

**DESARROLLO DE
ANTAGONISTAS SELECTIVOS
DEL RECEPTOR A₃ DE
ADENOSINA**

**DEVELOPMENT OF
ADENOSINE A₃ RECEPTOR
SELECTIVE ANTAGONISTS**

DARÍO MIRANDA PASTORIZA

CURSO ACADÉMICO 2019-2020

DESARROLLO DE ANTAGONISTAS SELECTIVOS DEL RECEPTOR A₃ DE ADENOSINA

*Development of adenosine A₃ receptor
selective antagonists*

DARÍO MIRANDA PASTORIZA

Trabajo de Fin de Grado

Curso académico 2019-2020

Santiago de Compostela

Tutor: Prof. Eddy Sotelo Pérez

Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela y Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CiQUS)



Índice

I. Resumen.....	1
II. Abstract.....	1
III. Abreviaturas	2
1. Introducción	4
1.1 Adenosina.....	4
1.2 Receptores de adenosina	5
1.2.1 Función de los receptores de adenosina.....	6
1.2.2 Localización de los receptores de adenosina	7
1.3 Relevancia fisiopatológica de la adenosina	8
1.3.1 Sistema cardiovascular	8
1.3.2 Cáncer	8
1.3.3 Desórdenes visuales	9
1.3.4 Sistema inmunitario	9
1.3.5 Otras patologías	10
1.4 Ligandos del receptor A₃ de adenosina.....	10
1.4.1 Agonistas del receptor A ₃	11
1.4.2 Antagonistas del receptor A ₃	12
1.5 Estructura del receptor A₃	14
1.6 Reacciones multicomponente como herramientas de síntesis	14
1.6.1 Ejemplos de reacciones multicomponente	15
1.6.2 Características y ventajas de las RMC.....	16
1.6.3 Reacción de Biginelli	18
1.7 Objetivos del Trabajo Fin de Grado	22
1.7.1 Antecedentes.....	22
1.7.2 Objetivos.....	24
2. Materiales y métodos.....	26
2.1 Esquema del proceso	26
2.2 Síntesis	26

2.2.1	Preparación de los β -cetoésteres.....	28
2.2.2	Preparación de los derivados tricíclicos	29
2.3	Purificación.....	31
2.4	Caracterización estructural de los compuestos	32
2.5	Evaluación farmacológica	33
3.	<i>Resultados y discusión</i>	35
3.1	Diseño de ligandos.....	35
3.2	Precursores obtenidos y caracterización estructural.....	38
3.3	Obtención de compuestos finales y caracterización estructural.....	39
3.3.1	Serie I: exploración del grupo aldehído en posición 4.....	39
3.3.2	Serie II: exploración del grupo éster en posición 3	41
3.3.3	Serie III: exploración combinada en R ₃ y R ₄	43
3.4	Evaluación farmacológica de los compuestos frente al receptor de adenosina.....	45
4.	<i>Conclusiones</i>.....	46
	<i>Bibliografía</i>.....	47
	<i>Índice de Figuras</i>.....	52
	<i>Agradecimientos</i>	55

I. Resumen

El presente Trabajo de Fin de Grado describe el diseño, síntesis y evaluación farmacológica de derivados del sistema 1,4-dihidrobenczo[4,5]imidazo[1,2-a]pirimidina como antagonistas del receptor A₃ de adenosina. Empleando una variante de la reacción de Biginelli se obtuvo una colección de 19 ligandos. Uno de los compuestos sintetizados mostró una elevada afinidad ($K_i=2.28$ nM) por el receptor A₃ de adenosina.

Palabras clave: adenosina, receptor A₃ de adenosina, antagonistas, reacciones multicomponente, reacción de Biginelli.

II. Abstract

The current project describes the design, synthesis and pharmacological evaluation of 1,4-dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidine derivatives as potential antagonists of the A₃ adenosine receptor. By employing the Biginelli reaction, a collection of 19 ligands has been obtained. Furthermore, a compound with A₃ receptor affinity ($K_i=2.28$ nM) has been identified.

Keywords: adenosine, A₃ antagonist receptor, antagonists, multicomponent reaction, Biginelli reaction.

III. Abreviaturas

A₁AR: Receptor A₁ de adenosina

A_{2A}AR: Receptor A_{2A} de adenosina

A_{2B}AR: Receptor A_{2B} de adenosina

A₃AR: Receptor A₃ de adenosina

AC: Adenilato ciclasa

ADP: Adenosín Difosfato

ADO: Adenosina

AMP: Adenosín Monofostato

AMPc: Adenosín Monofosfato cíclico

ATP: Adenosín Trifosfato

AR: Receptor de adenosina

CCF: Cromatografía en Capa fina

CDCl₃: Cloroformo deuterado

DCM: Diclorometano

DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido hexadeuterado

GPCR: Receptor Acoplado a Proteína G

MeOH: Metanol

mg: miligramo

mL: mililitro

mmol: milimol

Mw: Peso molecular

μL: microlitro

Pi: Fosfato inorgánico

REA: Relación Estructura-Actividad

RMC: Reacción Multicomponente

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RMN-¹H: Resonancia Magnética Nuclear de protón

RMN-¹³C: Resonancia Magnética Nuclear de carbono

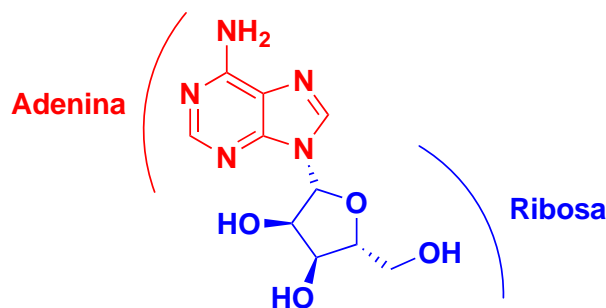
THF: Tetrahidrofurano

1. Introducción

1.1 Adenosina

La adenosina (ADO) es un nucleósido presente en diferentes tejidos de nuestro organismo. Se forma a través de la unión de la adenina con un anillo de ribosa mediante un enlace β -N₉ glucosídico.

Esta estructura de 6-Amino-9- β -D-ribofuranosil-9H-purina (*Figura 1.1*) tiene una relevancia importante en diversas funciones biológicas al ser el núcleo estructural de moléculas como el Adenosín Trifosfato (ATP), Adenosín Difosfato (ADP) o el Adenosín Monofosfato cíclico (AMPc) (1,2).



Adenosina
6-Amino-9- β -D-ribofuranosil-9H-purina

Figura 1.1 Estructura química de la ADO.

La ADO actúa como sustrato en todo un complejo engranaje de sistemas enzimáticos. Por este motivo, la concentración de esta dependerá de la actividad que presenten las diferentes enzimas (*Figura 1.2*), pero también de los transportadores de nucleósidos y nucleótidos presentes en la membrana celular (2). El ATP, nucleótido fundamental en la obtención de energía celular, se forma a partir de la trifosforilación de la molécula de ADO a través de la enzima adenosín quinasa (AQ). La conversión de ADO en ATP puede ser revertida mediante la rotura de los grupos fosfato a través de la acción de enzimas con actividad 5'-nucleotidasa (5'NT). La rotura del ATP formado provoca la liberación de energía. Esta energía es empleada en multitud de procesos celulares. Además, a partir del ATP se puede obtener el AMPc, importante segundo mensajero en muchos procesos biológicos, mediante la acción de la enzima adenilato ciclasa

(AC). La concentración de AMPc está regulada por las enzimas con actividad fosfodiesterasa (PDE).

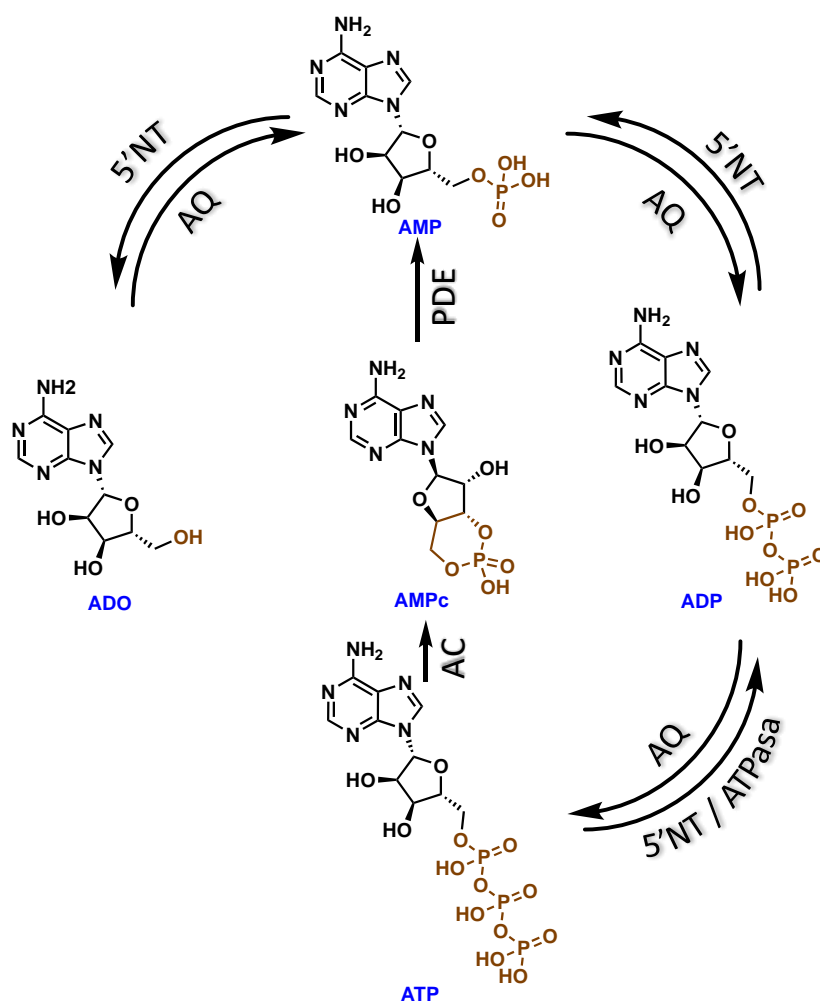


Figura 1.2 Metabolitos formados a partir de la ADO y enzimas responsables (AQ = Adenosín quinasa; 5'NT = 5'-Nucleotidasa, PDE = Fosfodiesterasa y AC = Adenilato ciclasa).

Además de su importancia como depósito energético, y en la señalización celular, la ADO ejerce sus principales funciones al unirse a los receptores de adenosina (AR). Mediante esta interacción, se regulan procesos fisiológicos (actividad locomotora, ritmo cardíaco, actividad muscular, lipólisis, etc.) y patológicos (cáncer, glaucoma, enfermedades del sistema inmunitario, inflamación de articulaciones...) (3).

1.2 Receptores de adenosina

Los AR son un tipo de receptores transmembrana que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Los GPCR están formados por una única cadena polipeptídica comprendida por siete hélices transmembrana, con un

dominio tipo N-terminal extracelular y un dominio C-terminal de localización intracelular (*Figura 1.3*).

Dentro de la familia de AR se encuentran cuatro subtipos, agrupados generalmente en función de la afinidad por este nucleósido. Así, se conocen tres receptores de alta afinidad: A₁, A_{2A} y A₃; y un receptor de baja afinidad: A_{2B}. Con respecto a su estructura, los cuatro subtipos son muy semejantes: existe un 46,6% de homología entre el subtipo A_{2A} y el A_{2B} y un 46,5% entre el A₁ y el A₃ (4). En la actualidad se conoce la estructura cristalina del receptor A_{2A} y A₁ y de sus complejos con diferentes fármacos.

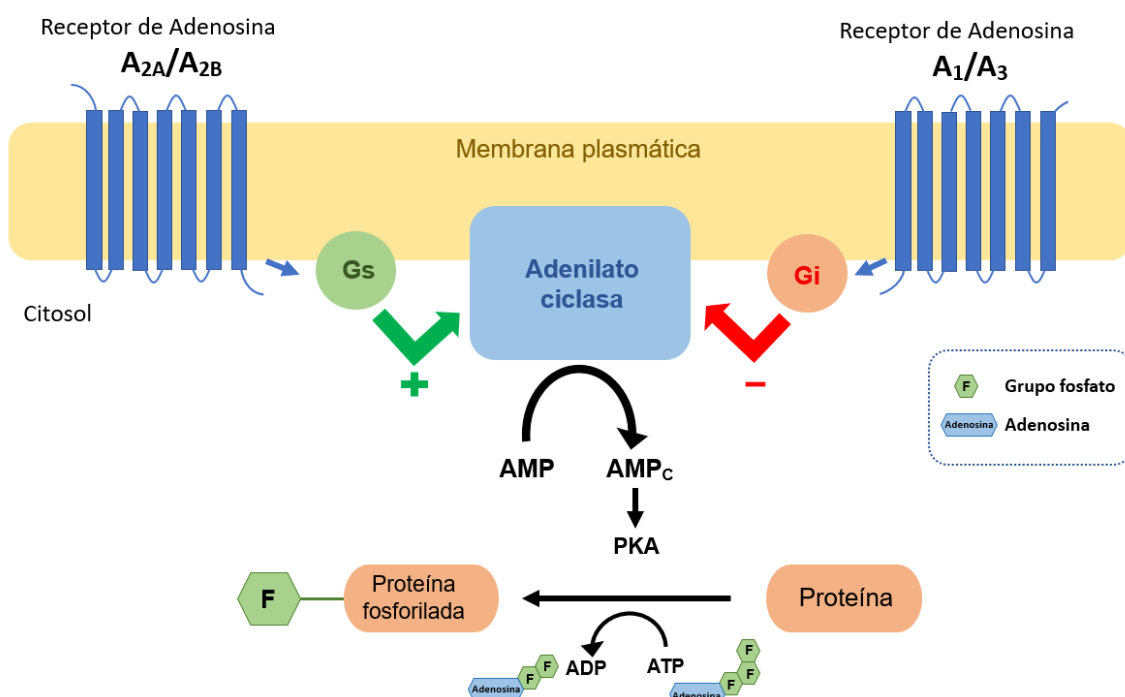


Figura 1.3 Estructura de los subtipos de AR y esquema de su funcionalidad (Elaboración propia).

1.2.1 Función de los receptores de adenosina

Estos receptores usan mayoritariamente las proteínas G como señalizadores celulares (1). Las proteínas G se denominan así debido a que fijan nucleótidos de guanina. Están formadas por tres subunidades: α , β y γ . Dependiendo del tipo de subunidad α , se describen diferentes tipos de proteínas G. Específicamente, en el caso de los AR, se presentan dos tipos de proteínas G, la G_s (subunidad α_s) y G_i (subunidad α_i). Cuando el receptor acoplado a este tipo de proteína está en conformación activa, la subunidad α se separa de las otras dos, quedando libre y

permitiendo la unión a diferentes sistemas, generalmente la AC, que desencadena la respuesta celular.

Otro modo de clasificar los AR es en función de actividad sobre la AC. Los subtipos A_{2A} y A_{2B} están acoplados a subunidad α_s, por lo que provocarán una activación de la AC, incrementando los niveles de AMPc (2). Por el contrario, los subtipos A₁ y A₃ acoplan la subunidad α_i, por lo que provocarán una inhibición de la AC, disminuyendo los niveles de AMPc. Estos niveles de AMPc regularán la activación de la proteína quinasa A (PKA; *Figura 1.3*) que, en último término, provoca la fosforilación de otras proteínas, llegando así a una respuesta celular.

1.2.2 Localización de los receptores de adenosina

Los AR están ampliamente distribuidos por el organismo (*Figura 1.4*). Comúnmente se encuentran localizados los cuatro subtipos de AR en hígado, tejido adiposo y páncreas. En el caso de la subfamilia A₃, estos receptores se encuentran muy expresados en el corazón, placenta, útero, vejiga y ojos, entre otros órganos (4).

Esto justifica la importancia que adquieren estos receptores de ser explorados como dianas terapéuticas, proporcionando nuevas oportunidades para el tratamiento de una amplia variedad de patologías.

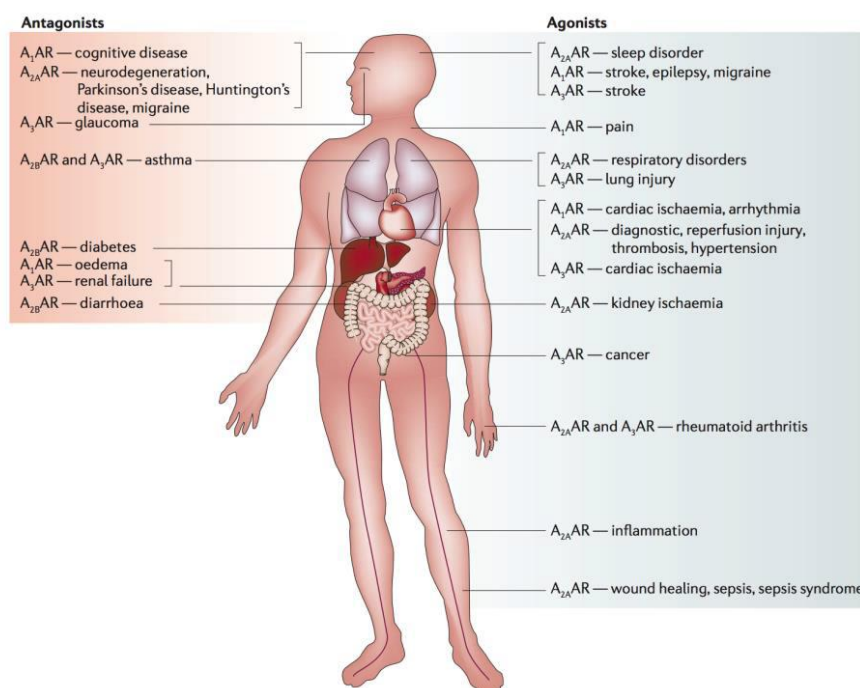


Figura 1.4 Localización de los AR (5).

1.3 Relevancia fisiopatológica de la adenosina

La amplia distribución de los AR, y su mayor expresión en ciertas condiciones fisiológicas, generan un importante interés en el estudio de cómo actúan en ciertas patologías. Concretamente, el A₃AR tiene mucha importancia en patologías que afectan al sistema cardiovascular e inmunitario.

1.3.1 Sistema cardiovascular

Arritmia

La activación del receptor A₁ presenta importantes efectos a nivel cardiovascular, ya que se produce una reducción en la frecuencia cardíaca y contractilidad muscular. Un importante ejemplo de esta aplicación es el fármaco **Adenocor**. Este medicamento contiene ADO y se utiliza mediante infusión intravenosa para revertir la taquicardia supraventricular paroxística al bloquear el nódulo auriculoventricular y así conseguir restaurar el ritmo normal del corazón (5).

Isquemia

Cuando se produce una obstrucción total o parcial de la arteria coronaria, se produce una grave patología cardíaca conocida como **isquemia miocárdica**. Durante este proceso de estrés orgánico se produce una importante liberación de ADO para intentar amortiguar los daños causados, por lo que actuar sobre los receptores A₁ y A₃ (recordemos la fuerte homología entre estos dos subtipos de AR) podría ser una diana terapéutica para favorecer la supervivencia ante estos casos isquémicos. Además, se sabe que la principal causa de esta enfermedad es la obstrucción arterial debida a la formación de la placa de ateroma. Respecto a esto, se ha demostrado que el bloqueo del A₃AR produce un impedimento de la formación de dicha placa (5).

