

Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en
Ciencias Químicas:

*Diseño y desarrollo
biofarmacéutico
de nuevos derivados de
Zidovudina*

Tesis Doctoral

Farmacéutico Esteban M. Schenfeld

- 2018 -

Trabajo de Tesis realizado en:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Mario Alfredo Quevedo

COMISIÓN DE TESIS

Dra. Margarita Cristina Briñón

Dra. Gabriela Leonor Borosky

Dra. María Teresa Baumgartner

EVALUADOR EXTERNO

Dra. Luciana Gavernet (Universidad Nacional de La Plata)

A mis Viejos, a Renée y a Otto

Agradecimientos

Me gustaría agradecerle a todas las personas que me acompañaron y me ayudaron en este camino:

Al **Dr. Alfredo M. Quevedo, “Fredy”**, por su confianza en mí para llevar a cabo este proyecto, y brindarme el tiempo y los recursos necesarios para realizarlo.

A la **Dra. Briñón**, por su colaboración, consejos, correcciones a lo largo de todo este camino y por posibilitarme en mis comienzos formar parte de su grupo de investigación.

A las **Dras. Baumgartner y Borosky**, por sus aportes a lo largo de todos estos años y a la **Dra. Gavernet**, por aceptar evaluar esta Tesis.

A la **Dra. Granero** por permitirme utilizar el HPLC, entre otras cosas, para la realización de gran parte de los estudios.

A los ex 202 y agregados **Sole, Sergio, Mony, Diego y Flavia** por su ayuda incondicional, su paciencia y los buenos momentos que pasamos.

A **Julia, Jime, Dra. Ortiz, Gabi U., Lina, Dani Q.**, por su compañía, su buen humor y su ayuda.

A todos los que conforman el **Departamento de Ciencias Farmacéuticas** y la **Unidad de Tecnología Farmacéutica (UNITEFA)**.

A **mis amigos** de Zapala, de Córdoba y de la vida, que siempre me acompañaron y me brindaron lo mejor de ellos.

A mi vieja “**Marita**” y a mi viejo “**Juan**” por su ayuda, cariño, comprensión y compañía. Y por ser los primeros que confiaron en mí y me enseñaron que la mayor herramienta para la vida es estudiar y ser honesto. A mi hermano “**Juanchi**” por soportarme todos los años de facultad y hacerme reír con sus cargadas; y a mi hermana “**Lali**” por su ayuda en los comienzos y su comprensión. A **Mari** y a **Pablo** por los hermosos momentos compartidos. A mis sobrinos **Juan, Anto** y **Clarita** por su cariño.

A mis **tíos, tías** y a mi **abuela “Beba”**, por siempre estar pendiente de mí.

A **Graciela, Raúl, Nacho, Euge** y **Loli**, por su paciencia, su apoyo, su comprensión y por estar siempre presente a lo largo de todos estos años.

A la persona más importante, mi esposa, la madre de mi hijo, que con todo su amor, cariño y paciencia me acompañó, me entendió y me ayudó, siendo mi guía y mi sostén en todo momento Gracias “**Ne**”.

Y, por último, porque acaba de llegar y cambiarnos la vida a **Otto**, al que vamos a amar, cuidar y acompañar siempre. ¡¡¡Te amo hijo!!!

Índice

I Abreviaturas	I
II Resumen	V
III Objetivos General y específicos	VII
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)	1
1.1.1 Ciclo replicativo del VIH	3
1.2 Terapia anti-VIH	5
1.2.1 Inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa reversa (INTR)	6
1.2.2 Zidovudina	7
1.2.2.1 Limitaciones en la terapia antiviral con AZT	7
1.3 Profármacos	10
1.3.1 Profármacos de zidovudina (AZT)	13
1.4 Objetivos general y específicos.	14
Capítulo 2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de derivados AZT-Espaciador	17
2.1 Síntesis de derivados AZT-Espaciador	18
2.1.1 Introducción	18
2.1.2 Objetivos	20
2.1.3 Resultados y discusiones	20
2.1.3.1 Condiciones de reacción	21
2.1.3.2 Caracterización de AZT-Suc (1), AZT-Glu (2), y AZT-Adi (3)	23
2.1.4 Conclusiones parciales	25
2.1.5 Materiales y métodos	26
2.1.5.1 Procedimiento general para la síntesis de 1-3	26
2.1.5.2 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	26
2.1.5.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)	27

2.1.5.4 Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)	27
2.2 Estabilidad Química	28
2.2.1 Introducción	28
2.2.2 Objetivos	28
2.2.3 Resultados y discusiones	29
2.2.3.1 Estudios de estabilidad química a pH 2 y 7,4	29
2.2.3.2 Estudios de estabilidad química a pH 10	30
2.2.4 Conclusiones parciales	32
2.2.5 Materiales y Métodos	33
2.2.5.1 Soluciones de trabajo y soluciones <i>buffer</i>	33
2.2.5.2 Ensayos de estabilidad	33
2.2.5.3 Preparación y cuantificación de las muestras	34
2.3 Estudios en plasma humano	35
2.3.1 Introducción	35
2.3.2 Objetivos	39
2.3.3 Resultados y discusiones	39
2.3.3.1 Estabilidad en plasma humano	39
2.3.3.2 Unión a proteínas plasmáticas	41
2.3.4 Conclusiones parciales	44
2.3.5 Materiales y métodos	45
2.3.5.1 Soluciones de trabajo y soluciones <i>buffer</i>	45
2.3.5.2 Estabilidad en plasma humano	45
2.3.5.3 Unión a proteínas plasmáticas	46
2.3.5.4 Estudios computacionales de unión a ASH	47
2.4. Estudios de permeabilidad intestinal	48
2.4.1 Introducción	48
2.4.2 Objetivos	52
2.4.3 Diseño experimental	52
2.4.4 Resultados y discusiones	54
2.4.4.1 Viabilidad del tejido intestinal y estabilidad química en TC199 para 1- 3	54
2.4.4.2 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT	55
2.4.4.3 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Suc (1)	58
2.4.4.4 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Glu (2)	63
2.4.4.5 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Adi (3)	66

2.4.5 Conclusiones parciales	70
2.4.6 Materiales y métodos	71
2.4.6.1 Preparación de las soluciones mucosales y serosales	71
2.4.6.2 Obtención de segmentos intestinales	71
2.4.6.3 Montaje del dispositivo de permeación	71
2.4.6.4 Estudios de viabilidad intestinal	72
2.4.6.5 Toma, preparación y cuantificación de las muestras	72
2.5 Conclusiones parciales	73
Capítulo 3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos	77
<i>AZT-Espaciador-Aa-O-met</i>	
3.1 Síntesis de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met	79
3.1.1 Introducción	79
3.1.2 Objetivos	81
3.1.3 Resultados y discusiones	81
3.1.3.1 Condiciones de reacción	82
3.1.3.2 Caracterización de los profármacos 4 – 7	83
3.1.4 Conclusiones parciales	86
3.1.5 Materiales y métodos	86
3.1.5.1 Procedimiento general para la síntesis de ILeu-O-met y Fen-O-met	87
3.1.5.2 Procedimiento general para la síntesis de los profármacos 4 - 7	87
3.1.5.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	87
3.1.5.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)	88
3.1.5.5 Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)	89
3.2 Estabilidad Química	90
3.2.1 Introducción	90
3.2.2 Objetivos	91
3.2.3 Resultados y discusiones	91
3.2.3.1 Estudios de estabilidad química a pH 2	91
3.2.3.2 Estudios de estabilidad química a pH 7,4	91
3.2.3.3 Estudios de estabilidad química a pH 10	93
3.2.4 Conclusiones parciales	95
3.2.5 Materiales y métodos	96
3.2.5.1 Soluciones de trabajo y soluciones <i>buffer</i>	96

3.2.5.2 Ensayos de estabilidad química	96
3.2.5.3 Preparación y cuantificación de las muestras	97
3.3 Estudios en plasma humano	98
3.3.1 Introducción	98
3.3.2 Objetivos	98
3.3.3 Resultados y discusiones	98
3.3.3.1 Estabilidad en plasma humano	98
3.3.3.2 Unión a proteínas plasmáticas	101
3.3.4 Conclusiones parciales	106
3.3.5 Materiales y métodos	107
3.3.5.1 Soluciones de trabajo y soluciones <i>buffer</i>	107
3.3.5.2 Estabilidad en plasma humano	108
3.3.5.3 Unión a proteínas plasmáticas	108
3.3.5.4 Estudios computacionales de unión a ASH	109
3.4. Estudios de permeabilidad intestinal	111
3.4.1 Introducción	111
3.4.2 Objetivos	111
3.4.3 Resultados y discusiones	112
3.4.3.1 Estabilidad química de los profármacos 4 – 7 en TC199	112
3.4.3.2 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Suc-Fen-O-met (4)	112
3.4.3.3 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Suc-ILeu-O-Met (5)	115
3.4.3.4 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Glu-Fen-O-met (6)	117
3.4.3.5 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Adi-Fen-O-met (7)	119
3.4.4 Conclusiones parciales	122
3.4.5 Materiales y métodos	123
2.4.5.1 Preparación de las soluciones mucosales y serosales	123
2.4.5.2 Obtención de segmentos intestinales	124
2.4.5.3 Montaje del dispositivo de permeación	124
3.4.5.4 Toma, preparación y cuantificación de las muestras	124
3.5 Conclusiones parciales	126

Capítulo 4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos	129
4.1 Introducción	129
4.2 Objetivos	131
4.3 Resultados y discusiones	132
4.3.1 Cuantificación de AZT, AZT-Suc, AZT-Glu, AZT-Adi y AZT-Oxa en <i>buffer</i> fosfato	132
4.3.2 Cuantificación de AZT, AZT-Suc, AZT-Glu y AZT-Adi en medio de cultivo TC199	136
4.3.3 Cuantificación de AZT, AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met, AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met en <i>buffer</i> fosfato	139
4.3.4 Cuantificación de AZT, AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met, AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met en medio de cultivo TC199	143
4.4 Conclusión parciales	147
4.5 Materiales y métodos	147
4.5.1 Curva de calibrado y determinación de los parámetros de validación	147
Capítulo 5. Conclusiones generales y Proyecciones	151
5.1 Conclusiones generales	151
5.2 Proyecciones	154
Capítulo 6. Bibliografía	155
Anexo I. Estructuras de los derivados 1 - 3 y de los profármacos 4 - 7	167
Anexo II. Espectros de RMN y HRMS	169
Anexo III. Estudios computacionales de hidrólisis química	183
Anexo IV. Tablas	187

Abreviaturas

% Rec: Porcentaje de recuperación

°C: Grados centígrados

µg: Microgramo

µL: Microlitro

Å: Ångstrom

Aa: Aminoácido

ABC: ATP-binding cassette

ADME: Administración, distribución, metabolismo, excreción

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ala: *l*-Alanina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ASH: Albúmina sérica humana

AZT: Zidovudina

AZTeq: Zidovudina equivalente

AZTreg: Zidovudina regenerado

BChE: Butilcolinesterasa

BCRP: Proteína de resistencia al cáncer de mama (“*Breast cancer resistance protein*”)

BD: Biodisponibilidad

CES: Carboxilesterasa

DCC: N,N'-diciclohexilcarbodiimida

DCM: Diclorometano

DHU: Diciclohexilurea

DIPEA: N,N-Diisopropiletilamina

DM: Dinámica molecular

DMAP: Dimetilaminopiridina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DZP: Diazepam

EI: Estándar interno

HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución

ET: Estado de transición

Abreviaturas

F: Flujo de permeación

FDA: *Food and Drug Administration*

FE: Fase estacionaria

Fen: *l*-Fenilalanina

FM: Fase móvil

fs: Femtosegundos

f_u : fracción unida

g: Gramos

GB: Born generalizado (“*Generalized Born*”)

h: Hora

HAART: Terapia antiretroviral de alta actividad

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

ICH: *International conference on Harmonisation*

INI: Inhibidor de la integrasa

ILeu: *l*-Isoleucina

IF: inhibidor de la fusión

IN: Integrasa

INNTR: Inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa reversa

INTR: Inhibidor nucleosídico de la transcriptasa reversa

IP: Inhibidor de la proteasa

k_{obs} : Constante de velocidad observada

L: Litro

LAT-1: Transportador grande de aminoácidos tipo 1

LC: Límite de cuantificación

LD: Límite de detección

Leu: *l*-Leucina

M: Molar

Met: *l*-Metionina

mg: Miligramo

min: Minutos

mL: Mililitro

MM-PBSA: *Molecular mechanics Poisson Boltzmann surface area*

MM-GBSA: *Molecular mechanics Generalized Born surface area*

MRP-1: Proteína asociada a la resistencia de múltiples fármacos-1

Abreviaturas

ns: Nanosegundos
O-MET: O-metilados
OMS: Organización Mundial de la Salud
Oxyma: Oxyma Pure®
 P_{app} : Coeficiente de permeabilidad intestinal aparente
PDB: *Protein data bank*
PEPT-1: transportador de péptidos tipo 1
P-gp: Glicoproteína-P
PM: Peso molecular
PON: Paraoxonasa
PP: Proteínas plasmáticas
ppm: Partes por millón
PR: Proteasa
RMN: Resonancia magnética nuclear
rpm: Revoluciones por minuto
RSD: Desviación estándar relativa
SAL: Acido Salicílico
SASA: Área superficial accesible al solvente
Ser: *l*-Serina
SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC: Sistema nervioso central
SPE: Extracción en fase sólida
T: Temperatura
t: Tiempo
 $t_{1/2}$: Tiempo de vida media
 t_r : Tiempo de retención
TR: Transcriptasa reversa
Tyr: *l*-Tirosina
UV: Ultravioleta
Val: *l*-Valina
VER: Verapamilo
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana
 ΔG_{Sum} : Suma de interacciones

Resumen

El presente Trabajo de Tesis aborda la investigación y desarrollo de nuevos profármacos de Zidovudina (AZT), con el objetivo de optimizar diversas propiedades biofarmacéuticas subóptimas que presenta dicho principio activo. Se plantea como la continuación de esfuerzos previos realizados en el grupo de investigación, centrados en la síntesis y evaluación de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de otros profármacos de AZT. Está enmarcado dentro del área de la Química Medicinal, la cual apunta a la síntesis, identificación y el desarrollo de nuevas moléculas con utilidad terapéutica. Esta, es una ciencia interdisciplinaria que combina la química orgánica, la bioquímica, la química computacional, la farmacología, la farmacognosia, la biología molecular, la estadística, la química analítica y la química física.

Así, en el *Capítulo 1* se presenta una breve introducción de los aspectos teóricos relacionados con la problemática que presenta la utilización de AZT en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), como así también las bases que fundamentan el desarrollo de profármacos para optimizar las propiedades biofarmacéuticas.

En una primera etapa, se desarrollaron 3 derivados de AZT que responden a la estructura denominada *AZT-Espaciador (Capítulo 2)*, los cuales han sido sintetizados, caracterizados, y posteriormente evaluados en términos de su estabilidad química, comportamiento en plasma humano y permeabilidad intestinal. Sobre la base de los resultados obtenidos, se inició una segunda etapa de síntesis, en la cual se conjugaron los derivados obtenidos en el *Capítulo 2*, con aminoácidos-O-met (Aa-O-met), sintetizándose 4 nuevos profármacos de AZT denominados *AZT-Espaciador-Aa-O-met (Capítulo 3)*. Estos, además de ser debidamente caracterizados, fueron evaluados en términos de sus perfiles biofarmacéuticos, aplicando las metodologías homólogas a las empleadas en el *Capítulo 2*.

Teniendo en cuenta que la determinación de la estabilidad química y plasmática son esenciales durante el desarrollo preclínico de profármacos, éstos se estudiaron como parte de los *Capítulos 2 y 3* del presente trabajo. Asimismo, uno de los aspectos críticos que presenta la utilización de AZT en farmacoterapia es su limitada biodistribución, razón por la cual es de particular interés la determinación de la fracción de profármacos de AZT unida a proteínas plasmáticas, las cuales se encargan de la biodistribución de xenobióticos en el organismo. Dichos

Resumen

estudios son también presentados como parte de la caracterización biofarmacéutica de los nuevos derivados de AZT en los *Capítulos 2 y 3*.

Un requisito fundamental para que un fármaco ejerza su efecto terapéutico, es que el mismo llegue a su sitio blanco o sitio de acción luego de su administración. Considerando a la vía oral, como la más frecuentemente utilizada por los pacientes, se evaluó la permeación intestinal de los derivados y profármacos obtenidos, ya que esta propiedad biofarmacéutica constituye un aspecto de gran relevancia. Los resultados se compararon con el principio activo, proponiendo potenciales mecanismos de absorción y fenómenos de eflujo que suceden a nivel intestinal.

Atento a la necesidad de obtener resultados confiables y reproducibles, los métodos analíticos y bioanalíticos utilizados en el presente trabajo, fueron exhaustivamente desarrollados (*Capítulo 4*). Para dicho propósito se utilizaron lineamientos internacionales detallados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (*FDA, por sus siglas en inglés*) y por la Conferencia Internacional sobre Armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (*ICH, por sus siglas en inglés*).

Sobre la base de los resultados, se resumen las conclusiones generales del trabajo realizado (*Capítulo 5*), focalizando sobre las posibles mejoras en las propiedades biofarmacéuticas halladas para los nuevos profármacos. Finalmente, se plantean una serie de proyecciones en el contexto de la continuidad del desarrollo preclínico de los nuevos profármacos de AZT descriptos.

Objetivo general

El *objetivo general* de este trabajo de Tesis Doctoral, se centra en la obtención y evaluación biofarmacéutica de profármacos de Zidovudina (AZT), en vistas al desarrollo de alternativas terapéuticas más eficaces y seguras para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Objetivos específicos

- I. Síntesis, purificación y caracterización de los derivados con estructura *AZT-Espaciador*.
- II. Evaluación biofarmacéutica de los derivados *AZT-Espaciador*, estudiando la estabilidad química, el comportamiento plasmático y la permeabilidad intestinal de los mismos.
- III. Síntesis, purificación y caracterización de los profármacos con estructura *AZT-Espaciador-Aa-O-met*.
- IV. Evaluación biofarmacéutica de los profármacos *AZT-Espaciador-Aa-O-met* estudiando la estabilidad química, el comportamiento plasmático y la permeabilidad intestinal.
- V. Comparación de los resultados obtenidos para estos profármacos con los antecedentes previamente reportados para *AZT-Oxa* y *AZT-Oxa-Aa*.

Capítulo 1:
Introducción

Capítulo 1: Introducción

1.1 Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)

El síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA), es la pandemia más importante de los tiempos modernos. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del SIDA y presenta una tasa de letalidad elevada: desde su aparición en 1981 ha causado la muerte de más de 30 millones de personas. Las últimas estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) indican que en la actualidad hay 37 millones de personas infectadas¹⁻³. Esta pandemia no afecta a todas las regiones geográficas por igual, sino que lo hace en mayor proporción en los países pobres o emergentes (Figura 1.1). La zona más afectada es el África oriental y meridional (conocida como África negra), representando el 68 % del total de personas infectadas del mundo. Algunos de los países en que más incide esta epidemia son: Etiopía, Nigeria, Sudáfrica, Zambia y Zimbawe⁴.

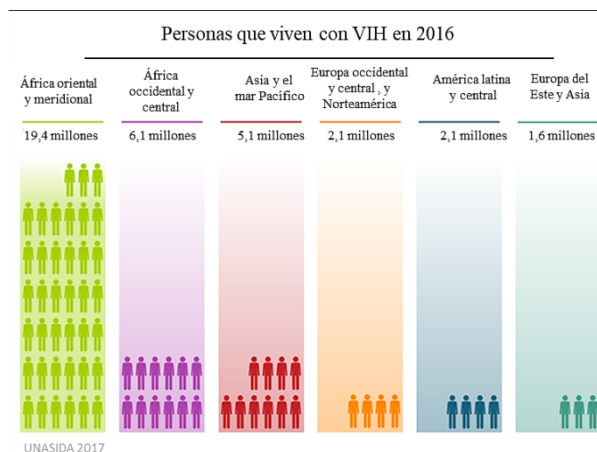


Figura 1.1. Prevalencia del SIDA en 2016³.

Cada año se producen 2 millones de nuevas infecciones y fallece más de un millón de personas en todo el mundo¹. En más de 30 años de lucha contra el SIDA se han producido grandes avances científicos, los cuales se han trasladado de una forma ejemplar a la vida real y han permitido que la infección por el VIH sea ahora una enfermedad crónica controlable. Un hito científico importante fue la identificación del VIH en 1983, solo 2 años después de declararse los primeros casos de SIDA en Estados Unidos. Poco después pudo conocerse con detalle la

1. Introducción

organización genética del virus y se demostró que la principal diana del VIH son los linfocitos T-CD4(+)^{5,6}.

Se sabe que suelen infectar los linfocitos T-CD4(+) activados, en ellos se inicia la transcripción del genoma del VIH y en pocas horas se produce una replicación viral masiva con destrucción de la célula infectada^{7,8}. Con el paso del tiempo, la destrucción celular progresiva conduce a una linfopenia T-CD4(+), con daño en los ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides, provocando una desregulación general de la función inmune. En aproximadamente 10 años el enfermo desarrolla una inmunodeficiencia grave⁹.

Desde la identificación del agente causal, se han desarrollado fármacos antivirales cada vez más eficaces y se ha documentado un descenso continuado de la mortalidad global por SIDA¹⁰. Actualmente, los tratamientos antivirales denominados *Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART)*, por sus siglas en inglés), pueden lograr la supresión virológica (definida como la incapacidad para detectar virus en la sangre mediante técnicas moleculares muy sensibles) en casi el 90% de los casos¹¹, lo que se ha traducido en un elevado porcentaje de pacientes que están controlados virológicamente, en quienes el virus se encuentra en un estado de latencia o sin replicación^{10,12}. Además, gracias al uso generalizado de profilaxis con antivirales durante el embarazo, se ha logrado prácticamente eliminar la transmisión vertical de la infección madre-hijo en los países desarrollados¹³.

La administración prolongada de los fármacos antivirales presenta muchos inconvenientes y no erradica la infección^{14,15}. Se sabe que en pacientes que se mantienen en una situación de supresión virológica con el HAART, siguen manteniendo ADN proviral con capacidad replicativa. Se ha demostrado que la suspensión del tratamiento en estos pacientes, presenta como consecuencia un repunte de la carga y replicación viral debido a la existencia de reservorios virales en los ganglios linfáticos, el tejido linfoide asociado al intestino y a nivel del sistema nervioso central^{16,17}.

La transmisión del VIH se produce por el intercambio de sangre o fluidos corporales que contienen el virus, habiéndose descrito como principales vías de transmisión el contacto sexual, la inoculación parenteral y el paso del virus desde las madres infectadas a sus hijos. La transmisión sexual es el modo de infección predominante en todo el mundo, siendo la responsable de más del 75 % de los casos de contagio del VIH. Por otra parte, se ha descrito la transmisión por vía parenteral del VIH en tres grupos de personas: consumidores de drogas de abuso por vía endovenosa, hemofílicos y receptores de transfusiones sanguíneas, siendo los primeros el grupo más numeroso.

1. Introducción

1.1.1 Ciclo replicativo del VIH

El VIH es un virus que contiene como material genético un ácido ribonucleico (ARN), por lo cual pertenece a la familia *Retroviridae*, concretamente a la subfamilia *lentivirus*¹⁸. Posee una estructura esférica de 100 nm de diámetro. Como parte de la maquinaria sintética del VIH es posible encontrar a enzimas propias del virus, como la transcriptasa reversa (TR), la integrasa (IN) y la proteasa (PR) (Figura 1.2).

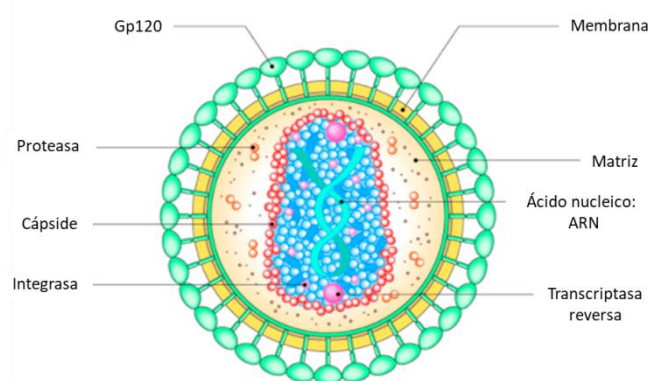


Figura 1.2. Estructura del VIH

Como se ha mencionado anteriormente, el VIH infecta de manera selectiva a los linfocitos T CD4(+), fenómeno que ocurre siguiendo diversos pasos secuenciales muy específicos. En particular, el ciclo replicativo del VIH se divide en las siguientes etapas (Figura 1.3)^{19,20}:

1-Entrada del virus en la célula: El VIH se une a los linfocitos CD4+, a través de su glicoproteína de superficie gp120, produciendo un cambio conformacional que permite la interacción con un correceptor, conocido como C-C quimiocina receptora tipo 5 (CCR5). Esta interacción provoca un cambio en la glicoproteína transmembrana gp41, que forma parte de la cápside viral, e induce la fusión con la membrana de la célula infectada. Este reconocimiento es fundamental para que el virus pueda penetrar en la célula huésped y así continuar con el proceso de replicación.

2- Transcripción inversa e integración: Tras la fusión e ingreso del virus al linfocito, se produce la liberación del genoma viral y se inicia el proceso de retrotranscripción. La TR es la enzima encargada de convertir el ARN viral en una doble hebra de ADN, conocido como ADN proviral. Éste, una vez sintetizado, se acopla a distintos factores celulares y virales formando el

1. Introducción

“complejo de preintegración”. Este complejo se desplaza al núcleo celular para integrarse en el genoma de la célula huésped, fenómeno que es catalizado por intervención de la enzima IN.

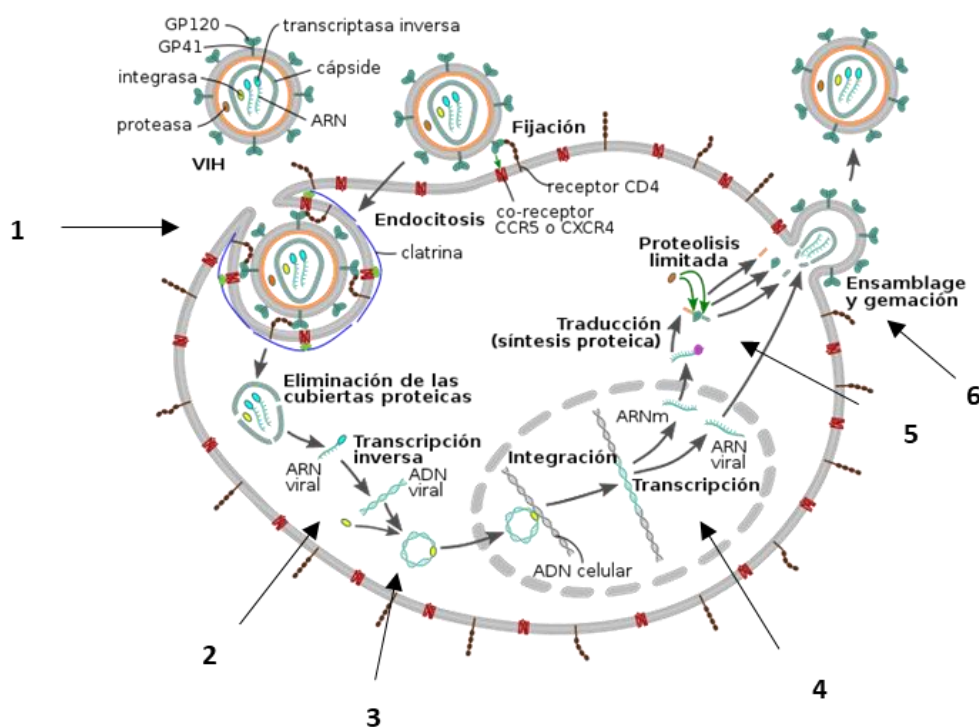


Figura 1.3. Ciclo de replicación del VIH.

3- Período de latencia: Tras la integración, el VIH puede permanecer latente, replicarse de forma controlada o sufrir una replicación masiva que resulta en un efecto letal para la célula infectada. En la mayoría de los linfocitos el virus permanece en forma latente. La reactivación de la replicación viral depende de factores celulares, como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas (NF- κ B), el cual es inducido en procesos de activación inmunológica. Tras dicha activación, la replicación viral se vuelve rápida y agresiva.

4- Transcripción del ADN viral: Producida la activación de la replicación viral, continua el proceso de transcripción, el cual da como resultado la síntesis del correspondiente ARN mensajero (ARNm). Dicho ARNm es complejo y se encuentra constituido por una sucesión de intrones (partes no informativas) y exones (partes informativas), razón por la cual debe ser procesado por “cortes” y “reempalmes” antes de que la información que contiene pueda utilizarse para sintetizar las proteínas virales correspondientes. Una vez procesado, el ARNm puede salir del núcleo a través de los poros nucleares e iniciar la etapa siguiente del ciclo viral.

5- Traducción: Una vez en el citoplasma, el ARNm proporciona la información para la traducción, es decir, la síntesis de proteínas virales, la cual se realiza empleando la maquinaria

1. Introducción

molecular de la célula infectada, siendo los ribosomas una parte fundamental. Como resultado de dicho proceso no se obtienen proteínas directamente funcionales, sino que constituyen una serie de poliproteínas de alto peso molecular que aún deben ser seccionadas en los correspondientes fragmentos funcionales. Dicho procesamiento es llevado a cabo por acción de las proteasas, enzimas específicas del VIH, originando las diversas cadenas polipeptídicas requeridas para formar una nueva partícula viral funcional. Finalmente, las proteínas virales sintetizadas se ensamblan, junto con copias de ARN provirales, para formar los componentes internos de la estructura del virión.

6- Gemación: Este es el último paso y tiene lugar cuando los nucleoides virales se aproximan a la membrana plasmática y son envueltos por la misma como una vesícula que termina por desprenderse de la célula infectada, formando un nuevo virión o partícula viral infectiva que es liberada al entorno. De acuerdo al ciclo viral descrito, en cada célula infectada pueden ensamblarse varios miles de nuevos viriones, aunque muchos son incompletos y no pueden infectar nuevos linfocitos. La alta tasa de desgaste metabólico que ello significa, implica la lisis de linfocito T CD4+ infectado, originando la inmunosupresión que caracteriza a la evolución clínica del VIH.

