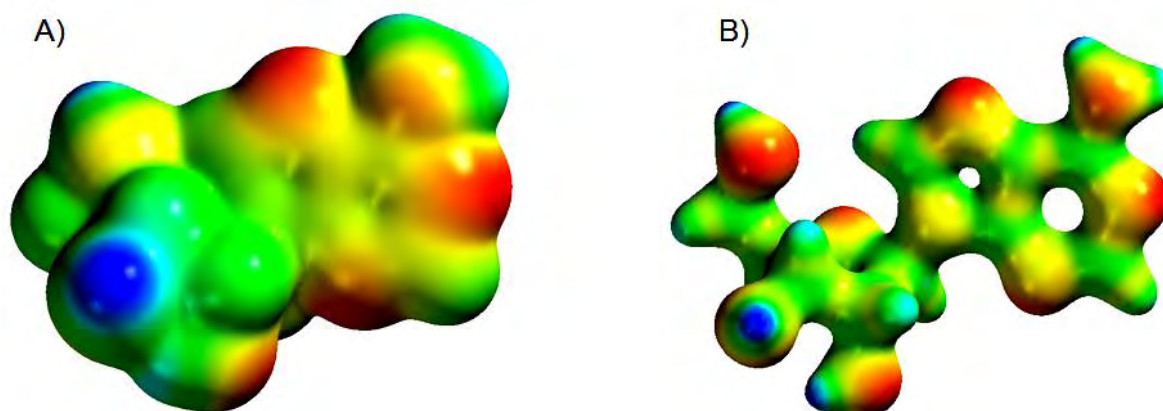
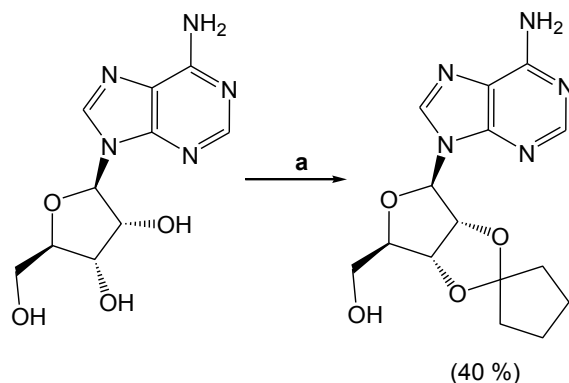


Figura 13. Mapa del potencial electrostático de la adenosina. Las zonas azules indican deficiencia de densidad electrónica mientras que las rojas indican alta densidad electrónica. La molécula se minimizó con método DFT B3LYP/6-31G* y la superficie se generó con el mismo nivel de teoría y base. A) Isovalor de 0.002 electrón/ua³. B) Isovalor de 0.080 electrón/ua³.

Ahora bien, el 1,2 diol de la ribosa si tiene un poder nucleofílico que competirá con el del hidroxilo carbinólico por lo que se decidió realizar la formación de un cetal (1,3-dioxolano) para evitar su reacción frente a un electrófilo. Como primer intento, se realizó la formación del ciclopentilideno empleando ciclopentanona en dimetilformamida con catálisis ácida (Esquema 12) generándose una resina que después de varios pasos de purificación, pudo precipitarse en un rendimiento muy bajo (40 %).



(a) Ciclopentanona, DMF, *p*-TsOH

Esquema 12. Protección de la adenosina con ciclopentanona.

La protección del 1,2 diol fue posteriormente realizada y optimizada mediante la formación del acetónido (cetal formado con acetona) en presencia de ácido *p*-toluensulfónico y 2,2-dimetoxipropano como agente desecante en un rendimiento del 89 %. Se propone en la literatura que la formación del 1,3-dioxolano es termodinámicamente más favorable que la formación del 1,3-dioxano en estas condiciones, con lo que el hidroxilo primario quedará libre para reaccionar posteriormente.⁷⁴ La protección con acetona tiene la ventaja (además del buen rendimiento obtenido y la facilidad de purificación) que la desprotección del acetónido es más fácil de realizarse y en condiciones más suaves que el ciclopentilideno, pero lo suficientemente estable para resistir las reacciones subsecuentes.

Se realizó la caracterización espectroscópica de este intermediario que es clave en la preparación de los profármacos y la elucidación estructural de los productos finales; al caracterizar a esta molécula con su espectro de RMN, la elucidación estructural de los productos finales será más sencilla, puesto que no se realizarán modificaciones drásticas en el anillo de purina y se podrán eliminar las señales correspondientes a este núcleo. Como podemos ver en el espectro de RMN (Figura 14), claramente se aprecian los hidrógenos alifáticos a campo alto del cetal (1.36 y 1.65 ppm) que son magnéticamente no equivalentes debido a la conformación de sobre que adopta el anillo de ribosa: los hidrógenos de un metilo presentan efecto anisotrópico debido al anillo de purina. A campo bajo se pueden apreciar señales muy características del anillo de purina: los hidrógenos aromáticos (7.91 y 8.31 ppm) observándose como un singulete fino seguido de una señal ancha a 6.23 ppm que se intercambia con agua deuterada correspondiente al grupo amino. Las señales que se encuentran entre 3.5 y 6 ppm corresponden a los hidrógenos del anillo de ribosa. Evidentemente, la señal tipo doblete a 5.90 ppm pertenece al hidrógeno más desprotegido, siendo el que se encuentra en la posición 1' del anillo de

ribosa. Para poder asignar las señales a los demás hidrógenos, se efectuó un espectro COSY (Figura 15), el cual indica que hidrógenos están acoplados entre sí, y con ayuda de la multiplicidad obtenida con el experimento de una dimensión. Como se observa en el espectro COSY, el hidrógeno de C1' se acopla a la señal triplete de 5.21 ppm por lo que se asigna al hidrógeno en C2'. Siguiendo esta secuencia podemos deducir que la señal doblete de 5.11 corresponde al hidrógeno de C3' y la señal ancha a 4.55 ppm al hidrógeno de C4'. Finalmente, el metileno presenta hidrógenos no equivalentes debido a la presencia de un centro quiral próximo a el y se esperan dos señales doble de doble. Efectivamente, el hidrógeno de C4' se acopla con estas señales; las dos señales doble de doble son características del metileno presente en todos los compuestos finales.

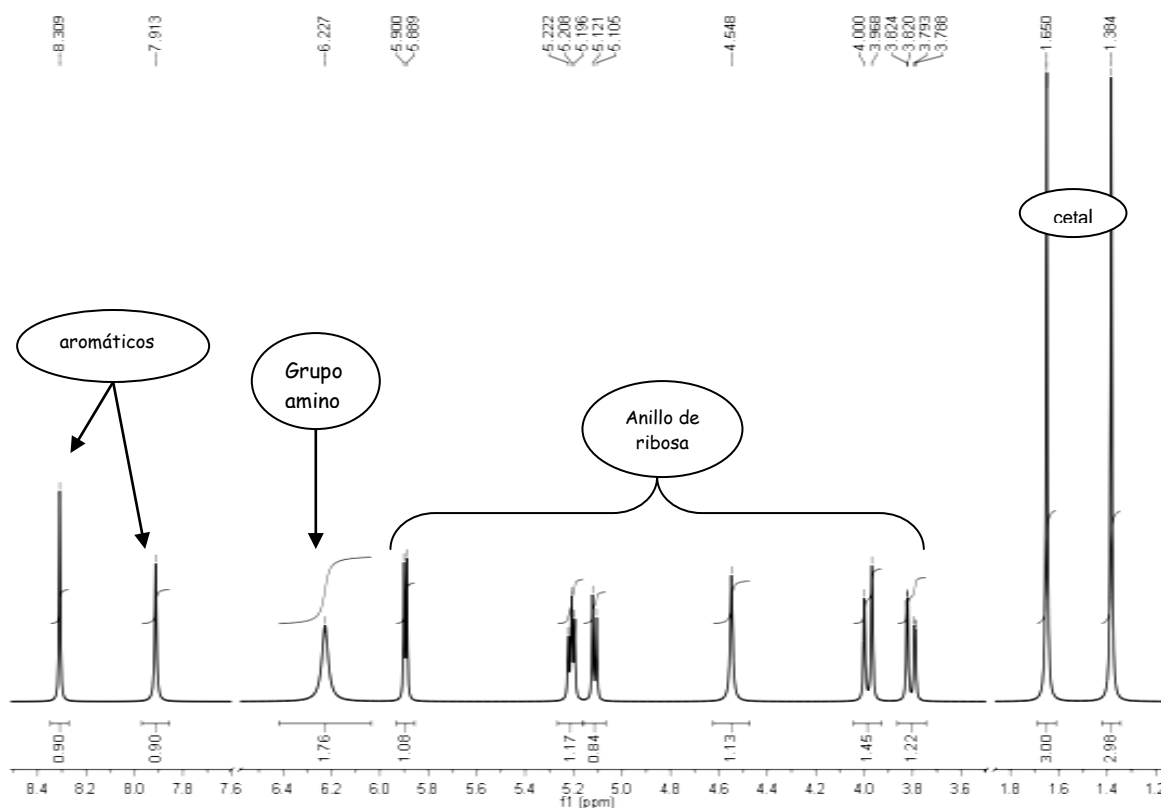
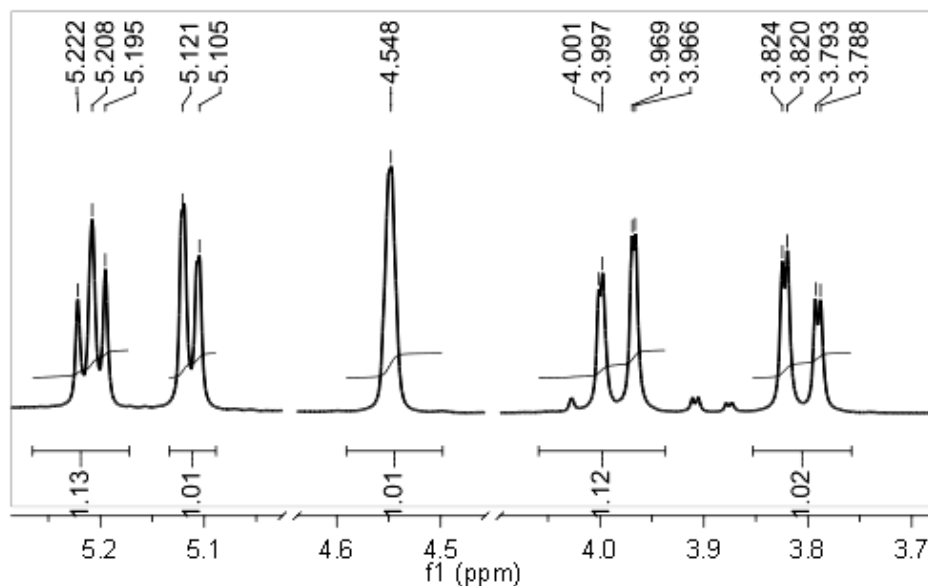


Figura 14. Asignación parcial de los hidrógenos de 2',3'-O-isopropilidenadenosina.

La asignación detallada e inequívoca de los hidrógenos de este compuesto es esencial para la elucidación estructural de los compuestos finales. Como se puede apreciar posteriormente, los desplazamientos químicos (a excepción de los hidrógenos del metileno que dan respuesta a campo más bajo por el efecto mayor de desprotección que

ejerce el enlace tipo éster con respecto al alcohol original) no cambian significativamente. La multiplicidad en ocasiones (para los hidrógenos de C2', C3' y C4') se ve modificada debido al valor numérico muy próximo de las constantes de acoplamiento; es decir, los hidrógenos de C2' pueden aparecer como triplete o doble de dobles.

A)



B)

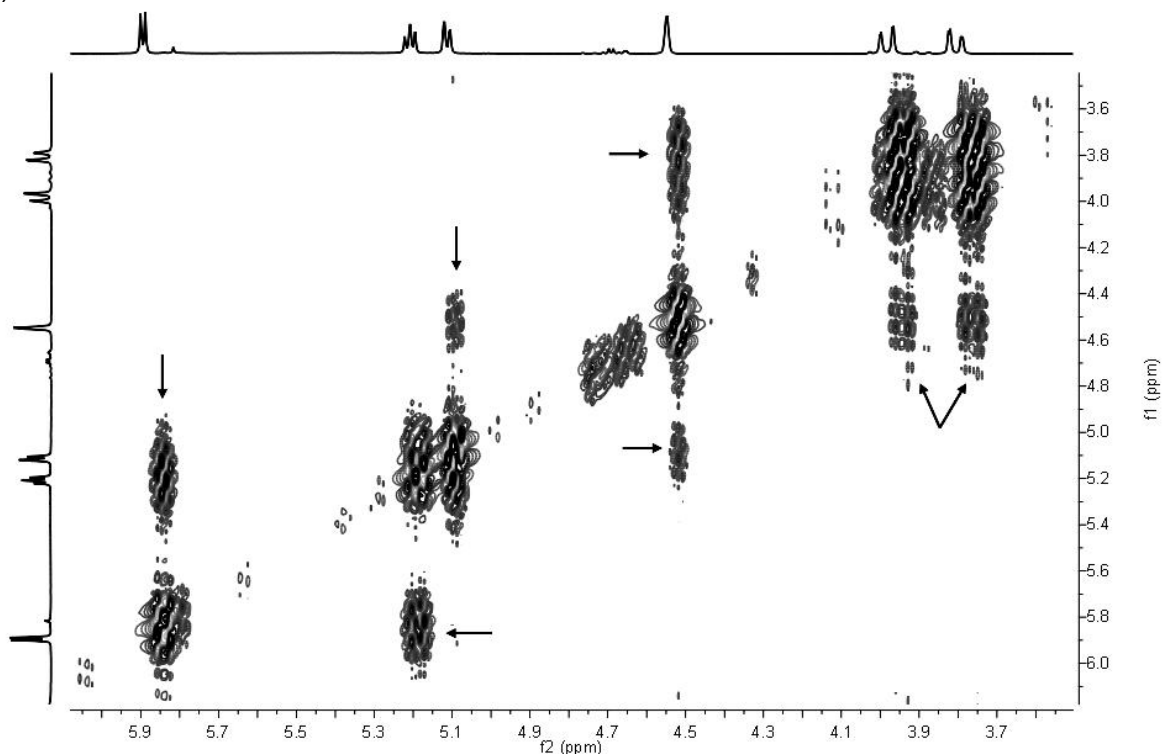


Figura 15. Ampliación del espectro RMN-¹H (A) y COSY (B) en la región de 3.5 a 6 ppm.

En conclusión, en la Figura 16 se muestran los desplazamientos químicos de los hidrógenos para el anillo de 2',3'-O-isopropilidenadenosina.

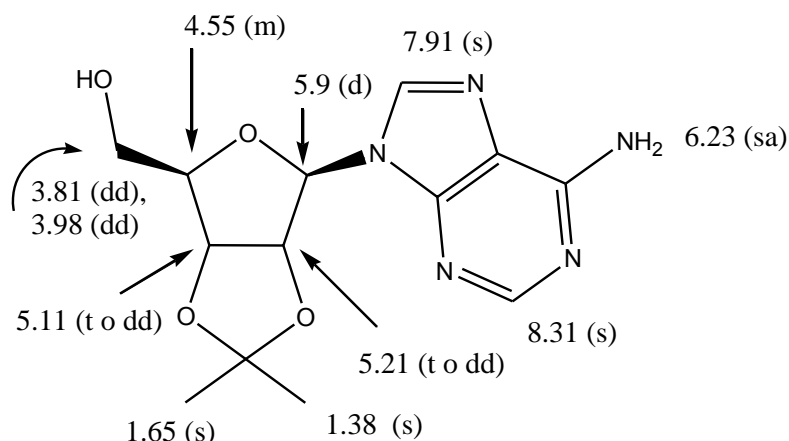
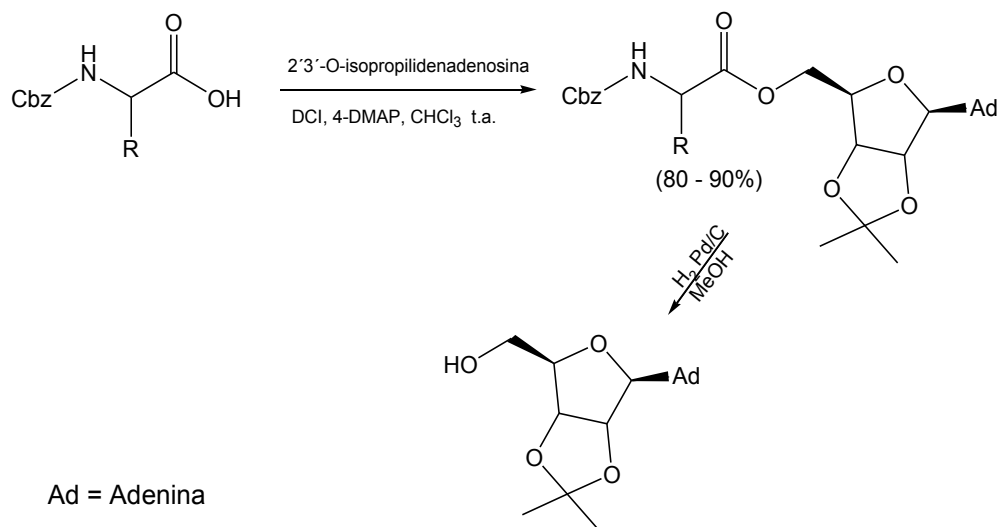


Figura 16. Asignación de las señales y desplazamiento químico del núcleo 2',3'-O-isopropilidenadenosina

7.1.2. Protección de los aminoácidos

Como se mencionó anteriormente, los aminoácidos se protegieron en el extremo amino. La elección del grupo Boc (*tert*-butoxicarbonilo) tuvo como fundamento varias cuestiones. En primer lugar, la protección con Boc resulta más económica que con Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), mientras que la protección con Cbz (benzoxicarbonilo) no tuvo resultados favorables en la desprotección (Esquema 13), puesto que la hidrogenación catalítica del éster protegido resultó en la hidrólisis de este debido al metanol, aunque se tiene planeado a futuro el cambio de disolvente. En otro rubro, en el plan de síntesis se ideó la desprotección simultánea del cetil y el grupo protector del amino, desprotección ampliamente reportada cuando se presenta el grupo Boc en la molécula y llevada a cabo con ácido trifluoroacético.^{75,76} Finalmente, en cuestión de simplificación de espectros, se esperan menos señales de hidrógeno y carbono con el empleo del mencionado grupo.



Esquema 13. Resultados generados al emplear Cbz como grupo protector.

Una vez resuelto el problema de la elección del grupo protector, se realizó la síntesis con buenos rendimientos y pureza, comprobándose la estructura por espectrometría de masas (FAB+) y RMN-¹H. Es de apreciarse una peculiaridad en el espectro de hidrógeno: los metilos del *tert*butilo en ocasiones se observan como dos señales, una integrando para 6 hidrógenos y la otra para 3 hidrógenos; esto se origina debido a la presencia de rotámeros en torno al carbamato (similar a lo que ocurre en *N,N*-dialquil amidas por el pseudocarácter de doble enlace), y la barrera energética es lo suficientemente grande para permitir la existencia de estas dos poblaciones de rotámeros en solución.

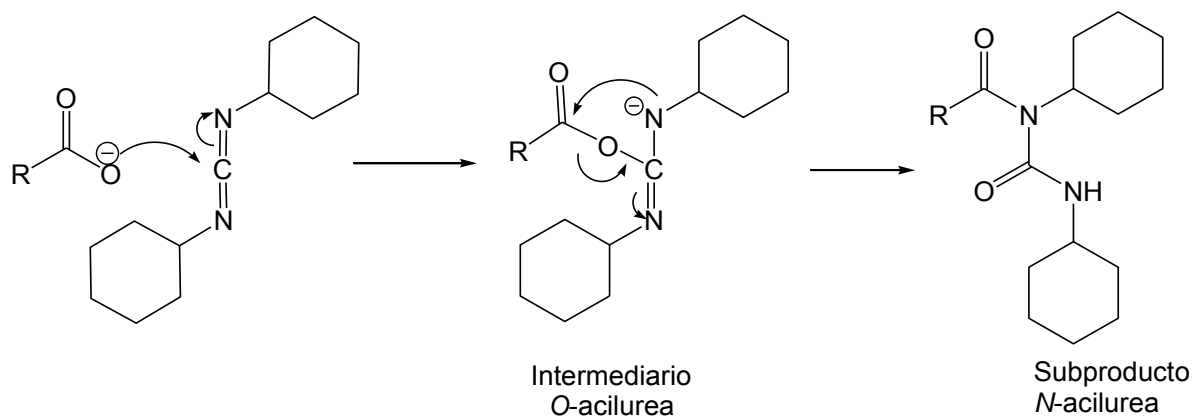
7.1.3. Obtención y caracterización de los profármacos I y VI

Los productos I y VI se obtuvieron del intermediario resultado de la esterificación entre la Boc-prolina y 2',3'-O-isopropilidenadenosina a partir de una síntesis divergente. El acoplamiento de las moléculas anteriores se intentó con varias condiciones (Tabla 4). Para el caso de los sustratos en estudio, se demostró que el acoplamiento transcurre con mejor rendimiento y menos tiempo de reacción al emplear dicitclohexilcarbodiimida (DCI) que carbonildiimidazol (CDI), activadores del grupo carboxilo ampliamente usados en síntesis orgánica. El empleo de DMF como disolvente no sólo limitó la reacción hacia la formación del producto, sino que, además, dificultó su aislamiento y purificación. En la literatura se encontró que la dicitclohexilcarbodiimida se emplea frecuentemente en un exceso (3 a 5 equivalentes), y cuando se agrega como catalizador la 4-dimetilaminopiridina, los rendimientos suelen mejorar.⁷⁶ En este aspecto, se probaron

tales condiciones empleando como disolventes cloroformo y DMF, siendo más alentador el uso de cloroformo. Posteriormente se pudo optimizar la reacción disminuyendo la cantidad de DCI hasta 1.3 equivalentes, con conversión total del sustrato y en muy buenos rendimientos. Se reporta que con el empleo de un elevado exceso de DCI y disolventes como la DMF, suelen generarse derivados *N*-acilurea debido a al ataque nucleofílico intramolecular del intermediario *O*-acilurea, mermando los rendimientos y complicando la purificación (Esquema 14),⁷⁷ lo cual pudo comprobarse al enviar a espectrometría de masas el crudo de reacción, donde aparece un pico correspondiente a este subproducto (espectro no mostrado). Debido a lo anterior, la cantidad de DCI se disminuyó hasta 1.3 equivalentes, condiciones en las cuales se logró obtener en buen rendimiento el producto.

Tabla 4. Métodos llevados a cabo para la reacción de acoplamiento.

Agente acoplante	Condiciones	Observaciones
CDI	1.5 eq CDI, CHCl ₃	Reacción con poca formación de producto
DCI	3 eq. DCI, DMF, 2 d	Formación de producto casi nula
	3 eq. DCI 30 % mol 4-DMAP, DMF 2 d	Poca formación del producto
	3 eq DCI, 30% mol 4-DMAP, CHCl ₃ , 5 h	Formación del producto en Buenos rendimientos.
	1.3 eq DCI 30% mol 4-DMAP, CHCl ₃ , 3h	100 % de transformación de sustrato en producto.



Esquema 14. Mecanismo propuesto para la formación del subproducto obtenido al emplear un gran exceso de DCI

Las condiciones óptimas del acoplamiento se emplearon con éxito para todas las rutas sintéticas posteriores, cambiándose en ocasiones el cloroformo por DCM con los mismos

resultados. El empleo de DCI no sólo mejoró el rendimiento con respecto al empleo de carbonildiimidazol, sino también la purificación y manejo de la reacción resultan más fáciles de realizar. En ocasiones, los productos tenían la suficiente pureza para continuar con la ruta sintética sin llevar a cabo la purificación.

Ahora bien, la elucidación estructural de la molécula intermediaria se realizó mediante el empleo de RMN-¹H y espectrometría de masas FAB+. En la Figura 17 se muestran las expansiones de las zonas claves para la elucidación estructural. En campo alto, podemos ver las señales de 4 metilos, dos correspondientes al acetónido y dos (que integran para diferente número de hidrógenos) del *tert*butilo. Estas señales indican claramente que las moléculas se encuentran unidas, pero surge la incógnita de la regioselectividad del acoplamiento. De acuerdo a lo establecido en la sección 7.1.1., el acoplamiento hipotéticamente será en el hidroxilo carbinólico y no en el grupo amino de la purina; esto se comprueba con la señal de 5.71 ppm, señal ancha que integra para dos hidrógenos y se intercambia con agua deuterada, que claramente pertenece al grupo amino aromático. Lo anterior escrito comprueba la hipótesis de regioselectividad en la molécula de adenosina cuando se encuentran protegidos los hidroxilos en las posiciones 2' y 3' del anillo de ribosa.

Finalmente, se comprueban las señales correspondientes al anillo de ribosa entre 4.3 y 6.2 ppm y únicamente faltan asignar las señales del anillo de pirrolidina. En teoría, las señales de estos hidrógenos se esperan como multipletes, puesto que se encuentran acoplados con varios hidrógenos no equivalentes. En 1.86 ppm hay un multiplete que integra para 4 hidrógenos correspondiente a las posiciones 3 y 4 del anillo mientras que a 3.42 ppm se aprecia otro multiplete de los hidrógenos de la posición 5 del anillo de ribosa. El hidrógeno de la posición anomérica, que hipotéticamente debería ser un triplete o doble de dobles, se superpone con la señal del metileno de la ribosa.

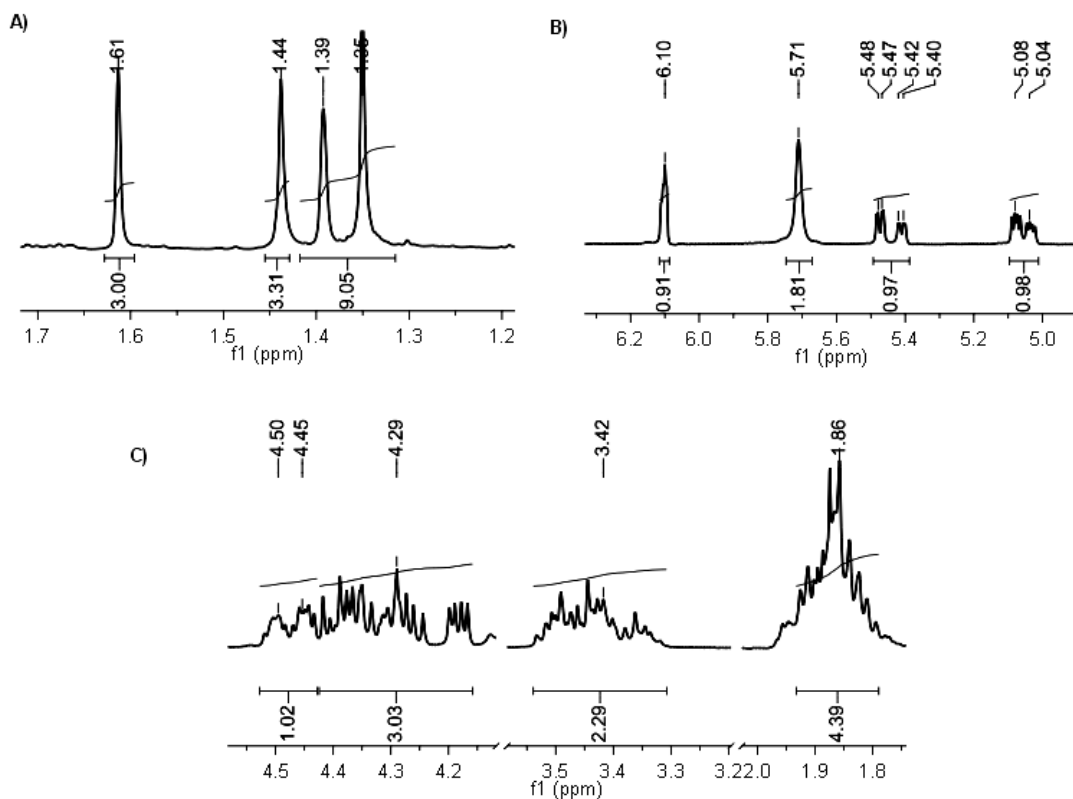


Figura 17. Expansiones del espectro RMN- ^1H de *N*-Boc-(*S*)-prolinato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo. A) Región de hidrógenos alifático acíclicos. B) Hidrógenos del anillo de ribosa. C) Hidrógenos del anillo de pirrolidina.

El siguiente paso en el plan de síntesis corresponde a la remoción de los grupos protectores. La desprotección del grupo Boc se realizó por diferentes métodos reportados en la literatura (Tabla 5) en incluso empleando la síntesis asistida por microondas. En la mayoría de los casos probados, la reacción ocurría con hidrólisis del sustrato para dar adenosina y en el peor de los casos, como único producto. Incluso, recientemente se ha reportado que los alcoholes fluorados se emplean como método suave para la desprotección del grupo Boc;⁷⁸ sin embargo, al momento de aplicar esa estrategia al sustrato en estudio, no hubo reacción. En base a todas las pruebas realizadas, se pudieron establecer dos metodologías. Con el tratamiento de ácido trifluoroacético en ausencia de disolvente en agitación vigorosa por 3 a 5 días, se logra la desprotección simultánea del cetal y el grupo Boc, mientras que cuando se trata el sustrato en CH_2Cl_2 : TFA (2:1) a 0°C , se logra la ruptura única del Boc. Esta metodología se llevó a cabo para cada profármaco obteniéndose resultados muy similares.

Tabla 5. Intentos realizados para la desprotección del grupo Boc.

Agente desprotector	Condiciones	Resultados
ácido trifluoroacético	TFA: H ₂ O (4:1)	Hidrólisis del compuesto
	MAOS*	Ruptura completa del éster
	t.a.	Desprotección del cetil y Boc
	CH ₂ Cl ₂ :TFA (2:1), 0°C	Desprotección del Boc
2,2,2-trifluoroetanol	Reflujo 2 días	Sin reacción
1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol	Reflujo 2 días	Sin reacción
HCl	Concentrado sin disolvente	Ruptura del enlace éster
	Solución en Dioxano	Ruptura parcial del éster

*MAOS. Las condiciones y gráfico de operación de la síntesis se muestran en el apéndice II.

Los productos finales **I** y **VI** se obtuvieron como sólidos, los cuales después de un corto tiempo cambiaban su estado físico generando aceites muy viscosos (higroscópicos). Ambos compuestos se caracterizaron espectroscópicamente y espectrométricamente. El espectro de IR para el profármaco **I**, presenta bandas características del grupo amino, 3337.85 cm⁻¹ para el estiramiento C-N y 1651.47 cm⁻¹ para flexión tipo tijera, también se comprueba la presencia de otros grupos característicos en la molécula como 3214.11 cm⁻¹ para el grupo hidroxilo, 1681.28 cm⁻¹ para el grupo carbonilo y 1132.91 cm⁻¹ para el estiramiento asimétrico del éter. En el caso del compuesto **VI**, la espectroscopía infrarroja no ayuda a la elucidación estructural, puesto que presenta bandas muy similares a las observadas en el profármaco **I**, a excepción de que el anterior carece de la banda de estiramiento O-H. La resonancia magnética nuclear de hidrógeno de ambos profármacos es muy similar, a excepción de la presencia de las señales del *ter*butilo para el caso del compuesto **VI** (Figura 18), y se confirma parcialmente la estructura por la presencia de las señales de los hidrógenos del anillo de purina, ribosa y pirrolidina, a excepción de los unidos a heteroátomos que posiblemente se encuentren traslapados con la señal de agua de los disolventes. Para confirmar la asignación de los hidrógenos, se recurrió a un experimento HSQC editado, con el cual se pueden apreciar los hidrógenos de metilos y metinos de un color, y los de metilenos de otro color así como también la señal de ¹³C al que están enlazados. Con ello, los desplazamientos químicos y la multiplicidad, se logró asignar las señales a los hidrógenos de cada molécula.

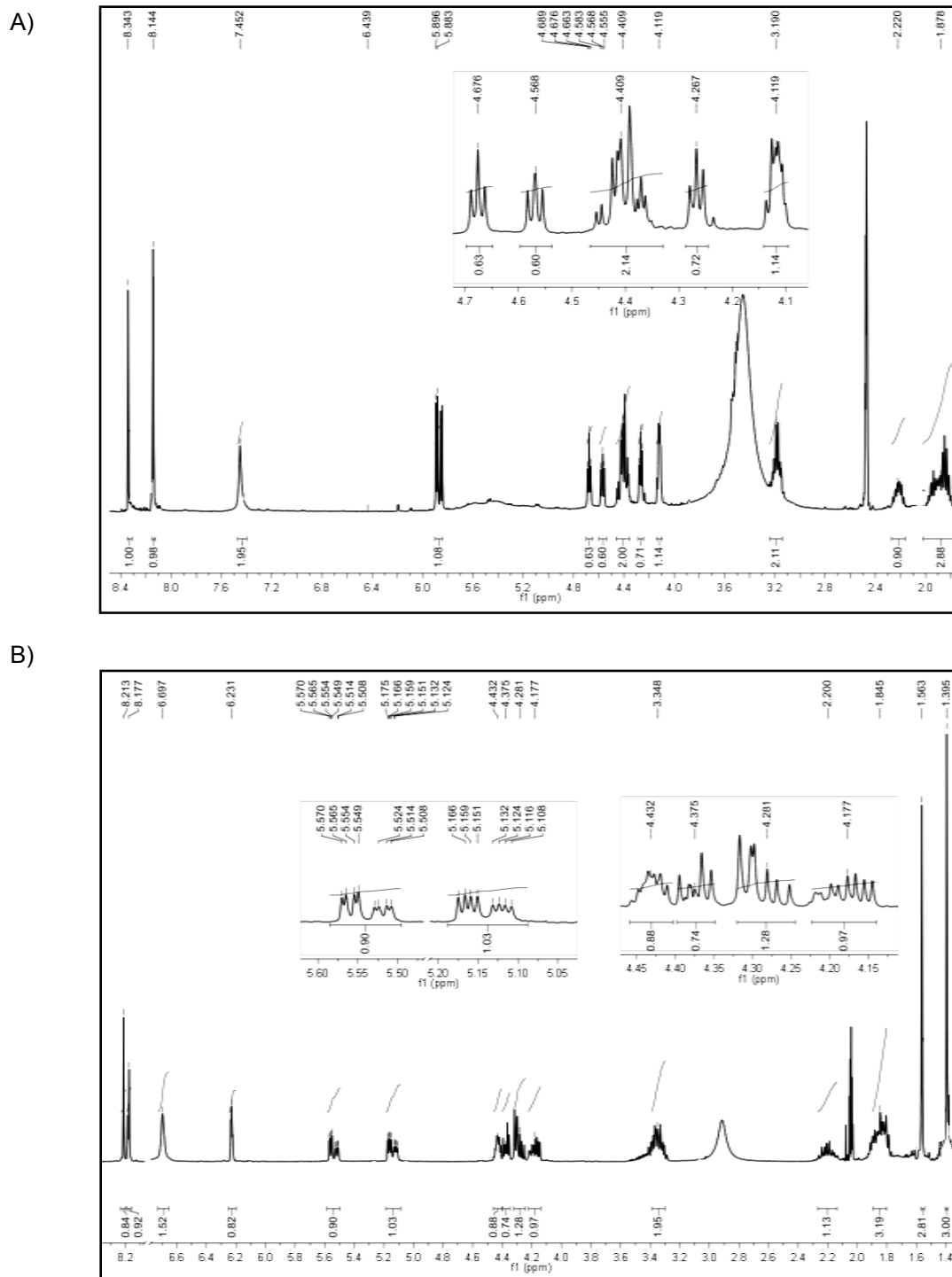


Figura 18. Comparación de los espectros de RMN-¹H para los profármacos I (A) y VI (B).

A manera de ejemplo, en la Figura 19 se muestra el espectro HSQC del profármaco VI, donde los metilos y metinos se muestran como manchas negras y los metilenos grises. Cabe señalar que el desplazamiento químico observado en el experimento en dos dimensiones varía levemente con respecto al de una dimensión. La señales a campo más alto, tanto en ¹H como en ¹³C, pertenecen a carbonos alifáticos del cetal y el anillo de

pirrolidina. Los metilos del cetal se aprecian claramente como manchas negras a 1.55 y 1.38 ppm mientras que se observan señales metilénicas (multipletes en ^1H) a 1.82 y 2.15 ppm, confirmándose como los hidrógenos del C2 y C3 del anillo de pirrolidina (prolina); el multiplete a 1.85 ppm integra para 3 hidrógenos, los dos del C3 y 1 hidrógeno del C1. Se distinguen dos manchas grises más de metilenos, que en la molécula pertenecen al metileno carbinólico de la ribosa (dos señales dd que integran para 1 H a 4.28 y 4.37 ppm) y el metileno de C4 de la pirrolidina a 3.35 ppm. Restan 5 manchas de color negro, lo que indica que pertenecen a carbonos metílicos o metínicos (en este caso son 5 metinos) Las señales a campo alto en ^{13}C son de los metinos del anillo de ribosa mientras que la señal de 4.18 ppm pertenece al carbono anomérico de la prolina.

Con el análisis anterior, se verificó la estructura de los profármacos que contienen a la prolina como modificador, comprobándose además su masa molar por espectrometría de masas técnica de FAB+ baja resolución (M+1 para el profármaco **I** de 365 g/mol y 405 g/mol para el **VI**) y su fórmula molecular (y composición) por FAB+ de alta resolución (Composición elemental del M+1 para el profármaco **I** $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{O}_6$ y para el profármaco **VI** $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{N}_6$).

Para la elucidación estructural de los siguientes profármacos, únicamente se hará hincapié en las señales correspondientes al aminoácido, dado que las señales de la adenosina sufren modificaciones no significativas en cuanto al desplazamiento químico y multiplicidad, a menos en aquellos espectros donde se presenten ciertas peculiaridades.

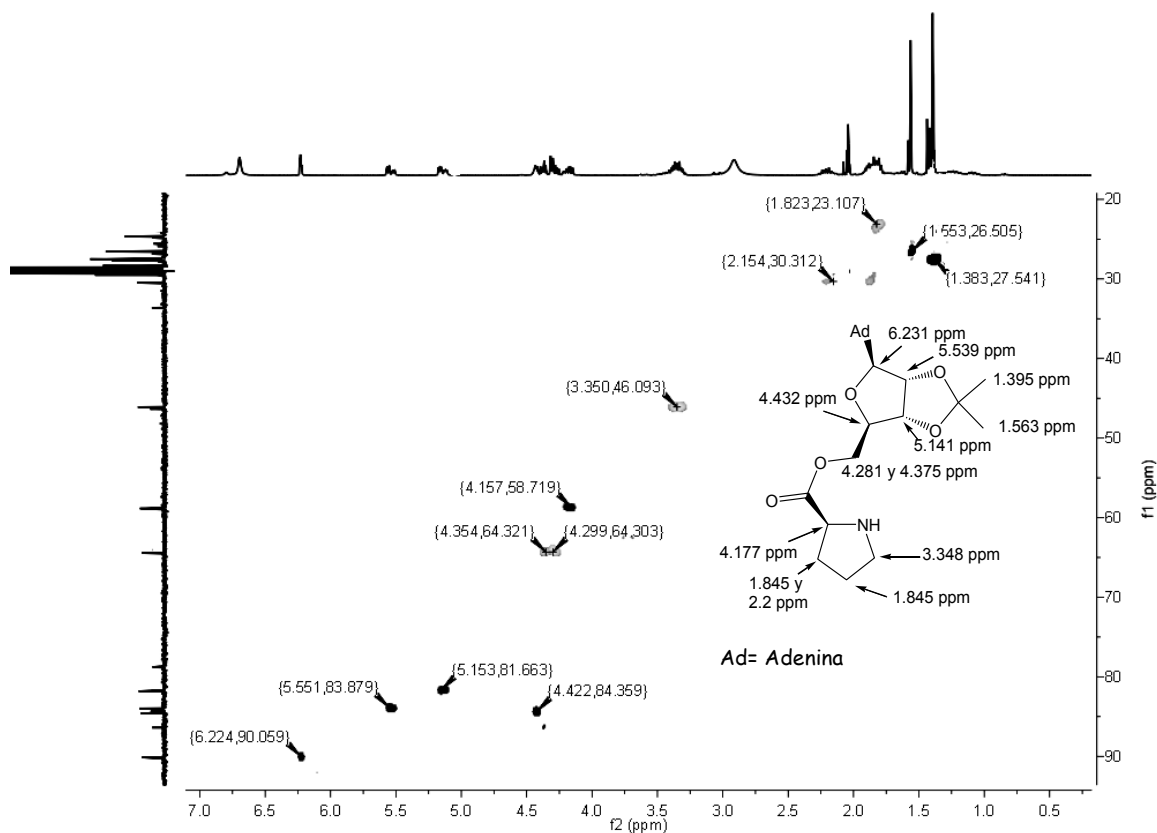


Figura 19. HSQC editado del profármaco VI y su asignación de señales de RMN-¹H.

7.1.4. Obtención y caracterización de los profármacos II y VII

Se repitieron las mismas condiciones de acoplamiento y desprotección citadas con anterioridad. El espectro de infrarrojo del profármaco II muestra nuevamente la presencia de grupos funcionales característicos en el compuesto: 3199.75 cm⁻¹ y 1194.02 cm⁻¹ para estiramiento y flexión tipo tijera respectivamente del grupo amino, 3071.48 cm⁻¹ del hidroxilo, 1672.69 cm⁻¹ grupo carbonilo y 1129.00 cm⁻¹ estiramiento asimétrico de éter. En el espectro de RMN-¹H se observan las señales del anillo de purina y los hidrógenos del anillo de ribosa a campo alto. Nuevamente se asegura que la unión del aminoácido ocurrió en el hidroxilo carbinólico y no en el amino por la presencia de la señal ancha que intercambia con agua deuterada a campo alto. Las expansiones del espectro (Figura 20, A y B) revelan las señales correspondientes al anillo de 1,3-tiazolidina. Con ayuda de los espectros en dos dimensiones COSY y HSQC editado (Figura 20, C y D), se pueden esclarecer las señales con mayor facilidad. Las dos señales dobles de dobles a 2.89 y 3.16 ppm (metilenos en el espectro HSQC) corresponden a los hidrógenos de la posición 3 del anillo de tiazolidina y correlacionan en el espectro COSY con la señal metínica de

4.01 ppm (posición 2 del anillo). Los hidrógenos metilénicos de la posición 5 se localizan a 4.10 y 4.30 ppm como dobletes y no correlacionan en el COSY más que con su hidrógeno geminal. La señal de 4.30 se traslapa con el multiplete correspondiente al C4 del anillo de ribosa.

Por otro lado, la estructura propuesta se corroboró mediante la determinación de su masa molar por espectrometría de masas (FAB+), siendo de 383 g/mol para el M+1. Como el ión molecular no cubría los requisitos de abundancia relativa, no se pudo realizar la técnica de FAB+ de alta resolución para esclarecer la composición elemental.

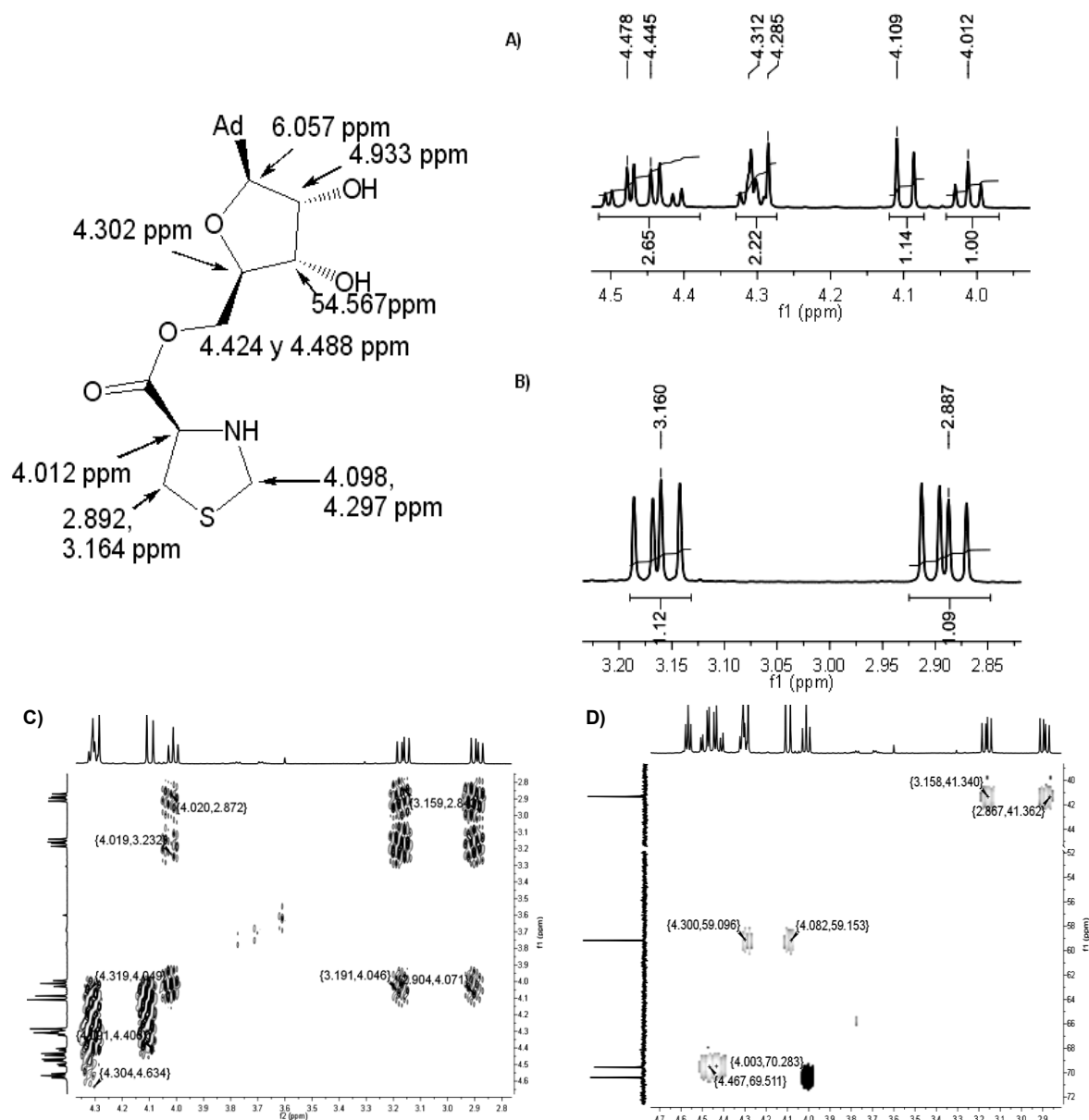


Figura 20. Espectros de RMN empleados para caracterizar al profármaco II: RMN-¹H (A y B), COSY (C) y HSQC editado (D).

En el caso del profármaco **VII**, no se caracterizó espectroscópicamente debido a su inestabilidad química, puesto que se hidrolizaba durante la realización de una columna cromatográfica o placa preparativa, razón por la cual se mandó a prueba biológica después del tratamiento de la reacción y sin purificación. Sin embargo, una cromatografía en capa fina de la reacción, presenta una mancha diferente a la materia prima y producto de hidrólisis, pero posee características similares a los demás profármacos (factor de retención y colorido café en placa al revelarse con ninhidrina), por lo que se supone su existencia en el crudo de reacción.

7.1.5. Obtención y caracterización de los profármacos **III** y **VIII**

Los profármacos conteniendo glicina como modificador se sintetizaron según la metodología antes propuesta. El espectro de infrarrojo para el profármaco **III** revela la presencia de grupos funcionales amino (3324.08 cm^{-1} , 1206.04 cm^{-1}), hidroxilo (3155.14 cm^{-1}), carbonilo (1668.56 cm^{-1}), y éter (1134.80 cm^{-1}), mientras que el profármaco **VIII** posee en su espectro infrarrojo bandas a 3353.80 cm^{-1} , 1204.08 cm^{-1} (grupo amino), 1678.53 cm^{-1} y 1135.08 cm^{-1} (carbonilo y éter respectivamente).

La resonancia magnética nuclear de hidrógeno no es muy diferente a la de la adenosina, salvo la presencia de una señal singulete correspondiente al metileno de la glicina (3.63 ppm para el profármaco **III** y 3.81 para el **VIII**) que en el espectro HSQC editado es de color negro correspondiente a metileno (Figura 21). Todas las señales en ambos profármacos de la molécula se pueden distinguir con su multiplicidad y desplazamiento químico ya estudiado.

La estructura de la molécula se corroboró con espectrometría de masas. La técnica de baja resolución indica que la masa molar del M+1 de los profármacos **III** y **VIII** es 325 g/mol y 365 g/mol respectivamente, mientras que la misma técnica pero en alta resolución arroja que la composición elemental del profármaco **III** es $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}_6$ y para el **VIII** $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{N}_6$.

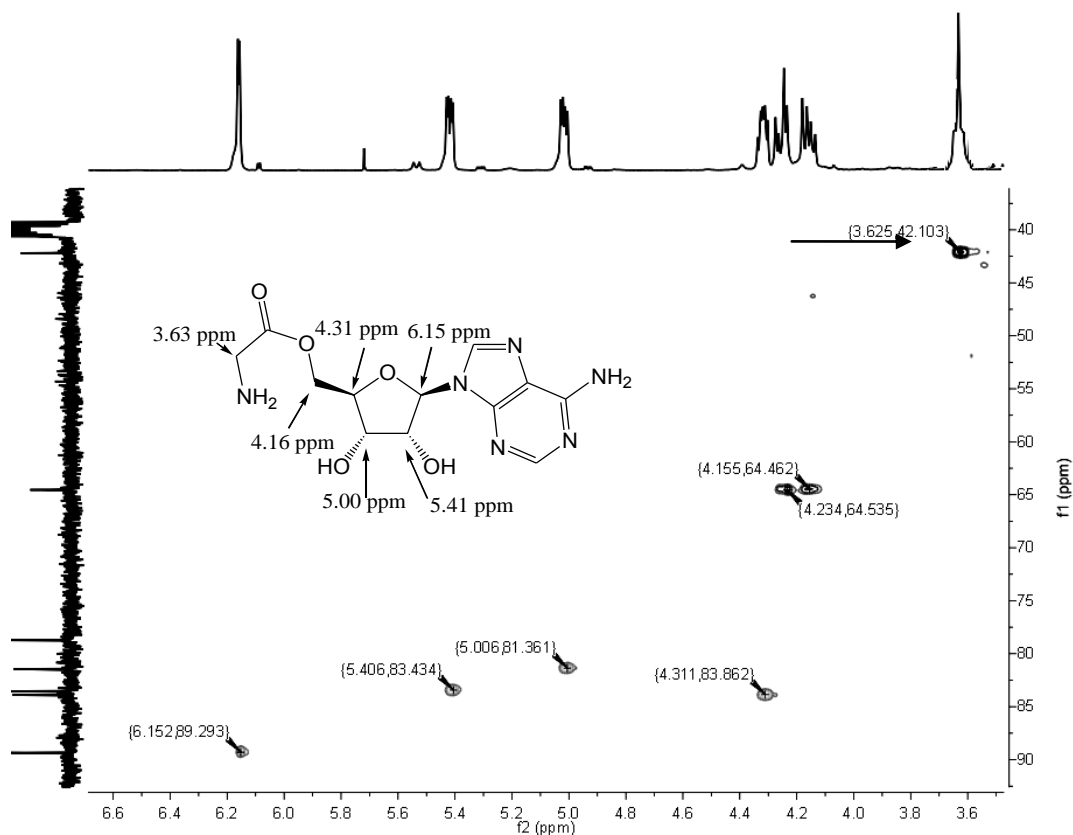


Figura 21. Espectro HSQC editado del profármaco **III** donde la flecha indica la señal correspondiente al metileno de la glicina.

7.1.6. Obtención y caracterización de los profármacos **IV** y **IX**

A diferencia de los demás profármacos, que se obtienen como sólidos higroscópicos que posteriormente se transforman en aceites, los profármacos **IV** y **IX** siempre fueron aceites. Los espectros de infrarrojo de los profármacos con ácido 3-aminopropanoico (β -alanina) muestran las bandas esperadas de acuerdo a los grupos funcionales presentes. Para el profármaco **IV** aparecen bandas características del grupo amino (3339.25 cm^{-1} , 1203.03 cm^{-1}), hidroxilo (3199.06 cm^{-1}), carbonilo y éter (1677.85 cm^{-1} y 1132.67 cm^{-1} respectivamente); por otro lado, el profármaco **IX** tiene señales del grupo amino a 3431.76 cm^{-1} , éster a 1684.68 cm^{-1} y éter a 1136.62 cm^{-1} .