1.3.2 Cáncer

En el microambiente tumoral la concentración de adenosina se incrementa 100 veces. Este incremento se debe principalmente a la potenciación de rutas que transforman el ATP (incrementado extracelularmente por el daño tisular) en adenosina, pero también a la evasión de la degradación de esta. La adenosina, mediante su interacción con los receptores A_{2A} (alta afinidad) y A_{2B} (baja afinidad) localizados en el microambiente tumoral, provoca **oncoprotección** a tres niveles (6): 1) Facilita la proliferación celular

y la metástasis, 2) contribuye a la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y 3) dificulta el correcto funcionamiento del sistema inmunitario (7).

Se ha demostrado que los antagonistas de este receptor provocan un revertimiento de la actividad inmune normal en neoplasias. Además, los agonistas del receptor A₃ pueden inducir o atenuar el proceso de apoptosis (dependiendo de la concentración utilizada del agonista). Este agonismo ha demostrado un efecto inhibitorio en el crecimiento tumoral en estudios in vitro e in vivo (8).

1.3.3 Desórdenes visuales

Respecto a las patologías visuales, existen estudios con ratones cuya expresión del receptor A₃ ha sido impedida (knock-out receptor A₃) (5).

Estos experimentos muestran que estos ratones presentan una menor presión intraocular, lo que puede indicar que el bloqueo del receptor A₃ mediante antagonistas es una potencial terapia para el tratamiento de glaucoma (enfermedad ocular producida por una elevada presión intraocular que termina produciendo ceguera, entre otros daños) (5,9).

1.3.4 Sistema inmunitario

El receptor A_{2A}, presente en la mayoría de las células inmunitarias, produce una atenuación de la inflamación y de la lesión por reperfusión en muchos tejidos cuando es activado (10). Este hecho lleva al interés en el estudio de los agonistas del receptor A_{2A} para el tratamiento de diferentes patologías con una respuesta inflamatoria exacerbada como, por ejemplo, artritis y psoriasis.

El receptor A₃ está presente en las células inmunitarias, razón por la que interviene en la fisiopatología de la regulación inflamatoria y la respuesta inmunitaria. En relación con esto, se demostró que la expresión del receptor A₃ en neutrófilos humanos produce una inhibición del estallido oxidativo. Esto evita la liberación de especies reactivas de oxígeno y, en última instancia, el daño inflamatorio. El receptor A₃ tiene, por tanto, actividad antiinflamatoria (11). También se ha demostrado que la expresión del receptor A₃ evita el proceso de apoptosis (muerte celular) de los eosinófilos y con ello la quimiotaxis (12).

1.3.5 Otras patologías

Otras patologías en las que interviene la molécula de ADO y los 4 subtipos de receptores son enfermedades como diabetes, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (A_{2B}) (13); enfermedades del sistema nervioso: daños neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson (A_{2A}) (14), demencia (A₁), daño isquémico (A₃) o trastornos del sueño (A₁) (15) y enfermedades articulares (A₃) (12).

Respecto a las patologías antes descritas y relacionadas con los distintos subtipos de AR destacan las enfermedades relacionadas con el receptor A₃ (Figura 1.5).

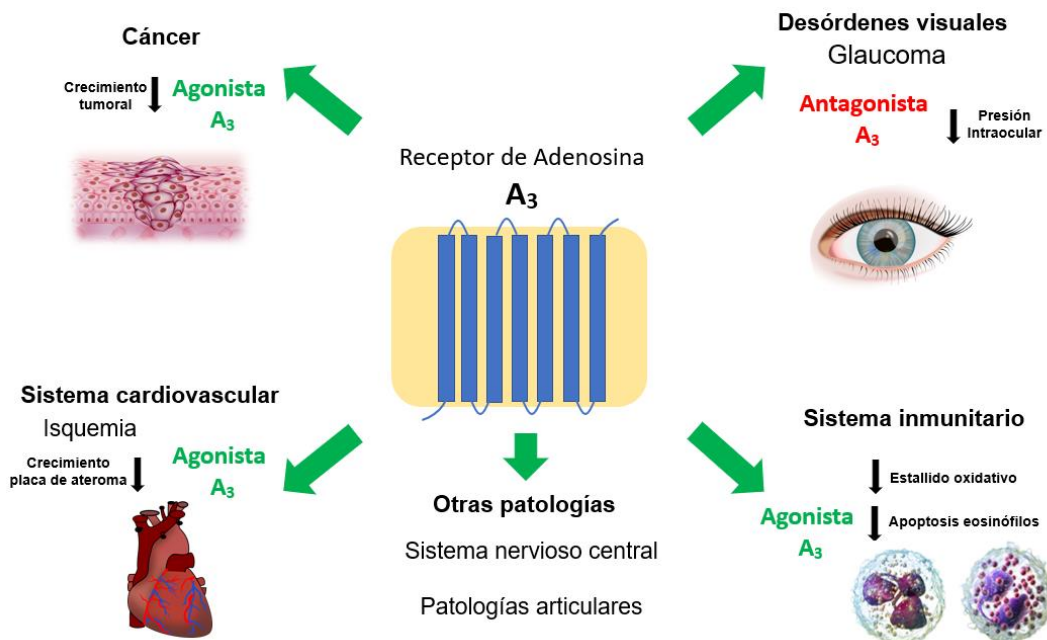


Figura 1.5 Esquema de la fisiopatología del receptor A₃ (Elaboración propia).

1.4 Ligandos del receptor A₃ de adenosina

Cuando se habla de ligandos de un receptor, pueden existir diferentes tipos dependiendo del efecto que provoquen al unirse al mismo. Atendiendo a esta clasificación se pueden describir hasta cinco tipos de ligandos (1): **agonistas** (se unen al receptor, lo activan y producen una respuesta máxima), **agonistas parciales** (se unen al receptor, lo activan y producen una respuesta menor que los agonistas), **agonistas inversos** (se unen al receptor, lo activan y produce una respuesta contraria

al agonista), **antagonistas** (se unen al receptor pero no lo activan, impidiendo que un ligando agonista se pueda unir al mismo y activarlo) y **moduladores alostéricos** (a diferencia de los anteriores, se unen al sitio alostérico del receptor, incrementando o disminuyendo indirectamente el efecto de un agonista o agonista inverso, y se pueden dividir en MAP, Modulador Alostérico Positivo, y MAN, Modulador Alostérico Negativo) (1,16).

Debido al interés que suscita el receptor A₃ en diversas patologías, el presente proyecto se centrará en los ligandos para este receptor.

1.4.1 Agonistas del receptor A₃

De forma general, los agonistas de los AR suelen ser moléculas análogas a la ADO. Por este motivo, suelen actuar sobre todos los subtipos de receptores, tratándose de ligandos no selectivos. Sobre la ADO se pueden realizar modificaciones tanto en el núcleo de adenina como en la ribosa, buscando la mayor afinidad y selectividad por el receptor. Como se puede observar en la *Figura 1.6* existe una gran semejanza estructural entre los agonistas del receptor A₃ **IB-MECA** (17,18), **2CI-IB-MECA** y **LJ568** (17,19) con la ADO.

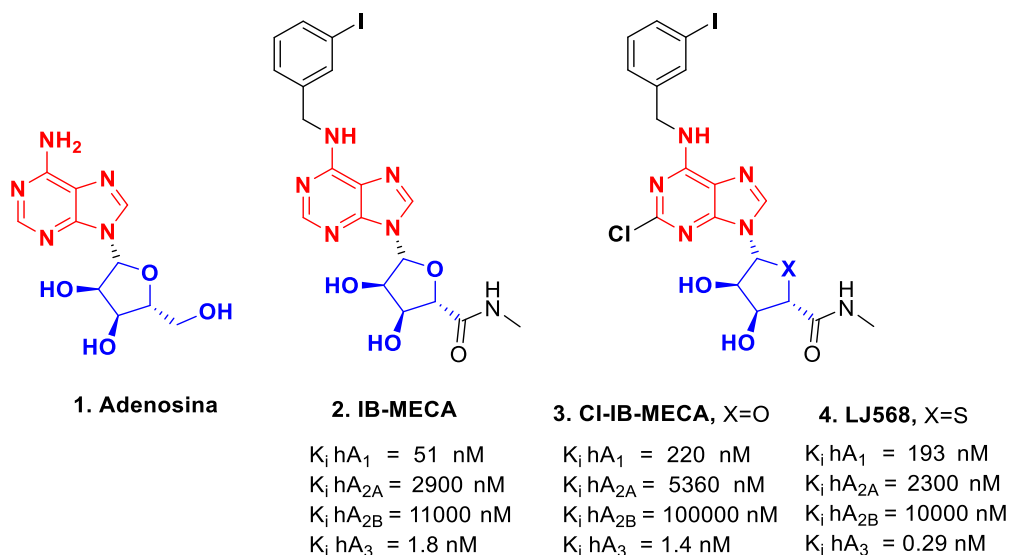


Figura 1.6 Ejemplos de agonistas del receptor A₃ y su semejanza estructural con la ADO. En rojo el núcleo de adenina y en azul el núcleo de ribosa.

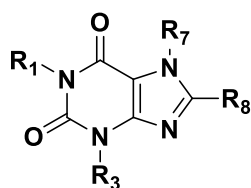
1.4.2 Antagonistas del receptor A₃

Los antagonistas del receptor A₃, a diferencia de los agonistas, pueden tener estructura variada. Esta familia de ligandos se clasifica en derivados xantínicos y no xantínicos.

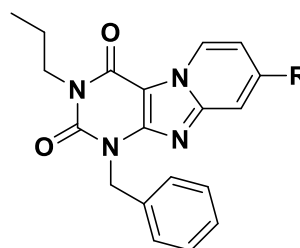
1.4.2.1 Derivados xantínicos

Los derivados xantínicos contienen un núcleo de xantina y la mayoría de los compuestos desarrollados no presentan la ribosa. Este tipo de compuestos generaron interés tras observar el ligero efecto antagonista que presentan las bases xánticas naturales como la cafeína o la teobromina (*Figura 1.7*).

Para poder obtener dichos productos, se han realizado modificaciones sobre el núcleo de xantina, destacando la incorporación de cadenas alquílicas en las posiciones 1 y 3 y de grupos aromáticos en posición 8 como es el caso de los compuestos **8** y **9** (12) de la *Figura 1.7*.



- 5. Caféina**, R₁=CH₃, R₃=CH₃, R₇= CH₃, R₈= H
6. Teobromina, R₁=H, R₃=CH₃, R₇= CH₃, R₈= H
7. Teofilina R₁=CH₃, R₃=CH₃, R₇= H, R₈= H



- | | |
|--|---|
| 8 , R = H | 9 , R = Ph |
| K _i hA ₁ = 50 nM | K _i hA ₁ = >10000 nM |
| K _i hA _{2A} = 119 nM | K _i hA _{2A} = >10000 nM |
| K _i hA ₃ = 4 nM | K _i hA ₃ = 35 nM |

Figura 1.7 Ligandos naturales y su comparación con los compuestos sintéticos 8 y 9.

1.4.2.2 Derivados no xantínicos

Son compuestos que no derivan del núcleo xantínico. Hay mucha diversidad estructural dentro de este grupo, dentro del cual destacan los derivados de pirimidina.

Derivados de piridina y pirimidina

El núcleo de pirimidina genera gran interés en la búsqueda de antagonistas del receptor A₃ ya sea en sistemas monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos. El grupo *ComBioMed* ha desarrollado con anterioridad diferentes compuestos dentro de esta

familia, como es el caso de la molécula **ISVY130** e **ISVY345**, con una elevada afinidad y selectividad por el receptor A_3 (Figura 1.8) (5).

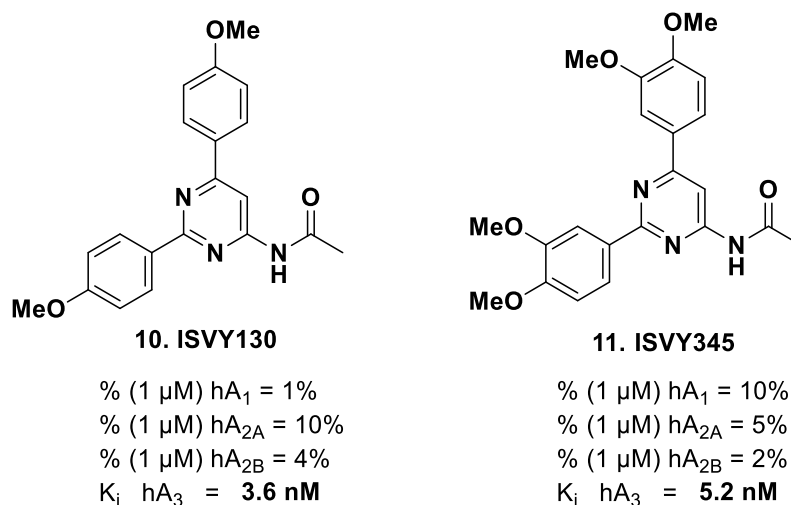


Figura 1.8 Ejemplo de antagonista pirimidínico del receptor A_3 .

Sistemas tricíclicos

Existen diferentes estructuras tricíclicas que actúan como antagonistas del receptor A_3 , destacando grupos como las triazoloquinazolinas y las pirazolo[3,4-c]quinolinas, entre otros (Figura 1.19). Dentro de esta línea de investigación hay ejemplos de diferentes compuestos como **MRS1220** (12), **13** y **14** (Figura 1.9) (5).

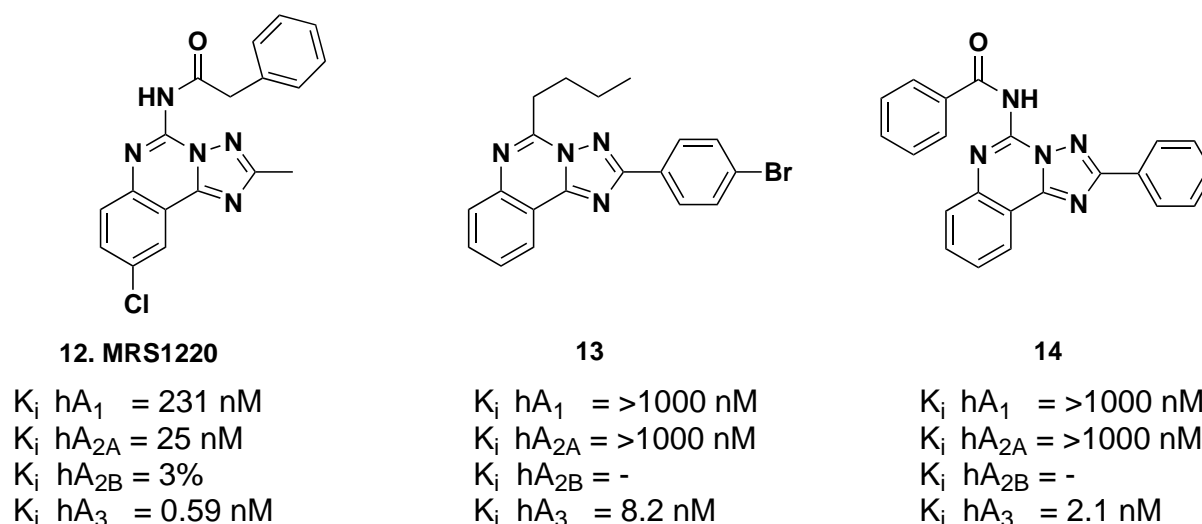


Figura 1.9 Ejemplos de antagonistas tricíclicos del receptor A_3 .

1.5 Estructura del receptor A₃

El escenario óptimo para desarrollar ligandos selectivos para un receptor requiere conocer con la mayor precisión posible la estructura tridimensional de este. Actualmente, la técnica más usada para ello es la cristalización. Mediante la cristalización de un receptor (solo o con un ligando unido) se puede conocer en detalle su estructura, así como los aminoácidos implicados en la interacción con el fármaco.

Actualmente disponemos de cristales del receptor A₁ y A_{2A}. Debido a la alta semejanza del receptor A₃ con el receptor A₁ se han podido emplear modelos informáticos para así desarrollar modelos de homología. Esto se basa en modelar computacionalmente la estructura del receptor A₃ partiendo de la estructura conocida del receptor A₁ (20,21). Gracias a la química computacional, existen simulaciones altamente precisas, como la realizada con la molécula ISVY-345 (22) unida al receptor A₃ (Figura 1.10) que permiten tener una referencia en el diseño de nuevos ligandos.

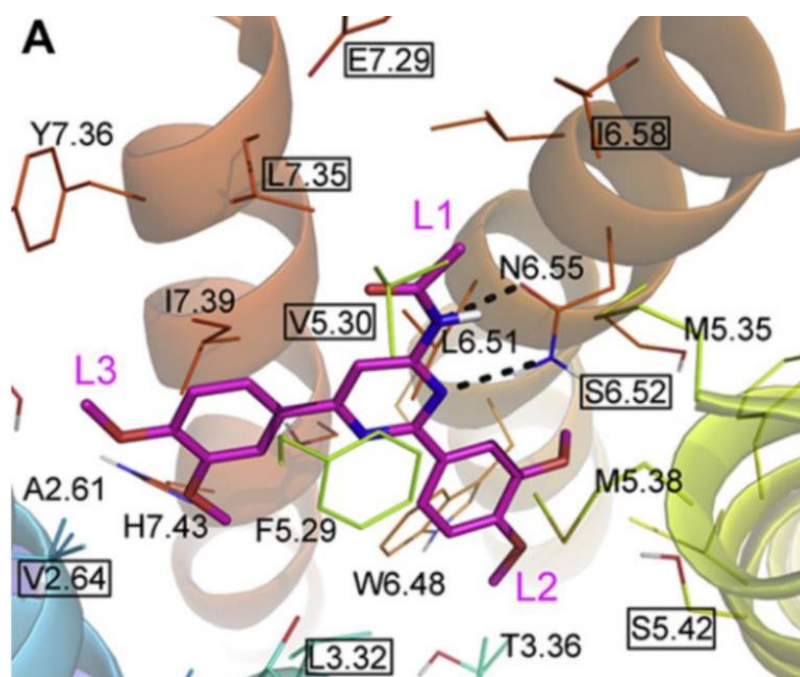


Figura 1.10 Modelo computacional de ISVY-345 unido al receptor A₃.

1.6 Reacciones multicomponente como herramientas de síntesis

La búsqueda de metodologías sintéticas más eficientes, rápidas y respetuosas con el medioambiente ha posicionado las reacciones multicomponente (RMC) como una de las metodologías emergentes en Química Farmacéutica.

En la mayoría de las RMC existentes interviene un compuesto **carbonílico (a)** y una **amina (b)** que, cuando reaccionan entre sí, forman un compuesto denominado aminol (c) y este compuesto da lugar a: iminas si la amina utilizada es primaria; sales de imino, si dicha amina es secundaria (d), tras el proceso de deshidratación. Finalmente, se le acopla el tercer componente de la reacción, un **nucleófilo (Nu)**, obteniendo el producto final de la reacción (e) (Figura 1.11) (23,24).