1.2 Terapia anti-VIH

La terapia anti-VIH, ha modificado la problemática sanitaria de la infección, convirtiéndola en una patología crónica y reduciendo la tasa de mortalidad de los pacientes. El uso combinado de diferentes fármacos antivirales ha permitido controlar la replicación viral, disminuir la aparición de cepas resistentes, preservar y/o restaurar el sistema inmune en un alto porcentaje de pacientes, aproximando la esperanza de vida de portadores del VIH cada vez más a la de la población general. No obstante, la terapia combinada no erradica los reservorios virales, por lo cual los pacientes deben mantener el tratamiento antiviral de por vida. Por otro lado, la complejidad de algunos esquemas de dosificación y sus efectos adversos dificultan el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente, conllevando no solo a fallas terapéuticas sino también aumentando el riesgo de desarrollo de resistencias a los antivirales^{12,21}.

En la actualidad se dispone de diversos fármacos que han sido aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA, por sus siglas en inglés), para el tratamiento de la infección por VIH. De acuerdo a la etapa que interrumpe el ciclo de replicación del virus, se los puede clasificar en 6 familias: a) Inhibidores Nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa (INTR), b) Inhibidores no Nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa (INNTR), c) Inhibidores de la Proteasa

1. Introducción

(IP), d) Inhibidores de la Fusión (IF), e) Inhibidores de la Integrasa (INIs) e f) Inhibidores de CCR5²².

Si bien llevan ya más de 30 años de utilización en clínica, el desarrollo de INTR continúa siendo un área de interés científico significativo, fundamentalmente orientado a la búsqueda y optimización de fármacos antivirales más seguros y eficaces.

1.2.1 Inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa reversa (INTR)

Los INTR fueron los primeros fármacos anti-VIH utilizados en terapia humana. Estos compuestos son inactivos como tales y requieren de una activación intracelular para ejercer su acción farmacológica. En la Figura 1.4 se muestran las estructuras químicas de los INTR utilizados actualmente en la terapia anti-VIH: a) zidovudina (AZT), b) didanosina (DDI), c) zalcitabina (DDC), d) lamivudina (3TC), e) emtricitabina (FTC) y f) abacavir (ABC).

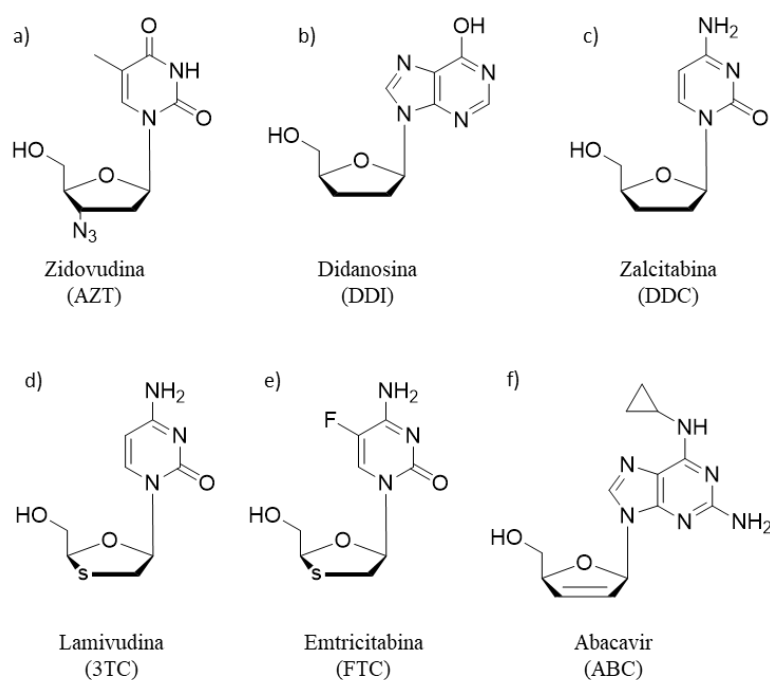


Figura 1.4. Inhibidores Nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa (INTR) aprobados para terapia en humanos: a) Zidovudina (AZT), b) Didanosina (DDI), c) Zalcitabina (DDC), d) Lamivudina (3TC), e) Emtricitabina (FTC) y e) Abacavir (ABC).

Como se ha mencionado, los INTR son compuestos farmacológicamente inactivos como tales, requiriendo de una bioactivación por trifosforilación en el interior del citoplasma por la acción de enzimas quinasas celulares. Por homología estructural con los nucleótidos naturales, los INTR trifosforilados compiten por la incorporación a la cadena de ADN províral, proceso

1. Introducción

mediado por la enzima TR. Como se puede observar en la Figura 1.4, los INTR no presentan el grupo 3'-OH que poseen los nucleótidos naturales (tales como timidina, Figura 1.5.A). La ausencia de dicho grupo funcional imposibilita que se establezcan los puentes 3'-5' trifosfatos característicos de las cadenas de ADN, interrumpiendo el proceso de elongación de la hebra de ADN proviral que normalmente es sintetizada mediante la enzima TR. Es decir, que los INTR presentan una actividad antiviral originada en la inhibición de la síntesis del ADN viral por competición con la incorporación del nucleótido natural, impidiendo la formación de ADN viral.

1.2.2 Zidovudina

La timidina (Figura 1.5.A) es un nucleósido que forma parte de las bases que constituyen el ADN. Timidina debe trifosforilarse para ser incorporado por la TR como nucleótido de la cadena de ADN proviral. La zidovudina (AZT, Figura 1.5.B), es un análogo estructural de la timidina, el cual posee un grupo azido (N_3) en reemplazo del 3'-OH de la subestructura de ribosa. Zidovudina fue sintetizada por primera vez en 1964 y se utilizó con poco éxito en el tratamiento de tumores. Tras la aparición del SIDA, y en un contexto de emergencia sanitaria, AZT fue aprobado en 1987 por la FDA para el tratamiento de la infección por VIH. Como todos los INTR, AZT debe trifosforilarse en el citoplasma celular por la acción secuencial de enzimas timidinkinásas celulares para sintetizar la forma mono, di y trifosforilada, siendo esta última la que actúa como inhibidor competitivo de timidina trifosfato.

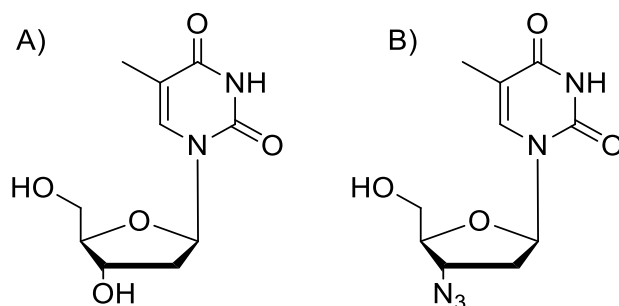


Figura 1.5. Estructuras químicas de A) Timidina. B) Zidovudina.

1.2.2.1 Limitaciones en la terapia antiviral con AZT

AZT está indicado para el tratamiento de la infección por VIH en combinación con otros agentes antivirales, así como también para la prevención de la transmisión materno-fetal del VIH. También la monoterapia con AZT redujo la transmisión del VIH de madre a hijo en un

1. Introducción

69% de los pacientes infectados²³. A pesar de su comprobada eficacia terapéutica, la utilización de AZT se ha asociado a la aparición de numerosos efectos adversos, tales como cefalea, malestar general, náuseas, anorexia y vómitos²³. También se han reportado efectos adversos específicos relacionados con la inhibición de la DNA polimerasa a nivel mitocondrial por acción de AZT^{24,25}, efecto citotóxico que conlleva a una marcada disminución en el número de eritrocitos y neutrófilos en circulación sanguínea. Dichos efectos adversos son particularmente relevantes como parte de la administración crónica de AZT²⁶. Es posible mencionar entonces que los efectos citotóxicos de AZT se encuentran estrechamente relacionados a su mecanismo de acción antiviral, es decir la inhibición de enzimas del tipo DNA polimerasas (TR y DNA polimerasa mitocondrial).

Por otra parte, los aspectos farmacocinéticos de AZT no son óptimos, lo cual conlleva a la necesidad de administrar dosis altas (600 mg/día) y frecuentes, aumentando aún más la incidencia de los efectos adversos en los pacientes. La biodisponibilidad oral de AZT, es una de las propiedades subóptimas que presenta mayor relevancia como parte de su perfil farmacocinético subóptimo. Si bien dicha biodisponibilidad no es excesivamente baja (ronda el 65%), si presenta una variabilidad muy significativa y que puede llegar a comprometer la eficacia terapéutica. Ello es debido fundamentalmente a problemas de absorción errática mediada por la acción de proteínas de eflujo a nivel intestinal, las cuales disminuyen la fracción de fármaco absorbido, provocando una variabilidad en la biodisponibilidad de AZT intra e inter paciente²⁶. Sumado a los problemas de eflujo, una vez que AZT es absorbido, se observa una elevada tasa de metabolismo de primer paso hepático como consecuencia de una rápida y eficiente glucuronidación sobre la posición 5'OH del fármaco, originando a 5'-glucuronil-zidovudina(G-AZT). Dicha acción es catalizada por la enzima hepática UDP-glucuroniltransferasa, originando un metabolito que presenta el 5'-OH bloqueado, generando así un compuesto inactivo frente a la TR dado que no es capaz de sufrir trifosforilación. Finalmente, el G-AZT es excretado de manera muy eficiente principalmente por orina^{12,23,26}.

La escasa fracción de AZT que llega a circulación sistémica una vez administrado por vía oral presenta una pobre distribución a nivel de los fluidos extravasculares, debido a la baja unión que presenta a proteínas plasmáticas, las cuáles son las encargadas de transportar los fármacos en el organismo²⁷. De manera simultánea, dicho fenómeno deja también expuesto al principio activo para que sea metabolizado rápidamente a nivel plasmático, originando un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) plasmático de aproximadamente 1 h. Como consecuencia de ello, el AZT que es capaz de absorberse a nivel intestinal presenta una rápida disminución de la concentración

1. Introducción

plasmática, llegando a niveles por debajo de la concentración efectiva mínima requerida para inhibir la replicación viral²⁶.

Otra característica farmacocinética subóptima que presenta AZT y que se encuentra asociada a su limitada biodistribución, es la baja concentración que alcanza en el sistema nervioso central (SNC), aún luego de períodos prolongados y sostenidos de terapia antiviral. Se ha reportado que dicho problema no depende de la capacidad de llegada del fármaco al SNC, ya que la molécula de AZT presenta una lipofilidad que permite el paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE), sino que se encuentra originado en el eflujo activo que sufre y que es mediado por proteínas de eflujo presentes en dicha barrera²⁸. Este aspecto, lleva a la generación de reservorios de partículas virales en el SNC, a partir de los cuales se puede producir un rebrote de la replicación viral sistémica si el paciente suspende el tratamiento^{26,29}. Los fenómenos de eflujo también se observan en los linfocitos, en los cuales provocan una disminución rápida de la concentración del antiviral en el interior de la célula blanco³⁰⁻³².

En la Figura 1.6, se resumen las principales propiedades farmacocinéticas subóptimas que presenta AZT y las consecuencias biofarmacéuticas de las mismas.

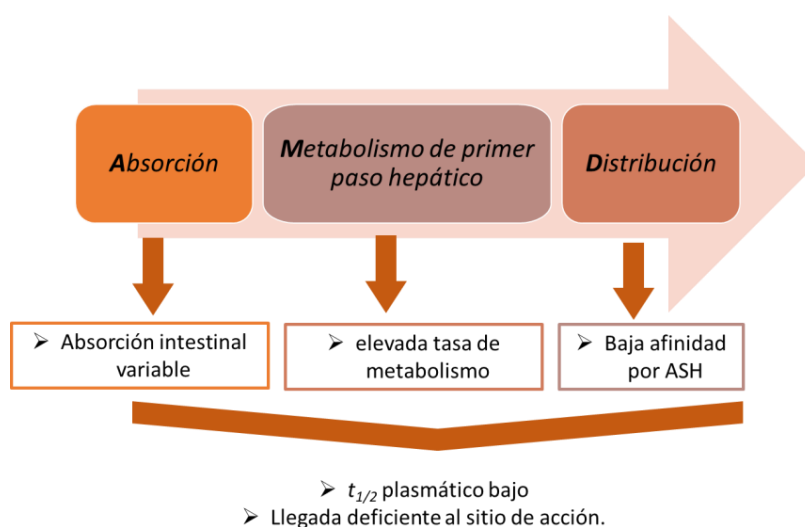


Figura 1.6. Esquema del proceso de absorción, distribución y metabolismo de AZT.

*ASH: Albumina sérica humana; t_{1/2}: tiempo de vida media

En este contexto, AZT como muchos otros fármacos, se encuentra enmarcado en un escenario en donde las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas no están conectadas entre sí³³. Es decir, que a la potencia anti-VIH del AZT no la acompaña propiedades farmacocinéticas óptimas, en lo referido a su absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME).

1. Introducción

De acuerdo a lo planteado, y a pesar de los serios efectos adversos y aspectos farmacocinéticos subóptimos relacionados a su utilización clínica, AZT sigue siendo uno de los fármacos de elección como INTR, que forman parte de los cócteles antiretrovirales usados actualmente para el tratamiento del SIDA. Ello es debido a su demostrada eficacia clínica, y relativa alta potencia antiviral, argumentos que motivan al desarrollo de estrategias que permitan optimizar sus propiedades farmacocinéticas para adecuarlas a la utilización segura por parte de pacientes. Entre dichas estrategias, es posible mencionar el diseño de profármacos por derivatización del 5'-OH, la que tienen como objetivo disminuir la tasa de metabolismo hepático que sufre AZT luego de ser absorbido a nivel intestinal, optimizar la biodisponibilidad oral y aumentar la afinidad por las proteínas plasmáticas, conllevando así a un aumento en el tiempo de permanencia de AZT en el plasma. Logrados dichos objetivos, sería posible reducir significativamente las dosis administradas a los pacientes y por consecuencia una disminución de la incidencia de los efectos secundarios asociados a la terapia²⁶.

1.3 Profármacos

Un fármaco ideal es aquel que es activo, fácil de formular, con buena absorción por vía oral, con un perfil farmacocinético adecuado, que es eliminado por riñón o transformado en metabolitos no tóxicos y excretado por orina. Sin embargo, no siempre se obtiene un fármaco que cumpla todos estos requisitos. El descubrimiento y desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso largo, complejo e incierto que requiere entre 12 y 24 años desde que se inicia el proyecto hasta que eventualmente se logra la comercialización³⁴. Una de las principales causas por las que un potencial fármaco puede fracasar en su desarrollo como molécula con uso terapéutico, es que presente propiedades farmacocinéticas desfavorables en la absorción, distribución, metabolismo o eliminación^{35,36}. Con el objetivo de superar estas propiedades no deseadas que presentan algunas moléculas y que limitan su desarrollo hacia un fármaco con utilidad terapéutica, se pueden llevar a cabo variaciones en la formulación del fármaco, la síntesis de análogos del compuesto o el desarrollo de profármacos. Esto último, presenta la ventaja de modificar de forma temporal las propiedades del fármaco activo.

La acción de los fármacos está gobernada por las fases farmacéutica, farmacocinética y farmacodinámica, las cuales se encuentran interconectadas entre sí^{37,38}. La fase farmacéutica está enmarcada en el tipo de formulación que se administra al paciente, mientras que la fase farmacocinética está dada por los eventos ADME y la fase farmacodinámica por la interacción fármaco-receptor. El diseño de profármacos obedece a un intento de optimizar las propiedades

1. Introducción

farmacocinéticas de un principio activo, ya que modificando algunas de estas propiedades también se pueden producir cambios en la fase farmacéutica y/o en la farmacodinámica, confiriendo así una mayor complejidad al proceso de diseño de un profármaco. La mayoría de los profármacos comercializados o que se encuentran en fase de desarrollo clínico, han sido diseñados principalmente con dos objetivos: mejorar la biodisponibilidad del fármaco y lograr su acción en lugares específicos como órganos o tejidos³³. Es decir que los profármacos pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas de un principio activo conectándolas con las propiedades farmacodinámicas del mismo.

Los profármacos son compuestos inactivos como tales, que requieren de proceso de bioactivación *in vivo*, regenerando el fármaco activo original (Figura 1.7). En este sentido, los profármacos pueden considerarse como compuestos que contienen un complemento molecular transitorios, que no resultan tóxicos y que optimizan o eliminan propiedades desfavorables del principio activo, principalmente del tipo farmacocinético³⁸.

Los profármacos se pueden clasificar esencialmente en dos clases: a) profármacos unidos a un complemento molecular y b) bioprecursores. Estos últimos, resultan de la modificación de la estructura molecular del fármaco y necesitan una activación metabólica en el organismo mediante un proceso inverso al de las reacciones metabólicas del tipo I (ej. oxidación, reducción, fosforilación) para regenerar el principio activo³⁹. Ya se ha mencionado que los INTR requieren de una trifosforilación para exhibir actividad biológica, razón por la cual pueden ser considerados como bioprecursores. Por otra parte, en los profármacos unidos a complemento molecular, el fármaco se une a una estructura química de manera transitoria mediante un enlace covalente temporal. Los tipos de enlace más comúnmente utilizados para obtenerlos son el enlace éster, amida, carbamato, carbonato, éter, imina o fosfato (Figura 1.7). La escisión del complemento molecular regenera al fármaco activo y al menos un producto secundario: el complemento molecular. En el diseño de este tipo de profármacos se deben cumplir los siguientes requisitos³⁹:

- ✓ La unión entre los fragmentos debe ser covalente.
- ✓ El profármaco debe ser inactivo.
- ✓ El enlace debe ser clivado *in vivo*.
- ✓ El profármaco y el complemento molecular no deben ser tóxicos.
- ✓ La regeneración del fármaco debe ser rápida e idealmente en el lugar de acción.

1. Introducción

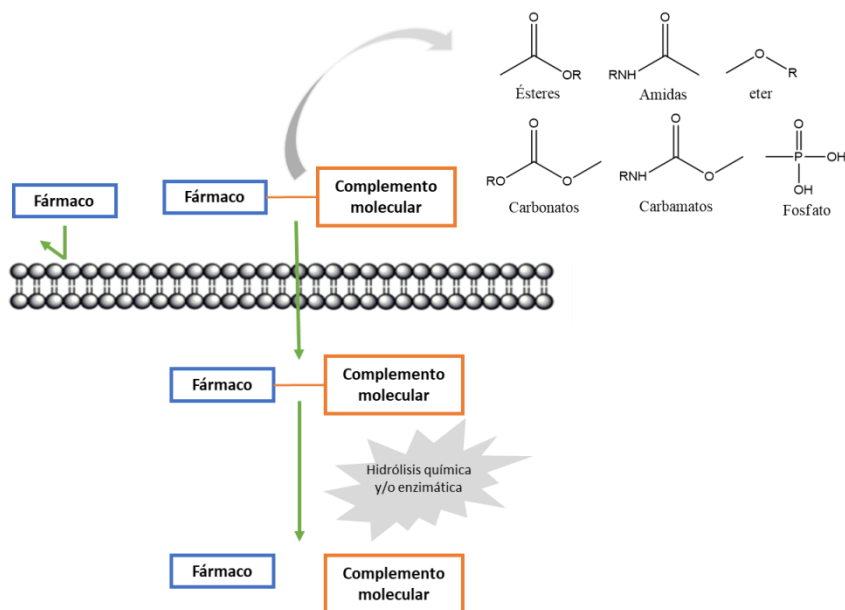


Figura 1.7. Bioactivación *in vivo* de profármacos mediante transformaciones enzimáticas y/o químicas.

En el organismo, la hidrólisis de ésteres, amidas y algunos tioésteres, es catalizada principalmente por enzimas del tipo esterasas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas por todo el organismo. Las carboxilesterasas (CES) son las esterasas más importantes en humanos y por su homología estructural se las clasifican en diversas subfamilias. Entre ellas, la subfamilia CESH1 presente principalmente en hígado, y las CESH2 expresadas en mayor medida a nivel intestinal⁴⁰. Las CESH1 y CESH2 se consideran significativamente diferentes, ya que las primeras hidrolizan preferentemente sustratos con un grupo alquilo pequeño y un grupo acilo más grande, en cambio CESH2 lo hace de manera inversa⁴¹. Debido a la elevada presencia de estas enzimas en el organismo, los enlaces tipo éster entre el principio activo y el complemento molecular han demostrado ser muy útiles para la preparación de profármacos, fundamentalmente debido a que presentan una susceptibilidad adecuada a la hidrólisis⁴².

Existen diferentes tipos de complementos moleculares (Figura 1.8) que se utilizan para generar profármacos que mejoren las propiedades desfavorables de los principios activos. La selección del complemento depende del propósito para el cual se diseña el profármaco, el tipo de grupos funcionales que es posible derivatizar en el principio activo, los mecanismos de conversión química y enzimática del profármaco al fármaco, la biocompatibilidad del complemento molecular y su disponibilidad en el mercado. En este sentido, los aminoácidos como complementos moleculares ofrecen varias ventajas, como por ejemplo su demostrada seguridad, amplia diversidad estructural y disponibilidad comercial^{43,44}.

1. Introducción

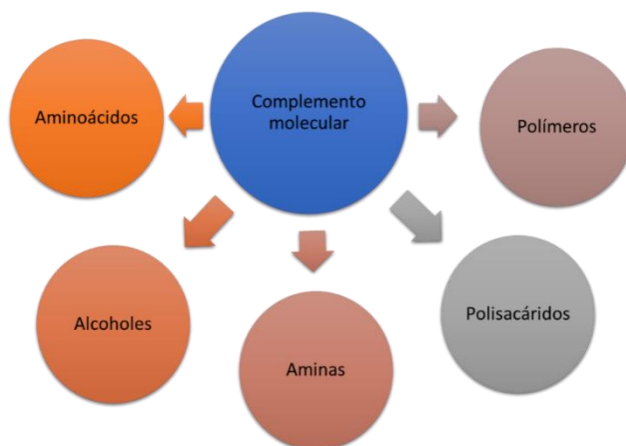


Figura 1.8. Tipos de complementos moleculares utilizados en el diseño de profármacos.

La unión entre el fármaco y el complemento molecular puede ser directa o a través de un grupo espaciador. A éste último tipo se los conoce como “profármacos múltiples”, en los cuales el grupo espaciador puede modificar propiedades de lipofilidad, velocidad de regeneración del principio activo, permeabilidad, etc. del profármaco conteniendo el complemento molecular⁴⁵.

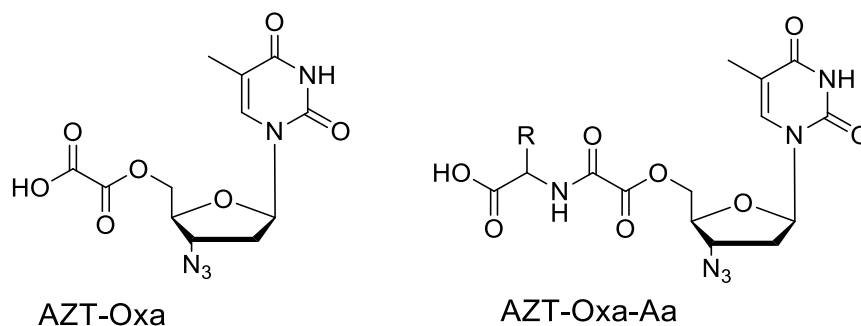
1.3.1 Profármacos de zidovudina (AZT)

Existen diversos reportes en los cuales se emplean una gran diversidad de estrategias para generar profármacos de AZT. En la gran mayoría de ellos se opta por derivatizar la posición 5'-OH,^{28,46-50} ya que como se ha comentado previamente la modificación química de dicha posición impide la trifosforilación (y activación) del fármaco. Entre los reportes más relevantes puede mencionarse la generación de ésteres de AZT con ácido retinoico⁵¹, ácido 1,4-dihidronicotínico⁵¹, esteroides ácidos⁵², lípidos⁵³ y glucósidos lipofílicos⁵⁴.

Los aportes del grupo de investigación al tema son diversos^{48,55,56}, incluyendo el estudio exhaustivo respecto de la obtención de profármacos de AZT por combinación con aminoácidos esenciales empleando ácido oxálico como grupo “espaciador”⁴⁸ (Figura 1.9). Algunos de estos profármacos han demostrado presentar propiedades fisicoquímicas optimizadas respecto del fármaco original, y dado que son capaces de regenerar al AZT pueden mantener la potencia antiviral del mismo., También se ha observado una reducida citotoxicidad celular para algunos de derivados⁵⁵. A pesar de esto, ninguno de los profármacos diseñados previamente en el grupo de trabajo, ha exhibido beneficios significativos en lo referido a su performance biofarmacéutica *in vitro*, estudiada empleando tejidos de animales de experimentación. Ello se debe a la limitada estabilidad en matrices biológicas (plasma y homogenato de tejidos) que presentan dichos

1. Introducción

profármacos ^{57,58}. Por este motivo, la motivación para el rediseño y optimización de estos aspectos ha dado origen a las actividades e hipótesis propuestas para el presente trabajo de tesis.



Profármaco	Aminoácido (Aa)
AZT-Oxa-Leu	<i>l</i> -leucina
AZT-Oxa-ILeu	<i>l</i> -isoleucina
AZT-Oxa-Val	<i>l</i> -valina
AZT-Oxa-Fen	<i>l</i> -fenilalanina
AZT-Oxa-Pro	<i>l</i> -prolina
AZT-Oxa-Trip	<i>l</i> -triptófano
AZT-Oxa-Tir	<i>l</i> -tirosina

Figura 1.9. Estructura química de AZT-Oxa y AZT-Oxa-Aa.

1.4 Objetivos general y específicos

Teniendo en cuenta la problemática actual del SIDA y de los fármacos aprobados para su tratamiento, se plantea como *objetivo general* de este trabajo de Tesis Doctoral, la obtención y evaluación biofarmacéutica de nuevos profármacos de AZT obtenidos por combinación con aminoácidos esenciales, en vistas al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas más eficaces y seguras para el tratamiento del SIDA.

Basándose en los antecedentes presentados, se plantea obtener en una primera etapa derivados de AZT por combinación de ácidos dicarboxílicos como grupos espaciadores (*Capítulo 2*), que luego en una segunda etapa serán combinados con aminoácidos esenciales (*Capítulo 3*). La utilización de ácidos dicarboxílicos tiene como objetivo evaluar si la separación entre los grupos carbonilos permite mejorar la estabilidad química del profármaco. Asimismo, se evaluará la posibilidad de obtener profármacos que presenten múltiples etapas de degradación

1. Introducción

con el fin de aumentar la permanencia del profármaco en el organismo y por consecuencia una regeneración modulada de AZT.

Sobre la base de lo expuesto, se plantean los *objetivos específicos*, los cuáles se pueden organizar según las etapas previstas para el desarrollo del proyecto:

- I. Síntesis, purificación y caracterización fisicoquímica de derivados con estructura *AZT-Espaciador* (*Capítulo 2*).
- II. Evaluación biofarmacéutica de los derivados *AZT-Espaciador*, estudiando la estabilidad química, el comportamiento plasmático y la permeabilidad intestinal de los mismos (*Capítulo 2*).
- III. Síntesis, purificación y caracterización fisicoquímica de los profármacos con estructura *AZT-Espaciador-Aa-O-met* (*Capítulo 3*).
- IV. Evaluación biofarmacéutica de *AZT-Espaciador-Aa-O-met*, estudiando la estabilidad química, el comportamiento plasmático y la permeabilidad intestinal de los mismos (*Capítulo 3*).
- V. Comparación de los resultados obtenidos para los nuevos profármacos con los antecedentes existente para AZT-Oxa.

Capítulo 2:

*Síntesis y evaluación
biofarmacéutica de derivados
AZT-Espaciador*

Capítulo 2: Síntesis y evaluación biofarmacéutica de derivados “AZT-Espaciador”

AZT es uno de los numerosos fármacos que a pesar de su demostrada eficacia terapéutica, presenta propiedades biofarmacéuticas desfavorables, tales como absorción intestinal errática, alto metabolismo de primer paso hepático y corta vida media plasmática²⁶, entre otras. Estas propiedades subóptimas, conllevan a la administración de dosis altas y repetidas del principio activo para mantener su concentración plasmática efectiva, acentuando aún más los efectos tóxicos que presenta. Como se describió anteriormente, una de las estrategias utilizadas para conectar las propiedades farmacocinéticas con las farmacodinámicas es la generación de profármacos. Los mismos, son moléculas farmacológicamente inactivas que en el organismo regeneran el principio activo, a través de procesos de biotransformación.

El objetivo planteado para esta etapa del Trabajo de Tesis, es la síntesis y evaluación biofarmacéutica de nuevos derivados de AZT, denominados “AZT-Espaciador”, los cuáles son obtenidos a partir de la conjugación de AZT con diversos ácidos dicarboxílicos de cadena carbonada lineal. Estos profármacos serán utilizados para la síntesis de los profármacos de AZT conteniendo aminoácidos esenciales. Debido a que los derivados *AZT-Espaciador* sintetizados pueden ser regenerados en el organismo, se evaluará si los mismos presentan propiedades biofarmacéuticas optimizadas con respecto al principio activo.

Para alcanzar el objetivo propuesto se plantean las siguientes etapas de trabajo:

- 1) Síntesis de nuevos derivados
- 2) Estudios de estabilidad química
- 3) Estudios en plasma humano
- 4) Estudios de permeabilidad intestinal

2.1 Síntesis de derivados “AZT-Espaciador”

2.1.1 Introducción

En esta primera etapa del Trabajo de Tesis, se planteó la obtención de ésteres de AZT por conjugación con ácidos dicarboxílicos (Figura 2.1). Entre las metodologías de esterificación comúnmente utilizadas, se pueden encontrar reacciones realizadas sin catalizador y a altas temperaturas, empleando catalizadores como los ácidos de Brønsted o Lewis, que emplean como agentes acoplantes a carbodiimidas⁵⁹⁻⁶¹, o bien, utilizando enzimas^{62,63}.

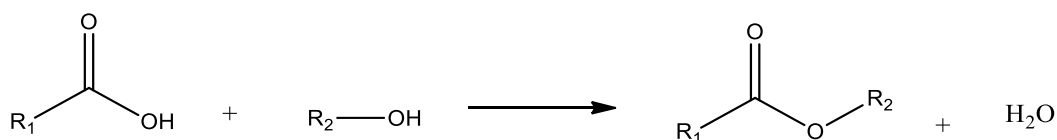


Figura 2.1. Reacción general para obtener ésteres.