Los espectros de RMN- ^1H de ambos productos finales poseen las señales características de la adenosina y señales propias de la β -alanina (Figura 22), dos tripletes a 2.48 y 3.30 ppm, que en el espectro HSQC editado se muestran color gris, asignados como metilenos.

Con los espectros de RMN se pudieron comprobar las estructuras de los profármacos **IV** y **IX**, con masas molares del M+1 obtenidas con la técnica de FAB + acordes a lo esperado: 339 g/mol para el producto **IV** y 379 para el profármaco **IX**. Finalmente, la composición elemental fue corroborada con la técnica de FAB+ alta resolución, siendo un compuesto $C_{13}H_{19}O_5N_6$ el profármaco **IV** y $C_{16}H_{23}O_5N_6$ el análogo acetónido **IX**.

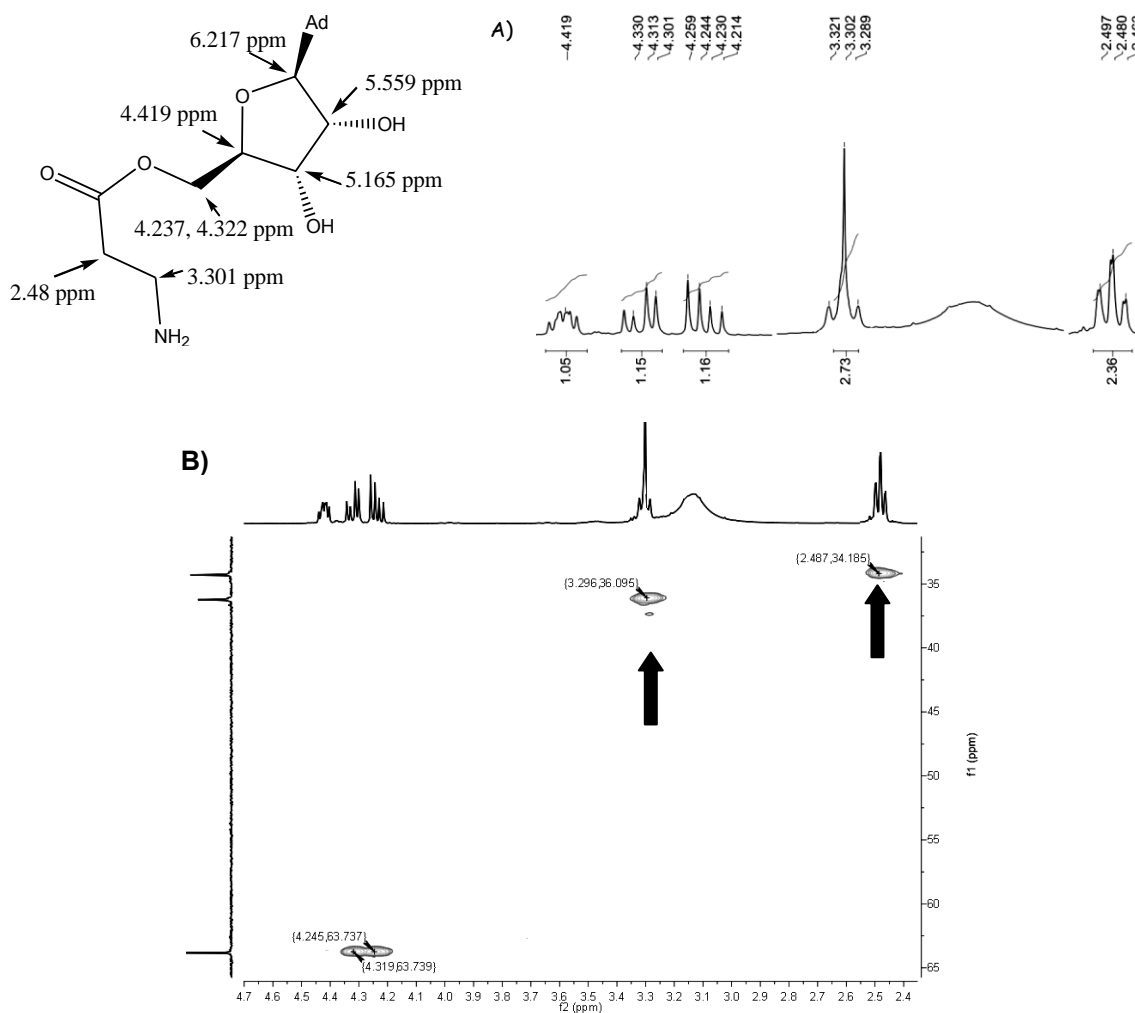


Figura 22. (A) Ampliación del espectro RMN- 1H donde se muestran las señales de la β -alanina. (B) Comprobación de las señales como metilenos en el HSQC editado.

7.1.7. Obtención y caracterización de los profármacos **V** y **X**

Los últimos profármacos de adenosina contienen el aminoácido (*S*)-alanina y presentan las bandas características de los grupos funcionales presentes en la molécula en su espectro de infrarrojo: el espectro del profármaco **V** tiene bandas a 3095.97 cm^{-1} (vibraciones de $-NH_2$ y $-OH$), 1676.80 cm^{-1} (carbonilo) y 1134.99 cm^{-1} correspondiente al estiramiento asimétrico del grupo éter. El análogo con cetal **X** sólo presenta bandas a

3316.48 cm^{-1} , 1703.03 cm^{-1} , 1136.47 cm^{-1} que indican la presencia de los grupos amino, carbonilo y éter respectivamente.

Los espectros de RMN de ambos productos muestran las señales esperadas para la adenosina (hidrógenos aromáticos y del anillo de ribosa) y adicionalmente presenta los picos de la alanina: un doblete a campo alto correspondiente al metilo (apareciendo como una mancha negra en el espectro HSQC editado) y un multiplete a 3.17 ppm (profármaco **V**) o 4.17 ppm para el compuesto **X**. En el experimento HSQC editado (Figura 23), ambas correlaciones se muestran de color negro, indicativo de su pertenencia a carbono metílico o metínico.

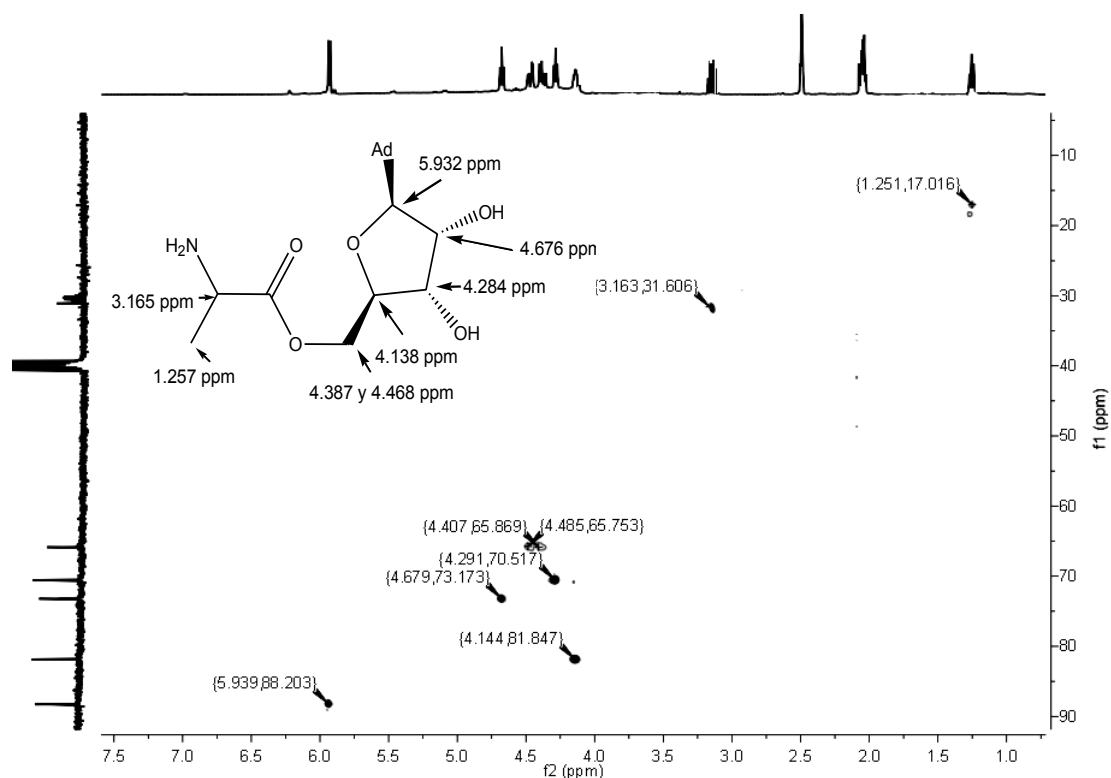
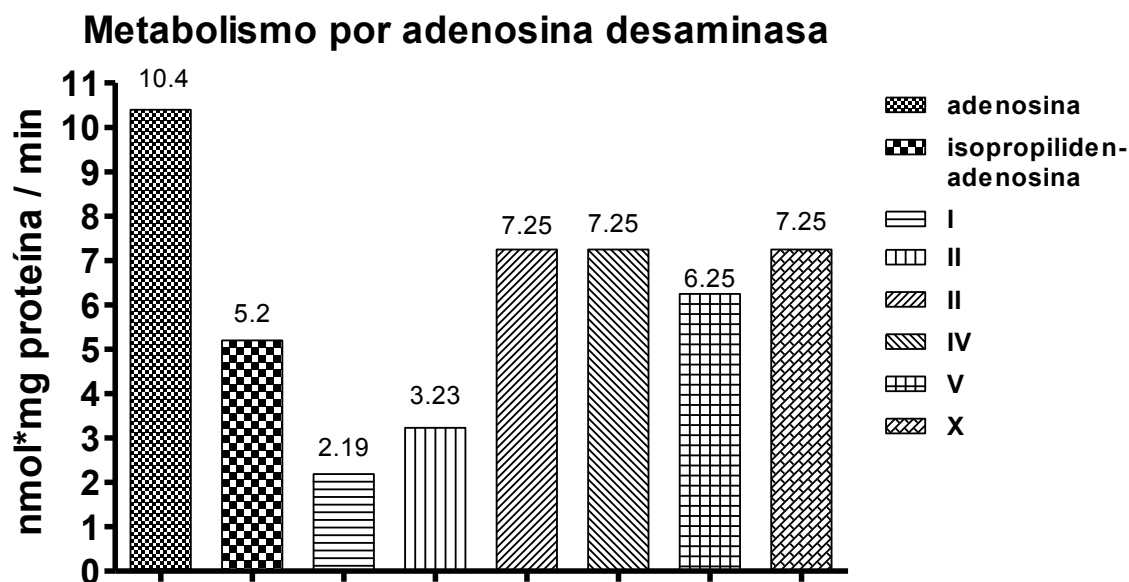


Figura 23. Elucidación estructural del profármaco **V** por medio de su espectro HSQC editado.

Nuevamente, la estructura se comprueba con la determinación de su masa molar y composición elemental obtenidos por espectrometría de masas técnica de FAB+. El profármaco **V** posee un ión molecular del M+1 de 379 g/mol, consistente con la estructura propuesta, y una composición elemental $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{N}_6$. De la misma manera, el profármaco **X** tiene una masa molar de 339 g/mol y presenta una composición elemental $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}_6$ acorde a la estructura.

7.2. Parte biológica

Se evaluó el metabolismo de los profármacos I—V, X y la molécula 2',3'-O-isopropilidenadenosina frente a la enzima adenosina desaminasa, principal enzima involucrada en la bioconversión del nucleósido. Los resultados se muestran en la Gráfica 1.



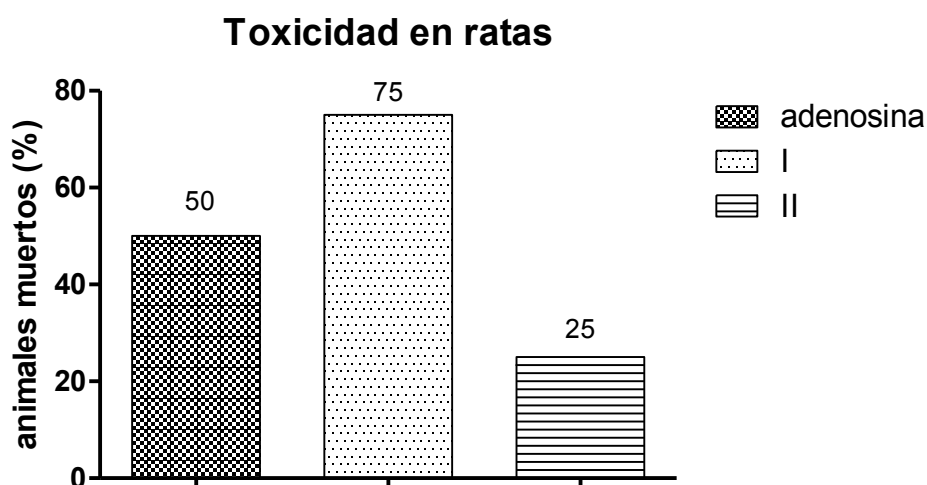
Gráfica 1. Resultados de la bioconversión de los profármacos por la enzima adenosina desaminasa.

Como era de esperarse, todos los profármacos tuvieron una menor conversión a inosina con respecto a la adenosina, de hasta cinco veces como es el caso del profármaco II, e incluso la simple protección del diol de la ribosa disminuyó en un 100% su biotransformación.

Los profármacos I y II, conteniendo como modificador prolina y tioprolina respectivamente, mostraron los resultados más prometedores al tener la menor bioconversión frente a la enzima en estudio; esto puede deberse a un mayor volumen estérico que genera el anillo de cinco miembros en el sitio catalítico de la enzima o una disminución en el número de grados de libertad de conformaciones con respecto a sus análogos de cadena abierta.

Se evaluó la toxicidad de los compuestos más prometedores para analizar si las modificaciones realizadas, incrementan o no los efectos tóxicos del prototipo adenosina. Esta se midió como porcentaje de animales muertos (ratas) tras la exposición a una dosis

elevada de los compuestos y la adenosina. La dosis empleada fue 50, 68 y 72 m/kg para la adenosina, y los compuestos I y II respectivamente. Los resultados se pueden apreciar en la Gráfica 2. Evidentemente, la toxicidad propia de la adenosina a dosis elevadas, se logró disminuir muy significativamente con el profármaco II no así con el profármaco I, cuyo porcentaje de muertos incremento en un 50%. Estas modificaciones en la toxicidad pueden deberse a cambios en la afinidad ligando-receptor hacia los receptores propios de la adenosina, que en el caso del profármaco II la afinidad hacia estos receptores probablemente disminuyó; los efectos tóxicos de la adenosina se reflejan principalmente en el corazón y el sistema inmune.



Gráfica 2. Toxicidad expresada como porcentaje de animales muertos tras exposición a una dosis aguda (50 mg/ kg) de adenosina y los profármacos I y II (68 y 72 respectivamente).

Los resultados experimentales resultan ser muy gratos y alentadores, puesto que no sólo se logró disminuir el metabolismo de la adenosina, sino que también se abatió considerablemente su toxicidad en el caso del profármaco II, lo que da pauta a continuar en estudios biológicos más avanzados de estas moléculas e incluso escalar a modelos *in vivo* de cirrosis.

7.3. Parte computacional

Con esta poderosa herramienta de la Química Farmacéutica y en general de la Química, se intentaron explicar los resultados obtenidos en las pruebas de actividad biológica y así generar más información acerca de los requerimientos estructurales para minimizar el metabolismo por la adenosina desaminasa.

7.3.1. Metabolismo por adenosina desaminasa

Los resultados del acoplamiento molecular con la ADA se muestran en la Tabla 6. Todos los profármacos mostraron afinidad por el sitio receptor de la enzima en cuestión, con valores de ΔG negativos, indicando que la unión ligando-receptor es un proceso favorecido, generando un complejo estable.

Tabla 6. Resultados del acoplamiento molecular con la enzima adenosina desaminasa humana

Compuesto	ΔG kcal/mol	Kd (μM)
adenosina	-7.58	2.75
I	-9.16	0.19
II	-7.20	5.26
III	-8.13	1.10
IV	-8.04	1.28
V	-8.23	0.93

Curiosamente, en el estudio *in silico* los profármacos forman complejos más estables con la enzima que el sustrato endógeno adenosina, contrastando alarmantemente con los resultados de metabolismo *in vitro*, puesto que se supone que mayor afinidad por el sitio receptor (entiéndase esto como el valor más negativo del ΔG), se espera una mayor rapidez en la biotransformación a inosina, y por ende, aparentemente, el estudio computacional demuestra indirectamente que los profármacos (a excepción del compuesto II) presentarían un menor tiempo de vida biológico que la adenosina. Cabe señalar otro aspecto importante, la inhibición de la enzima; los compuestos presentan una energía considerable para suponer que puedan actuar como inhibidores de la ADA. En este sentido, no se descarta la posibilidad de que los compuestos sintetizados puedan actuar como inhibidores, lo cual también es deseable puesto que incrementarán el tiempo de vida media de la adenosina endógena al inhibir su principal enzima catabólica al mismo tiempo que se libera adenosina exógena al hidrolizarse el profármaco. Empero, estudios más detallados deben llevarse a cabo para comprobar esta posibilidad.

Por otra parte, para que ocurra la formación del producto de hidrólisis enzimática, no solo es necesario tener una afinidad por el sitio catalítico, sino también, una conformación y orientación adecuada, por lo que este aspecto merece un análisis más exhaustivo. En el sitio catalítico de la adenosina desaminasa, se pueden encontrar 4 regiones o substios: SO, FO, F1 y F2. La región SO consiste en aminoácidos hidrofílicos mientras que en la

región FO predominan aminoácidos hidrofóbicos; las regiones F1 y F2 son regiones muy flexibles que favorecen la interacción ligando-receptor.⁷⁹

La Figura 24 muestra el acoplamiento molecular entre la adenosina y la adenosina desaminasa, donde se ven las interacciones que favorecen la formación del complejo. Dichas interacciones se producen en la región S0 de la enzima, salvo los hidroxilos en 2' y 3' del anillo de ribosa, que permanecen en la región F0 como lo propone Kinoshita y cols.⁷⁹ Es posible observar la formación de una interacción electrostática entre el grupo amino de la adenina y el catión zinc, necesario para que la molécula de agua ataque nucleofílicamente a la posición C1 del anillo de purina y lleve a cabo la desaminación oxidativa. Otras interacciones tipo enlace de hidrógeno se aprecian en el nitrógeno en la posición 2 con el ácido glutámico 217, el nitrógeno en 4 con la glicina 182, el nitrógeno en 7 y el ácido aspártico 296 y finalmente el grupo amino y la histidina 238 y el ácido aspártico 295. Cabe mencionar que las interacciones son muy parecidas a las que muestra el análogo de la adenosina co-cristalizado, el cual se descargó del Protein Data Bank. Con todo ello, de una manera cualitativa se valida el estudio de acoplamiento molecular de la adenosina desaminasa, al correlacionar los resultados generados en el docking con los obtenidos cristalográficamente y propuestos por otros autores.

A pesar de que los profármacos presentan una afinidad mayor por el sitio catalítico de la adenosina desaminasa con respecto a la adenosina como se detalló anteriormente (Ver Tabla 6), ninguno de ellos presenta la orientación adecuada para que se lleve la reacción de desaminación. A manera de ejemplo, se observa en la Figura 25 la comparación de la orientación de la adenosina y el profármaco II; mientras la adenosina presenta la orientación propuesta por Kinoshita, el profármaco II se encuentra levemente girado, cambiando las interacciones generadas por el programa Autodock Tools. Se hace notar que la porción esterificada se orienta en la subregión F0 de la enzima, interactuando con los aminoácidos hidrofóbicos (fenilalanina, triptófano y leucina) lo que obliga al anillo de purina a girar levemente, perdiendo los enlaces de hidrógeno formados con los ácidos aspárticos e incrementando la distancia del grupo amino y el catión zinc. Esto claramente explica el porqué de la disminución en el metabolismo del profármaco II, que a pesar de tener una energía de unión muy favorable, aunque menor a la de la adenosina, la orientación adoptada interfiere en la geometría requerida para que se lleve a cabo el ataque nucleofílico.

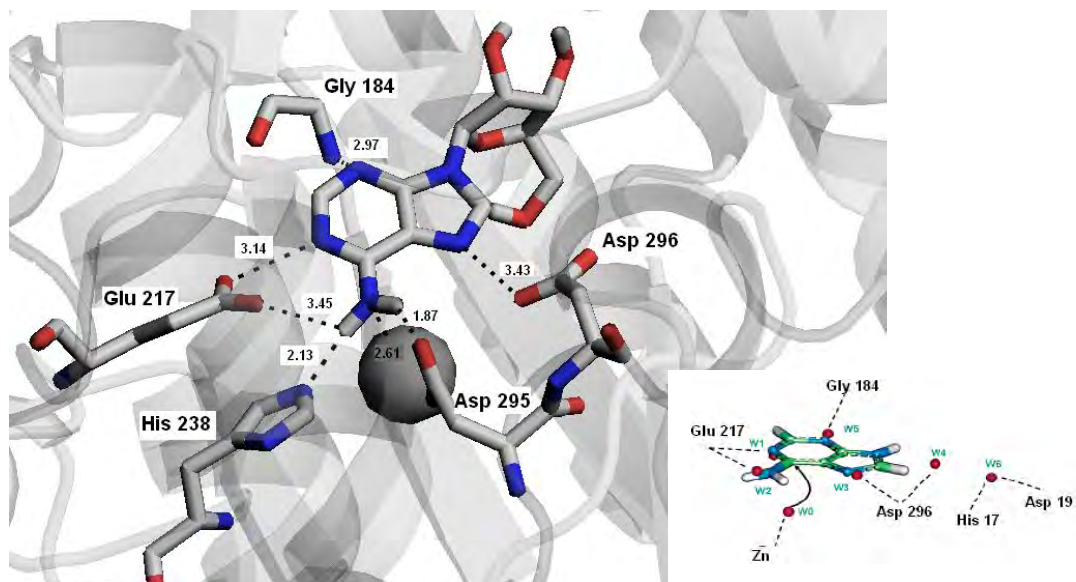


Figura 24. Interacciones principales de la adenosina con el subsitio SO y FO de la adenosina desaminasa. La esfera azul corresponde al catión zinc. Abajo a la izquierda se coloca el modelo hipotético de unión de la adenina a la región S0 propuesto por Kinoshita.

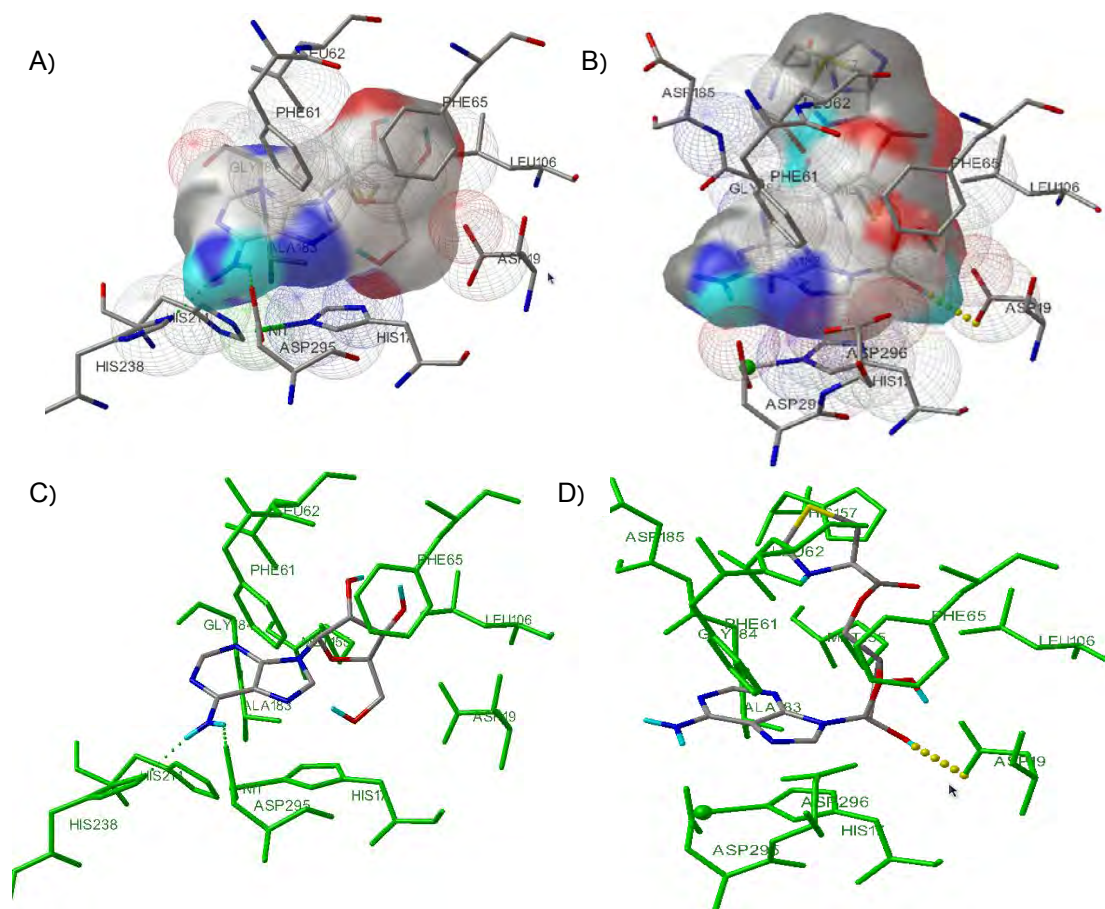


Figura 25. Comparación de las orientaciones e interacciones entre la adenosina (A y C) y el profármaco II (B y D). A y B) interacciones entre el ligando y el sitio receptor mostrándose como esferas de interacción. B y D) Visualización de la conformación e interacción de los ligandos.

Lo anterior se aplica a todos los profármacos (Figura 26), donde el cambio en la orientación es más significativo. Esta conformación adoptada, en el sitio receptor, incrementa, además, la distancia del grupo amino de la adenina y el catión zinc de 2.61 Å en la adenosina hasta 5.34 Å como es el caso del en el profármaco **V**. Este ligero cambio en la conformación molecular repercute notablemente en la actividad enzimática; la molécula de agua que lleva a cabo el ataque nucleofílico, se encuentra activada por el zinc muy cerca del ácido aspártico 295,⁷⁹ pero en el estudio de acoplamiento molecular se genera un estado tal que ni la orientación, ni la distancia son las adecuadas para que se lleve a cabo la reacción enzimática. Esta orientación se ve favorecida por la formación de dos enlaces de hidrógeno entre los átomos de nitrógeno del ácido glutámico 217 y la glicina 184 con los hidrógenos del grupo amino de la purina. Una interacción π - π se aprecia en el profármaco **IV** y Phe61. Así mismo, las interacciones que se pudieran formar en la región F0 con el modificador pueden estabilizar al complejo generado.

Con la discusión anterior, se recalca que para que una molécula pueda ser sustrato de una enzima, no sólo se requiere cierta afinidad expresado en términos del ΔG en el sitio receptor, sino también debe tener una conformación y orientación adecuada.

Es importante también resaltar lo siguiente. Los profármacos **III**, **IV** y **V**, teniendo como modificadores glicina, β -alanina y (S)-alanina respectivamente, presentan una orientación alternativa de unión en el sitio receptor de estabilidad equiparable a la mostrada en la Tabla 6 (Figura 27), orientación en la cual resulta imposible la desaminación oxidativa. En esta orientación, el anillo de purina se encuentra en la región hidrofóbica F0, mientras que la cadena del modificador, se encuentra estabilizada por interacciones electrostáticas (con el catión zinc) y tipo enlace de hidrógeno con los aminoácidos Gly184, Asp295 y el Asp19 que forma una interacción con los hidroxilos de la ribosa. Esta orientación de similar energética a la anterior, indica que la molécula puede unirse al sitio catalítico en estas dos conformaciones, aspecto que también contribuye a la disminución del metabolismo de estos profármacos.

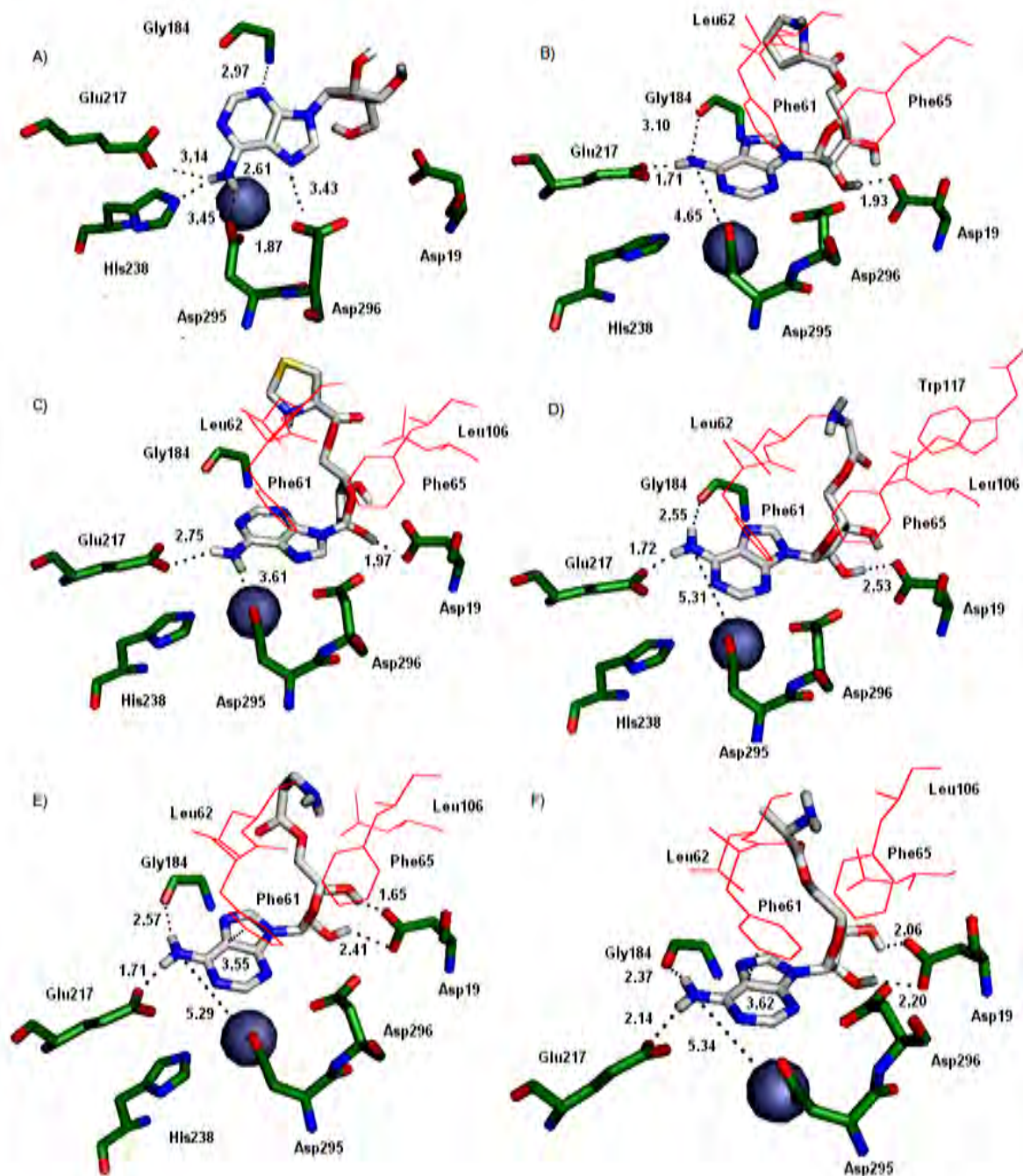


Figura 26. Interacciones de la adenosina (A) y los profármacos I-V (B, C, D, E y F consecutivamente) en el sitio catalítico de la adenosina desaminasa. La esfera corresponde al catión zinc, la región de aminoácidos verdes identifica a la región S0 mientras que los aminoácidos en rojo, hidrofóbicos, pertenecen al subsitio F0.

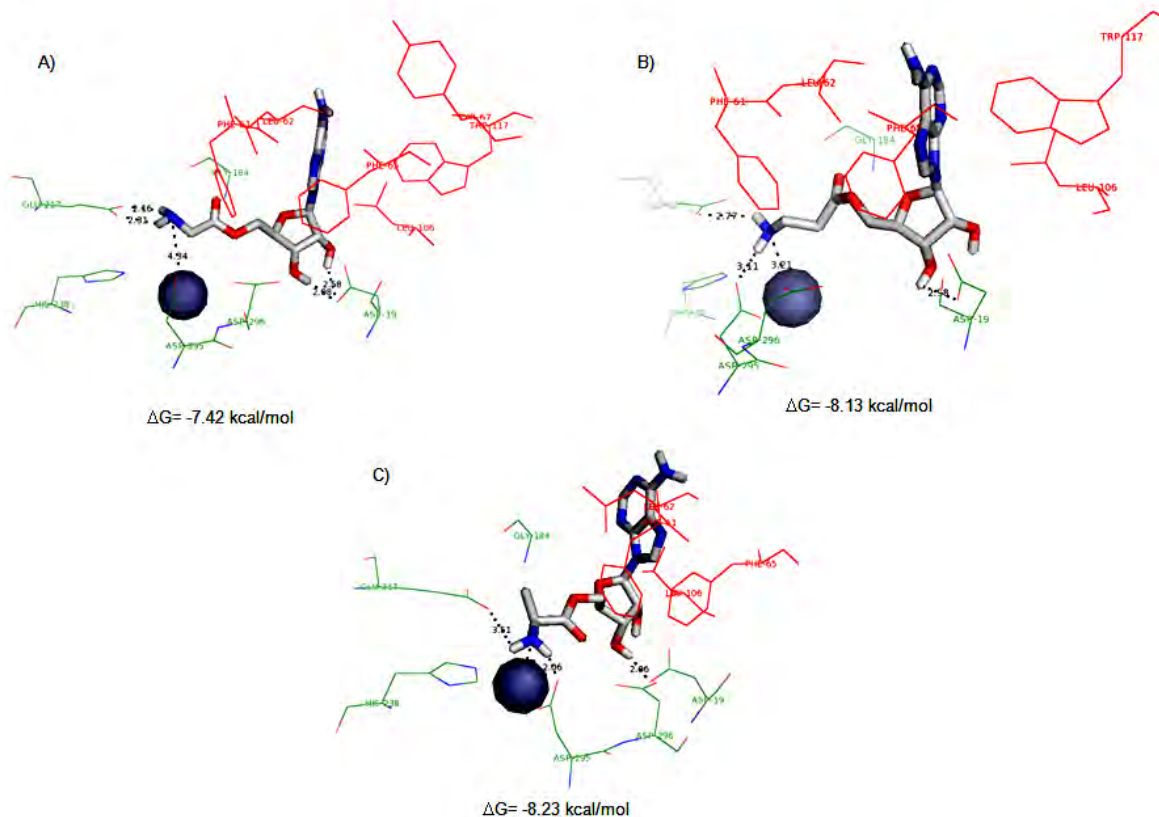


Figura 27. Conformación alternativa de los profármacos III (A), IV (B), y III (C). El grupo amino del modificador presenta una interacción tipo electrostática con el catión zinc, mientras que el anillo de adenina se localiza en el subsitio F0.

7.3.2. Hidrólisis de los profármacos

Para que los compuestos sintetizados puedan considerarse como profármacos, deben necesariamente hidrolizarse *in vivo*. Como se mencionó en los antecedentes, ese proceso puede ocurrir por medios químicos o enzimáticos. Los estudios de acoplamiento molecular permitirán tener una estimación de la factibilidad de hidrólisis vía enzimática en base a la estabilidad del complejo ligando-receptor formado, así como la orientación y conformación que se calcule en el sitio catalítico.

Se seleccionó a la carboxilesterasa humana 1 fundamentalmente porque es una de las principales enzimas encargadas de hidrolizar fármacos y xenobióticos en general, además que se encuentra en concentración elevada en el hígado, sitio donde el cual se requiere la hidrólisis de los compuestos. Los resultados que se generaron después del acoplamiento molecular se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Acoplamiento molecular de los profármacos con la carboxilesterasa humana 1.

Compuesto	ΔG Kcal/mol	K_d μM
I	-6.37	21.26
II	-2.70	10.54
III	-7.30	4.47
IV	-7.58	2.77
V	-7.65	2.47

Absolutamente todos los compuestos sintetizados generan complejos energéticamente favorables con el sitio catalítico de hCE1 al tener valores de energía libre de Gibbs negativas, por lo que adelantadamente se puede predecir que pueden metabolizarse por esta enzima. El profármaco **II** es el menos afín al sitio catalítico, lo que indica que no existen las mismas interacciones favorables con respecto a los demás compuestos. Nuevamente, se analizará la orientación que adquiere la molécula en el sitio catalítico, puesto que debe encontrarse en la distancia y orientación adecuada para sufrir el ataque por parte de la Ser221. En la figura 28 se observa la orientación y conformación que las moléculas adquieren en el sitio catalítico. Los profármacos **I, III-V** presentan la misma conformación, mientras que en el profármaco **II** presenta invertida la orientación de la adenina, situada hacia adentro del núcleo de ribosa. Todas las moléculas presentan estabilización por la formación de dos enlaces de hidrógeno entre el grupo amino de la adenina y los aminoácidos Leu304 y Leu363. Aún más importante para establecer la hidrólisis hipotética de los ésteres, es la cercanía y factibilidad de ataque por parte de Ser221. En varios trabajos revisados acerca de hidrólisis de ésteres por hCE1, y en estructuras cristalográficas, la distancia entre el carbonilo y Ser221 oscila entre 3 y 6 Å, mientras que en los profármacos se ubica de 4.49 a 5.24 Å por lo que es muy probable que los compuestos se hidrolicen en el organismo, actuando como profármacos. También es de notar (Ver Figura 28) que, como era de suponerse, el heterociclo de purina se ubica en la cavidad grande de la enzima (Leu255, Leu304, Leu318, Leu363, Met364, Ser365, Leu388, Met425, Phe428), denotándose como aminoácidos de color rojo en la Figura 28. En conclusión, los compuestos pueden actuar como profármacos en base a los estudios de acoplamiento molecular realizados, al poderse hidrolizar dentro del organismo. Cabe señalar que la carboxilesterasa humana no es la única enzima que realiza la hidrólisis de ésteres, pero si la más abundante y una de las menos selectivas.

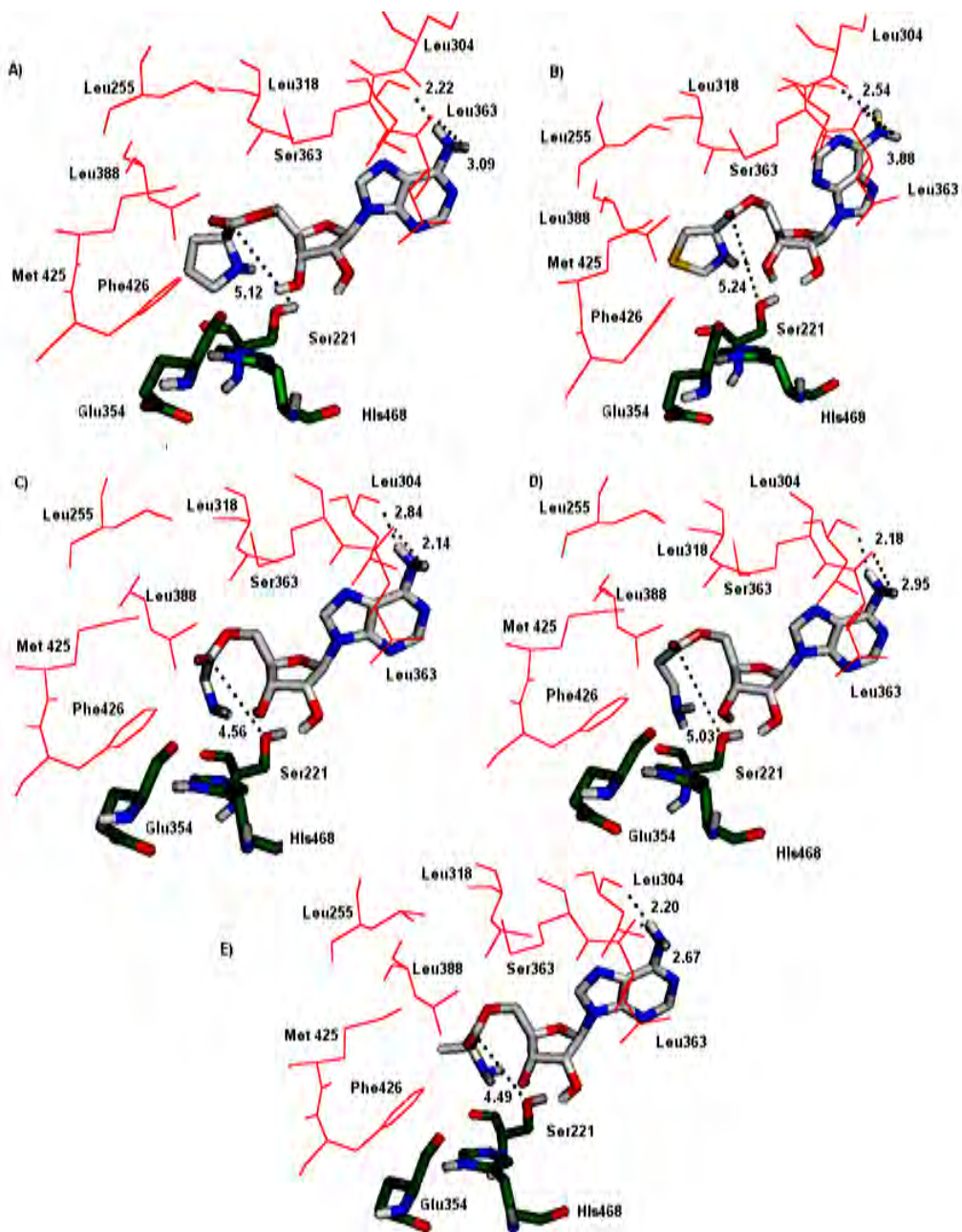


Figura 28. Interacciones principales de los profármacos con el sitio catalítico de la hCE1. Los aminoácidos en verde pertenecen a la triada catalítica. Los aminoácidos en rojo son parte de la cavidad grande del sitio catalítico. La línea punteada indica los enlaces de hidrógeno que estabilizan la molécula, así como también la distancia del hidroxilo de la Ser221 y el carbonilo del éster. A) profármaco I; B) profármaco II, C) profármaco III, D) profármaco IV, E) profármaco V.

7.3.3. Evaluación de las energías de unión de los profármacos XI-XIV

En las secciones 6.1.1.1. y 6.1.1.2. se mencionaron moléculas con notable actividad antioxidante y/o hepatoprotectora que se consideraron en el diseño de los profármacos. Sin embargo, por falta de tiempo en la realización del proyecto, no se pudieron sintetizar, mas generan un gran interés debido a que la mayoría de ellas han demostrado actividad antifibrótica en diversos estudios, además de que generan un mayor impedimento estérico en la posición 5' lo que hipotéticamente puede disminuir la afinidad de la adenosina desaminasa al interactuar con la subregión F0 como se demostró anteriormente. Estos profármacos se muestran en la Figura 29 y se tienen contemplados para trabajos posteriores.

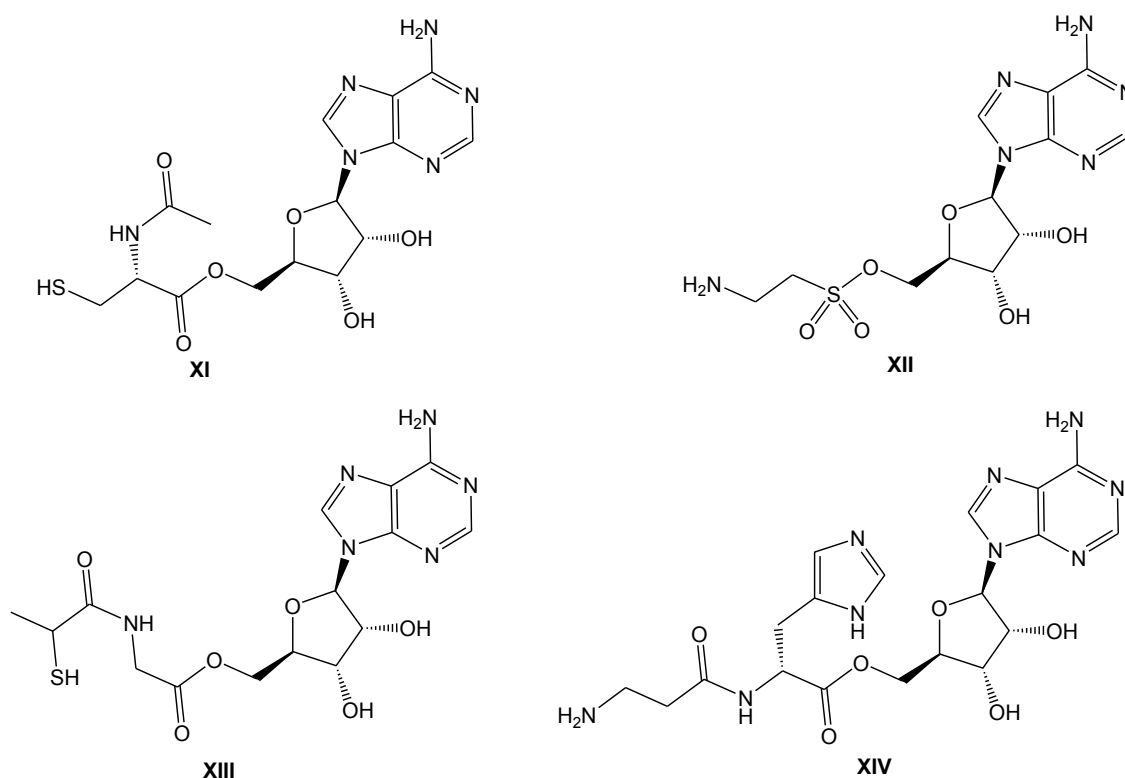


Figura 29. Compuestos para realizar estudios *in silico* de acoplamiento molecular.

Los resultados del acoplamiento molecular de la adenosina desaminasa y la carboxilesterasa humana 1 se engloban en la Tabla 8.

Tabla 8. Acoplamiento molecular de los profármacos **XI-XIV**.

Compuesto	adenosina desaminasa		carboxilesterasa humana 1	
	ΔG Kcal/mol	Kd (μM)	ΔG Kcal/mol	Kd (mM)
XI	-8,57	0.52	-0.57	380.03
XII	-4.46	539.30	-5.42	0.11
XIII	-9.18	0.19	-5.54	0.09
XIV	-7.76	2.04	-----	-----

En el caso de la adenosina desaminasa, nuevamente se observan complejos muy estables, con energías negativas similares a lo encontrado en los profármacos **I-V**; sin embargo, al analizar las conformaciones se encuentra exactamente la misma situación anteriormente discutida (Figura 30); las moléculas se encuentran rotadas con un incremento considerable en la distancia del zinc y la molécula de agua que lleva a cabo la reacción. Nuevamente, el grupo amino de la adenina forma enlaces de hidrógeno con Gly184 y Glu217, mientras que el modificador está situado en el subsitio F0 de la enzima. Por tanto, como los resultados *in silico* de estas moléculas son muy parecidos a los calculados para aquellos que se sintetizaron, podemos inferir que el metabolismo de estos compuestos por la adenosina desaminasa será menor comparado con la adenosina.

De la misma forma, se realizó el acoplamiento molecular con la hCE1. El profármaco conteniendo carnosina como modificador generó energías positivas por lo que, al menos *in silico*, no será sustrato de esta enzima. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de hidrólisis por otras enzimas no selectivas como la acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa o carboxilesterasa humana intestinal. Con respecto a los demás profármacos, es probable que se hidrolicen dentro del organismo al ser sustratos de la hCE1, deducción basada en la energía favorable y la orientación adecuada que, como se ve en la Figura 31, es muy similar a la de los profármacos **I-V**, con una distancia aceptable entre el carbonilo (o sulfonato en el caso de la taurina, grupo funcional que también es sustrato de hCE1) y el acomodo de la adenosina en la cavidad grande. Estos dos aspectos nos indican que estos compuestos demostraron ser muy interesantes *in silico*, al disminuir su afinidad por la hCE1 y actuar como profármacos al ser sustrato de hCE1.

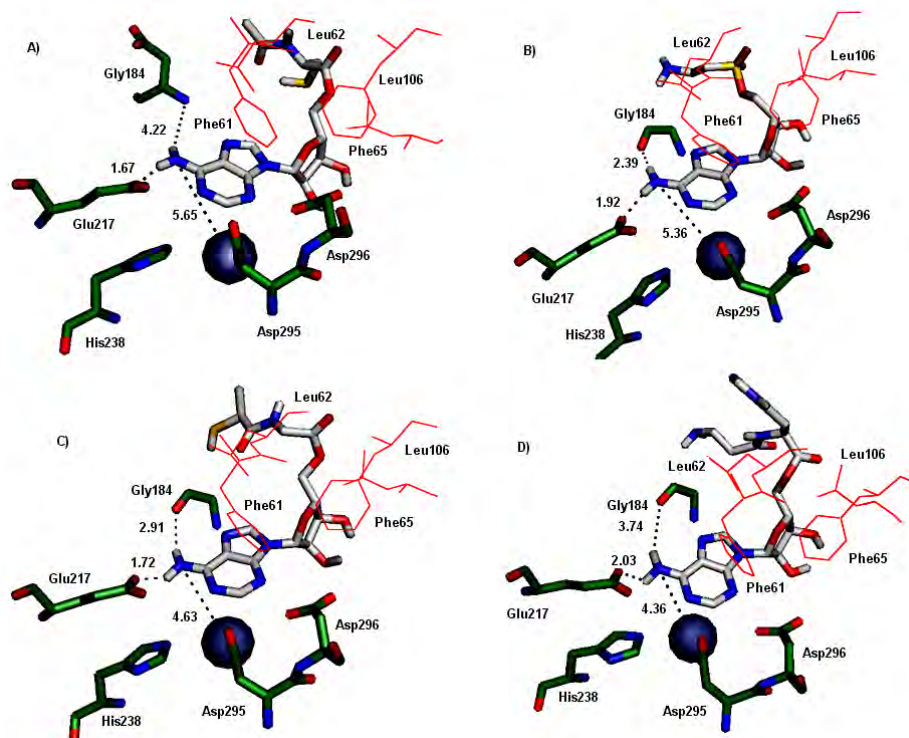


Figura 30. Interacciones de los profármacos XI—XIV (A—D consecutivamente) con los subsitios S0 (aminoácidos verdes) y F0 (aminoácidos en rojo). La esfera corresponde al catión zinc

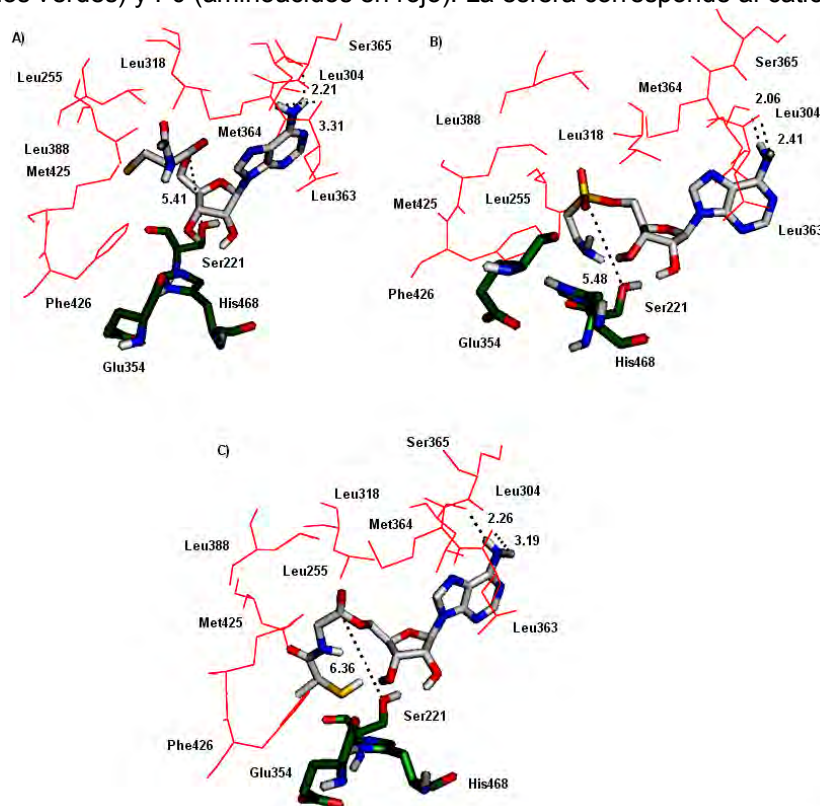


Figura 31. Interacciones de los profármacos XI (A), XII (B) y XIII (C) con el sitio catalítico de hCE1. Los aminoácidos en verde forman la triada catalítica Glu-His-Ser, mientras que los rojos forman parte de la cavidad grande. Se muestra la distancia entre el carbonilo (o sulfonato) y el zinc.

8. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos biológicamente e *in silico*, se acepta la hipótesis establecida al inicio del proyecto: la esterificación en la posición 5' de la molécula de adenosina disminuyó apreciablemente el metabolismo por la adenosina desaminasa.

Se sintetizaron profármacos mutuos de adenosina empleando como modificadores, aminoácidos de baja toxicidad y que a su vez pueden contribuir al (los) padecimientos en los cuales participa la adenosina, como la cirrosis, arritmias o modulación inmunológica. Con respecto a la síntesis, se establecieron las mejores condiciones de acoplamiento y desprotección para este sistema y que en un futuro pueden ser de utilidad para la preparación de compuestos similares. Como se esperaba, la solubilidad acuosa de los compuestos finales no se vio afectada por el modificador, propiedad fisicoquímica indispensable para que un prototipo pueda llegar a tener éxito farmacéutico.

Con base en los estudios de acoplamiento molecular, se concluye que el comportamiento presentado por los compuestos frente a la adenosina desaminasa es debido a un alejamiento de la parte reactiva de la adenosina con respecto al zinc y la molécula de agua en el sitio catalítico. Este incremento en la distancia es ocasionado por un giro del anillo de purina y las interacciones favorables que el modificador posee en el subsitio F0. La disminución en el metabolismo de la adenosina está íntimamente ligada al incremento del tiempo de vida media del nucleósido en el organismo, por lo que se espera que los efectos antifibróticos de la adenosina se incrementen apreciablemente. Esto únicamente se podrá corroborar con modelos de cirrosis en modelos experimentales, en donde se espera que la actividad de los profármacos sea mayor al de la adenosina. Por otra parte, el profármaco **II**, compuesto que presenta el menor metabolismo por la adenosina desaminasa, logró disminuir hasta en un 100% la toxicidad propia de la adenosina, posiblemente al disminuirse la afinidad por los receptores de adenosina.

Se anticipa que las moléculas sintetizadas puedan actuar como profármacos al ser sustratos de la carboxilesterasa 1, obtenidos en el estudio de acoplamiento molecular, aunque no se rechaza la posible hidrólisis por otras enzimas como la acetilcolinesterasa o carboxilesterasa intestinal, enzimas que también metabolizan una gran cantidad de xenobióticos sin aparente especificidad.

De acuerdo con los estudios de acoplamiento molecular, se predice que los compuestos **XI—XIV** pueden generar resultados biológicos muy interesantes, debido a que la orientación, conformaciones y energías de unión, muy similares a la de los compuestos **I—V**; se anticipa cualitativamente que actuarán como profármacos al ser sustrato de la carboxilesterasa humana 1 y disminuirán su metabolismo por adenosina desaminasa. Estos estudios motivan a la síntesis de dichas moléculas en trabajos posteriores, aunado a la gran cantidad de trabajos por otros grupos de investigación sobre los efectos hepatoprotectores de los modificadores que contienen.

Sin embargo, se requieren estudios computacionales adicionales y más detallados para identificar los requerimientos estereoelectrónicos de reconocimiento ligando-receptor de la adenosina desaminasa y en base a ello emplear modificadores que no sólo tengan actividad hepatoprotectora *per se*, sino que además minimicen el metabolismo de la adenosina en un 100%, como es el caso del profármaco **II** que contiene como modificador a la tioprolina.

Perspectivas

Lo que se mostró en este trabajo es solamente el inicio de una nueva línea de investigación emprendida por nuestro grupo que va a continuarse a lo largo de los siguientes años. En cuanto a este proyecto, queda pendiente la evaluación biológica de los profármacos sintetizados en un modelo de cirrosis, para demostrar que la disminución del metabolismo y la actividad propia del modificador contribuyen a incrementar la actividad farmacológica atribuida a la adenosina. En este rubro, la síntesis de los profármacos **XI** a **XIV** es de interés primordial, dado que estas moléculas presentan modificadores con actividad antioxidante o hepatoprotectora muy importante y demostraron en los estudios de acoplamiento molecular características similares a los compuestos **I—V**. Los modelos de acoplamiento molecular generados, pueden ayudar al diseño de moléculas tipo profármacos que puedan disminuir aún más el metabolismo por parte de la adenosina desaminasa.

Debido a las propiedades multifisiológicas de la adenosina, los profármacos pueden probarse en otros estudios biológicos en donde la adenosina participa directamente y se encuentre validada por varios autores. Así mismo, cabe mencionar que el empleo de la adenosina como modificador de otro tipo de moléculas es una línea a futuro que puede resultar muy interesante.

Por otra parte, los análogos protegidos en el diol como cetales, se evaluarán como posibles citotóxicos, resultados que están en proceso de generarse y da pauta a investigar si la adenosina puede servir como acarreador de moléculas citotóxicas o incluso antiparasitarias.

REFERENCIAS

1. Pitarys, C. J.; Virmani, R.; Vildibill, H. D. Reduction of Myocardial Reperfusion Injury by Intravenous Adenosine Administered During the Early Reperfusion Period. *Circulation* **1991**, *83*, 237–247.
2. Cronstein, B. N.; Kramer, S. B.; Weissmann, G.; Hirschorn, R. Adenosine: Physiologic Modulator of Superoxide Anion Generation by Human Neutrophils. *J. Exp. Med.* **1983**, *158*, 1160–1177.
3. Ely, S. W.; Berne, R. M. Protective Effects of Adenosine in Myocardial Ischemia. *Circulation* **1992**, *85*, 893–904.
4. Mahaffey, K. W.; Puma, J. A.; Barbagelata, N. A. et al. Adenosine as an Adjunct to Thrombolytic Therapy for Acute Myocardial Infarction. Results of a Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled Trial: The Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1999**, *34*, 1711-1720.
5. Wilbur, S. L.; Marchlinski, F. E. Adenosine as an Antiarrhythmic Agent. *Am. J. Cardiol.* **1997**, *79*, 30–37.
6. Brenner, B. M.; Cooper, M.E.; de Zeeuw, D.; Keane, W. F.; Mitch, W. E.; Parving, H. H.; Remuzzi, G.; Snapinn, S. M.; Zhang, Z.; Shahinfar, S. Effects of Losartan on Renal and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 861–869.
7. Michel, P. P.; Marien, M.; Ruberg, M.; Colpaert, F.; Agid, Y. Adenosine Prevents the Death of Mesencephalic Dopaminergic Neurons by a Mechanism that Involves Astrocytes. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 2074–2082.
8. Yoo, B.; Choi, J. W.; Yoon, S. Y.; Ko, K. H. Protective Effect of Adenosine and Purine Nucleos(t)ides Against the Death by Hydrogen Peroxide and Glucose Deprivation in Rat Primary Astrocytes. *J. Neu. Res.* **2005**, *51*, 39–44.
9. Dworak, M.; Diel, P.; Voss, S.; Hollmann, W.; Strüder, H. K. Intense Exercise Increases Adenosine Concentrations in Rat Brain: Implications for a Homeostatic Sleep Drive. *Neuroscience* **2007**, *150*, 789–795.
10. Von Lubitz, D. K. Adenosine and Cerebral Ischemia: Therapeutic Future or Death of a Brave Concept?. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *365*, 9-25.
11. Haskó, G.; Németh, Z. H.; Vizi, E. S.; Salzman, A. L.; Szabó, C. An Agonist of A3 Adenosine Receptors Decreases IL-12, IFN- γ , and Nitric Oxide Production and Prevents Lethality in Endotoxemic Mice. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *358*, 261-268.

12. Szabó, C.; Scott, G. S.; Virág, L.; Egnaczyk, G.; et al. Suppression of Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 α Production and Collagen-Induced Arthritis by Adenosine Receptor Agonists. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *125*, 379-387.
13. Schrier, D. J.; Lesch, M. E.; Wright, C. D.; Gilbertsen, R. B. The Antiinflammatory Effects of Adenosine Receptor Agonists on the Carrageenan-Induced Pleural Inflammatory Response in Rats. *J. Immunol.* **1990**, *145*, 1874-1879.
14. Haskó, G.; Kuhel, D. G.; Németh, Z. H.; Mabley, J. G.; et al. Inosine Inhibits Inflammatory Cytokine production by a Posttranscriptional Mechanism and protects Against Endotoxin-Induced Shock. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 1013-1019.
15. Apasov, S.; Chen, J. F.; Smith, P.; Sitkovsky, M. A2A Receptor Dependent and A2A Receptor Independent Effects of Extracellular Adenosine on Murine Thymocytes in Conditions of Adenosine Deaminase Deficiency. *Blood* **2000**, *95*, 3859-3867.
16. Latini, S.; Pedata, F. Adenosine in the Central Nervous System: Release Mechanisms and Extracellular Concentrations. *J. Neurochem.* **2001**, *79*, 463-484.
17. El-Darahali, A.; Fawcett, H.; Mader, J. S.; Conrtad, D.M.; et al. Adenosine-Induced Apoptosis in EL-4 Thymoma Cells is Caspase-Independent and Mediated Through a Non-Classical Adenosine Receptor. *Ex. Mol. Pathol.* **2005**, *79*, 249-258.
18. Mendieta-Condado, E.; Chagoya de Sanchez, V.; Hernandez-Muñoz, R. Adenosine Can Accelerate the Cell Cycle During Rat Liver Regeneration Induced by Partial Hepatectomy. *J. Hepatol.* **2007**, *46*, S142-S143.
19. Hernández-Muñoz, R.; Díaz-Muñoz, M.; Suárez-Cuenca, J. A.; Trejo-Solís, C.; et al. Adenosine Reverses Preestablished CCl₄-Induced Micronodular Cirrhosis Through Collagenolytic Activity and Stimulating Hepatocyte Cell proliferation in Rats. *Hepatol.* **2001**, *34*, 667-687.
20. Hernández-Muñoz, R.; Díaz-Muñoz, N.; Suárez, J.; Chagoya de Sánchez, V. Adenosine Partially Prevents Cirrhosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats. *Hepatol.* **1990**, *12*, 242-248.
21. Mösher, G. H.; Schrader, J.; Deussen, A. Turnover of Adenosine in plasma of human and Dog Blood. *Am. J. Physiol.* **1989**, *256*, C799-806.
22. 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*, 527-552.
23. http://portal.salud.gob.mx/sites/salud/descargas/pdf/period_mexsano/mexicosano_sept08.pdf

24. Heidelbaugh, J. L.; Bruderly, M. Cirrhosis and Chronic Liver Failure: Part I. Diagnosis and Evaluation. *Am. Fam. Physician* **2006**, *74*, 756–762.
25. Heidelbaugh, J. L.; Sherbondy, M. Cirrhosis and Chronic Liver Failure: Part II. Complications and Treatment. *Am. Fam. Physician* **2006**, *74*, 767-776.
26. Bataller, R.; Brenner, D. A. Liver Fibrosis. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 209-218.
27. Olaso, E.; Friedman, S. L. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis. *J. Hepatol.* **1998**, *29*, 863-847.
28. Albanis, E.; Friedman, S. L. Hepatic Fibrosis. Pathogenesis and Principles of Therapy. *Clin. Liver Dis.* **2001**, *5*, 315-334.
29. Friedman, S. L.; Roll, F.J.; et al. Hepatic Lypocytes; the Principal Collagen-Producing Cells of Normal Rat Liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82*, 8681-8685.
30. Guyot, C.; Lepreux, S.; et al. Hepatic Fibrosis and Cirrhosis: The (Myo)Fibroblastic Cell Subpopulations Involved. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 135-151.
31. Lotersztajn, S.; Julien, B.; Teixeira-Clerc, F.; Grenard, P.; Mallat, A. Hepatic Fibrosis: Molecular Mechanisms and Drug Targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 605-628.
32. Pinzani, M.; Gesualdo, L.; Sabbah, G. M.; Abboud, H. E. Effects of Platelet-Derived Growth Factor and Other Polypeptide Mitogens on DNA Synthesis and Growth of Cultured Rat Liver Fatstoring Cells. *J. Clin. Invest.* **1989**, *84*, 1786-1793.
33. Czaja, A. J.; Carpenter, H. A. Decreased Fibrosis During Corticosteroid Therapy of Autoimmune Hepatitis. *J. Hepatol.* **2004**, *40*, 646–652.
34. Davaille, J.; Li, L.; Mallat, A.; Lotersztajn, S. Sphingosine 1-Phosphate Triggers Both Apoptotic and Survival Signals for Human Hepatic Myofibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37323–37330.
35. Lieber, C. S. Role of Oxidative Stress and Antioxidant Therapy in Alcoholic and Nonalcoholic Liver Diseases. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *38*, 601–628.
36. Harrison, S. A.; Torgerson, S.; Hayashi, P.; Ward, J.; Schenker, S. Vitamin E and Vitamin C Treatment Improves Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2003**, *398*, 2485–2490.
37. Tome, S.; Lucey, M. R. Review Article: Current Management of Alcoholic Liver Disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2004**, *19*, 707–714
38. Távora, A.; Chin, M.; Fioravanti, L.; Carvalho, R. V.; Igne F. E. Advances in Prodrug Design. *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 893-914.
39. Atanczak, A.; Ferra, A. Prodrugs and Soft Drugs. *Pharmacol. Rep.* **2006**, *58*, 599-613.

40. Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs: Design and Clinical Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255-270.
41. Testa, B. Prodrug Research: Futile or Fertile?. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2097-2106.
42. Leppanen, J.; Huuskonen, J.; Nevalainen, T.; Gynther, J.; Taipale, H.; Järvinen, T. Design and Synthesis of a Novel L-DOPA-Entacapone Codrug. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1379-1382.
43. Etmayer, P.; Amidon, G. L.; Clement, B.; Testa, B. Lessons Learned from Marketed and Investigational Prodrugs. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2393-2404.
44. Liederer, B.; Borchardt, R. Enzymes Involved in the Bioconversion of Ester-Based Prodrugs. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 1177-1195.
45. Aldrige, W. N. Serum Esterases. *Biochem. J.* **1952**, *53*, 110-117.
46. Redinbo, M.; Potter, P. Mammalian Carboxylesterases: from Drug Targets to Protein Therapeutics. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 313-325.
47. Bencharit, S.; Morton, C. Crystal Structure of Human Carboxylesterase 1 Complexed with the Alzheimer's Drug Tacrine: from Binding Promiscuity to Selective Inhibition. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 341-349.
48. Folmer, B. M.; Barron, D.; Hughes, E.; Miguët, L.; Sanchez, B.; et al. Monocomponent Hexa- and Dodeca-ethylene Glycol Succinyl-Tocopherol Esters: Selfassembly Structures, Cellular uptake and Sensitivity to Enzyme Hydrolysis. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, Article in Press.
49. Imai, T. Human Carboxylesterase Isozymes: Catalytic Properties and Rational Drug Design. *Drug. Metab. Pharmacokinetic.* **2006**, *21*, 173- 185.
50. Tyagi, S.; Pleiss, J. Biochemical profiling in Silico-Predicting Substrate Specificities of Large Enzymes Family. *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 108-116.
51. Hopfinger, J. A. Computer-Assisted Drug Design. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1133-1139.
52. Veselovsky, A. V.; Ivanov, A. S. Strategy of Computer Aided Drug Design. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2003**, *3*, 33-40.
53. Ooms, F. Molecular Modeling and Computer Aided Drug Design. Examples of their Applications in Medicinal Chemistry. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 141-158.
54. Jorgensen, W. L. The Many Roles of Computation in Drug Discovery. *Science* **2004**, *303*, 1813-1816

-
55. Leach, A. *Molecular Modelling. Principles and Applications*; Prentice Hall: England, 2001.
56. Halperin, I.; Ma, B.; Wolfson, H.; Nussinov, R. Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. *Proteins* **2002**, *47*, 409–443.
57. Krovat, E. M.; Steindl, T.; Langer, T. Recent Advances in Docking and Scoring. *Curr. Comput. Aided Drug. Des.* **2005**, *1*, 93-102.
58. Norel, R.; Petrey, D.; Haim, R.; Wolfson, J.; Nussinov, R. Examination of Shape Complementary in Docking of Unbound Proteins. *Proteins* **1999**, *35*, 403-419.
59. Kitchen, D.; Decornez, H.; Furr, J.; Bajorath, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 935-949.
60. Senthilkumar, R.; Sengottuvelan, N. Protective Effect of Glycine Supplementation on the Levels of Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in the Erythrocyte of Rats with Alcohol-Induced Liver Injury. *Cell Biochem. Funct.* **2003**, *22*, 123-128.
61. Ligumsky, M.; Sestieri, M.; Okon, E.; Ginsburg, I. Antioxidants Inhibit Ethanol-Induced Gastric Injury in the Rat: Role of Manganese, Glycine and Carotene. *Scand. J. Gastroenterol.* **1995**, *30*, 854-860.
62. Ishizaki-Koizumi, S.; Sonaka, I.; Fujitani, S.; Nishiguchi, S. Mechanism of the Protective Effect of L-Alanine to D-Galactosamine-Induced Hepatocellular Injury: Comparative Studies of L-Alanine and Pyruvate. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **2002**, *291*, 738-743.
63. Jun-Lee, B.; Hendricks, D. G. Antioxidant Effects of L-Carnosine on liposomes and Beef Homogenates. *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 931-1000.
64. Gulizar, A. Antioxidant Effects of Sulfur-Containing Amino Acids. *Yonsei Med. J.* **2004**, *45*, 776-788.
65. Lakshmi, S.; Viswanathan, P.; Anuradha, C. Taurine Enhances the Metabolism and Detoxification of Ethanol and Prevents Hepatic Fibrosis in Rats Treated with Iron and Alcohol. *Enviro. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *27*, 120-126.
66. Sochman, J. N-Acetylcysteine in Acute Cardiology: 10 years later. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2002**, *39*, 1422-1428.
67. Failli, P.; Palmien, L.; D'Alfonso, C.; Giovannelli, L.; Generini, S.; Rosso, A. D.; et al. Effects of N-Acetylcysteine on Peroxynitrite and Superoxide Anion Production of Lung Alveolar Macrophages in Systemic Sclerosis. *Nitric Oxide* **2002**, *7*, 277-282.

-
68. Terneus, M.; Kiningham, K.; Carpenter, A. B.; Sullivan, S. B.; Valentovic, M. Comparison of S-Adenosyl-L-methionine and N-Acetylcysteine Protective Effects on Acetaminophen Hepatic Toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *320*, 99-107.
69. Abdo, E.; Cunha, J. E. Protective Effect of N-Mercaptopropionylglycine on Rats and Dogs Liver During Ischemia/Reperfusion Process. *Arq. Gastroenterol.* **2003**, *40*, 177-180.
70. Harman, A.; Self, G. Comparison of the Protective Effects of N-Acetylcysteine, 2-Mercaptopropionylglycine and Dithiothreitol Against Acetaminophen Toxicity in Mouse Hepatocytes. *Toxicol.* **1986**, *41*, 83-93.
71. Zhang, J. G.; Lindup, E. Tiopronin Protects Against the Nephrotoxicity of Cisplatin in Rat Renal Cortical Slices *in Vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1996**, *141*, 425-433.
72. Suo, M.; Mukaisho, K.; Shimomura, A.; Sugihara, H.; Hattori, T. Thioproline Prevents Carcinogenesis in the Remnant Stomach Induced by Duodenal Reflux. *Cancer Lett.* **2006**, *237*, 256-262.
73. Kizaki, H.; Sakurada, T.; Simple Micro-assay Methods for Enzymes of Purine Metabolism. *J. Lab. Clin. Med.* **1977**, *89*, 1135-1144.
74. Wuts, P.G.; Greene, T. *Green's Protective Groups in Organic Synthesis*. Wiley-Interscience; New Jersey, **2007**.
75. Tuck, K.; Saldanha, A.; Birch, L. M.; Smith, A. G.; Abell, C. The Design and Synthesis of Inhibitors of Pantothenate Synthetase. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3598-3610
76. Song, X.; Vig, S.; Lorenzi, P. L.; Drach, J. C.; Townsend, L. B.; Amidon, G. L. Amino Acid Ester Prodrugs of the Antiviral Agent 2-Bromo-5,6-dichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole as Potential Substrates of hPEPT1 Transporter. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1274- 1277.
77. Jones, J. *Amino Acid and Peptide Synthesis*. Oxford University Press: Oxford, **2000**.
78. Jason, C.; Jaime-Figueroa, S.; Jiang, L.; Wagner, P. Novel Practical Deprotection of N-Boc Compounds Using Fluorinated Alcohols. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 3840- 3853.
79. Kinoshita, T.; Nakanishi, I.; Terasaka, T.; Kuno, M.; Seki, N.; Warizaya, M.; Matsumura, H.; et al. Structural Basis of Compound Recognition by Adenosine Deaminase. *Biochem.* **2005**, *44*, 10562-10569.
80. La Motta, C.; Sartini, S.; Mugnaini, L.; Salerno, S.; Simorini, F.; Taliani, S.; et al. Exploiting the Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one Ring System as a Useful Template To Obtain Potent Adenosine Deaminase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1681-1692.

APÉNDICE I: PARTE EXPERIMENTAL**Información general**

Los compuestos fueron sintetizados con reactivos de las compañías de Aldrich® y Fluka®. Las masas de las sustancias se determinaron en una balanza analítica Sartorius A210P y en una balanza granataria E4000.

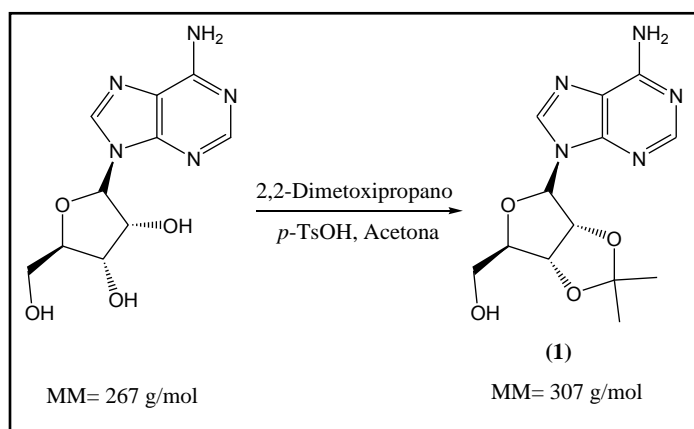
El avance de las reacciones químicas realizadas se monitoreo por cromatografía en capa fina (ccf), empleando placas de vidrio cubiertas de gel de sílice y fluoresceína y se visualizaron con lámpara de luz ultravioleta (longitud de onda corta y larga), vapores de yodo y solución metanólica de ninhidrina (aminoácidos y productos finales).

Los disolventes se destilaron a presión reducida empleando un evaporador rotatorio Büchi R-114 con baño de calentamiento B-480 acoplado a una bomba de vacío Vacubrand modelo PC610 con regulador de vacío integrado CVC-2 y un condensador de eficiencia conectado a un enfriador Birkman CI-30 o bien con un evaporador rotatorio R-205 con baño de calentamiento R-490 acoplado a un condensador de dedo frío enfriado por un refrigerante en espiral Birkman modelo IC30 conectado a una bomba de vacío Büchi V-800 y controlador V-500.

Los equipos utilizados en las técnicas espectroscópicas y espectrométricas pertenecen a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. La determinación de los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C se realizó en un espectrómetro Varian modelo MRS de 400 MHz y un espectrómetro Varian modelo MR de 400 MHz, empleando disolventes deuterados como cloroformo, acetona, dimetilsulfóxido, metanol y agua deuterada para el experimento de intercambio de hidrógenos ácidos. Se usó como referencia interna el tetrametilsilano (TMS) y los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm. La multiplicidad de las señales se denotaron con las siguientes abreviaturas: s para indicar un singulete, sa para señal ancha, d para un doblete, t para un triplete, c para un cuarteto, dd para un doble de dobles, m para señales múltiples. La espectrometría de masas se llevó a cabo en un equipo JEOL modelo JMS-SX102A utilizándose la técnica de FAB⁺. Se empleó la simbología siguiente: m/z (masa/carga), M⁺·(Ión molecular), [M+1]⁺ (pico isotópico). Los espectros de Infrarrojo se obtuvieron con un espectrofotómetro FTIR modelo spectrom Rx1 Perkin Elmer y 1605 en pastilla de bromuro de potasio o película, y las frecuencias de las señales se reportan en cm⁻¹.

Sistemas cromatográficos empleados en la síntesis de los profármacos

Sistema	Componentes	Proporción
I	cloroformo: metanol	9:1
II	cloroformo: metanol	8:2
III	butanol: ácido acético: agua	4:1:1
IV	acetato de etilo: metanol	9:1
V	cloroformo: metanol: NH ₄ OH	80:20:1
VI	cloroformo: metanol: NH ₄ OH	70:30:1

Metodología sintética
Síntesis de 2',3'-O-isopropilidenadenosina (1)


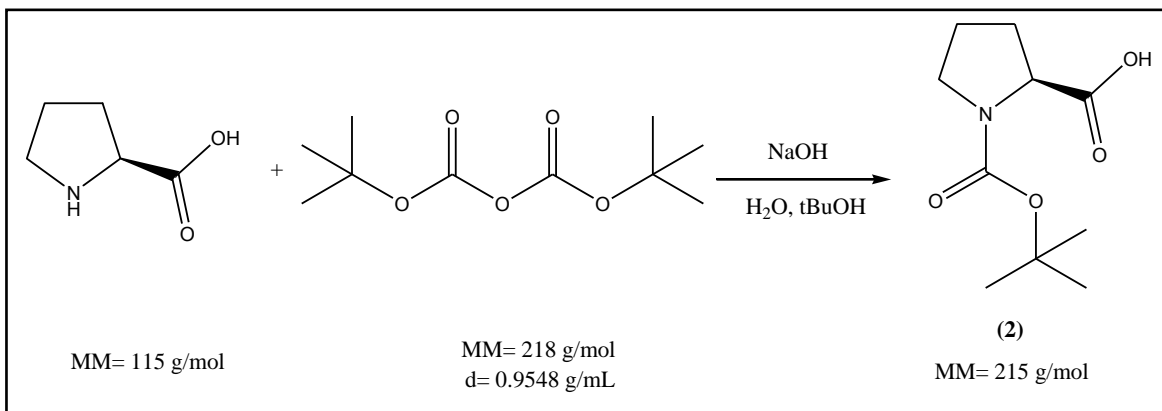
En un matraz bola de 250 mL equipado con agitación magnética, se colocaron 3 g (11.23 mmol) de adenosina y 90 mL acetona anhidra y se dejó en agitación por 10 minutos. A la suspensión resultante, se agregó una solución de 2.33 g (13.55 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico en 30 mL de acetona y después 5.6 mL (45.6 mmol) de 2,2-dimetoxipropano. La reacción se mantuvo en atmósfera de nitrógeno agitándose vigorosamente por 72 horas. Al término de este tiempo, la reacción se neutralizó con solución saturada de Na₂CO₃ y extrajo con cloroformo (3x50 mL). Las fases orgánicas se unieron y secaron con sulfato de sodio anhidro y finalmente se filtró al vacío. El filtrado se evaporó a sequedad y resuspendió en éter dietílico, se filtró y se lavó con más éter. Se obtuvieron 3.11 g de un sólido blanco en un rendimiento de 89 %, que presenta una única mancha en ccf (Sistema I; *R_f* de 0.67) y su punto de fusión es 201.5-202.8 °C (reportado 200°C).

IR (KBr) en cm⁻¹: 3271.82, 1605.78 (-NH₂), 3110.39 (-OH), 2988.33 (C alifático), 1084.48 (C-O-C).

EMFAB m/z (%ar): 308 (88) [M+1]⁺; 136 (100) [M-172]⁺

RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ ppm): 1.38 (s, 3H, CH₃-), 1.65 (s, 3H, CH₃-), 3.81 (dd, 1H, HO-CH₂-CH-CH-, J₁=12.6 Hz, J₂= 2 Hz), 3.98 (dd, 1H, HO-CH₂-CH-CH-, J₁=12.6 Hz, J₂= 1.6 Hz), 4.55 (sa, 1H, HO-CH₂-CH-O-), 5.11 (t, 1H, HO-CH₂-CHO-CH-, J=6.4 Hz), 5.21 (t, 1H, -N-CHO-CH-, J=5.6 Hz), 5.90 (d, 1H, O-CH-N-, J=4.4 Hz), 6.23 (s, 2H, -NH₂), 7.91 (s, 1H, CH- anillo de imidazol), 8.31 (s, 1H, CH- anillo de pirimidina).

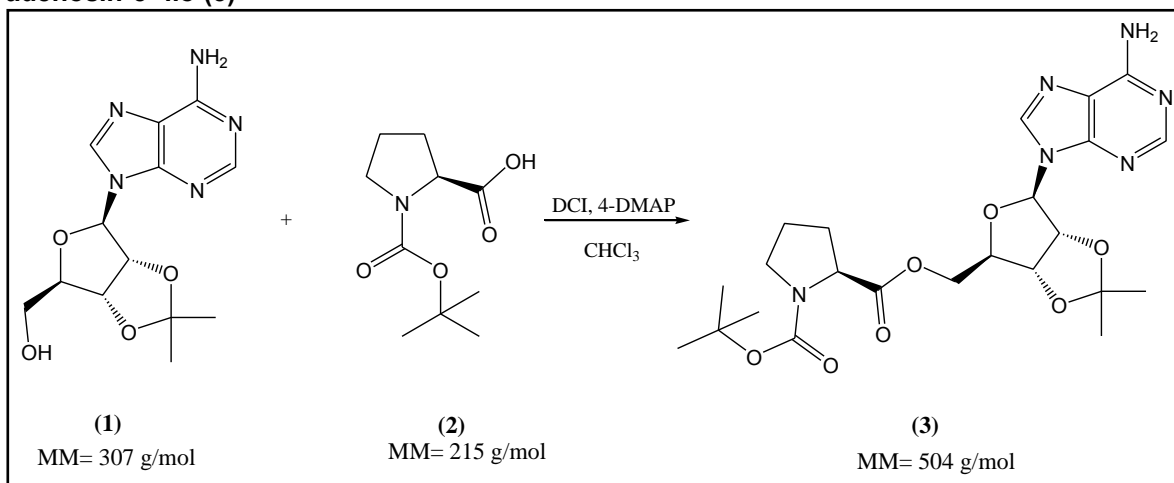
Síntesis de *N*-*tert*butoxicarbonil-(*S*)-prolina (2)



En un matraz bola de 250 mL equipado con agitación magnética y trampa de gases, se colocaron 3 g (26.05 mmol) de (*S*)-prolina y 1.09 g (27.25 mmol) de hidróxido de sodio en 65 mL de solución *t*BuOH:H₂O (7:3) y se dejó agitar por 10 minutos. A continuación, se agregaron 6.3 mL (26.35 mmol) de dicarbonato de *tert*butilo y se dejó en agitación por 24 h. Al finalizar este tiempo, se agregaron 20 mL de agua y se lavó con hexano (3 x 20 mL). La fase acuosa se llevó a pH 3 en frío con ácido cítrico precipitando 4.46 g (Rendimiento de 79.6 %) de un sólido blanco cristalino que presenta una sola mancha en ccf (*R_f* de 0.57 sistema III) y un punto de fusión de 133.2 -134 °C.

EMFAB m/z (%ar): 216 (45) [M+1]⁺.

RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ ppm): 1.43, 1.48 (s,s, 9H, (CH₃)₃C-), 1.94 (m, 2H, Boc-N-CH₂-CH₂-CH₂), 2.08 (m, 1H, Boc-N-CH-CH₂), 2.27 (m, 1H, Boc-N-CH-CH₂), 3.47 (m, 2H, Boc-N-CH₂-CH₂-CH₂), 4.30 (dd, 1H, Boc-N-CH-CH₂, J=40 Hz).

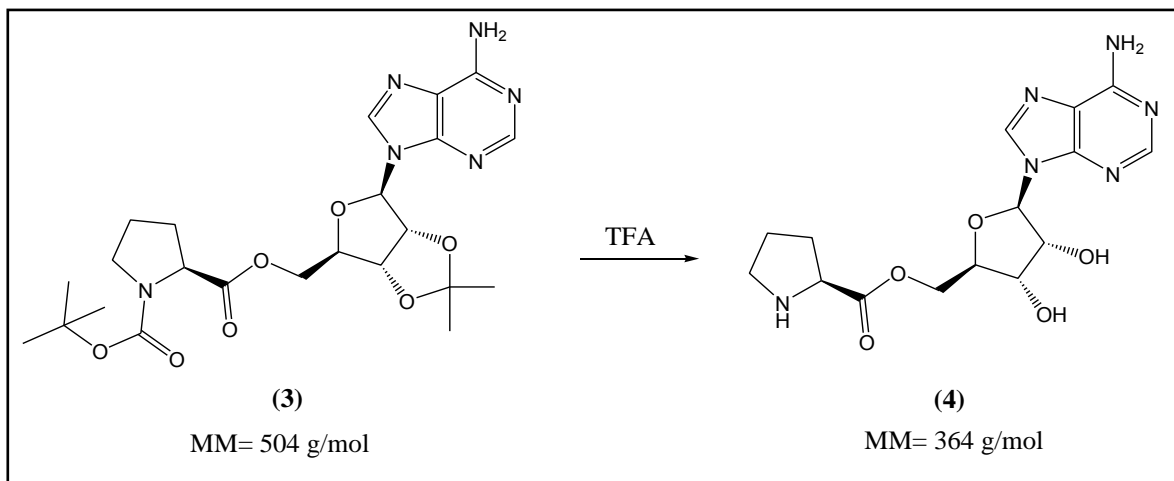
Síntesis de *N*-tertbutoxicarbonil-(*S*)-pirrolidín-2-carboxilato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (3)


En un matraz bola de 100 mL, equipado con agitación magnética, se colocaron 1.61 g (5.25 mmol) de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina, 1.24 g (5.78 mmol) de *N*-*tert*butoxicarbonil-(*S*)-prolina, 1.19 g (5.78 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida y 0.12 g (0.98 mmol) de 4-dimetilaminopiridina en 60 mL de cloroformo. Se agitó bajo atmósfera de nitrógeno por 2.5 h, tiempo después del cual la agitación se detuvo y la suspensión resultante se filtró para eliminar la dicitclohexilurea formada. El sólido se lavó con 20 mL más de cloroformo. El filtrado se lavó con 20 mL de solución saturada de Na₂CO₃ y posteriormente con otros 20 mL de solución de ácido cítrico al 20 %. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y evaporó a sequedad resultando un aceite blanco. Se agregan 40 mL de hexano y agita vigorosamente hasta la formación de un sólido blanco. Se obtuvo 2.43 g de sólido en un rendimiento de 92 % presentando una sola mancha en ccf (R_f de 0.58 Sistema IV). Una muestra se purificó por columna empleando como eluyente CHCl₃ hasta CHCl₃: MeOH (95:5) resultando en un sólido cristalino blanco con un punto de fusión de 113.1-115.4 °C.

EMFAB m/z (%ar): 505(100) [M+1]⁺.

RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ ppm): 1.35, 1.39 (s, s, 9H, (CH₃)₃C-), 1.44 (s, 3H, CH₃-), 1.63 (s, 3H, CH₃-), 1.86 (m, 4H, Boc-N-CH₂-CH₂-CH₂-), 3.42 (m, 2H, Boc-N-CH₂-CH₂-), 4.29 (m, 1H, Boc-N-CH-COO-), 4.45 (m, 2H, -COO-CH₂-CH-), 4.50 (m, 1H, -COO-CH₂-CH-), 5.06 (m, 1H, -COO-CH₂-CH-), 5.47 (m, 1H, N-CHO-CH-), 5.71 (s, 2H, NH₂-), 6.10 (s, 1H, N-CHO-CH-), 7.87 (s, 1H, Hidrógeno del anillo de pirimidina), 8.35 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

Síntesis de (S)-pirrolidín-2-carboxilato de adenosin-5'-ilo (4)



En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y trampa anhidra, se colocaron 0.5 g (0.99 mmol) del éster **3** en 1 mL de ácido trifluoroacético (1.04 g, 9.09 mmol) manteniéndose en agitación por 72 h. Al término de este tiempo, se evaporó a sequedad, neutralizó y purificó por columna (fase móvil CHCl_3 a CHCl_3 : MeOH 9:1), obteniéndose 0.17 g (48 %) de un sólido amarillo claro cristalino con un R_f de 0.327 (Sistema VI) revelado con solución metanólica de ninhidrina. El sólido resultó ser higroscópico por lo que no se pudo obtener el punto de fusión.

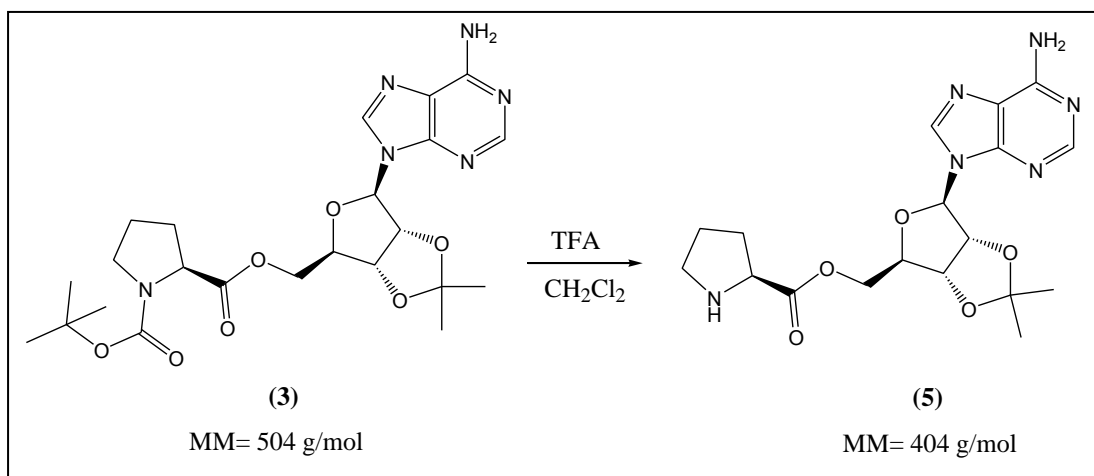
IR (película MeOH) en cm^{-1} : 3337.85, 1651.47 ($-\text{NH}_2$), 3214.11 ($-\text{OH}$), 2946.23 (C alifático), 1681.28 (C=O), 1132.91 (C-O-C).

EMFAB m/z (%ar): 365(26) $[\text{M}+1]^+$.

HR-EMFAB fórmula condensada $[\text{M}+1]^+$: $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{N}_6$.

RMN- ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm): 1.88 (m, 3H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}}-\text{H}$), 2.22 (m, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}-\text{H}$), 3.19 (m, 2H, $-\text{NH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 4.12 (m, 1H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}-\text{CH}-$), 4.27 (t, 1H, $-\text{NH}-\underline{\text{CH}}-\text{COO}-$, $J = 5.2$ Hz), 4.41 (m, 2H, $-\text{COO}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}-\text{CH}-$), 4.57 (t, 1H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\underline{\text{CH}}-$, $J = 6$ Hz), 4.68 (t, 1H, $-\text{N}-\text{CHO}-\underline{\text{CH}}-$, $J = 5.2$ Hz), 5.89 (d, 1H, $-\text{N}-\text{CHO}-\underline{\text{CH}}-$, $J = 5.2$ Hz), 7.45 (sa, 2H, NH_2), 8.14 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.34 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

RMN- ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm): 23.4 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-$), 28.1 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-$), 46.0 ($-\text{NH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 59.1 ($-\text{NH}-\underline{\text{CH}}-\text{COO}-$), 66.2 ($-\text{COO}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}-\text{CH}-$), 81.6 ($-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\underline{\text{CH}}-$), 86.3 ($-\text{N}-\text{CHO}-\underline{\text{CH}}-$), 88.3 ($-\text{COO}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}-\text{CH}-$), 91.2 ($-\text{N}-\text{CH}-\text{O}-$), 119.6 (C_5 anillo de purina), 140.5 (C_8 anillo de purina), 149.7 (C_4 anillo de purina), 152.7 (C_2 anillo de purina), 156.2 (C_6 anillo de purina), 169.2 ($-\text{COO}-$).

Síntesis de (S)-pirrolidín-2-carboxilato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (5)


En un matraz bola de 50 mL equipado con agitación magnética y trampa de gases, se colocaron 0.5 g (0.99 mmol) del compuesto **3** en 20 mL de DCM. La solución anterior se enfrió a 0 °C con un baño de hielo y se agregaron 10 mL de ácido trifluoroacético (10.36 g, 90.9 mmol), dejándose en agitación vigorosa por 1 hora. Al término de este tiempo, se evaporó a sequedad, redisolvió en acetona y pasó sobre una cama de alúmina básica. El producto se purificó por columna fase normal (CHCl₃ a CHCl₃: MeOH: 95:5), obteniéndose 0.31 g (77 %) de un aceite amarillo claro con una sola mancha en ccf (R_f de 0.67, Sistema V).

IR (película MeOH) en cm⁻¹: 3380.86, 1204.7 (NH₂-), 2954.39 (C alifático), 1681.6 (C=O), 1137.10 (C-O-C).

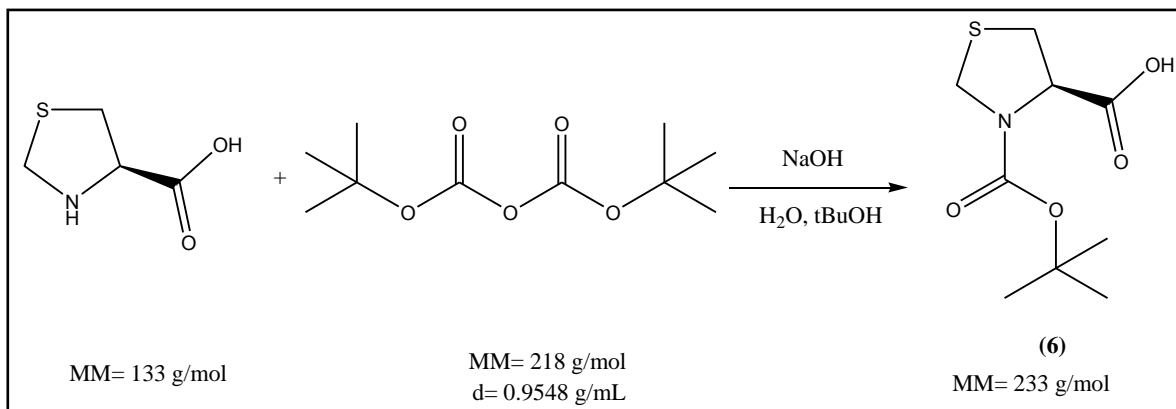
EMFAB m/z (%ar): 405(16) [M+1]⁺.

HR-EMFAB composición elemental [M+1]⁺: C₁₅H₂₁O₅N₆.

RMN-¹H (Acetona-d₆, 400 MHz, δ ppm): 1.40 (s, 3H, CH₃-), 1.56 (s, 3H, CH₃-), 1.85 (m, 3H, -NH-CH₂-CH₂-CH-H), 2.20 (m, 1H, -NH-CH₂-CH₂-CH-H), 3.35 (m, 2H, -NH-CH₂-), 4.18 (m, 1H, -NH-CH-COO-), 4.28 (m, 1H, -COO-CH₂-CH-), 4.38 (m, 1H, -COO-CH₂-CH-), 4.43 (m, 1H, -COO-CH₂-CH-), 5.14 (ddd, 1H, -COO-CH₂-CHO-CH-, J₁= 17.1 Hz, J₂= 6.2 Hz, J₃= 3.6 Hz), 5.54 (ddd, 1H, -N-CHO-CH-, J₁= 16.3 Hz, J₂= 6.2 Hz, J₃= 2 Hz), 6.23 (sa, 1H, -NH-CH-O-), 6.70 (sa, 2H, NH₂-), 8.18 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.21 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

RMN-¹³C (Acetona-d₆, 100MHz): 23.9 (-NH-CH₂-CH₂-), 26.6 (CH₃-), 27.5 (CH₃-), 30.5 (-NH-CH-CH₂-), 46.1 (-NH-CH₂-), 58.9 (-NH-CH-COO-), 64.5 (-COO-CH₂-), 81.8 (-COO-CH₂-CHO-CH-), 84.0 (-N-CHO-CH-), 84.6 (-COO-CH-O-), 90.1 (-N-CH-O-), 113.3 ((CH₃)₂-C-), 113.8 (C₅ del anillo de purina), 139.8 (C₈ del anillo de purina), 152.5 (C₄ del anillo de purina), 152.8 (C₂ del anillo de purina), 156.4 (C₆ del anillo de purina), 172.6 (-COO-).

Síntesis de ácido *N*-*tert*butoxicarbonil-(*R*)-tiazolidín-4-carboxílico (6)

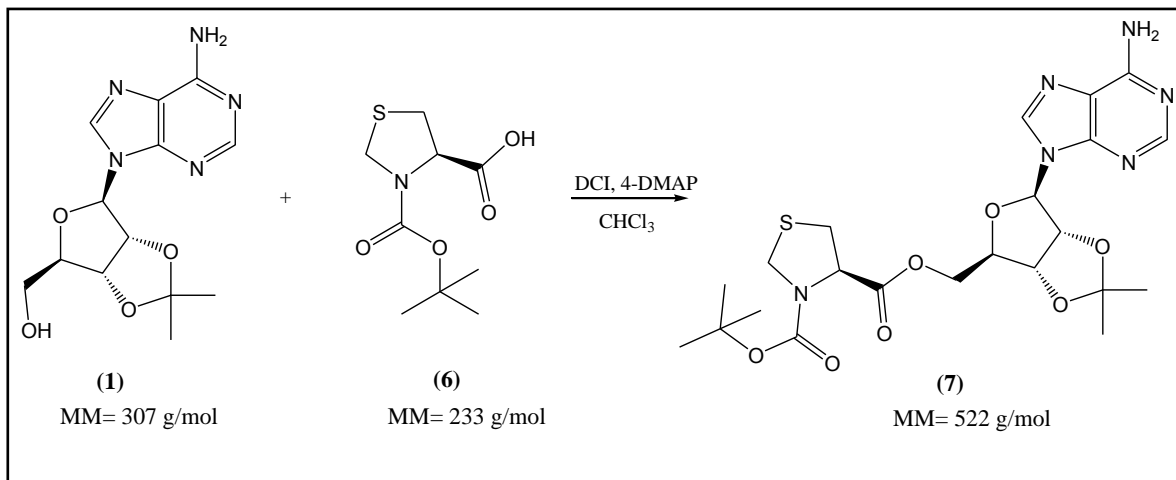


En un matraz bola de 100 mL, se agitó por diez minutos una solución de 3 g (22.55 mmol) de ácido (*R*)-tiazolidín-4-carboxílico con 0.96 g de NaOH (24 mmol) en 56.5 mL de mezcla *t*BuOH:H₂O (7:3). Al término de este tiempo, se agregaron 5.5 mL (24.06 mmol) de dicarbonato de *tert*butilo y dejó en agitación por 20 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución se lavó con hexano (4 x 20 mL) y se colocó en baño de hielo y llevó a pH 3 con ácido cítrico, precipitando un sólido blanco cristalino (5.09 g) en un rendimiento de 97 % y presentó una única mancha en ccf (*R_f* de 0.745 en Sistema III revelado con solución metanólica de ninhidrina). El punto de fusión es de 132.1-133.4 °C.

EMFAB m/z (%ar): 234(30) [M+1]⁺.

RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ ppm): 1.49 (s, 9H, (CH₃)₃C-), 3.29 (s, 2H, -S-CH₂-CH-), 4.55 (dd, 2H, -S-CH₂-N-BOC, J₁= 52 Hz, J₂= 28 Hz), 4.80 (d, 1H, Boc-N-CH-COOH, J= 68 Hz), 8.71 (s, 1H, -COOH).

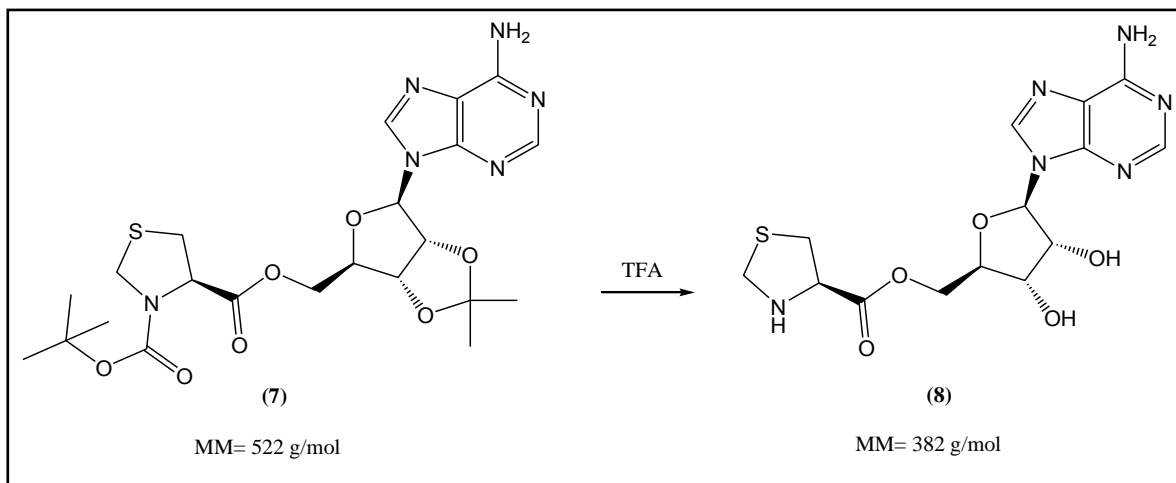
Síntesis de *N*-*tert*butoxicarbonil-(*R*)-tiazolidín-4-carboxilato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (7)



En un matraz bola de 100 mL equipado con agitación magnética, se colocaron 1 g (4.3 mmol) del compuesto **6**, 1.20 g (3.9 mmol) de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina, 0.89 g (4.3 mmol) de diciclohexilcarbodiimida y 0.14 g de 4-dimetilaminopiridina (1.15 mmol) en 40 mL de CHCl_3 . La mezcla de reacción se dejó en agitación por 3.3 h en atmósfera de nitrógeno, monitoreándose por ccf. Después del consumo total de la materia prima, la suspensión resultante se filtró al vacío y lavó con agua carbonatada (20 mL). La fase orgánica se lavó con solución de ácido cítrico al 20 %, secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a presión reducida en un rotaevaporador. El aceite resultante se purificó por cromatografía en columna (CHCl_3 : MeOH, 98:2) resultando en un sólido color blanco. Se obtuvieron 1.57 g (77 % de rendimiento) con una sola mancha en ccf (R_f de 0.6 en Sistema II) y un punto de fusión de 107.8-109.1 °C.

EMFAB m/z (%ar): 523 (32) $[\text{M}+1]^+$.