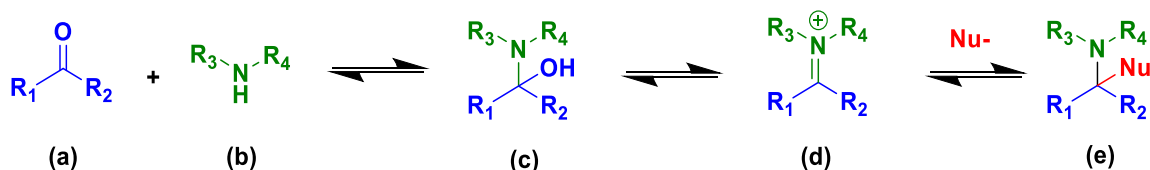


Figura 1.11 Esquema de reacción entre un compuesto carbonílico, una amina y un nucleófilo.

1.6.1 Ejemplos de reacciones multicomponente

La historia de las reacciones multicomponente se remonta al año 1850 con el descubrimiento de la reacción de Strecker (23). Ésta consiste en la combinación de un **aldehído (a)**, una **amina (b)** y un ion **cianuro (c)** que forman un α -aminonitrilo (d), precursor sintético de los α -aminoácidos (e) (Figura 1.12).

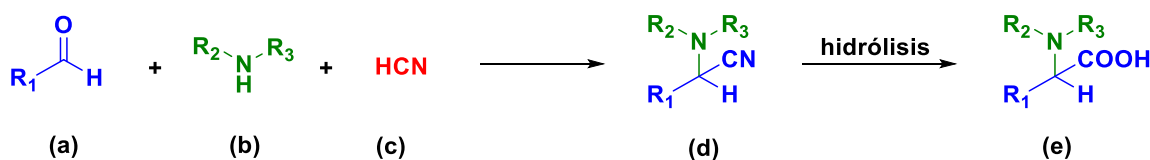


Figura 1.12 Reacción de Strecker.

A partir de esta primera reacción aparecieron nuevas RMC. Un ejemplo es la síntesis de dihidropiridinas de Hantzsch (1882) (23). Aquí, los compuestos que intervienen son un **aldehído (a)**, una **amina (b)** y **dos equivalentes de un compuesto 1,3-dicarbonílico (c)**, obteniendo como producto final una 1,4-dihidropiridina (d) (Figura 1.13).

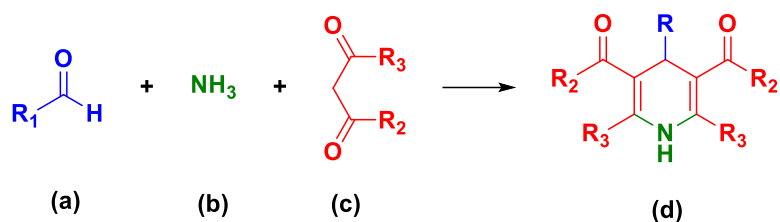


Figura 1.13 Reacción de Hantzsch.

Dentro de estas reacciones que, como hemos visto, utilizan grupos carbonilo, amino y nucleófilos, destacan las RMC que emplean isonitrilos. Las más relevantes en ese grupo son la reacción de Passerini y la reacción de Ugi (Figura 1.13) (24). La primera utiliza un **ácido carboxílico (a)**, un **compuesto carbonílico (b)**, y un **isonitrilo (c)** para formar una **α -aciloxiamida (d)**. En el caso de la reacción de Ugi se utiliza, además de los precursores nombrados anteriormente, una **amina (e)** formando una **α -acilaminoamida (f)** (Figura 1.14)

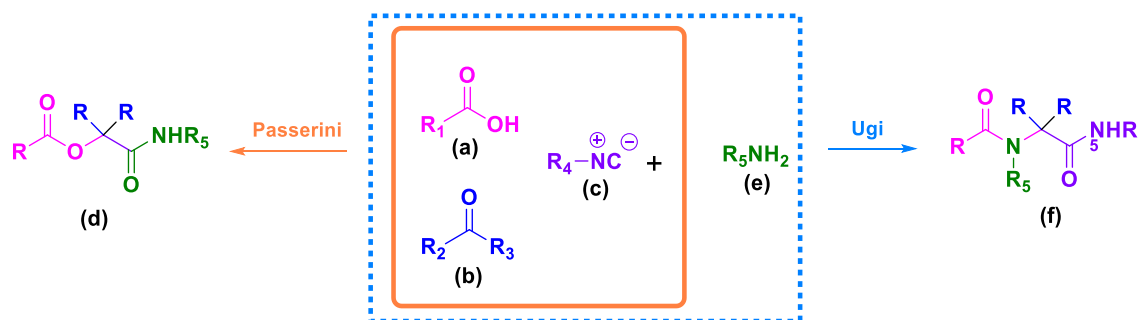


Figura 1.14 Reacciones de Passerini y Ugi.

Las RMC, a pesar de existir desde hace más de un siglo, no despertaron suficiente interés en el campo de la síntesis química hasta hace relativamente poco tiempo, donde se empezó a explotar su potencial en la investigación química y farmacéutica. En los siguientes apartados hablaremos, entre otros aspectos, de la reacción de Biginelli, RMC muy importante en este trabajo.

1.6.2 Características y ventajas de las RMC

La química clásica se caracteriza por utilizar aproximaciones sintéticas lineales en varias etapas, modelo contrario al de las reacciones multicomponente (que realiza la síntesis en una única etapa). Este hecho le aporta a las RMC ciertas ventajas frente a las reacciones de la química tradicional (24):

- **Economía de etapas:** el modelo sintético de las RMC se basa en una etapa, por lo que el número de reacciones necesarias para llegar al producto final es mucho menor que en la química lineal (*Figura 1.15*). Este hecho aporta un ahorro de tiempo, de métodos de purificación y de disolventes. Además, el rendimiento global de la reacción es mayor, puesto que se evita perder producto entre una etapa y otra, como ocurre en la química clásica.
- **Economía de átomos:** la mayoría de los átomos de los precursores que participan en una RMC acaban formando parte del producto final. Esto tiene importantes ventajas medioambientales.
- **Economía de enlace:** en cada RMC se generan como mínimo dos nuevos enlaces, haciendo más eficiente la síntesis.
- **Simplicidad:** la gran mayoría de las RMC se realizan bajo condiciones suaves, usando productos de partida sencillos y comerciales en la mayoría de los casos.
- **Poco contaminantes:** el uso de disolventes es mucho menor que en las reacciones lineales y la formación de agua como subproducto permite reducir considerablemente el impacto medioambiental.

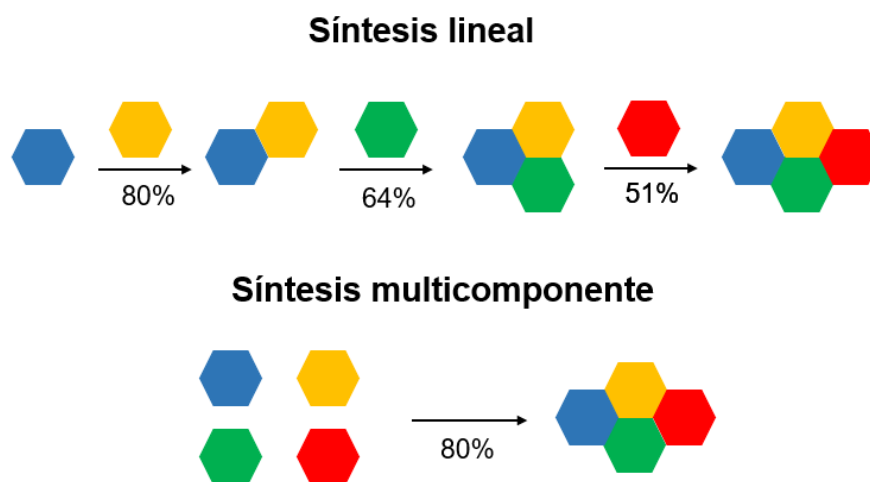


Figura 1.15 Comparativa entre la síntesis lineal y la síntesis multicomponente (23).

La simplicidad y la rapidez, entre otros aspectos, hacen de las RMC una excelente herramienta para la síntesis de nuevos compuestos, permitiendo la preparación de compuestos con pequeñas variaciones estructurales. Esto genera un gran interés en el ámbito del descubrimiento de fármacos, debido a la elevada capacidad exploratoria de las RMC.

1.6.3 Reacción de Biginelli

Reacción multicomponente descubierta en el año 1893 por el químico italiano Pietro Biginelli (23). La primera versión de la reacción fue utilizando como compuestos de partida benzaldehído, urea y acetoacetato de etilo en etanol a reflujo y con catálisis ácida, obteniendo a partir de esto como producto mayoritario el 6-metil-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etilo (25) (Figura 1.16).

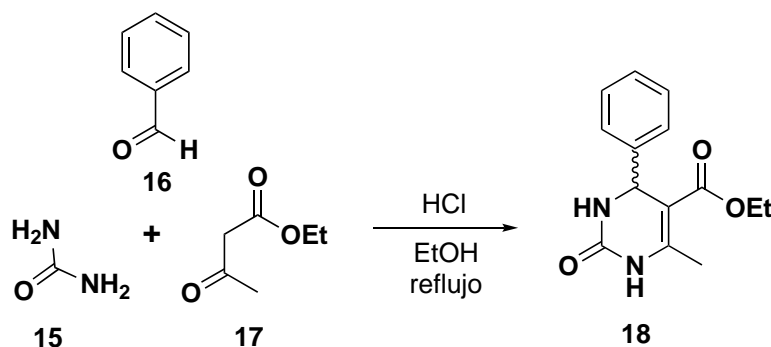


Figura 1.16 Primera reacción de Biginelli (24).

A partir de esa primera reacción se verificó el potencial sintético de la transformación mediante la variación de sus tres componentes (Figura 1.17). Ésta consiste en usar β -cetoésteres, aldehídos y un derivado de la urea para obtener 3,4-dihidropirimidin-1(H)-onas (DHP) (24). Además, permite explorar la reactividad de otro tipo de compuestos que mantengan semejanza química y estructural con estos tres grupos funcionales de partida. Los derivados del grupo β -cetoéster pueden ser sustituidos por grupos cetona, que presentan menos reactividad, la urea puede ser sustituida por tiourea o por compuestos con núcleo de guanidina y en el caso del aldehído, se pueden presentar diferentes variantes a parte de los aromáticos, como los alifáticos y los heterocíclicos (24,26).

Lo mismo ocurre con los catalizadores empleados para la reacción, que, en las últimas décadas se ha registrado un crecimiento exponencial hasta llegar a presentar más de

300 tipos diferentes (27). Aunque la mayoría de ellos son ácidos de Lewis, destacan otro tipo de catalizadores con técnicas innovadoras como las nanopartículas de cobre (28) o incluso a nivel enzimático en levaduras (29). La gran variabilidad estructural permitida, además de la baja dificultad de la reacción, facilita su uso como herramienta para el descubrimiento de nuevos fármacos.

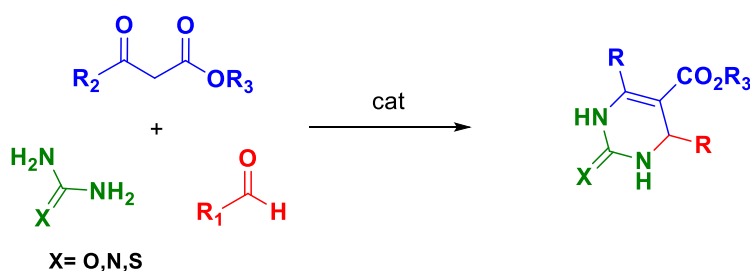


Figura 1.17 Esquema general de la reacción de Biginelli (cat = catalizador).

1.6.3.1 Mecanismo de reacción

A lo largo de los años el mecanismo de la reacción de Biginelli ha sido tema de debate. Los tres mecanismos más relevantes propuestos para la transformación deben su nombre al tipo de compuesto intermedio de reacción supuestamente formado. Cabe destacar que los diferentes mecanismos se diferencian en la pareja de precursores (e intermedios clave) que inician la secuencia que conduce al producto final:

1. **Mecanismo imino:** como bien dice el nombre, el producto intermedio relevante es una imina. Se da reacción entre la urea (a) y un aldehído (b) que forman una imina (i), la cual reacciona con el β-cetoéster (c) para finalmente formar la DHP (d) tras sufrir un proceso de ciclación intramolecular (Figura 1.18) (27).
2. **Mecanismo enamina:** este mecanismo propone la reacción de la urea (a) con el β-cetoéster para generar una enamina, (ii) que reaccionará con el aldehído para formar la DHP (d) tras sufrir un proceso de ciclación intramolecular (Figura 1.19) (27).
3. **Mecanismo Knoevenagel:** se produce una condensación de Knoevenagel entre el aldehído (a) y el β-cetoéster formando un aducto de Knoevenagel (iii) (24) que reacciona con la urea (c) para formar la DHP (d) tras sufrir un proceso de ciclación intramolecular (Figura 1.20).

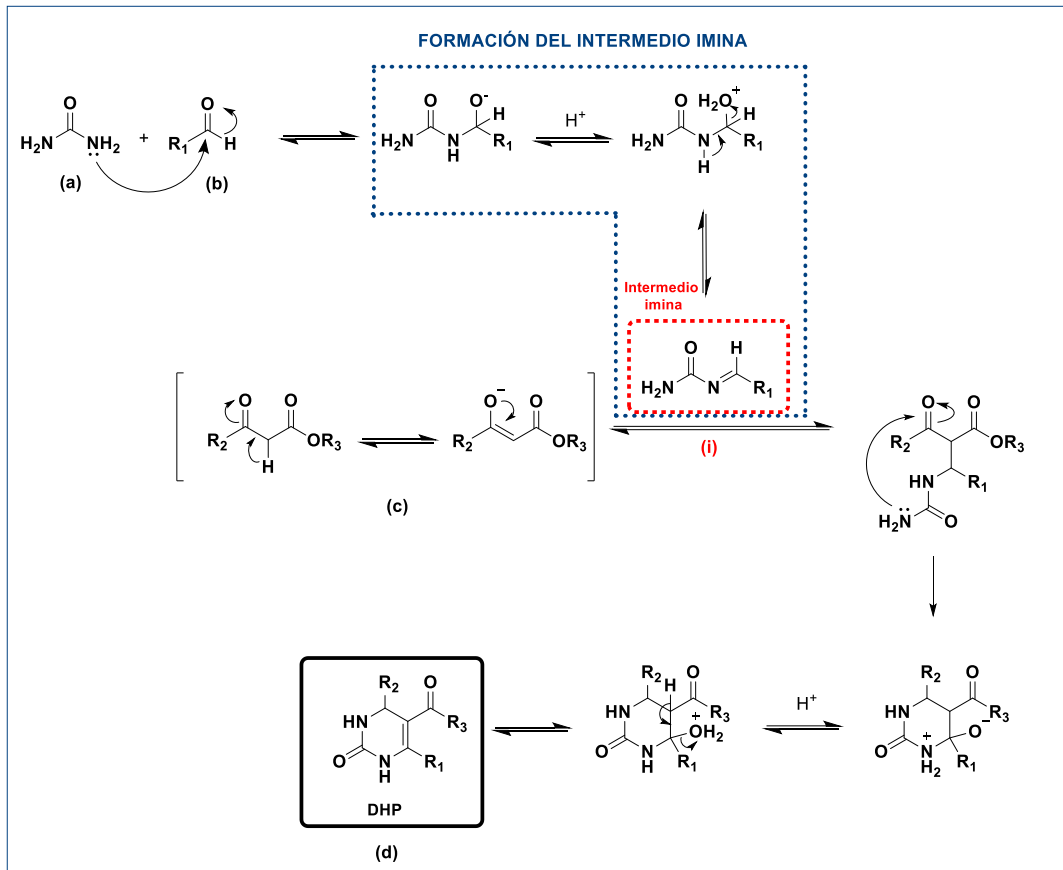


Figura 1.18 Mecanismo imino.

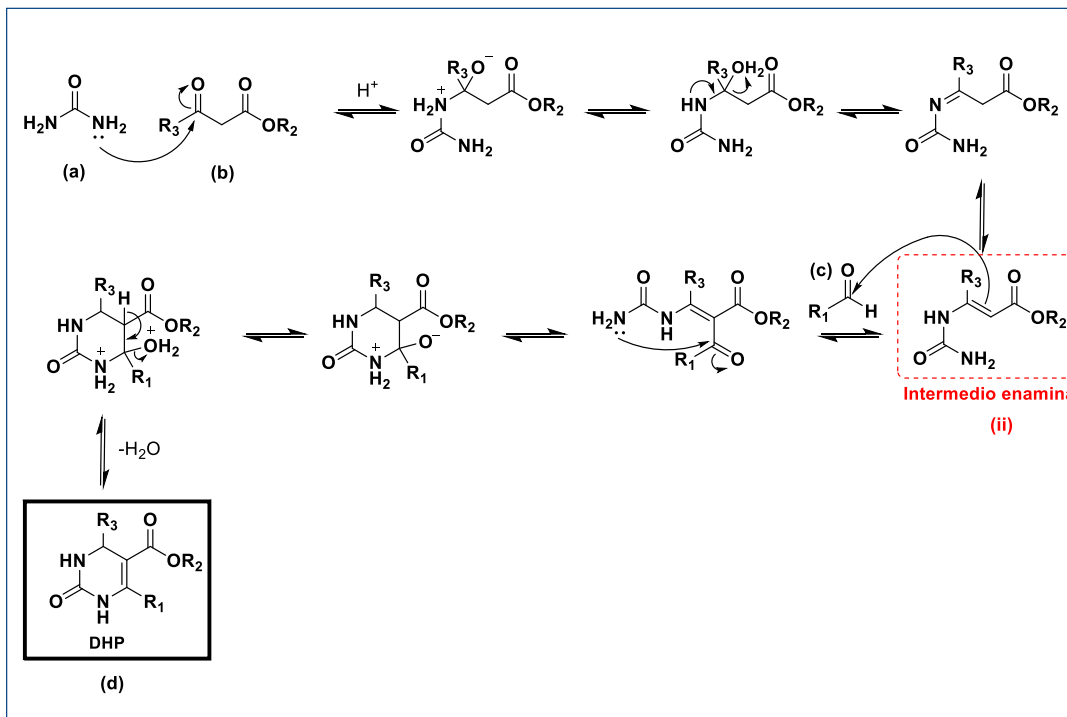


Figura 1.19 Mecanismo enamina.