Existen diversos reportes, en los cuales se generan derivados de AZT por conjugación con ácidos dicarboxílicos, a partir de la utilización de anhídridos de ácidos^{64,65}. Esta estrategia de síntesis, posibilita obtener productos con buenos rendimientos sin presencia de subproductos, pero tiene como limitante la escasa disponibilidad comercial e inestabilidad de los diácidos en su forma de anhídrido cíclico⁶⁶. Otra estrategia para la obtención de ésteres es el método de esterificación de Steglich⁶⁷, mediante el cual se pueden generar ésteres a partir de un ácido carboxílico y un alcohol, en presencia de N',N'-diclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-(N,N'dimetilamino) piridina (DMAP). La utilización de la DCC como activador del grupo carboxílico, permite llevar a cabo reacciones en condiciones suaves, empleando una gran diversidad de reactivos conteniendo diversos grupos funcionales^{60,68-70}

El mecanismo de esterificación mediada por DCC involucra varios pasos, los cuales se describen en la Figura 2.2⁷¹:

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

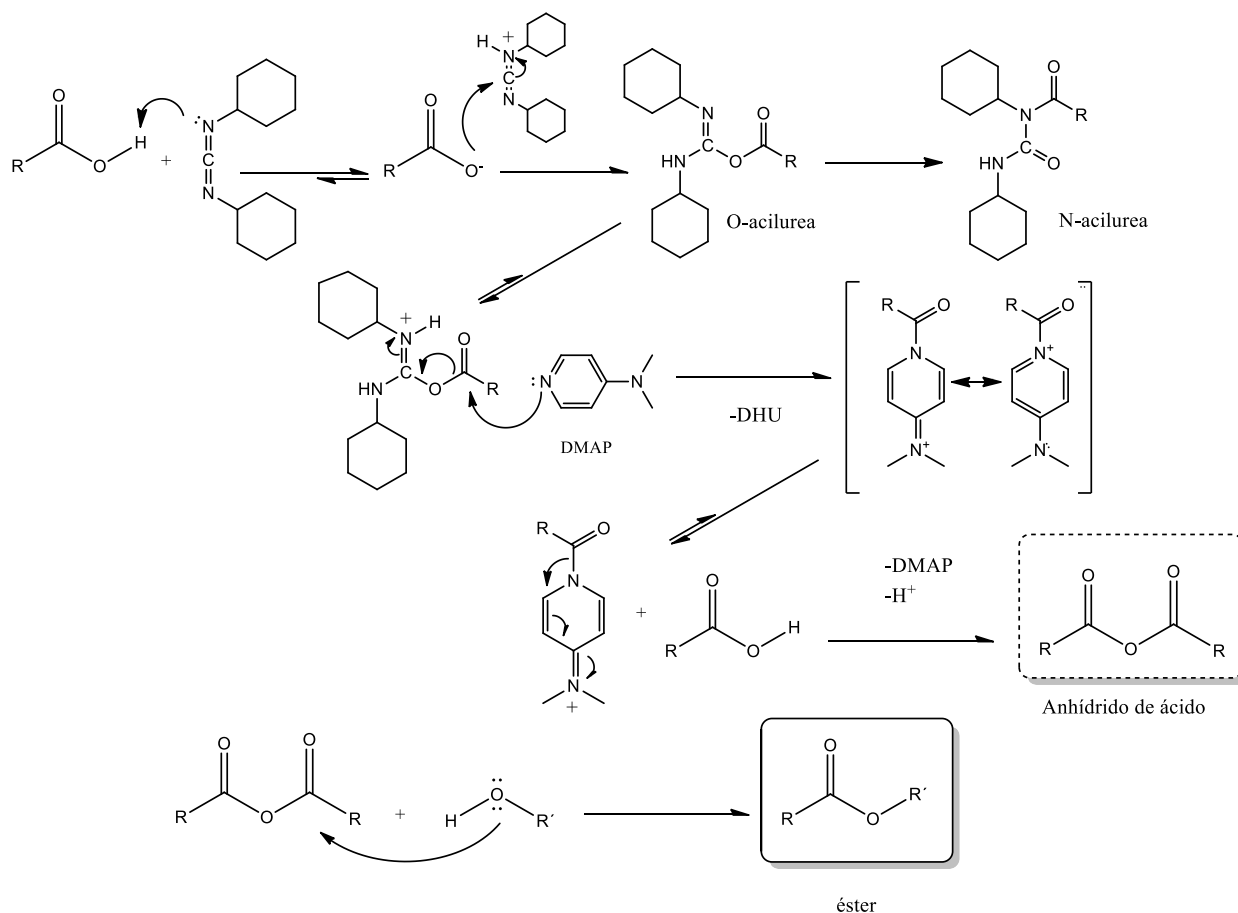


Figura 2.2. Mecanismo de reacción para la obtención de ésteres

1) Inicialmente, la DCC actúa como base abstrayendo el protón del ácido carboxílico, el cual en su forma ionizada realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono cuaternario de la DCC, formándose una *O*-acilurea como intermediario reactivo (Figura 2.2, Etapa 1).

2) En una próxima etapa la DMAP, reacciona con la *O*-acilurea formando una amida reactiva y dicitlohexilurea (DHU) (Figura 2.2, Etapa 2).

3) La amida reactiva, reacciona con otra molécula de ácido carboxílico para generar “*in situ*” el correspondiente anhídrido de ácido (Figura 2.2, Etapa 3).

4) El alcohol se adiciona a uno de los carbonilos activados del anhídrido generado a través de un ataque nucleofílico, obteniéndose el correspondiente éster (Figura 2.2, Etapa 4).

La adición de DMAP es fundamental para la formación eficiente del éster, ya que sin la presencia de este catalizador, la *O*-acilurea se reordena desplazando la reacción hacia la formación de una *N*-acilurea no reactiva, la cual imposibilita la formación del éster correspondiente^{72,73}(Figura 2.2, Etapa 1).

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

2.1.2 Objetivos

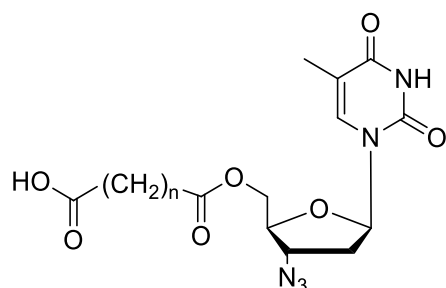
El objetivo de esta etapa de trabajo, es obtener nuevos derivados de AZT por esterificación del 5'-OH con ácidos dicarboxílicos de cadena carbonada lineal, específicamente con el ácido succínico, glutárico y adípico. Estos diácidos son considerados grupos *Espaciadores* en la estructura general de los profármacos múltiples que se desarrollan en el presente Trabajo de Tesis. El método sintético seleccionado fue la esterificación de Steglich⁶⁷. Los nuevos derivados presentan la siguiente estructura general (Figura 2.3):



Figura 2.3. Estructuras generales de los derivados de AZT desarrollados en el capítulo 2.

2.1.3 Resultados y discusiones

Los derivados planteados que son objeto de síntesis son: AZT-Succínico (**AZT-Suc, 1**), AZT-Glutárico (**AZT-Glu, 2**) y AZT-Adípico (**AZT-Adi, 3**), los cuales se representan en la Figura 2.4 y Anexo 1.



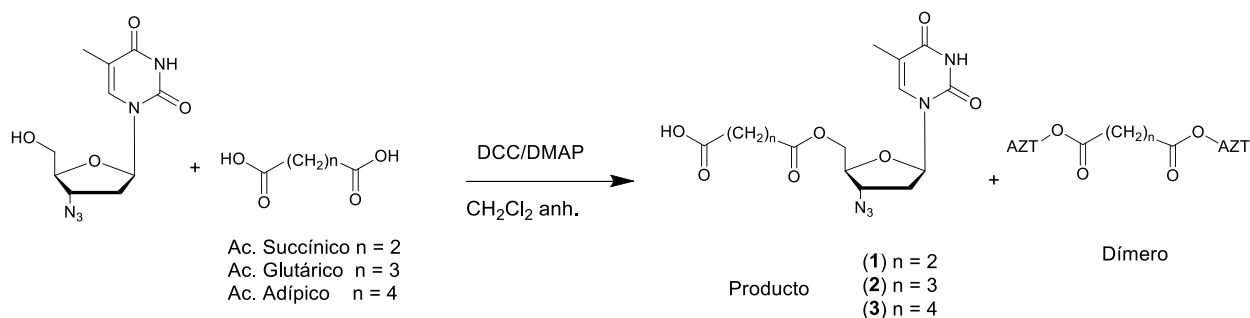
<i>Compuesto</i>	<i>n</i>
1; AZT-Suc	2
2; AZT-Glu	3
3; AZT-Adi	4

Figura 2.4. Estructuras de los derivados AZT-Espaciador.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

2.1.3.1 Condiciones de reacción

La reacción de esterificación, se puede representar como se muestra en la Figura 2.5.



**DCC*: Dimetilaminopiridina. *DMAP*: N,N'-diciclohexilcarbodiimida

Figura 2.5. Esquema de síntesis de los derivados AZT-Espaciador.

Basándose en el mecanismo de reacción planteado en la Figura 2.2, la síntesis de los nuevos profármacos se realizó en dos etapas consecutivas. En la primera, se formó el anhídrido correspondiente por acción de DCC y DMAP, y luego en la segunda etapa se realizó la formación del éster correspondiente mediante el agregado de AZT al medio de reacción. Es muy importante destacar que, debido a la presencia de dos grupos reactivos en la molécula del espaciador (ácidos dicarboxílicos), es posible la formación de dímeros (Figura 2.5), originados por el ataque nucleofílico de dos moléculas de AZT al anhídrido de ácido. Dichos dímeros constituyen subproductos de reacción que disminuyen el rendimiento del producto deseado. Modificando la relación estequiométrica entre el diácido y la DCC, manteniendo constante los equivalentes de AZT y DMAP, se favorece la formación del producto deseado, razón por la cual se ensayaron condiciones de reacción, según se muestra en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Condiciones de reacción ensayadas para la obtención del derivado AZT-Suc (1).^a

Condición	AZT (eq)	Diácido (eq)	DCC (eq)	DMAP (eq)	Producto	
					Producto	Dímero
I	1	1	1,5	0,12	+	+++
II	1	2,5	1,5	0,12	+++	+
III	1	3	1,5	0,12	+++	+

^a 5mL de CH_2Cl_2 ; 1 mmol de AZT.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

Como primera condición se utilizó una relación estequiométrica 1:1,5 (diácido:DCC) y se observó como producto principal de la reacción al dímero correspondiente, debido a que el exceso de DCC en relación al diácido presente en el medio de reacción conduce a la activación de ambos grupos carboxilos en la molécula espaciadora, los cuáles posteriormente se conjugan de manera simultánea con el grupo hidroxilo de AZT, y forman así el dímero de estructura, AZT-Suc-AZT (Condición I, Tabla 2.1). En una segunda etapa, se aumentó la cantidad de diácido con el fin de desfavorecer la activación de ambos grupos carbonilos, para lo cual se utilizó una relación estequiométrica 2,5:1,5 (diácido:DCC), observándose como producto principal de reacción el AZT-Suc (**1**) (Condición II Tabla 2.1 y Figura 2.6) y una pequeña proporción de dímero. Como última condición, se aumentó nuevamente la cantidad de diácido hasta obtener una relación 3:1,5 (diácido: DCC). Empleando esta condición de reacción no se observó una mejora en el rendimiento de la reacción (Condición III, Tabla 2.1). Sobre la base de los resultados obtenidos, para los estudios posteriores se utilizó sistemáticamente la condición II, con el fin de minimizar la formación del dímero y favorecer la obtención del producto deseado en el crudo de la reacción. Las condiciones de reacción fueron monitoreadas mediante HPLC-UV. En la Figura 2.6 se muestra un cromatograma a modo de ejemplo de la condición II para la síntesis de AZT-Suc.

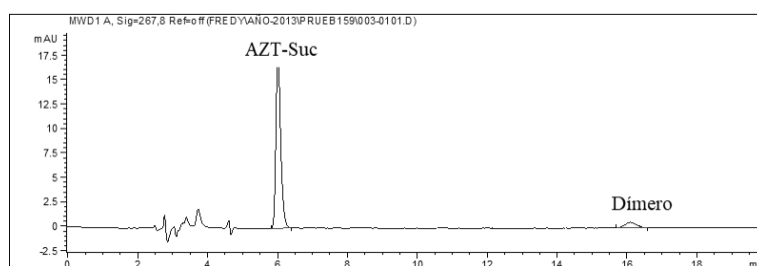


Figura 2.6. Cromatograma correspondiente a la condición II de reacción, para la síntesis AZT-Suc.

Asimismo, cuando se compararon los resultados obtenidos para la misma condición de reacción empleando ácido glutárico y adípico, se observó que la formación del dímero es más factible cuanto mayor es el largo de la cadena carbonada del diácido. Esto se podría deber a que la activación de ambos grupos carboxílicos se ve favorecida al disminuir el impedimento estérico cuando se aumenta el largo de la cadena carbonada del espaciador. Es decir, que cuando se utiliza el ácido succínico la formación del dímero es menor, mientras que su formación se ve más favorecida cuando se utiliza el ácido adípico.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

Finalmente, el producto deseado se aisló del crudo de reacción realizando primero una filtración para eliminar la DHU producida durante la reacción y luego una serie de extracciones líquido-líquido con cambio de pH que permitió aislar el producto de reacción debido a las diferentes características ácido base entre éste y el subproducto (dímero). Por último, se evaporó a sequedad el solvente orgánico conteniendo el producto, el cuál fue obtenido como un sólido blanco.

2.1.3.2 *Caracterización de AZT-Suc (1), AZT-Glu (2) y AZT-Adi (3)*

Una vez purificados y aislados, los derivados **AZT-Suc**, **AZT-Glu**, y **AZT-Adi**, fueron caracterizados para confirmar la identidad de los productos obtenidos. Entre las metodologías utilizadas a tal fin, se encuentran la espectrometría de masas de alta resolución (*HRMS* por sus siglas en inglés) y la resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN), de carbono-13 (^{13}C -RMN) y sus variantes en dos dimensiones.

Se utilizó la técnica de *HRMS* empleando condiciones previamente desarrolladas en nuestro grupo de investigación para *AZT*, obteniéndose en todos los casos el ion molecular correspondiente a la pérdida de un protón ($M-1$) (*Anexo II*), confirmándose así la presencia de cada uno de los compuestos sintetizados.

Se realizaron los espectros de RMN de protones (^1H -RMN) y de carbonos (^{13}C -RMN) (*Anexo II*). Posteriormente, se emplearon las técnicas bidimensionales, entre las cuales se encuentran *Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC)* y *Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC)*. La primera (*HSQC*), correlaciona el desplazamiento químico de cada protón con el desplazamiento químico del carbono (o nitrógeno) al cual está directamente unido. En cambio, *HMBC* correlaciona protones y carbonos que están a dos o tres enlaces de distancia⁷⁴. La técnica de RMN se utiliza habitualmente para la identificación de estructuras químicas, constituyendo una herramienta imprescindible para la caracterización estructural de sustancias desconocidas, ya que es un método no destructivo que aporta información sobre los núcleos activos presentes en las moléculas estudiadas.

En los espectros de ^1H -RMN se identificaron las señales características de los grupos metileno de los espaciadores entre 2,5-2,6 ppm, complementadas con las señales típicas correspondientes a *AZT*. En los espectros de ^{13}C -RMN se identificaron las señales de los grupos carbonilos de la cadena lateral a 172 – 173 ppm, como así también las correspondiente a *AZT*. La asignación de cada señal se complementó con los espectros en dos dimensiones, confirmando la identidad de cada producto de síntesis.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

A continuación, se detallan los resultados obtenidos que confirman las estructuras químicas de **1-3**, mientras que en el *Anexo 1* se encuentran los espectros correspondientes de RMN y de HRMS. Para facilitar la identificación de las señales correspondiente en los ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, se numeraron los átomos de cada derivado tal como se muestra en la Figura 2.7.

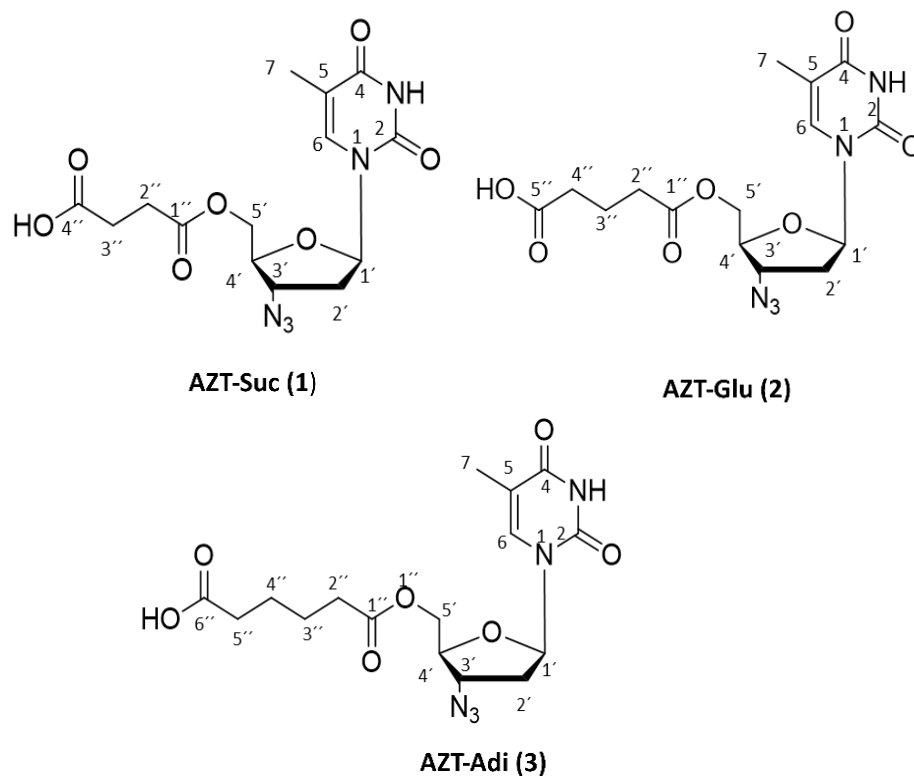


Figura 2.7. Numeración de los compuestos sintetizados, para su interpretación por métodos espectroscópicos.

3'-Azido-3'-deoxy-5'-O-succiniltimidina ácido (1; AZT-Suc): Se obtuvo utilizando ácido succínico, con un rendimiento aislado del 58%. **Punto de fusión:** 59–60 °C. **^1H -RMN** (400 MHz, Acetona- d_6): δ [ppm] = 1,87 [d, 3H, J = 1,2 Hz, 7H], 2,52 [dm, 2H, J = 26,2 Hz, 2'H], 2,69 [m, 4H, J = 25,2, 2'H y 3'H], 4,11 [c, 1H, J = 13,4 Hz, 4'H], 4,40 [dd, 2H, J = 16,6Hz, 5H], 4,51 [dt, 1H, J = 18,0 Hz, 3'H], 6,24 [t, 1H, J = 13,1 Hz, 1'H], 7,54 [d, 1H, J = 1,2 Hz, 6H]. **^{13}C -RMN** (100,63 MHz, Acetona- d_6): δ [ppm] = 11,59 [C7], 28,30 [C3''], 28,36 [C2''], 36,53 [C2'], 60,67 [C3'], 63,27 [C5'], 81,55 [C4'], 84,50 [C1'], 110,36 [C5], 135,73 [C6], 150,36 [C2], 163,46 [C4], 171,92 [C1''], 172,98 [C4'']. **HRMS (ESI)** m/z $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_7^-$ [M-H]⁻ calculado: 366,1055; experimental 366,1001.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

3'-Azido -3'-deoxy-5'-O-glutarilimidina ácido (2; AZT-Glu): Se obtuvo utilizando ácido glutárico, con un rendimiento del 60%. **Punto de fusión:** 56–57 °C. **¹H-RMN** (400 MHz, Acetona-d₆): δ [ppm] = 1,87 [d, 3H, J = 1,2 Hz, 7H], 1,93 [c, 2H, J = 14,72 Hz, 3'H], 2,41 [t, 2H, J = 7,24Hz, 2'H], 2,53 [m, 4H, J = 71,4, 2'H y 4'H], 4,13 [c, 1H, J = 13,9Hz, 4H], 4,39 [dc, 2H, J = 16,8Hz, 5'H], 4,53 [dt, 1H, J = 18,0Hz, 3'H], 6,23 [t, 1H, J = 13,1 Hz, 1'H], 7,51 [d, 1H, J = 1,2 Hz, 6H]. **¹³C-RMN** (100,63 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 11,61 [C7], 20,00 [C3''], 32,23 [C4''], 32,69 [C2''], 36,51 [C2'], 60,90 [C3'], 63,31 [C5'], 81,50 [C4'], 84,70 [C1'], 110,30 [C5], 135,70 [C6], 150,31 [C2], 163,35 [C4], 172,22 [C1'], 173,34 [C5'']. **HRMS (ESI)** m/z C₁₅H₁₈N₅O₇⁻ [M-H]⁻: calculado: 380,1212; experimental 380,1244.

3'-Azido -3'-deoxy-5'-O-adipitimidina ácido (3; AZT-Adi): Se obtuvo utilizando, ácido adípico, con un rendimiento del 52%. **Punto de fusión:** 48–49 °C. **¹H-RMN** (400 MHz, Acetona-d₆): δ [ppm] = 1,68 [m, 4H, J = 37,7 Hz, 3'H y 4'H], 1,87 [d, 3H, J = 1,3 Hz, 7H], 2,34 [m, 2H, J = 28,1 Hz, 2'H], 2,53 [m, 4H, J = 28,1 Hz, 2'H y 5'H], 4,12 [q, 1H, J = 13,9 Hz, 4'H], 4,40 [dc, 2H, J = 16,8 Hz, 5'H], 4,52 [dt, 1H, J = 18,1 Hz, 3'H], 6,22 [t, 1H, J = 13,1 Hz, 1'H], 7,52 [d, 1H, J = 1,2 Hz, 6H]. **¹³C-RMN** (100,63 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 11,64 [C7], 24,15 [C3'' y C4''], 32,94 [C5''], 33,31 [C6''], 36,52 [C2'], 60,90 [C3'], 63,27 [C5'], 81,52 [C4'], 84,74 [C1'], 110,30 [C5], 135,81 [C6] 150,36 [C2], 163,50 [C4], 172,43 [C1'], 173,78 [C6'']. **HRMS (ESI)** m/z C₁₆H₂₀N₅O₇⁻ [M-H]⁻: calculado: 394,1368; experimental 394,1415.

2.1.4 Conclusiones parciales

Los derivados **1-3**, se obtuvieron por esterificación del 5'-OH de AZT con ácido succínico, glutárico y adípico, a través de la esterificación de Steglich. Esta estrategia permitió generar *in situ* los anhídridos de ácido correspondientes, los cuales luego reaccionaron eficientemente con el grupo hidroxilo de AZT, para formar los ésteres correspondientes. De esta forma, manejando la relación estequiométrica entre la DCC y el ácido dicarboxílico, se pudo desarrollar una metodología que permite ampliar el espacio químico para la generación de ésteres de AZT por conjugación con ácidos dicarboxílicos lineales. De esta forma, la obtención de este tipo de profármacos no se encuentra limitada a la utilización de los anhídridos cíclicos de ácido disponibles en el mercado.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

Los compuestos **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi**, se obtuvieron con buenos rendimientos de reacción. Se purificaron utilizando técnicas simples y se caracterizaron de forma exitosa por RMN y HRMS, confirmando la estructura de los tres derivados sintetizados.

2.1.5 Materiales y métodos

El fármaco antiviral AZT, fue donado por Laboratorios Filaxis[®] (Buenos Aires, Argentina). Los reactivos utilizados fueron adquiridos en Sigma Aldrich[®] (99,9 % de pureza). La síntesis y la purificación se realizaron con solventes de grado analítico (Sintorgan[®]). Se utilizó agua Milli-Q en todos los experimentos.

2.1.5.1 Procedimiento general para la síntesis de 1-3

Para la síntesis de **1-3**, se disolvieron en 5 mL de CH₂Cl₂ (DCM) anhidro, 1,5 mmol de DCC; 0,12 mmol de DMAP y 2,5 mmol del diácido correspondiente. La mezcla de reacción se agitó en un baño de hielo por 15 min y posteriormente a temperatura ambiente por 24 hs para generar *in situ* el anhídrido. En una segunda etapa, se adicionó 1 mmol de AZT y se agitó el medio de reacción por 48 h a temperatura ambiente. El crudo de reacción resultante se filtró para eliminar la DHU formada y luego se extrajo la DMAP presente con 3 x 10 mL de HCl (1 M). En una segunda etapa, se trató la fase orgánica resultante con una solución de HCO₃Na 5% (3 x 10 mL). La fase acuosa básica que contiene el producto, se acidificó hasta pH 1,0 y se extrajo con 3 x 10 mL DCM. La fase orgánica resultante se secó con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó a sequedad, obteniéndose un sólido blanco con un rendimiento de reacción entre el 50 y el 60% según el diácido utilizado.

2.1.5.2 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El curso de la reacción fue monitoreado por HPLC-UV, utilizando un equipo Agilent S1100[®]. La fase móvil utilizada fue una mezcla de MeOH: ácido fosfórico pH 2 (0,1 M) 50:50. Se empleó una columna analítica Phenomenex Synergi Fusion C18[®] (4 x 250 mm, 5 mm tamaño de partícula) equipada con una precolumna Phenomenex Security Guard Fusion RP[®] (4 x 30 mm) termostatazada a 40 °C. La longitud de onda seleccionada para la cuantificación de las muestras fue 267 nm.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

Las condiciones cromatográficas, permitieron detectar tanto a los compuestos, como a AZT y a los dímeros correspondientes. Los tiempos de retención (t_r) se presentan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Tiempos de retención (t_r), para AZT, AZT-Suc, AZT-Glu, AZT-Adi y subproductos de reacción.

<i>Compuestos</i>	<i>t_r (min)</i>	<i>Compuestos</i>	<i>t_r (min)</i>
AZT	4,63		
AZT-Suc (1)	5,75	AZT-Suc-AZT	16,01
AZT-Glu (2)	6,92	AZT-Glu-AZT	19,83
AZT-Adi (3)	7,61	AZT-Adi-AZT	21,23

2.1.5.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN fueron obtenidos usando un espectrómetro Bruker Avance II 400 de alta resolución, equipado con resolución digital, sonda de detección inversa y unidad de temperatura variable. El equipo operó a 400,16 MHz para ^1H y a 100,63 para ^{13}C . Se utilizaron tubos de 5 mm de diámetro marca Merck®. Todos los experimentos se desarrollaron empleando como solvente acetona deuterada (CD_3COCD_3 , 99,99%, Sigma Aldrich®) y utilizando trimetilsilano como estándar interno. La concentración de las muestras fue de 50 mM en todos los casos. Los corrimientos químicos se expresan en ppm.

2.1.5.4 Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

El peso molecular de los compuestos obtenidos, se determinó por HRMS, utilizando un equipo Bruker Daltonics micro TOF QII®, del Instituto Superior de Investigación, Desarrollo y Servicios en Alimentos (ISIDSA). Los ensayos se realizaron empleando una interface de electrospray (ESI) configurada en modo negativo, abarcando un rango de detección de 257 a 400 m/z,

2.2 Estabilidad Química

2.2.1 Introducción

Un aspecto fundamental para el diseño de un nuevo profármaco, es lograr una regeneración del principio activo con una velocidad y extensión adecuadas. La velocidad de regeneración debe ser rápida e idealmente completa, para no disminuir la biodisponibilidad del principio activo. El proceso de regeneración *in vivo* es el resultado de la hidrólisis química o enzimática del enlace covalente entre el fármaco y el complemento molecular.

Particularmente, los ésteres se hidrolizan en medios acuosos a través de catálisis ácida o básica, obteniéndose el ácido carboxílico y alcohol correspondiente (Figura 2.8).

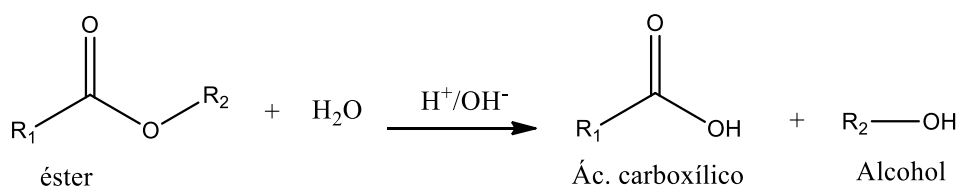


Figura 2.8. Hidrólisis de ésteres en medio acuoso.

2.2.2 Objetivos

Teniendo en cuenta la necesidad de conocer la estabilidad química de los derivados con estructura *AZT-Espaciador*, surge como objetivo el estudio de esta propiedad para **AZT-Suc (1)**, **AZT-Glu (2)** y **AZT-Adi (3)**, en soluciones acuosas de diferentes pH. Dichos estudios permitirán conocer los parámetros cinéticos involucrados, identificando además los productos de degradación correspondiente y serán comparados con otro derivado de AZT sintetizado con anterioridad, conocido como **AZT-Oxa** (Figura 1.9).

2.2.3 Resultados y discusiones

2.2.3.1 Estudios de estabilidad química a pH 2 y 7,4

Se realizaron los estudios de estabilidad por 48 h a 37°C en *buffer* fosfato 0,1 M a pH 2 y 7,4 de **AZT-Suc**, **AZT-Glu**, **AZT-Adi**. En esas condiciones, no se observaron cambios en la concentración de los profármacos *AZT-Espaciador* (1-3) evaluados, ni se detectó la aparición del principio activo como producto de degradación (Figura 2.9), demostrando que son estables en las condiciones evaluadas. En cambio, si se observó degradación de **AZT-Oxa** en medio ácido y neutro, con un $t_{1/2}$ de 19 (± 3) h y 12 (± 2) h, respectivamente (Figura 2.9 y Ecs 2.1 y 2.2).

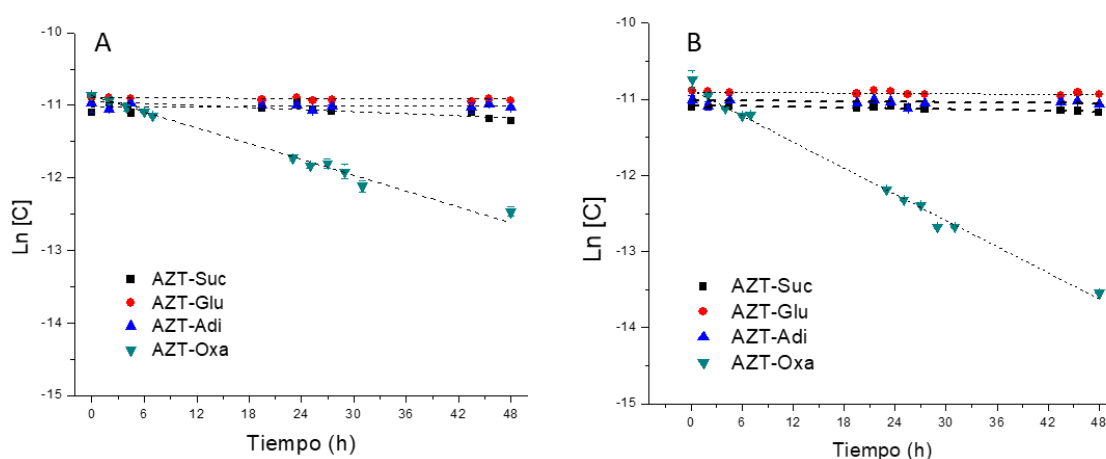


Figura 2.9. Ln concentración vs tiempo. Perfiles de hidrólisis de los profármacos AZT-Suc, AZT-Glu, AZT-Adi y AZT-Oxa. A) pH 2 y 37°C. y B) pH 7,4 y 37°C.

$$\begin{aligned} \text{Ln [AZT-Oxa] (pH 2)} &= -0,035(\pm 0,001) \text{ tiempo (h)} -10,89 (\pm 0,03) & \mathbf{Ec\ 2.1} \\ n &= 11; r^2 = 0,985; sd = 0,05; F = 704.61 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Ln [AZT-Oxa] (pH 7,4)} &= -0,059(\pm 0,001) \text{ tiempo (h)} -10,83 (\pm 0,03) & \mathbf{Ec\ 2.2} \\ n &= 11; r^2 = 0,994; ds = 0,07; F = 1605,6 \end{aligned}$$

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

Tabla 2.3. Constantes de velocidad de degradación observadas (k_{obs}) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) para AZT-Oxa, AZT-Suc, AZT-Glu y AZT-Adi en pH 2 y 7,4; 48h.