RMN-¹H (Acetona-d₆, 400 MHz, δ ppm): 1.33, 1.42 (sa, sa, 3H, 6H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.36 (s, 3H, CH_3 -), 1.57 (s, 3H, CH_3 -), 3.18 (sa, 2H, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}$), 4.36 (m, 3H, $-\text{NH}-\text{HCH}-\text{S}$ - y $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}$ -), 4.42 (m, 1H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}$ -), 4.55 (d, 1H, $-\text{NH}-\text{HCH}-\text{S}$ -, $J= 8.8$ Hz), 4.73 (sa, 1H, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}$ -), 5.17 (sa, 1H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}$ -), 5.55 (sa, 1H, $-\text{N}-\text{CHO}-\text{CH}$ -), 6.23 (d, 1H, $-\text{N}-\text{CH}-\text{O}$ -, $J= 2$ Hz), 6.71 (sa, 2H, $-\text{NH}_2$), 8.22 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.19 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

Síntesis de (*R*)-tiazolidín-4-carboxilato de adenosin-5'-ilo (8)

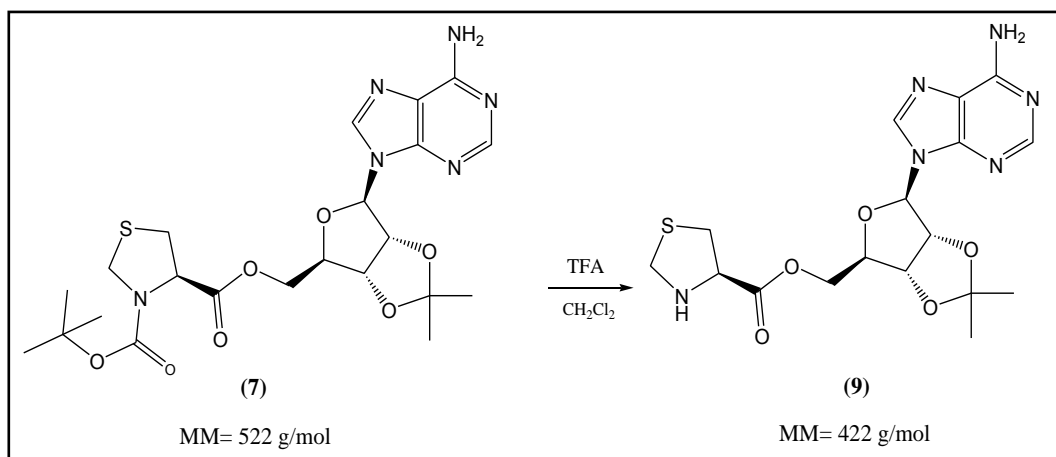
En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética, se colocó 1 g del éster **7** (1.91 mmol) y se agregaron 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA). La reacción se dejó en agitación con atmósfera de nitrógeno por 3 días monitoreándose por ccf. Terminado este tiempo, se neutralizó con trietilamina y lavó con cloroformo (3x20 mL). La fase acuosa se evaporó al vacío y obtuvo un aceite color café que se purificó por cromatografía columna (CHCl₃ a CHCl₃: MeOH; 9:1) obteniéndose 0.54 g de un polvo café con un 74 % de rendimiento (R_f de 0.38 Sistema V). El compuesto obtenido resultó ser higroscópico por lo que no se pudo determinar el punto de fusión.

IR (película MeOH) en cm⁻¹: 3199.75, 1194.02 (-NH₂), 3071.48 (-OH), 2897.29 (C alifático), 1672.69 (C=O), 1129.00 (C-O-C).

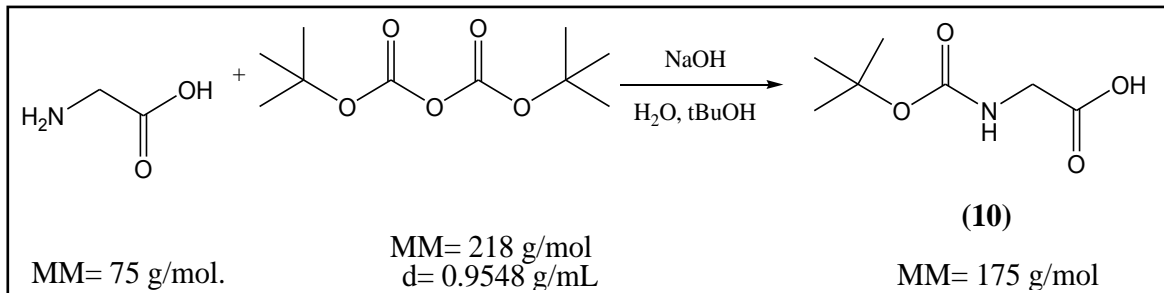
EMFAB m/z (%ar): 383 (6) [M+1]⁺.

RMN-¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm): 2.89 (dd, 1H, -S-CH₂-CH-, J₁= 10.4 Hz, J₂= 6.8 Hz), 3.16 (dd, 1H, -S-CH₂-CH-, J₁= 10.4 HZ, J₂= 7.2 Hz), 4.01 (t, 1H, -S-CH₂-CH-, J= 7.2 Hz), 4.10 (d, 1H, -NH-CH₂-S-, J= 9.2 Hz), 4.30 (d, 1H, -NH-CH₂-S-, J= 9.2 Hz), 4.30 (m, 1H, -COO-CH₂-CH-), 4.42 (dd, 1H, -COO-CH₂-CH-, J₁= 12 Hz, J₂=4.8 Hz), 4.49 (dd, 1H, -COO-CH₂-CH-O-, J₁= 12 Hz, J₂=4 Hz), 4.57 (t, 1H, -COO-CH₂-CHO-CH-, J= 5.2 Hz), 4.93 (t, 1H, -N-CHO-CH-, J= 5.2 Hz), 5.62 (s, 1H, -NH-), 5.86 (s, 2H, -NH₂), 6.06 (d, 1H, -N-CHO-CH-, J= 4.8 Hz), 8.21 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.25 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

RMN-¹³C (DMSO-d₆, 100 MHz, δ ppm): 41.3 (-S-CH₂-CH-), 59.2 (-NH-CH₂-S-), 69.5 (-COO-CH₂-), 70.4 (-S-CH₂-CH-), 76.0 (-COO-CH₂-CH-CH-), 78.8 (-N-CHO-CH-), 87.1 (-COO-CH₂-CH-), 94.0 (-N-CH-O), 118.2 (C₅ anillo de Purina), 145.1 (C₈ anillo de Purina), 154.9 (C₄ anillo de Purina), 157.8 (C₂ anillo de Purina), 161.3 (C₆ anillo de Purina), 176.2 (-COO-).

Síntesis de (*R*)-tiazolidín-4-carboxilato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (9)


En un matraz bola de 50 mL equipado con agitación magnética y trampa de gases, se colocaron 0.5 g (0.957 mmol) del compuesto **7** en 20 mL de DCM. La solución anterior se enfrió a 0 °C con un baño de hielo y se agregaron 10 mL de ácido trifluoroacético (10.36 g, 90.9 mmol), dejándose en agitación vigorosa por 1 hora. Al término de este tiempo, se evaporó a sequedad, redisolvió en acetona y pasó sobre una cama de alúmina básica. El producto no se pudo purificar debido a su inestabilidad química. Se obtuvieron 0.18 g de un aceite café (45 %) y R_f de 0.516 (Sistema V).

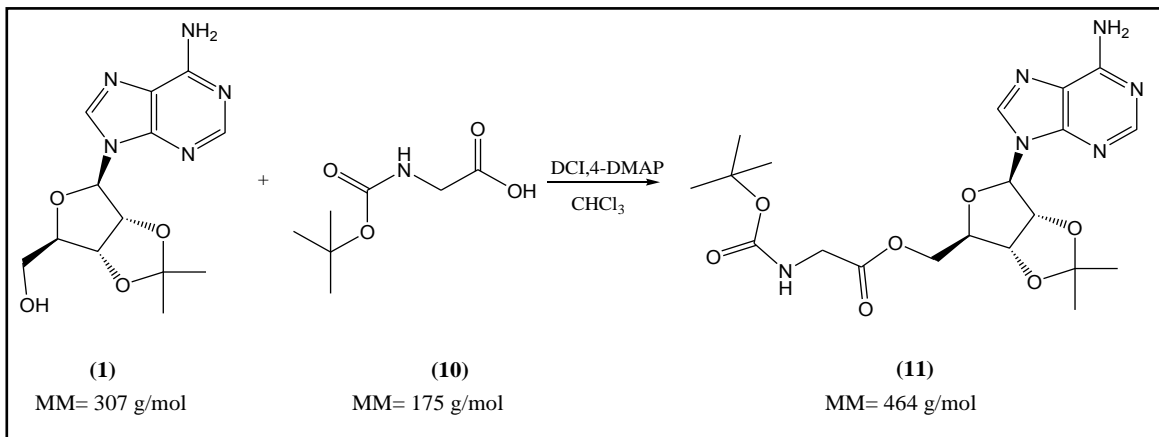
Síntesis de *N*-tertbutoxicarbonilglicina (10)


En un matraz bola de 200 mL equipado con agitación magnética y trampa de gases, se agitó por diez minutos una solución de 3 g (40 mmol) de glicina con 2.08 g de NaOH (52 mmol) en 100 mL de mezcla *t*-BuOH:H₂O (7:3). Al término de este tiempo, se agregaron 12 mL (52.5 mmol) de dicarbonato de di-*t*-butilo y dejó en agitación por 22 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución se lavó con hexano (4 x 20 mL) y la fase acuosa se colocó en baño de hielo y llevó a pH 3 con ácido cítrico, precipitando un sólido blanco cristalino (5.11 g) en un rendimiento de 73 % y no presentó mancha correspondiente a materia prima en ccf (Sistema III, revelado con solución metanólica de ninhidrina). El punto de fusión es de 75.9-76.5 °C (reportado 76-78 °C).

EMFAB m/z (%ar): 176 (47) [M+1]⁺.

RMN-¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm): 1.46 (s, 9H, (CH₃)₃C-), 3.93 (d, 2H, -CH₂-COOH, J= 30.4 Hz), 5.30 (s, 1H, Boc-NH-), 11.37 (s, 1H, -COOH).

Síntesis de *N*-tertbutoxicarbonilglicinato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (11)

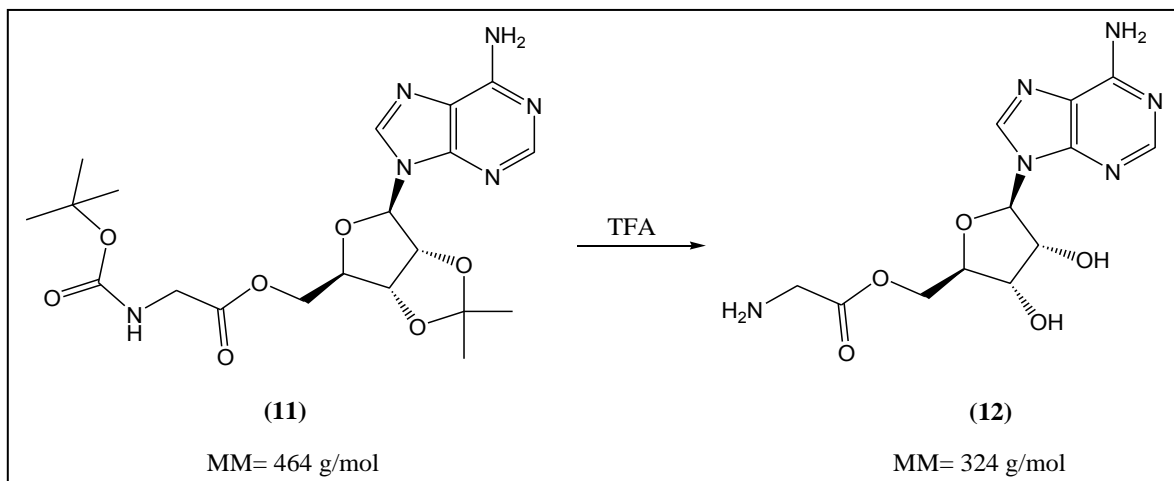


En un matraz bola de 100 mL equipado con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se colocaron 1 g (3.257 mmol) de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina, 0.71 g (4.06 mmol) de Boc-glicina, 0.87 g (4.22 mmol) de diciclohexilurea y 0.11 g (0.90 mmol) de 4-dimetilaminopiridina en 50 mL de cloroformo. La reacción se dejó en agitación por 2 h y posteriormente se filtró al vacío. El sólido se lavó con más cloroformo y el filtrado se lavó con 20 mL de agua carbonatada y posteriormente con 20 mL de solución de ácido cítrico al 20 %. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y posteriormente evaporó a sequedad hasta la formación de un aceite blanco. Dicho aceite se agitó vigorosamente en 50 mL de hexano por 2 días, precipitando un sólido fino blanco (1.32 g) en un rendimiento de 87 % con un punto de fusión de 110.3-112.1 °C con una única mancha en ccf (*R_f* de 0.56 en el Sistema IV).

EMFAB m/z (%ar): 465 (44) [M+1]⁺.

RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ ppm): 1.41 (s, 3H, CH₃-), 1.43 (s, 9H, (CH₃)₃C-), 1.62 (s, 3H, CH₃-), 3.36 (d, 2H, Boc-NH-CH₂-, J= 6 Hz), 4.28 (dd, 1H, -COO-CH₂-, J₁= 11.8 Hz, J₂= 6.4 Hz), 4.37 (dd, 1H, -COO-CH₂-, J₁= 11.6 Hz, J₂= 4.8), 4.46 (m, 1H, -COO-CH₂-CH-O-), 5.10 (dd, 1H, -COO-CH₂-CHO-CH-, J₁= 6, J₂= 3.6), 5.16 (s, 1H, Boc-NH-), 5.50 (dd, 1H, -N-CHO-CH-, J₁=6.4 Hz J₂= 1.6 Hz), 6.02 (s, 2H, -NH₂), 6.10 (d, 1H, -N-CHO-CH-), 7.89 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.34 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

Síntesis de glicinato de adenosin-5'-ilo (12)



En un matraz bola de 100 mL equipado con agitación magnética y trampa de gases, se agregaron 0.95 g (2.05 mmol) del éster **(11)** y 1.5 mL de ácido trifluoroacético. La reacción se dejó en agitación vigorosa por 3 d, monitoreándose constantemente por ccf. Finalizado este tiempo, se evaporó a sequedad, neutralizó y purificó por columna (fase móvil CHCl_3 a CHCl_3 : MeOH 9:1), obteniéndose 0.33 g (49 %) de un aceite amarillo claro con un R_f de 0.154 (Sistema VI) revelado con solución metanólica de ninhidrina.

IR (película MeOH) en cm^{-1} : 3324.08, 1206.04 ($-\text{NH}_2$), 3155.14 ($-\text{OH}$), 2932.04 (C alifático), 1668.56 ($\text{C}=\text{O}$), 1134.80 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$).

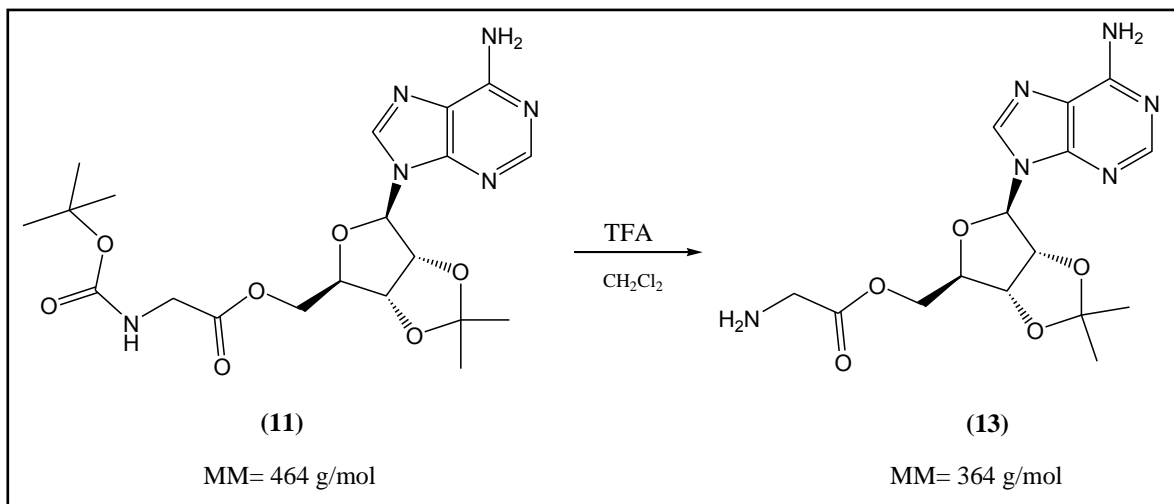
EMFAB m/z (%ar): 325 (64) $[\text{M}+1]^+$.

HR-EMFAB composición elemental $[\text{M}+1]^+$: $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}_6$.

RMN- ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm): 3.63 (s, 2H, $\text{NH}_2\text{-CH}_2$ -), 4.16 (dd, 1H, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH-}$, $J_1=11.6$ Hz, $J_2=6.4$ Hz), 4.25 (dd, 1H, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH-}$, $J_1=11.8$ Hz, $J_2=4.8$ Hz), 4.319 (m, 1H, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH-}$), 5.02 (dd, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH-CH-}$, $J_1=6$ Hz, $J_2=3.2$ Hz), 5.42 (dd, $-\text{N-CHO-CH-}$, $J_1=6.2$ Hz, $J_2=2.8$ Hz), 6.16 (d, $-\text{N-CH-O-}$, $J=2.4$ Hz), 7.16 (sa, 1H, $\text{NH}_2\text{-CH}_2$ -), 7.31 (sa, 2H, NH_2 - purina), 8.14 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.28 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

RMN- ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm): 42.2 ($\text{NH}_2\text{-CH}_2$ -), 64.5 ($-\text{COO-CH}_2$ -), 81.1 ($-\text{COO-CH}_2\text{-CH-}$), 83.5 ($-\text{N-CHO-CH-}$), 83.9 ($-\text{COO-CH}_2\text{-CH-}$), 89.4 ($-\text{N-CH-O-}$), 119.5 (C_5 anillo purina), 140.2 (C_8 purina), 149.2 (C_4 purina), 153.2 (C_2 purina), 156.6 (C_6 purina), 170.6 ($-\text{COO-}$).

Síntesis de glicinato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (13)



En un matraz bola de 50 mL equipado con agitación magnética y trampa de gases, se colocó 0.5 g (1.08 mmol) del compuesto (11) en 20 mL de DCM. La solución anterior se enfrió a 0 °C con un baño de hielo y se agregaron 10 mL de ácido trifluoroacético (10.36 g, 90.9 mmol), dejándose en agitación vigorosa por 1 hora. Al término de este tiempo, se evaporó a sequedad, redisolvió en acetona y pasó sobre una cama de alúmina básica. El producto se purificó por columna fase normal (CHCl₃ a CHCl₃: MeOH: 95:5), obteniéndose 0.20 g (50 %) de un aceite amarillo claro con una sola mancha en ccf (R_f de 0.538, Sistema V).

IR (película MeOH) en cm⁻¹: 3353.80, 1204.08 (-NH₂), 2992.99 (C alifático), 1678.53 (C=O), 1135.08 (C-O-C).

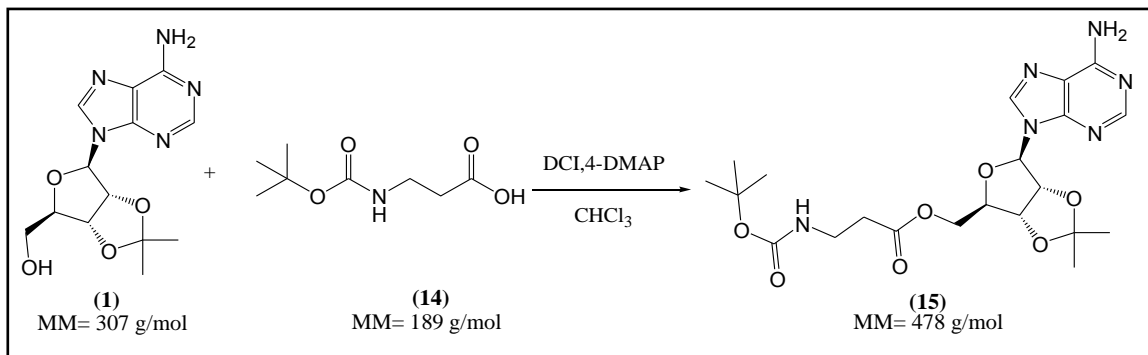
EMFAB m/z (%ar): 365 (34) [M+1]⁺.

HR-EMFAB composición elemental [M+1]⁺: C₁₅H₂₁O₅N₆.

RMN-¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm): 1.36 (s, 3H, CH₃-), 1.57 (s, 3H, CH₃-), 3.81 (s, 2H, NH₂-CH₂-COO-), 4.29 (dd, 1H, -COO-CH₂-CH-, J₁= 11.6 Hz, J₂= 5.6 Hz), 4.38 (dd, 1H, -COO-CH₂-CH-, J₁= 11.6 Hz, J₂= 4.8 Hz), 4.42 (m, 1H, -COO-CH₂-CH-), 5.14 (dd, 1H, -COO-CH₂-CH-CH-, J₁= 6.4 Hz, J₂= 3.2 Hz), 5.54 (dd, 1H, -N-CHO-CH-, J₁= 6.4 Hz, J₂= 2.4 Hz), 6.22 (d, 1H, -N-CH-O-, J= 2.4 Hz), 6.29 (sa, 1H, NH₂-CH₂-), 6.68 (sa, 2H, NH₂- purina), 8.20 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.22 (2, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

RMN-¹³C (DMSO-d₆, 100 MHz, δ ppm): 24.7 (CH₃-), 26.6 (CH₃-), 41.9 (NH₂-CH₂-COO-), 64.2 (-COO-CH₂-), 81.6 (-COO-CH₂-CH-CH-), 83.8 (-N-CHO-CH-), 84.3 (-COO-CH₂-CH-CH-), 90.0 (-N-

Síntesis de *N*-terbutiloxicarbonil-3-aminopropanoato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (15)

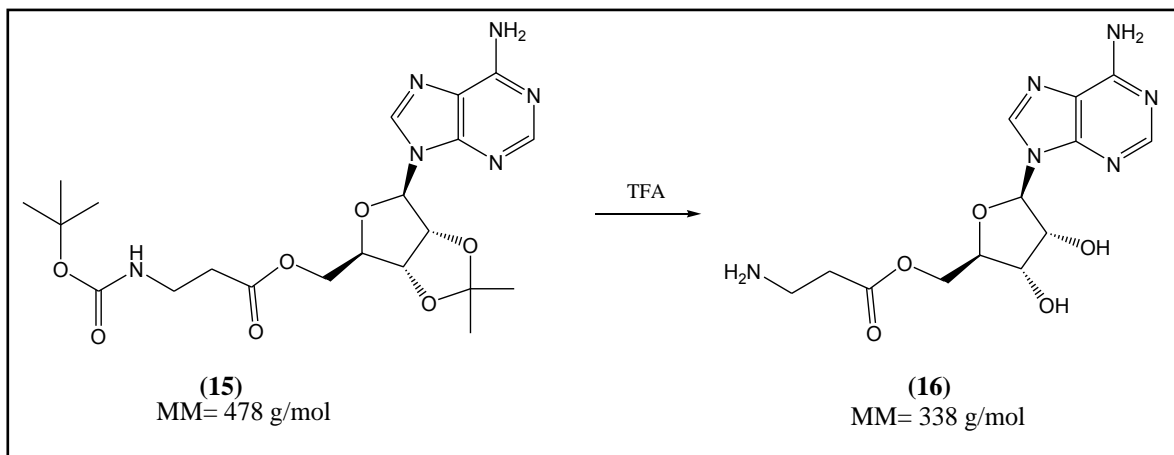


En un matraz bola de 100 mL equipado con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se colocaron 1 g (3.26 mmol) de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina, 0.73 g (3.86 mmol) de ácido *N*-Boc-3-aminopropanoico, 0.8 g de diciclohexilcarbodiimida (3.88 mmol) y 0.12 g (0.98 mmol) de 4-dimetilaminopiridina en 60 mL de cloroformo. Transcurridas 2.5 h de reacción, se filtró la reacción con vacío y el filtrado se lavó con 20 mL de agua carbonatada y después con 20 mL de ácido cítrico al 20 %. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y evaporó a sequedad. El residuo se agitó vigorosamente en 50 mL de hexano por 24 h, formándose 1.35 g (86 %) de un sólido amarillo claro con *R_f* de 0.49 (Sistema IV). Una parte se purificó por cromatografía en columna fase normal empleando como eluyente CHCl₃: MeOH (95:5) generando una aceite blanco.

EMFAB *m/z* (%ar): 479(16) [M+1]⁺.

RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ ppm): 1.41 (s, 3 H, CH₃-), 1.43 (s, 9 H, (CH₃)₃C-), 1.62 (s, 3H, CH₃-), 2.48 (t, 2H, -CH₂-CH₂-COO-), 3.36 (t, 2H, Boc-NH-CH₂-), 4.28 (dd, 1H, -COO-CH₂-, J₁= 11.8 Hz, J₂= 6.4 Hz), 4.37 (dd, 1H, -COO-CH₂-, J₁= 11.6 Hz, J₂= 4.8 Hz), 4.47 (m, 1H, -COO-CH₂-CH-O-), 5.10 (dd, 1H, -COO-CH₂-CHO-CH-, J₁= 6 Hz, J₂= 3.6 Hz), 5.16 (s, 1H, Boc-NH-), 5.50 (dd, 1H, N-CHO-CH-, J₁= 6.4 Hz, J₂= 1.6 Hz), 6.02 (s, 2H, NH₂-), 6.1 (d, 1H, N-CH-O-, J= 2 Hz), 7.89 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.34 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

Síntesis de 3-aminopropanoato de adenosin-5'-ilo (16)



En un matraz bola de 100 mL provisto con agitación magnética y trampa anhidra, se colocaron 1 g (2.09 mmol) del éster **15** y 2 mL de ácido trifluoroacético. La reacción se dejó en agitación vigorosa por 3 d, monitoreándose constantemente por ccf. Finalizado este tiempo, se evaporó a sequedad, neutralizó y purificó por columna (fase móvil CHCl₃ a CHCl₃: MeOH 9:1), obteniéndose 0.35 g (50 %) de un aceite blanco con un R_f de 0.38 (Sistema VI) revelado con solución metanólica de ninhidrina.

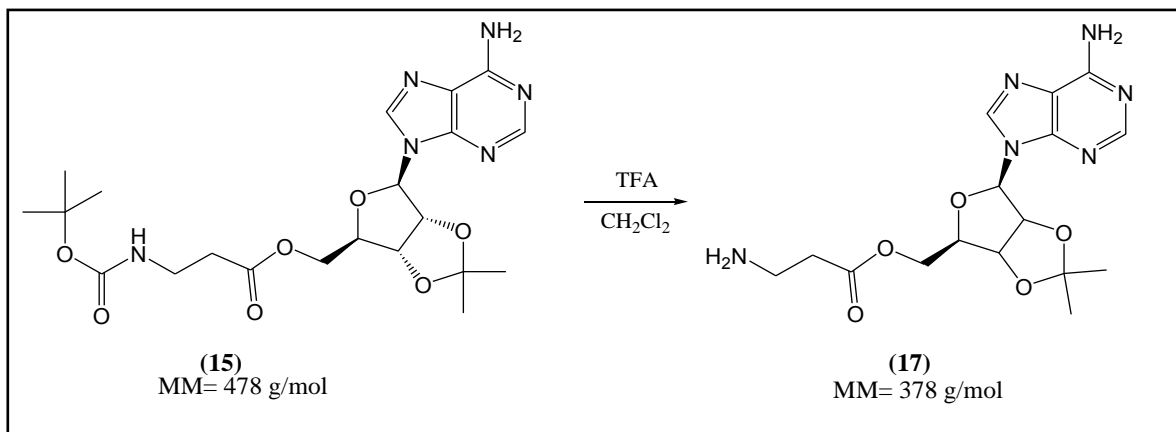
IR (película MeOH) en cm⁻¹: 3339.25, 1203.03 (-NH₂), 3199.06 (-OH), 1677.85 (C=O), 1132.67 (C-O-C).

EMFAB m/z (%ar): 339(40) [M+1]⁺.

HR-EMFAB fórmula condensada [M+1]⁺: C₁₃H₁₉O₅N₆.

RMN-¹H (DMSO-D₆, 400 MHz, δ ppm): 2.48 (t, 2H, -CH₂-COO-, J= 2.8 Hz), 3.30 (m, 2H, NH₂-CH₂-CH₂-), 4.24 (dd, 1H, -COO-CH₂-CH-, J₁= 11.8 Hz, J₂= 6.4 Hz), 4.32 (dd, 1H, -COO-CH₂-CH-, J₁= 11.6 Hz, J₂= 4.8 Hz), 4.42 (m, 1H, -COO-CH₂-CH-CH-), 5.17 (dd, -COO-CH₂-CH-CH-, J₁= 6.2 Hz, J₂=3.6), 5.56 (dd, 1H, -N-CHO-CH-, J₁= 6.4 Hz, J₂=2.4 Hz), 6.22 (d, 1H, -N-CH-O-, J= 2Hz), 6.71 (sa, 2H, NH₂-C=N-), 8.19 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.22 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

RMN-¹³C (DMSO-D₆, 100 MHz, δ ppm): 34.3 (NH₂-CH₂-CH₂-), 36.2 (NH₂-CH₂-CH₂-), 63.8 (-COO-CH₂-), 81.7 (-COO-CH₂-CH-CH-), 83.9 (-N-CHO-CH-), 84.4 (-COO-CH₂-CH-), 90.2 (-N-CH-O-), 113.8 (C₅ anillo purina), 140.0 (C₈ anillo purina), 149.3 (C₄ anillo purina), 152.9 (C₂ anillo purina), 156.4 (C₆ anillo purina), 171.0 (-COO-).

Síntesis de 3-aminopropanoato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (17)


En un matraz bola de 50 mL equipado con agitación magnética y trampa de gases, se colocaron 1.34 g (2.80 mmol) del compuesto **15** disueltos en 30 mL de DCM y se dejó agitando a 0°C por 10 minutos. A continuación, se agregaron 15 mL de ácido trifluoroacético y dejó en agitación por 1 hora. Transcurrido este tiempo, la solución se evaporó a sequedad y pasó sobre una cama de alúmina básica. El producto se purificó por columna empleando CHCl_3 a CHCl_3 : MeOH: (95:5) como eluyente y se obtuvo 0.82 g (77 % de rendimiento) de un aceite blanco con R_f de 0.433 (Sistema V).

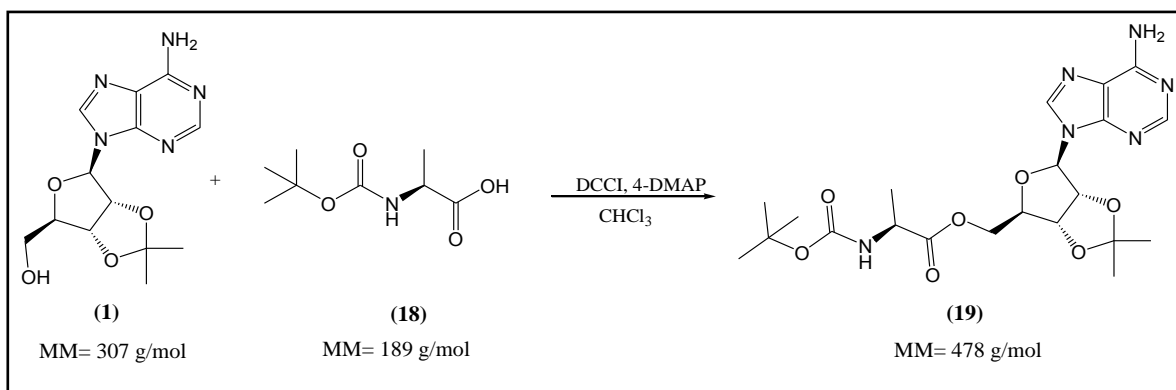
IR (película MeOH) en cm^{-1} : 3431.76, 1207.65 ($-\text{NH}_2$), 1684.68 (C=O), 1136.62 (C-O-C).

EMFAB m/z (%ar): 379 (26) $[\text{M}+1]^+$.

HR-EMFAB fórmula condensada $[\text{M}+1]^+$: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{N}_6$.

RMN- ^1H (Acetona- D_6 , 400 MHz, δ ppm): 1.80 (s, 3H, CH_3 -), 2.00 (s, 3H, CH_3 -), 2.51 (2H, $-\text{CH}_2-\text{COO}-$), 3.33 (t, 2H, $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $J= 6.8$ Hz), 4.74 (dd, 1H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-$, $J_1= 11.8$ Hz, $J_2= 6$ Hz), 4.81 (dd, 1H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-$, $J_1= 11.4$ Hz, $J_2= 4.4$ Hz), 4.89 (m, 1H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 5.60 (dd, 1H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-$, $J_1= 6$ Hz, $J_2= 3.2$ Hz), 5.97 (dd, 1H, N-CHO- $\text{CH}-$, $J_1= 5.6$ Hz, $J_2= 2.4$ Hz), 6.68 (d, 1H, -N-CH-O, $J= 2.4$ Hz), 6.73 (sa, 2H, NH_2 -), 8.72 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.76 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

RMN- ^{13}C (Acetona- D_6 , 100 MHz, δ ppm): 24.6 (CH_3 -), 26.5 (CH_3 -), 30.1 ($\text{CH}_2-\text{COO}-$), 31.0 ($\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 64.3 ($-\text{COO}-\text{CH}_2-$), 81.5 ($-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-$), 84.1 (N-CHO- $\text{CH}-$), 84.4 ($-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 90.2 (N-CH-O), 113.9 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}-$), 115.7 (C_5 anillo de Purina), 140.6 (C_8 anillo de Purina), 149.1 (C_4 anillo de Purina), 151.6 (C_2 anillo de Purina), 155.4 (C_6 anillo de Purina), 170.5 ($-\text{COO}-$).

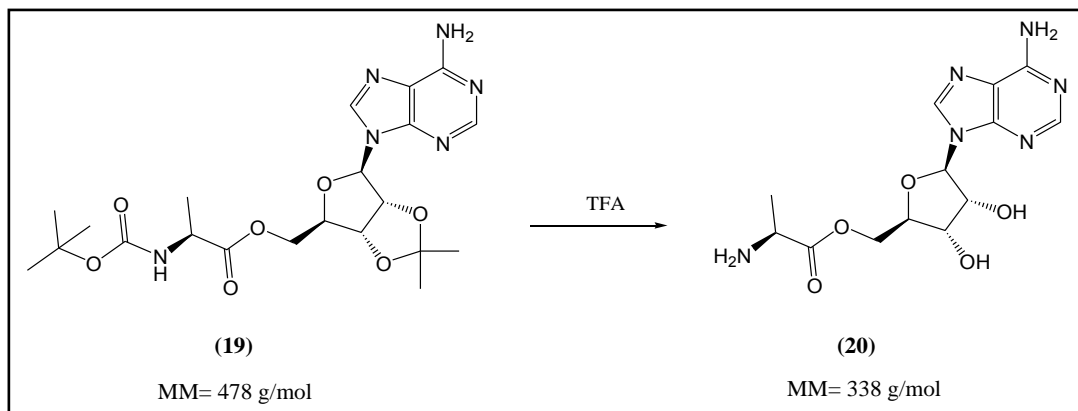
Síntesis de *N*-tertbutiloxicarbonil-(*S*)-alaninato de 2'-3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (19)


En un matraz bola de 100 mL equipado con agitación magnética, se colocaron 1 g (3.26 mmol) de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina, 0.8 g (4.23 mmol) de Boc-(*S*)-alanina, 0.87 g (4.22 mmol) de diciclohexilurea y 0.12 g de 4-dimetilaminopiridina (0.98 mmol) en 50 de CHCl₃. La reacción se agitó en atmósfera de nitrógeno por 2.5 horas monitoreándose con ccf. Después del consumo total de la materia prima, la reacción se lavó con 20 mL de solución saturada de carbonato de sodio y después con 20 mL de ácido cítrico al 20 %. La fase acuosa secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a presión reducida hasta la obtención de un aceite blanco. Dicho aceite se mantuvo en agitación vigorosa con 30 mL de hexano precipitando un polvo fino blanco. Se purificó por columna abierta (CHCl₃ a CHCl₃: MeOH 98:2) y se obtuvieron 1.17 g de sólido blanco en un 75 % de rendimiento presentando una única mancha en ccf (R_f de 0.51 en el Sistema IV) con un punto de fusión de 86.5-88.8 °C.

EMFAB m/z (%ar): 479(62) [M+1]⁺.

RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ ppm): 1.33 (d, 3H, CH₃-CH-, J= 7.2 Hz), 1.40 (s, 3H, CH₃-), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃C-), 1.62 (s, 3H, CH₃-), 3.48 (m, 1H, CH₃-CH-), 4.36 (dd, 1H, -COO-CH₂-CH-O-, J₁= 11.6 Hz, J₂= 6 Hz), 4.4 dd, 1H, -COO-CH₂-CH-O-, J₁= 11.6 Hz, J₂= 4.4 Hz), 4.47 (m, 1H, -COO-CH₂-CH-O-), 5.07 (dd, 1H, -COO-CH₂-CHO-CH-, J₁= 6.4 Hz, J₂=3.2 Hz), 5.22 (sa, 1H, Boc-NH-), 5.52 (dd, 1H, -N-CHO-CH-, J₁= 6.4 Hz, J₂=4 Hz), 5.81 (s, 2H, -NH₂), 6.07 (d, 1H, -N-CH-O, J= 2Hz), 7.89 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.36 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

Síntesis de (S)-alaninato de adenosin-5'-ilo (20)



En un matraz bola equipado con agitación magnética y trampa de gases, se colocaron 1 g (2.09 mmol) del éster **19** y 4 mL de ácido trifluoroacético y dejó en agitación por 4 d. Al término de este lapso, se evaporó a sequedad y neutralizó con DIPEA. La purificación se realizó por medio de columna empleando como eluyente CHCl_3 hasta CHCl_3 : MeOH (9:1). Se obtuvieron 0.36 g de un polvo amarillo claro cristalino que después de un tiempo se convertía en un aceite amarillo. El rendimiento fue 50 % (R_f de 0.33 en Sistema VI).

IR (película MeOH) en cm^{-1} : 3095.97 ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$), 1201.83 ($-\text{NH}_2$), 1676.80 (C=O), 1134.99 (C-O-C).

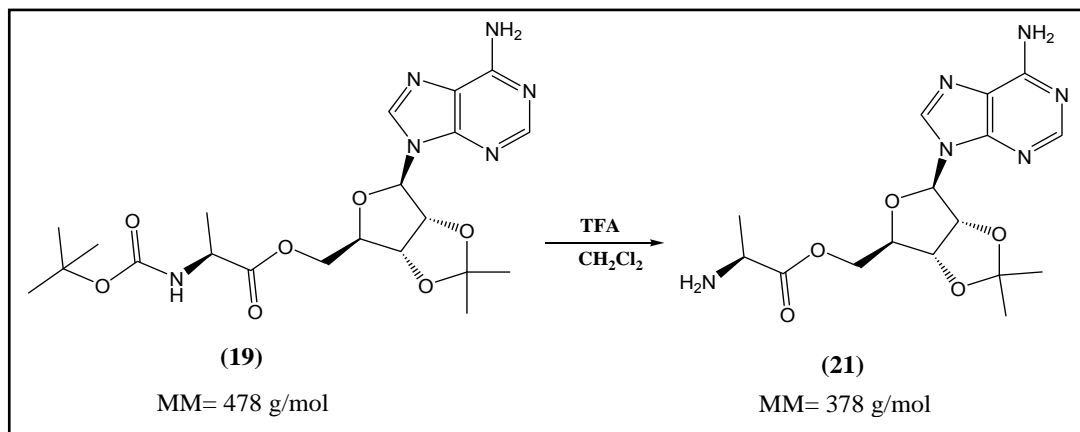
EMFAB m/z (%ar): 339(40) $[\text{M}+1]^+$.

HR-EMFAB composición elemental $[\text{M}+1]^+$: $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}_6$.

RMN- ^1H (DMSO- D_6 , 400 MHz, δ ppm): 1.26 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH-}$, $J= 13.6$ Hz), 3.17 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-}$), 4.14 (m, 1H, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH-}$), 4.28 (t, 1H, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH-CH-}$, $J= 5.2$ Hz), 4.38 (dd, 1H, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH-}$, $J_1= 12$ Hz, $J_2= 6.4$ Hz), 4.47 (dd, 1H, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH-}$, $J_1= 11.8$ Hz, $J_2= 3.6$ Hz), 4.68 (t, 1H, $-\text{N-CHO-CH-}$, $J= 5.2$ Hz), 5.93 (d, 1H, $-\text{N-CH-O-}$, $J= 4.8$ Hz), 7.88 (sa, 2H, $-\text{NH}_2$), 8.25 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.43 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

RMN- ^{13}C (DMSO- D_6 , 100 MHz, δ ppm): 17.1 ($\text{CH}_3\text{-CH-}$), 31.1 ($\text{CH}_3\text{-CH-}$), 65.9 ($-\text{COO-CH}_2\text{-}$), 70.6 ($-\text{COO-CH}_2\text{-CH-CH-}$), 73.2 ($-\text{N-CHO-CH-}$), 81.9 ($-\text{COO-CH}_2\text{-CH-}$), 88.3 ($-\text{N-CH-O-}$), 119.5 (C_5 anillo purina), 141.5 (C_8 anillo purina), 149.5 (C_4 anillo purina), 151.2 (C_2 anillo purina), 155.1 (C_6 anillo purina), 168.0 ($-\text{COO-}$).

Síntesis de (S)-alaninato de 2'-3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (21)



En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y trampa de gases, se colocaron 1 g (2.09 mmol) del éster **19** disueltos en 30 mL de CH_2Cl_2 y dejó en agitación por 10 minutos a 0°C . Se agregaron posteriormente 15 mL de ácido trifluoroacético y deja en agitación por 1 h. La solución se evaporó a sequedad resultando un aceite amarillo. El producto se purificó por columna fase normal (CHCl_3 a $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 95:5) obteniéndose 0.57 g de un polvo amarillo claro (73 % de rendimiento) R_f de 0.64 (Sistema V). No se pudo obtener el punto de fusión dadas las características higroscópicas del compuesto.

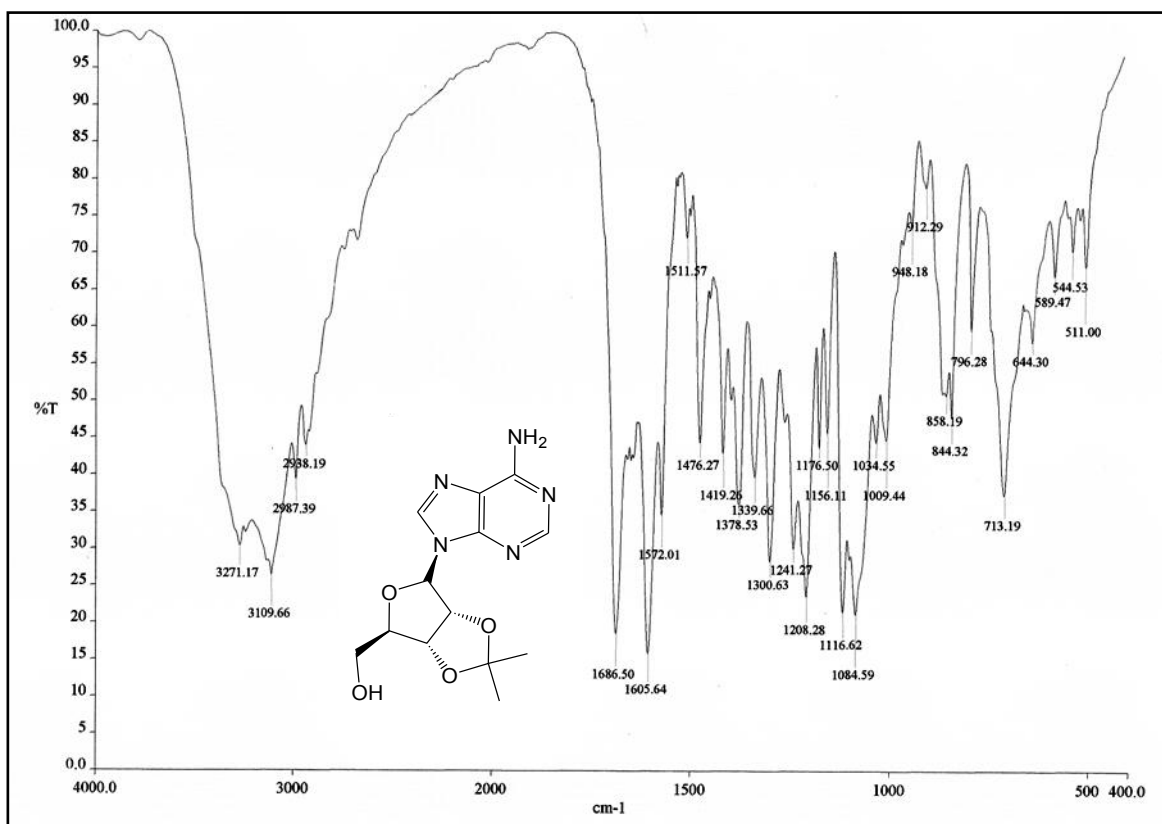
IR (película MeOH) en cm^{-1} : 3316.48, 1202.39 ($-\text{NH}_2$), 2931.99, 2855.99 (C alifático), 1703.03 (C=O), 1136.47 (C-O-C).

EMFAB m/z (%ar): 379 (16) $[\text{M}+1]^+$.

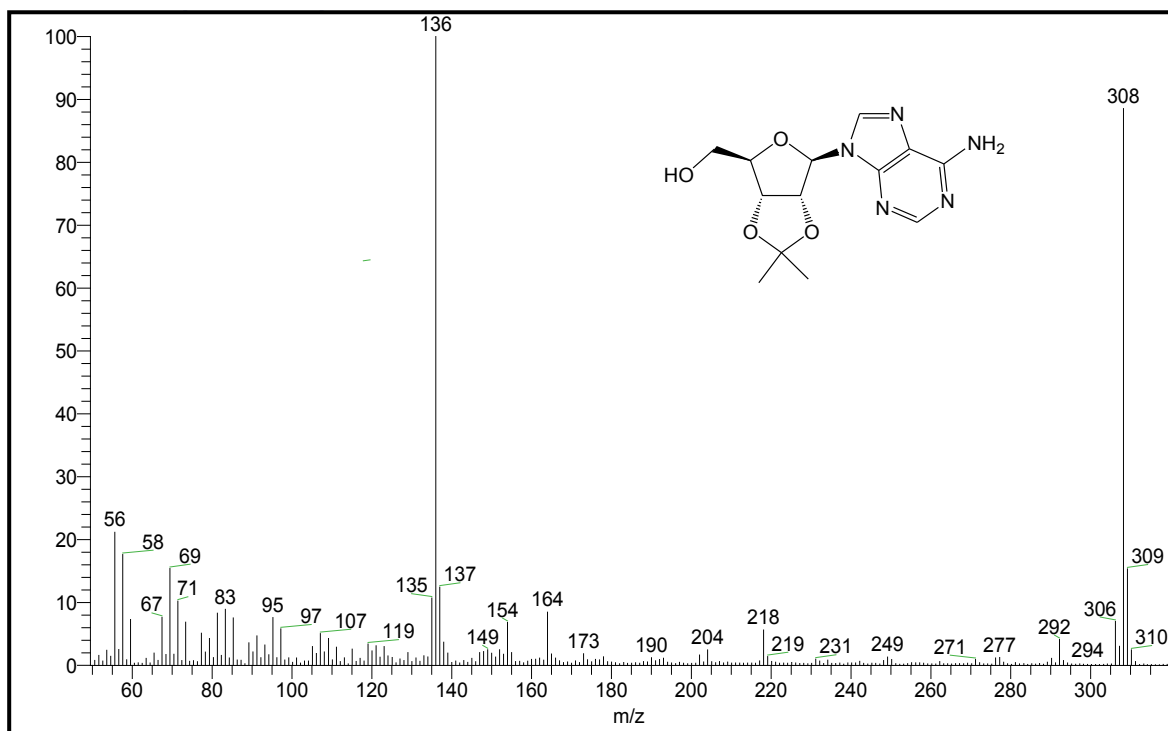
HR-EMFAB composición elemental $[\text{M}+1]^+$: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{N}_6$.

RMN- ^1H (acetona- D_6 , 400 MHz, δ ppm): 1.31 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH-}$, $J=7.2$ Hz), 1.36 (s, 3H, $(\text{CH}_3)\text{-C}$), 1.57 (s, 3H, $(\text{CH}_3)\text{-C}$), 4.17 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-}$), 4.28 (dd, 1H, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH-}$, $J_1=11.6$ Hz, $J_2=6$ Hz), 4.36 (dd, 1H, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH-}$, $J_1=11.6$ Hz, $J_2=4.8$ Hz), 4.42 (m, 1H, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH-}$), 5.14 (dd, 1H, $-\text{COO-CH}_2\text{-CH-CH-}$, $J_1=6$ Hz, $J_2=3.2$ Hz), 5.56 (dd, 1H, $-\text{N-CHO-CH-}$, $J_1=6.4$ Hz, $J_2=2.4$ Hz), 6.21 (d, 1H, $-\text{N-CH-O-}$, $J=2.4$ Hz), 6.68 (sa, 2H, $-\text{NH}_2$ purina), 8.19 (s, 1H, hidrógeno del anillo de imidazol), 8.22 (s, 1H, hidrógeno del anillo de pirimidina).

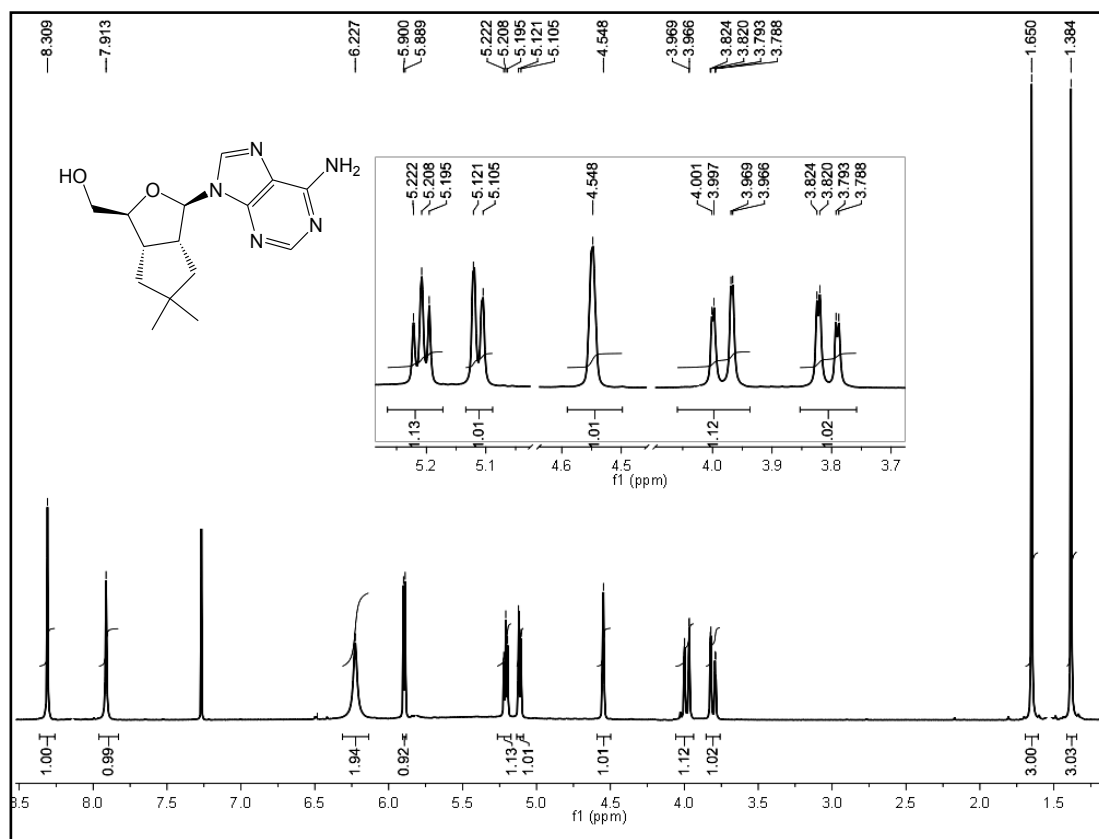
RMN- ^{13}C (acetona- D_6 , 100 MHz, δ ppm): 17.0 ($\text{CH}_3\text{-CH-}$), 24.7 ($(\text{CH}_3)\text{-C-}$), 26.6 ($(\text{CH}_3)\text{-C-}$), 49.3 ($\text{CH}_3\text{-CH-}$), 64.2 ($-\text{COO-CH}_2\text{-CH-CH-}$), 81.7 ($-\text{COO-CH}_2\text{-CH-CH-}$), 83.7 ($-\text{N-CHO-CH-}$), 84.1 ($-\text{COO-CH}_2\text{-CH-CH-}$), 90.2 ($-\text{N-CH-O-}$), 113.9 ($(\text{CH}_3)\text{-C-}$), 120.0 (C_5 anillo purina), 140.1 (C_8 anillo purina), 149.3 (C_4 anillo purina), 152.8 (C_2 anillo purina), 156.4 (C_6 anillo purina), 172.6 ($-\text{COO-}$).