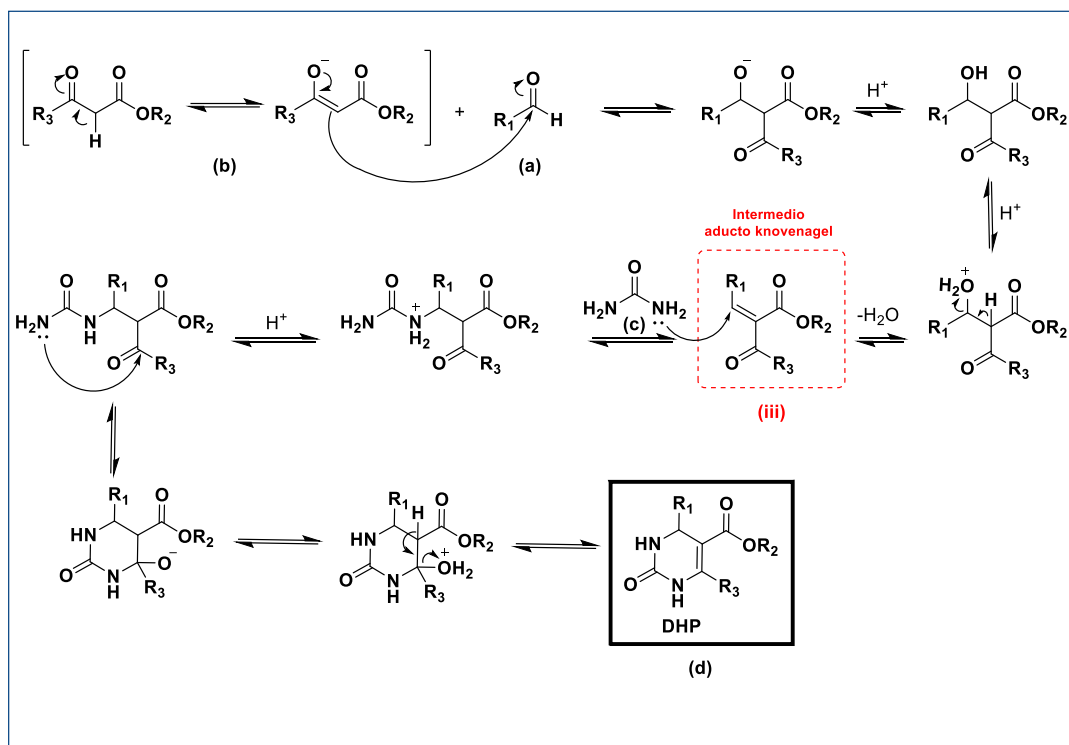


Figura 1.20 Mecanismo Knoevenagel.

En 1933 Folkers y Johnson propusieron los posibles intermedios de la reacción (30). Cuatro décadas después, en el año 1973, destacaron los estudios de Sweet y Fissekis que propusieron el mecanismo de Knoevenagel, ya que defendían que inicialmente se producía una condensación (31). Sin embargo, no fue hasta el año 1997 cuando Kappe, mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), descubrió la presencia mayoritaria del intermedio imina (32). Esto demostró que el mecanismo predominante de la reacción de Biginelli es el **mecanismo imina**.

1.6.3.2 Estereoquímica en la reacción de Biginelli.

Los compuestos obtenidos en la reacción de Biginelli son asimétricos, por lo que en dicha reacción se obtienen mezclas racémicas (27). Esto presenta gran relevancia en la química farmacéutica, puesto que en muchas ocasiones uno de los dos enantiómeros es el que presenta la mayor actividad farmacológica (eutómero) e incluso uno de los dos enantiómeros puede causar efectos contrarios al terapéutico y ser dañino (33,34). Debido a esto, es importante buscar métodos para poder separar ambos enantiómeros o variantes enantioselectivas y así poder mejorar la afinidad del compuesto por el receptor (ya que uno de los dos es inactivo o prácticamente inactivo)

y evitar reacciones adversas no deseadas, como en el caso de la talidomida, que la forma S produce malformaciones fetales, mientras que la R produce el efecto farmacológico deseado que es el de sedación (33).

Para poder separar los enantiómeros se presentan diferentes metodologías dentro de las cuales la más empleada es el HPLC quiral (35).

1.7 Objetivos del Trabajo Fin de Grado

1.7.1 Antecedentes

El potencial terapéutico derivado del bloqueo del receptor A_3 ha estimulado el desarrollo de nuevos antagonistas sintéticos. En anteriores trabajos de nuestro grupo hemos identificado y optimizado series de antagonistas A_3 derivados del sistema diaril-pirimidina (4,6-diaril-pirimidina-2-acilamina o 2,4-diaril-pirimidina-6-acilamina) (Figura 1.21).

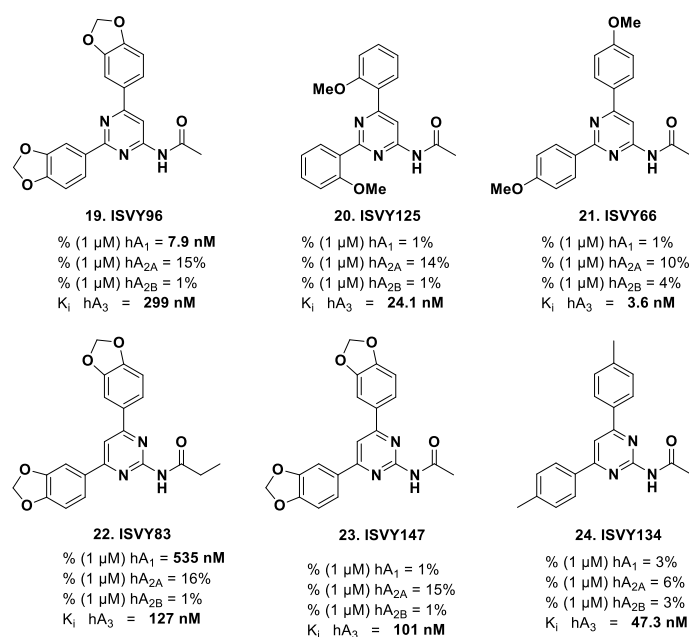


Figura 1.21 Ejemplos y datos farmacológicos de antagonistas del receptor A_3 obtenidos en anteriores trabajos (5).

Los modelos computacionales de la interacción de estos ligandos con el receptor A_3 apuntan la importancia de los dos residuos metoxifenílicos, el anillo central y el grupo amida exocíclico para su óptima fijación al sitio ortostérico.

Posteriores estudios en esta serie nos han permitido identificar una región en el receptor (círculo rojo *Figura 1.22*) que podría ser ocupada por una cadena carbonada (**compuesto 25**) o adicionando otros anillos al heterociclo central. Dado que el grupo NH exocíclico es importante para la unión al receptor, hemos propuesto el uso de anillos tipo 1,4-dihidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pirimidina.

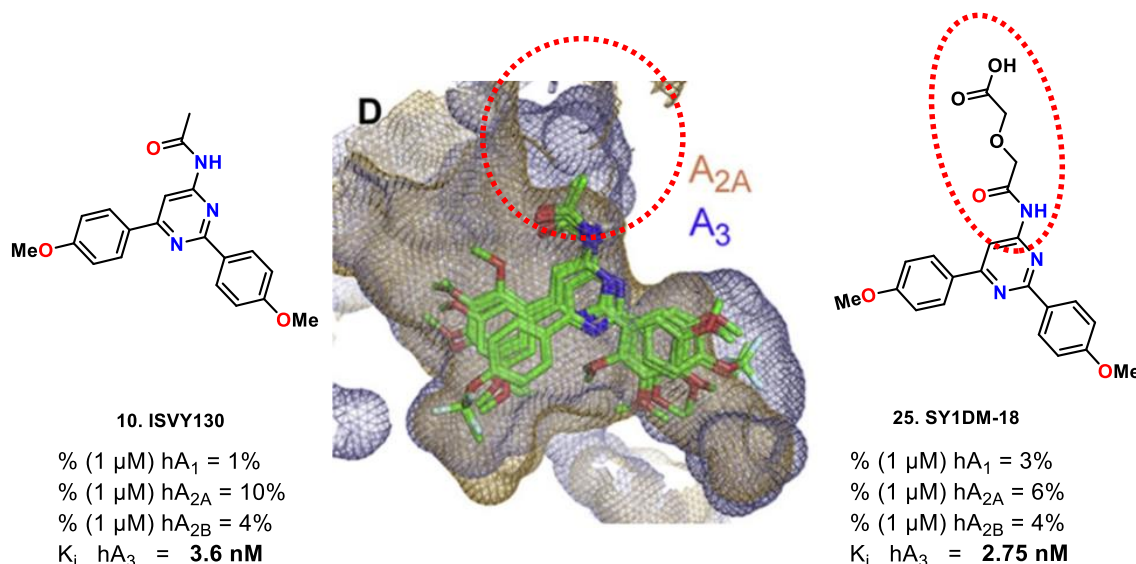


Figura 1.22 Izquierda: ISVY-130, antagonista selectivo A₃. Centro: simulación computacional de unión al receptor A₃. Derecha: SY1DM-18, antagonista selectivo A₃.

El esqueleto de pirimidina es una estructura que funciona bien en ligandos para los otros AR. Específicamente, en el caso del A_{2B}AR, partiendo de estructuras de tipo pirimidínico con buena afinidad (**SY1AF-30**(36)), se ha llegado a estructuras tricíclicas de tipo 1,4-dihidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pirimidina con una notable mejoría en la afinidad (**ISAM-140** (13)), manteniendo los radicales típicos para el A_{2B}AR.

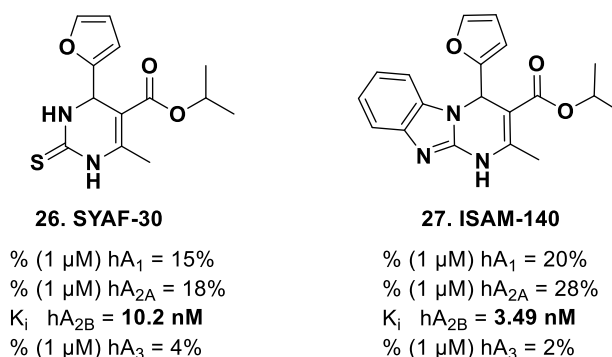


Figura 1.23 Izquierda: SYAF-30, antagonista selectivo A_{2B}. Derecha: ISAM-140 antagonista selectivo A_{2B} con mejor afinidad debido al esqueleto tricíclico.

1.7.2 Objetivos

El objetivo principal del trabajo de fin de grado es el desarrollo de nuevos antagonistas selectivos del receptor A₃ derivados del sistema 1,4-dihidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pirimidina. La estructura general y diversidades de los compuestos diseñados se representan en la *Figura 1.24*.

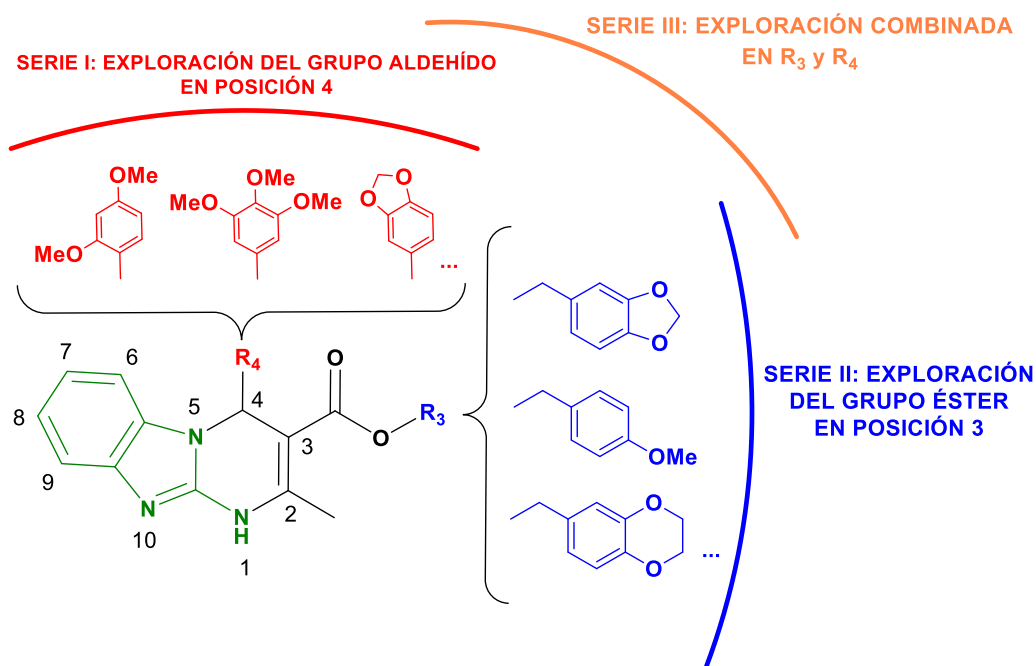


Figura 1.24 Estructura general de las 3 series objetivo.

Para abordar el trabajo sintético y organizar el análisis de la relación estructura-actividad, los compuestos diseñados se dividieron en 3 series (I, II y III):

- **Serie I exploración del grupo aldehído en posición 4:** sintetizar nuevos compuestos mediante la sustitución de diferentes aldehídos aromáticos en la posición 4 del sistema triccíclico 1,4-dihidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pirimidina. En la posición 3 se mantuvo el grupo metilendioxfenilo debido a que es un farmacóforo muy común en los ligandos A₁. Fijamos dicho grupo para explorar la variabilidad en la posición 4.
- **Serie II exploración del grupo éster en posición 3:** sintetizar nuevos compuestos mediante la sustitución de diferentes ésteres aromáticos en la posición 3 del sistema triccíclico 1,4-dihidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pirimidina. En la posición 4 se mantuvo el grupo metilendioxfenilo debido a que es un

farmacóforo muy común en los ligandos A₁. Fijamos dicho grupo para explorar la variabilidad en la posición 3.

- **Serie III exploración combinada de R₃ y R₄:** sintetizar nuevos compuestos mediante la sustitución simultánea en la posición 3 y 4 del esqueleto tricíclico.

2. Materiales y métodos

2.1 Esquema del proceso

El proceso general de obtención de ligandos empleando reacciones multicomponente sigue el esquema mostrado en la *Figura 2.1*.

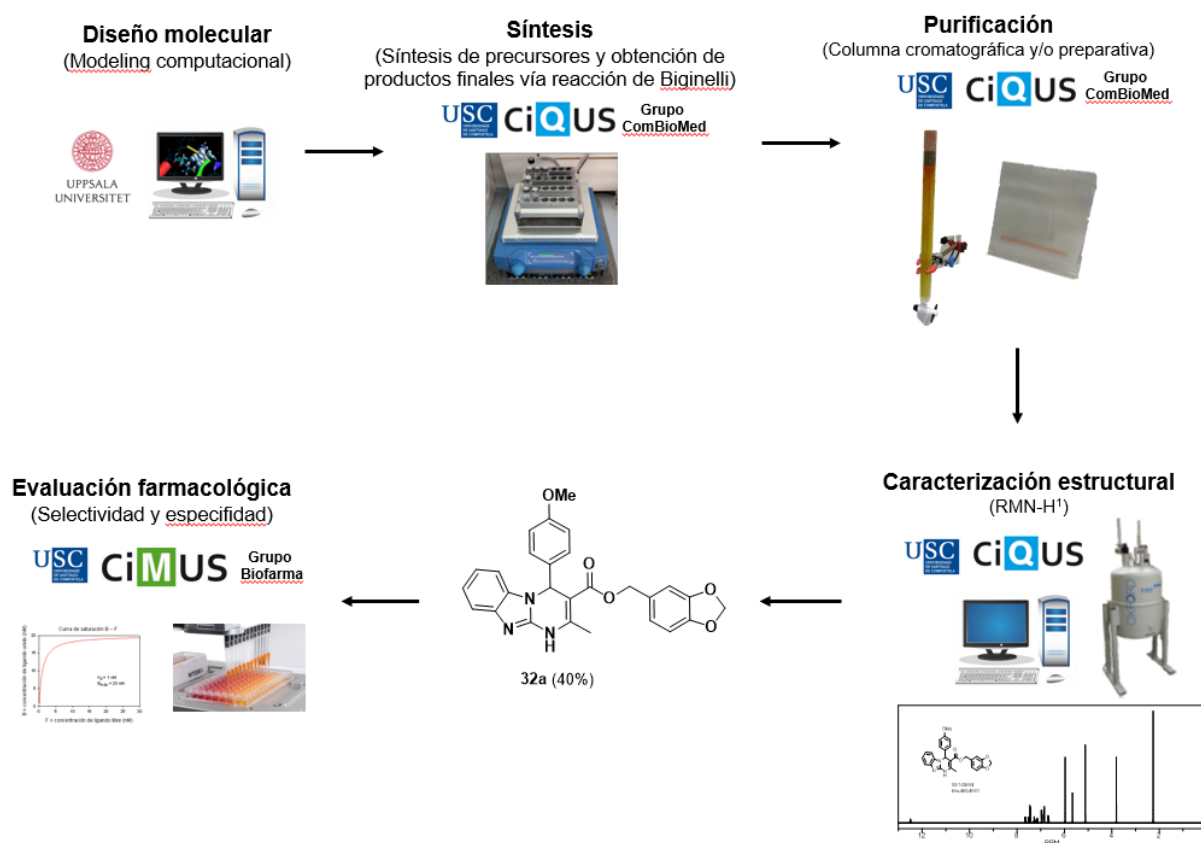


Figura 2.1 Esquema general del proyecto.

En los siguientes apartados, se explica detalladamente cada paso que se ha realizado, junto con la instrumentación y la metodología.

2.2 Síntesis

La estrategia sintética que se ha llevado a cabo en este proyecto consistió en emplear la reacción de Biginelli para obtener el compuesto tricíclico final con los sustituyentes requeridos. Como se ha mencionado en la introducción, esta RMC requiere tres reactivos: un aldehído, un compuesto β -cetoéster y urea, pero en nuestro caso, hemos sustituido la urea por un derivado, el 2-aminobenzimidazol, para poder formar el compuesto tricíclico (27). Esta reacción requiere de la presencia de un catalizador, en

nuestro caso ácido cloroacético, y tetrahidrofurano (THF) como disolvente (*Figura 2.2*). La mezcla es introducida en un matraz Kimble y se calienta a 90°C durante 24 horas en un equipo de agitación orbital (PLS) (*Figura 2.3*).

Para comprobar el fin de la reacción se ha empleado cromatografía en capa fina (TLC), utilizando cromatofolios de gel de sílice DC-60 F₂₅₄ de Merck, empleando como revelador luz UV (254 y 360 nm) y una solución de *p*-anisaldehído.

El 2-amino-benzoimidazol **28** y los aldehídos utilizados **29a-k** son comerciales, sin embargo, los β-cetoéster **30** fueron sintetizados en el laboratorio siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 2.2.1.