Derivado	pH 2		pH 7,4	
	k_{obs} (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	k_{obs} (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
AZT-Oxa	0,04 (± 0,01)	19,0 (± 3,0)	0,06 (± 0,01)	12,0 (± 2,0)
AZT-Suc	Estable	Estable	Estable	Estable
AZT-Glu	Estable	Estable	Estable	Estable
AZT-Adi	Estable	Estable	Estable	Estable

Comparando los resultados obtenidos para los derivados **1-3** con los de **AZT-Oxa**, se observó que el comportamiento a esta evidencia que la separación de los grupos carboxílicos empleando grupos metilenos en el “Espaciador” es beneficioso en cuanto a una mayor resistencia a la hidrólisis química de los derivados **1-3**.

2.2.3.2 Estudios de estabilidad química a pH 10

Además, se realizaron estudios de estabilidad en condiciones básicas (pH 10), tomándose muestras durante 24 h. En estos ensayos se observó que los derivados **1-3** se degradan siguiendo una cinética de pseudo-primer orden (Figura 2.10 y Ecs. 2.3-2.6), presentando los siguientes valores de $t_{1/2}$: 13,2 (± 0,4) h, 7,4 (± 0,3) h, y 5,7 (± 0,5) h, para **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi**, respectivamente (Tabla 2.4). Como se puede observar a este pH, a medida que aumenta la longitud de la cadena carbonada de los derivados AZT-Espaciador **1-3** disminuyen los $t_{1/2}$. También se evaluó la estabilidad de **AZT-Oxa** a pH 10 por 24 h, obteniéndose un valor de $t_{1/2}$ de 0,21 (± 0,01) h, el cual es significativamente inferior a los determinados para **1-3** (Figura 2.10, Ec. 2.6 y Tabla 2.4). Estos estudios demuestran que los derivados **1-3** se hidrolizan regenerando AZT, lo cual es esencial para que cumplan el rol de profármacos, y que a su vez presentan $t_{1/2}$ mayores que **AZT-Oxa**, lo cual podría traducirse en un mejor perfil biofarmacéutico al comparar entre estos derivados.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

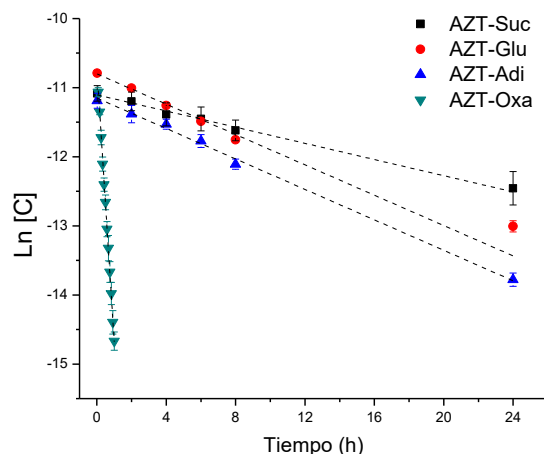


Figura 2.10. Ln concentración vs tiempo. Perfiles de hidrólisis a pH 10 y 37°C.
Derivados AZT-Oxa, AZT-Suc, AZT-Glu y AZT-Adi.

$$\begin{aligned} \text{Ln [AZT-Suc]} &= -0,053 (\pm 0,002) \text{ tiempo (h)} - 11,12 (\pm 0,02) & \text{Ec 2.3} \\ n &= 6; r^2 = 0,993; ds = 0,04; F = 689,83 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Ln [AZT-Glu]} &= -0,093 (\pm 0,005) \text{ tiempo (h)} - 10,89 (\pm 0,06) & \text{Ec 2.4} \\ n &= 6; r^2 = 0,984; ds = 0,09; F = 308,84 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Ln [AZT-Adi]} &= -0,109 (\pm 0,003) \text{ tiempo (h)} - 11,15 (\pm 0,03) & \text{Ec 2.5} \\ n &= 6; r^2 = 0,996; ds = 0,06; F = 1399,33 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Ln [AZT-Oxa]} &= -3,94 (\pm 0,03) \text{ tiempo (h)} - 10,73 (\pm 0,02) & \text{Ec 2.6} \\ n &= 11; r^2 = 0,999; ds = 0,04; F = 11292,73 \end{aligned}$$

Tabla 2.4. Constantes de velocidad de degradación observadas (k_{obs}) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) para AZT-Oxa, AZT-Suc, AZT-Glu y AZT-Adi en pH 10, a 37 °C, 24h.

Derivado	pH 10	
	k_{obs} (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
AZT-Oxa	3,9 (± 0,2)	0,21 (± 0,01)
AZT-Suc	0,053 (± 0,002)	13,2 (± 0,4)
AZT-Glu	0,093 (± 0,003)	7,4 (± 0,3)
AZT-Adi	0,109 (± 0,004)	5,7 (± 0,5)

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

Con el fin de elucidar las razones de estas diferencias respecto a la estabilidad de estos compuestos (Tabla 2.4), se realizaron estudios computacionales, empleando metodologías en mecánica cuántica, en colaboración con el Dr. S. Ribone⁷⁵, del Departamento de Ciencias Farmacéuticas, FCQ-UNC, los cuales no se analizan exhaustivamente debido a que no forman parte de los objetivos de este Trabajo de Tesis. Para ello, se modelaron las coordenadas de reacción involucradas en la hidrólisis de los derivados *AZT-Espaciador*; las que corresponden al ataque del ión oxidrilo sobre el carbono carbonílico del grupo éster correspondiente (*Anexo III*).

En estos estudios se puede observar que el primer estado de transición correspondiente a la proximidad del oxidrilo al carbono carbonílico del éster (*TS1*; *Anexo III*), es el paso limitante en la reacción de hidrólisis de los profármacos estudiados, siendo **AZT-Oxa** el que presenta la energía de su *TS1* como la más baja, siendo el mismo el más inestable de la serie. La diferencia de energías entre los profármacos **1-3** y **AZT-Oxa** se debe a que, este último, posee el grupo carboxilo adyacente al carbonilo del éster que sufre el ataque por el ión hidróxido, con lo cual atrae una mayor densidad de moléculas de agua alrededor del centro hidrolítico (*Anexo III*). La presencia de dichas moléculas de agua estabiliza por medio de una red de puentes de hidrógeno el *TS1* de la reacción, lo cual produce una notoria disminución en la E_a de la misma, y por consiguiente una menor estabilidad de **AZT-Oxa**

2.2.4 Conclusiones parciales

Los estudios de estabilidad química demostraron que **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi** pueden regenerar AZT en condiciones básicas y que a pH neutros o ácidos presentan una significativa estabilidad, exhibiendo así un perfil de estabilidad química optimizado respecto del profármaco **AZT-Oxa**, que forma parte de los esfuerzos científicos previos realizados en el grupo de trabajo. Combinando los estudios teóricos con los experimentales, se concluye que **AZT-Oxa** presenta un grupo carboxilo terminal que se encuentra solvatado y contiguo al carbono carbonílico del éster correspondiente, siendo dichas moléculas de agua las que asisten la hidrólisis de la unión éster entre el AZT y el complemento molecular. Dicha situación no ocurre para los nuevos profármacos de AZT sintetizados como parte de este Trabajo de Tesis, justificando sus estabilidades químicas optimizadas.

Sobre la base de los resultados presentados, es posible decir que los derivados **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi** presentan un perfil de estabilidad química que justifican la continuidad de los estudios biofarmacéuticos, entre ellos, los estudios de estabilidad en matrices biológicas.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

2.2.5 Materiales y Métodos

2.2.5.1 Soluciones de trabajo y soluciones *buffer*

Las soluciones madres de los compuestos (**AZT-Oxa** y **1-4**), se pesaron 10 mg de cada uno y se disolvieron en 10 mL de una mezcla ACN : MeOH (80:20), obteniéndose así una concentración de 1 mg/mL. A partir de ellos, se hicieron soluciones de **AZT-Suc** y **AZT-Glu** en ACN de concentración 0,15 mg/mL, para ser empleadas como estándar interno (EI), de acuerdo al compuesto a cuantificar por HPLC-UV (Sección 2.2.5.2).

Para los ensayos de estabilidad a diferentes *pH*, se utilizaron soluciones de *buffer* fosfato (0,1 M) de *pH* 2 (H_3PO_4 85% 0,003 mg/mL), *pH* 7,4 (8,63 mg/mL NaH_2PO_4 ; 4,70 mg/mL Na_2HPO_4) y *pH* 10 (8,63 mg/mL NaH_2PO_4). Las cuales, se prepararon con reactivos para análisis (Anedra[®]) en agua Milli-Q el mismo día de los ensayos. El *pH* de las soluciones se midió con un pHmetro GLP21 (Crison Instruments[®]), equipado con un electrodo de Ag/AgCl, el cual se calibró con soluciones estándar de *buffer* *pH* 7,00 ($\pm 0,01$) y 4,00 ($\pm 0,01$) marca Crison[®].

2.2.5.2 Ensayos de estabilidad

Con el objetivo de estudiar la estabilidad de los compuestos, **AZT-Suc**, **AZT-Glu**, **AZT-Adi** y **AZT-Oxa**, se prepararon soluciones de trabajo cuyas concentraciones fueron de $1,4 \times 10^{-4}$ M, en *buffer* fosfato (0,1 M) *pHs* 2; 7,4 y 10,0. Para llevar a cabo los ensayos, las soluciones de trabajo se fraccionaron en alícuotas de 2 mL cada una y se incubaron a 37°C en un baño termostatzado con agitación. Se tomaron muestras a diferentes tiempos a las cuales se les adicionó 80 μL de HCl 2 M y 50 μL del correspondiente EI para la cuantificación por HPLC-UV. Se empleó como EI **AZT-Glu** 0,15 mg/mL para la cuantificación de **AZT**, **AZT-Suc** y **AZT-Adi**, mientras que para la cuantificación de **AZT-Glu** se utilizó **AZT-Suc** 0,15 mg/mL.

Los estudios realizados a *pH* 2 y 7,4 se prolongaron durante 48 h y se tomaron muestras a los siguientes tiempos: 120, 270, 1170, 1290, 1410, 1530, 1650, 2610, 2730, 2880 min; mientras que a *pH* 10 se tomaron muestras a 5, 120, 240, 360, 480, 1320, 1380, 1440 min durante 24 h.

Los ensayos de estabilidad se realizaron por triplicado a temperatura controlada a 37 °C y con agitación continua para asegurar la homogeneidad de las muestras. Se empleó un baño termostatzado Vicking Masson D[®] con una precisión de $\pm 0,1$ °C, con agitación controlada. Las muestras fueron cuantificadas por HPLC-UV, utilizando los métodos validados descritos en el Capítulo 4.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

2.2.5.3 Preparación y cuantificación de las muestras

Las muestras se prepararon mediante un proceso de extracción en fase sólida (*SPE*, por sus siglas en inglés). Se utilizaron cartuchos de extracción Strata-X 30 mg, Phenomenex® y una celda de vacío Phenomenex®. La técnica consiste en el lavado de los cartuchos con 2 mL de MeOH, seguido de una etapa en la cual se equilibra la fase estacionaria con 2 mL de *buffer* fosfato (0,1 M) pH 2, carga de la muestra, lavado con 8 mL de una mezcla de *buffer* fosfato (0,1 M) pH 2: MeOH (90:10), secado por vacío durante 1 min y por último elución con 1 mL de ACN. Finalmente, se evaporó el solvente a sequedad utilizando un concentrador *Techne Sample Concentrator*, Dri-Block® DB-3A. Las muestras así procesadas se almacenaron a -10°C hasta el momento del análisis por HPLC-UV.

2.3 Estudios en plasma humano

2.3.1 Introducción

La administración de un fármaco puede llevarse a cabo por diversas vías, entre las más importantes se encuentran, a) la *vía endovenosa*, en la cual el fármaco ingresa directamente a circulación sistémica y se distribuye por todo el organismo; o b) la *vía oral*, en la cual el principio activo llega a la circulación sistémica a través del proceso de absorción intestinal. En ambos casos, la biodistribución se produce a través del fluido circulatorio, el cual conforma el compartimento central en el organismo, y a partir de éste se suceden los procesos de biotransformación, metabolismo y excreción. Finalmente, tienen lugar los fenómenos asociados a la eliminación del fármaco del organismo y la consiguiente finalización de la actividad biológica⁸⁸.

La acción terapéutica de un principio activo, es ejercida por la fracción de fármaco libre, es decir aquella que no se encuentra unida a proteínas plasmáticas, ya que esta última no puede unirse a su blanco terapéutico y por consiguiente no puede ejercer su acción farmacológica⁸⁹. A su vez, los complejos entre el fármaco y las proteínas de transporte sirven como reserva para mantener la concentración plasmática del principio activo, la cual va disminuyendo por procesos de biotransformación, y por lo tanto prolongan la permanencia de fármaco en el organismo.

El plasma es la fracción acelular de la sangre, que contiene diversas proteínas. Entre ellas la *albúmina sérica humana* (ASH), la *alfa-1-glicoproteína ácida* (α AGP), diversas globulinas y lipoproteínas^{88,90}. La principal proteína es la ASH, cuya concentración es de 600 μ M y es la responsable de transportar sustancias de carácter ácidas y neutras⁹¹. En contrapartida, la α AGP es capaz de unir compuestos de carácter básico y complementa la funcionalidad de ASH en el transporte de sustancias exógenas. Otras proteínas que están presentes en una concentración más baja en el plasma, tienen una significancia mucho menor en términos del impacto en la farmacocinética de fármacos⁹¹.

La ASH es una proteína compuesta por 585 aminoácidos (PM = 66 kDa), que puede unir, solubilizar y transportar sustancias endógenas y exógenas. Entre las primeras se encuentran los ácidos grasos (AG), bilirrubina, hormonas y aminoácidos, mientras que entre las sustancias

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

exógenas se encuentran una gran diversidad de fármacos, principalmente con características ácidas⁹². El fenómeno de unión a la ASH está gobernado por equilibrios de múltiples interacciones intermoleculares no covalentes de diversa naturaleza (fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas y Van der Waals). Sobre la base de la estructura general de la ASH, se describieron varios sitios de unión de fármacos, los cuales se los conoce con el nombre de sitios de Sudlow, en honor a G. Sudlow, quien fue el primero en proponerlos en el año 1975⁹³. En la actualidad se sabe que existen 4 sitios principales de unión, siendo los sitios I y II los que presentan mayor relevancia desde el punto de vista clínico (Figura 2.11)⁹⁴.

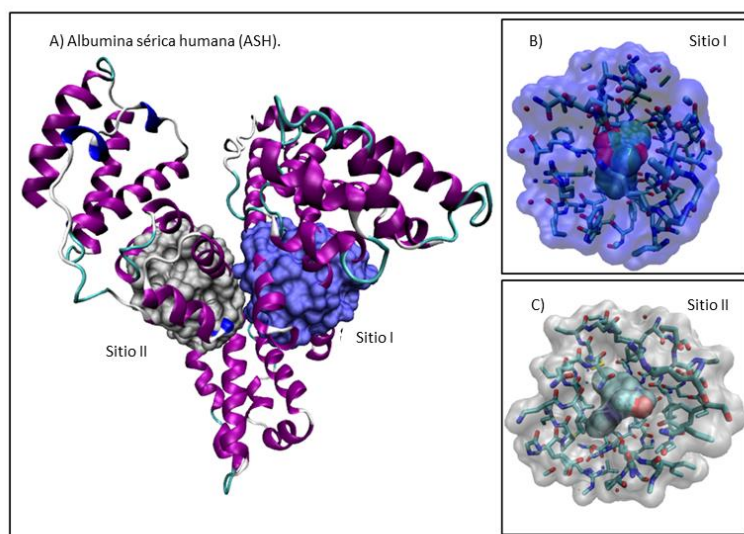


Figura 2.11. (A) Estructura tridimensional de la albúmina sérica humana (ASH).

(B) Vista 3D del sitio de unión I. (C) Vista 3D del sitio de unión II.

El **Sitio I** (Figura 2.11. A y B), es una cavidad grande y flexible, de carácter principalmente apolar con algunas regiones polares, como por ejemplo Tyr150, His242 y Arg257^{91,95}. Entre los ligandos que tienen selectividad por este sitio comúnmente se encuentran el ácido salicílico (SAL), la warfarina, la indometacina y AZT⁹⁴. Se ha descrito a SAL como uno de los marcadores utilizados como referencia de este sitio de unión de la ASH, debido a que presenta una constante de afinidad elevada ($K_a=1,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)^{91,94,95}.

EL **Sitio II** (Figura 2.11. A y C), también presenta característica principalmente apolar con regiones polares. En contraste con el sitio I, la entrada al sitio II está expuesta al solvente y su cavidad interna es más pequeña, poco flexible y estereoselectiva (*l*-triptófano muestra una afinidad 100 veces mayor que el enantiómero *d*-triptófano)⁹⁵. Las moléculas que se unen al sitio II son comúnmente ácidos carboxílicos aromáticos, por ejemplo, los antiinflamatorios no esteroideos, entre ellos el ibuprofeno y el naproxeno. Uno de los marcadores

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

reconocidos de este sitio es el diazepam (DZP), el cual presentan una elevada afinidad por este sitio

$$(K_a = 3,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1})^{94}.$$

La unión a ASH es un proceso reversible, en el cual el fármaco libre [F] se une a la proteína [P] a través de un proceso de equilibrio gobernado por una constante de unión (K_a), para generar el complejo fármaco-proteína [F-P]⁹⁶, como se muestra en la Figura 2.12

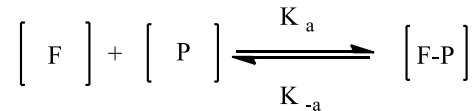


Figura 2.12. Equilibrio complejo Fármaco proteína

Existen diferentes formas de cuantificar la afinidad por las proteínas plasmáticas. Las dos más utilizadas se describen a continuación:

Diálisis de equilibrio, el plasma o suero enriquecido con fármaco se coloca en un compartimento donador, separado por una membrana semipermeable de un segundo compartimento receptor, el cual habitualmente contiene *buffer* pH 7,4. La membrana empleada tiene un corte molecular (*cut-off*) que no permite el paso de las macromoléculas y, por lo tanto, del fármaco unido a las mismas. El principio activo libre difunde por gradiente de concentración al compartimento receptor a través de la membrana hasta que las concentraciones en ambos compartimentos se equilibran (Figura 2.13). Las condiciones estándares utilizadas para lograr tal equilibrio son de 6 h a 37 °C. Esta metodología presenta como principales desventajas el tiempo de incubación requerido, debido a que durante el mismo pueden tener lugar inestabilidades químicas y/o enzimáticas. Por otra parte, también es necesario utilizar *buffer* con la misma fuerza osmótica que en el compartimento donador para lograr condiciones de equilibrio adecuadas⁹².

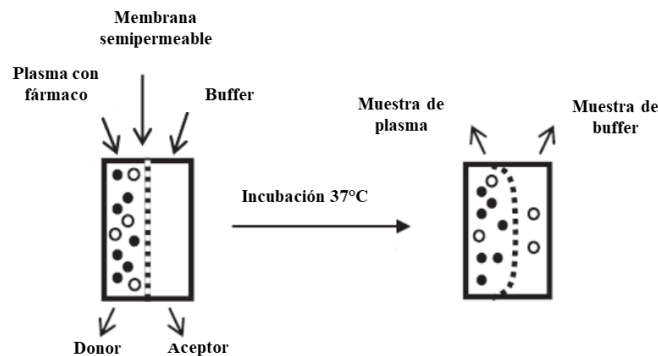


Figura 2.13. Proceso de diálisis de equilibrio.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

Ultrafiltración: el método se basa en la separación del fármaco libre del fármaco unido a proteínas, mediante el ultrafiltrado de una solución preincubada, empleando una membrana semipermeable como parte de un dispositivo de ultrafiltración que es sometido a fuerza centrífuga. El método experimental consiste en agregar el fármaco a una solución que contiene plasma e incubarla por un tiempo determinado para alcanzar condiciones de equilibrio de unión. Luego, la solución de estudio se coloca en un dispositivo de ultrafiltración que contiene una membrana semipermeable y se centrifuga a 1000-2000 g (Figura 2.14). Las condiciones aplicadas durante la centrifugación (tiempo, velocidad, temperatura, etc.) se tienen en cuenta, de manera tal de obtener una pequeña fracción de ultrafiltrado, la cual no debe modificar el equilibrio de unión del analito a la proteína. Normalmente, el $V_{\text{ultrafiltrado}}$ no debe ser mayor al 20% del volumen incubado. Esta metodología presenta como ventaja, que es rápida, simple y eficiente, y con un tiempo de separación que minimiza el porcentaje de fármaco degradado. La principal desventaja es la aplicación de una fuerza centrífuga para lograr la separación, la cual puede provocar un desplazamiento de las condiciones de equilibrio, si no se realiza una adecuada validación del procedimiento aplicado⁹².

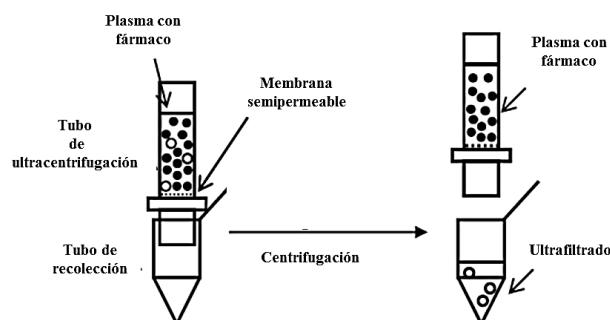


Figura 2.14. *Proceso de ultrafiltración.*

La fracción de fármaco libre es susceptible a sufrir procesos degradativos por las esterasas presentes en el plasma humano, entre ellas la butilcolinesterasa (BChE) y la paraoxonasa (PON), como así también la esterasa presente en la ASH⁹⁷. Las carboxilesterasas (CES), no se encuentran en el plasma humano, debido que a nivel sanguíneo se localizan en los eritrocitos y leucocitos⁹⁸. La actividad hidrolítica de la ASH y de PON, son significativamente más bajas que la de las esterasas (BChE y CES). La expresión de las enzimas hidrolíticas o degradativas es muy variable según la especie animal, por lo cual es muy importante la correcta selección de la especie a utilizar cuando se desarrolla un estudio biofarmacéutico. Algunos autores, sugieren la utilización de plasma humano o de perros debido a su similitud en la expresión y cantidad de enzimas hidrolíticas. Por el contrario, el patrón de expresión en rata,

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

ratón y conejos, es muy diferentes al de los humanos, por lo cual no se aconseja su utilización si se estudian moléculas con potencial interés en terapéutica humana⁹⁹.

Desde el punto de vista de los profármacos, es muy importante que éstos puedan ser hidrolizados por alguna de estas enzimas para regenerar el fármaco activo. Igualmente, dicha hidrólisis no debe ser excesivamente rápida, ya que no se traduciría en una optimización de las propiedades biofarmacéuticas del principio activo.

Como se ha presentado en secciones anteriores, una de las principales desventajas biofarmacéuticas que presenta AZT, es una baja unión a ASH²⁷. Esto provoca una tasa de metabolismo alta, debido a la elevada fracción de fármaco libre¹⁰⁰, y una deficiente concentración del principio activo en los diversos órganos o tejido y por consiguiente en el blanco terapéutico. Sobre la base de lo expuesto, el objetivo de la presente sección es evaluar la estabilidad plasmática de los profármacos de AZT en desarrollo, como así también evaluar su afinidad por las proteínas plasmáticas. Ambos aspectos constituyen elementos esenciales para caracterizar de manera muy general el comportamiento *in vivo* de los profármacos en desarrollo^{41,101}.

2.3.2 Objetivos

Teniendo en cuenta la relevancia de estudiar el comportamiento en plasma humano de los derivados *AZT-Espaciador*, se presenta como objetivo de esta sección el estudio de la estabilidad plasmática y la unión por las proteínas presentes en este fluido de **1**, **2** y **3** y **AZT-Oxa**. Ello permitirá conocer determinados parámetros cinéticos, la posibilidad de regeneración de AZT a nivel plasmático, y si estos derivados presentarían una biodistribución optimizada con respecto a AZT.

2.3.3 Resultados y discusiones

2.3.3.1 Estabilidad en plasma humano

Los estudios de estabilidad plasmática se desarrollaron para **AZT-Suc**, **AZT-Glu**, **AZT-Adi** y **AZT-Oxa**. Se encontró que **1-3** sufren un pequeño porcentaje de hidrólisis plasmática, que corresponde a 1,17; 3,72 y 6,51 %, respectivamente (Figura 2.15 y Tabla 2.5). Los derivados *AZT-Espaciador 1-3* presentaron los siguientes $t_{1/2}$: 138,6 ($\pm 1,6$), 25,6 ($\pm 0,7$) y 43,3 ($\pm 0,4$) h, respectivamente (Tabla 2.5). Es necesario destacar que dichos $t_{1/2}$ son estimados, debido a que el

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

estudio de estabilidad plasmática no pudo extenderse por más de 24 h, ya que, superado ese tiempo, se puede producir pérdida de la actividad enzimática y/o crecimiento microbiano en el plasma incubado. Para el profármaco **AZT-Oxa** (Figura 2.15 y Tabla 2.5), se determinó un $t_{1/2}$ 5,1 ($\pm 0,5$) h, evidenciando que los profármacos **1-3** presentan una mayor resistencia a la hidrólisis mediada por esterasas plasmáticas. Dicho comportamiento puede deberse a un aumento del porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas y/o a una acción diferencial de las enzimas degradativas presentes en el mismo.

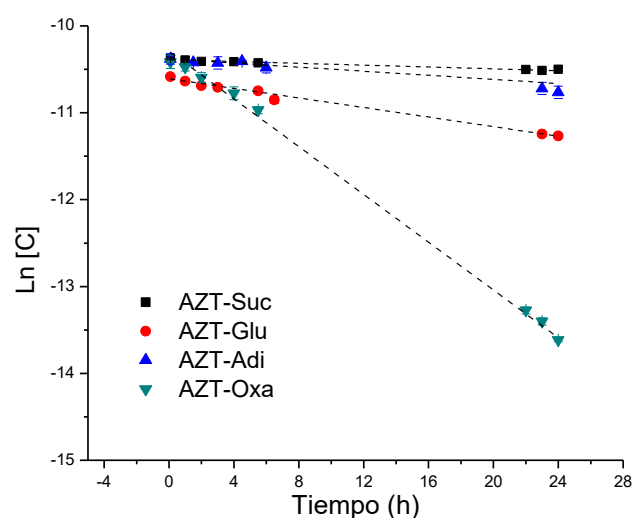


Figura 2.15. Perfiles de Concentración en plasma humano vs tiempo a 37°C, para AZT-Suc, AZT-Glu, AZT-Adi y AZT-Oxa.

$$\text{Ln [AZT-Suc]} = -0,0049 (\pm 0,0003) \text{ Tiempo (h)} - 10,39 (\pm 0,01) \quad \text{Ec 2.7}$$

$$n = 8; r^2 = 0,974; ds = 0,01; F = 231,08$$

$$\text{Ln [AZT-Glu]} = -0,027 (\pm 0,001) \text{ Tiempo (h)} - 10,62 (\pm 0,01) \quad \text{Ec 2.8}$$

$$n = 6; r^2 = 0,989; ds = 0,03; F = 569,26$$

$$\text{Ln [AZT-Adi]} = -0,016 (\pm 0,001) \text{ Tiempo (h)} - 10,38 (\pm 0,01) \quad \text{Ec 2.9}$$

$$n = 7; r^2 = 0,982; ds = 0,02; F = 285,41$$

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

$$\text{Ln [AZT-Oxa]} = -0,135(\pm 0,009) \text{ Tiempo (h)} -10,31 (\pm 0,03) \quad \text{Ec 2.10}$$

$$n = 8; r^2 = 0,997; ds = 0,07; F = 3374,21$$

Tabla 2.5. Constantes de velocidad observadas (k_{obs}) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$), para AZT-Oxa, AZT-Suc, AZT-Glu y AZT-Adi en plasma humano 37°C; 24 h.

<i>Derivado</i>	<i>Plasma humano</i>	
	$k_{obs} (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$
<i>AZT-Oxa</i>	0,135 ($\pm 0,009$)	5,1 ($\pm 0,5$)
<i>AZT-Suc</i>	0,005 ($\pm 0,001$) ^a	138,6 ($\pm 1,6$) ^a
<i>AZT-Glu</i>	0,027 ($\pm 0,001$) ^a	25,6 ($\pm 0,7$) ^a
<i>AZT-Adi</i>	0,016 ($\pm 0,002$) ^a	43,3 ($\pm 0,4$) ^a

^a Valores estimados. k_{obs} : constante de velocidad observada y $t_{1/2}$: tiempo de vida media

2.3.3.2 Unión a proteínas plasmáticas

Se realizaron los estudios de unión a proteínas plasmáticas totales de los profármacos **AZT-Suc**, **AZT-Glu**, **AZT-Adi** y **AZT-Oxa**, en los cuales se observó que **1-3** presentan una mayor afinidad por las proteínas transportadoras que el fármaco original. En cambio, **AZT-Oxa** presentó una menor afinidad al compararlo con AZT. Los resultados correspondientes se presentan en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6. Porcentaje de unión de AZT, AZT-Oxa, AZT-Suc, AZT-Glu y AZT-Adi por las proteínas totales (PP) y con la presencia de ácido salicílico (PP + SAL).