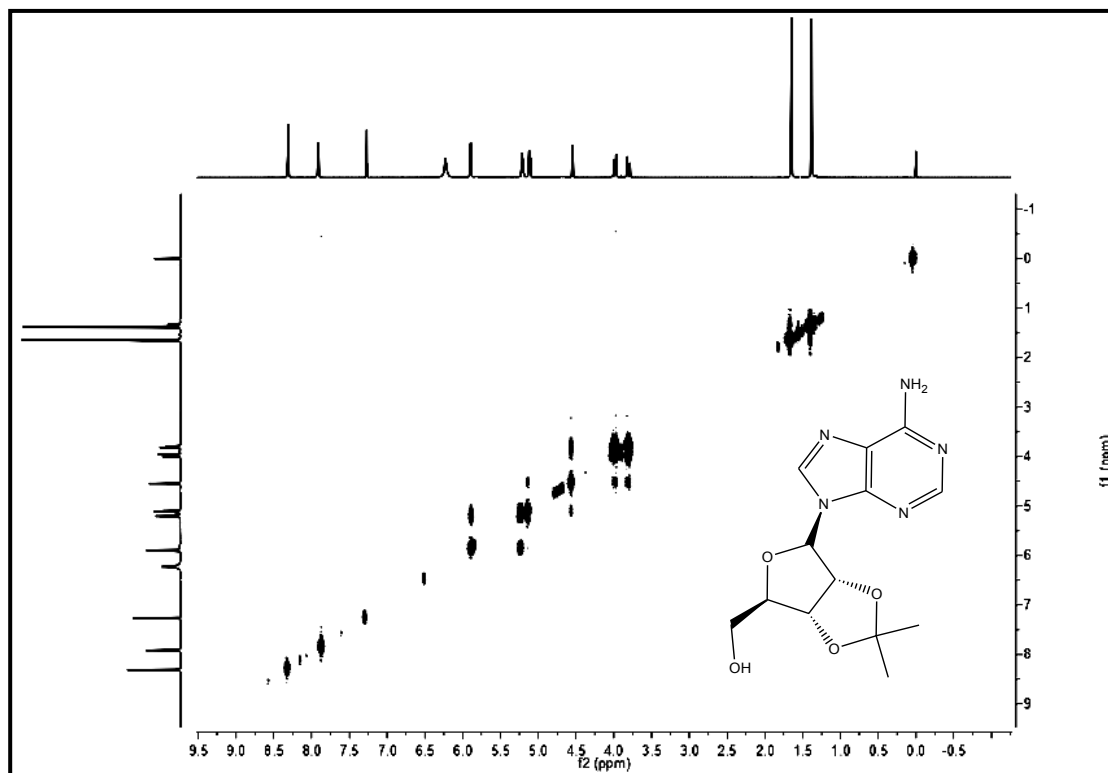
Espectro 1. IR (Pastilla KBr) de 2',3'-O-isopropilidenadenosina (1).



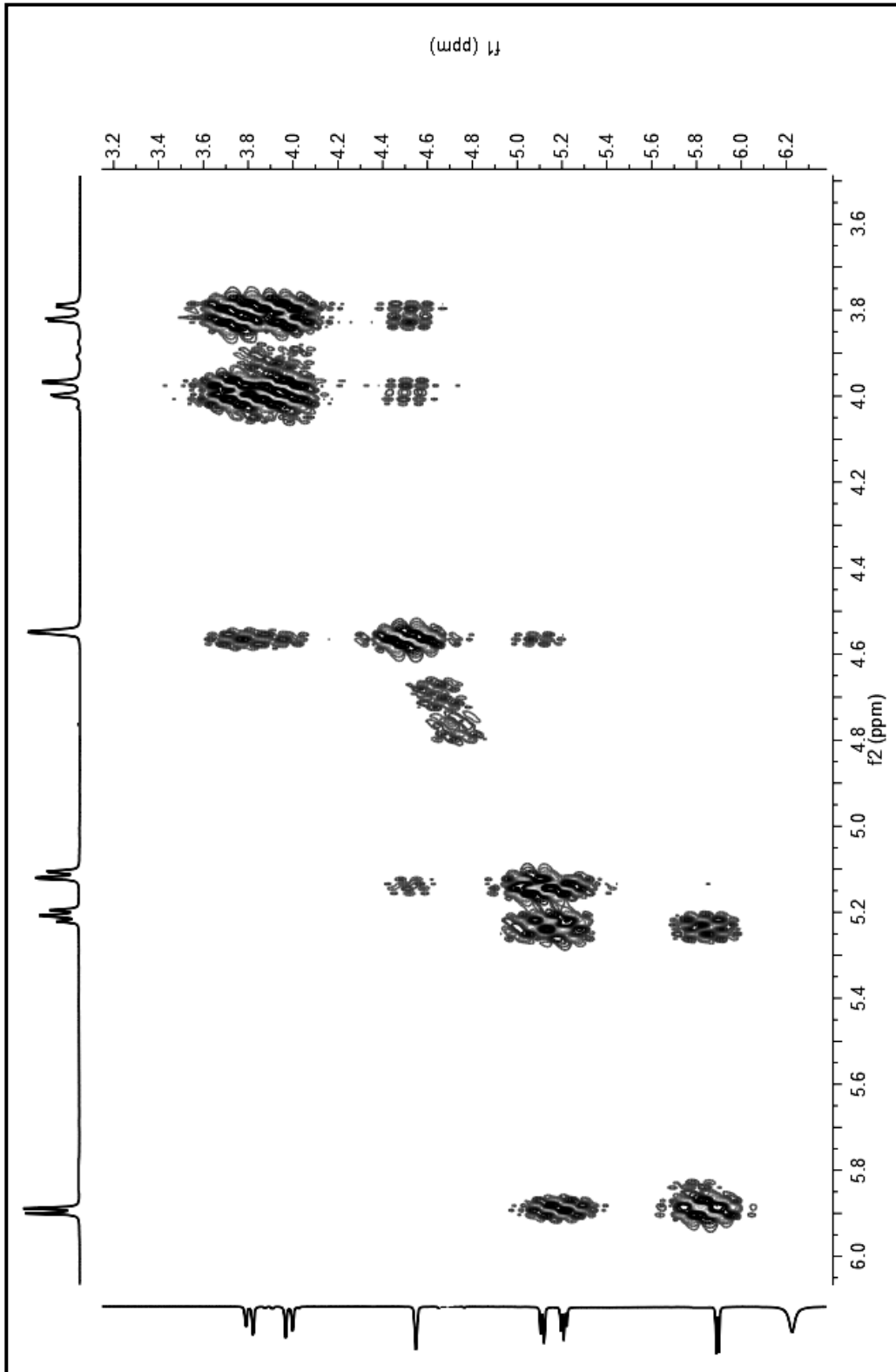
Espectro 2. EMFAB de 2'-3'-O-isopropilidenadenosina (1).



Espectro 3. RMN-¹H de 2'-3'-O-isopropilidenadenosina (1).



Espectro 4. Espectro COSY de 2'-3'-O-isopropilidenadenosina (1).

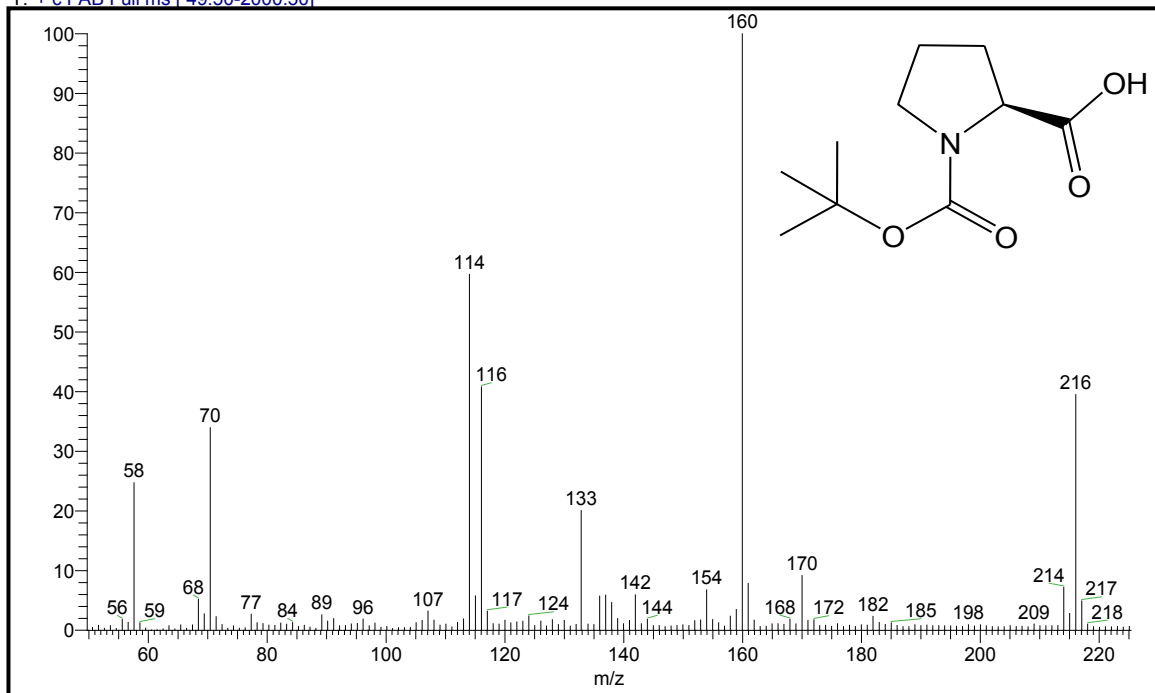
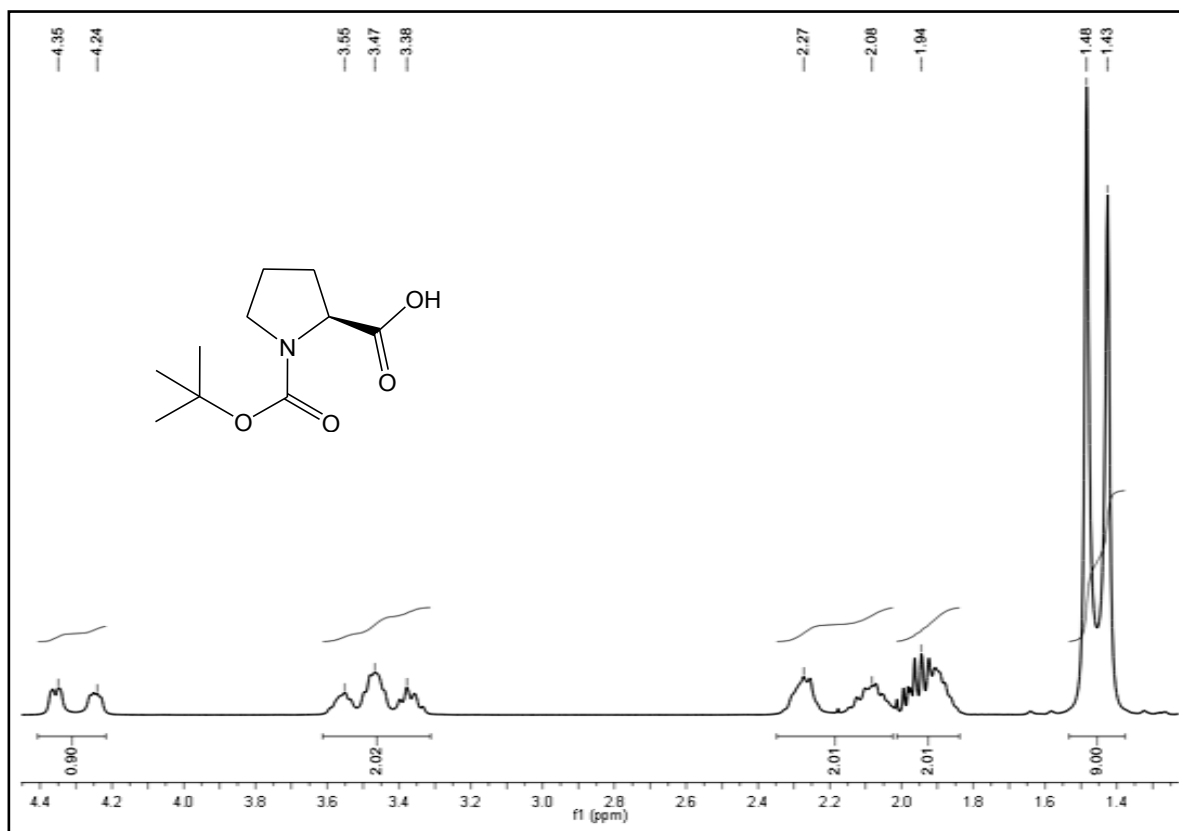


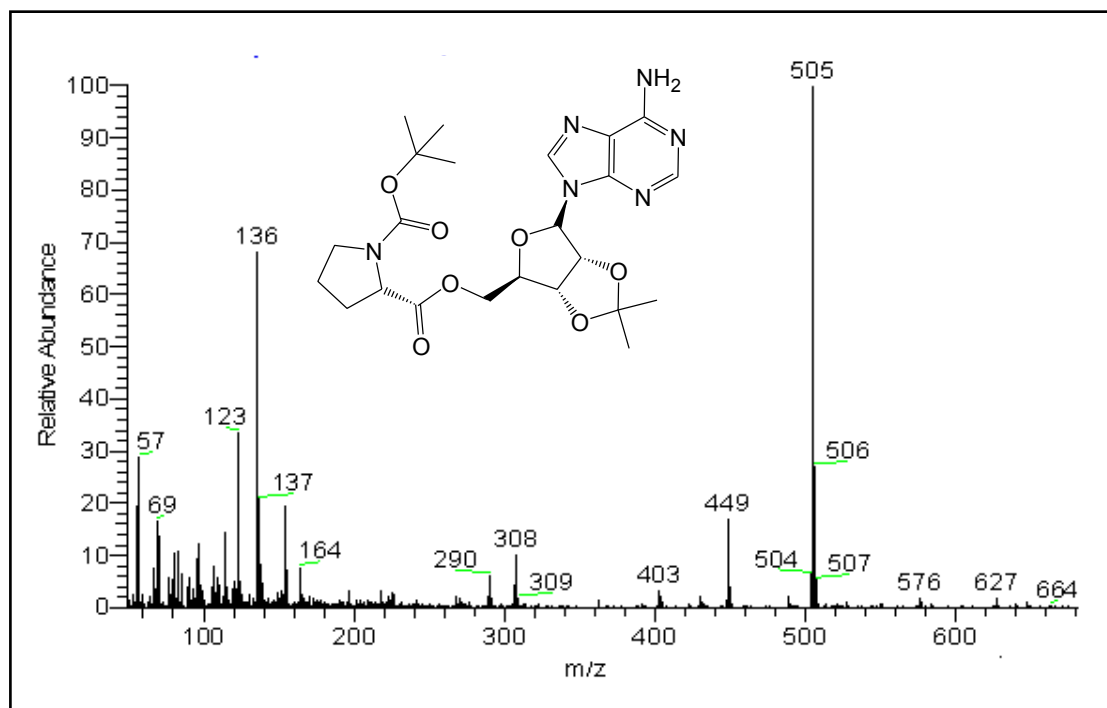
Espectro 5. Ampliación COSY de 2'-3'-O-isopropilidenadenosina (1).

DMF

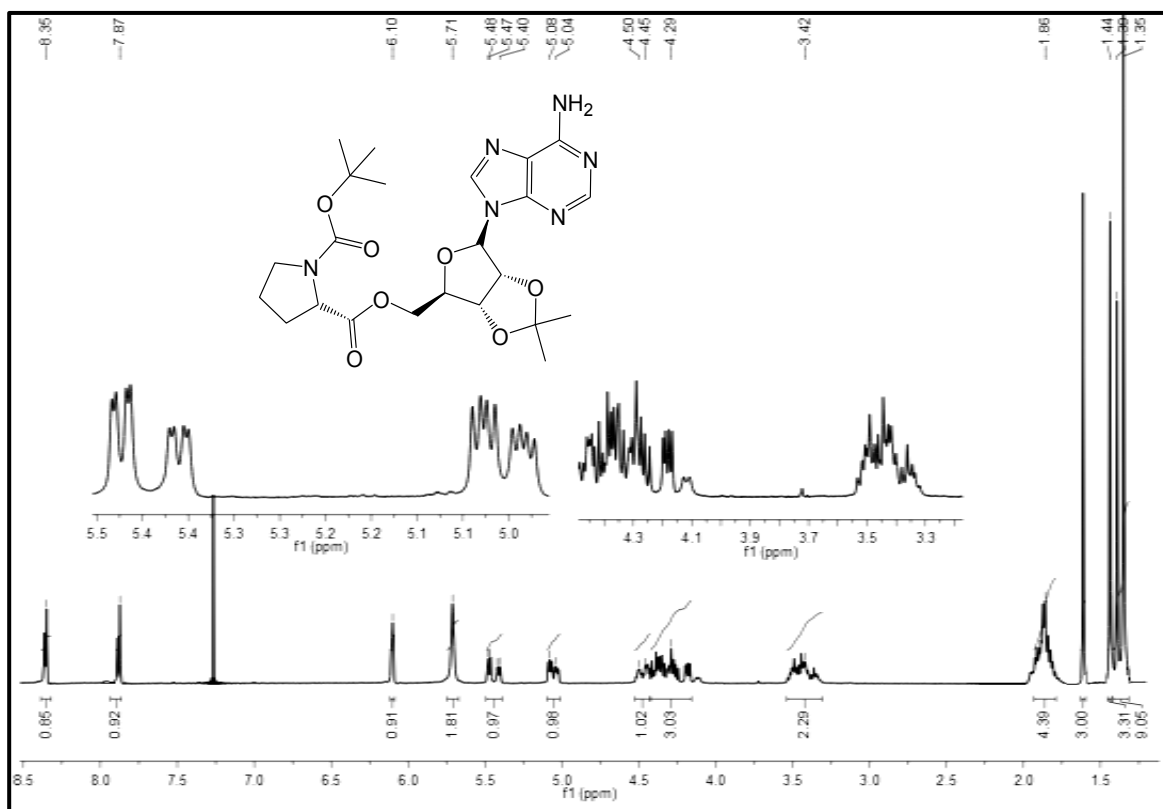
QT2020_1#1-4 RT: 0.00-0.82 AV: 4 NL: 1.15E7

T: + c FAB Full ms [49.50-2000.50]

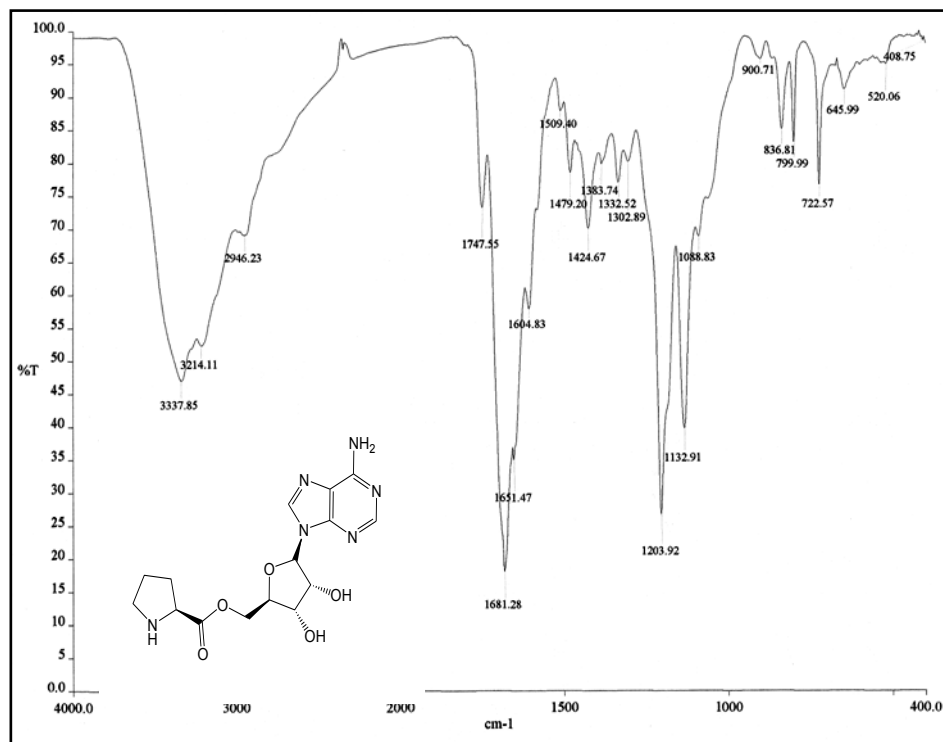
Espectro 6. EMFAB de *N*-tert-butoxycarbonylprolina (2).Espectro 7. RMN-¹H de *N*-tert-butoxycarbonylprolina (2).



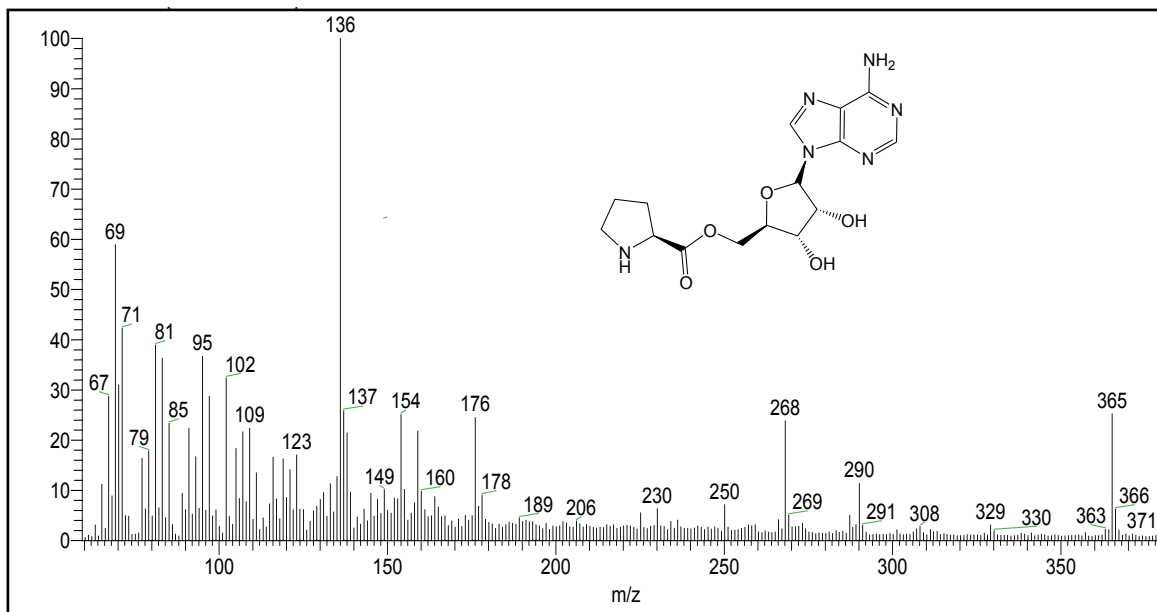
Espectro 8. EMFAB de *N*-tertbutoxicarbonil-(*S*)-pirrolidín-2-carboxilato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**3**).



Espectro 9. RMN-¹H de *N*-tertbutoxicarbonil-(*S*)-pirrolidín-2-carboxilato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**3**).



Espectro 10. IR (película MeOH) de (S)-prirrolidín-2-carboxilato de adenosin-5'-ilo (**4**).



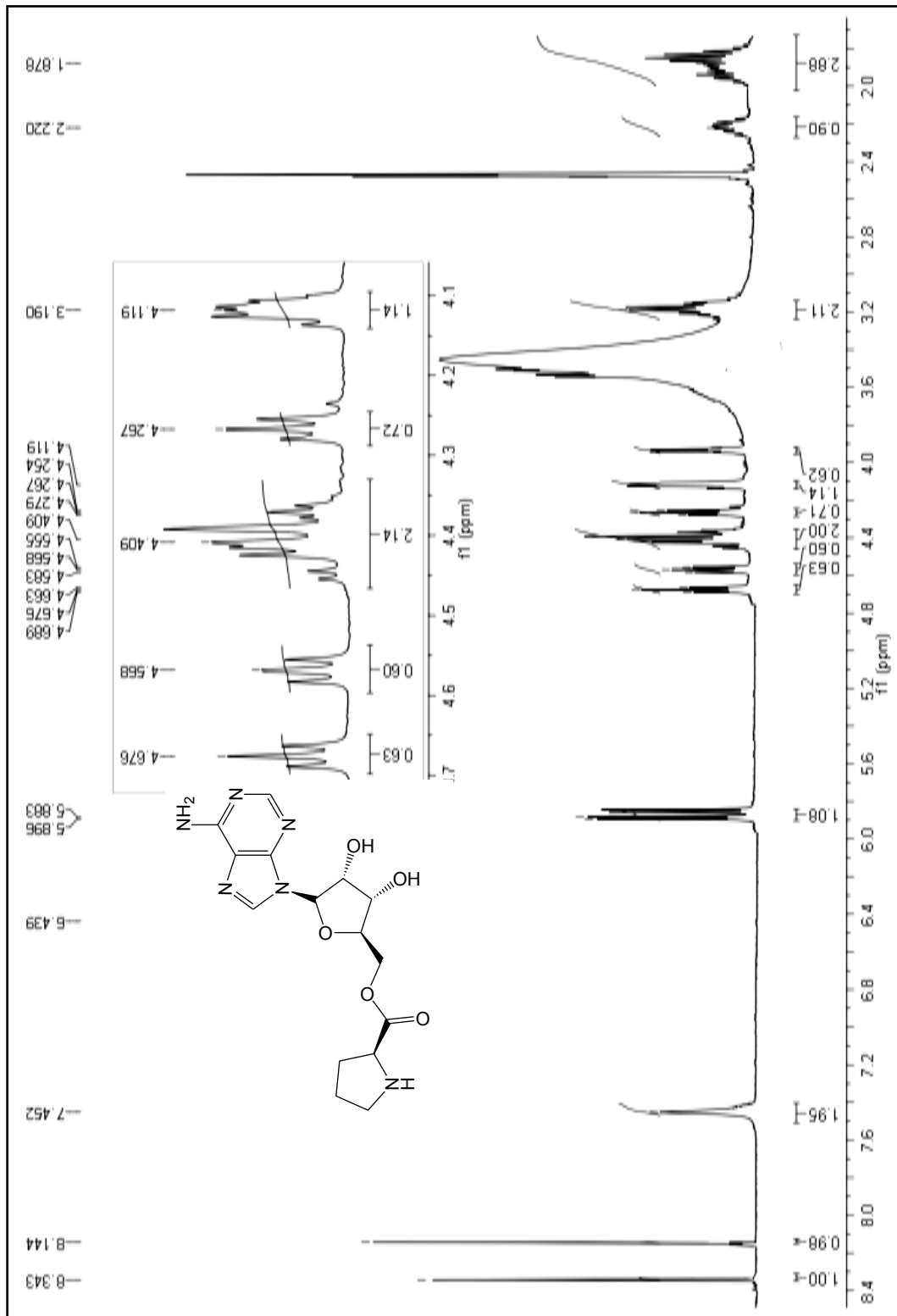
Espectro 11. EMFAB de (S)-prirrolidín-2-carboxilato de adenosin-5'-ilo (**4**).

Elemental composition search on mass 365.16

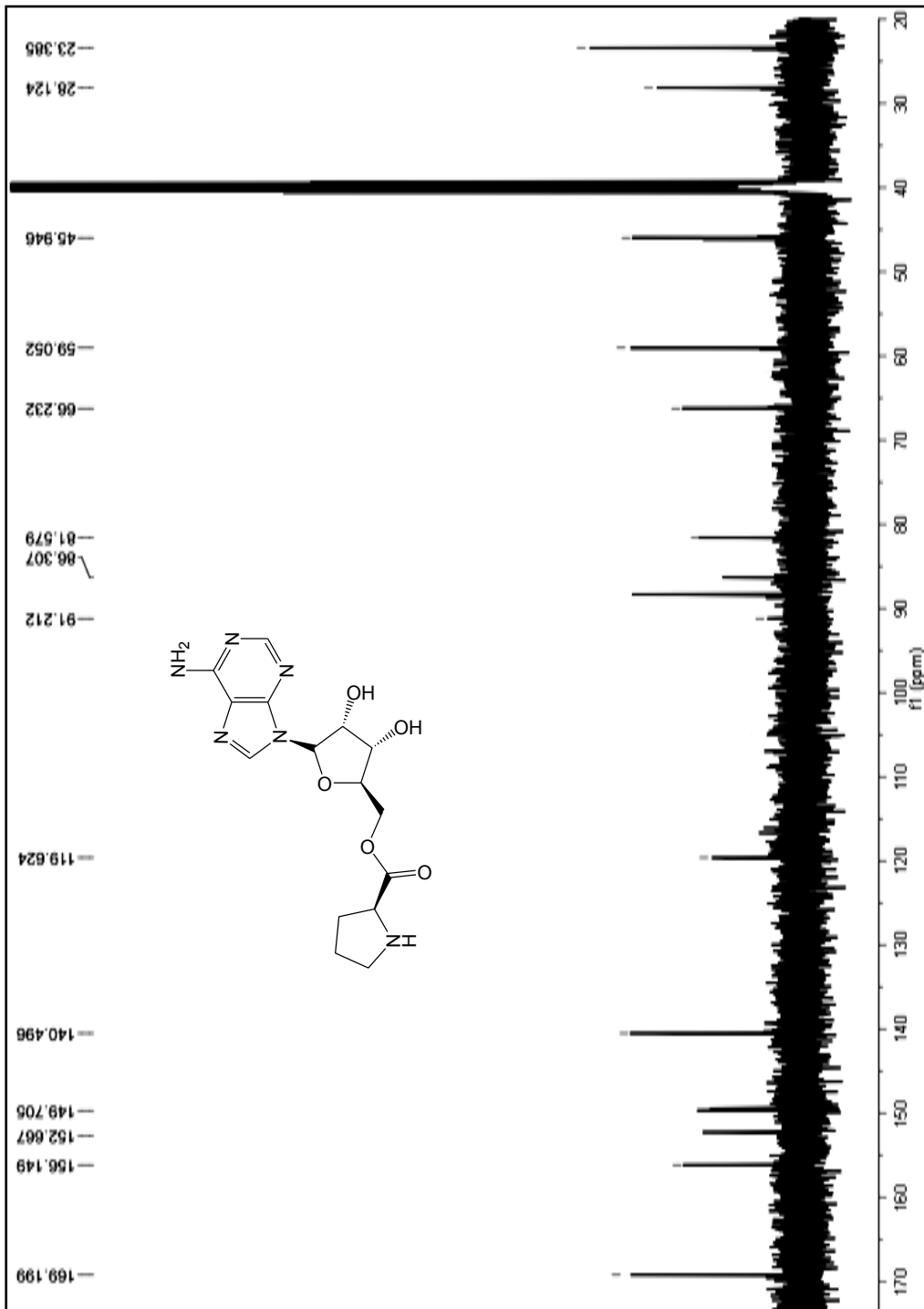
m/z = 360.16-370.16

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
365.1551	365.1568	-4.64	8.5	C ₁₅ H ₂₁ O ₅ N ₆

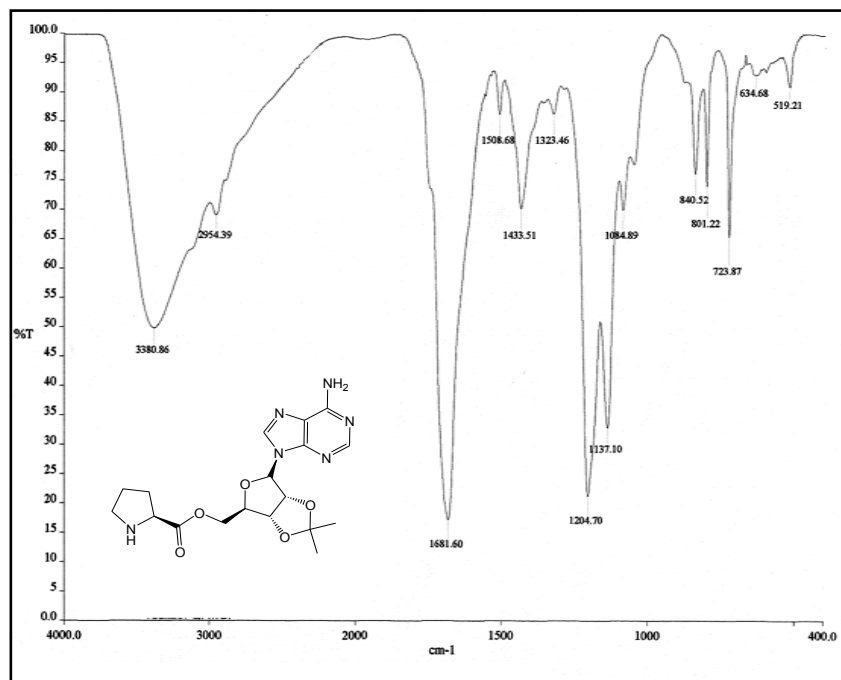
Espectro 12. HR FAB de (S)-prirrolidín-2-carboxilato de adenosin-5'-ilo (**4**).



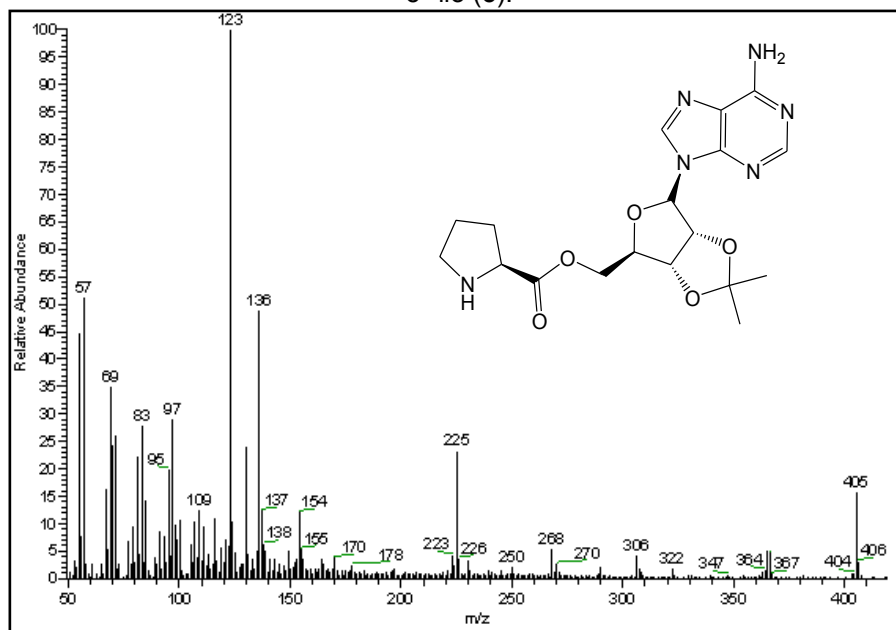
Espectro 13. RMN- ^1H (S)-pirrolidin-2-carboxilato de adenosin-5'-ilo (4).



Espectro 14. RMN- ^{13}C de (S)-pirrolidín-2-carboxilato de adenosin-5'-ilo (4).



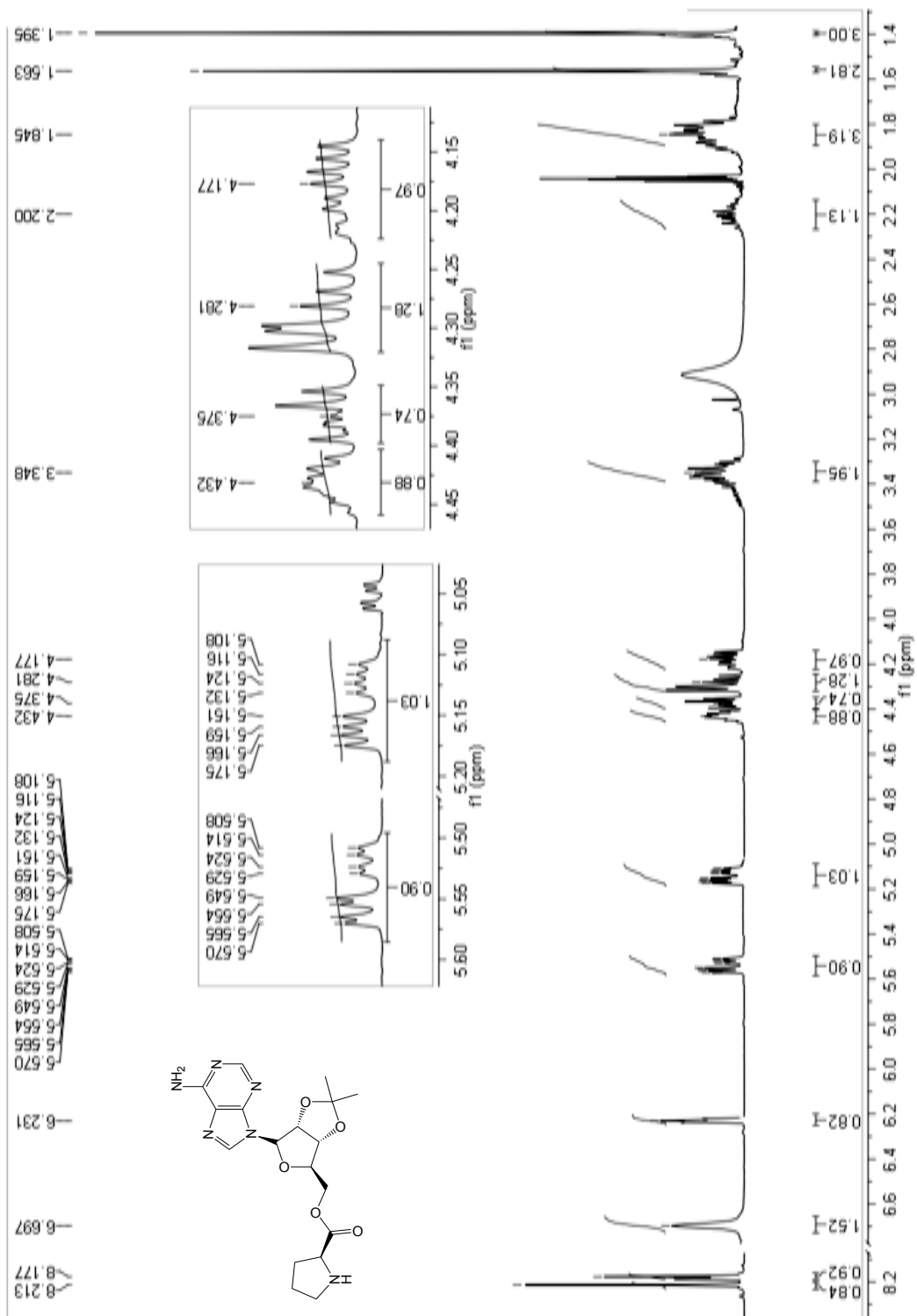
Espectro 15. IR (película MeOH) de (S)-pirrolidín-2-carboxilato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**5**).



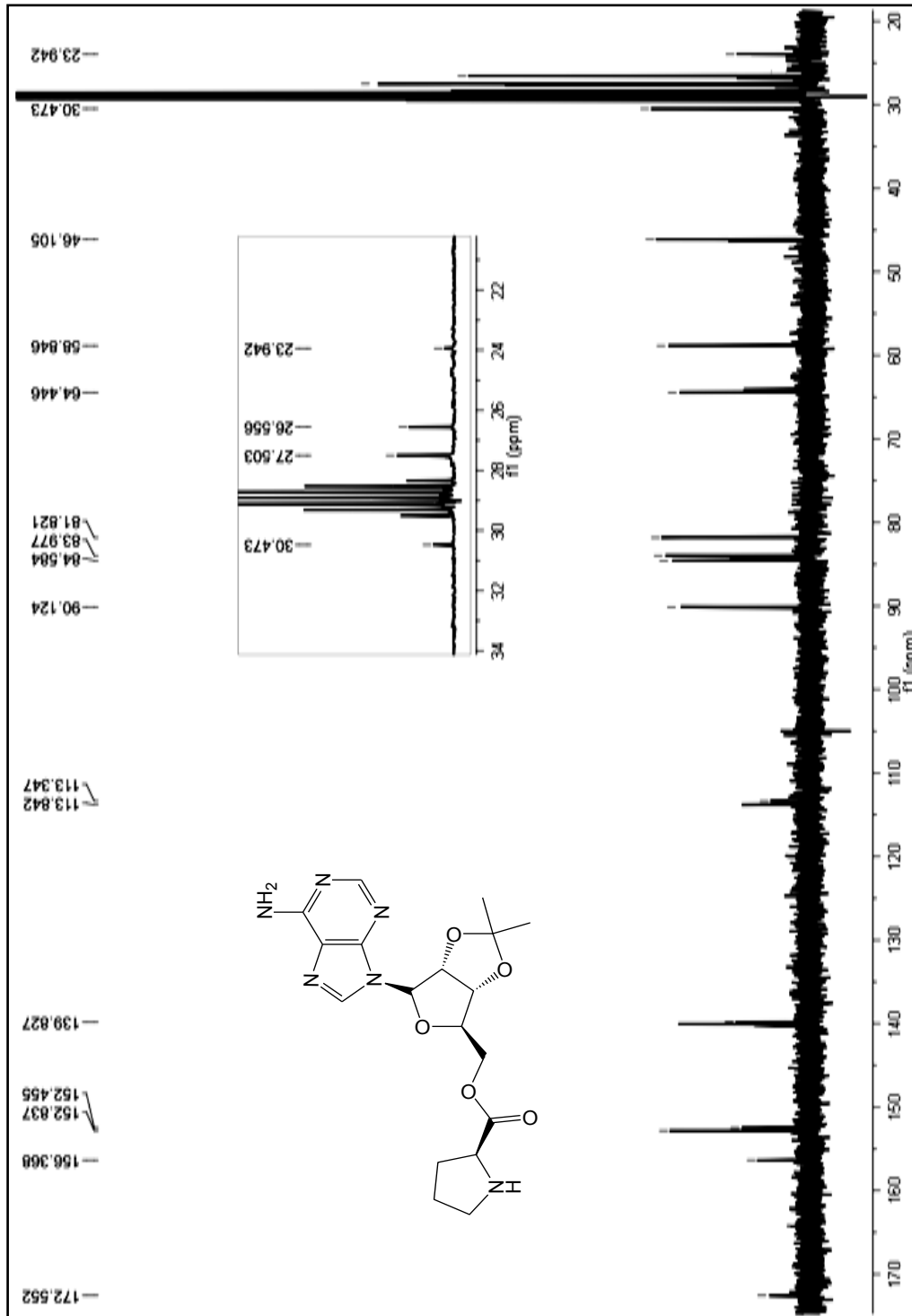
Espectro 16. EMFAB de (S)-pirrolidín-2-carboxilato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**5**).

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
405.1856	405.1881	-6.16	9.5	C ₁₈ H ₂₅ O ₅ N ₆

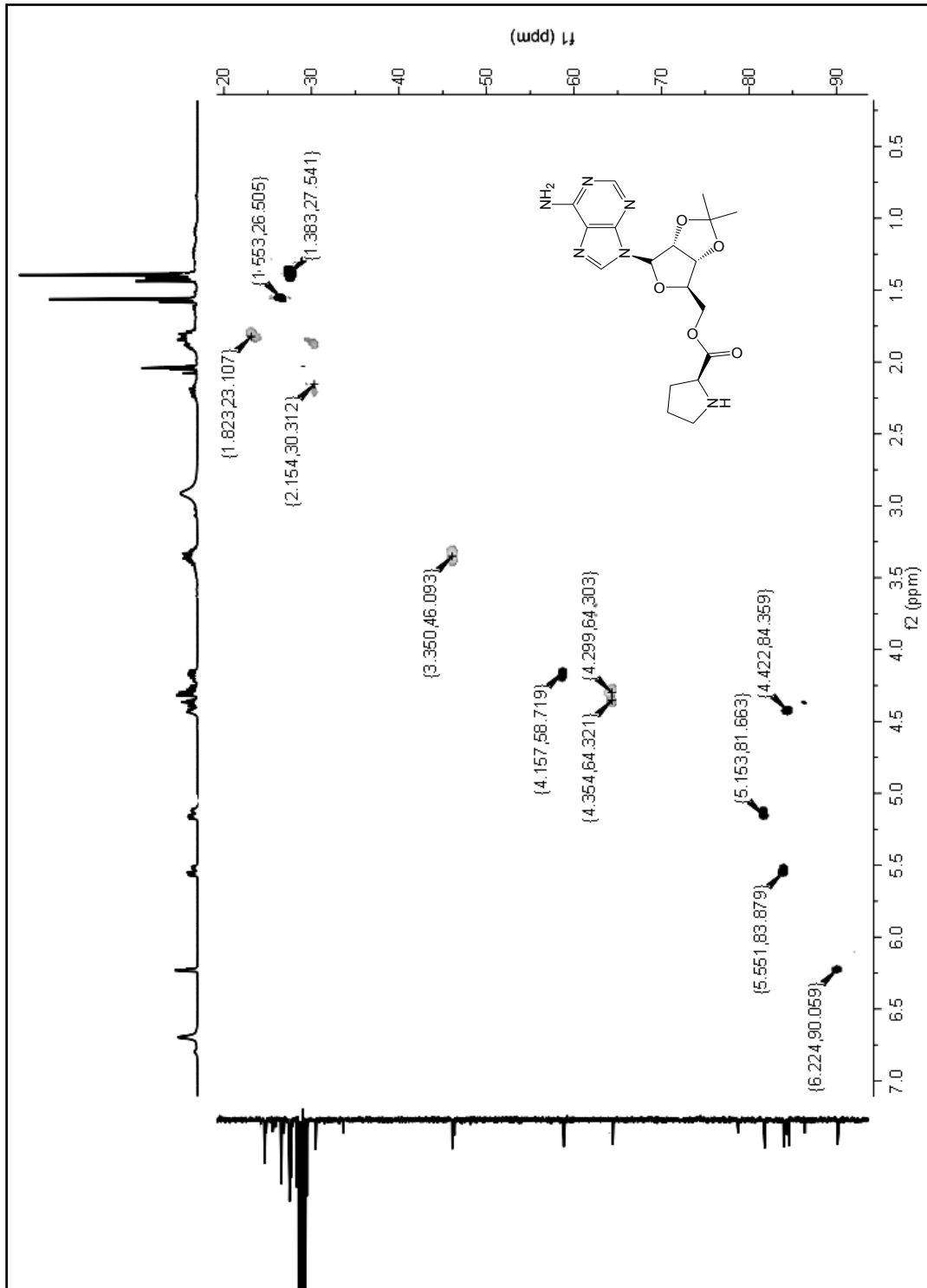
Espectro 17. HR-FAB de (S)-pirrolidín-2-carboxilato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**5**).



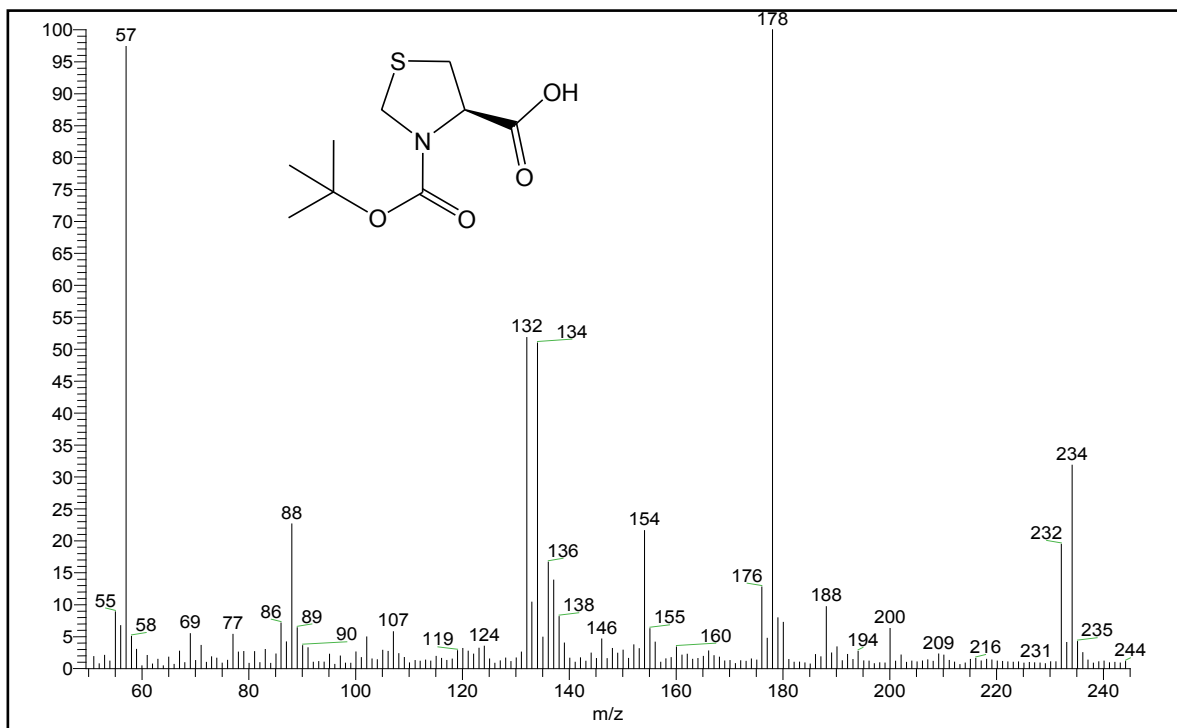
Espectro 18. RMN- ^1H de (S)-pirrolidin-2-carboxilato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (5).



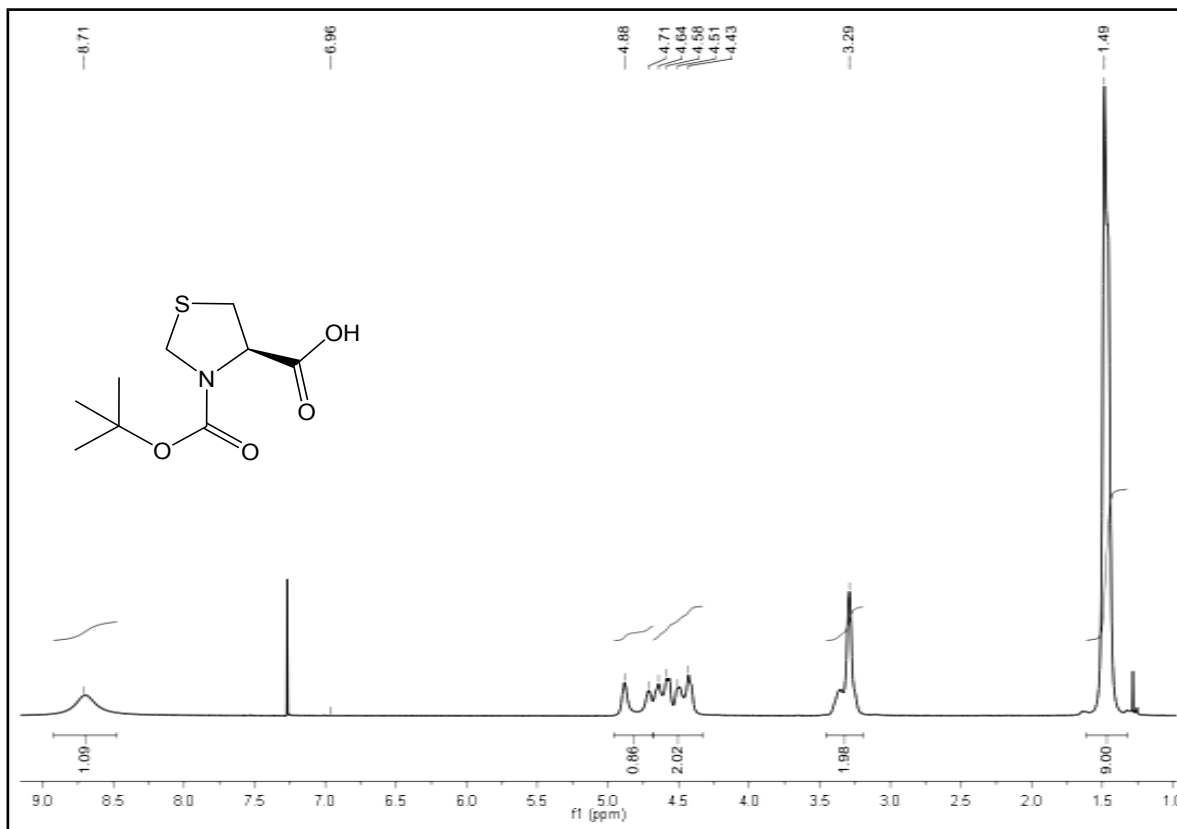
Espectro 19. RMN- ^{13}C de (S)-priroidin-2-carboxilato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (5).



Espectro 20. HSQC editado de (S)-pirrolidin-2-carboxilato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (5).