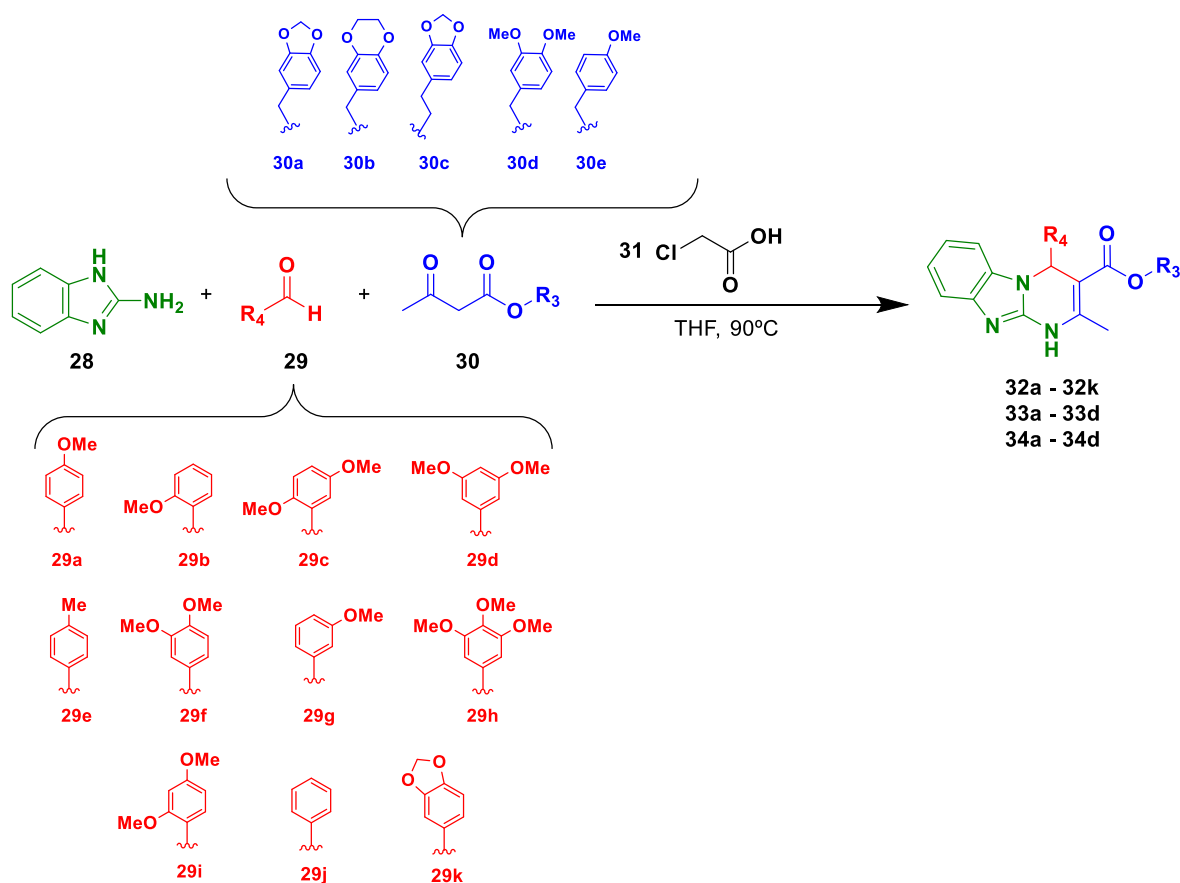


Figura 2.2 Esquema general de síntesis de los compuestos tricíclicos finales.

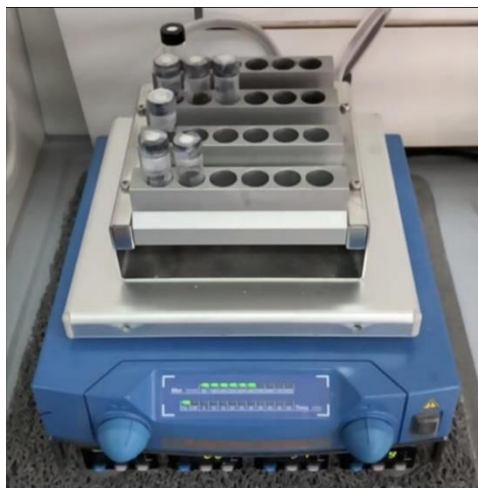


Figura 2.3 PLS con viales Kimble de 7 mL.

2.2.1 Preparación de los β -cetoésteres

Una mezcla de la 2,2,6-trimetil-4H-1,3-dioxin-4-ona **35** (1 eq, 50 mmol) y el alcohol **36a-e** deseado (1 eq, 50 mmol) en 5 mL de tolueno se mantuvo en agitación a 150°C durante 12 horas en un matraz de reacción. Comprobando que la reacción ha finalizado por cromatografía en capa fina (TLC), se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido fue purificado por columna cromatográfica (*n*-hexano/Acetato de etilo 5:1-10:1). Los compuestos **30a-e** se aislaron como aceites y se caracterizaron mediante RMN-¹H. Los rendimientos de la síntesis oscilan entre el 60-85%.

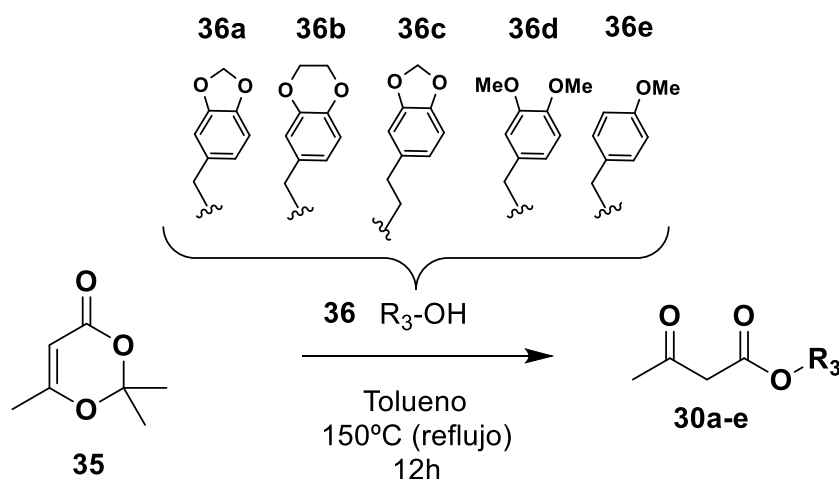


Figura 2.4 Esquema general de síntesis de los precursores.

A modo de ejemplo, se muestran los datos de RMN-¹H de la molécula **30a**, representativa de esta serie.

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 6.88 – 6.70 (m, 4H), 5.95 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H), 5.06 (d, *J* = 1.7 Hz, 3H), 3.47 (s, 2H).

2.2.2 Preparación de los derivados tricíclicos

Los productos finales se sintetizaron siguiendo el esquema sintético descrito y la metodología general para las tres series. Una mezcla de 1,5 equivalentes de **2-amino-5-benzoimidazol**, 1 equivalente de **aldehído**, 1 equivalente de **β-dicarbonílico** y 0,5 equivalentes de **ácido cloroacético** en 2 mL de **THF** se colocó en un vial Kimble. La mezcla se calentó a 90°C durante 12 horas en un sintetizador orgánico (PLS). Comprobando que la reacción ha finalizado por TLC, se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido fue purificado por columna cromatográfica (MeOH/DCM 0.5%-3%) y/o preparativa (MeOH/DCM 1%) (Apartado 2.3) obteniendo los compuestos con un rendimiento entre el 20-50%. Finalmente se realizó la caracterización estructural de los compuestos mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN-¹H) (Apartado 2.4 y 3.3).

2.2.2.1 Serie I: exploración del grupo aldehído en posición 4

Siguiendo la metodología general descrita y el esquema sintético (*Figura 2.5*) se han preparado los compuestos **32a-k**.

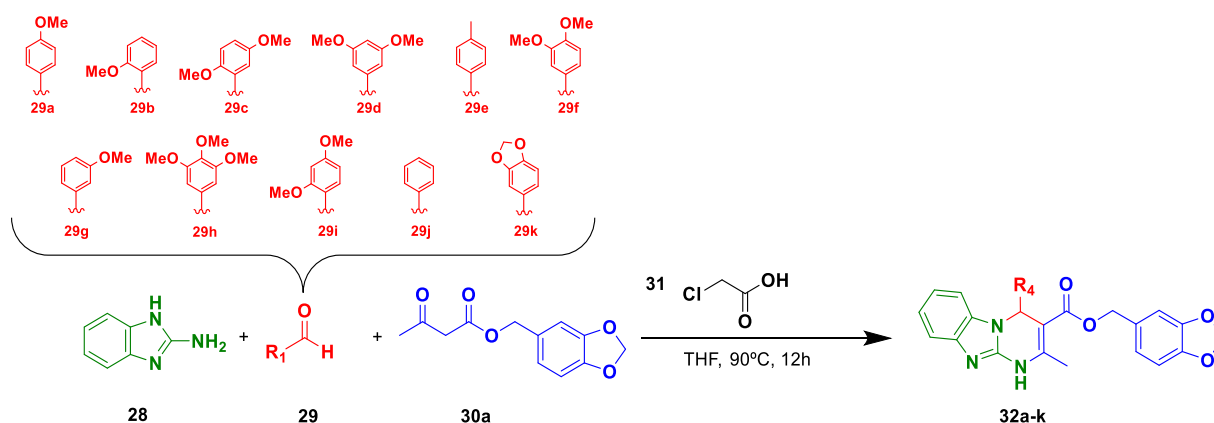


Figura 2.5 Esquema general de síntesis de la serie I.

A modo de ejemplo, se muestran los datos de RMN-¹H de tres moléculas representativas de esta serie, **32b** y **32h** respectivamente.

2.2.2.2 Serie III: exploración combinada de R₃ y R₄

Siguiendo la metodología general descrita y el esquema sintético de la *Figura 2.7* se han preparado los compuestos **34a-d**.

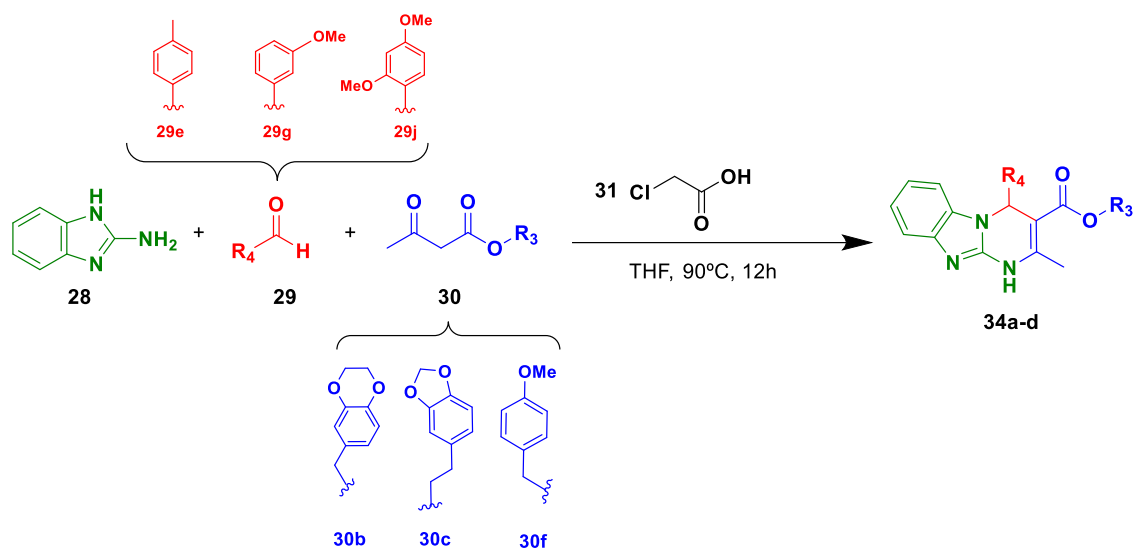


Figura 2.7 Esquema general de síntesis de la serie III.

A modo de ejemplo, se muestran los datos de RMN-¹H de la molécula **34a**, representativa de esta serie.

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.29 – 7.09 (m, 5H), 7.05 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 6.88 – 6.69 (m, 3H), 6.40 (s, 1H), 5.00 (s, 2H), 4.28 (d, *J* = 1.3 Hz, 4H), 2.71 (s, 3H), 2.26 (s, 3H).

2.3 Purificación

Una vez finalizada la reacción, la mezcla resultante se purificó por cromatografía en columna (usando como fase estacionaria gel de sílice de Acros de 40-60 μm y como fase móvil una mezcla de MeOH/DCM (0,5-3%)) y/o cromatografía preparativa empleando gel de sílice de Acros de 40-60 μm como fase estacionaria y usando como fase móvil una mezcla de MeOH/DCM (1%) (*Figura 2.8*).

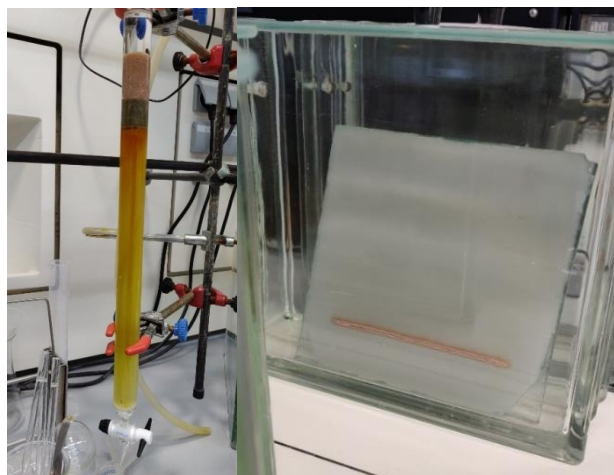


Figura 2.8 Ejemplos de cromatografía en columna (izquierda) y preparativa (derecha).

2.4 Caracterización estructural de los compuestos

La Resonancia Magnética Nuclear es una herramienta analítica usada, además de en la medicina clínica, para apoyar la síntesis química y poder confirmar si se ha obtenido exactamente la estructura molecular que se buscaba.

Esta técnica consiste en generar un campo magnético dentro de una bobina generadora, irradiar la muestra mediante una bobina emisora y detectar la absorción magnética que efectúe esta muestra por una bobina receptora y procesando después los datos mediante un software (37) . Dentro de los espectros más utilizados en la química orgánica destacan el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN- ^{13}C) y el de protón (RMN- ^1H).

Los espectros de RMN- ^1H se realizaron en el Centro singular de Investigación en Química biológica y materiales moleculares de la Universidad de Santiago de Compostela (CiQUS). El modelo de espectrómetro que se usó es BRUKER AMX 300 (Figura 2.9). Dichos espectros se realizaron a temperatura ambiente, usando como disolvente CDCl_3 o DMSO-d_6 .

Una vez realizado el experimento, los espectros fueron procesados usando el software Mnova de Mestrelab research. Los desplazamientos químicos δ se indican en ppm. La multiplicidad de la señal generada se representa con las abreviaturas **s** (singulete), **d** (doblete), **t** (triplete), **q** (quintuplete), **m** (multiplete), **dd** (doble doblete) y **dt** (doble

triplete), seguido del número de protones para los que integra esa señal. Las constantes de acoplamiento (J) están medidas en Hertzios (Hz).



Figura 2.9 Varian 300 MHz Mercury (38).

2.5 Evaluación farmacológica

La evaluación farmacológica representa la etapa de comprobación de la capacidad que tiene la molécula analizada de unirse a un receptor sobreexpresado en una célula que funcionará como soporte.

Para los receptores de adenosina se realizan ensayos de **competición con radioligando**, que consiste en medir el desplazamiento que sufre un radioligando del receptor cuando se pone en contacto con 1 μM de disolución de la molécula que se analiza (39).

Las moléculas preparadas por el grupo ComBioMed son evaluadas farmacológicamente por el grupo Biofarma de la profesora María Isabel Loza en el Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS) y para cada subtipo de receptor de adenosina se utilizan diferentes células:

- **Receptor A₁**: las células utilizadas para los ensayos con el receptor A₁ son células ováricas de hámster chino (CHO) con sobreexpresión del receptor A₁ (CHO-A₁) marcadas con 2 nM [3H]DPCPX.
- **Receptor A_{2A}**: las células utilizadas para los ensayos con el receptor A_{2A} son células de cáncer cérvico-uterino (HeLa) con sobreexpresión del receptor A_{2A} (HeLa-A_{2A}) marcadas 3 nM de [3H]ZM241385.

- **Receptor A_{2B}**: las células utilizadas para los ensayos con el receptor A_{2B} son células renales de embrión humano (HEK-293) con sobreexpresión del receptor A_{2B} (HEK-293- A_{2B}) marcadas con 3 nM de 25 nM de [3H]DPCPX.
- **Receptor A₃**: las células utilizadas para los ensayos con el receptor A₃ son células de cáncer cérvico-uterino (HeLa) con sobreexpresión del receptor A₃ (HeLa-A₃) marcadas con 30 nM [3H]NECA.

Los resultados obtenidos del ensayo se expresan en porcentaje de desplazamiento del radioligando a concentración 1 μ M o en constante de afinidad (K_i). Esta constante representa la concentración a la cual se alcanza un porcentaje de desplazamiento del 50% del radioligando. La constante de afinidad se determina mediante curvas dosis-respuesta para los ligandos que muestran porcentajes de desplazamiento superiores al 70%.

Cuanto mayor es el porcentaje de desplazamiento o menores los valores de K_i , mayor afinidad presenta la molécula por el receptor. Respecto a la selectividad, ésta se considera comparando los valores de unión de la molécula a los cuatro subtipos de receptores de adenosina. Concretamente, una molécula selectiva y específica para el receptor A₃ tendrá buenos valores de afinidad para este receptor y bajos para el resto de los subtipos.

3. Resultados y discusión

3.1 Diseño de ligandos

Como indicamos anteriormente, el objetivo de este trabajo es el desarrollo de nuevos antagonistas selectivos del receptor A₃. Para ello tenemos como base un modelo refinado de la interacción del receptor A₃ con series de ligandos desarrollados anteriormente en nuestro grupo (Figura 3.1).

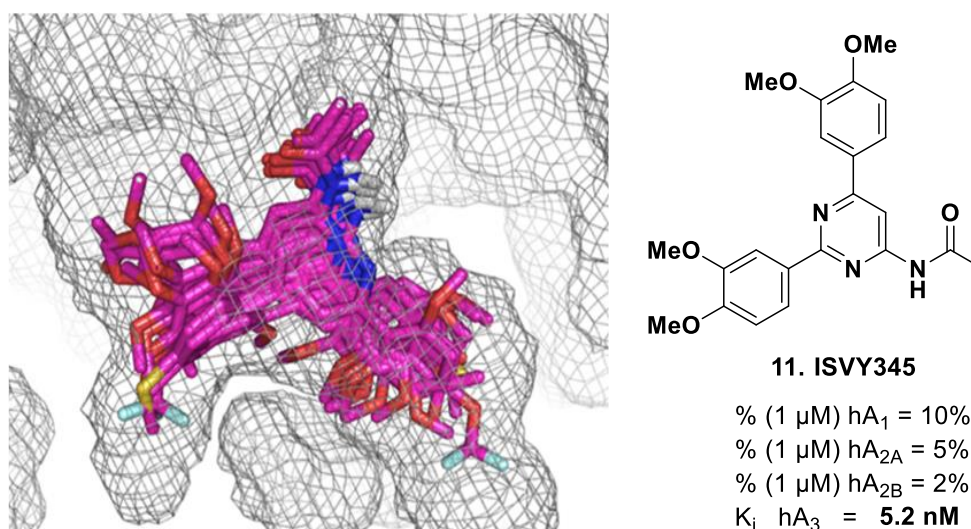


Figura 3.1 Simulación computacional comparativa del receptor A₃ (bolsillo lipofílico resaltado en azul) en la unión de análogos de ISVY-345 y datos farmacológicos (5,40).