<i>Derivado</i>	<i>PP (%)</i>	<i>PP + SAL (%)</i>
<i>AZT</i>	13,1($\pm 1,3$)	2,5 ($\pm 1,8$)
<i>AZT-Oxa</i>	8,0($\pm 1,4$)	1,3($\pm 1,1$)
<i>AZT-Suc</i>	33,2 ($\pm 1,8$)	8,1($\pm 2,6$)
<i>AZT-Glu</i>	26,8($\pm 0,5$)	1,8($\pm 1,3$)
<i>AZT-Adi</i>	34,1($\pm 1,5$)	4,8($\pm 2,2$)

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

Para determinar si estos profármacos se unen a la ASH se realizaron ensayos de incubación, específicamente SAL como marcador por excelencia del sitio I ^{94,102} (SAL+PP, Tabla 2.6). En todos los casos se observó una disminución significativa en el porcentaje de unión de **AZT-Oxa**, **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi**. Este comportamiento, indica que los profármacos en estudio y AZT se unen a la ASH y lo hacen en el sitio I de la misma. Es de esperar que los derivados **1-3** al tener un grupo ionizable, requieran estabilizar la carga negativa presente en la molécula. Esta estabilización de la carga podría ser el motivo en las diferencias de afinidad entre los profármacos estudiados.

Con el fin de esclarecer a nivel molecular el modo de unión de **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi** al sitio I de la ASH, se utilizaron técnicas y metodologías computacionales. Estos estudios fueron realizados en colaboración con el *Dr. S Ribone*¹⁰³.

A partir de los resultados obtenidos, se observó que **1-3** se unen de manera homóloga al sitio I, interaccionando con los residuos Tyr150, Ser192, Lys195, Gln196, Lys199, Val241, Cys245, Arg257, Ser287, His288 y Ala291 (Figura 2.16. A-C). Dichos residuos forman parte de la subcavidad de unión para AZT, que es principalmente una región de carácter hidrofílico⁹² (Figura 2.16.E). Por otra parte, SAL también ocupa el sitio de unión I de la ASH, e interactúa con los residuos Leu219, Phe223, Leu238, Val241, Arg257, Leu260, Ile264, Ser287, Ile290 y Ala291 (Figura 2.16.D). En la Figura 2.16 se puede observar que **1-3** establecen interacciones electrostáticas fuertes con Arg257, y que a su vez mejoran su afinidad en comparación con AZT. Las interacciones electrostáticas con Arg257 resultan cruciales para la unión de los *AZT-Espaciador* a ASH, de igual modo que SAL. Además, **1** y **2** establecen interacciones con His288, lo cual no se observa para SAL. Los residuos Arg257 e His288, son los responsables de estabilizar la carga negativa presente en los *AZT-Espaciadores 1-3*.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

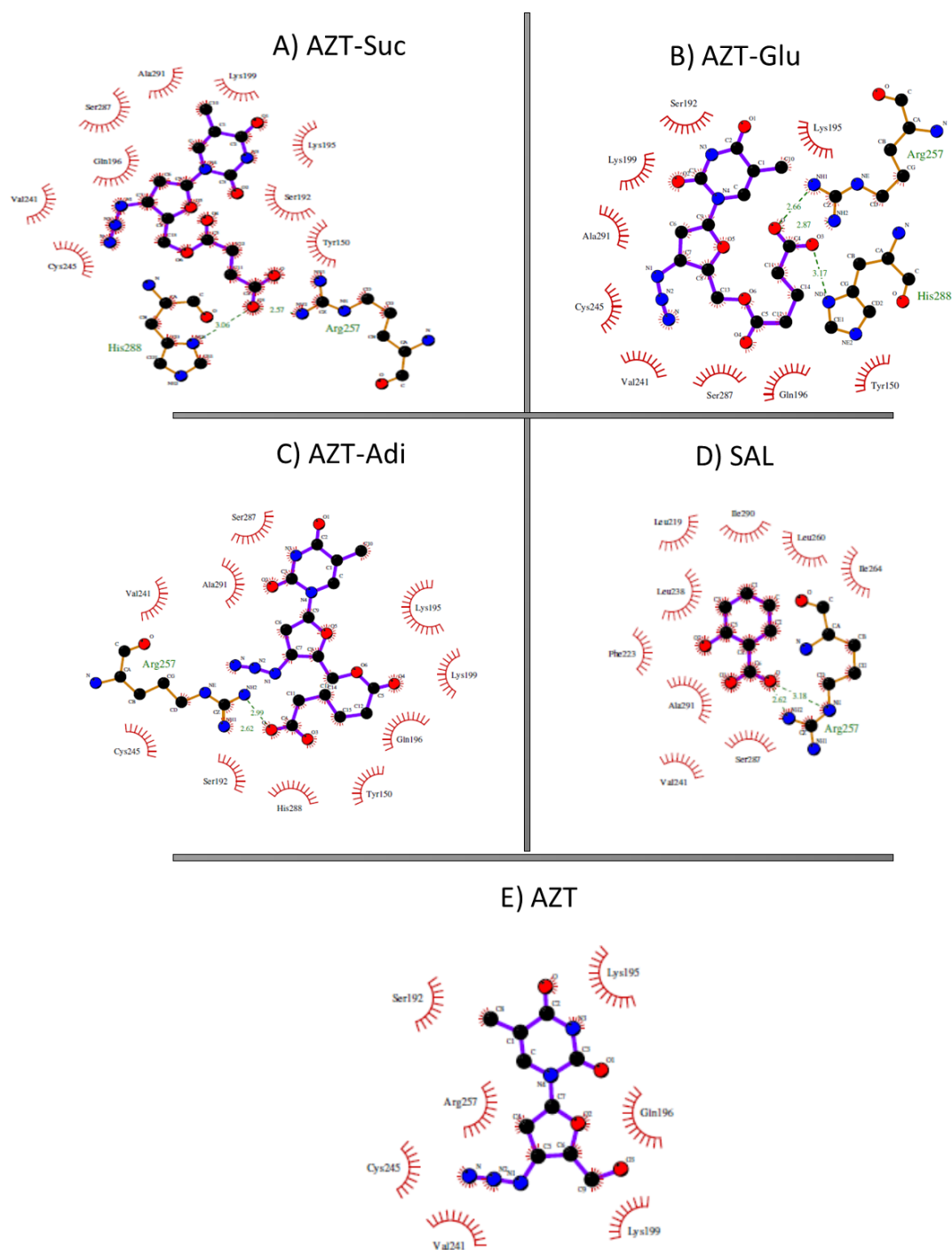


Figura 2.16. Patrón de interacciones de los compuestos (A) AZT-Suc, (B) AZT-Glu, (C) AZT-Adi, (D) SAL y (E) AZT, en el sitio I de unión de la ASH.

Los valores de ΔG_{sum} presentados en la Tabla 2.7 se correlacionan con las fracciones unidas determinadas experimentalmente en la Tabla 2.6, observándose la mayor energía de interacción para **1** (-20,75 kcal/mol) y **3** (-20,28 kcal/mol) en comparación con **2** (-18,10 kcal/mol).

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

Tabla 2.7. Análisis de descomposición energética (kcal/mol) por Molecular mechanics Generalized Born surface area (MMGBSA) AZT-Suc, AZT-Glu y AZT-Adi y SAL sobre el sitio I de unión de la ASH.

<i>Residuos</i>	<i>AZT</i>	<i>AZT-Suc</i>	<i>AZT-Glu</i>	<i>AZT-Adi</i>	<i>Residuos</i>	<i>SAL</i>
<i>Tyr150</i>	-1,35	-1,81	-1,10	-0,87	<i>Leu219</i>	-0,40
<i>Ser192</i>	-0,14	-0,22	-0,50	-0,65	<i>Phe223</i>	-0,21
<i>Lys195</i>	-1,17	-0,86	2,45	0,85	<i>Leu238</i>	-1,27
<i>Gln196</i>	0,51	-1,23	-1,04	-1,79	<i>Val241</i>	-1,07
<i>Lys199</i>	-0,13	-0,85	-0,60	-0,87	<i>Arg257</i>	-13,45
<i>Val241</i>	-0,50	-0,70	-0,69	-0,76	<i>Leu260</i>	-1,78
<i>Cys245</i>	-0,61	-0,07	-0,32	-0,51	<i>Ile264</i>	-0,22
<i>Arg257</i>	1,15	-8,62	-13,23	-14,04	<i>Ser287</i>	-2,18
<i>Ser287</i>	-0,14	-0,41	-0,51	-0,20	<i>Ile290</i>	-1,81
<i>His288</i>	-0,10	-5,33	-1,49	-0,20	<i>Ala291</i>	-1,76
<i>Ala291</i>	-0,24	-0,65	-1,16	-1,32		
ΔG_{sum}^a	-2,72	-20,75	-18,10	-20,28		-24,15

^a Suma total de las energías de interacción.

Es de importancia resaltar que en ensayos previos para el derivado **AZT-Oxa**, se observó que dicho derivado no puede estabilizar la carga negativa con la Arg257 debido a que presenta una repulsión electrostática con un ácido graso que estabiliza la carga negativa en dicho residuo, compitiendo así por el mismo sitio de interacción²⁷. Dicho fenómeno explica la observación experimental de que **AZT-Oxa** presente menor afinidad por ASH ($8,0 \pm 1,4$ %) que el propio AZT, y los AZT-Espaciadores **1-3**, los cuales si pueden estabilizar la carga negativa.

2.3.4 Conclusiones parciales

Mediante el desarrollo de los estudios de estabilidad plasmática y de unión a proteínas totales de los AZT-Espaciador, se pudo determinar que **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi**, presentan un perfil de estabilidad plasmática mejorado con respecto a **AZT-Oxa**, con valores de $t_{1/2}$ que posibilitarían mayor tiempo de permanencia del fármaco en el organismo.

En cuanto a los estudios de unión a proteínas plasmáticas totales, los derivados **1-3** presentan una mayor fracción de fármaco unido, comparado con **AZT** y **AZT-Oxa**, por lo que la

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

elongación de la cadena favorece la unión a la proteína transportadora. Además, estos nuevos derivados, son desplazados por la presencia de SAL, lo cual indica que se unen al sitio I de la ASH. Estos resultados fueron consistentes con obtenidos mediante técnicas computacionales de unión a ASH, en las cuales se observó que **1-3** presentan un patrón de interacción en el sitio I de la ASH similar a SAL, y que el aumento en el porcentaje de unión está relacionado directamente con la posibilidad de estabilizar la carga negativa por interacción con el residuo Arg257.

2.3.5 Materiales y métodos

2.3.5.1 Soluciones de trabajo y soluciones buffer

Se prepararon soluciones madres de cada uno de los compuestos (**AZT-Oxa**, **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi**), de 10 mg/mL y 1 mg/mL en DMSO. A partir de estas últimas, se hicieron soluciones de **AZT-Suc** y **AZT-Glu** en ACN de concentración 0,15 mg/mL, para ser empleadas como estándar interno (EI), de acuerdo al compuesto a cuantificar por HPLC-UV. El plasma humano fue generosamente donado por el *Instituto de Hematología, Hemoterapia y Banco de Sangre, de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina* y almacenado a -80 °C. Para su utilización fue descongelado en baño de agua fría y luego filtrado por gravedad sobre lana de vidrio para eliminar las posibles proteínas desnaturalizadas e impurezas producidas durante los procedimientos de almacenamiento y descongelación. Previo a los ensayos, se determinó la concentración de proteínas totales y de ASH utilizando el *kit* comercial Proti 2, Weiner lab[®], Boston, MA. El rango de concentración de proteínas totales para todas las muestras utilizadas fue de 55 -58 g/L y para la ASH de 36-41g/L. Estos valores fueron determinados durante el desarrollo de los procedimientos y verificados en todos los lotes de plasma humano empleados. Se utilizó SAL como marcador del sitio de unión I de la ASH, para lo cual se preparó una solución en DMSO de concentración de 1 mg/mL.

2.3.5.2 Estabilidad en plasma humano

La estabilidad plasmática se evaluó incubando soluciones de concentración $5,5 \times 10^{-4}$ M del compuesto en estudio en 2 mL de plasma humano, termostatzada a 37 °C durante 24 h en un baño de agua con agitación continua. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y luego se cuantificó por HPLC-UV. Los ensayos se realizaron por triplicado.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

2.3.5.3 Unión a proteínas plasmáticas

La unión a proteínas plasmáticas se evaluó utilizando la técnica de ultrafiltración para separar el fármaco libre del unido a proteínas. A partir de las soluciones madres de cada uno de los derivados (1 mg/mL), se prepararon soluciones *stock* en *buffer* fosfato (0,1 M) *pH* 7,4 para obtener una concentración de trabajo de 0,01 mg/mL. De esta última solución, se tomaron 600 μ L y se adicionó 600 μ L de plasma (solución de trabajo) o 600 μ L de *buffer* fosfato (0,1 M) *pH* 7,4 para referencia (muestra 100 %). Las soluciones resultantes se incubaron a 37°C durante 10 min en un baño termostatzado con agitación. Luego se tomó 1 mL de cada muestra y se lo colocó en el dispositivo de ultrafiltración (Centrifree®UF, Millipore) equipado con una membrana Ultracel YM-T (*cut-off* 30000 Da) y se lo sometió a centrifugación a 2000 RPM por 5 min.

Para el desarrollo de esta técnica, se estudiaron diversos factores que pueden afectar el resultado tales como: la adsorción de los derivados sobre la membrana de filtración, el tiempo y la velocidad de centrifugación y la densidad de la muestra a utilizar. El tiempo y la velocidad de centrifugación son dos factores relevantes para no provocar un desplazamiento del equilibrio de unión fármaco-proteína, al intentar separar la fracción libre de fármaco de la fracción unida a las mismas. Las condiciones experimentales finales involucraron una relación (1:1), plasma humano : *buffer* fosfato (0,1 M) *pH* 7,4, centrifugado a 2000 rpm por 5 min, obteniéndose así 200 μ L del ultrafiltrado para su posterior cuantificación por HPLC, sin provocar un desplazamiento del equilibrio de unión.

Las fracciones unidas (*fu*) para cada derivado se calculan como porcentaje, utilizando la Ec. 2.11

$$fu = 100 - ((A_M / A_{100\%}) * 100) \quad \text{Ec 2.11}$$

en donde, A_M corresponde al área de la muestra, $A_{100\%}$ al área muestra 100% y *fu* a la fracción unida.

Los ensayos de unión a proteínas se realizaron por duplicado para cada uno de los compuestos. Cada ensayo consta de 1 muestra de 100% y 3 muestras de unión a PP, preparadas a partir de la misma solución *stock* del derivado y tratadas en forma paralela. De todos los ensayos se calcula el promedio ($n = 6$) de los resultados con su correspondiente desviación estándar. Para determinar el sitio de unión de los derivados a la ASH, se utilizó como marcador al SAL, el cual se conoce que se une al sitio I de la ASH con una elevada afinidad⁵⁶.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-*Espaciador*

2.3.5.4 Estudios computacionales de unión a ASH

Para analizar el modo de unión de los profármacos de AZT a la ASH se realizaron estudios computacionales en colaboración con el *Dr. Sergio R. Ribone*, investigador de UNITEFA-CONICET, en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas, de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

Para determinar el modo de unión de todos los compuestos estudiados en el sitio I, se sometieron a un protocolo de *docking molecular* utilizando la estructura cristalográfica de ASH complejada con AZT y ácido mirístico (Myr) como proteína blanco (código PDB: 3B9L)⁹². El ácido salicílico (SAL) fue sometido al mismo protocolo de *docking molecular*, pero utilizando el complejo cristalográfico de ASH y Myr conteniendo SAL (código PDB: 2I30)¹⁰⁴.

Los procedimientos de *docking molecular* se realizaron utilizando software desarrollado por OpenEye Scientific Software¹⁰⁵. Para la realización de los estudios se empleó una estrategia de *docking* rígido exhaustivo, el cual se ejecutó a partir de dos etapas secuenciales: 1) una etapa de generación de librerías de conformeros de los ligandos, que se realizó usando una barrera energética de 10 kcal/mol y utilizando el software OMEGA2.4.3¹⁰⁶ y 2) los ensayos de *docking* se realizaron utilizando el método rígido y exhaustivo implementado por el software FRED¹⁰⁷. En este caso, se utilizó la función de puntuación *ChemGauss3* para evaluar y clasificar las posiciones de *docking*. Para conocer los potenciales modos de unión de los profármacos a la ASH, se seleccionaron las posiciones de *docking* de menor energía.

El cálculo de la energía de interacción se realizó utilizando la técnica *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann surface area (MM-PBSA)*¹⁰⁸, implementada en Amber17¹⁰⁹. Para parametrizar a la ASH y a los ligandos, se utilizaron los campos de fuerza *ff14SB* y *GAFF*¹¹⁰, respectivamente. La energía de unión se calculó tomando en cuenta las energías de solvatación de las moléculas interactuantes, además de las energías de mecánica molecular (MM). La contribución de las energías de solvatación polar se calculó mediante el modelo de solvente implícito generalizado de Born (GB), mientras que la contribución no polar de la energía de solvatación dependió del área superficial accesible al solvente (SASA)¹¹¹. Las interacciones intermoleculares se identificaron y representaron usando software VMD v.1.9.3. y LigPlot + v.1.4.5^{112,113}. Se seleccionaron aquellos residuos que presentan una mayor interacción al realizar la descomposición energética. La suma de las energías de interacción con los residuos correspondientes, se correlacionó posteriormente con los resultados experimentales de unión a proteínas totales.

2.4 Estudios de permeabilidad intestinal

2.4.1 Introducción

La biodisponibilidad es la cantidad de fármaco administrado por vía oral que llega a la circulación sistémica después de ser absorbido desde la forma farmacéutica. La optimización de esta propiedad es uno de los objetivos más importantes para la industria farmacéutica, durante la fase de desarrollo de nuevos fármacos¹¹⁴.

La cantidad de fármaco biodisponible depende de numerosos factores, entre los cuales se encuentran las propiedades fisicoquímicas de la molécula (peso molecular, pKa, lipofilicidad), su solubilidad, su estabilidad, el pH gastrointestinal, el vaciamiento gástrico, el tránsito intestinal y su vía de absorción, entre otros. Posterior a su absorción, el fármaco debe pasar hígado, donde será susceptible de sufrir lo que se conoce como “*metabolismo de primer paso hepático*”, fenómeno por el cual numerosos fármacos presentan una baja biodisponibilidad¹¹⁵.

Para optimizar la biodisponibilidad de un fármaco, se requiere el conocimiento de los procesos fisiológicos y moleculares relacionados con su absorción, como así también de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas. De esta manera, es fundamental conocer la absorción intestinal del fármaco durante las etapas tempranas de su desarrollo. Para lograrlo, es necesario contar con modelos experimentales adecuados, los cuales deben ofrecer información cuantitativa sobre los mecanismos de absorción.

La absorción intestinal de un fármaco desde el lumen intestinal hacia la circulación sistémica, puede llevarse a cabo mediante cinco tipos principales de mecanismos, los cuales se describen brevemente a continuación (Figura 2.17)¹¹⁶.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

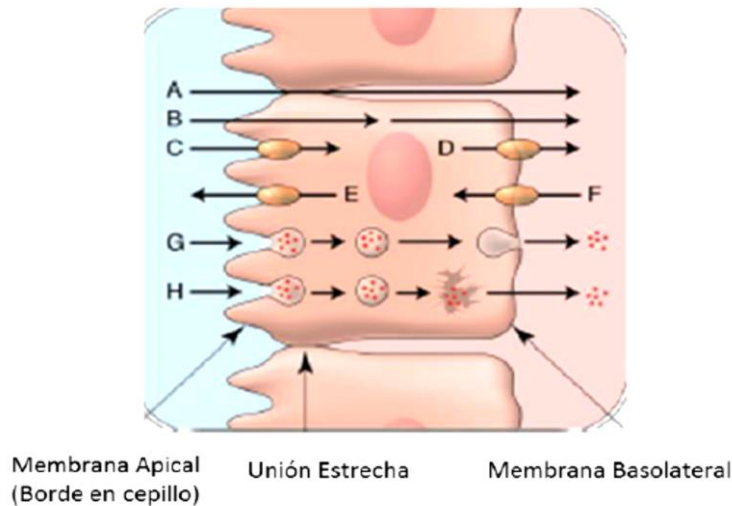


Figura 2.17. Procesos mediante los cuales un fármaco puede atravesar el tejido intestinal para lograr su absorción. A: Pasaje paracelular; B: Difusión pasiva; C-F: Transporte facilitado; G: Transcitosis; H: Endocitosis.

A) Pasaje paracelular: En este caso, el fármaco puede atravesar el tejido intestinal utilizando los poros intercelulares. Transcurre sin gasto energético y es impulsado por el gradiente de concentración. Este mecanismo tiene lugar fundamentalmente en la absorción de moléculas de bajo peso molecular y baja lipofiliidad, como por ejemplo las que se encuentran ionizadas al pH del lumen intestinal (Figura 2.17; A).

B) Difusión pasiva: Es la vía más utilizada por las moléculas lipofílicas de bajo peso molecular. Este mecanismo sigue la ley de Fick, por la cual, la cantidad de fármaco absorbido es proporcional al gradiente de concentración y al área de contacto (Figura 2.17; B).

C-F) Transporte facilitado: Este mecanismo involucra la interacción específica entre la molécula y un transportador, constituyendo un mecanismo que es saturable. Incluye dos tipos de transportes: activo y pasivo. En el primer caso, los fármacos atraviesan el epitelio intestinal mediante un gasto energético y pueden actuar contra un gradiente de concentración del sustrato. En el transporte pasivo, es necesario también un transportador de membrana, aunque opera sin gasto energético y es impulsado por la concentración del sustrato o por la presencia de un cotransportador (Figura 2.17; C-F).

G) Transcitosis: Se puede definir como un determinado conjunto de fenómenos, que permiten que la sustancia pueda atravesar el citoplasma celular, desde un extremo al otro de la célula. Este es un doble proceso, en el que es necesario la acción tanto de la endocitosis como de la exocitosis. Es propio de las células endoteliales (Figura 2.17; G).

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

H) Endocitosis: Este es un proceso observable en la mayoría de las células de mamíferos para la absorción de macromoléculas. Se requiere gasto metabólico y la realizan algunos tipos de células especializadas, por ejemplo, las células del sistema retículo-endotelial. Es generalmente un mecanismo de absorción lenta que resulta de la fusión de vesículas endocíticas con los lisosomas que contienen altos niveles de actividad enzimática. La endocitosis puede involucrar también algunos receptores específicos (Figura 2.17; H).

El enterocito (célula intestinal especializada) presenta diferentes características en su cara basal y apical, tanto en la estructura como en la función, por lo cual se las denomina “células polarizadas” (Figura 2.18). La superficie apical orientada hacia el lumen intestinal se especializa en la absorción de sustratos, en cambio, la cara basal media el transporte de nutrientes desde el interior del enterocito hacia los fluidos circundantes que conducen al torrente sanguíneo¹¹⁷. En ambos lados del enterocito se expresan proteínas que intervienen en los procesos de transporte mencionados, tal como se muestra en la Figura 2.18.

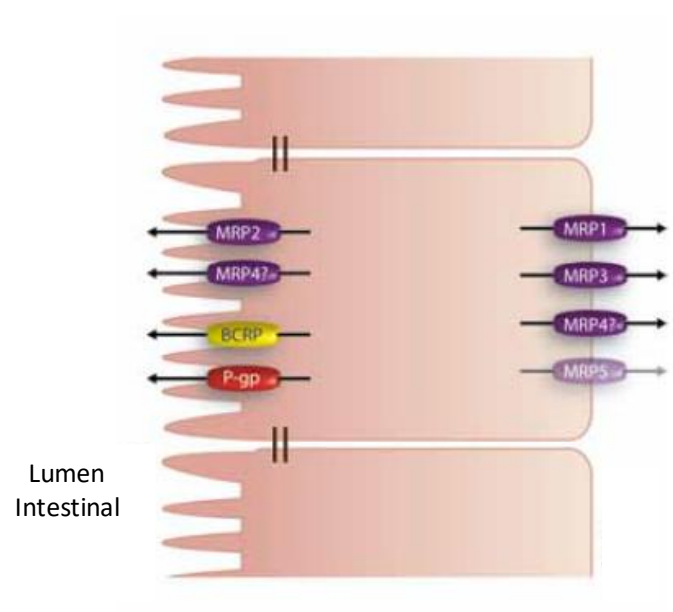


Figura 2.18. Distribución de proteínas de eflujo en el enterocito.

La superficie apical de los enterocitos, presenta numerosas proyecciones en forma de dedos (100 nm de diámetro) llamadas “microvellosidades”, las cuales aumentan significativamente el área expuesta de la superficie apical, mejorando así la capacidad de absorción del tejido intestinal^{117,118}. Sobre las microvellosidades, se encuentra el glicocalix, una red compuesta de glicoproteínas integrales de membrana, glucolípidos y enzimas que catalizan las etapas finales en la digestión de carbohidratos y proteínas. La acción de estas enzimas

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

produce monosacáridos y aminoácidos, que se transportan a través del epitelio intestinal y finalmente al torrente sanguíneo¹¹⁷.

Las células epiteliales, contienen un conjunto de proteínas conocidas como la familia ABC (*ATP-binding cassette*, por sus siglas en inglés), las cuales forman parte del proceso de transporte facilitado con gasto de energía^{119,120}. Dependiendo de su función y ubicación, pueden aumentar o disminuir la permeabilidad de un fármaco (Figura 2.18).

Las principales proteínas de esta familia son la glicoproteína P (P-gp) y la proteína asociada a la resistencia múltiple de fármacos tipo 1 (MRP-1, por sus siglas en inglés). Ambas están presentes en diversos tejidos del organismo, y son capaces de transportar sustratos con estructuras muy diversas, exhibiendo la función de mediar el eflujo de sustancias desde el interior celular, muchas de ellas tóxicas, y por lo tanto cumplen un rol fisiológico de protección para la célula. En el intestino P-gp se encuentra en la membrana apical, y expulsa los xenobióticos desde el interior del enterocito hacia el lumen intestinal. En cambio, MRP-1 está presente en la cara basal, y promueve el flujo de sustratos hacia la circulación enterohepática. La expresión de los transportadores a lo largo del tracto gastrointestinal es variable. En particular, P-gp aumenta su expresión hacia los segmentos distales del intestino, mientras que MRP-1 presenta mayor abundancia en el segmento proximal y disminuye hacia los segmentos distales¹²¹.

Otro punto a tener en cuenta es la presencia de carboxilesterasas (CES) en la mucosa intestinal y en el interior del enterocito^{40,122}, ya que los profármacos pueden ser metabolizados durante el pasaje por el mismo. Este proceso también puede ser beneficioso si mejora algún aspecto en la absorción intestinal del fármaco original¹²². Las CES, desempeñan un papel fundamental en la hidrólisis de una variedad de fármacos y profármacos que presentan una función éster, amida o carbamato^{40,41}. Las CES son isoenzimas que se pueden clasificar en 5 subfamilias denominadas CESh1-CESh5 de acuerdo con la homología en su secuencia. La mayoría de las CES identificadas al momento pertenecen a las subfamilias CESh1 o CESh2. La primera hidroliza principalmente sustratos con un grupo alquilo más pequeño y un grupo acilo más grande, mientras que también se han reportado excepciones en donde su amplia cavidad catalítica también permite que se reconozcan ésteres de alcoholes más voluminosos. Por el contrario, la enzima CESh2 reconoce sustratos con grupos alquilo más grandes y grupos acilo más pequeños^{40,41}. En el intestino delgado solo se expresa CESh2¹²².

Particularmente, AZT presenta una biodisponibilidad oral relativamente baja ($65 \pm 15\%$), pero que está asociada a una alta variabilidad intra e inter-paciente¹²³. A su vez, se ha informado que AZT es sustrato de proteínas de eflujo presentes en diversos tejidos, tales como en el sistema nervioso central (SNC), en las células del sistema inmune y en el epitelio intestinal^{124,125}, estando

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

éste último directamente relacionado con sus problemas de biodisponibilidad oral. El eflujo que sufre AZT a nivel intestinal está mediado principalmente por la P-gp⁵⁸.

2.4.2 Objetivos

Dada la permeabilidad intestinal subóptima que presenta AZT, el objetivo de esta etapa es estudiar si los nuevos derivados *AZT-Espaciadores* (**AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi**) presentan propiedades de absorción optimizada respecto de AZT.

2.4.3 Diseño experimental

Teniendo en cuenta la gran variedad de fenómenos que tienen lugar durante el pasaje de un profármaco por la membrana intestinal, se seleccionó un modelo *ex vivo* que emplea segmentos intestinales completos aislados de rata¹²⁶, conocido por el nombre de *técnica del saco intestinal evertido de ratas*. Dicha técnica ha sido utilizada con anterioridad en el grupo de investigación donde se realizó el presente Trabajo de Tesis^{57,58,127}. Éste es un modelo conveniente, ya que se mantienen las características estructurales y funcionales del epitelio intestinal y no presenta la complejidad de realizar un estudio *in vivo*.

Esta técnica consiste en sumergir un segmento intestinal aislado en una solución conteniendo la sustancia a evaluar, posibilitando así la determinación de parámetros relacionados a la cinética de permeación a través del tejido, involucrando tanto a los transportadores de membrana como a los procesos de difusión pasiva. Otra característica de relevancia que presenta este diseño experimental, es que permite estudiar el metabolismo durante el pasaje a través del tejido intestinal, ya sea en el epitelio propiamente dicho o dentro de la célula, otorgando información de gran valor y utilidad¹²⁸⁻¹³⁰.

Para que el ensayo sea válido, se debe realizar bajo lo que se conoce como “condiciones de sumidero”, por lo cual se requiere una baja cantidad de compuesto para efectuar el estudio, lo cual es una ventaja ya que la síntesis y purificación de profármacos son habitualmente procesos laboriosos y de costos elevados. Así, el volumen de solución en la cual se disuelve el compuesto a ensayar es mayor que el de otras metodologías existentes, de manera que la solubilidad del compuesto a evaluar, usualmente no es un factor limitante en la ejecución del experimento. Ésto, junto con el pequeño volumen de la solución en la cual se colecta de muestra del ensayo de permeación, facilita notablemente el análisis cuantitativo, por lo cual no se requieren límites de cuantificación extremadamente bajos. Asimismo, es necesario una minuciosa manipulación del

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

tejido durante el armado del dispositivo, a fin de no dañar la integridad del segmento intestinal empleado, siendo ésto una de las mayores dificultades.

Para evertir el segmento intestinal, se coloca una varilla de vidrio en un extremo del tejido aislado para facilitar el proceso de eversión, de manera tal que la mucosa intestinal responsable de la absorción quede expuesta hacia el exterior; mientras que la capa serosal se expone hacia la cara interna del segmento.