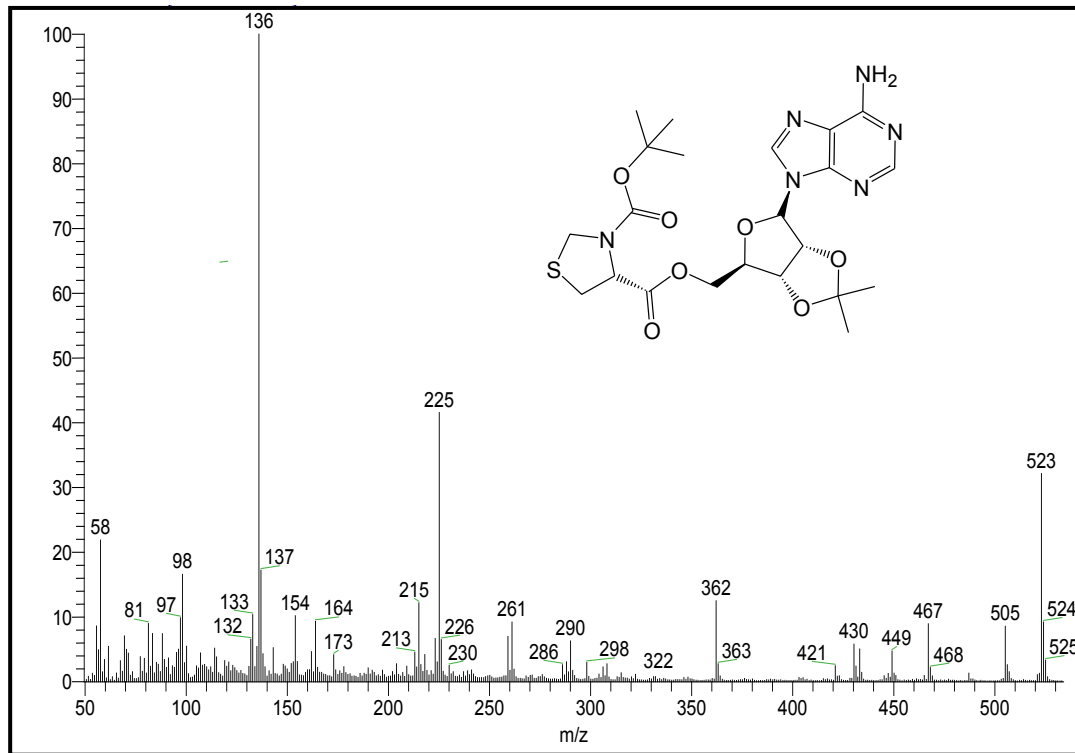


Espectro 21. EMFAB de ácido *N*-*tert*butoxicarbonil-(*R*)-tiazolidín-4-carboxílico (6).

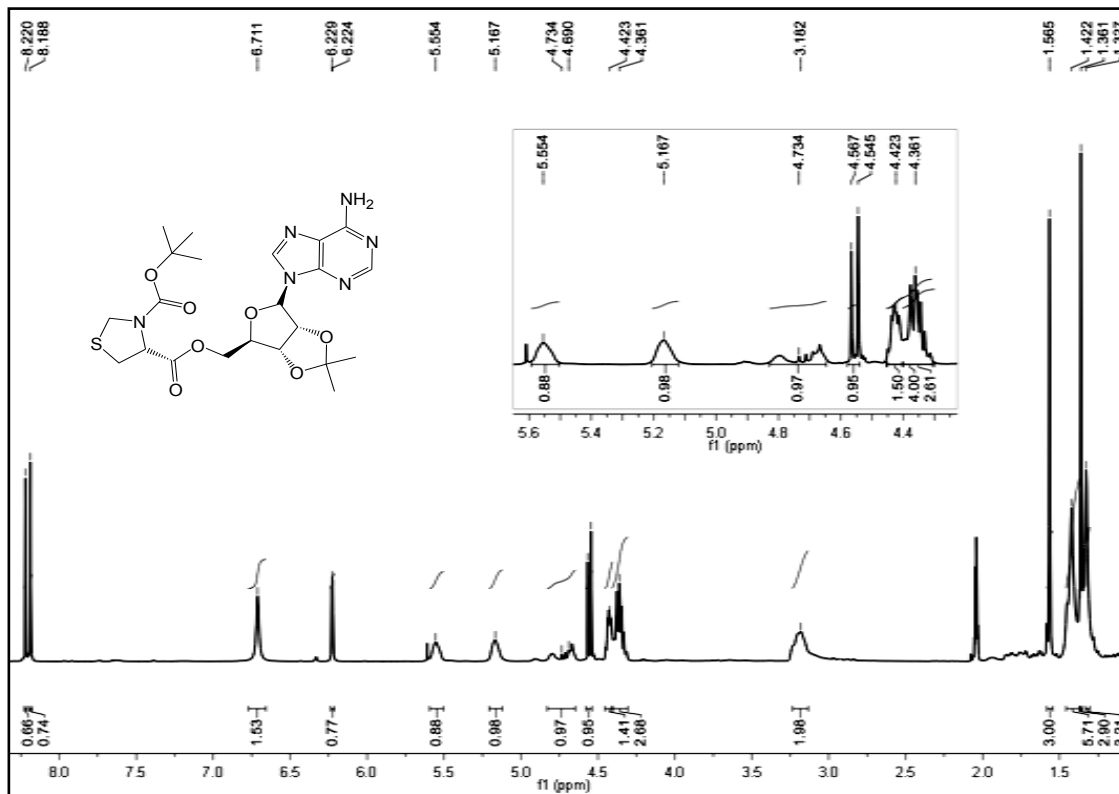


Espectro 22 . RMN-¹H de ácido *N*-*tert*butoxicarbonil-(*R*)-tiazolidín-4-carboxílico (6)

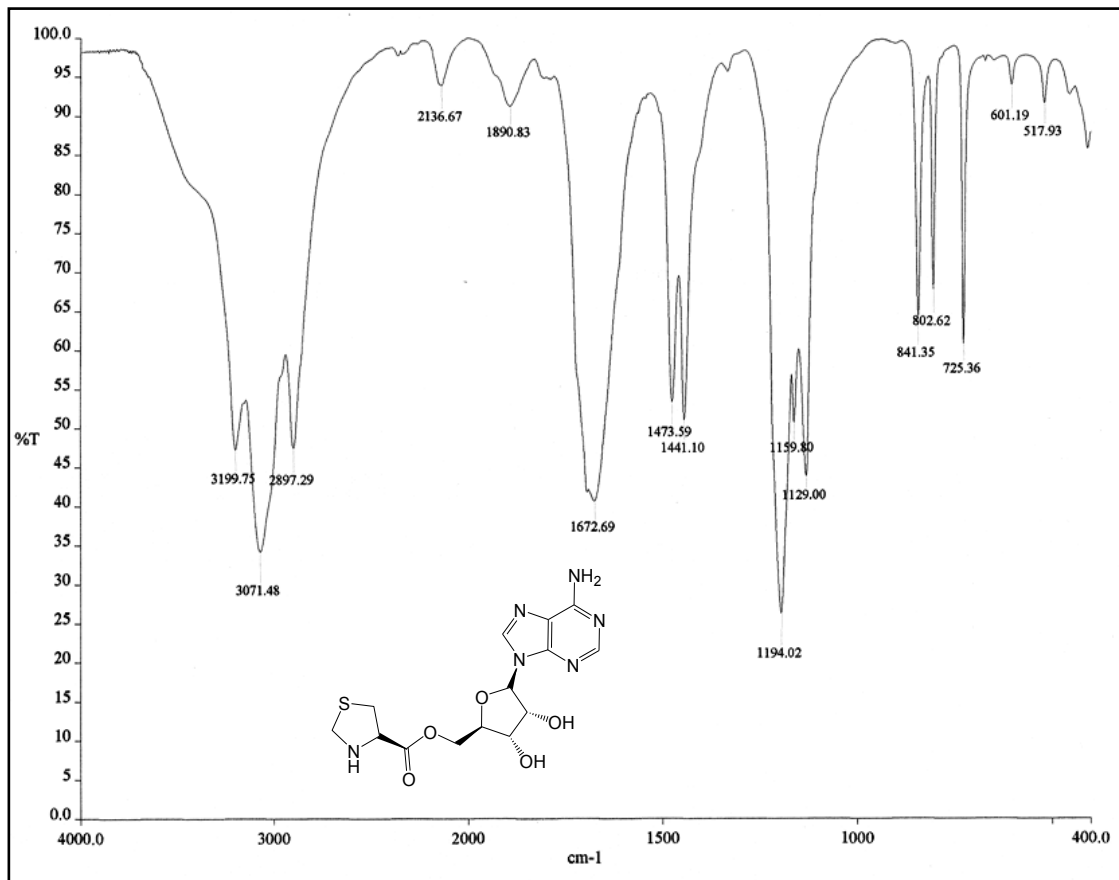
Relative Abundance



Espectro23. EMFAB de *N*-*tert*butoxycarbonyl-(*R*)-tiazolidín-4-carboxilato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (7).

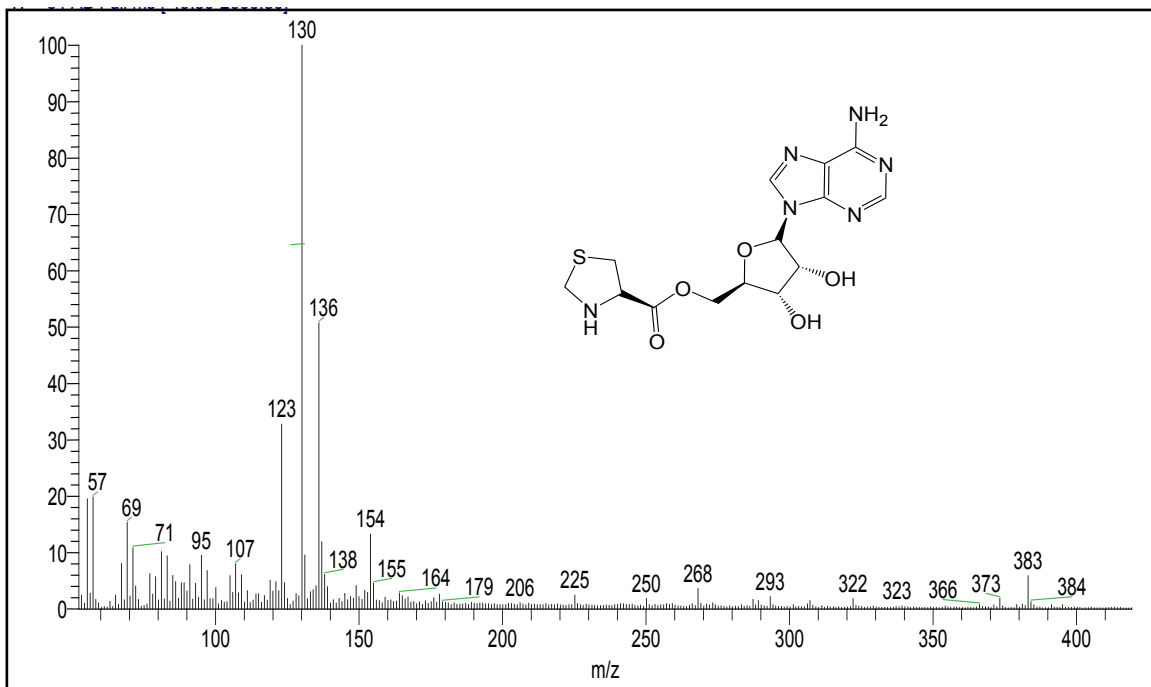


Espectro 24. RMN-¹H de *N*-*tert*butoxycarbonyl-(*R*)-tiazolidín-4-carboxilato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (7).

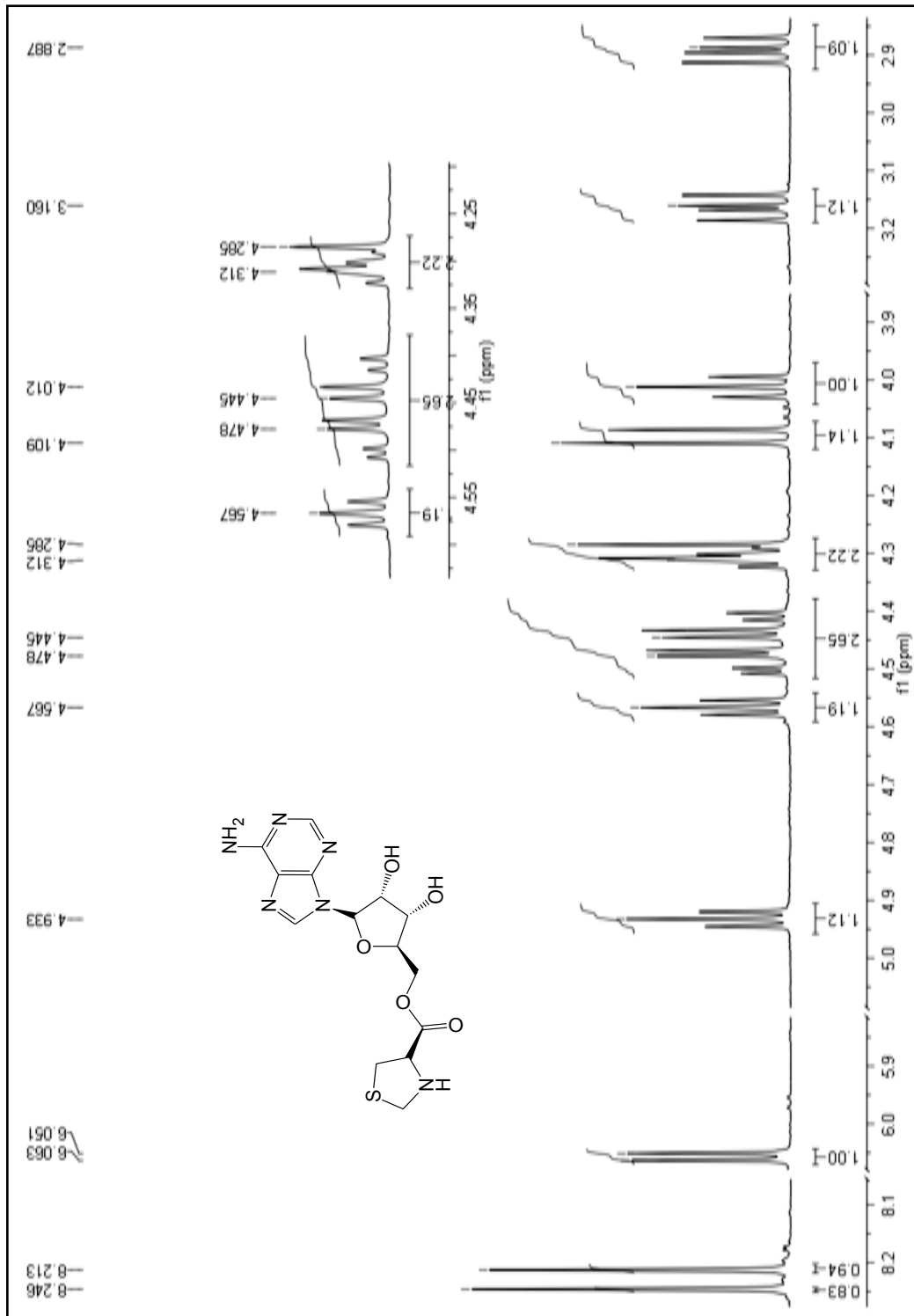


Espectro 25. IR (Película MeOH) de (*R*)-tiazolidín-4-carboxilato de adenosin-5'-ilo (**8**).

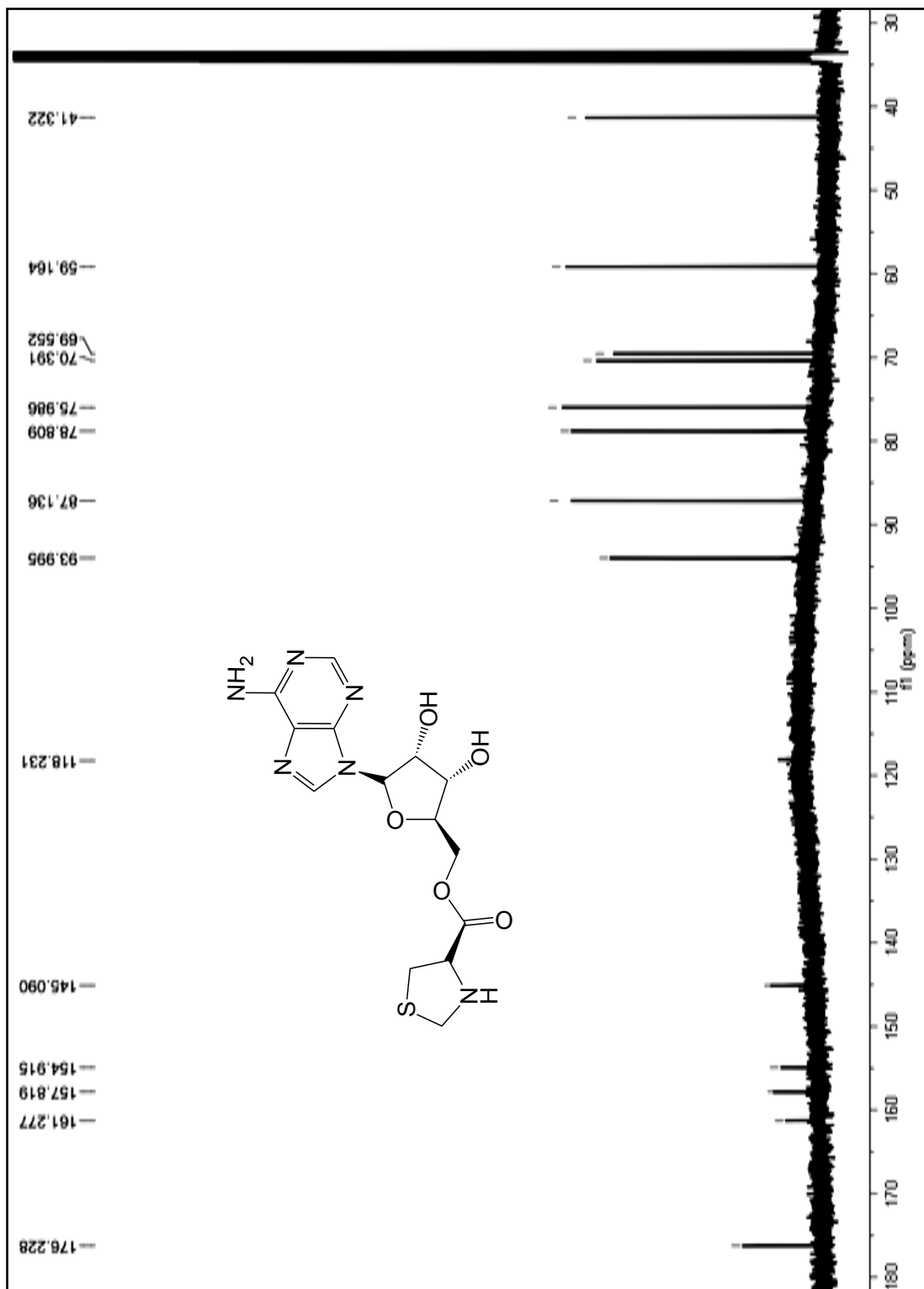
Relative Abundance



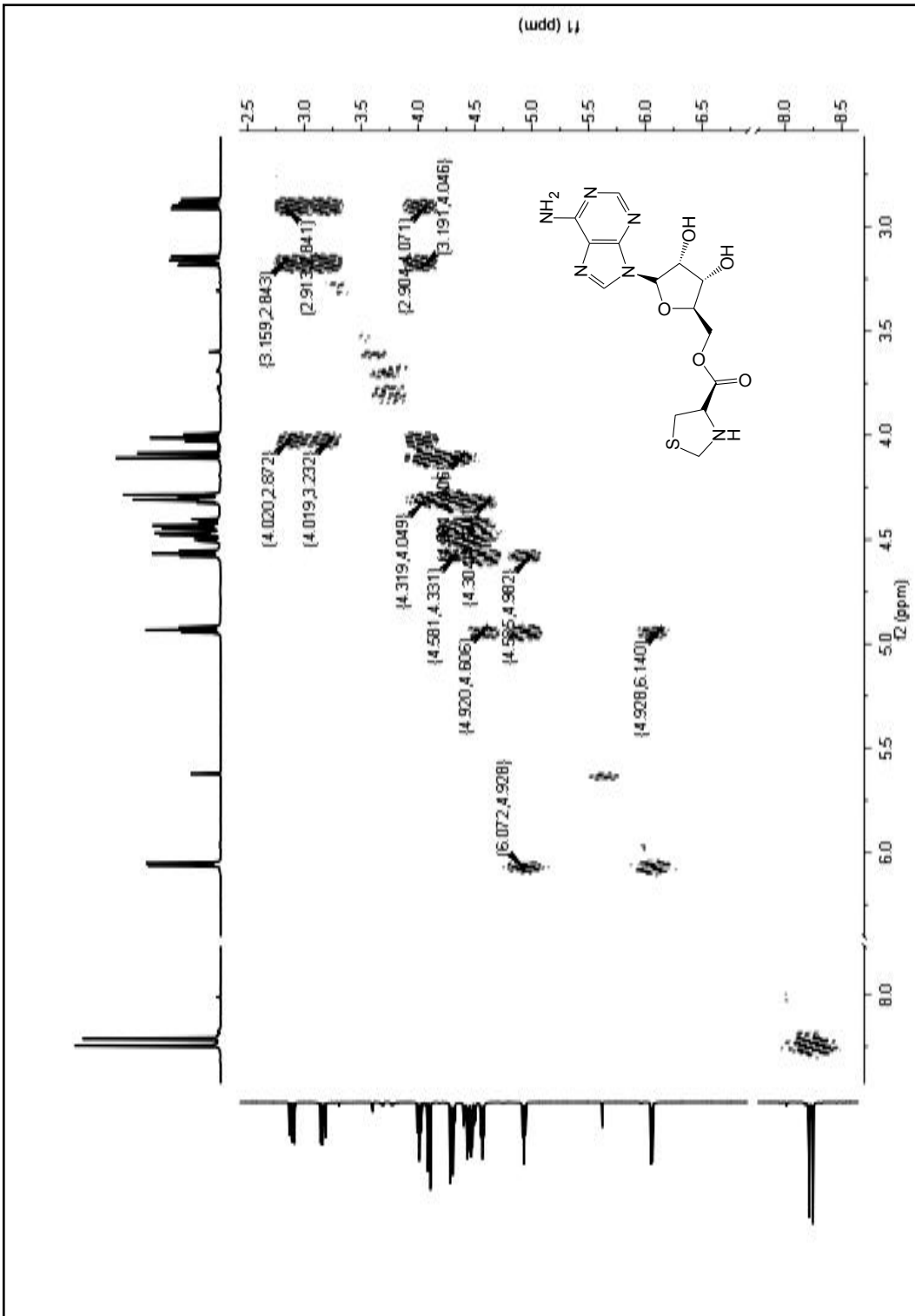
Espectro 26. EMFAB de (*R*)-tiazolidín-4-carboxilato de adenosin-5'-ilo (**8**).



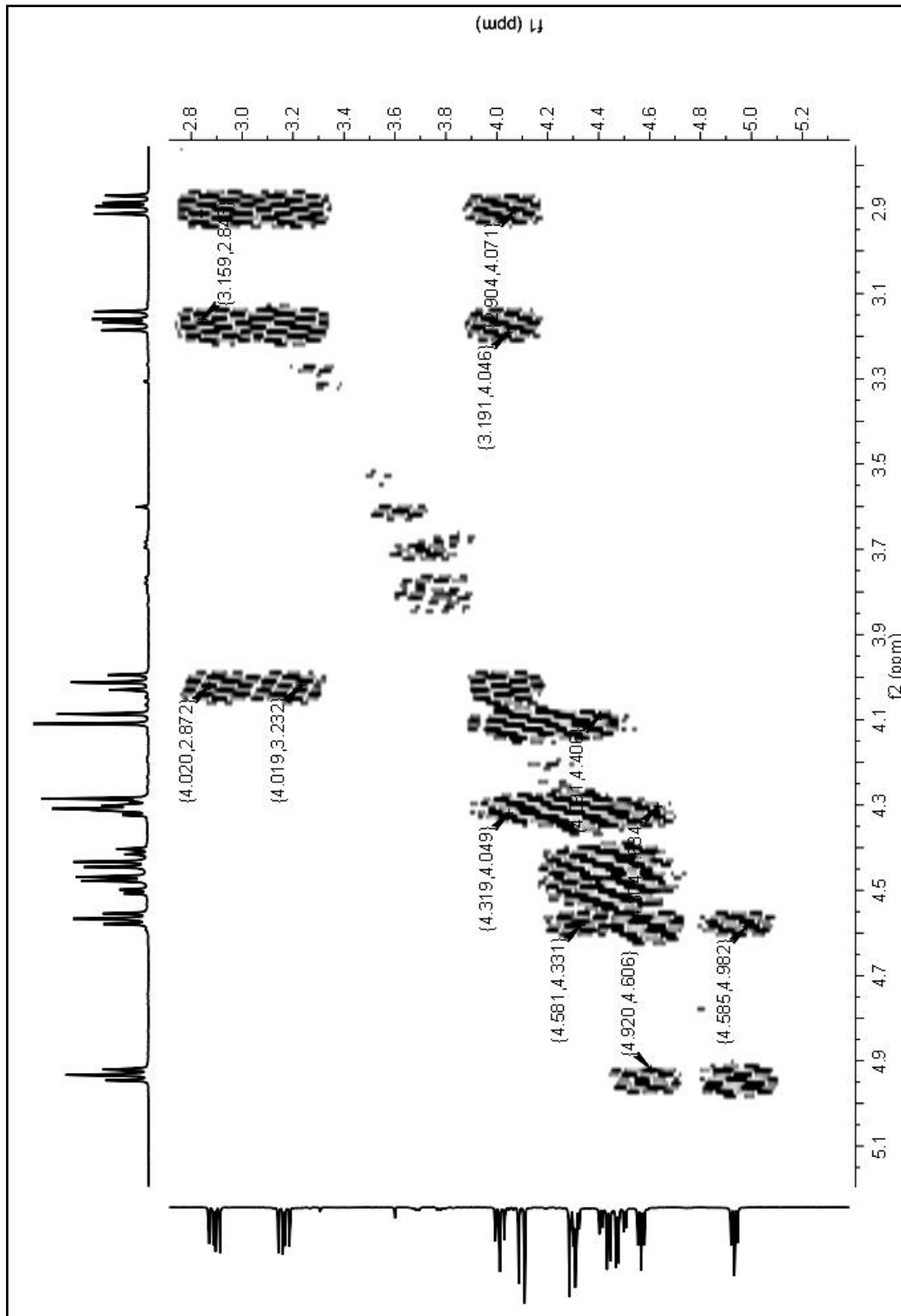
Espectro 27. RMN- ^1H (*R*)-tiazolidin-4-carboxilato de adenosin-5'-ilo (8).



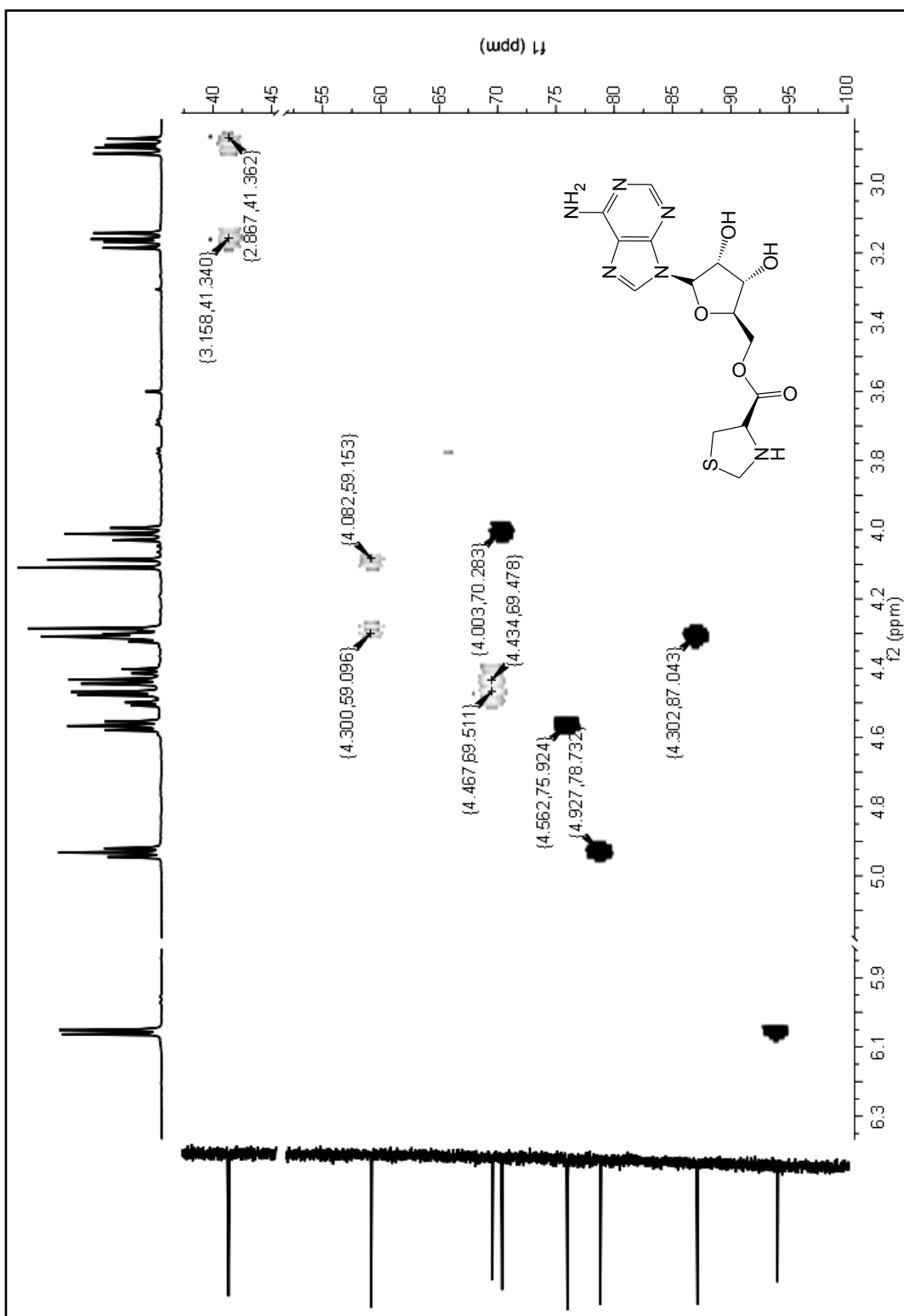
Espectro 28. RMN- ^{13}C (R)-tiazolidin-4-carboxilato de adenosin-5'-ilo (8).



Espectro 29. COSY de (R)-tiazolidin-4-carboxilato de adenosin-5'-ilo (8).

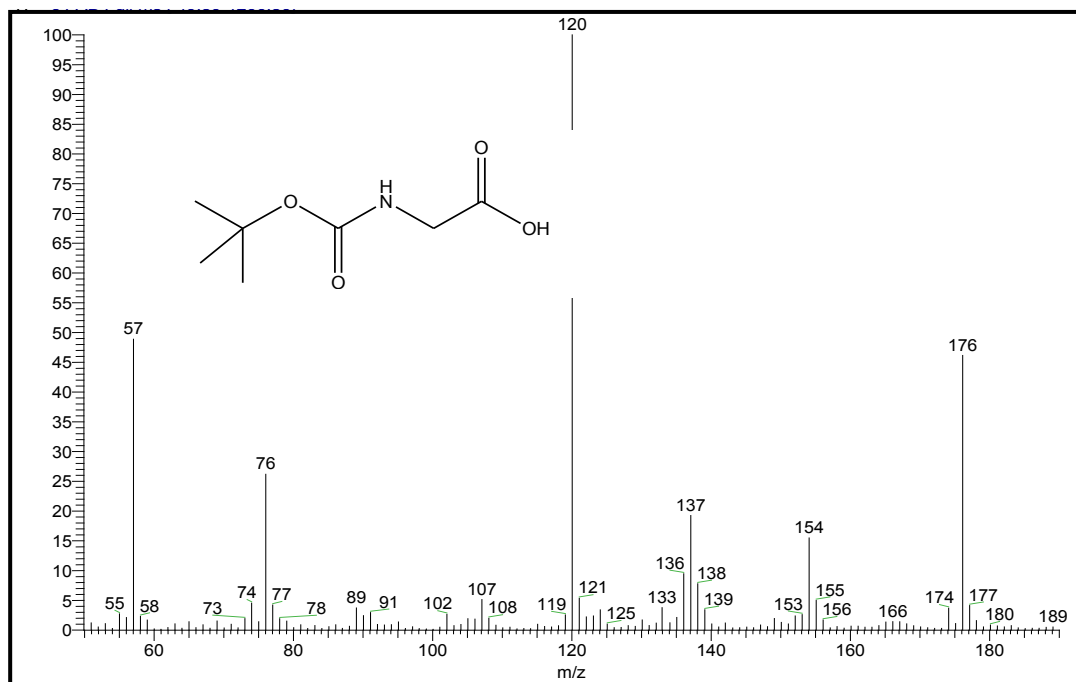


Espectro 30. COSY ampliado de (*R*)-tiazolidín-4-carboxilato de adenosin-5'-ilo (**8**).

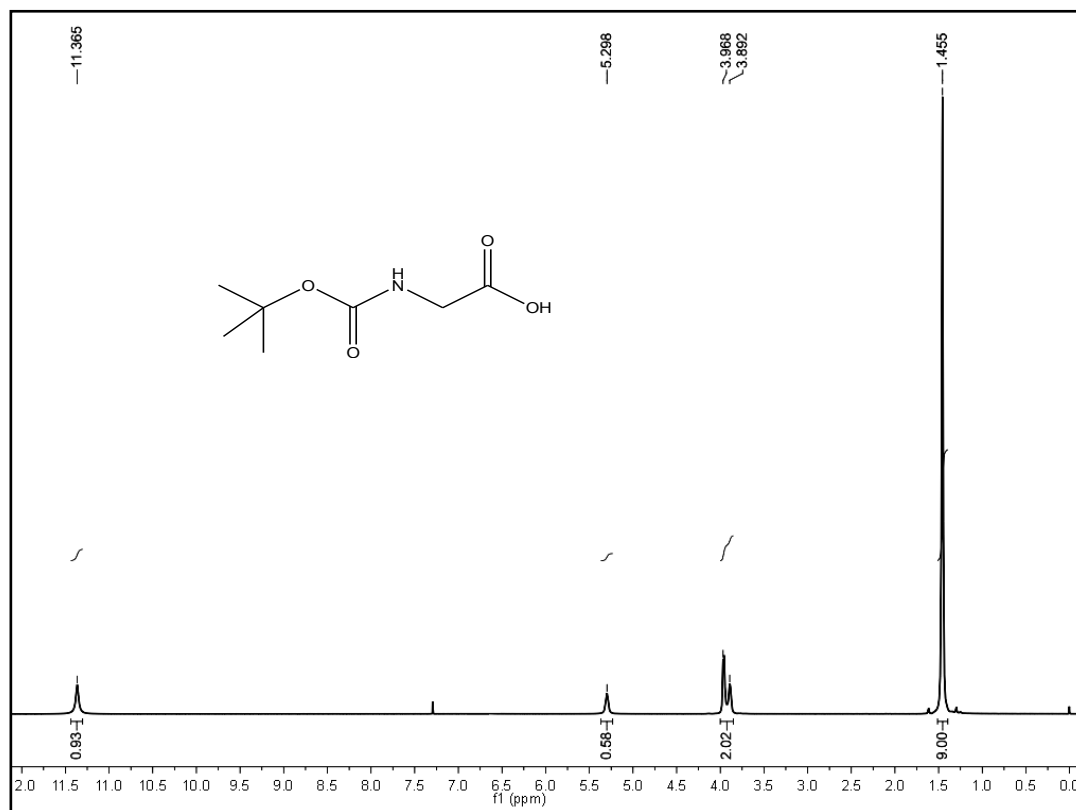


Espectro 31. HSQC editado de de (R)-tiazolidin-4-carboxilato de adenosin-5'-ilo (8).

Relative Abundance

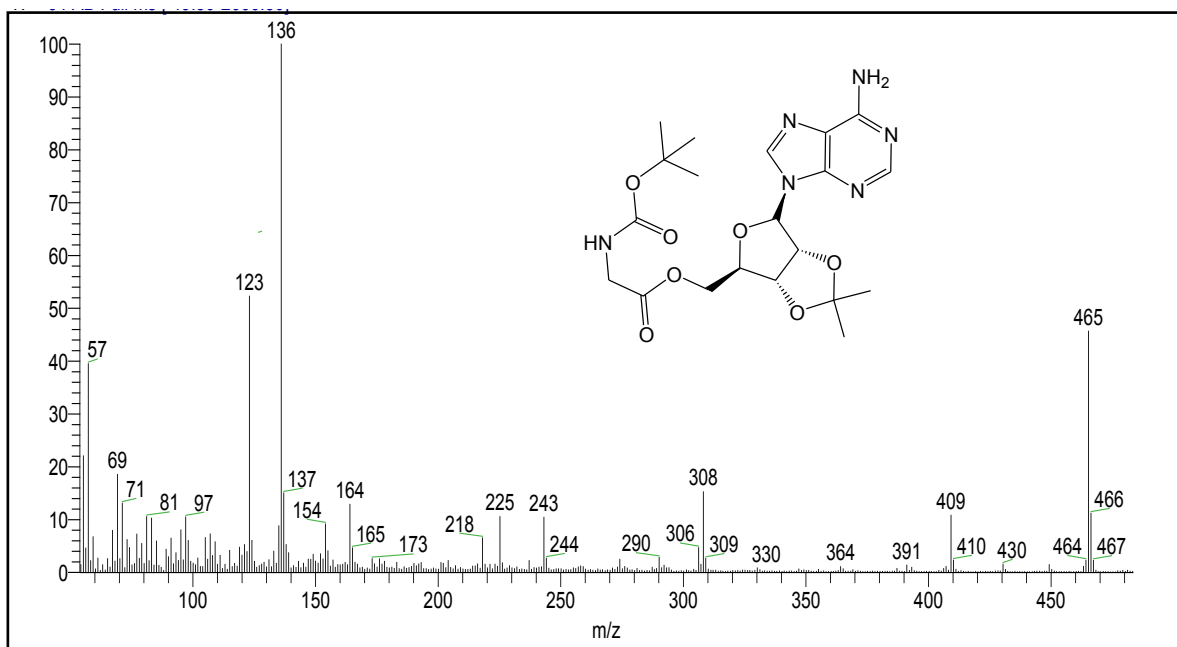


Espectro 32. EMFAB de *N*-tert-butoxicarbonilglicina (10).

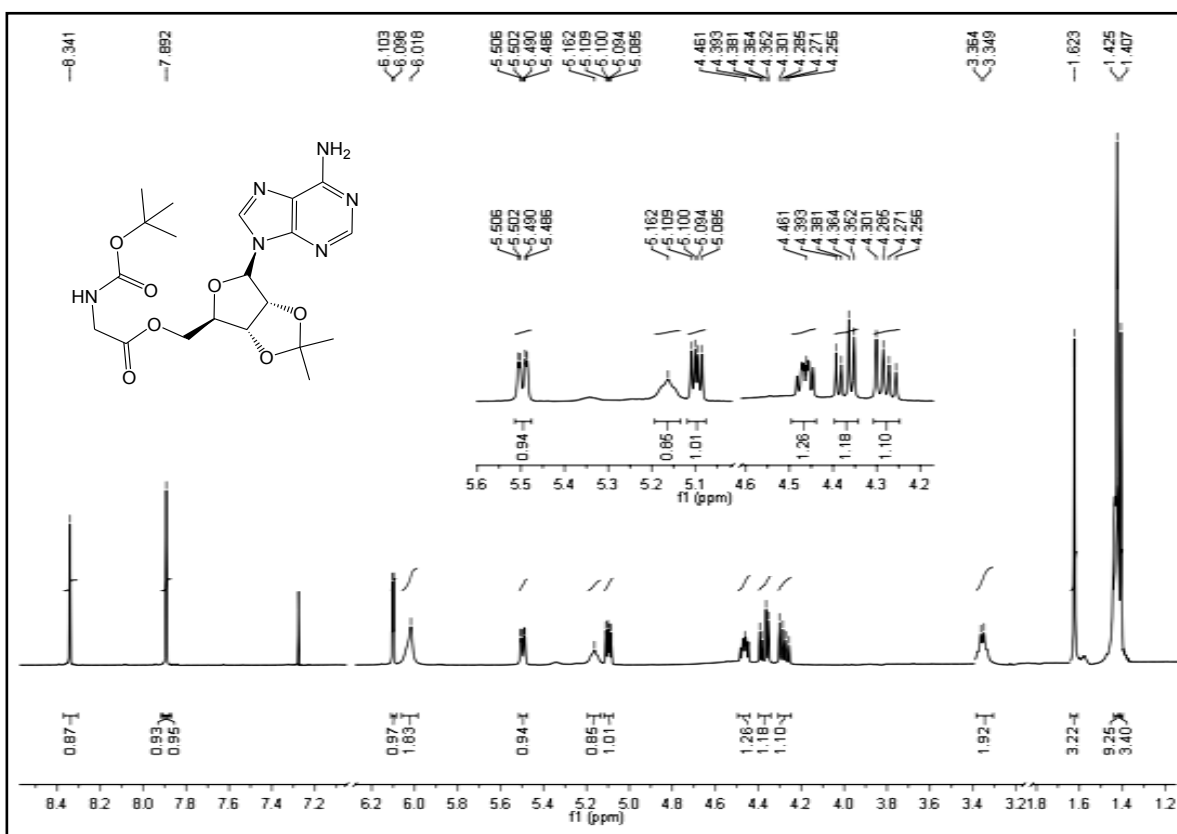


Espectro 33. RMN-¹H de *N*-tert-butoxicarbonilglicina (10).

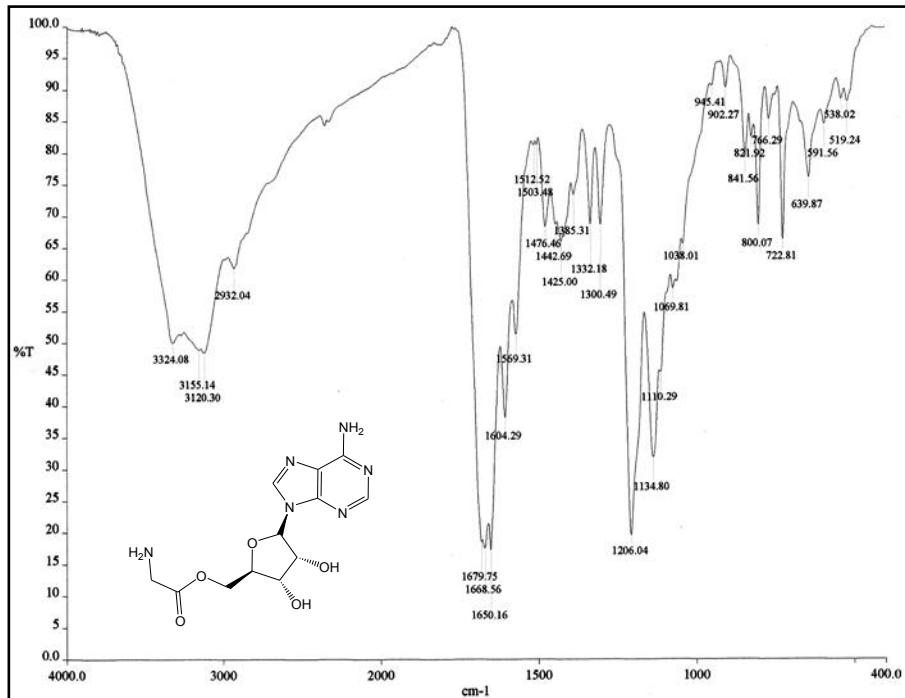
Relative Abundance



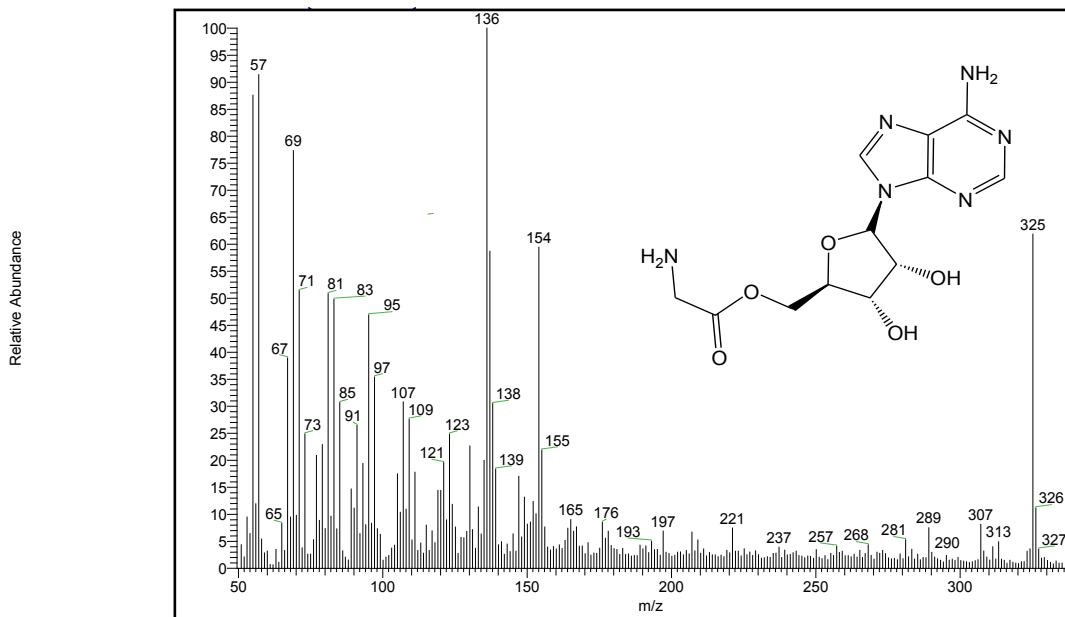
Espectro 34. EMFAB de *N*-*tert*butoxycarbonilglicinato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**11**).



Espectro 35. RMN-¹H de *N*-*tert*butoxycarbonilglicinato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**11**).



Espectro 36. IR (Película MeOH) de glicinato de adenosin-5'-ilo (12).



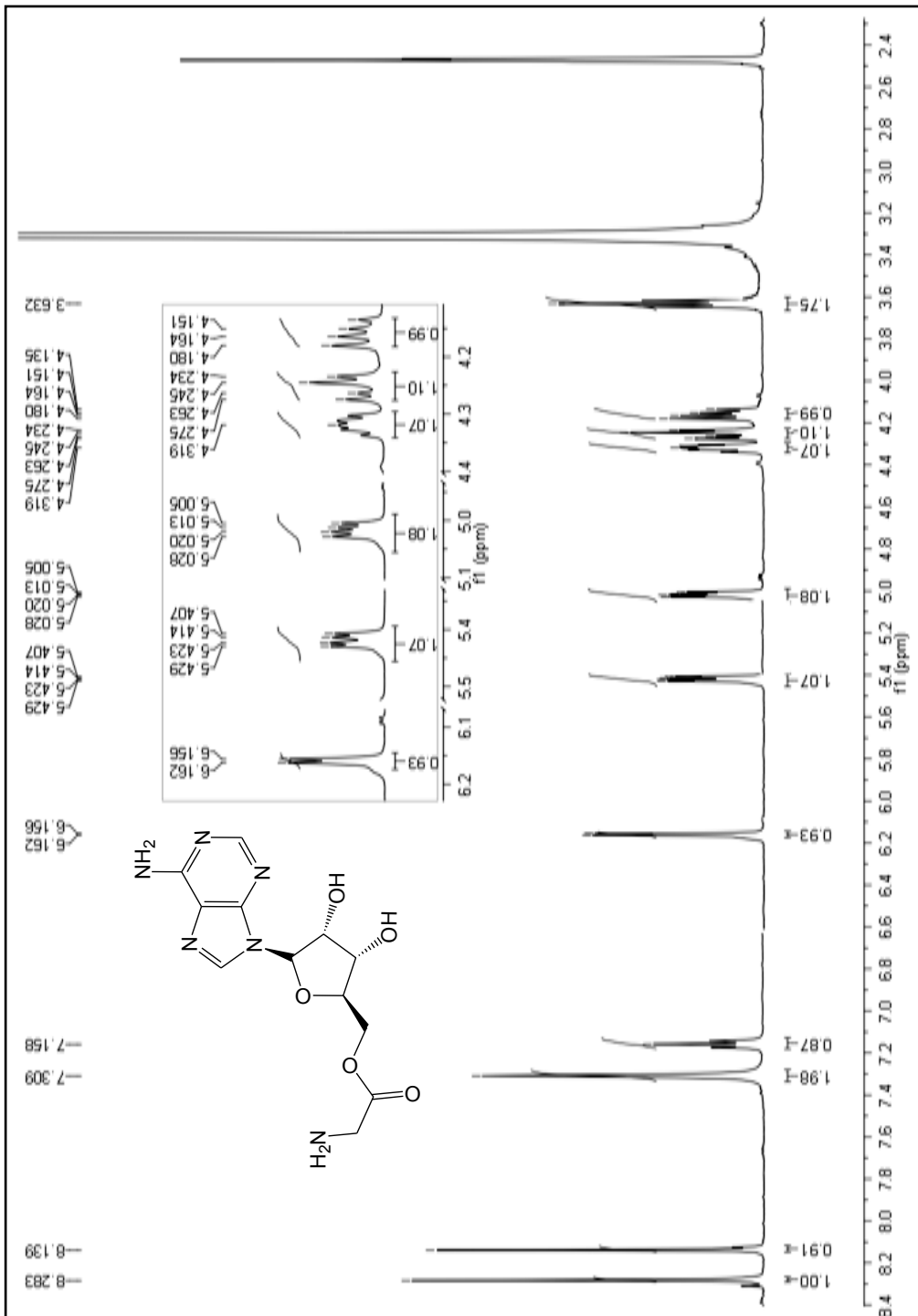
Espectro 37. EMFAB de glicinato de adenosin-5'-ilo (12).