El nuevo modelo sugiere que podríamos ocupar una cavidad poco explorada. Para ello propusimos transformar el anillo pirimidínico central en un triciclo (mediante la creación de un ciclo) (Figura 3.2).

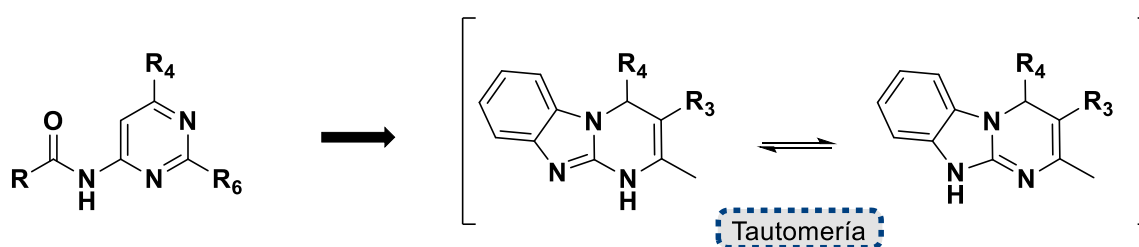


Figura 3.2 Heteroclación del núcleo pirimidínico para los compuestos del presente trabajo.

De esta forma se diseñaron los nuevos ligandos descritos en este trabajo. Los grupos de las posiciones R₃ y R₄ fueron elegidos entre los sustituyentes que mejor afinidad proporcionarían en series anteriores (Figura 3.3).

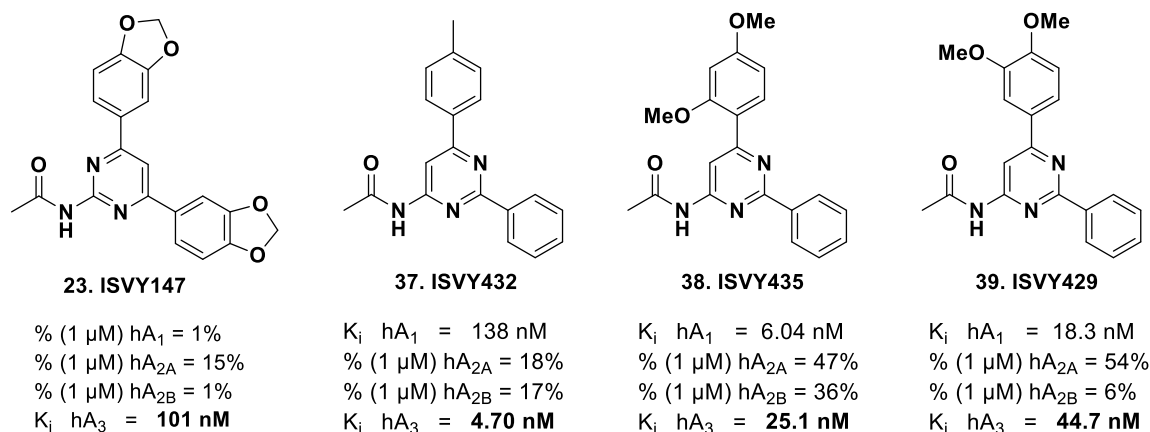


Figura 3.3 Compuestos antagonistas del receptor A₃ que tomaron como referencia para los sustituyentes en R₃ y R₄ de los compuestos del presente trabajo.

La elección del sistema tricíclico 1,4-dihidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pirimidina se debe también a su accesibilidad sintética mediante la reacción de Biginelli. Cabe destacar que nuestro grupo ha empleado esa reacción y este heterociclo para mejorar antagonistas selectivos del receptor A_{2B} (Figura 3.4).

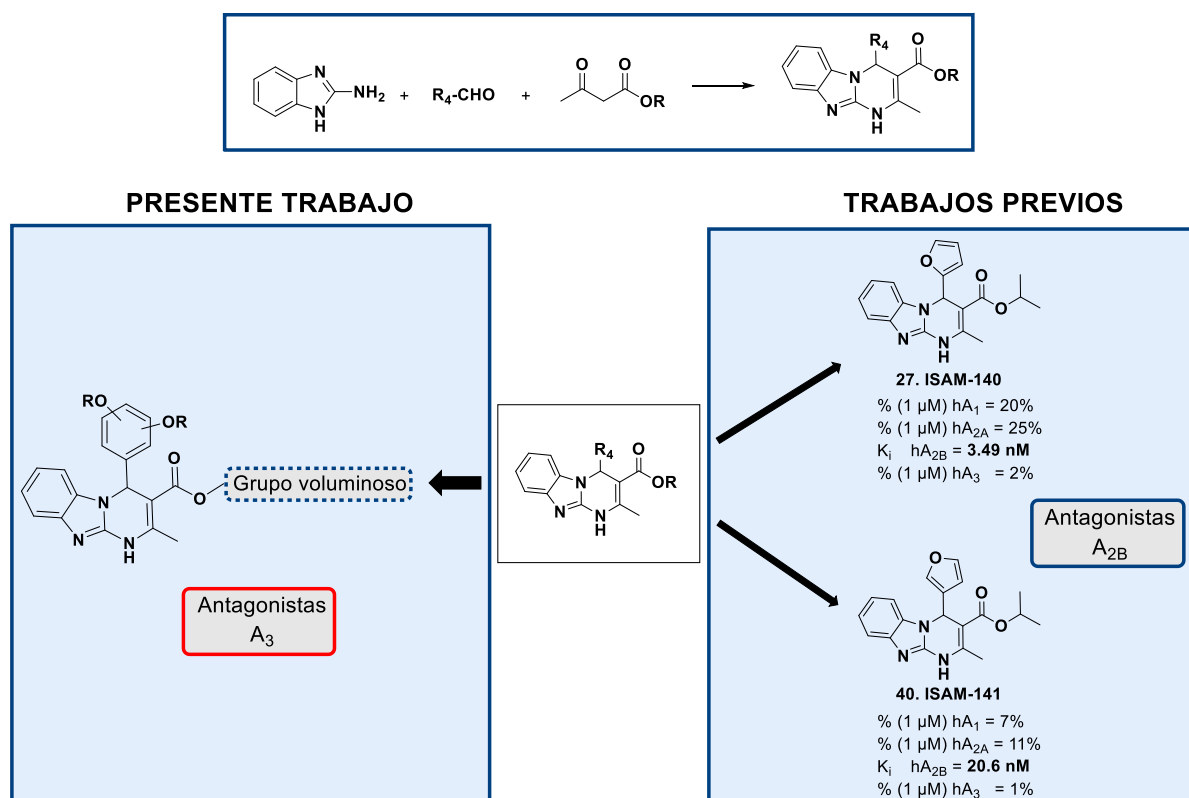


Figura 3.4 Comparativa estructural para obtener antagonismo A_{2B} o A₃ en el mismo sistema tricíclico (39).

Los estudios con el receptor A_{2B} nos han permitido verificar que los grupos óptimos para las posiciones R₄ y R₃ son un anillo heterocíclico pentagonal (furano o tiofeno) y un grupo etilo o isopropilo (*Figura 3.4*). En todos los datos hemos observado que cambios fuera de esos grupos conducen a la pérdida de la afinidad A_{2B}.

Aprovechando esas observaciones y las predicciones del modelo computacional, decidimos introducir en R₄ Y R₃ grupos voluminosos con residuos alcoxi (que proporcionan afinidad por el receptor A₃) (*Figura 3.3*).

A diferencia de anteriores series de ligandos A₃ de nuestro grupo (que tienen los grupos alcoxifenilo en posición 1,3) los nuevos compuestos aquí descritos tienen esos residuos en posiciones contiguas (1,2). En cualquier caso, los modelos computacionales sugieren que debido a la mayor flexibilidad del grupo en R₃ esa modificación sería bien tolerada (*Figura 3.5*).

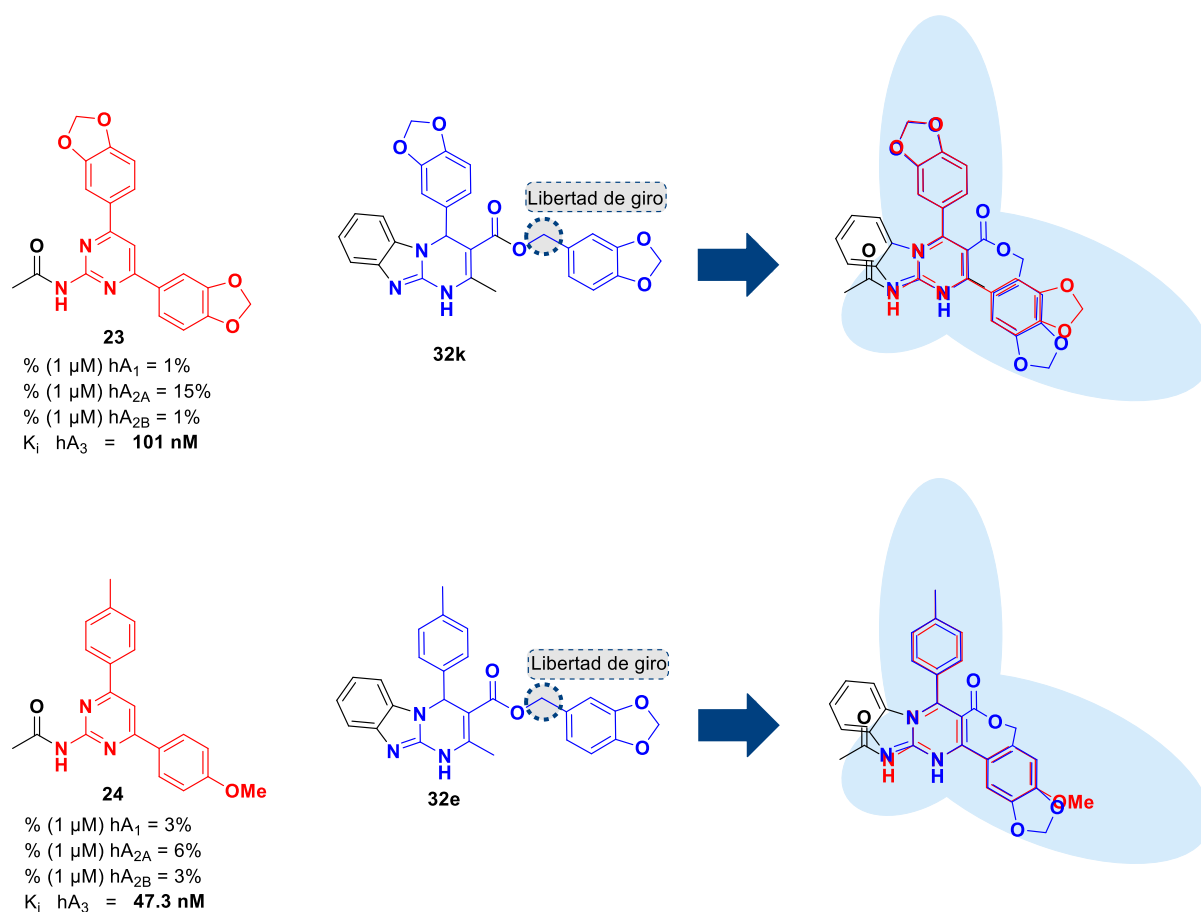


Figura 3.5 Comparativa 2D de disposición entre compuestos conocidos y obtenidos en este trabajo para su unión al receptor A₃.

3.2 Precursores obtenidos y caracterización estructural

Para la síntesis de los ligandos diseñados se requirió obtener los β -cetoésteres **30a-e**. En la *Figura 3.6* se muestran los 5 compuestos sintetizados, el método preparativo usado y sus rendimientos.

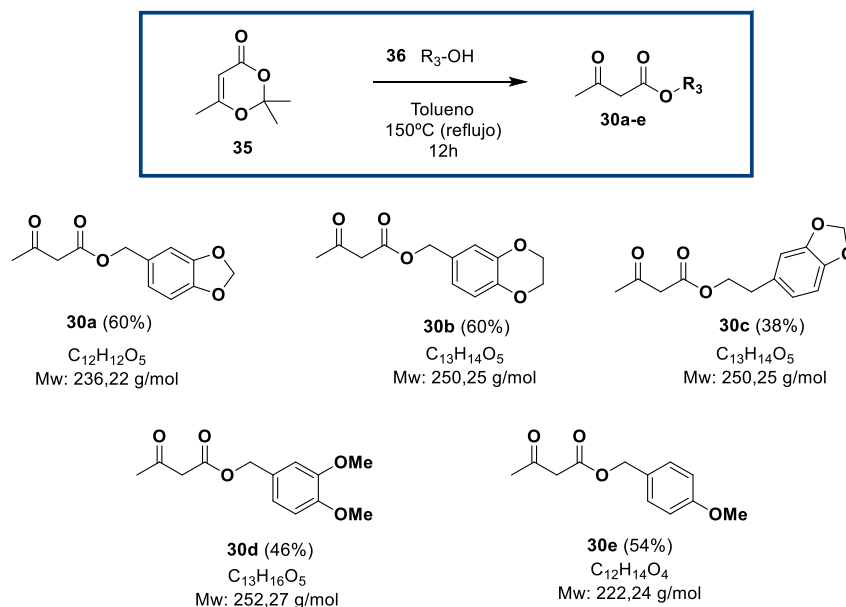


Figura 3.6 Precursores obtenidos

Caracterización estructural

A modo de ejemplo, se muestra el espectro de RMN- H^1 de la molécula **30b**, representativa de esta serie (*Figura 3.7*).

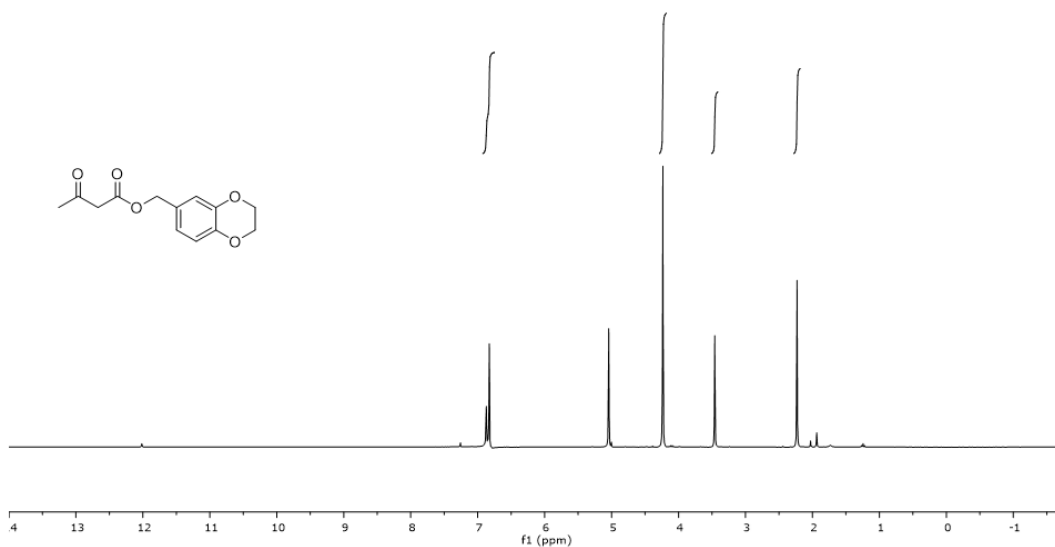


Figura 3.7 Espectro de RMN- 1H del compuesto **30b**.

3.3 Obtención de compuestos finales y caracterización estructural

3.3.1 Serie I: exploración del grupo aldehído en posición 4

Para la síntesis de los compuestos de esta serie se mantuvo fijo el grupo éster y se varió el sustituyente en R₄.

En la *Figura 3.8* se muestra la colección de 11 compuestos sintetizados siguiendo el esquema general de la reacción de Biginelli. En todos los casos se emplea ácido cloroacético como catalizador. Las transformaciones conducen a los compuestos deseados con rendimientos que oscilan entre el 15 y el 52%.

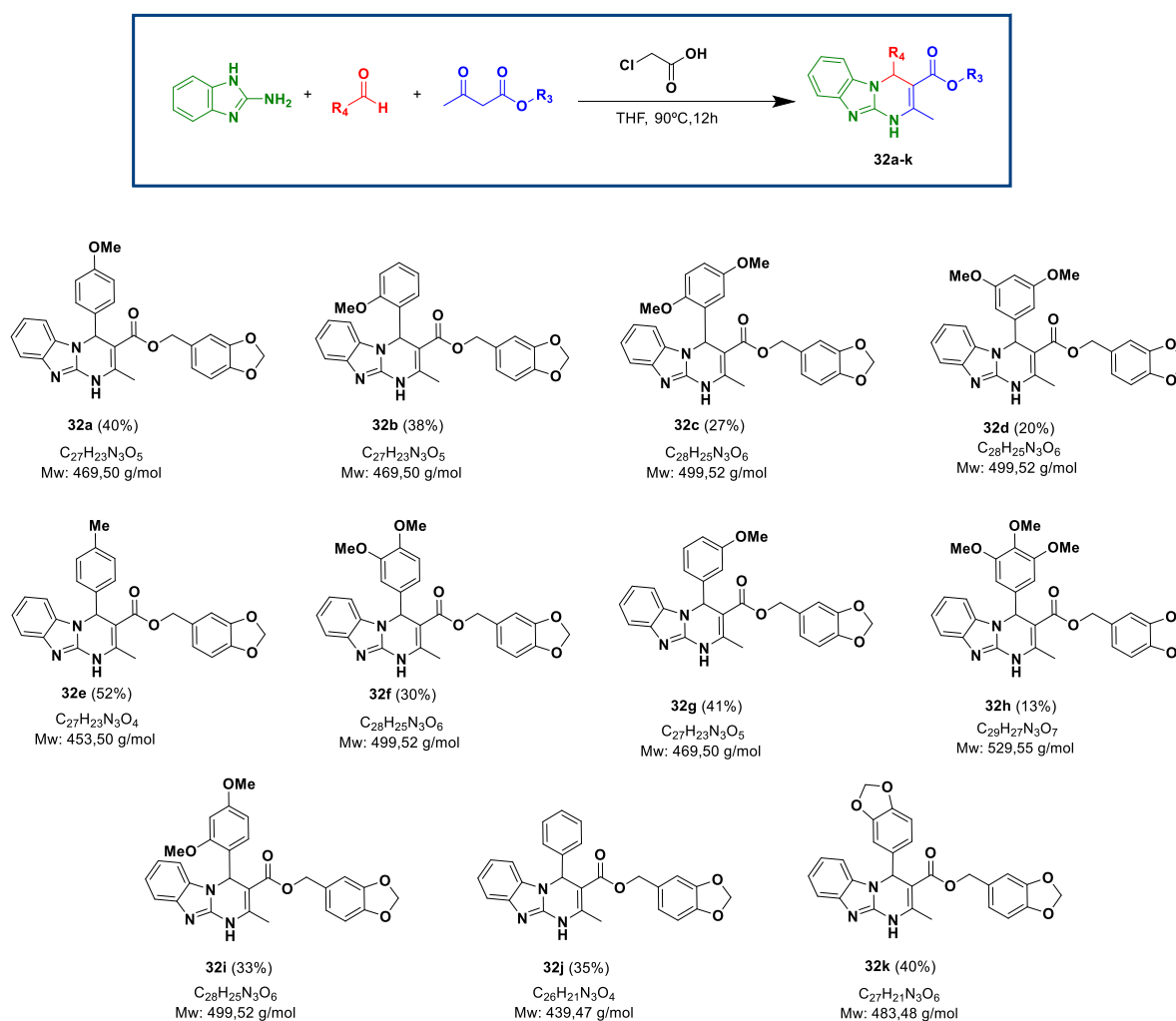


Figura 3.8 Esquema sintético y compuestos de la serie I.