En la Figura 2.19 se muestra un esquema del dispositivo de trabajo utilizado en los estudios de permeabilidad. En el interior del tejido se coloca una cánula que permite la introducción del medio fresco (*solución serosal*) y la toma de muestras desde el interior del segmento. Posteriormente, el tejido se incubaba en la solución que contiene la sustancia en estudio (*solución mucosal*), la cual difunde hacia el interior del segmento intestinal, desde donde se recolectan las muestras por medio de la cánula y se la prepara para su posterior cuantificación.

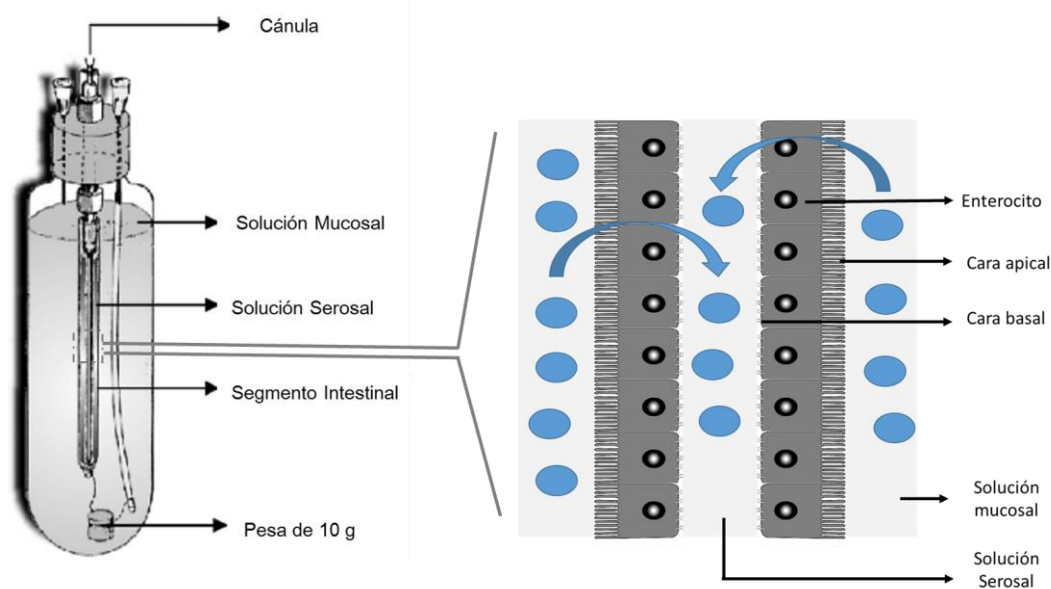


Figura 2.19 Esquema del dispositivo utilizado para el ensayo de permeación intestinal empleando el modelo del saco intestinal evertido.

De acuerdo al diseño experimental, los dispositivos se incuban a 37 °C y se extraen muestras de la solución serosal a distintos tiempos, cuantificándose el analito proveniente de la solución mucosal por difusión a través del segmento intestinal. A partir de los datos obtenidos, se grafica la cantidad de analito acumulado en la solución serosal en función del tiempo. Mediante un análisis de regresión lineal simple, se obtiene una recta cuya pendiente corresponde al flujo de permeación (F , $\mu\text{g}/\text{min}$), el cual es una medida directa de la cantidad de fármaco que atraviesa el

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

tejido intestinal por unidad de tiempo. A partir del valor de F , es posible calcular el coeficiente de permeabilidad intestinal aparente (P_{app} , cm/min) según las ecuaciones 2.12 y 2.13.

$$P_{app} = \frac{F}{Sup_{exp} \times C_i} \quad (\text{Ec. 2.12})$$

$$Sup_{exp} = 2\pi r h \quad (\text{Ec. 2.13})$$

en donde, Sup_{exp} es la superficie del segmento intestinal expuesto a la solución mucosal, C_i es la concentración inicial del fármaco en la solución mucosal, r es el radio promedio del segmento intestinal (0,4 cm) y h es el largo del segmento intestinal disponible para la permeación (10 cm). El P_{app} representa una medida directa del grado de permeabilidad del fármaco y refleja su velocidad de transporte a través del tejido intestinal^{58,127,131-133}.

El P_{app} depende tanto de F como de la Sup_{exp} para la absorción, por lo tanto, para obtener resultados comparables es indispensable emplear segmentos intestinales de igual tamaño ($r = 0,4$ cm y $h = 10$ cm) originando así, una $Sup_{exp} = 25,13$ cm² (Ec. 2.13), que se mantiene constante para todas las experiencias.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, haciendo un uso racional de los animales de experimentación, los cuáles a su vez son manipulados siguiendo las normas de buenas prácticas de uso de animales de laboratorio¹³⁴⁻¹³⁶. Cabe destacar, que los procedimientos utilizados fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC. (Res. N° 138/07), quienes regulan el uso de animales en protocolos experimentales. Los valores se informan como la media de las determinaciones con su correspondiente desviación estándar. La comparación entre los valores de P_{app} calculados, se realizó mediante un análisis de ANOVA de una vía, mientras que, al comparar más de un grupo de resultados, fue necesario la aplicación del test t de Student. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

2.4.4 Resultados y discusiones

2.4.4.1 Viabilidad del tejido intestinal y estabilidad química en TC199 para 1- 3

Para evaluar la integridad del tejido intestinal durante los estudios de permeabilidad realizados, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad. Éstos, consistieron en medir la capacidad que tienen los segmentos intestinales para concentrar activamente glucosa desde la solución

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

mucosal hacia la solución serosal¹³⁷. Para ello, se cuantificó la cantidad de glucosa presente en la solución serosal, siguiendo el procedimiento detallado en la sección de materiales y métodos.

Los resultados demostraron que los segmentos intestinales utilizados (yeyuno proximal) durante los ensayos de permeabilidad fueron capaces de concentrar glucosa en la solución serosal durante los 60 min que duró el estudio, indicando que el tejido se mantuvo viable y conserva su integridad (Figura 2.20).

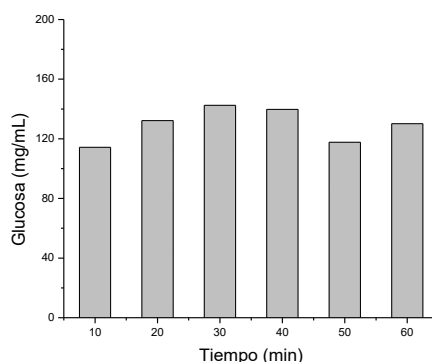


Figura 2.20 Viabilidad del tejido intestinal, Glucosa mg/mL vs tiempo (min).

Previo a los estudios de permeación intestinal, fue necesario determinar la estabilidad química de **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi**, aplicando la misma metodología desarrollada para los estudios de permeabilidad, pero sin la presencia del segmento intestinal. Finalmente, se cuantificaron las muestras observando en todos los casos que los profármacos **1-3** son estables en las condiciones experimentales por el tiempo que duró el ensayo (1 h).

2.4.4.2 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT

Los ensayos de permeabilidad de AZT se realizaron utilizando dos concentraciones diferentes de fármaco $0,50$ y $1,00 \times 10^{-3}$ M. Se evaluaron en yeyuno proximal, debido a que según reportes previos, en este segmento AZT presenta una permeabilidad mediada por mecanismos de transporte saturable y sufre fenómenos de eflujo¹³⁸.

Se observó que la cantidad de moles de AZT que atraviesan el tejido intestinal aumenta hasta los 30 min de iniciado el ensayo (Figura 2.21.A), y luego se mantuvo esencialmente constante durante todo el experimento. Esto concuerda con el equilibrio de difusión entre la concentración de fármaco y el tejido intestinal necesarios para alcanzar un estado estacionario en el proceso de permeación. La Figura 2.21.B, muestra los μg acumulados de AZT en la solución serosal en función del tiempo, como resultado de la permeación a través del segmento intestinal.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

En la Figura 2.21 se presentan los datos obtenidos para dos concentraciones evaluadas de AZT ($0,5$ y $1,0 \times 10^{-3}$ M), para cada una se realizó el ensayo por triplicado y luego se promedian los valores de F y del P_{app} .

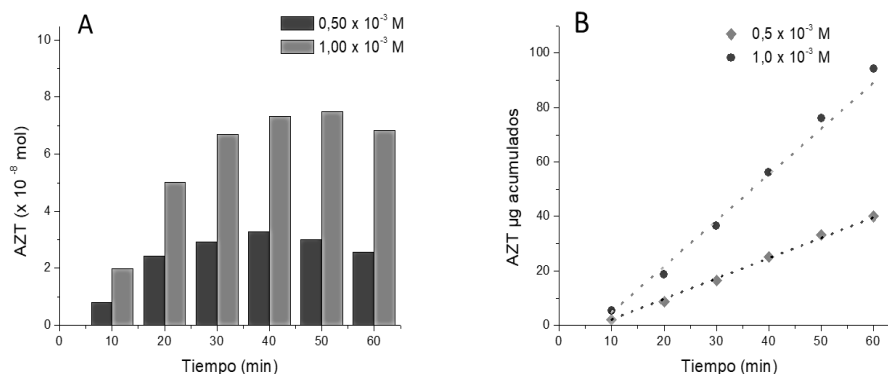


Figura 2.21. Ensayos de permeabilidad intestinal de AZT concentración $0,5$ y $1,0 \times 10^{-3}$ M. A) Moles permeados en función del tiempo. B) μg acumulados de AZT en función del tiempo.

$$\begin{aligned} \mu\text{g acum AZT} (0,5 \times 10^{-3} \text{ M}) &= 0,78 (\pm 0,02) \text{ tiempo (min)} - 6,24 (\pm 0,64) && \text{Ec. 2.14} \\ n &= 6; r^2 = 0,992; ds = 0,08; F = 641,66 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \mu\text{g acum AZT} (1,0 \times 10^{-3} \text{ M}) &= 1,82 (\pm 0,05) \text{ tiempo (min)} - 15,71 (\pm 2,10) && \text{Ec. 2.15} \\ n &= 6; r^2 = 0,996; ds = 0,21; F = 1176,94 \end{aligned}$$

De las pendientes de las rectas se obtuvieron las Ecs 2.14 y 2.15, se determinaron los valores de F en cada condición, obteniéndose un valor promedio de $0,9 (\pm 0,1)$ y $1,8 (\pm 0,2)$ $\mu\text{g}/\text{min}$, para una solución mucosal de AZT de $0,5$ y $1,0 \times 10^{-3}$ M, respectivamente. A partir de los valores de F y utilizando las Ecs 2.12 y 2.13, se determinó el valor del P_{app} , siendo $2,9 (\pm 0,3)$ y $2,7 (\pm 0,3) \times 10^{-4}$ cm/min para una concentración de AZT de $0,5$ y $1,0 \times 10^{-3}$ M, respectivamente. En la Tabla 2.8 se resumen los valores de F y P_{app} obtenidos en los ensayos para AZT, en la cual se observa que al aumentar la concentración de AZT en la solución los valores de P_{app} son estadísticamente similares, consistente con la intervención de mecanismos de difusión pasiva a través del segmento intestinal. Esta conclusión concuerda con los resultados reportados previamente en nuestro grupo de investigación¹³⁸.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

Tabla 2.8. Valores de F y P_{app} para las diferentes concentraciones de AZT

	Concentración (M)	F ($\mu\text{g}/\text{min}$)	P_{app} ($\times 10^{-4} \text{ cm}/\text{min}$)
AZT	$0,5 \times 10^{-3} \text{ M}$	$0,9 (\pm 0,1)$	$2,9 (\pm 0,3)$
	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,8 (\pm 0,2)$	$2,7 (\pm 0,3)$

Debido a que AZT es sustrato de proteínas de eflujo a nivel intestinal^{57,58}, se realizaron ensayos de permeación en presencia de verapamilo (VER), el cual es un inhibidor de las proteínas de eflujo tales como P-gp y MRP-1. Para realizar estos estudios se empleó una concentración de AZT de $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$, añadiendo VER a la solución mucosal ($1,0 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$). La concentración de VER empleada fue de $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$, la cual se seleccionó de acuerdo a los reportes bibliográficos que demuestran que dicha concentración es capaz de inhibir a la P-gp y a su vez no resulta citotóxica para el enterocito^{58,124,139,140}. De esta manera, se analizó la influencia de las proteínas de eflujo, observando los moles permeados y los μg acumulados de AZT en función del tiempo, en presencia de VER (Figura 2.22).

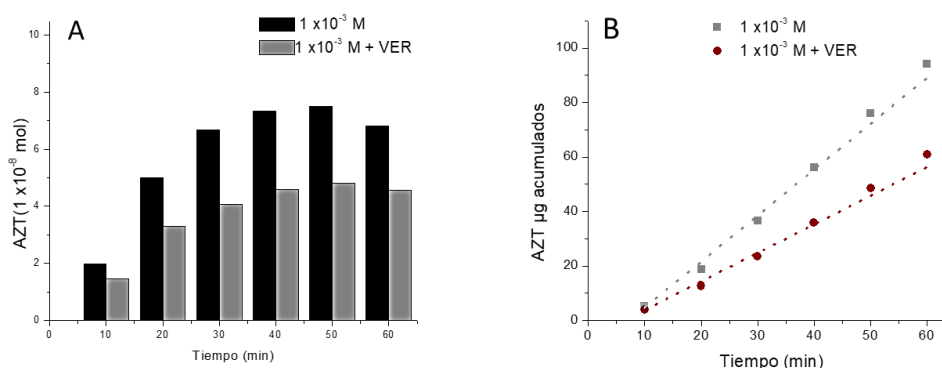


Figura 2.22. Ensayos de permeabilidad intestinal de AZT concentración $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $1,0 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$. A) Moles permeados de AZT en función del tiempo. B) μg acumulados de AZT en función del tiempo.

$$\mu\text{g acum AZT } (1,0 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}) = 1,16 (\pm 0,04) \text{ tiempo (min)} - 9,61 (\pm 0,37) \quad \text{Ec. 2.15}$$

$$n = 6; r^2 = 0,995; ds = 0,47; F = 1074,09$$

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

Como se puede apreciar en la Figura 2.22.A, la cantidad de moles permeados de AZT en presencia de VER ($1,0 \times 10^{-3}M + VER$), es inferior en todos los tiempos comparado con los moles permeados en el ensayo sin la presencia del inhibidor ($1,0 \times 10^{-3}M$). Esto se traduce en un menor flujo de AZT en los ensayos con VER (Figura 2.22.B). Luego del correspondiente análisis de regresión lineal (Ec. 2.15), se calcularon los valores de F y de P_{app} (Tabla 2.9), para AZT en presencia de VER.

Tabla 2.9. Valores de F y P_{app} para AZT en presencia de Verapamilo ($1,0 \times 10^{-3}M + VER$)

<i>Derivado</i>	<i>Concentración (M)</i>	<i>F ($\mu g/min$)</i>	<i>P_{app} ($\times 10^{-4} cm/min$)</i>
AZT	$1,0 \times 10^{-3}M + VER$	1,2 ($\pm 0,1$)	1,7 ($\pm 0,2$)
	$1,0 \times 10^{-3}M$	1,8 ($\pm 0,2$)	2,7 ($\pm 0,3$)

En yeyuno proximal, la expresión de MRP-1 es mayoritaria con respecto a P-gp, y se encuentra a nivel basal, promoviendo el paso de las sustancias a circulación enterohepática¹²¹. Si un compuesto es sustrato de MRP-1, se espera observar una disminución en el valor de P_{app} al realizar el ensayo de permeabilidad en presencia de VER evidenciando un fenómeno de influjo a nivel intestinal. A partir de los resultados detallados en la Tabla 2.9, se puede afirmar que se determinó un P_{app} inferior para AZT en presencia de VER, lo que demuestra que el principio activo sufre influjo mediado por MRP-1 en yeyuno proximal. Dicho fenómeno es consistente con lo descrito en diversos trabajos científicos^{124,141,142}.

2.4.4.3 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Suc (I)

Los estudios de permeabilidad intestinal para **AZT-Suc** se realizaron evaluando una concentración de $1,0 \times 10^{-3} M$ en la solución mucosal. Durante los ensayos se monitoreó en la solución serosal la presencia de **AZT-Suc**, como así también la aparición del AZT regenerado (**AZTreg**) como producto de degradación (Figura 2.23.A).

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

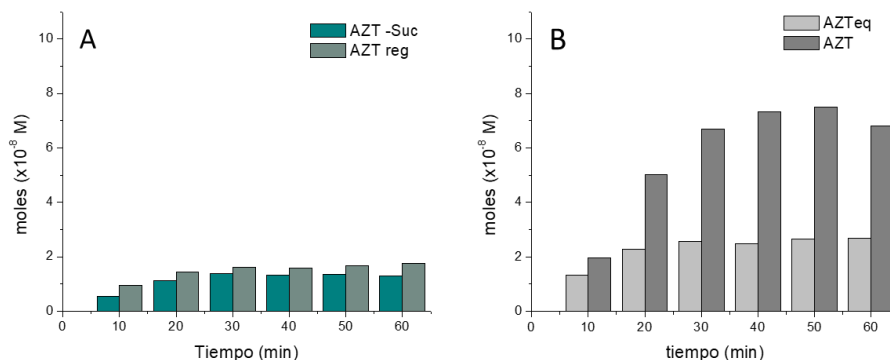
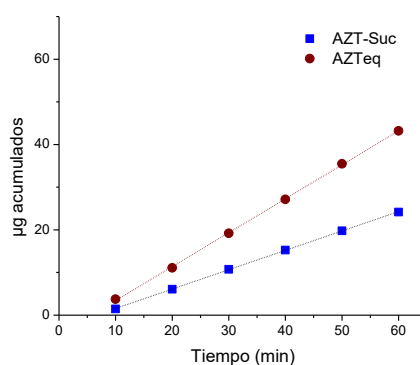


Figura 2.23. Ensayo de permeabilidad intestinal de AZT-Suc $1,0 \times 10^{-3}$ M. Moles permeados en función del tiempo para A) AZT-Suc y AZTreg y para B) AZTeq y AZT como tal en la solución mucosal.

Como se puede apreciar en la Figura 2.23.A, una fracción de **AZT-Suc** puede atravesar el epitelio intestinal sin ser metabolizado. Asimismo, se observa que, durante el pasaje del derivado a través del segmento intestinal, una fracción del mismo es metabolizado por las enzimas presentes en el tejido, regenerando el principio activo (**AZTreg**). A partir de los moles de **AZT-Suc** y **AZTreg** detectados en la solución serosal, se calcularon los moles equivalentes de AZT (**AZTeq**) y se observó que los mismos son inferiores en todos los tiempos, con respecto a los detectados en los estudios realizados para AZT en una concentración de 1×10^{-3} M (Figura 2.23.B).

A partir de los moles presentes en la solución serosal para **AZT-Suc** y **AZTeq**, se calcularon los μg acumulados en función del tiempo (Figura 2.24). A partir de ellos, se obtuvieron las ecuaciones de las rectas correspondientes (Ec. 2.16 y 2.17) y se determinaron los valores de F para **AZT-Suc** y **AZTeq**, de $0,48 (\pm 0,05)$ y $0,79 (\pm 0,06)$ $\mu\text{g}/\text{min}$, respectivamente (Tabla 2.10). De estos valores de F , se determinaron los valores de P_{app} de $0,52 (\pm 0,06)$ y $1,17 (\pm 0,02) \times 10^{-4}$ cm/min para **AZT-Suc** y **AZTeq**, respectivamente (Tabla 2.10).



2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

Figura 2.24. Ensayo de permeabilidad intestinal de AZT-Suc. μg acumulados de AZT-Suc y AZTeq en función del tiempo.

$$\mu\text{g acum AZT-Suc } (1,0 \times 10^{-3} \text{ M}). = 0,454 (\pm 0,02) \text{ tiempo (min)} - 2,99 (\pm 0,08) \quad \text{Ec. 2.16}$$

$$n = 6; r^2 = 0,999; ds = 0,07; F = 46745,7$$

$$\mu\text{g acum AZTeq } (1,0 \times 10^{-3} \text{ M}). = 0,795 (\pm 0,01) \text{ tiempo (min)} - 4,54 (\pm 0,26) \quad \text{Ec. 2.17}$$

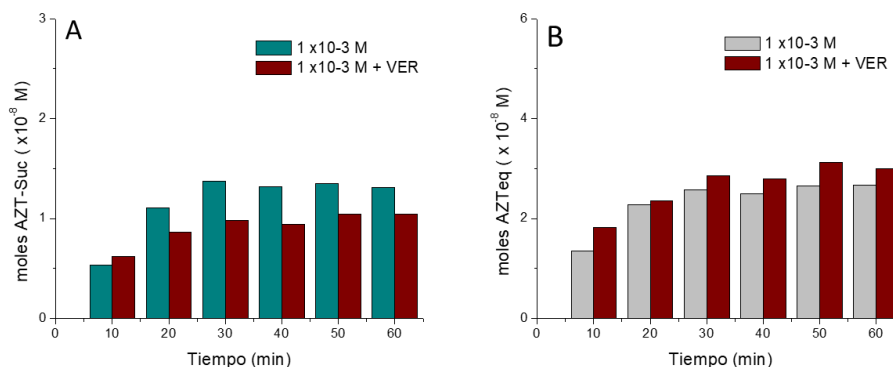
$$n = 6; r^2 = 0,999; ds = 0,07; F = 1470,15$$

Tabla 2.10. Valores de F y P_{app} para AZT-Suc y AZTeq ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$.)

Especie	F ($\mu\text{g}/\text{min}$)	P_{app} ($\times 10^{-4} \text{ cm}/\text{min}$)
AZT-Suc	$0,48 \pm 0,05$	$0,52 \pm 0,06$
AZTeq	$0,79 \pm 0,06$	$1,17 \pm 0,02$

En ambos casos, se observó que el P_{app} para **AZT-Suc** y **AZTeq** es inferior al obtenido para AZT en solución mucosal ($2,7 (\pm 0,3) \times 10^{-4} \text{ cm}/\text{min}$), indicando que el derivado **1** presenta una permeabilidad intrínseca inferior a la del principio activo. Ello podría estar asociado a sus propiedades fisicoquímicas, como por ejemplo su aumentada hidrofiliicidad, como así también a la acción de proteínas de eflujo.

Para determinar si **AZT-Suc** y el correspondiente **AZTreg** producido durante el proceso de permeación son sustratos de proteínas de eflujo, se evaluó la permeabilidad del derivado **1** utilizando una concentración de $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ en presencia de VER en la solución mucosal (Figura 2.25).



2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

Figura 2.25. Ensayo de permeabilidad intestinal de AZT-Suc $1,0 \times 10^{-3} M$ en ausencia y presencia de Verapamilo. Moles permeados para A) AZT-Suc y para B) AZTeq en función del tiempo.

Analizando los moles detectados en la solución serosal en presencia de VER en función del tiempo, se determinó que la cantidad de moles de **AZT-Suc** que atraviesan el epitelio intestinal en ambos ensayos aumenta en presencia del inhibidor (Figura 2.25.A), sugiriendo la intervención de un fenómeno de eflujo. Dicha diferencia no es tan significativa cuando se analiza el perfil de moles permeados para **AZTeq** (Figura 2.25.B). Para profundizar se calcularon los valores de F y P_{app} para **AZT-Suc** y **AZTeq** (Figura 2.26, Ecs 2.18 y 2.19 y Tabla 2.11).

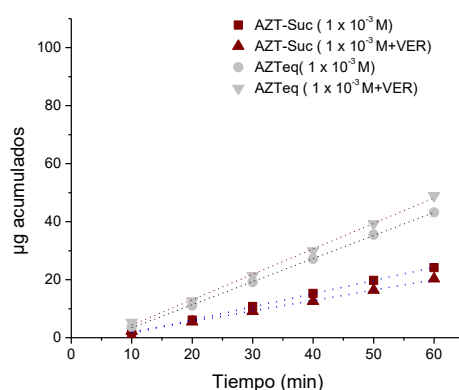


Figura 2.26. Ensayos de permeabilidad intestinal de AZT-Suc $1,0 \times 10^{-3} M$ en ausencia y presencia de Verapamilo. μg acumulados de AZT-Suc y AZTeq en función del tiempo.

$$\mu g \text{ acum AZT-Suc} = 0,36 (\pm 0,01) \text{ tiempo (min)} - 1,60 (\pm 0,02) \quad \text{Ec. 2.18}$$

$$n = 6; r^2 = 0,998; ds = 0,06; F = 3755,9$$

$$\mu g \text{ acum. AZTeq} = 0,88 (\pm 0,02) \text{ tiempo (min)} - 4,42 (\pm 0,03) \quad \text{Ec. 2.19}$$

$$n = 6; r^2 = 0,998; ds = 0,06; F = 2152,5$$

Tabla 2.11. Valores de F y P_{app} $1 \times 10^{-3} M$ y $1 \times 10^{-3} M + VER$, para **AZT-Suc** y **AZTeq**.

Derivado	Concentración	F	P_{app}
		($\mu g/min$)	(cm/min)
AZT-Suc	$1 \times 10^{-3} M$	$0,48 \pm 0,14$	$0,52 \pm 0,06$
	$1 \times 10^{-3} M + VER$	$0,36 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,02$
AZTeq	$1 \times 10^{-3} M$	$0,79 \pm 0,06$	$1,17 \pm 0,02$
	$1 \times 10^{-3} M + VER$	$0,75 \pm 0,05$	$1,12 \pm 0,03$

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

Al analizar los P_{app} en ambas condiciones para **AZT-Suc**, se confirmó que el coeficiente de permeabilidad es levemente inferior en el ensayo con el inhibidor, confirmando que este derivado es reconocido por proteínas de eflujo a nivel basal (Tabla 2.11). En contraparte, la permeabilidad global obtenida para **AZTeq** no presenta cambios significativos en el P_{app} al comparar los ensayos en presencia y ausencia del inhibidor, indicando que las proteínas de eflujo no modifican la permeabilidad global obtenida a partir de **AZT-Suc** (Tabla 2.11). Esto podría traducirse en una potencial optimización en la biodisponibilidad del fármaco a nivel intestinal.

A modo de evaluar si los cambios en la concentración de **AZT-Suc** en la solución mucosal afectan el valor de P_{app} , se trabajó con tres concentraciones más, 0,38; 0,50; 0,70 x 10⁻³ M. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 2.12 y Figura 2.27.

Tabla 2.12. Valores de F y P_{app} para las diferentes concentraciones de *AZT-Suc*.

<i>Derivado</i>	<i>Concentración</i> (x 10 ⁻³ M)	<i>F</i> ($\mu\text{g}/\text{min}$)	<i>P_{app}</i> (x 10 ⁻⁴ cm/min)
<i>AZT-Suc</i>	0,38	0,11 ± 0,04	0,29 ± 0,05
	0,50	0,17 ± 0,03	0,33 ± 0,01
	0,70	0,25 ± 0,02	0,37 ± 0,01
	1,00	0,45 ± 0,02	0,48 ± 0,02

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

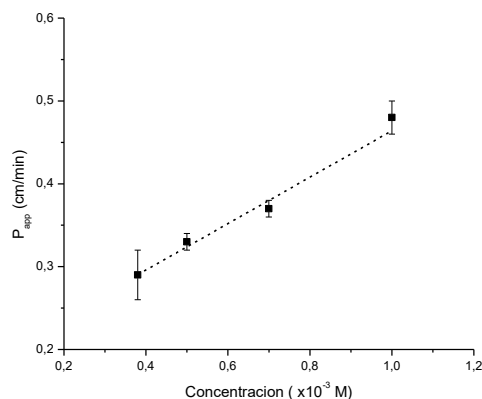


Figura 2.27. Representación del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) de AZT-Suc vs. concentración de la solución mucosal.

$$P_{app} \text{ AZT-Suc} = 0,28 (\pm 0,04) \times 10^{-3} M + 0,18 (\pm 0,03) \quad \text{Ec. 2.20}$$

$$n = 4; r^2 = 0,942; ds = 0,03; F = 49,419$$

Del análisis de los valores de P_{app} obtenidos con respecto a la variación de la concentración de **AZT-Suc** en la solución mucosal, se observa que éstos no son estadísticamente equivalentes, sino que el P_{app} aumenta de conforme aumenta la concentración del profármaco (Figura 2.27 y Ec. 2.20), evidenciando un pasaje intestinal mediado por transportadores, ya que se observa una mayor eficiencia de transporte conforme se aumenta la concentración del derivado en la solución mucosal. Es de destacar que en el rango de concentraciones evaluadas no se produce una saturación del sistema de transporte.

2.4.4.4 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Glu (2)

Se evaluó una concentración de **AZT-Glu** en la solución mucosal de $1 \times 10^{-3} M$ (Figura 2.28.A). Se detectó la presencia de **AZTreg** en la solución serosal, indicando que **AZT-Glu** está siendo metabolizado durante su pasaje a través del segmento intestinal. Cabe destacar que, la cantidad de moles de **AZT-Glu** en la solución serosal es mayoritaria, indicado que la fracción de profármaco que atraviesa el epitelio intestinal como tal, presenta un menor grado de metabolismo si se lo compara con **AZT-Suc**. A partir de los moles de **AZT-Glu** y **AZTreg** detectados en la solución serosal, se calcularon los moles equivalentes de AZT (**AZTeq**) y se observó que los mismos aumenta durante todo el ensayo, pero son inferiores con respecto a los detectados en los estudios realizados para AZT en una concentración de $1 \times 10^{-3} M$ (Figura 2.28.B).

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

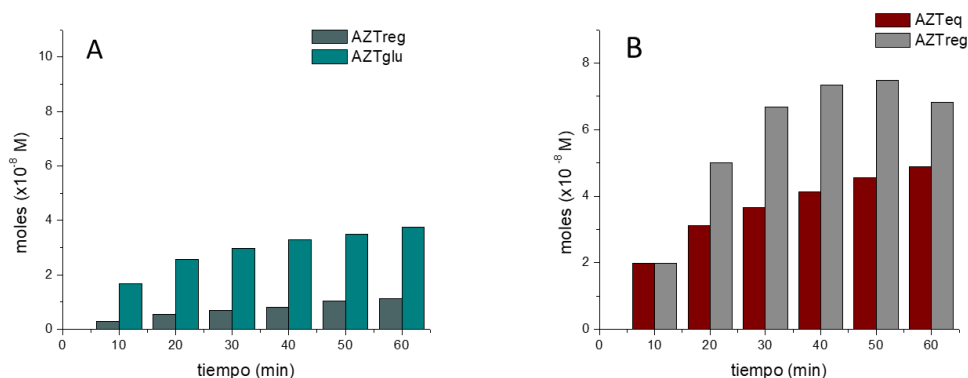


Figura 2.28. Ensayos de permeabilidad intestinal de AZT-Glu $1,0 \times 10^{-3}$ M. Moles permeados en función del tiempo para A) AZT-Glu y AZTreg y para B) AZTeq y AZT como tal en la solución mucosal.