Elemental composition search on mass 325.13

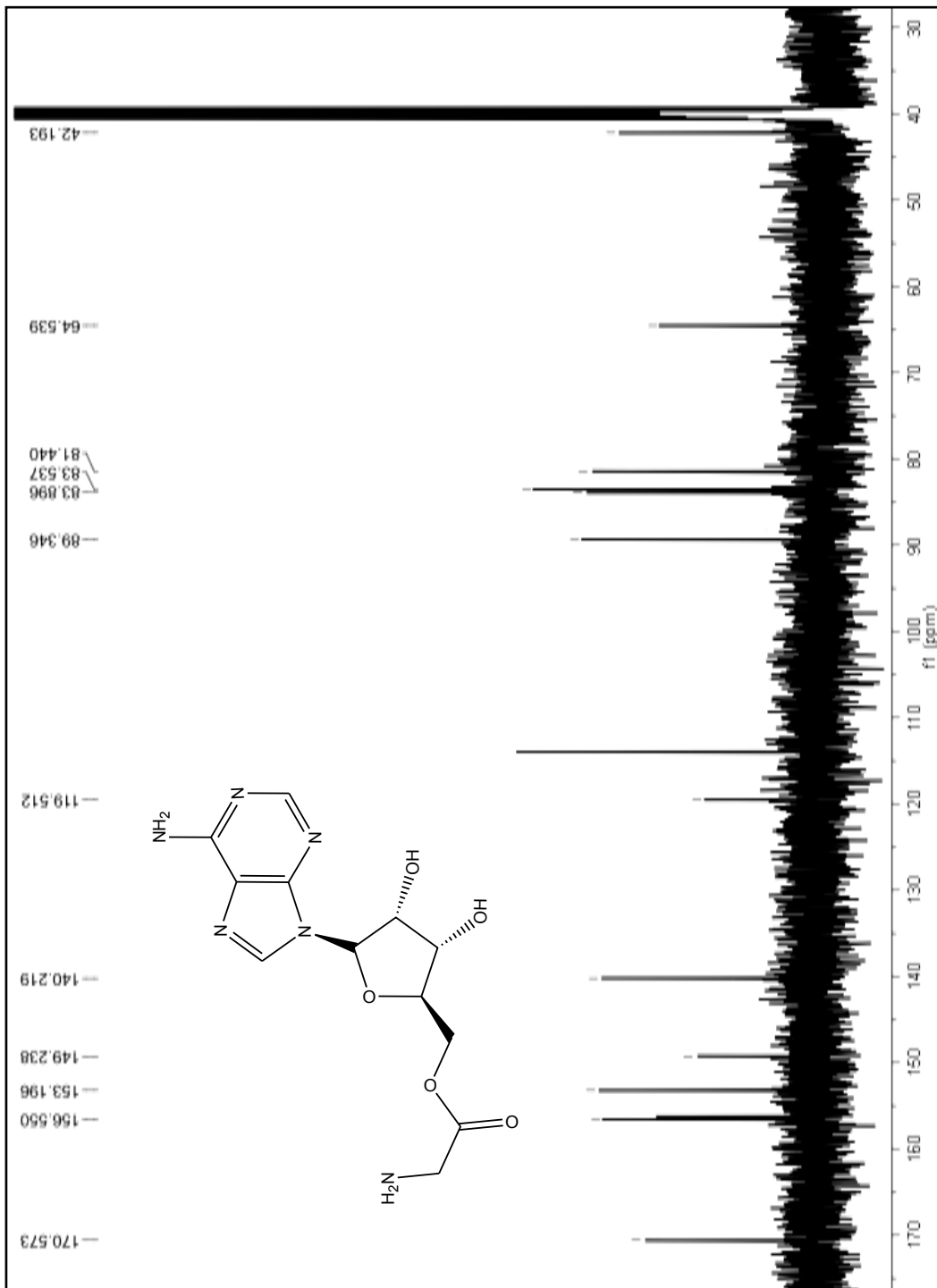
m/z= 320.13-330.13

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
325.1254	325.1255	-0.29	7.5	C ₁₂ H ₁₇ O ₅ N ₆

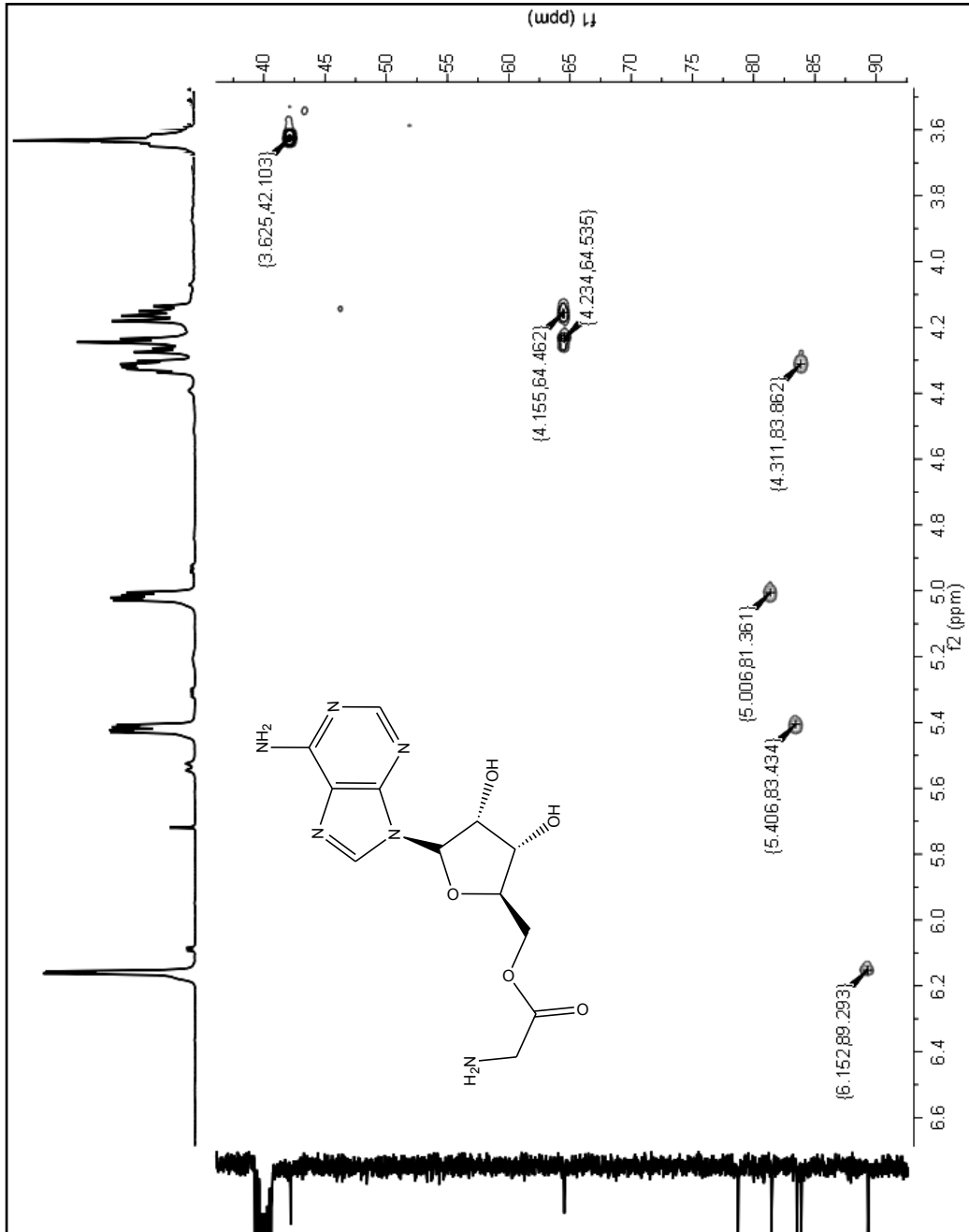
Espectro 38. HR-FAB glicinato de adenosin-5'-ilo (12).



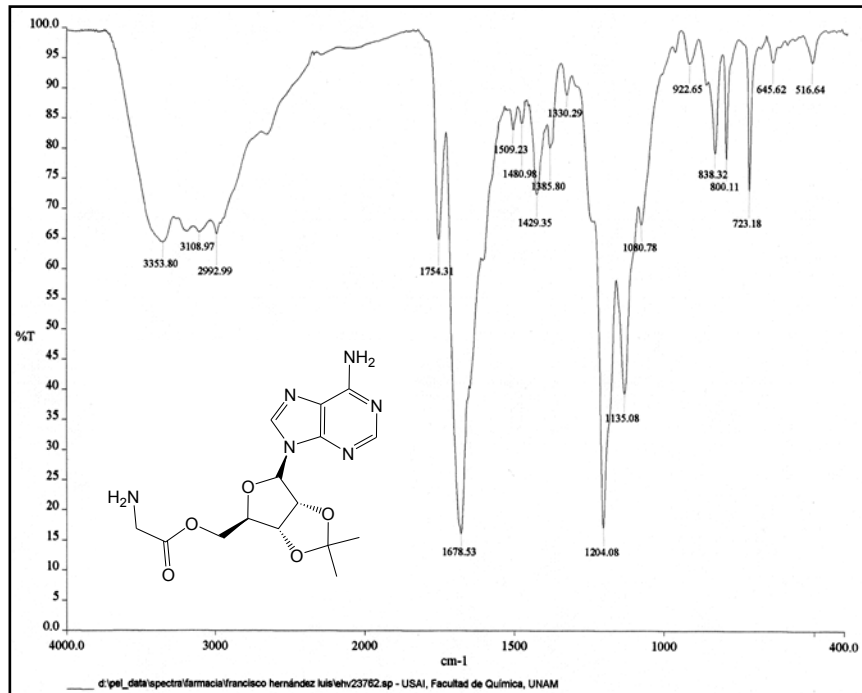
Espectro 39. RMN- ^1H de glicinato de adenosin-5'-ilo (12).



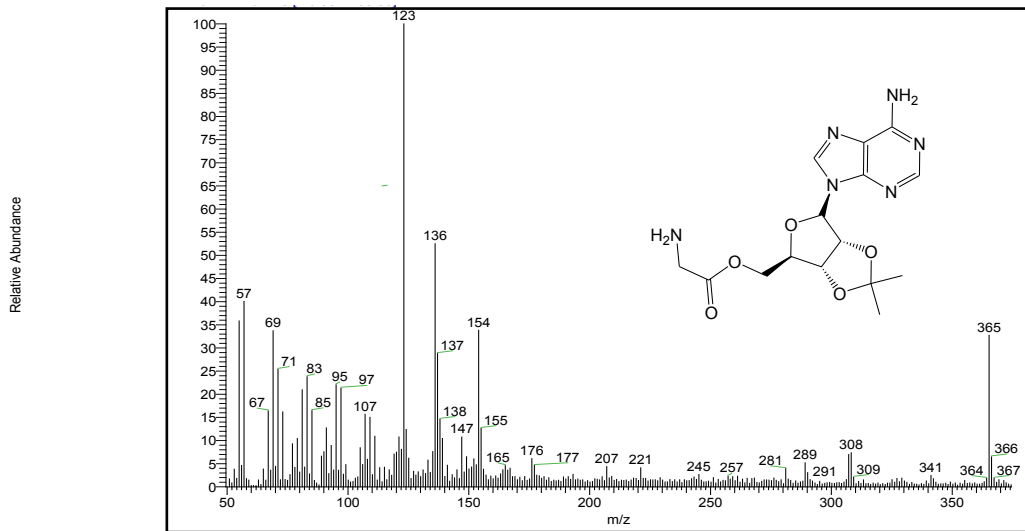
Espectro 40. RMN-¹³C de glicinato de adenosin-5'-ilo (12).



Espectro 41. HSQC editado de glicinato de adenosin-5'-ilo (12).



Espectro 42. IR (Película MeOH) de glicinato de 2'-3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**13**).



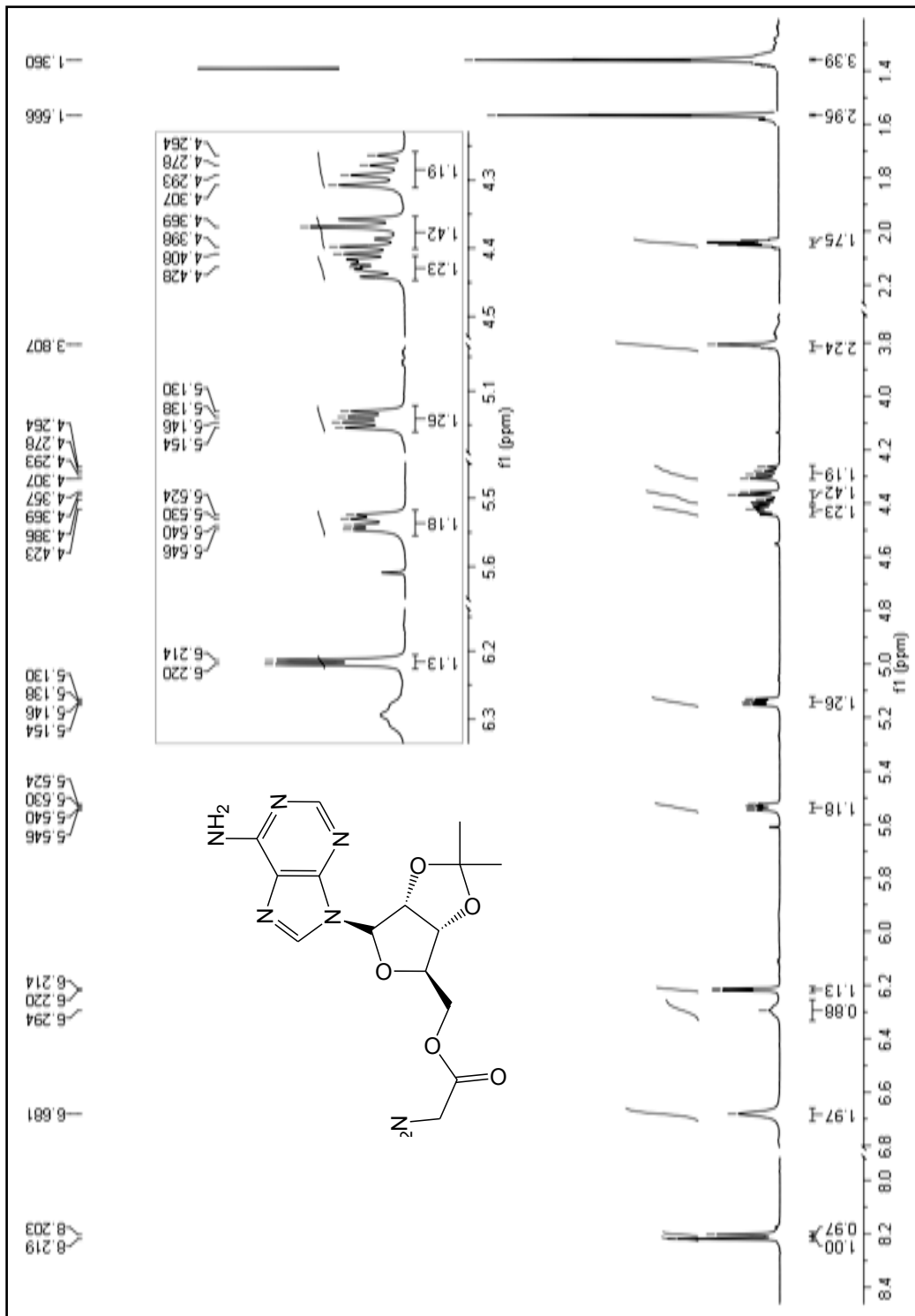
Espectro 43. EMFAB de glicinato de 2'-3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**13**).

Elemental composition search on mass 365.16

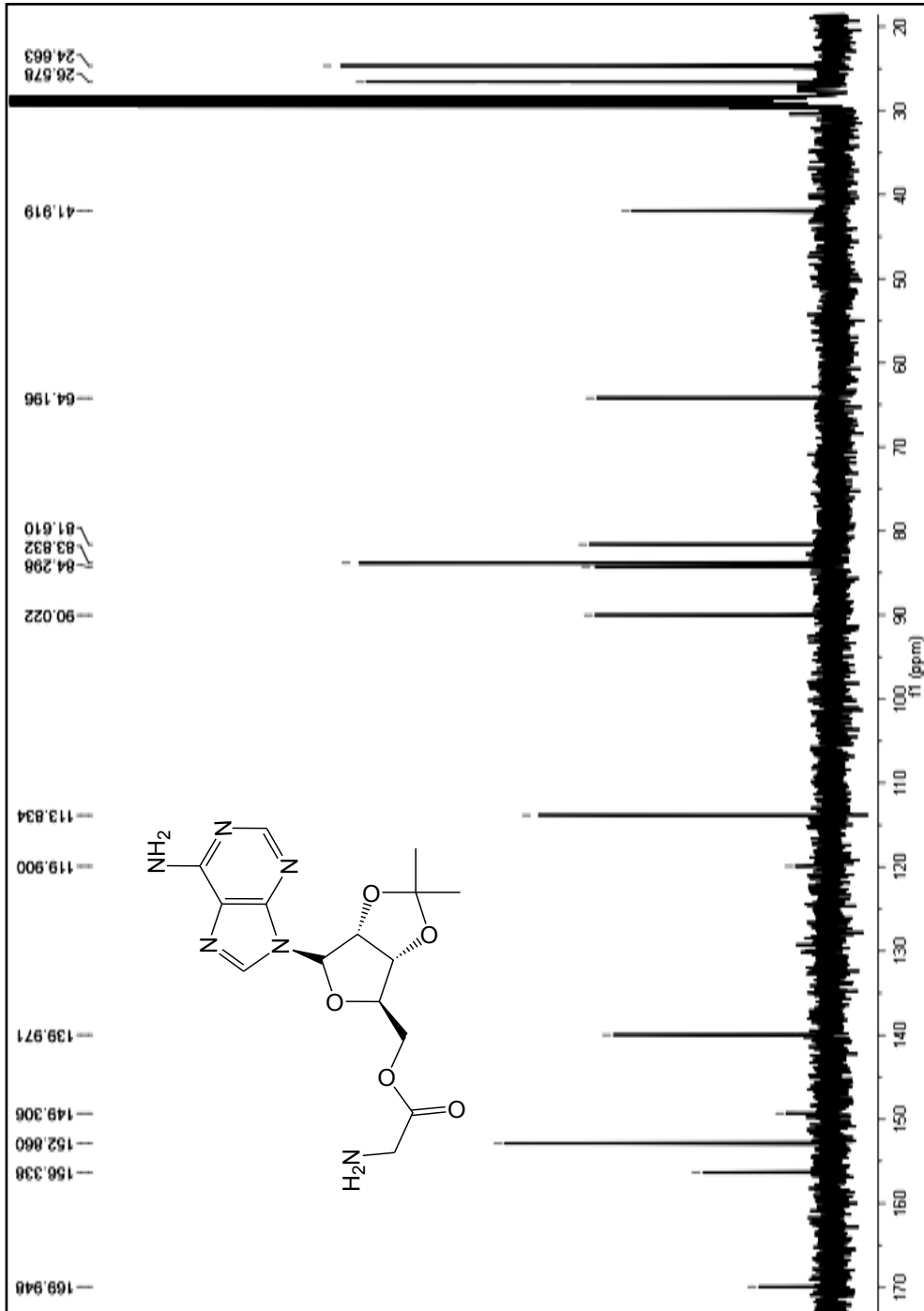
m/z = 360.16-370.16

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
365.1558	365.1568	-0.99	8.5	C ₁₅ H ₂₁ O ₅ N ₆

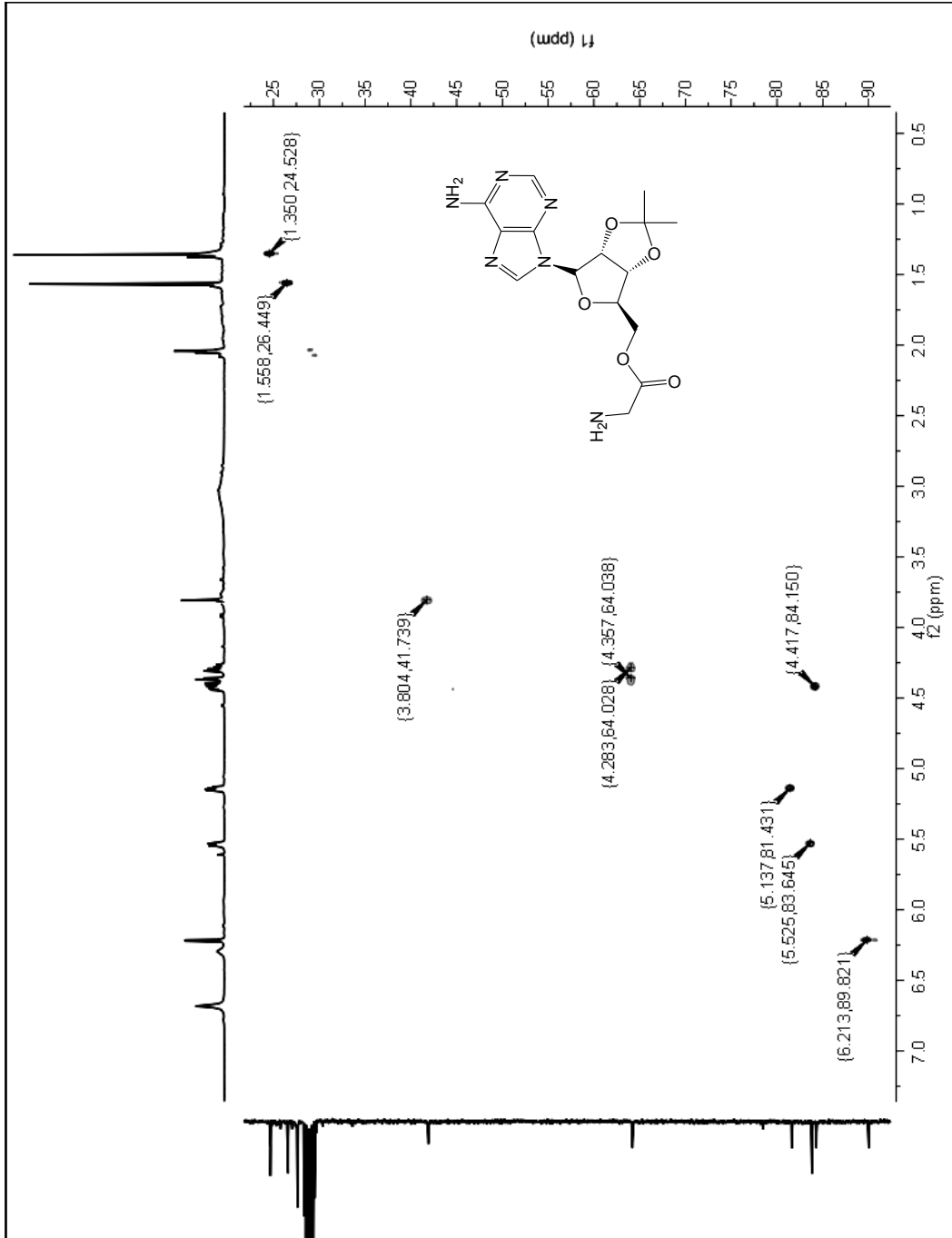
Espectro 44. HR-FAB de glicinato de 2'-3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**13**).



Espectro 45. RMN- ^1H de glicinato de 2'-3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (13).

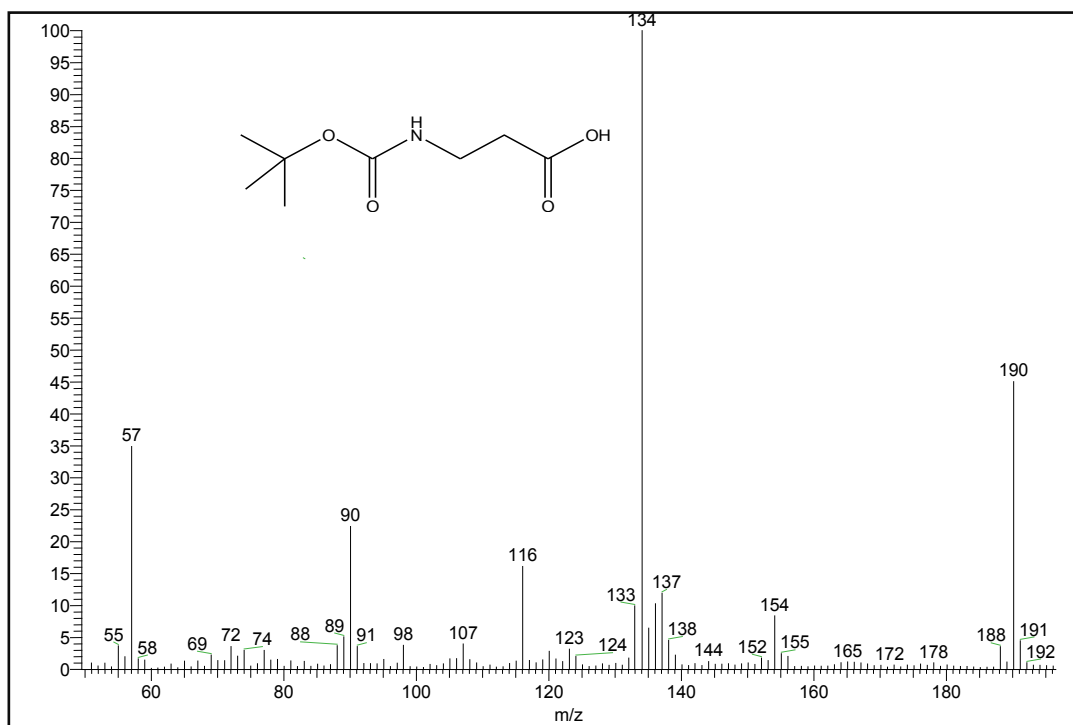


Espectro 46. RMN- ^{13}C de glicinato de 2'-3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (13).

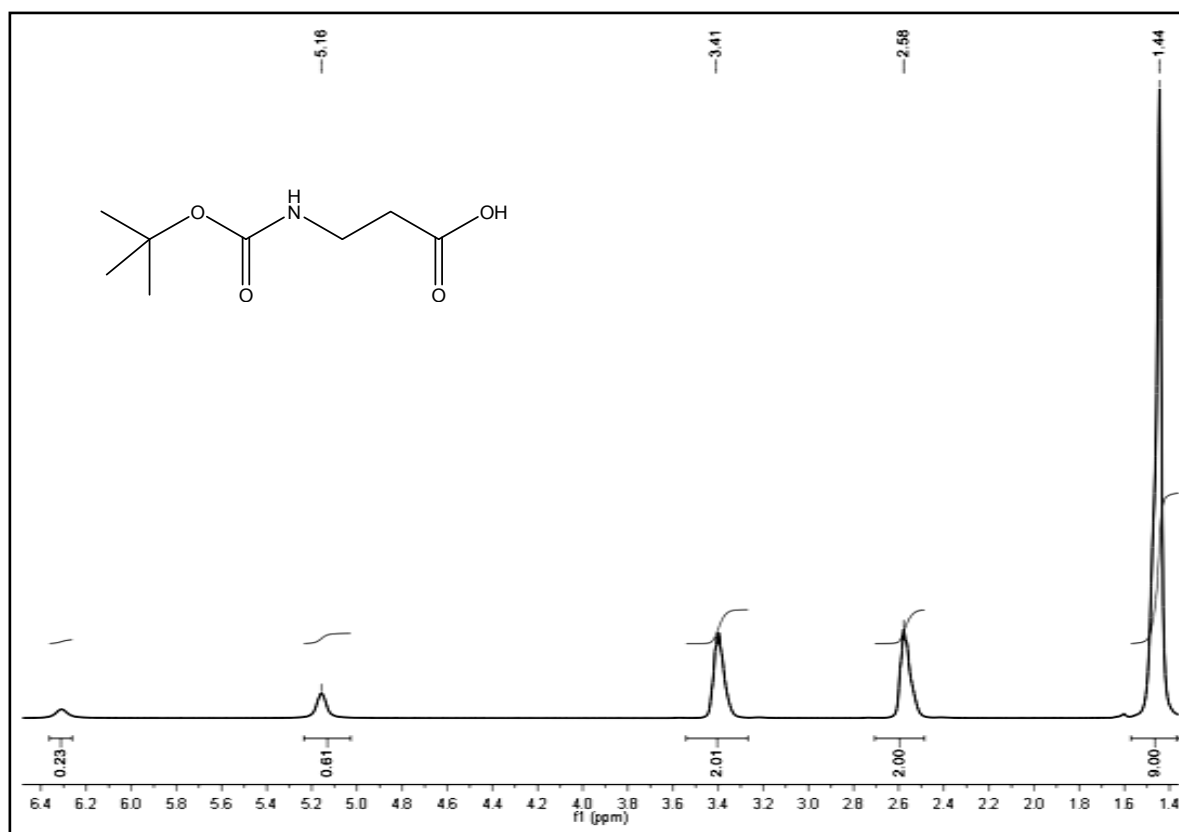


Espectro 47. HSQC editado de glicinato de 2'-3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**13**).

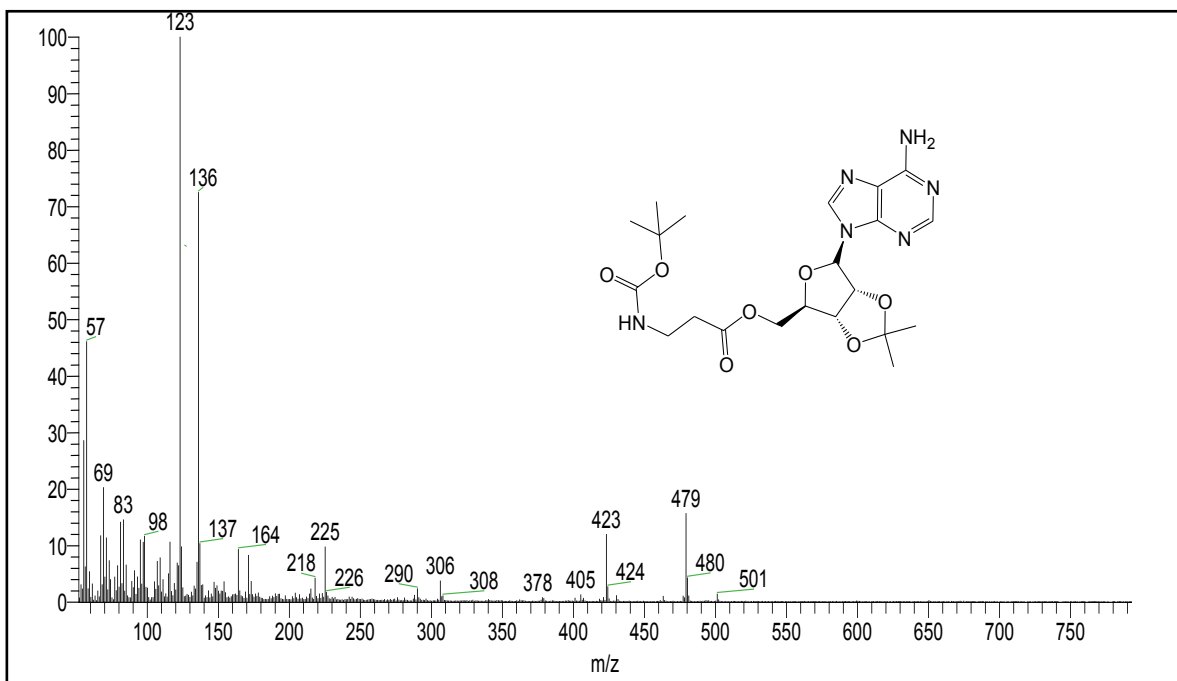
Relative Abundance



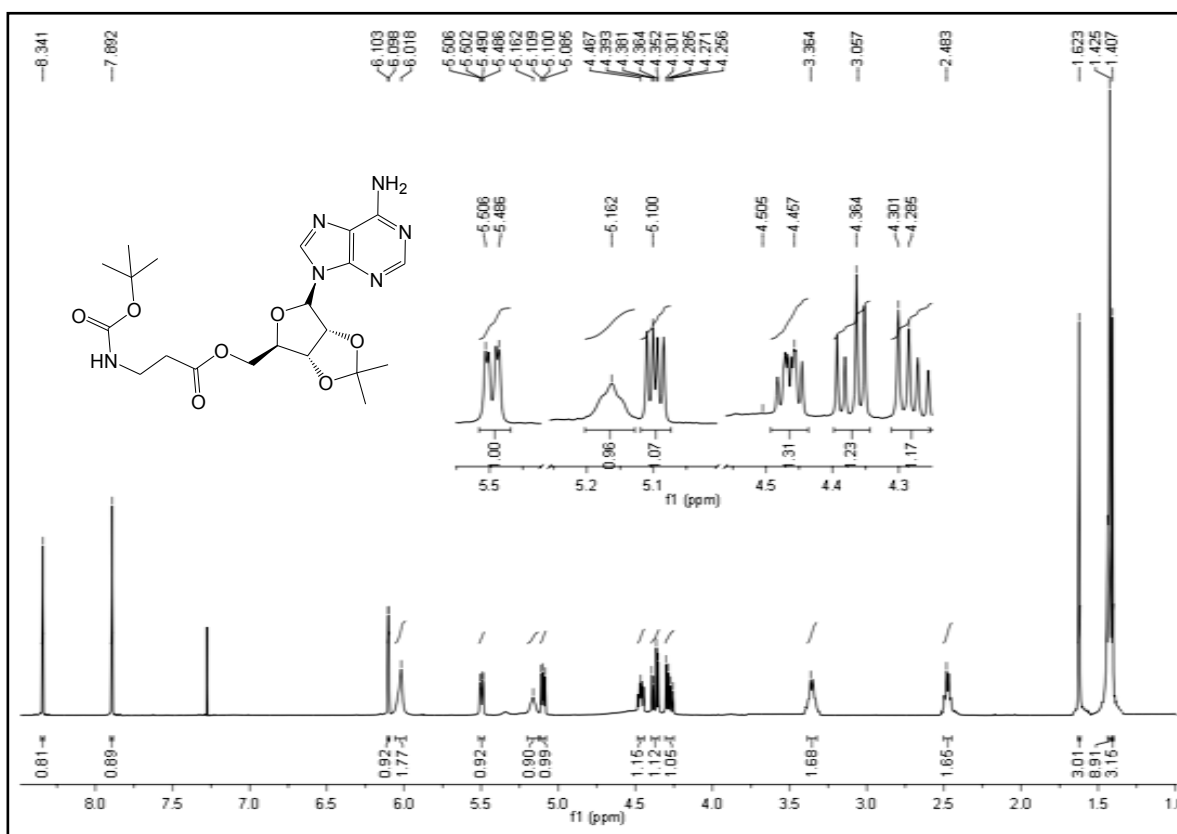
Espectro 48. EMFAB de ácido *N*-tertbutoxicarbonilpropanoico (14).



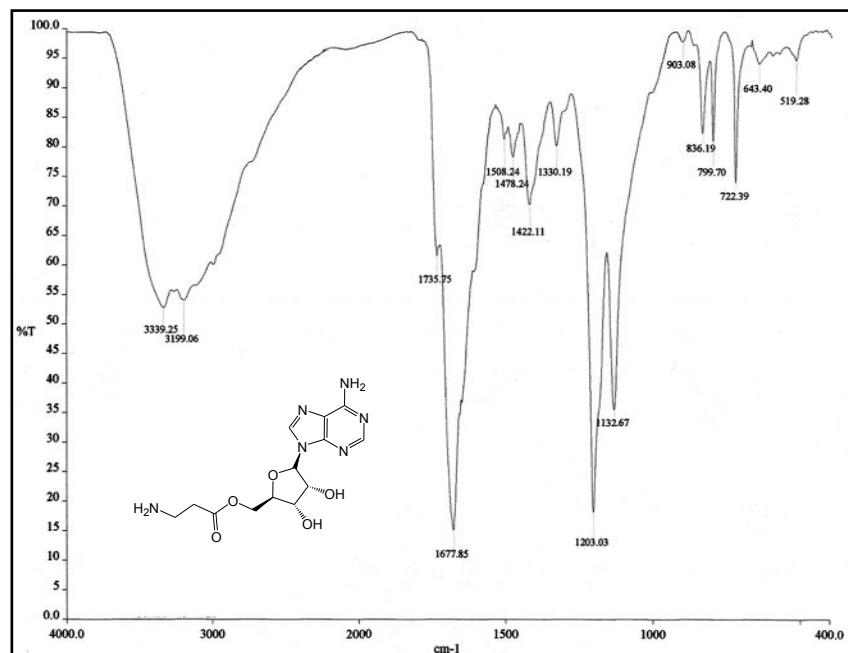
Espectro 49. RMN-¹H de ácido *N*-tertbutoxicarbonilpropanoico (14).



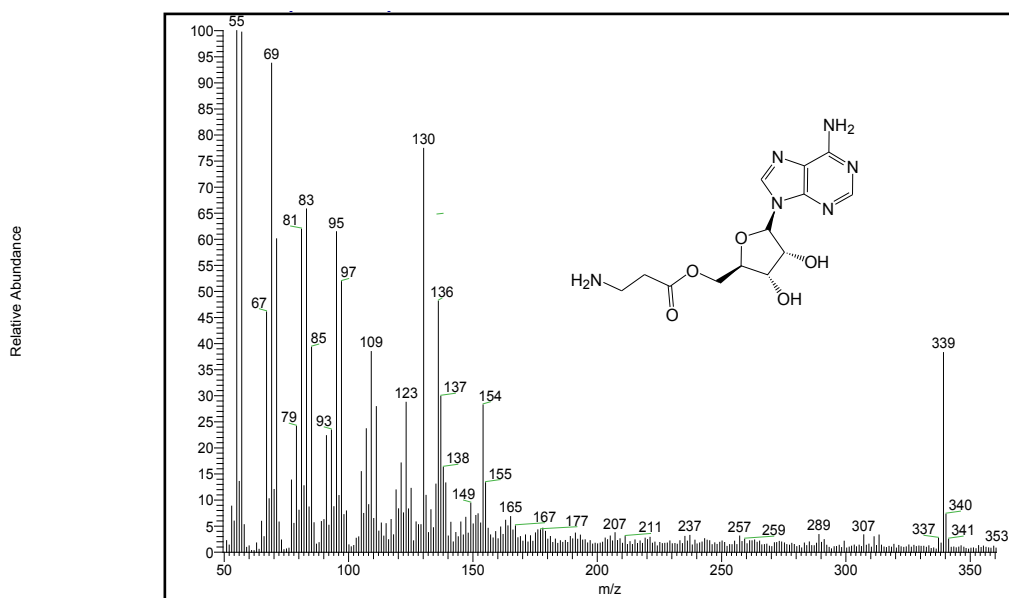
Espectro 50. EMFAB de *N*-Boc-3-aminopropanoato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**15**).



Espectro 51. RMN-¹H *N*-Boc-3-aminopropanoato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**15**).



Espectro 52. IR (Película MeOH) de 3-aminopropanoato de adenosin-5'-ilo (**16**).



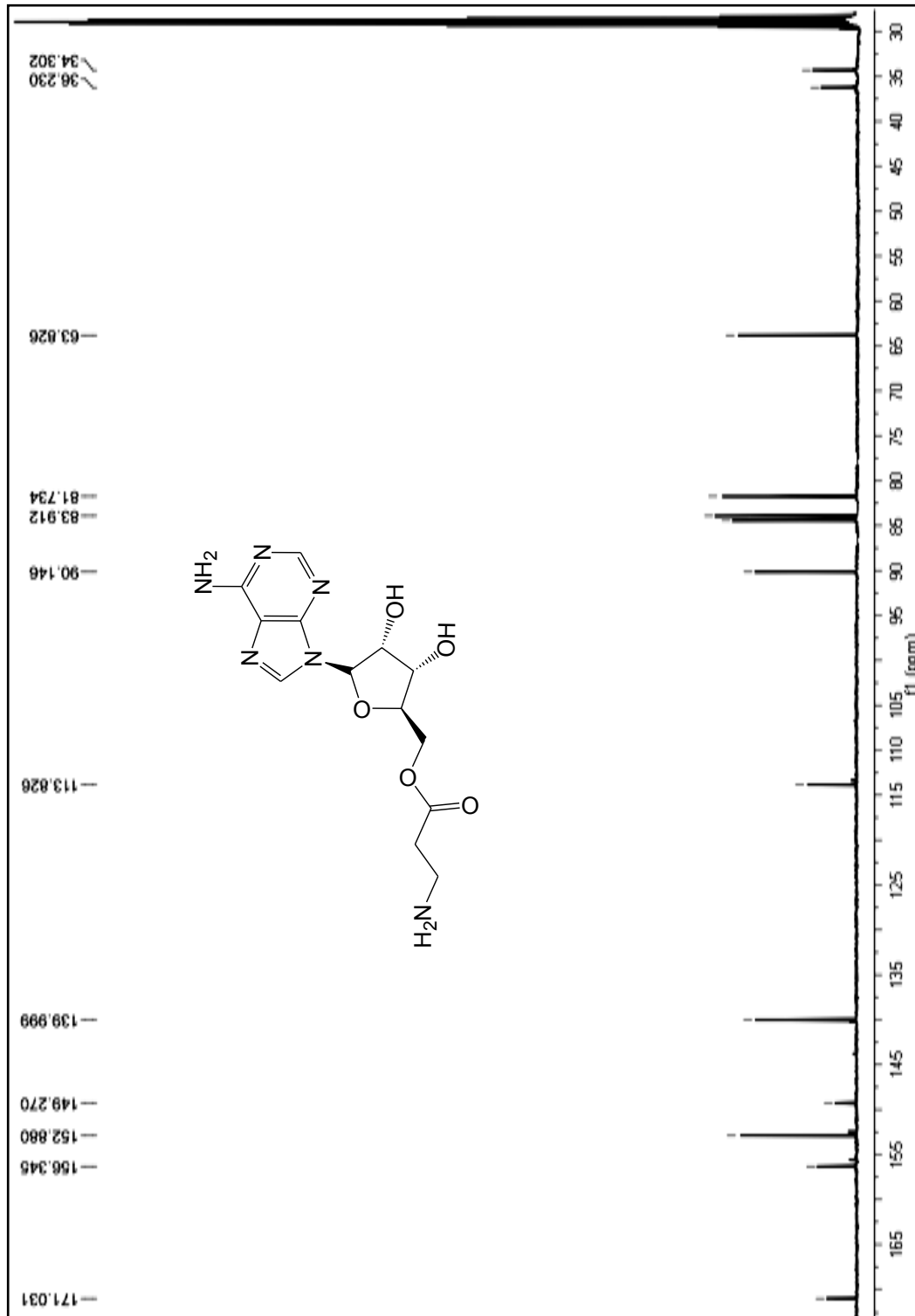
Espectro 53. EMFAB de 3-aminopropanoato de adenosin-5'-ilo (**16**).

Elemental composition search on mass 339.14

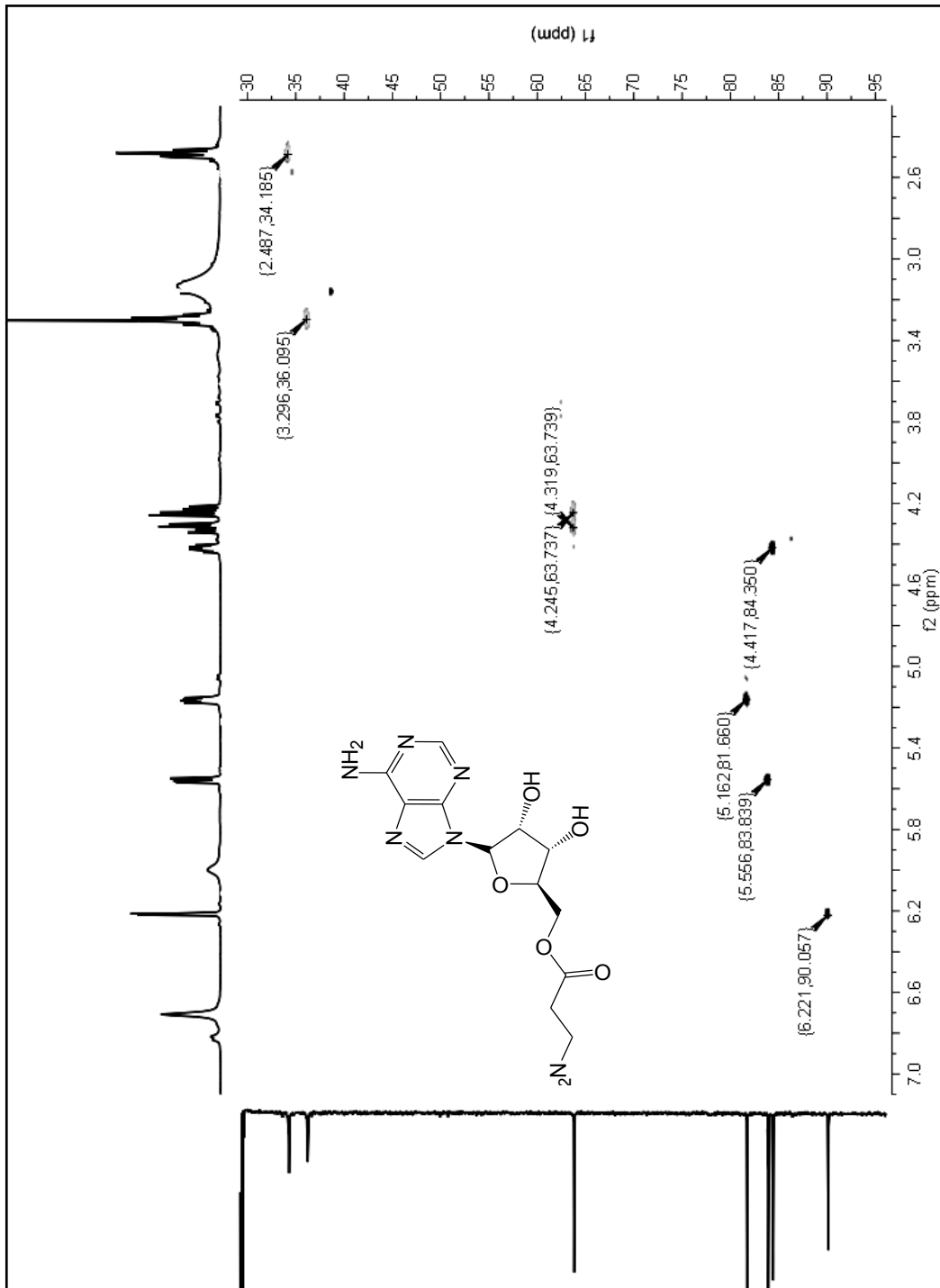
m/z= 334.14-344.14

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
339.1439	339.1411	8.12	7.5	C ₁₃ H ₁₉ O ₅ N ₆

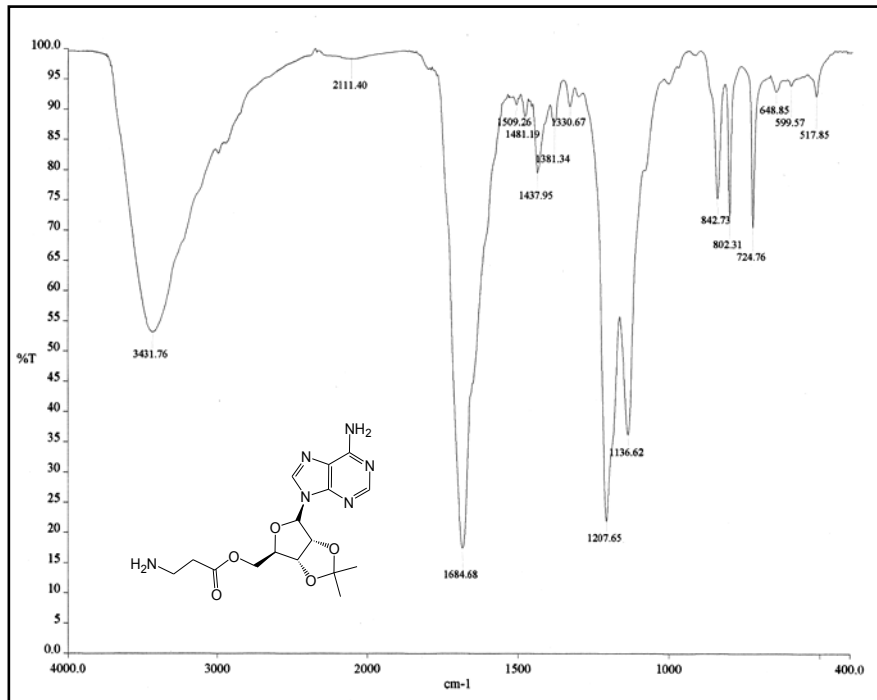
Espectro 54. HR-FAB de 3-aminopropanoato de adenosin-5'-ilo (**16**).



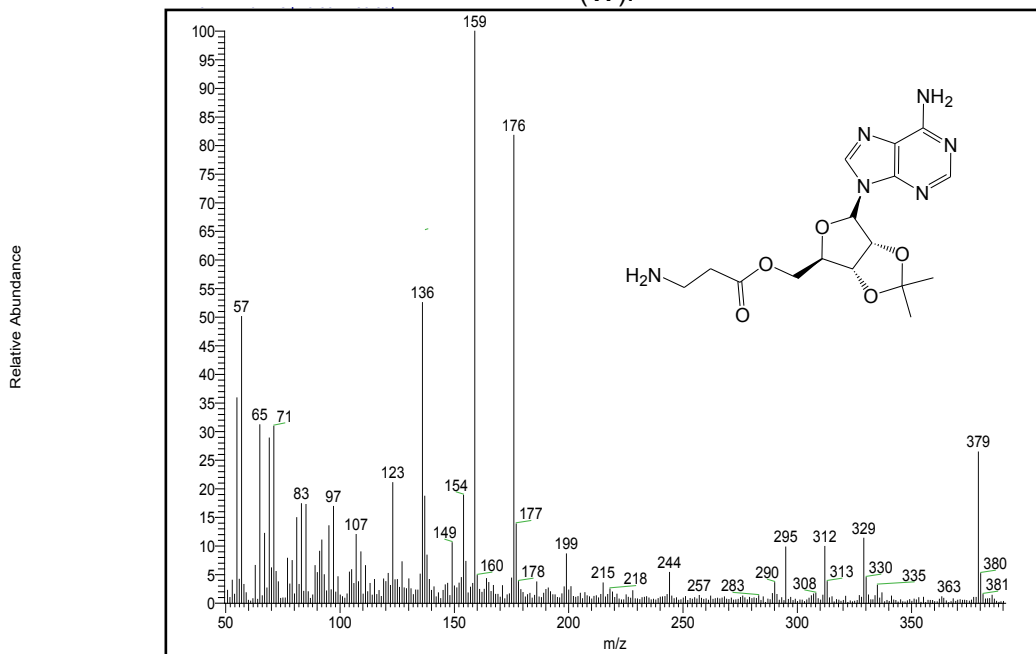
Espectro 56. RMN- ^{13}C de 3-aminopropanoato de adenosin-5'-ilo (16).



Espectro 57. HSQC editado de 3-aminopropanoato de adenosin-5'-ilo (16).



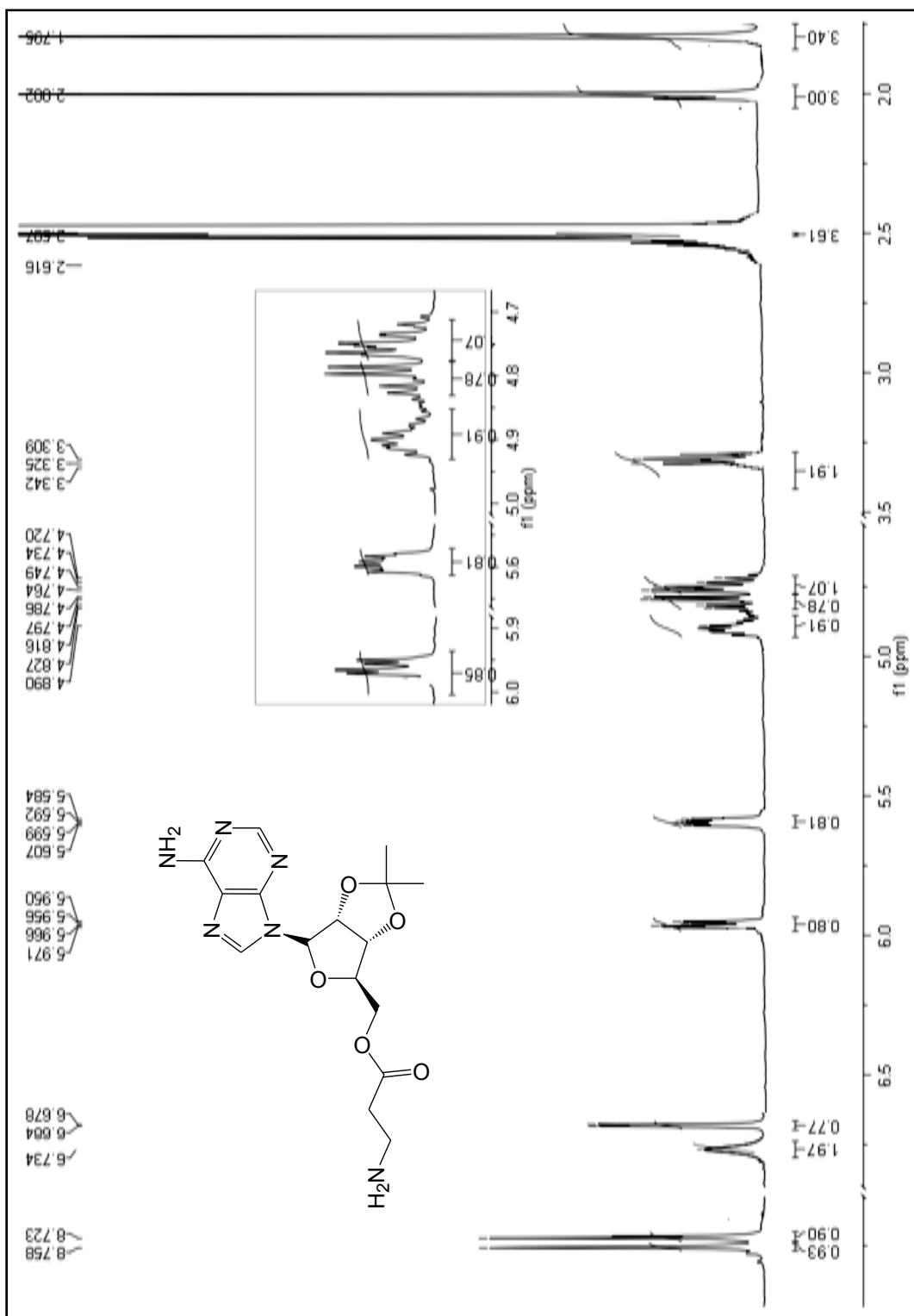
Espectro 58. IR (Película MeOH) de 3-aminopropanoato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (17).