Los compuestos obtenidos contienen uno o varios grupos metoxilo en diferentes posiciones del anillo bencénico de la posición 4.

Caracterización estructural

A modo de ejemplo de esta serie, se muestran los espectros de RMN- ^1H de las moléculas **32b** y **32h** (Figura 3.9 y 3.10).

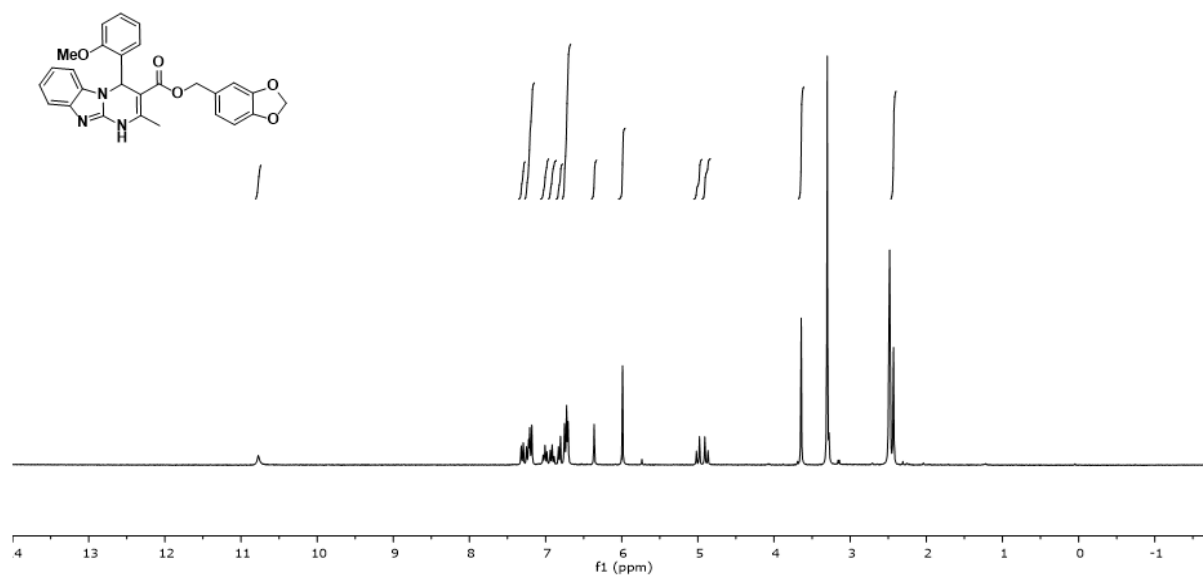


Figura 3.9 Espectro de RMN- ^1H del compuesto **32b**.

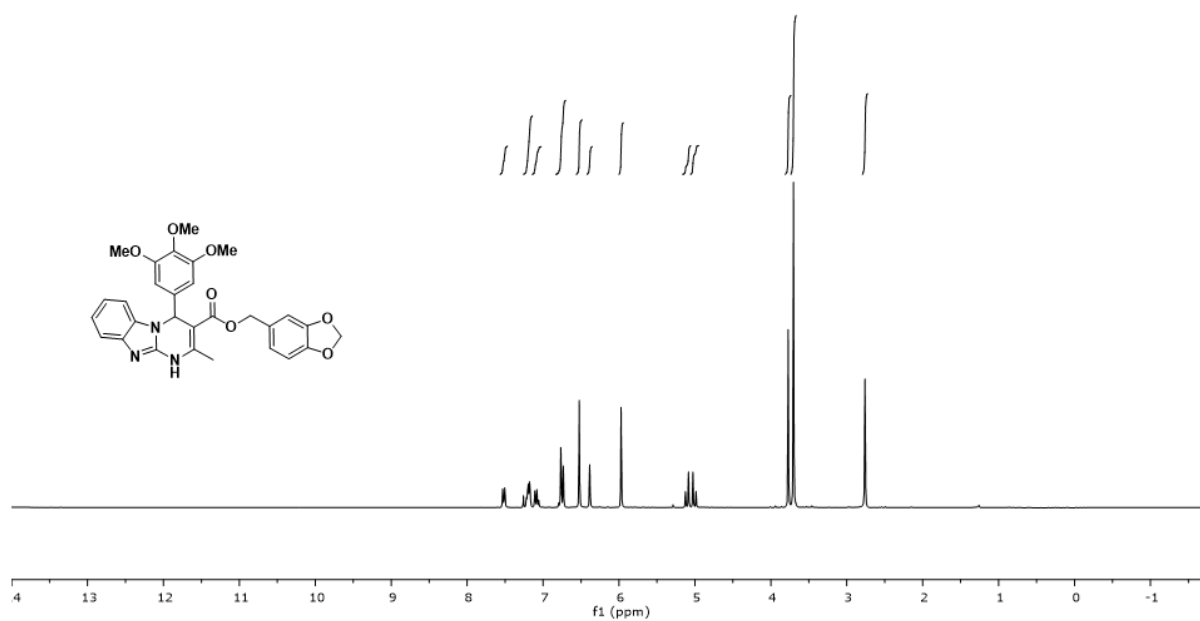


Figura 3.10 Espectro de RMN- ^1H del compuesto **32h**.

3.3.2 Serie II: exploración del grupo éster en posición 3

En la *Figura 3.11* se muestran los 4 compuestos sintetizados siguiendo el esquema general de síntesis. En esta serie hemos variado el sustituyente en la posición 3 del sistema tricíclico, manteniendo invariable el resto de las posiciones en el anillo heterocíclico (*Figura 2.6*). Los reactivos usados para obtener los diferentes sustituyentes fueron precursores dicarbonílicos preparados siguiendo el esquema de síntesis de la *Figura 2.4*. Como se observa en la *Figura 3.3*, la variación en el residuo carbonado del éster conlleva la expansión (5→6) del anillo en el piperonal (**33a**), la eliminación del anillo (**33c** y **33d**) o el alargamiento de la cadena que une el oxígeno al anillo aromático (**33b**). Las transformaciones conducen a los compuestos deseados con rendimientos que oscilan entre el 22 y el 45%.

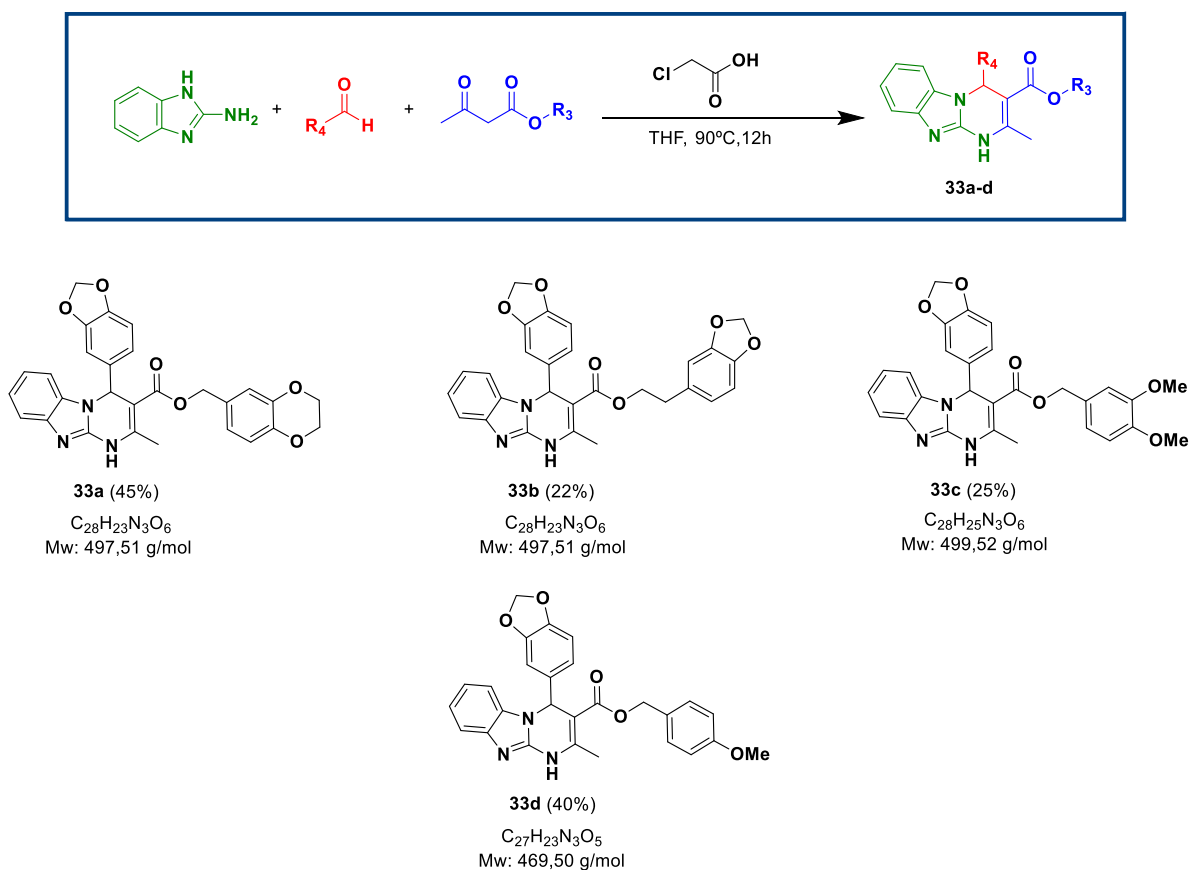


Figura 3.11 Esquema sintético y compuestos de la serie II.

Caracterización estructural

A modo de ejemplo de esta serie, se muestran los espectros de RMN- ^1H de las moléculas **33a** y **33d** (Figura 3.12 y 3.13).

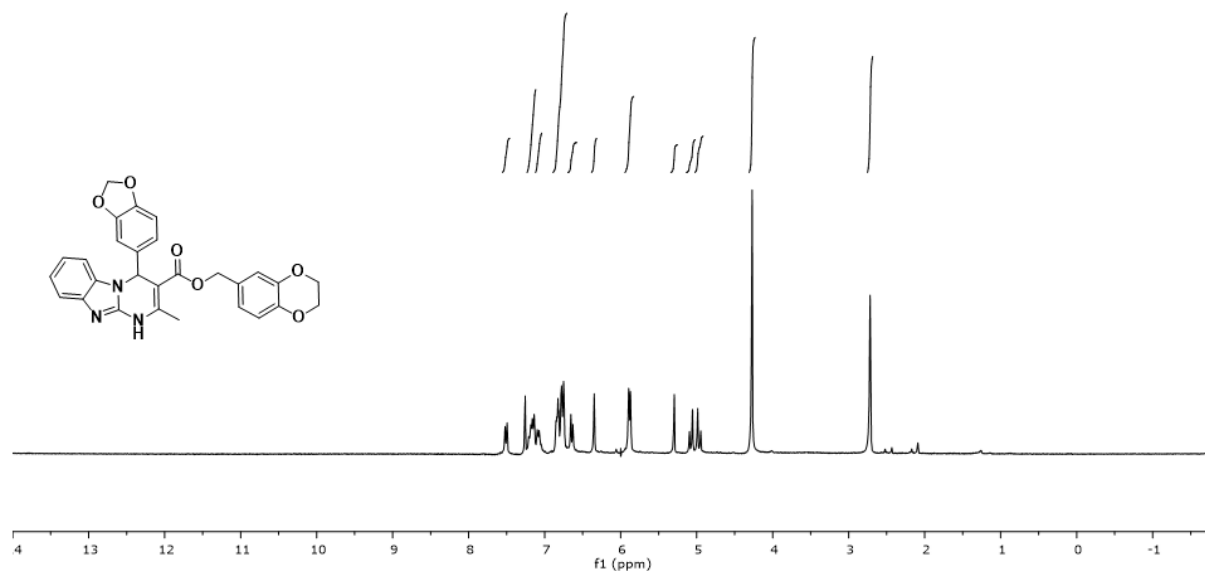


Figura 3.12 Espectro de RMN- ^1H del compuesto **33a**.

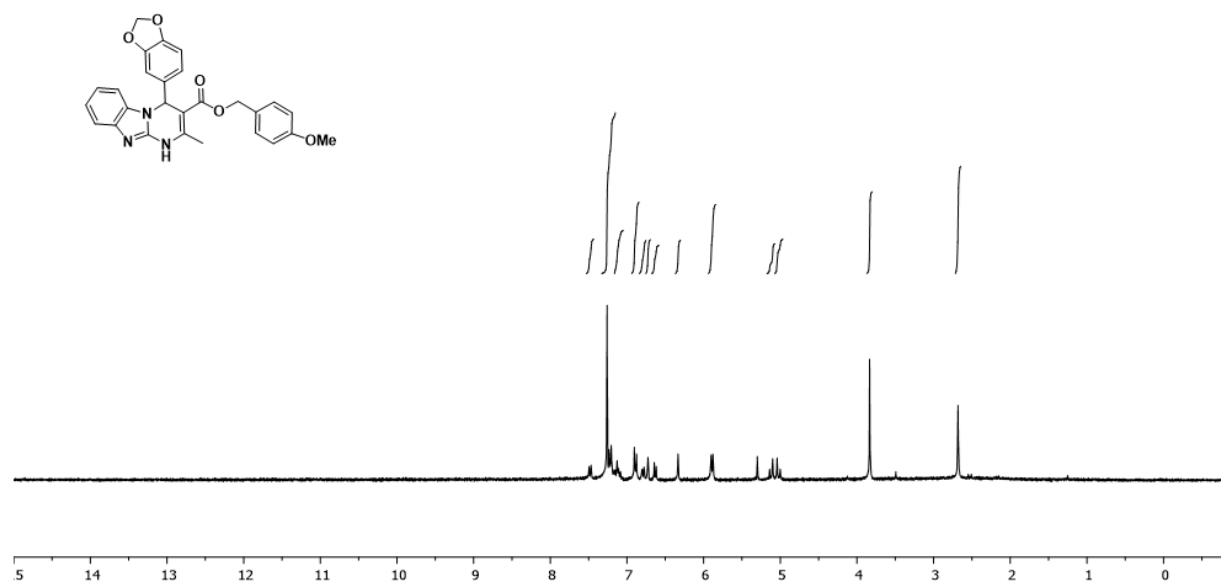


Figura 3.13 Espectro de RMN- ^1H del compuesto **33d**.

3.3.3 Serie III: exploración combinada en R₃ y R₄

En la *Figura 3.14* se muestran los 4 compuestos sintetizados siguiendo el esquema general de síntesis, en este caso hemos variado los sustituyentes en la posición 3 y 4 del sistema tricíclico (*Figura 2.2*). La síntesis de los compuestos **34** se realizó empleando las condiciones mostradas en la *Figura 3.14*, empleando ácido cloroacético como catalizador y aldehídos comerciales. Los ligandos son obtenidos con rendimientos que oscilan entre el 20 y el 40%.

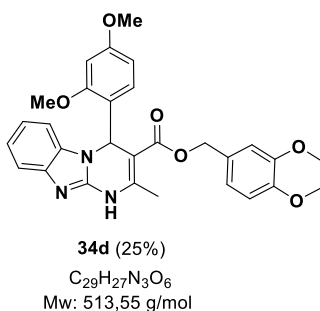
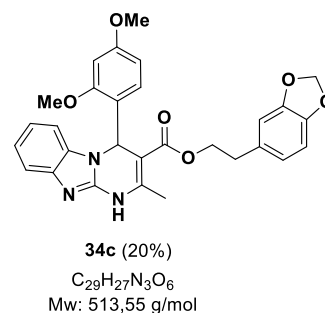
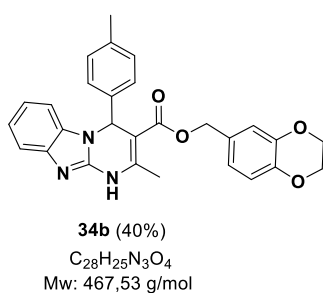
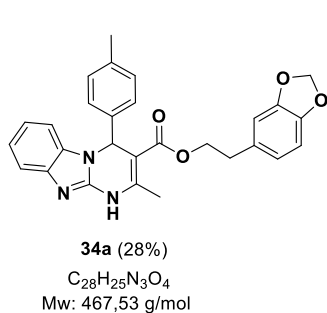
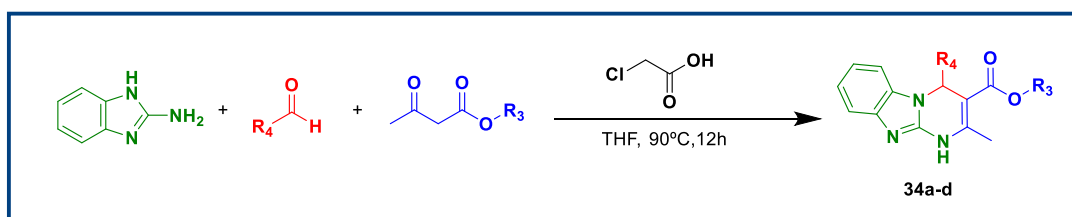


Figura 3.14 Esquema sintético y compuestos de la serie III.

Caracterización estructural

A modo de ejemplo de esta serie, se muestra el espectro de ^1H -RMN (Figura 3.15) de la molécula **34b**.