Para comparar el perfil de permeabilidad de este derivado con el de AZT, se determinaron los valores de F y P_{app} para **AZT-Glu** y para los **AZTeq** (Figura 2.29 y Ec. 2.21 y 2.22). determinándose valores de P_{app} de $1,32 (\pm 0,06)$ y $1,61 (\pm 0,02) \times 10^{-4}$ cm/min para **AZT-Glu** y **AZTeq**, respectivamente (Tabla 2.13). Tanto **AZT-Glu** como **AZTeq** presentaron un valor de P_{app} inferior al de AZT ($2,7 (\pm 0,3) \times 10^{-4}$ cm/min), demostrando que este derivado logra atravesar con una menor eficiencia el tejido intestinal.

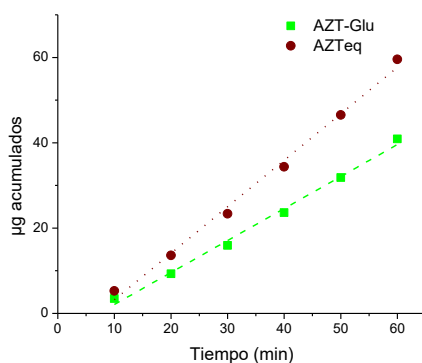


Figura 2.29 Ensayo de permeabilidad intestinal de AZT-Glu ($1,0 \times 10^{-3}$ M). μg acumulados de AZT-Glu y AZTeq en función del tiempo.

$$\mu\text{g acum. AZT-Glu.} = 0,75 (\pm 0,03) \text{ tiempo (min)} - 5,40 (\pm 1,15) \quad \text{Ec. 2.21}$$

$$n = 6; r^2 = 0,992; ds = 1,5; F = 648,7$$

$$\mu\text{g acum AZTeq} = 1,09 (\pm 0,06) \text{ tiempo (min)} - 7,67 (\pm 0,70) \quad \text{Ec. 2.22}$$

$$n = 6; r^2 = 0,990; ds = 1,30; F = 622,3$$

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

Tabla 2.13. Valores de F y P_{app} para de AZT-Glu y AZTeq. Concentración $1 \times 10^{-3} M$.

	F ($\mu\text{g}/\text{min}$)	P_{app} ($\times 10^{-4} \text{ cm}/\text{min}$)
AZT-Glu	$1,23 \pm 0,06$	$1,32 \pm 0,06$
AZTeq	$1,09 \pm 0,06$	$1,61 \pm 0,02$

La influencia de los transportadores de eflujo durante el pasaje a través de la membrana intestinal, se determinó realizando ensayos de permeabilidad en presencia de VER y utilizando una concentración fija de **AZT-Glu** de $1 \times 10^{-3} M$ (Figura 2.30).

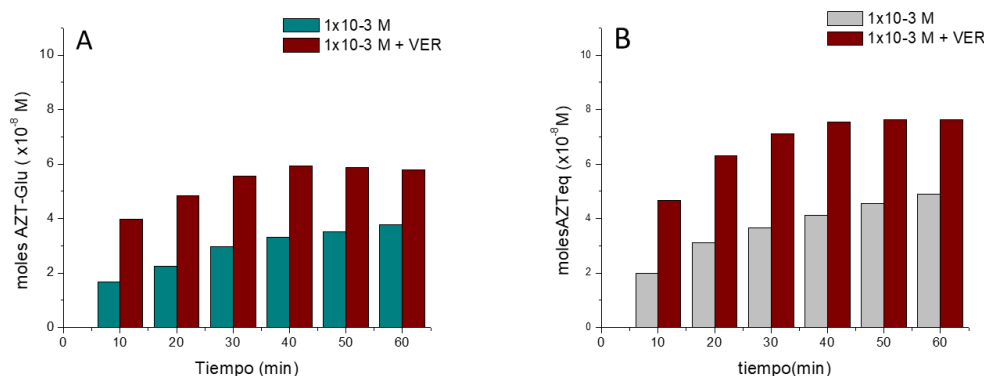


Figura 2.30. Ensayo de permeabilidad intestinal de AZT-Glu $1,0 \times 10^{-3} M$ en ausencia y presencia de Verapamilo. Moles permeados para A) AZT-Glu y para B) AZTeq en función del tiempo.

Al analizar la Figura 2.30.A, se observa que la cantidad de moles de **AZT-Glu** que atraviesan la membrana intestinal en presencia del inhibidor (VER) es mayor que los moles observados en el ensayo sin el inhibidor, sugiriendo la intervención de fenómenos de eflujo durante el pasaje del derivado **2**. Dicha tendencia también se observó para los **AZTeq** (Figura 2.30.B). Para profundizar el análisis, se determinaron los valores de F y P_{app} (Figura 2.31, Ecs.2.23 y 2.24 y Tabla 2.14)

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

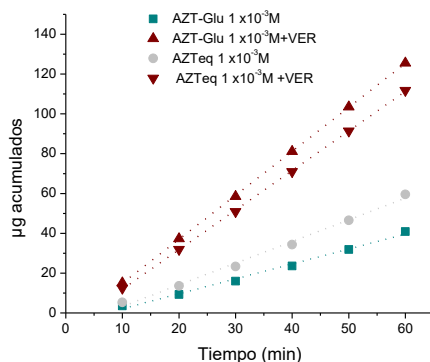


Figura 2.31. Ensayo de permeabilidad intestinal de AZT-Glu $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ en ausencia y presencia de Verapamilo. μg acumulados de AZT-Glu y AZTeq en función del tiempo.

$$\begin{aligned} \mu\text{g acum. AZT-Glu} &= 2,21 (\pm 0,01) \text{ tiempo (min)} - 7,16 (\pm 0,04) && \text{Ec. 2.23} \\ n &= 6; r^2 = 0,999; ds = 0,14; F = 62133,1 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \mu\text{g acum AZTeq} &= 1,99 (\pm 0,01) \text{ tiempo (min)} - 7,93 (\pm 0,05) && \text{Ec. 2.24} \\ n &= 6; r^2 = 0,999; ds = 0,34; F = 19907,1 \end{aligned}$$

Al determinar el P_{app} para **AZT-Glu** y **AZTeq** en presencia de VER, se observó que los mismos son estadísticamente diferentes a los valores determinados en ausencia del inhibidor, aumentando al doble los valores del coeficiente en presencia de VER (Tabla 2.14).

Tabla 2.14. Valores de F y P_{app} $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $1 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$, para **AZT-Glu** y **AZTeq**.

<i>Derivado</i>	<i>Concentración</i>	<i>F</i> ($\mu\text{g}/\text{min}$)	<i>P_{app}</i> (cm/min)
AZT-Glu	$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,23 \pm 0,06$	$1,32 \pm 0,06$
	$1 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	$2,21 \pm 0,02$	$2,41 \pm 0,02$
AZTeq	$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,09 \pm 0,06$	$1,61 \pm 0,02$
	$1 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	$1,99 \pm 0,06$	$2,9 \pm 0,02$

Estos perfiles de permeabilidad indican que tanto **AZT-Glu** como el **AZTreg** son sustratos de P-gp a nivel apical, debido a que su P_{app} aumenta al inhibir la función de dichas proteínas.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

Si bien este derivado no presenta una permeabilidad intrínseca superior a la de AZT como tal y que es sustrato de proteínas de eflujo, es destacable que evidenció un menor grado de metabolismo durante el pasaje por la membrana intestinal que el profármaco **AZT-Suc**.

2.4.4.5 Estudios de permeabilidad intestinal de *AZT-Adi* (3)

Se evaluaron las propiedades de permeación de **AZT-Adi**, a una concentración de 1×10^{-3} M (Figura 2.32.A). En la solución serosal se pudo observar que **AZT-Adi**, al igual que los otros profármacos evaluados, atraviesa el tejido intestinal como tal, y durante este pasaje es reconocido por esterasas presentes en el tejido que lo metabolizan y producen **AZTreg** (Figura 2.32.A). A partir de las especies detectadas en la solución serosal, se calcularon los moles **AZTreg** y se observó que los mismos son inferiores con respecto a los detectados en los estudios realizados para AZT en una concentración de 1×10^{-3} M (Figura 2.32.B).

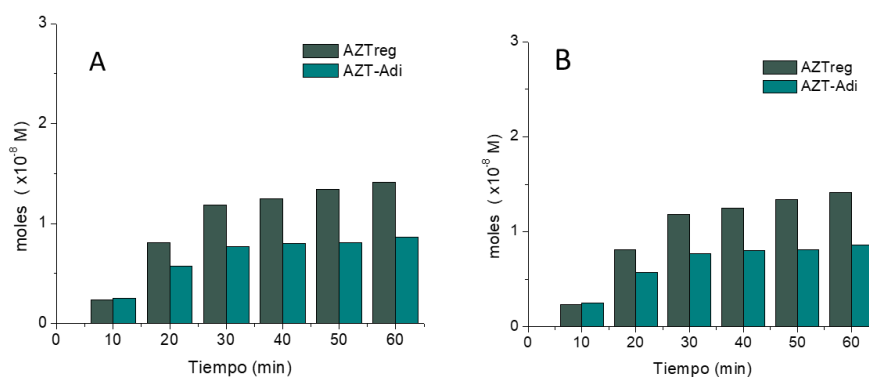


Figura 2.32. Ensayos de permeabilidad intestinal de *AZT-Adi* $1,0 \times 10^{-3}$ M. Moles permeados en función del tiempo para A) *AZT-Adi* y *AZTreg* y para B) *AZTreg* y *AZT* como tal en la solución mucosal.

Analizando los ensayos de igual manera que para **AZT-Suc** y **AZT-Glu**, se determinaron los valores de F y P_{app} para **AZT-Adi** y para el correspondiente **AZTreg** (Figura 2.33, Ecs 2.25 y 2.26 y Tabla 2.15).

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

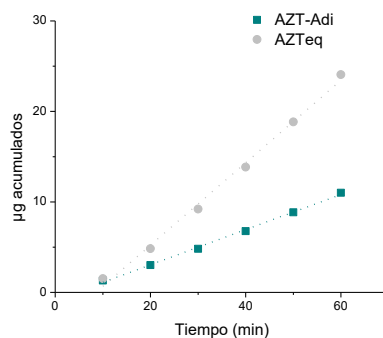


Figura 2.33. Ensayo de permeabilidad intestinal de AZT-Adi ($1,0 \times 10^{-3} M$). μg acumulados de AZT-Adi y AZTeq en función del tiempo.

$$\mu g \text{ acum. AZT-Adi } (1,0 \times 10^{-3} M) = 0,19 (\pm 0,01) \text{ tiempo (min)} - 0,84 (\pm 0,17) \quad \text{Ec. 2.25}$$

$$n = 6; r^2 = 0,997; ds = 0,4; F = 1788,8$$

$$\mu g \text{ acum. AZTeq } (1,0 \times 10^{-3} M) = 1,09 (\pm 0,06) \text{ tiempo (min)} - 7,67 (\pm 0,70) \quad \text{Ec. 2.26}$$

$$n = 6; r^2 = 0,994; ds = 0,4; F = 786,9$$

Tabla 2.15. Valores de F y P_{app} para de AZT-Adi y AZTeq. Concentración $1 \times 10^{-3} M$.

Especie	F ($\mu g/min$)	P_{app} ($\times 10^{-4} cm/min$)
AZT-Adi	$0,19 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$
AZTeq	$0,46 \pm 0,09$	$0,68 \pm 0,10$

A la concentración evaluada, **AZT-Adi** presentó un P_{app} inferior que AZT y que resto de los derivados evaluados (**1** y **2**). Esto también se observó al evaluar el P_{app} para los **AZTeq**, indicando que **AZT-Adi** presenta un grado de permeabilidad intrínseca inferior que el principio activo.

Para estudiar la influencia de los transportadores de eflujo durante el pasaje por la membrana intestinal, se realizaron ensayos de permeabilidad en presencia de VER y utilizando una concentración de **AZT-Adi** de $1 \times 10^{-3} M$ (Figura 2.34).

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

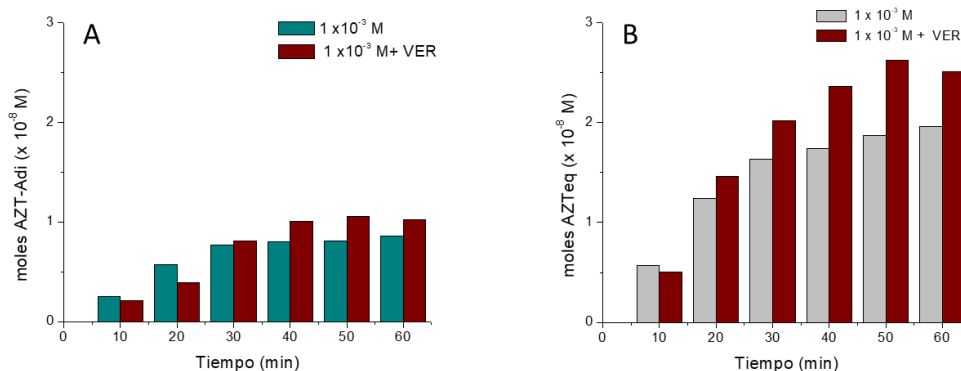


Figura 2.34. Ensayo de permeabilidad intestinal de AZT-Adi $1,0 \times 10^{-3}$ M en ausencia y presencia de Verapamilo. Moles permeados para A) AZT-Adi y para B) AZTeq en función del tiempo

Al realizar los ensayos de permeabilidad intestinal de **AZT-Adi** en presencia de VER, se observó que la cantidad de moles que pueden atravesar el epitelio no son similares a los determinados sin el inhibidor, determinándose un aumento en la cantidad de moles que logran atravesar el tejido intestinal después de los 30 min (Figura 2.34.A). Este comportamiento es similar cuando se analizan los moles de **AZTeq** presentes en la solución mucosal en ambos ensayos (Figura 2.34.B). Para profundizar el se calcularon los valores de F y P_{app} para **AZT-Adi** y **AZTeq** (Figura 2.35, Ecs 2.27 y 2.28 y Tabla 2.16).

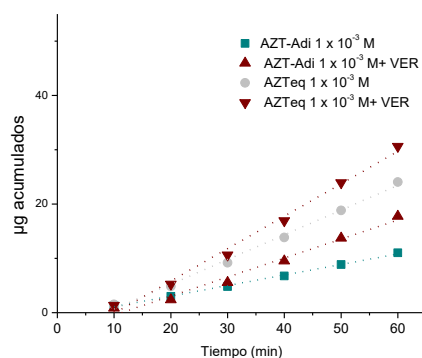


Figura 2.35. Ensayo de permeabilidad intestinal de AZT-Adi ($1,0 \times 10^{-3}$ M) en ausencia y presencia de Verapamilo. μg acumulados de AZT-Adi y AZTeq en función del tiempo.

$$\mu\text{g acum. AZT-Adi} = 0,35 (\pm 0,02) \text{ tiempo (min)} - 3,97 (\pm 0,63) \quad \text{Ec. 2.27}$$

$$n = 6; r^2 = 0,987; ds = 0,1; F = 222,43$$

$$\mu\text{g acum. AZTeq} = 0,59 (\pm 0,03) \text{ tiempo (min)} - 6,09 (\pm 0,01) \quad \text{Ec. 2.28}$$

$$n = 6; r^2 = 0,989; ds = 0,4; F = 451,6$$

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

Tabla 2.16. Valores de F y P_{app} $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $1 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$, para AZT-Adi y AZTeq.

<i>Derivado</i>	<i>Concentración</i>	<i>F</i> ($\mu\text{g}/\text{min}$)	<i>P_{app}</i> (cm/min)
<i>AZT-Adi</i>	$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$0,19 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$
	$1 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	$0,38 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,05$
<i>AZTeq</i>	$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$0,46 \pm 0,09$	$0,68 \pm 0,10$
	$1 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	$0,60 \pm 0,08$	$0,89 \pm 0,06$

Para ambas especies (**AZT-Adi** y **AZTeq**) se pudo determinar que en presencia del inhibidor el P_{app} es superior en ambos casos, evidenciando fenómenos de eflujo a nivel apical especialmente para **AZT-Adi** (Tabla 2.16). En consecuencia, se concluye que este derivado está siendo reconocidos por transportadores de eflujo presente en el enterocito.

De igual manera que para **AZT-Glu**, no se pudieron realizar los ensayos de permeabilidad utilizando una concentración de **AZT-Adi** de $0,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ debido a que la fracción de profármaco y de principio activo que atraviesan la membrana intestinal caen por debajo del límite de cuantificación.

2.4.5 Conclusiones parciales

De los resultados presentados, se concluye que **AZT-Suc (1)**, **AZT-Glu (2)** y **AZT-Adi (3)** exhiben una permeabilidad intrínseca menor que la de AZT como tal, presentado el siguiente orden $3 < 1 < 2 < \text{AZT}$. A pesar de su baja permeabilidad, se observó que los nuevos derivados AZT-Espaciador evaluados son capaces de atravesar la membrana intestinal como tales en una cantidad cuantificable, evidenciando su capacidad para atravesar el tejido intestinal y llegar a circulación enterohepática. En este sentido, la presencia de derivados de AZT con el 5'-OH protegido puede impedir que el principio activo sea metabolizado durante el paso por hígado antes de llegar a circulación sistémica. Por otro lado, se determinó que una fracción de los derivados **1-3** son metabolizados durante el pasaje por el segmento intestinal, regenerando el principio activo (**AZTreg**), siendo el derivado **2**, el que presenta este fenómeno en menor medida.

Para conocer si los derivados AZT-Espaciadores (y el **AZTreg** que se produce a partir de ellos) son o no sustratos de proteínas de eflujo, se determinó la permeabilidad de los mismos en presencia de VER. En el caso de **AZT-Suc** se pudo observar una leve disminución en el P_{app}

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

indicando la acción de proteínas de eflujo a nivel basal. En cambio, para **AZT-Glu** y **AZT Adi** se observó eflujo a nivel apical, posiblemente mediado por P-gp.

En el caso particular de **AZT-Suc**, para el cual se evaluaron diversas concentraciones, se puede decir que su P_{app} depende de la concentración del derivado en la solución mucosal, evidenciando una difusión mediada por transportadores que no llega a saturarse en las concentraciones evaluadas.

Sobre la base de lo discutido, se puede decir que los nuevos derivados *AZT-Espaciadores* (**1-3**) presentan un perfil similar de permeabilidad al descrito para **AZT-Oxa**, para el cual se determinó una permeabilidad intrínseca inferior a AZT, asociada a una baja tasa de regeneración de AZT durante el pasaje por el tejido intestinal⁵⁷. A su vez la difusión de **AZT-Oxa** a través del tejido intestinal demostró que el P_{app} aumenta conforme aumenta la concentración en la solución mucosal⁵⁷, evidenciando una difusión facilitada de manera similar al descrito para **AZT-Suc**. Así, es posible decir que las propiedades de permeabilidad intestinal de los derivados *AZT-Espaciadores* evaluados y su predecesor **AZT-Oxa** presentan un comportamiento similar.

2.4.6 Materiales y métodos

2.4.6.1 Preparación de las soluciones mucosales y serosales

La preparación de la solución mucosal de cada profármaco (**AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi**), se realizó pesando las cantidades necesarias de cada uno de ellos y disolviéndolos en 50 mL de medio de cultivo TC199 (sigma Aldrich®), para generar soluciones de trabajo, en el rango de concentración desde los $0,38 \times 10^{-3}$ M a 1×10^{-3} M, según corresponda. El medio de cultivo TC199, se preparó según las indicaciones del proveedor, ajustando el pH final a 7,4 y sometido a burbujeo con gas carbónico (5:95 CO₂: O₂), termostaticando la solución resultante a 37 °C. Las condiciones descritas permitieron asegurar la viabilidad del tejido intestinal durante el tiempo que dura el ensayo.

La solución de verapamilo (VER), se preparó pesando 25 mg, los cuáles fueron solubilizados en 50 mL de TC199, obteniéndose una concentración de $1,0 \times 10^{-4}$ M. La solución serosal utilizada, estaba compuesta de medio de cultivo TC199 termostaticado a 37 °C y saturado con gas carbónico.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

2.4.6.2 Obtención de segmentos intestinales

Los estudios se llevaron a cabo utilizando ratas Wistar machos, de 3 meses de edad pesando entre 300 y 450 g. Los animales se anestesiaron mediante la administración intraperitoneal de una solución de uretano (1000 mg/Kg). Posteriormente, se les realizó una incisión de 2 cm en la línea de la cavidad abdominal, se aisló el estómago y se descartaron los primeros 10 cm de tejido intestinal (duodeno), posibilitando de esta forma la toma de 10 cm de yeyuno proximal. Luego de la obtención del tejido, los animales se sacrificaron mediante la administración de dióxido de carbono.

2.4.6.3 Montaje del dispositivo de permeación

El segmento de yeyuno proximal aislado se colocó en una varilla de vidrio y se procedió a evertirlo. Luego, se lo insertó en una cánula de vidrio (0,2 cm de diámetro) y se sujetó el segmento en su extremo superior. En el extremo inferior se colocó una pesa de 10 g para mantener estirado el segmento intestinal. Luego se ligó el extremo inferior del tejido a la cánula, quedando expuestos 10 cm de tejido intestinal para el proceso de permeación. El segmento intestinal conteniendo la cánula en su interior, fue colocado en medio de cultivo TC199 y termostatzado a 37 °C, saturando la solución con gas carbógeno. En el interior del saco intestinal se adicionó 1 mL de la solución serosal y se lo dejó durante 10 min para equilibrar el tejido. El mismo se mantuvo en estas condiciones hasta el momento de comenzar el experimento.

2.4.6.4 Estudios de viabilidad intestinal

Los ensayos de viabilidad se realizaron tomando 20 µL de solución serosal cada 10 min durante una 1 h. Se cuantificó la glucosa presente en las muestras, utilizando un *kit* comercial (Wiener Lab) para este fin. El protocolo de trabajo empleado consistió en incubar a 37 °C por 10 min, los 20 µL de la muestra con 2 mL de solución de trabajo, compuesta por 50% de agua destilada, 5% de 4-aminofenazona 25 mM en *buffer* TRIS (0,92 M), el 5% de una solución de fenol 55 mM y 0,3% de glucosa oxidasa 1000 U/mL y peroxidasa 120 U/mL. La absorbancia correspondiente de la muestra se midió utilizando un espectrofotómetro UV-Vis, a una longitud de onda de 505 nm.

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos *AZT-Espaciador*

2.4.6.5 Toma, preparación y cuantificación de las muestras

Una vez montado el dispositivo de permeación, el segmento intestinal, es sumergido en la solución mucosal. En el interior del segmento intestinal, se colocó 1 mL de solución serosal por medio de una cánula insertada en su interior. Transcurridos 10 min, se retira el volumen agregado y se lava con 1 mL de solución serosal, tras lo cual se vuelve a introducir 1 mL de solución serosal fresca. De esta manera, la muestra de permeación está compuesta por 2 mL provenientes de la solución serosal retirados del interior de la cánula (muestra de permeación + muestra de lavado), a los cuales se le adicionó 80 μ L de HCl 2 M y 50 μ L de EI. La solución de EI para la cuantificación de **AZT**, **AZT-Suc** y **AZT-Adi**, fue preparada utilizando **AZT-Glu** (0,15 mg/mL), mientras que para **AZT-Glu**, se utilizó una solución de **AZT-Suc** (0,15 mg/mL). Este procedimiento se repitió cada 10 min durante 60 min. Luego se acondicionaron las muestras por extracción en fase sólida y posteriormente se cuantificaron mediante los métodos analíticos desarrollados y validados para tal fin, los cuáles se describen en el *Capítulo 4*.

2.5 Conclusiones parciales

Se sintetizaron 3 nuevos derivados AZT-Espaciadores, denominados **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi**, como intermediarios de la síntesis de profármacos más complejos, conteniendo aminoácidos esenciales como complemento molecular (AZT-Espaciadores-Aa-O-met). Debido a que estos últimos pueden ser metabolizados generando como producto los AZT-Espaciadores correspondiente, se evaluaron propiedades de estabilidad química y plasmática, unión a proteínas plasmática y propiedades de permeabilidad intestinal, con el objetivo de determinar, si **1-3** presentan propiedades optimizadas con respecto a AZT y su predecesor **AZT-Oxa**.

Los nuevos derivados, se obtuvieron mediante una estrategia sintética simple que permite la utilización de diácidos de diferente longitud de cadena alquílica lineal, ampliando así el espacio químico disponible de ser explorado para la síntesis de este tipo de profármacos de AZT.

Se evaluó la estabilidad química de los derivados en soluciones de *pH* 2,0, 7,4 y 10,0 obteniendo buenos y prometedores perfiles de estabilidad. Se determinó que **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi** pueden regenerar AZT en condiciones alcalinas, y que estos presentan un perfil de estabilidad química superior con respecto a **AZT-Oxa**. Asimismo, los derivados **1-3** demostraron que al aumentar la separación de los grupos carbonilos disminuye la estabilidad en soluciones acuosas, probablemente debido a un efecto de catálisis intramolecular que no fue estudiado en mayor detalle debido a que no forma parte de los objetivos de este Trabajo de Tesis.

Con relación a los estudios en plasma humano, se pudo observar que los nuevos derivados también presentan buena estabilidad plasmática, siendo **AZT-Suc** el que exhibe el mayor $t_{1/2}$. En cuanto a la unión a proteínas plasmáticas, los nuevos derivados presentan una mayor afinidad con respecto a AZT y **AZT-Oxa**, en el siguiente orden **AZT-Oxa** < AZT < **AZT-Glu** < **AZT-Suc** = **AZT-Adi**. Todos los derivados ácidos evaluados fueron desplazados por el marcador del sitio I (SAL) de la ASH, confirmando su afinidad por este sitio. Éstos estudios se complementaron mediante estudios teóricos de unión a ASH, en los cuales se observó que **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi** presentan interacciones similares a SAL, confirmando que se unen al sitio I de la ASH, estableciendo interacciones del tipo iónico con Arg257, aumentando así la afinidad de **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi** por la ASH, respecto a AZT.

Por otra parte, se puede decir que **1-3** no presentan permeabilidad intestinal mejorada con respecto al principio activo original, debido a que sus P_{app} son inferiores al de AZT. A pesar de ello, los estudios realizados sugieren que los mismos conducirían a una disminución en la tasa de

2. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador

metabolismo hepático del AZT debido a que en su forma de profármaco, no son hidrolizados completamente durante el pasaje por el segmento intestinal, lo cual inhibiría el metabolismo que presenta AZT a nivel hepático.

Para estudiar si **1-3** y el **AZTreg** que se produce a partir de éstos, son o no sustratos de proteínas de eflujo, se determinó la permeabilidad intestinal de los mismos en presencia de VER. En estos ensayos se pudieron observar diversos fenómenos de eflujo a nivel intestinal. Particularmente para **AZT-Glu** y el correspondiente **AZTreg**, se observó una mayor acción de proteínas de eflujo a nivel basal. Dicho fenómeno tuvo lugar en menor medida, para **AZT-Adi**. En cambio, **AZT-Suc** presentó una leve disminución del P_{app} , indicando la intervención de fenómenos de eflujo a nivel basal. Al comparar las permeabilidades globales (**AZTeq**), obtenidas a partir de **AZT-Suc** en presencia y ausencia de VER, no se observaron cambios significativos, por lo cual podría traducirse en una potencial optimización en la biodisponibilidad del fármaco a nivel intestinal

En el caso particular de **AZT-Suc**, se observó que el P_{app} depende de la concentración del derivado en la solución mucosal, evidenciando un mecanismo de difusión facilitada.

Sobre la base de lo discutido, se puede concluir que los profármacos **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi** presentan mejores propiedades biofarmacéuticas que **AZT-Oxa**, en cuanto a una mayor estabilidad química, enzimática y a un aumento en la afinidad por la ASH. Esto lleva a la conclusión que al separar los grupos carbonilos presentes en el “espaciador”, se pueden modular las propiedades mencionadas anteriormente.

Capítulo 3:

*Síntesis y evaluación
biofarmacéutica de profármacos
AZT-Espaciador-Aa-O-met*

Capítulo 3: Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Los profármacos pueden estar diseñados para superar diversos aspectos subóptimos de los principios activos, como una baja solubilidad acuosa, una baja biodisponibilidad oral o una corta duración de la acción¹⁴³. Con el fin de aumentar la biodisponibilidad de un fármaco se emplean diversas estrategias, como por ejemplo, mejorar su solubilidad acuosa, optimizar su absorción intestinal, o bien disminuir el grado de metabolismo³⁸.

La absorción intestinal por difusión pasiva de un principio activo, depende de sus propiedades fisicoquímicas como la lipofilia, el grado de ionización, etc. Normalmente los fármacos que presentan un peso molecular bajo o medio y que se encuentran no ionizados, son absorbidos a través de las membranas por difusión pasiva, a favor de un gradiente de concentración. La velocidad de dicha difusión está regida por la *ley de Fick*, y será mayor cuanto mayor sea el gradiente de concentración y menor sea el peso molecular y la hidrofiliencia de la molécula. En cambio, la difusión facilitada, depende de que los transportadores de membrana reconozcan a las moléculas, y de esta forma aumentan su permeabilidad. En particular, los profármacos que contienen aminoácidos son utilizados para mejorar la biodisponibilidad oral de los principios activos, ya que son reconocidos por transportadores que se expresan en las membranas de las células intestinales, mejorando la absorción del principio activo⁴⁴. Uno de los casos más representativos, es la conjugación de aciclovir con el aminoácido esencial *l*-valina, para generar *valaciclovir* (Valtrex[®]), que presenta una biodisponibilidad oral 3-5 veces mayor que el principio activo original^{44,144}. Esta misma estrategia fue aplicada para obtener *valganciclovir* (Valcyte[®]) el cual presenta una biodisponibilidad 10 veces mayor que el *ganciclovir*⁴⁴. Otro ejemplo, es la *Midrodina* (Gutron[®]) en el cual se conjuga el principio activo *desglímidodrina* con *glicina*, presentando de esta manera una biodisponibilidad oral de 93%⁴⁴. En todos estos casos, los profármacos presentan una biodisponibilidad aumentada debido a que son reconocidos por el transportador de péptidos *PEPT-1* presente en la cara apical de los enterocitos¹⁴⁵. También actúa como transportadores para sustratos tales como cefalosporinas, penicilinas, *oseltamivir* y péptidos, entre otros^{145,146}. En la actualidad se sabe que los sustratos de *PEPT-1* presentan algunas de las siguientes características estructurales: contener *l*-aminoácidos, una función ácida y otra débilmente básica, un enlace amida y una conformación *trans* en el enlace peptídico¹⁴⁷.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Teniendo en cuenta las posibles ventajas que puede presentar la presencia de un aminoácido en los profármacos de AZT en desarrollo, se propone adicionar al complemento molecular de los nuevos derivados *AZT-Espaciador* desarrollados en el *Capítulo 2*, un *l*-aminoácido con el fin de obtener profármacos que exhiban un potencial aumento en su biodisponibilidad oral respecto de AZT, como así también un aumento de afinidad por las proteínas de transporte plasmático. Por otra parte, la introducción de un complemento molecular del tipo aminoácido, podría conllevar a una disminución en el metabolismo de primer paso hepático que sufre el principio activo. En este caso en particular, se plantea la conjugación de los derivados evaluados en el capítulo anterior, con aminoácidos a través de una unión amida y de esta manera generar profármacos que simulen la estructura de un dipéptido, de forma tal que puedan ser reconocidos por *PEPT-1* optimizando el comportamiento biofarmacéutico de AZT.