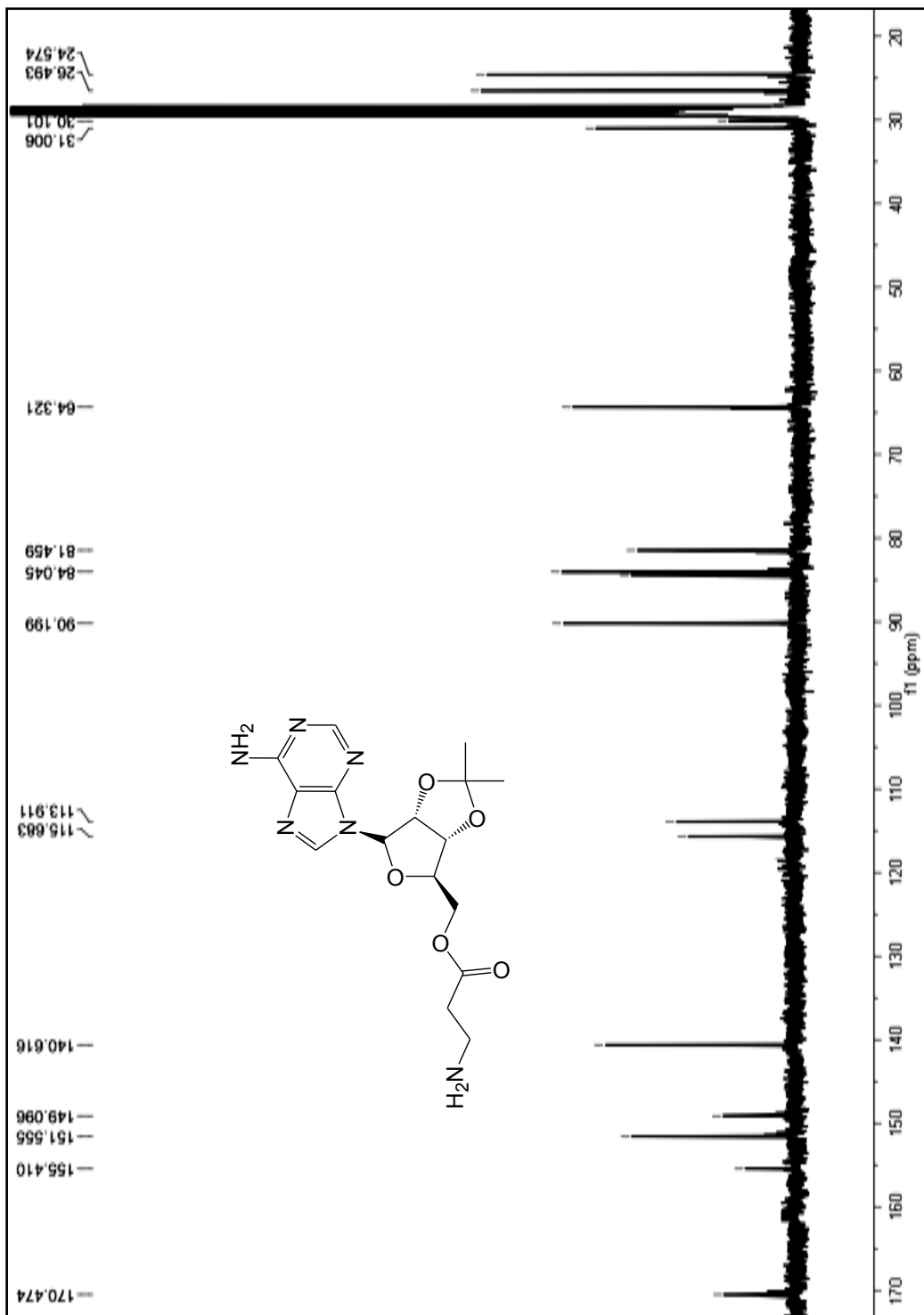
Espectro 59. EMFAB de 3-aminopropanoato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (17).

m/z	Theo. Mass	Delta (mmu)	RDB equiv.	Composition
379.2468	379.1724	74.36	8.5	C ₁₆ H ₂₃ O ₅ N ₆

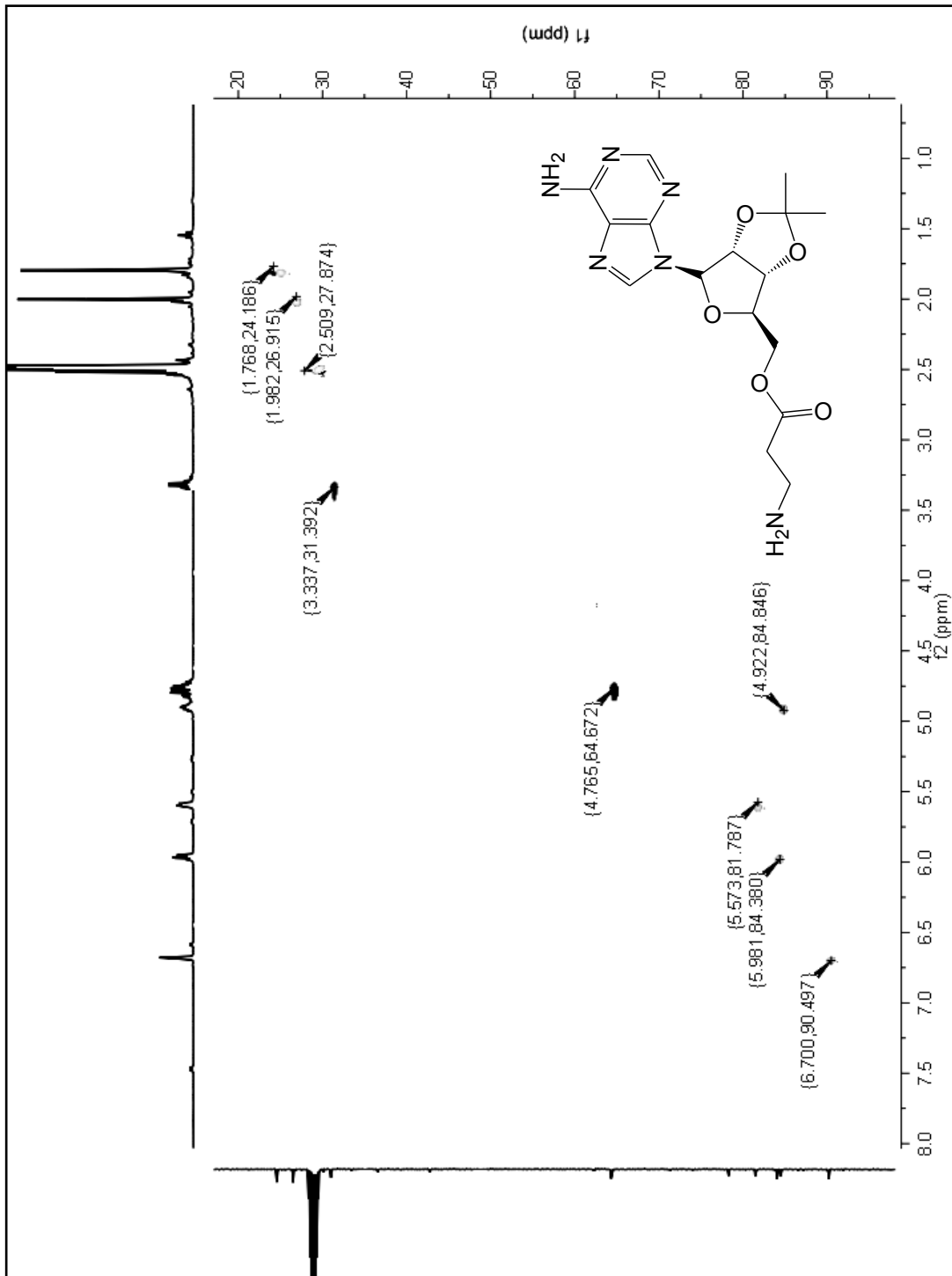
Espectro 60. HRFAB de 3-aminopropanoato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (17).



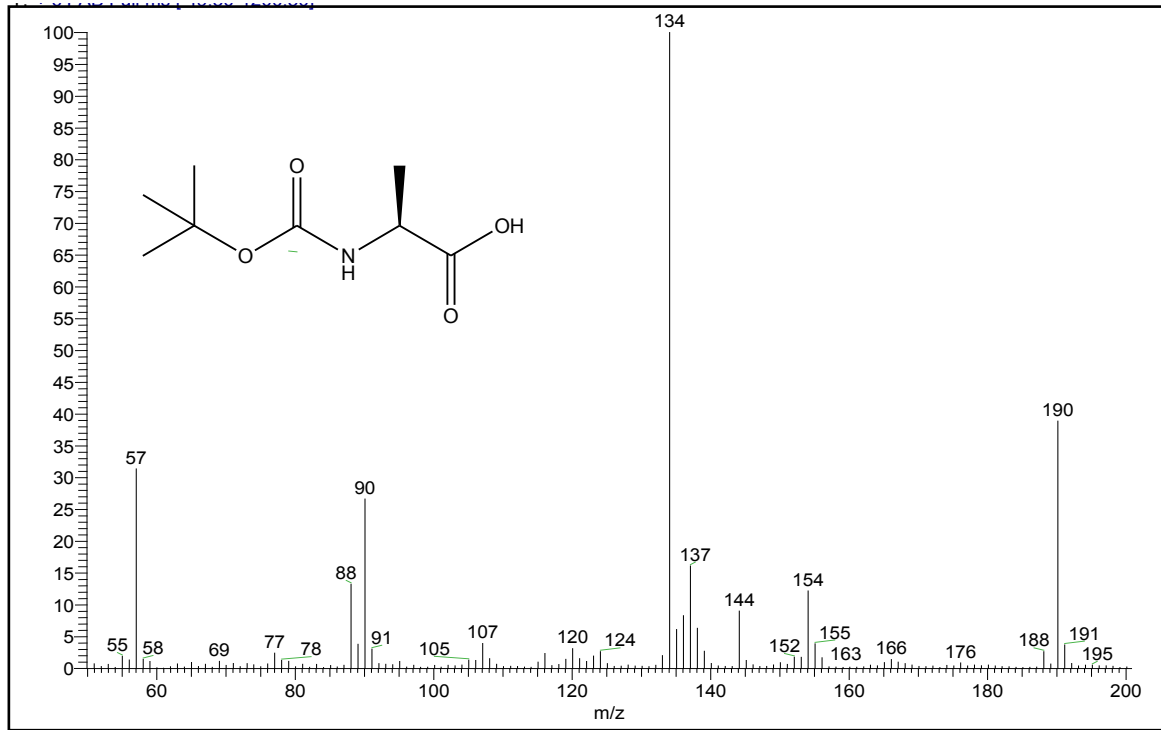
Espectro 61. RMN^{-1} de 3-aminopropanoato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (17).



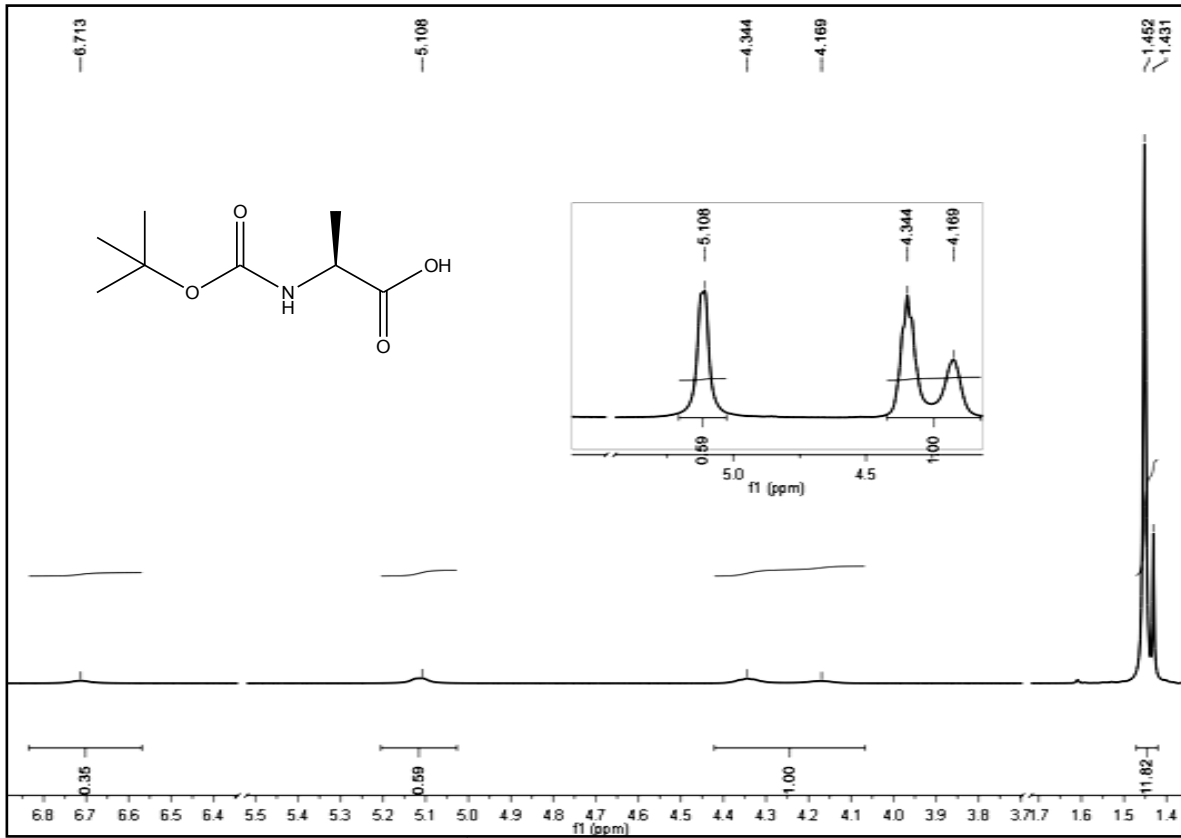
Espectro 62. RMN- ^{13}C de 3-aminopropanoato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (17).



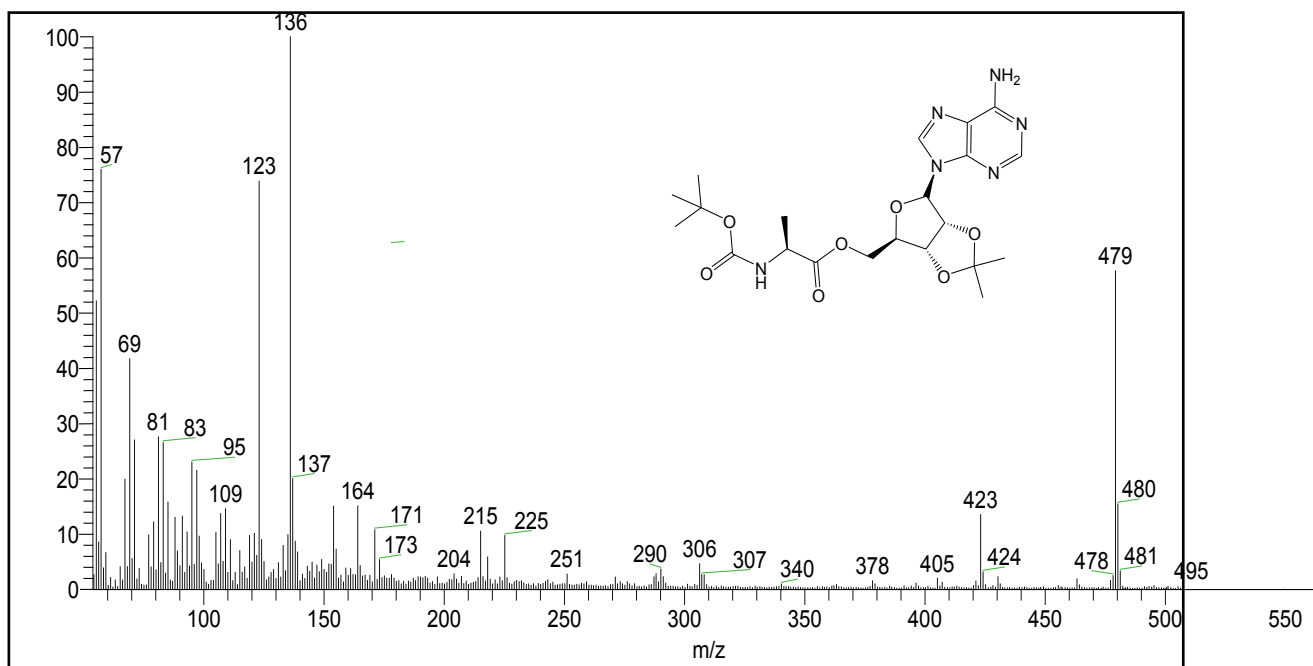
Espectro 63. HSQC editado de 3-aminopropanoato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**17**).



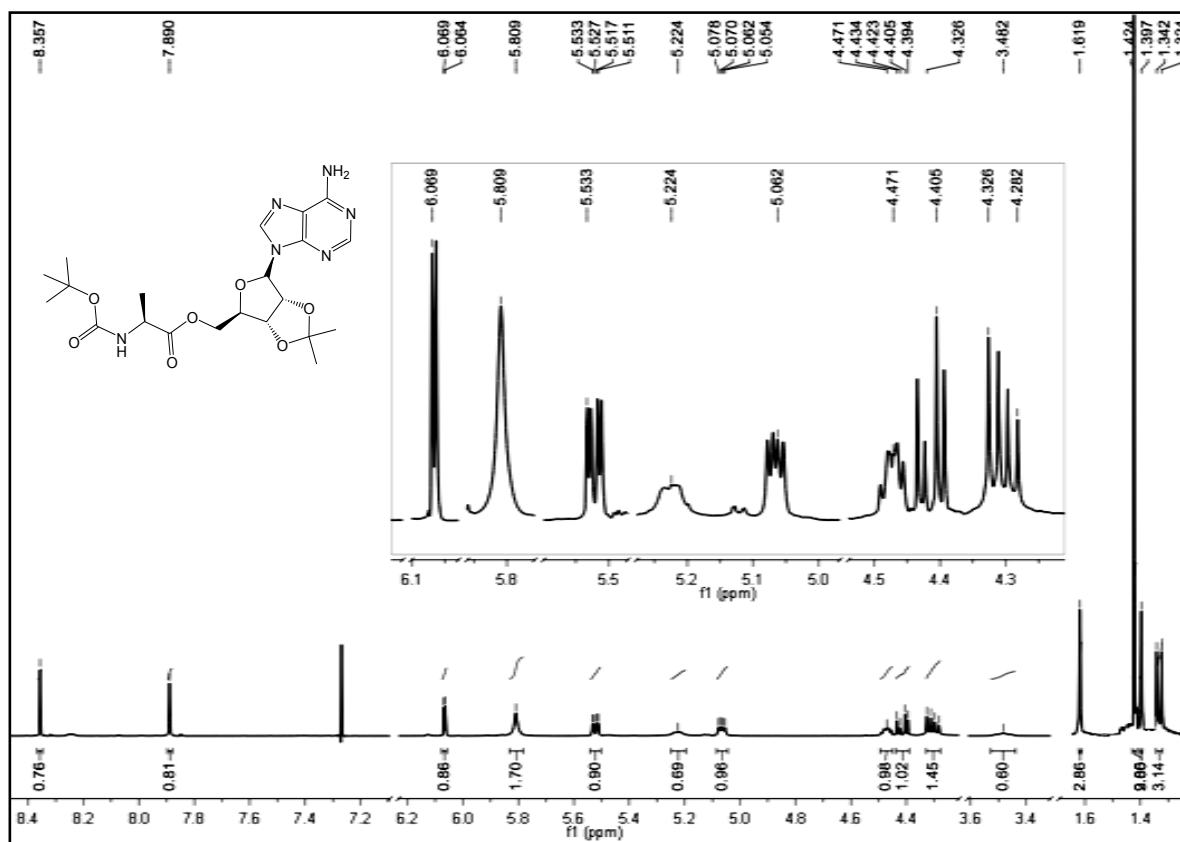
Espectro 64. EMFAB de *N*-tertbutoxycarbonyl-(*S*)-alanina (18).



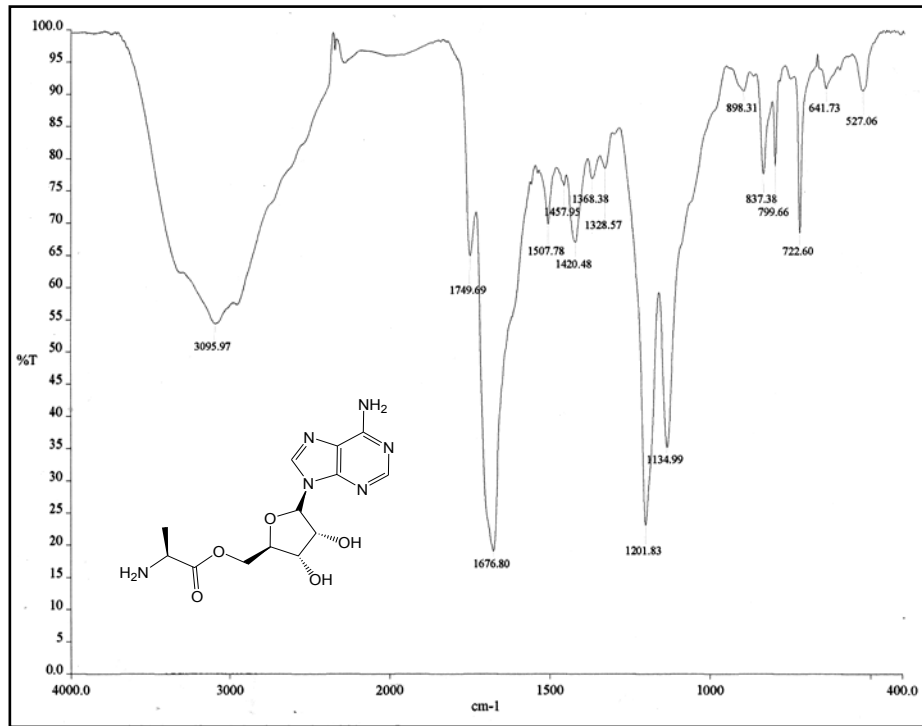
Espectro 65. RMN-¹H de *N*-tertbutoxycarbonyl-(*S*)-alanina (18).



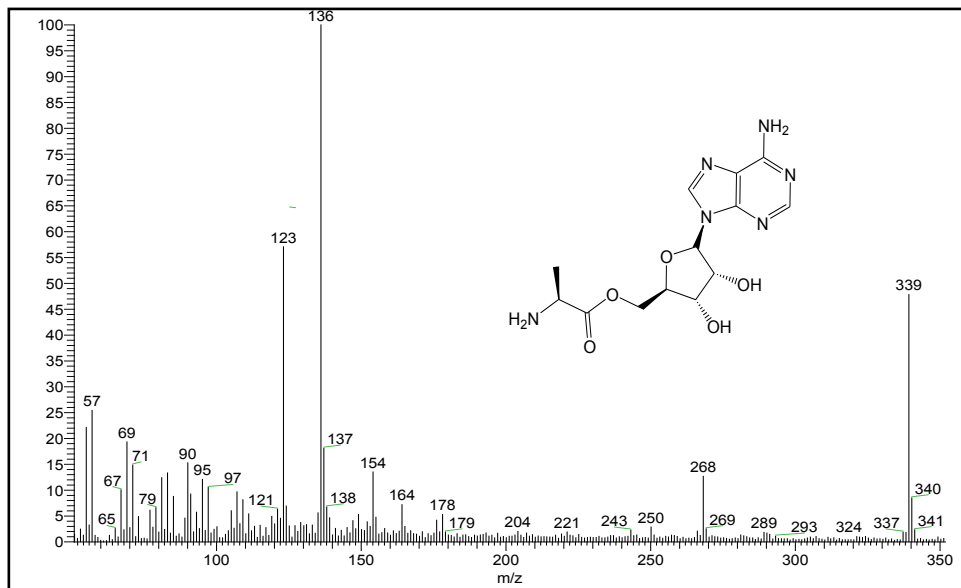
Espectro 66. EMFAB de *N*-Boc-(*S*)-alaninato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**19**).



Espectro 67. RMN-¹H de *N*-Boc-(*S*)-alaninato de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**19**).



Espectro 68. IR (Película en MeOH) de (S)-alaninato de adenosin-5'-ilo (**20**).



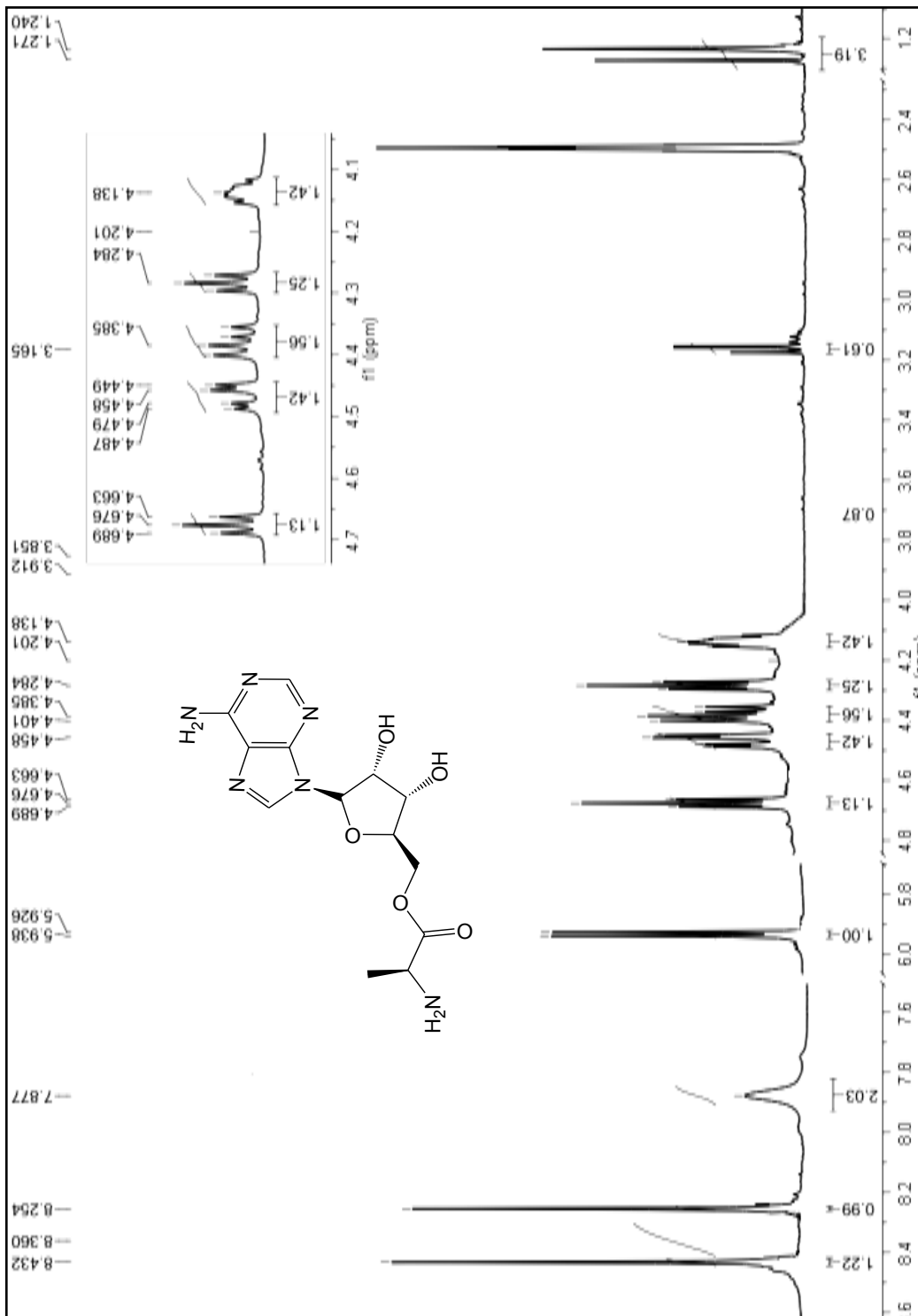
Espectro 69. EMFAB de (S)-alaninato de adenosin-5'-ilo (**20**).

Elemental composition search on mass 339.14

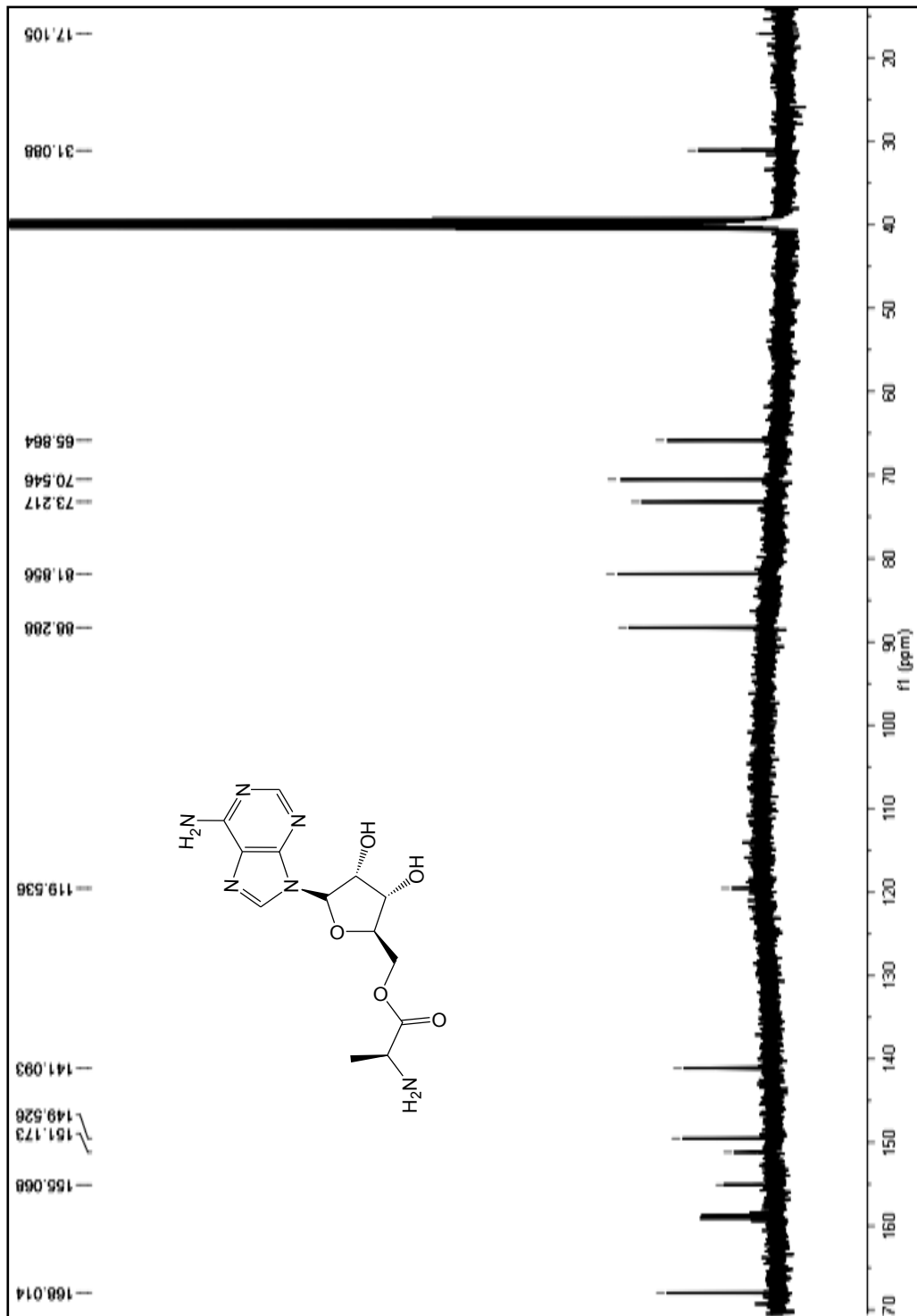
m/z= 334.14-344.14

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
339.1406	339.1411	-0.54	7.5	C ₁₃ H ₁₉ O ₅ N ₆

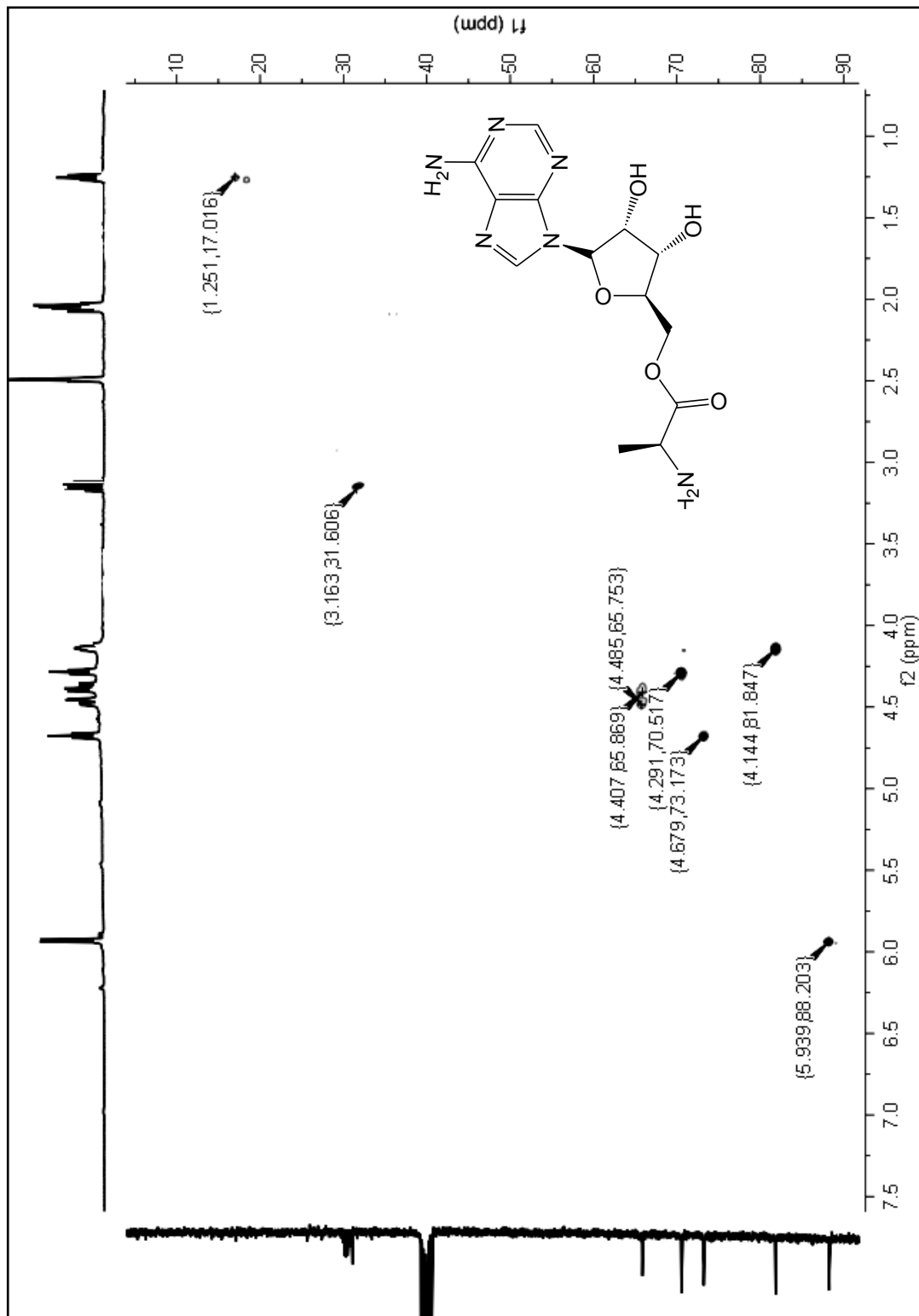
Espectro 70. HR-FAB de (S)-alaninato de adenosin-5'-ilo (**20**).



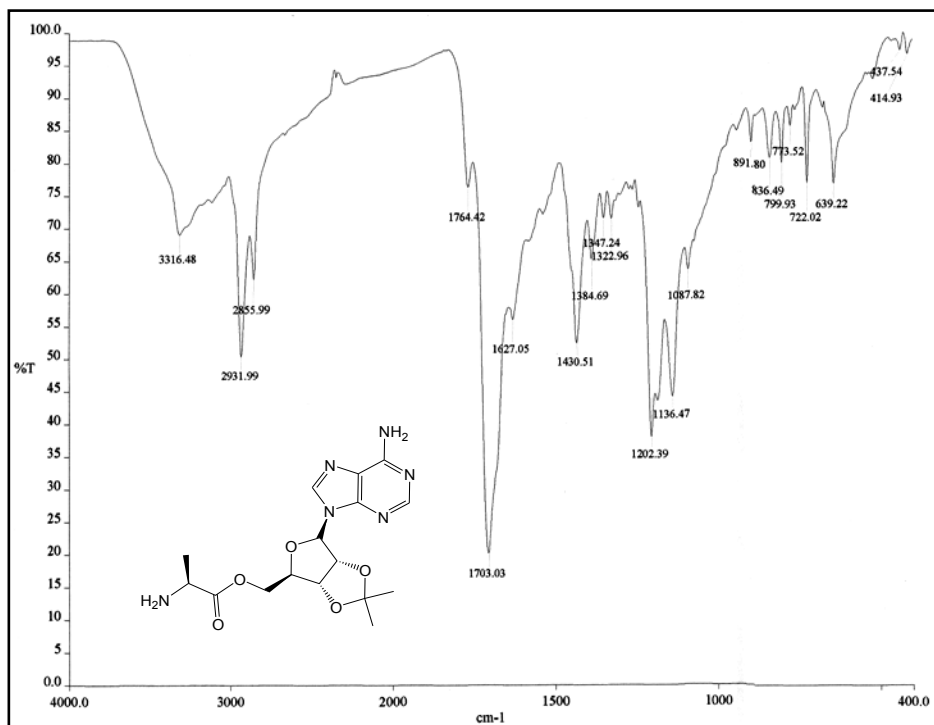
Espectro 71. RMN-¹H (S)-alaninato de adenosin-5'-ilo (20).



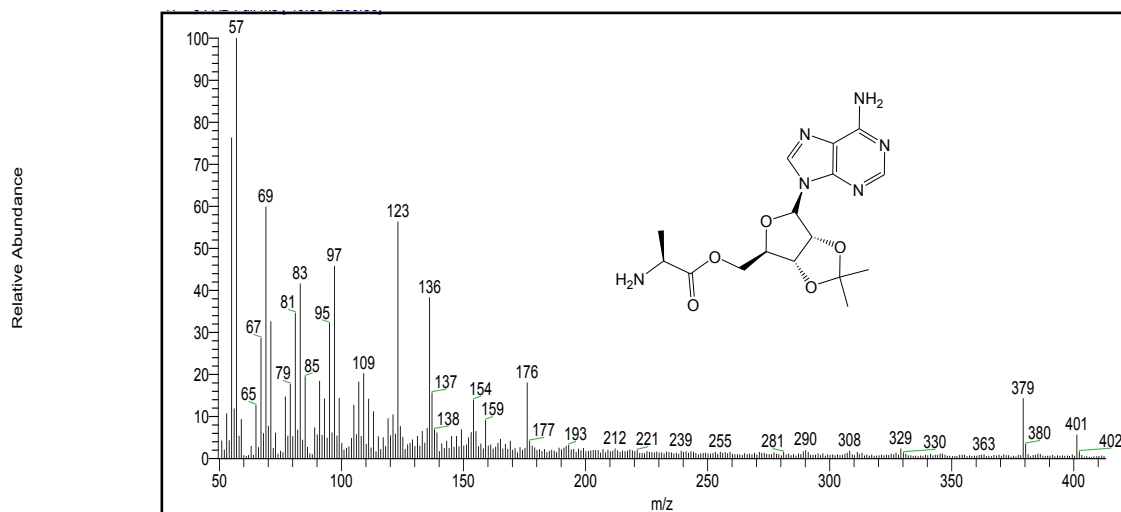
Espectro 72. RMN- ^{13}C (S)-alainato de adenosin-5'-ilo (20).



Espectro 73. HSQC editado de (S)-alaninato de adenosin-5'-ilo (20).



Espectro 74. IR (Película en MeOH) de (S)-alaninato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**21**).



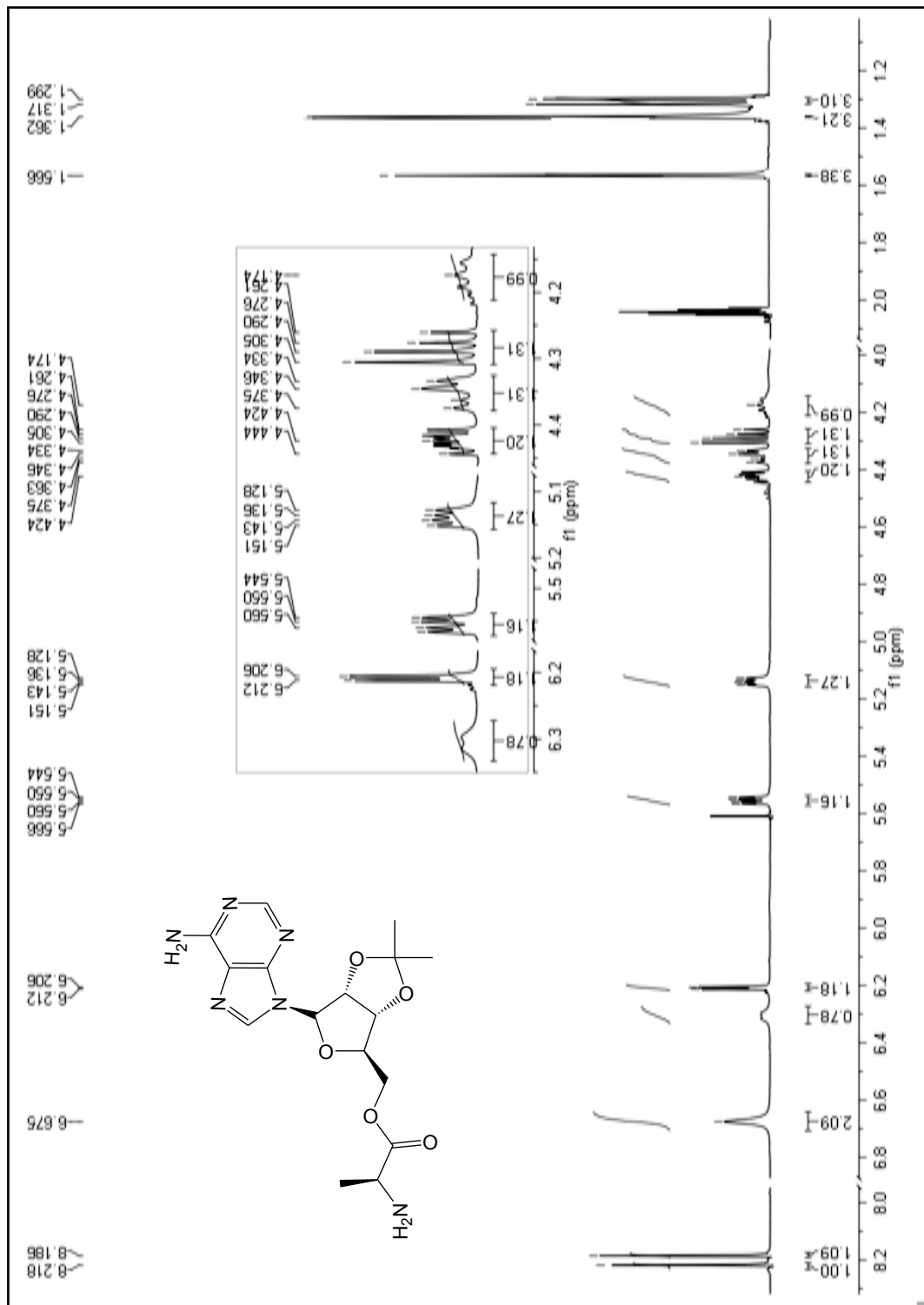
Espectro 75. EMFAB de (S)-alaninato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**21**).

Elemental composition search on mass 379.17

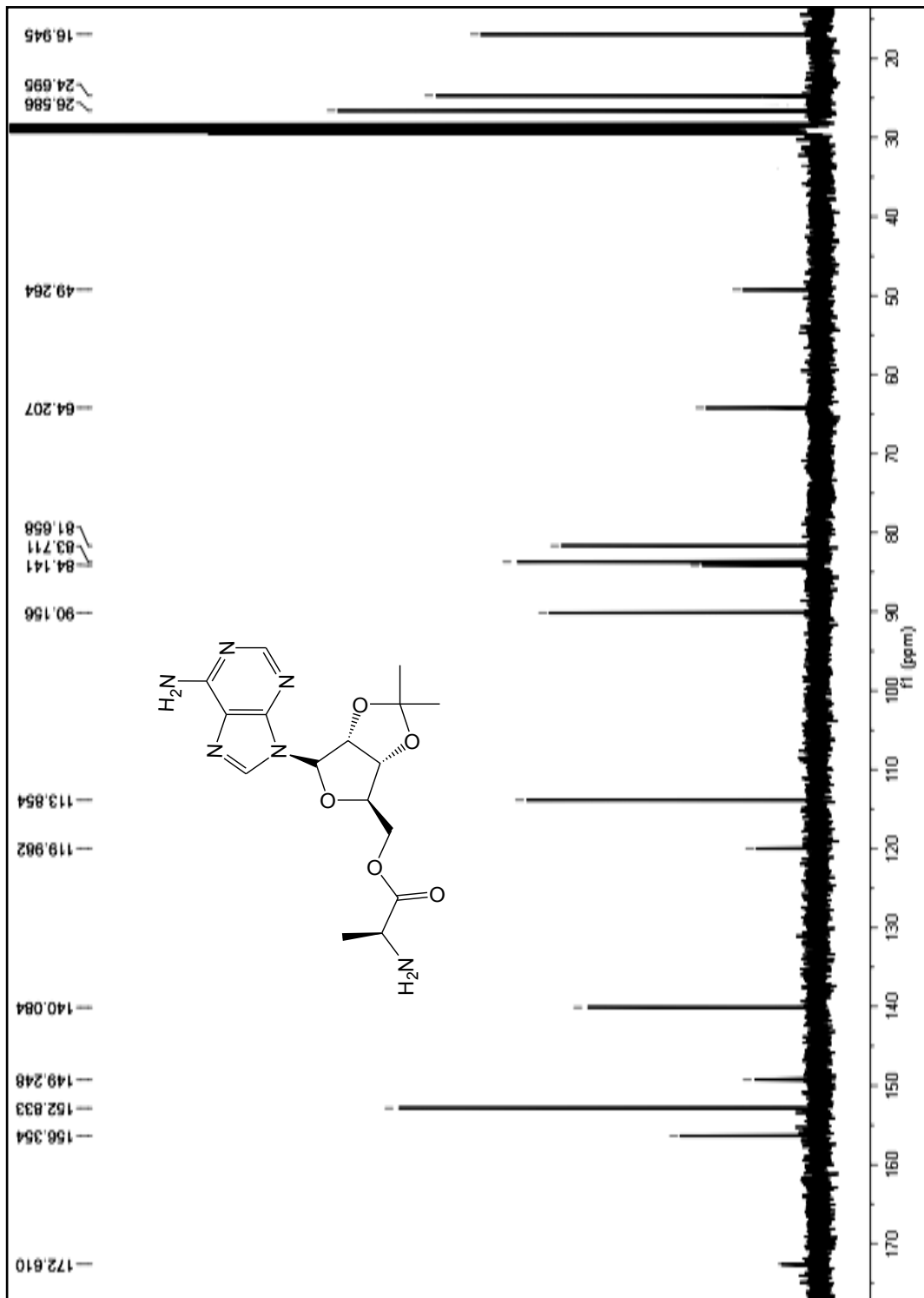
m/z = 374.17-384.17

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
379.1727	379.1724	0.67	8.5	C ₁₆ H ₂₃ O ₅ N ₆

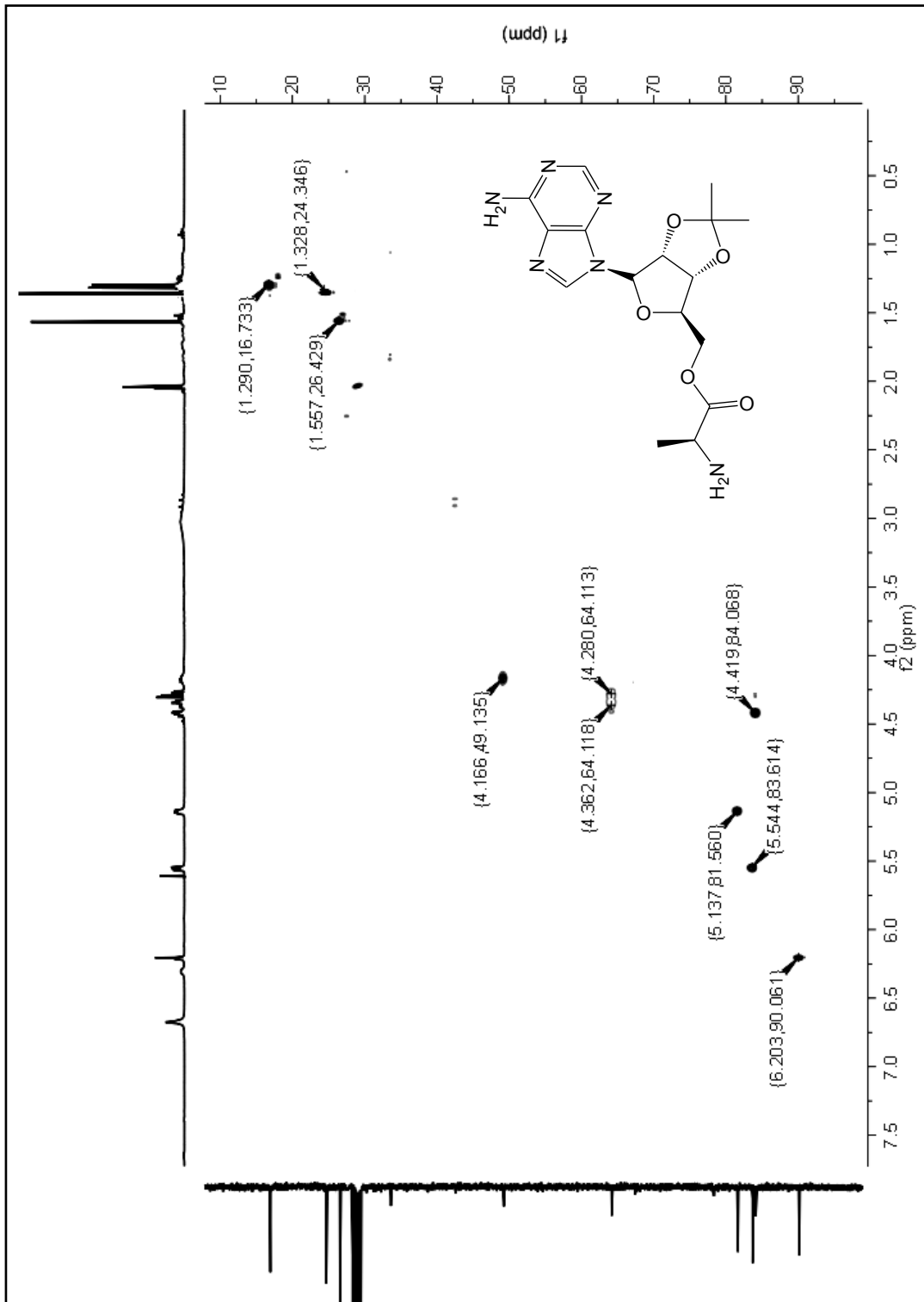
Espectro 76. HR-FAB de (S)-alaninato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (**21**).



Espectro 77. RMN-¹H de (S)-alaninato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (21).



Espectro 78. RMN- ^{13}C de (S)-alaninato de 2',3'-O-isopropilidenadenosin-5'-ilo (21).



Espectro 79. HSQC editado de (S)-alaninato de 2',3'-O-isopropilidadenosin-5'-ilo (21).

Se realizaron algunos intentos de desprotección del grupo Boc mediante el empleo de microondas, estrategia conocida como Síntesis Orgánica Asistida por Microondas (MAOS).

En este caso, se empleó un horno de microondas Synthos 3000 de Anton Parr®, utilizando un rotor multimodal 64MG5 de 64 viales con control interno de temperatura.

Se emplearon viales Wheaton® de tamaño estándar. Se colocaron 100 mg de materia prima en los viales y un agitador magnético, posteriormente se adicionó 1 mL de ácido trifluoroacético y a los demás viales de control interno, isopropanol. Se empleó una rampa de 2 minutos a 800 W para alcanzar 120 °C. Posteriormente tuvo un tiempo “Hold” de 20 minutos a esa temperatura y finalmente se dejó enfriar por 10 minutos con el ventilador nivel 3. La gráfica de control de temperatura y presión se muestra a continuación.