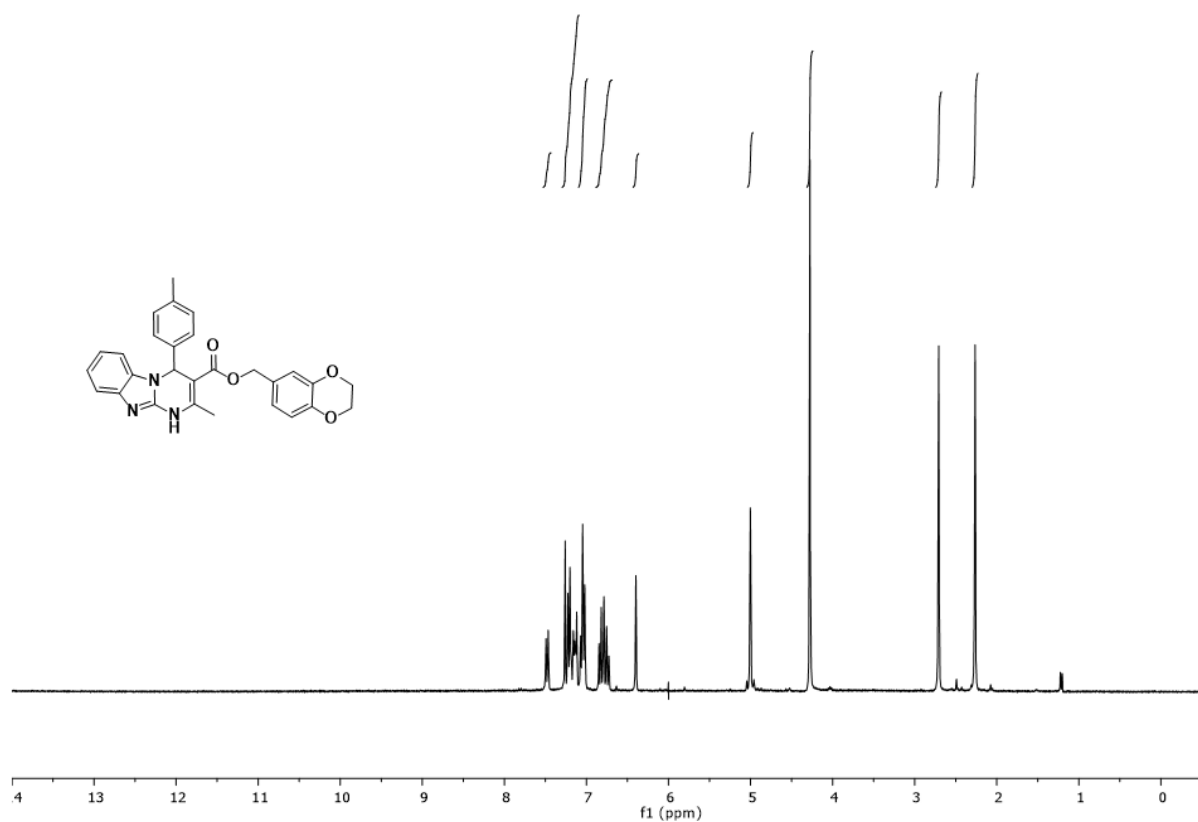


Figura 3.15 Espectro de RMN- ^1H del compuesto **34b**.

3.4 Evaluación farmacológica de los compuestos frente al receptor de adenosina

Ante la inesperada pandemia de la enfermedad Covid-19; y debido al confinamiento, no se han podido realizar la evaluación farmacológica de la mayoría de los compuestos descritos. El único compuesto evaluado (**32k**) mostró una elevada afinidad por el receptor A₃ de adenosina ($K_i = 2.28$ nM) y excelente selectividad frente al resto de subtipos (*Figura 3.16*).

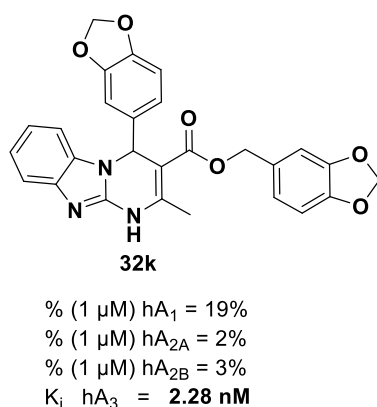


Figura 3.16 Resultados de la evaluación farmacológica del compuesto 32k.

A la espera de obtener los datos farmacológicos del resto de la serie (que serán evaluados en septiembre), el excelente perfil de potencia y selectividad de **32k** permite ser optimistas. La comparación estructural y de los datos farmacológicos de **32k** y el ligando modelo **23**, permiten sugerir que la estrategia de diseño empleada en este trabajo es acertada (*Figura 3.17*).

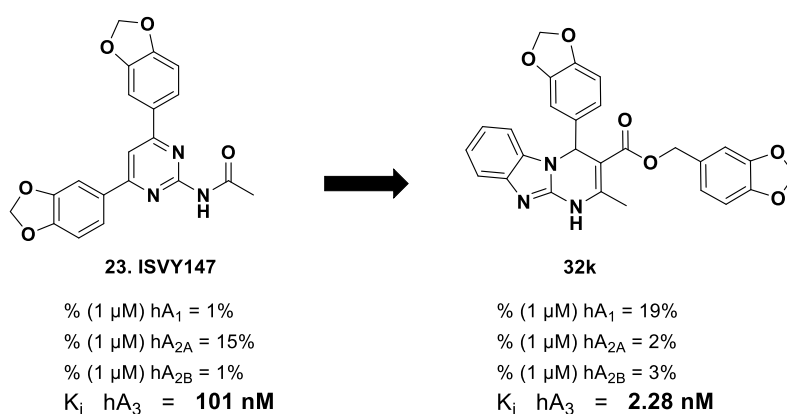


Figura 3.17 Izquierda: Antagonista selectivo del receptor A₃ de adenosina. Derecha: Compuesto obtenido en el presente trabajo con mejora en los resultados.

4. Conclusiones

- 1) Hemos sintetizado una nueva familia de potenciales antagonistas del receptor A_3 de adenosina empleando la reacción de Biginelli.
- 2) Los resultados de la evaluación farmacológica del ligando **32k** y a la espera de recibir los datos farmacológicos de los otros miembros de las series, permiten validar de forma preliminar la hipótesis de diseño que sirvió de inspiración al presente proyecto.
- 3) Hemos identificado un nuevo antagonista selectivo del receptor A_3 derivado del sistema 1,4-dihidrobenczo[4,5]imidazo[1,2-a]pirimidina (*Figura 3.16*).

Bibliografía

1. Rang H, Dale M. *Farmacología*. 8ª Ed. Elsevier; 2008.
2. Layland J, Carrick D, Lee M, Oldroyd K, Berry C. Adenosine: Physiology, pharmacology, and clinical applications. *JACC Cardiovasc Interv*. 2014;7(6):581-91.
3. Borea PA, Varani K, Vincenzi F, Baraldi PG, Tabrizi MA, Merighi S, et al. The A₃ Adenosine Receptor: History and Perspectives. *Pharmacological reviews* 2015;67(1):74-102.
4. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. *Physiological Reviews*. 2018;98(3):1591-625.
5. Yaziji V. *Identificación y optimización de nuevos derivados pirimidínicos como antagonistas selectivos del receptor A₃ de adenosina mediante metodologías sintéticas divergentes*. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela; 2012.
6. Jacobson KA. Introduction to Adenosine Receptors as Therapeutic ethylxanthines. En: *Handbook of Experimental pharmacology: Methylxantines*. 2011. 4-19 p.
7. Hammami A, Allard D, Allard B, Stagg J. Seminars in Immunology Targeting the adenosine pathway for cancer immunotherapy. *Semin Immunol* [Internet]. 2019;42(March):101304. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.10.1304>
8. Baraldi PG, Tabrizi MA, Romagnoli R, Merighi S, Varani K, Gessi S, et al. Characterize A₃ Adenosine Receptors in Human Tumor Cell Lines. *Current Medicinal Chemistry*. 2005;1319-29.
9. Pnina F, Shira C, Bar-Yehuda S. Targeting the A₃ adenosine receptor for glaucoma treatment (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2013;7(6):1723-5.
10. Montesinos MC, Desai A, Delano D, Chen JF, Fink JS, Jacobson MA, et al. Adenosine A_{2A} or A₃ receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(1):240-7.

11. Jacobson KA, Merighi S, Varani K, Borea PA, Baraldi S, Aghazadeh Tabrizi M, et al. A₃ Adenosine Receptors as Modulators of Inflammation: From Medicinal Chemistry to Therapy. *Med Res Rev.* 2018;38(4):1031-72.
12. Pier Giovanni Baraldi, Delia Preti PAB and KV. Pharmacological characterization of novel A₃ adenosine receptor- selective antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2012;55(12):5676-703.
13. El Maatougui A, Azuaje J, González-Gómez M, Miguez G, Crespo A, Carbajales C, et al. Discovery of Potent and Highly Selective A_{2B} Adenosine Receptor Antagonist Chemotypes. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2016;59(5):1967-83.
14. Cieślak M, Komoszyński M, Wojtczak A. Adenosine A_{2A} receptors in Parkinson's disease treatment. *Purinergic Signal.* 2008;4(4):305-12.
15. Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2006;5(3):247-64.
16. Vecchio EA, Baltos J, Nguyen ATN, Christopoulos A, White PJ, May LT. New paradigms in adenosine receptor pharmacology : allostery , oligomerization and biased agonism. *British Journal of Pharmacology.* 2018;175(21):4036-46.
17. Janes K, Symons-Liguori AM, Jacobson KA, Salvemini D. Identification of A₃ adenosine receptor agonists as novel non-narcotic analgesics. *British Journal of Pharmacology.* 2016;173(8):1253-67.
18. IB-MECA Supplier | CAS 152918-18-8 | Tocris Bioscience [Internet]. [citado 31 de marzo de 2020]. Disponible en: https://www.tocris.com/products/ib-meca_1066
19. 2-Cl-IB-MECA Supplier | CAS 163042-96-4 | Tocris Bioscience [Internet]. [citado 31 de marzo de 2020]. Disponible en: https://www.tocris.com/products/2-cl-ib-meca_1104
20. Jespers W, Oliveira A, Åqvist J, Id ES, Guti H. Structure-Based Design of Potent and Selective Ligands at the Four Adenosine Receptors. *Molecules.* 2017;22(11):1-17.

21. Gutiérrez-de-terán H, Keränen H, Azuaje J, Rodríguez D, Åqvist J, Sotelo E. Computer-Aided Design of GPCR Ligands. *Methods In Molecular Biology*. 2015; 1272:271-91.
22. Yaziji V, Rodríguez D, Coelho A, García-Mera X, El A, Brea J, et al. European Journal of Medicinal Chemistry Selective and potent adenosine A₃ receptor antagonists by methoxyaryl substitution on the N - (2 , 6-diarylpyrimidin-4-yl) acetamide scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;59:235-42.
23. Azuaje J. *Nuevas aplicaciones de la reacción de ugi en el descubrimiento de fármacos*. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela; 2012.
24. Zhu J, Wang Q, Wang M-X. *Multicomponent Reactions in Organic Synthesis*. Zhu J, Wang Q, Wang M-X, editores. Wiley; 2015.
25. Kappe CO, Stadler A. The Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. *Organic Reactions*. 2004;63:1-116.
26. Kappe CO. 100 years of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. *Tetrahedron*. 1993;49(32):6937-63.
27. Gavilán AC. *Estrategias multicomponente en el descubrimiento de fármacos. Identificación y optimización de antagonistas selectivos de los receptores de adenosina empleando la reacción de Biginelli*. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela; 2011.
28. Dewan M, Kumar A, Saxena A, De A, Mozumdar S. Biginelli Reaction Catalyzed by Copper Nanoparticles. *Plos One* 2012;7(8):2-9.
29. Kumar A, Maurya RA. An efficient baker's yeast catalyzed synthesis. *Tetrahedron*. 2007;48:4569-71.
30. Folkers K, Johnson TB. Researches on Pyrimidines. CXXXI. The Reduction of 1,2,3,4-Tetrahydropyrimidines. *Journal of American Chemical Society*. 1933;55(3):1140-7.

31. Sweet F, Fissekis JD. On the Synthesis of 3,4-Dihydro-2(1H)-Pyrimidinones and the Mechanism of the Biginelli Reaction. *Journal of American Chemical Society*. 1973;95(26):8741-9.
32. CO. K. A reexamination of the mechanism of the Biginelli dihydropyrimidine synthesis . Support for an N - Acyliminium ion intermediate¹ Recent advances in the Biginelli dihydropyrimidine synthesis . New tricks from an old dog A solid phase protocol of the Bigine. *Journal of Organic Chemistry*. 1997;62(21)(6):7201-4.
33. Franks ME, Macpherson GR, Figg WD. Thalidomide. *Lancet* 2004;363(9423):1802-11.
34. Thomas G. *Medicinal Chemistry*. 2^aEd. Wiley; 2007. 621 p.
35. Harada N. HPLC Separation of Diastereomers : Chiral Molecular Tools Useful for the Preparation of Enantiopure Compounds and Simultaneous. *Molecules*. 2016; 21(10):1328.
36. Crespo A, Maatougui A El, Biagini P, Azuaje J, Coelho A, Brea J, et al. Discovery of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1 H) - ones As a Novel Class of Potent and Selective A_{2B} Adenosine Receptor Antagonists. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2013;4(11):1031-6.
37. Laurella SL. *Resonancia magnética nuclear: una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares*. 1^a Ed. Plata E de la UN de La, editor. La Plata: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata; 2017. 179 p.
38. Varian 300 MHz Mercury (2 Channel) NMR — NEPA Refurbishments [Internet]. [citado 18 de abril de 2020]. Disponible en: <https://neparefurbishments.com/for-sale/varian-300-mhz-mercury-2-channel-nmr>
39. Prieto R. *Derivados halogenados del sistema Benzimidazolo[1,2-a]piridina como antagonistas del receptor A_{2B} de adenosina*. Trabajo de Fin de Grado. Universidade de Santiago de Compostela; 2018.

40. Azuaje J, Jespers W, Yaziji V, Mallo A, Majellaro M, Caamaño O, et al. Effect of Nitrogen Atom Substitution in A₃ Adenosine Receptor Binding: N-(4,6-Diarylpyridin-2-yl)acetamides as Potent and Selective Antagonists. *J Med Chem.* septiembre de 2017;60(17):7502-11.

Índice de Figuras

Figura 1.1 Estructura química de la ADO.....	4
Figura 1.2 Metabolitos formados a partir de la ADO y enzimas responsables (AQ = Adenosín quinasa; 5'NT = 5'-Nucleotidasa, PDE = Fosfodiesterasa y AC = Adenilato ciclasa).....	5
Figura 1.3 Estructura de los subtipos de AR y esquema de su funcionalidad (Elaboración propia).	6
Figura 1.4 Localización de los AR (5).	7
Figura 1.5 Esquema de la fisiopatología del receptor A ₃ (Elaboración propia).	10
Figura 1.6 Ejemplos de agonistas del receptor A ₃ y su semejanza estructural con la ADO. En rojo el núcleo de adenina y en azul el núcleo de ribosa.....	11
Figura 1.7 Ligandos naturales y su comparación con los compuestos sintéticos 8 y 9.	12
Figura 1.8 Ejemplo de antagonista pirimidínico del receptor A ₃	13
Figura 1.9 Ejemplos de antagonistas tricíclicos del receptor A ₃	13
Figura 1.10 Modelo computacional de ISVY-345 unido al receptor A ₃	14
Figura 1.11 Esquema de reacción entre un compuesto carbonílico, una amina y un nucleófilo.	15
Figura 1.12 Reacción de Strecker.	15
Figura 1.13 Reacción de Hantzsch.	16
Figura 1.14 Reacciones de Passerini y Ugi.	16
Figura 1.15 Comparativa entre la síntesis lineal y la síntesis multicomponente (23).	17
Figura 1.16 Primera reacción de Biginelli (24).	18
Figura 1.17 Esquema general de la reacción de Biginelli (cat = catalizador).	19
Figura 1.18 Mecanismo imino.	20
Figura 1.19 Mecanismo enamina.	20
Figura 1.20 Mecanismo Knoevenagel.....	21
Figura 1.21 Ejemplos y datos farmacológicos de antagonistas del receptor A ₃ obtenidos en anteriores trabajos (5).....	22
Figura 1.22 Izquierda: ISVY-130, antagonista selectivo A ₃ . Centro: simulación computacional de unión al receptor A ₃ . Derecha: SY1DM-18, antagonista selectivo A ₃	23
Figura 1.23 Izquierda: SYAF-30, antagonista selectivo A _{2B} . Derecha: ISAM-140 antagonista selectivo A _{2B} con mejor afinidad debido al esqueleto tricíclico.	23

Figura 1.24 Estructura general de las 3 series objetivo.	24
Figura 2.1 Esquema general del proyecto.	26
Figura 2.2 Esquema general de síntesis de los compuestos tricíclicos finales.	27
Figura 2.3 PLS con viales Kimble de 7 mL.	28
Figura 2.4 Esquema general de síntesis de los precursores.	28
Figura 2.5 Esquema general de síntesis de la serie I.	29
Figura 2.6 Esquema general de síntesis de la serie II.	30
Figura 2.7 Esquema general de síntesis de la serie III.	31
Figura 2.8 Ejemplos de cromatografía en columna (izquierda) y preparativa (derecha).	32
Figura 2.9 Varian 300 MHz Mercury (38).	33
Figura 3.1 Simulación computacional comparativa del receptor A ₃ (bolsillo lipofílico resaltado en azul) en la unión de análogos de ISVY-345 y datos farmacológicos (5,40).	35
Figura 3.2 Heteroclación del núcleo pirimidínico para los compuestos del presente trabajo.	35
Figura 3.3 Compuestos antagonistas del receptor A ₃ que tomaron como referencia para los sustituyentes en R ₃ y R ₄ de los compuestos del presente trabajo.	36
Figura 3.4 Comparativa estructural para obtener antagonismo A _{2B} o A ₃ en el mismo sistema tricíclico (39).	36
Figura 3.5 Comparativa 2D de disposición entre compuestos conocidos y obtenidos en este trabajo para su unión al receptor A ₃	37
Figura 3.6 Precursores obtenidos	38
Figura 3.7 Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 30b.	38
Figura 3.8 Esquema sintético y compuestos de la serie I.	39
Figura 3.9 Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 32b.	40
Figura 3.10 Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 32h.	40
Figura 3.11 Esquema sintético y compuestos de la serie II.	41
Figura 3.12 Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 33a.	42
Figura 3.13 Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 33d.	42
Figura 3.14 Esquema sintético y compuestos de la serie III.	43
Figura 3.15 Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 34b.	44
Figura 3.16 Resultados de la evaluación farmacológica del compuesto 32k.	45

Figura 3.17 Izquierda: Antagonista selectivo del receptor A₃ de adenosina. Derecha: Compuesto obtenido en el presente trabajo con mejora en los resultados..... 45

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mi tutor, el Prof. Eddy Sotelo, el haberme dado la oportunidad de adentrarme en el mundo de la investigación a través de su grupo. También quiero agradecerle el haberme transmitido la pasión por la ciencia y su importancia para mejorar la vida de las personas.

Agradecer también al Dr. Rodrigo Bernárdez todo lo que me ha enseñado durante mi estancia en el laboratorio, al igual que al Dr Jhonny Azuaje y la Dra María Majellaro. Inmensa admiración es la que siento hacia vosotros.

A Rubén Prieto, compañero y también mentor, por haberme ayudado tantas veces y ampliado mi destreza en el laboratorio. También a Aitor, compañero de campana, y al resto de mis compañeros Hugo, Carlos, Lucia, Carlos, Claudia, Antonio, Mateo, Ana y Carmen, por haberme hecho disfrutar de inolvidables momentos de risas, haciendo todavía más bonita esta experiencia.

A mi familia y en especial a mi madre, por su eterno apoyo, cariño y comprensión incondicional. Gracias por estar siempre a mi lado.

A Alba, por su constante apoyo y cariño. Gracias por hacer mis días más felices.

A mis amigos, por sus ánimos en los momentos bajos y por todos los grandes momentos que vivo con ellos.