Debido a que los derivados *AZT-Espaciador* evaluados en el capítulo anterior no presentaron un aumento en la permeabilidad intestinal, fundamentalmente porque los mismos presentaban un grupo ácido ionizado a *pH* intestinal (*pH* 5-7), se decidió utilizar aminoácidos que presenten el grupo ácido enmascarado por un grupo metilo (Aa-O-met), impidiendo así, su ionización.

Para alcanzar el objetivo propuesto se siguió el mismo esquema de trabajo utilizado en el *Capítulo 2*, es decir:

- 1) Síntesis de nuevos profármacos (AZT-Espaciador-Aa-O-Met)
- 2) Estudios de estabilidad química
- 3) Estudios en plasma humano
- 4) Estudios de permeabilidad intestinal

3.1 Síntesis de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

3.1.1 Introducción

Se planteó la síntesis de compuestos que presenten un enlace amida, por conjugación de un ácido carboxílico y una amina. En la Figura 3.1 se representa la reacción general para la obtención del enlace amida.



Figura 3.1. Reacción general para la obtención de amidas.

La formación de un enlace amida, entre un ácido carboxílico y una amina, no es favorable termodinámicamente, por lo cual se han desarrollado diversas estrategias sintéticas que posibilitan la formación de dicho enlace a través de la activación del grupo carboxilo⁷². Existen diferentes métodos, los cuales se pueden dividir en tres grupos^{72,148}:

- 1) Formación del intermediario reactivo y luego en una segunda etapa la adición de la amina.
- 2) Formación de un reactivo acilante, que se aísla y se purifica.
- 3) Activación del ácido carboxílico, con posterior formación del enlace amida en una sola etapa.

La última estrategia fue la elegida para la obtención de los derivados propuestos en esta etapa de síntesis.

Una de las metodologías utilizadas para activar el grupo carboxilo es emplear carbodiimidas, previamente descritas en la sección 2.1.1, lo cual permite mejorar el rendimiento de la reacción si se la asocia con un catalizador que evite la formación de la *N*-acilurea no reactiva (Figura 3.2). Durante décadas se han utilizado los benzotriazoles como catalizadores para la formación del enlace amida, entre los cuales se encuentran: 1-hidroxibenzotriazol

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

(HOBt), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-Tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uronio (HBTU), hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi) trispirrolidino fosfonio (PyAOP)^{72,149,150}. Sin embargo, todos estos compuestos están clasificados como materiales explosivos de la clase 1 y, por lo tanto, requieren de extremo cuidado durante el transporte, el almacenamiento y su utilización, limitando el uso de los mismos^{150,151}, lo cual ha llevado a la búsqueda de nuevos catalizadores no explosivos. Es por ello que se estudió la utilización de un derivado sintetizado en los años 70, específicamente el acetato de etil-(hidroxiimino)-ciano, comercialmente conocido como OymaPure[®] (Oxyma)¹⁵⁰. Este compuesto, no presenta propiedades explosivas y se ha reportado que se obtienen mejores rendimientos de reacción, que cuando se utiliza HOBt¹⁵⁰. Por las ventajas que presenta, es muy utilizado en la actualidad conjuntamente con carbodiimidas^{152,153}.

El procedimiento sintético seleccionado para la formación del enlace amida de los profármacos, es similar al descrito para la formación del enlace tipo éster presentado en el capítulo anterior (Sección 2.1.1). La diferencia radica en el catalizador utilizado.

El mecanismo de reacción se detalla a continuación (Figura 3.2)⁷²:

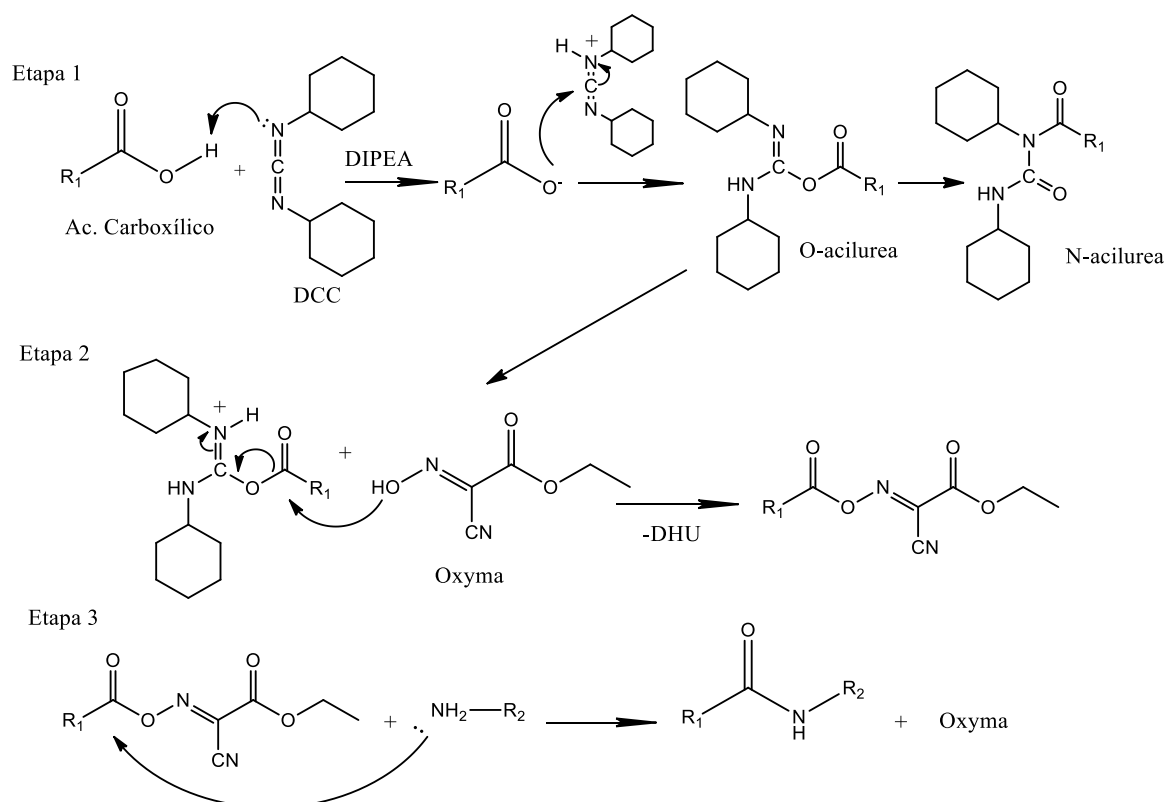


Figura 3.2. Mecanismo de reacción para la obtención de los derivados AZT-Espaciador-Aa-O-met.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

- 1) Inicialmente, la DCC actúa como base abstrayendo el protón del ácido carboxílico, el cual en su forma ionizada ataca al carbono cuaternario de la DCC, formando la correspondiente *O*-acilurea como intermediario (Figura 3.2, etapa 1)
- 2) La Oxyma, adicionada como catalizador, reacciona con la *O*-acilurea formando un éster reactivo y DHU (Figura 3.2, etapa 2).
- 3) El grupo amino, ataca de forma nucleofílica al éster reactivo, para generar el enlace amida, regenerando el catalizador (Figura 3.2, etapa 3).

En este caso, la adición de la Oxyma es fundamental para la formación del enlace amida, ya que, sin este catalizador, la reacción se desplaza hacia la formación de la *N*-acilurea no reactiva.

3.1.2 Objetivos

El objetivo de esta etapa de trabajo, es conjugar los derivados **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi** con Aa-O-met, de forma tal de obtener profármacos de AZT que responden a la estructura general que se presenta en la Figura 3.3.

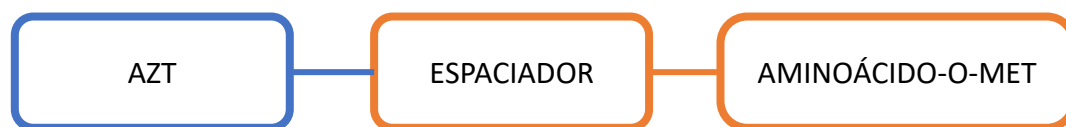
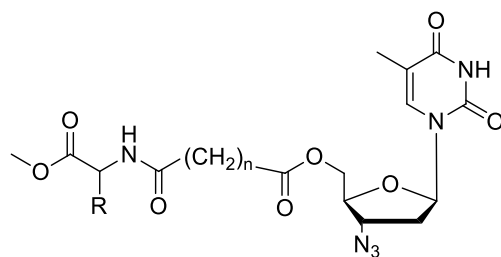


Figura 3.3. Estructuras generales de los profármacos de AZT desarrollados en el presente capítulo.

3.1.3 Resultados y discusiones

Los profármacos planteados que son objeto de síntesis son: **AZT-Suc-Fen-O-met (4)**, **AZT-Suc-Ileu-O-met (5)**, **AZT-Glu-Fen-O-met (6)** y **AZT-Adi-Fen-O-met (7)**, los cuales se representan en la Figura 3.4. y en el anexo I.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met



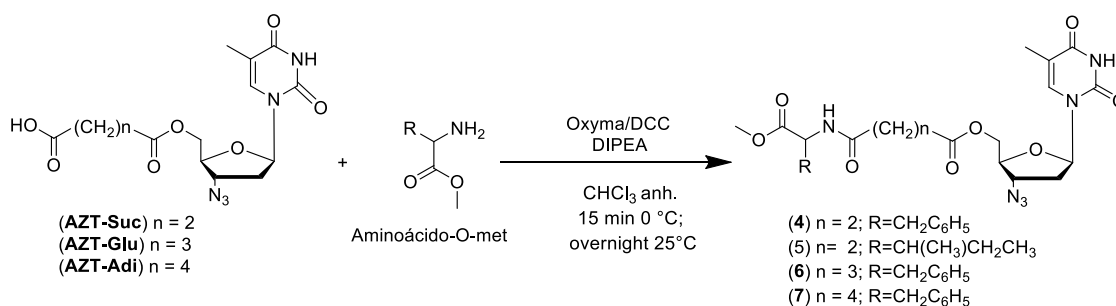
AZT-Espaciador-Aa-O-met

<i>Compuesto</i>	<i>n</i>	<i>R</i>
4; AZT-Suc-Fen-O-met	2	CH ₂ C ₆ H ₅
5; AZT-Suc-ILeu-O-met	2	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
6; AZT-Glu-Fen-O-met	3	CH ₂ C ₆ H ₅
7; AZT-Adi-Fen-O-met	4	CH ₂ C ₆ H ₅

Figura 3.4. Estructuras de los profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met.

3.1.3.1 Condiciones de reacción

La formación del enlace amida entre el AZT-Espaciador y el Aa-O-met, se puede representar como se muestra en la Figura 3.5.



**Oxyma*: acetato de etil-(hidroxiimino)-ciano. *DCC*: Dimetilaminopiridina. *DIPEA*: N,N'-diisopropiletilamina

Figura 3.5. Esquema de síntesis de los profármacos 4-7 (AZT-Espaciador-Aa-O-met).

Teniendo como referencia el mecanismo de reacción planteado en la Figura 3.2, se realizó la síntesis de los profármacos **4-7** en un solo paso, en el cual se produce la activación del ácido carboxílico por acción de la DCC, seguido de la formación del enlace amida por conjugación del intermediario activado y el Aa-O-met, obteniéndose los profármacos correspondientes.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

El producto objeto de síntesis se aisló del crudo de reacción a través de una cromatografía en columna de fase reversa, método por el cual fue eliminada la Oxyma. La fase móvil consistió en mezclas *buffer* fosfato *pH* 2: acetona (80:20 x 50 mL, 70:30 x 50 mL, 60:40 x 100 mL). Una vez aislado el compuesto de interés, se evaporó a presión reducida la acetona y luego se realizó una extracción líquido-líquido con diclorometano. El extracto orgánico resultante, luego es evaporado a presión reducida. El producto de reacción se obtuvo como un sólido, calculándose un rendimiento en el rango de 60 – 65 %.

3.1.3.2 Caracterización de los profármacos 4 - 7

Una vez aislados y purificados los productos obtenidos en esta etapa de síntesis, fueron caracterizados por RMN, en una y dos dimensiones, y HRMS. En los espectros de ^1H -RMN, se observaron las señales descritas previamente para los derivados *AZT-Espaciador*, como así también un singlete a 3,54 ppm que integra para 3 protones, perteneciente al grupo O-met de los nuevos profármacos. También se identificaron las señales provenientes de los protones del aminoácido incluido como complemento molecular. Para asignar correctamente cada señal y dilucidar la estructura química de cada derivado, se realizaron estudios de ^{13}C -RMN, *HMBC* y *HSCQ*.

Por otra parte, se utilizó la técnica de HRMS para la determinación del ión molecular de cada compuesto, utilizando condiciones estándares, en las cuales se observó para todos los casos la presencia del aducto $[\text{M}+\text{Na}]^+$, confirmando la identidad de los compuestos que son objeto de síntesis.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos que confirman la obtención de **4-7**, mientras que en el *Anexo I* se encuentran los espectros de RMN y de HRMS correspondientes. Para facilitar la identificación cada una de las señales en los espectros de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN, se enumeraron los átomos de cada derivado, tal como se muestra en la Figura 3.6.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

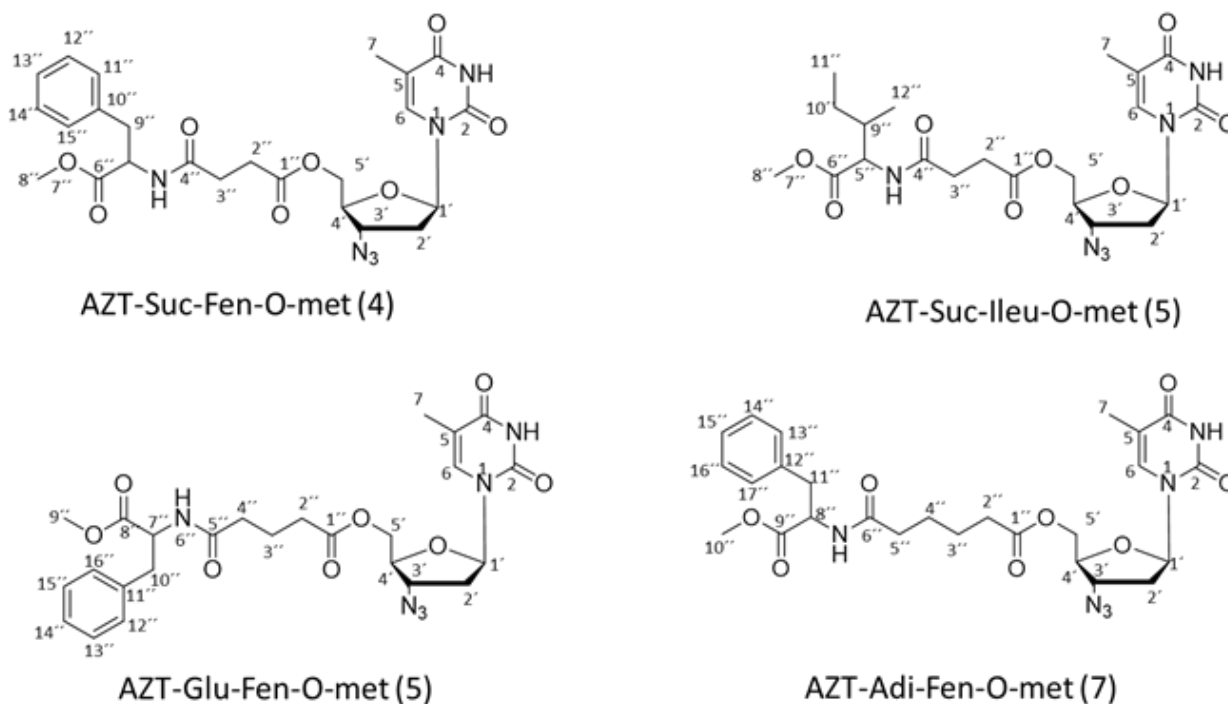


Figura 3.6. Numeración de los compuestos sintetizados, para su interpretación por métodos espectroscópicos.

3'-Azido-3'-deoxi-5'-O-succinil-N-metoxifenilalanina timidina (4; AZT-Suc-Fen-O-met):

Se obtuvo utilizando AZT-Suc y fenilalanina-O-met, con un rendimiento aislado del 61%. **Punto de fusión:** 144-145°C. **¹H-RMN** (400 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm]= 1,70 [m, 3H, J = 1,2 Hz, 7-H], 2,37 [m, 1H, J = 22,4 Hz, 2b'-H], 2,25 [m, 1H, J = 24,4 Hz, 2a'-H], 2,42 [m, 4H, J = 31,6 Hz, 2'' y 3''-H], 2,81 [m, 1H, J = 33,6 Hz, 9b''-H], 2,94 [m, 1H, J = 28,8 Hz, 9a''-H], 3,49 [s, 3H, J = 18,4 Hz, 8''-H], 3,90 [m, 1H, J = 33,2 Hz, 4'-H], 4,11 [dd, 1H, J = 24,8 Hz, 5b'-H], 4,29 [dd, 1H, J = 22,0 Hz, 5a'-H], 4,34 [dm, 1H, J = 28,4 Hz, 3'-H], 4,54 [dm, 1H, J = 31,2 Hz, 6''-H], 6,07[t, 1H, J = 24,4 Hz, 1'-H], 7,04 [m, 5H, J = 56,0 Hz, 11''-15''-H], 7,38 [d, 1H, J = 16,8 Hz, 6-H]. **¹³C-RMN** (400 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 11,61 [C7], 29,84 [C 2'' y 3'], 36,50[C 2],37,51 [C 9'], 51,32 [C 8'],53,73 [C 6'], 60,57 [C 3'], 63,03 [C5'], 81,62 [C4'], 84,33 [C 1'], 110,37 [C 5], 126,63-129,21 [C 10''-15''], 135,68 [C 6], 150,34 [C 2], 163,29[C 4], 170,84 [C 1''], 171,81 [C 4'], 172,14 [C 7'']. **HRMS (ESI)** m/z C₂₄H₂₈N₆O₈Na [M+Na]⁺: calculado 551,1861, experimental 551,1855.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

3'-Azido-3'-deoxi-5'-O-succinil-N-metoxiisoleucina timidina (5; AZT-Suc-ILeu-O-met): Se obtuvo utilizando AZT-Suc e Isoleucina-O-met, con un rendimiento aislado del 60%. **Punto de fusión:** 130-131°C. **¹H-RMN** (400 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 0,75 [m, 6H, J = 7,5 Hz, 11''-12''-H], 1,72 [m, 3H, J = 1,2 Hz, 7-H], 1,92 [m, 2H, J = 2,01 Hz, 10''-H], 2,31 [m, 1H, J = 12,3 Hz, 2b'-H], 2,42 [m, 1H, J = 13,9 Hz, 2a'-H], 2,52 [m, 4H, J = 16,3 Hz, 2'' y 3''-H], 3,54 [s, 3H, J = 18,4 Hz, 8''-H], 3,94 [m, 1H, J = 3,88 Hz, 4'-H], 4,15 [dm, 1H, J = 3,6 Hz, 5b'-H], 4,31 [dm, 1H, J = 3,6 Hz, 5a'-H], 4,34 [m, 1H, J = 4,01 Hz, 9''-H], 4,38 [dm, 1H, J = 5,46 Hz, 3'-H], 6,10 [t, 1H, J = 24,4 Hz, 1'-H], 7,41 [d, 1H, J = 1,168 Hz, 6-H]. **¹³C-RMN** (400 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 10,8 [C11''], 11,61 [C7], 14,98 [C12''], 25,01 [C10''], 29,60 [C2''], 29,80 [3''], 36,51 [C2'], 37,42 [C8''], 51,06 [C5'], 56,15 [C9''], 60,54 [C6''], 62,99 [C3'], 81,63 [C4'], 84,32 [C1'], 110,36 [C5], 135,69 [C6], 150,33 [C2], 163,27 [C4], 170,98 [C1'], 171,920 [C4'], 172,20 [C7'']. **HRMS (ESI)** m/z C₂₀H₂₈N₆O₈Na [M+Na]⁺: calculado 517,2017, experimental 517,2020.

3'-Azido-3'-deoxi-5'-O-glutaril-N-metoxifenilalanina timidina (6; AZT-Glu-Fen-O-met): Se obtuvo utilizando AZT-Glu y Fen-O-met, con un rendimiento aislado del 65%. **Punto de fusión:** 150-151°C. **¹H-RMN** (400 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 1,70 [D, 3H, J = 1,2 Hz, 7-H], 2,11 [T, 2H, J = 14,7 Hz, 4''-H], 2,24 [M, 1H, J = 17,16 Hz, 2''H], 2,33 [M, 1H, J = 26,2 Hz, 3b''-H], 2,41 [T, 1H, J = 7,24 Hz, 2'-H], 2,44 [M, 1H, J = 27,8 Hz, 3a''-H], 2,83 [C, 1H, J = 22,4 Hz, 10b''-H], 2,99 [C, 1H, J = 19,4 Hz, 10a''-H], 3,51 [S, 3H, J = 18,4 Hz, 9''-H], 3,96 [C, 1H, J = 13,72 Hz, 4'-H], 4,17 [M, 1H, J = 15,88 Hz, 5b'-H], 4,27 [M, 1H, J = 16,8 Hz, 5a'-H], 4,39 [M, 1H, J = 18,6 Hz, 3'-H], 4,58 [M, 1H, J = 22,2 Hz, 7''-H], 6,11 [T, 1H, J = 13,12 Hz, 1'-H], 7,12 [M, 5H, J = 31,7 Hz, 12''-16''-H], 7,36 [S, 1H, J = 1,16 Hz, 6-H]. **¹³C-RMN** (400 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 11,70 [C7], 20,62 [C3''], 32,68 [C4''], 34,18 [C2'] 36,16 [C2''], 37,41 [C10''], 51,35 [C9''], 53,51 [C7''], 60,82 [C3'], 63,21 [C5'], 81,49 [C4'], 84,64 [C1'], 110,32 [C5], 126,61 -128,28 [C12''-17''], 129,17 [C9''], 135,74 [C6], 150,32 [C2], 163,31 [C4], 171,49 [C1'], 172,04 [C5''], 172,42 [C8'']. **HRMS (ESI)** m/z C₂₅H₃₀N₆O₈Na [M+Na]⁺: calculado 565,2071, experimental 565,2023.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

3'-Azido-3'-deoxi-5'-O-adipil-N-metoxifenilalanina timidina (7; AZT-Adi-Fen-O-met): Se obtuvo utilizando AZT-Adi y fenilalanina-O-met, con un rendimiento aislado del 61%. **Punto de fusión:** 159–160°C. **¹H-RMN** (400 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 1,44 [m, 4H, J = 36,8 Hz, 3''-4''-H], 1,71 [m, 3H, J = 13,6 Hz, 7-H], 2,25 [m, 2H, J = 24,4 Hz, 2'-H], 2,39 [m, 4H, J = 88,5 Hz, 2''-5''-H], 2,83 [m, 1H, J = 36,8 Hz, 11b''-H], 2,99 [m, 1H, J = 36,0 Hz, 11a''-H], 3,52 [s, 3H, J = 18,4 Hz, 10''-H], 3,96 [m, 1H, J = 33,6 Hz, 4'-H], 4,18 [dm, 1H, J = 30,4 Hz, 5b'-H], 4,26 [dm, 1H, J = 30,0 Hz, 5a'-H], 4,39 [m, 1H, J = 41,2 Hz, 3'-H], 4,58 [m, 1H, J = 40,0 Hz, 8''-H], 6,08 [t, 1H, J = 36,0 Hz, 1'-H], 7,11 [m, 5H, J = 70,0 Hz, 13''-17''-H], 7,37 [s, 1H, J = 13,6 Hz, 6-H]. **¹³C-RMN** (400 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 11,67 [C7], 24,12 [C3'], 24,72 [C4'], 33,34 [C2'], 36,47 [C2''-5''], 37,44 [C 11''], 51,29 [C 10''], 53,49 [C 8''], 60,85 [C 3'], 63,22 [C5'], 81,49 [C4'], 84,69 [C 1'], 110,25 [C 5], 126,57-129,18 [C 12''-17''], 135,74 [C 6], 150,29 [C 2], 163,27 [C 4], 171,76 [C 1''], 172,02 [C 6''], 172,42 [C 9'']. **HRMS (ESI)** m/z C₂₆H₃₂N₆O₈Na [M+Na]⁺: calculado 579,2174, experimental: 579,2161.

3.1.4 Conclusiones parciales

En esta sección se obtuvieron cuatro nuevos profármacos de AZT, denominados **AZT-Suc-Fen-O-met (4)**, **AZT-Suc-ILeu-O-met (5)**, **AZT-Glu-Fen-O-met (6)** y **AZT-Adi-Fen-O-met (7)**, a través de la generación de un enlace amida entre el ácido carboxílico del AZT-Espaciador y el grupo amino de los Aa-O-met. Para ello se utilizó DCC como activador del grupo ácido de AZT-Espaciador, asistido por el uso de Oxyma como catalizador, impidiendo la formación de la N-acilurea no reactiva. Esta estrategia permitió generar en un solo paso el enlace amida correspondiente y obtener los productos de reacción deseados. Los compuestos, **4-7** se obtuvieron con muy buenos rendimientos y se caracterizaron de forma exitosa por RMN y HRMS, confirmando la estructura de los cuatros derivados sintetizados.

3.1.5 Materiales y métodos

Los derivados **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi**, fueron sintetizados según lo reportado en el *Capítulo 2* de este Trabajo de Tesis. Los reactivos utilizados fueron adquiridos en Sigma Aldrich® (99,9 % de pureza). La síntesis y la purificación se realizó con solventes de grado analítico (Sintorgan®). Se utilizó agua Milli-Q en todos los experimentos.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

3.1.5.1 Procedimiento general para la síntesis de ILeu-O-met y Fen-O-met.

Para la síntesis de Fen-O-met e ILeu-O-met (Aa-O-met) se utilizó el procedimiento descrito por *Li et. al*¹⁵⁴. Se utilizaron 0,02 moles de triclorometilsilano y 0,024 moles del aminoácido correspondiente. Luego se adicionaron 10 mL de MeOH y se dejó agitando durante toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo de reacción, se evaporó el solvente a sequedad, obteniéndose un sólido que corresponde al producto deseado.

3.1.5.2 Procedimiento general para la síntesis de los profármacos 4-7

Para la síntesis de los compuestos: **AZT-Suc-Fen-O-met (4)**, **AZT-Suc-ILeu-O-met(5)**, **AZT-Glu-Fen-O-met (6)** y **AZT-Adi-Fen-O-met (7)**, se disolvió 1 mmol del *AZT-Espaciador* correspondiente, 2 mmol de Aa-O-Met y 1 de mmol *N,N*-Diisopropiletamina (DIPEA) en 10 mL de cloroformo anhidro, y se lo agitó en baño de hielo por 15 min. Luego se agregaron, 1,5 mmol de DCC y 1,1 mmol de Oxyma y se dejó agitando durante toda la noche a temperatura ambiente. La fase orgánica se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en una solución *buffer* fosfato *pH* 2: acetona (80:20) (20 mL). La solución fue purificada mediante cromatografía en columna en fase reversa, empleando cartuchos Phenomenex Strata-X[®]. La fase móvil consistió en mezclas *buffer* fosfato *pH* 2: acetona (80:20 x 50 mL, 70:30 x 50 mL, 60:40 x 100 mL). La fracción de solvente final se recolectó y la acetona se evaporó a presión reducida. La solución acuosa resultante se extrajo con DCM (3 x 10 mL). Luego, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a sequedad. El producto deseado se obtuvo como un sólido blanco con rendimientos cercanos al 60 %.

3.1.5.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Las síntesis fueron monitoreadas por HPLC-UV, utilizando un cromatógrafo JASCO UV-2077 Plus, equipado con una bomba cuaternaria. Se empleó una columna analítica Phenomenex Synergi Fusion C18[®] (4 x 250 mm, 5 mm tamaño de partícula) con precolumna Phenomenex Security Guard Fusion RP[®] (4 x 30 mm) termostata a 40 °C. La longitud de onda seleccionada para la cuantificación de las muestras fue 267 nm. Debido a la elevada lipofilidad de los compuestos sintetizados y a la necesidad de cuantificar tanto AZT como así también *AZT-Espaciador*, se utilizó un gradiente de fase móvil, que consistió en *buffer pH* 2 (0,1 mM): MeOH (53:47 v/v) por 2,5 min, seguido por un cambio lineal hasta llegar a (30:70 v/v) a los 9,5 min y se

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

lo mantuvo constante por 1,5 min. Finalmente se volvió a la composición inicial de fase móvil, estabilizando entre cada inyección durante al menos 1,5 min.

En la Figura 3.7 se muestra a modo de ejemplo el cromatograma para la síntesis de **AZT-Suc-Fen-O-met**. Los tiempos de retención (t_r) para AZT, AZT-Espaciador (**1-3**) y para los profármacos (**4-7**), se presentan en la Tabla 3.1.

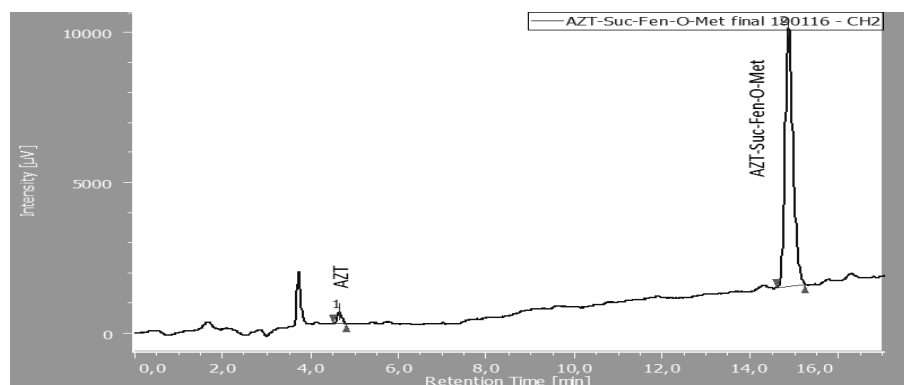


Figura 3.7. Cromatograma síntesis de AZT-Suc-Fen-O-met.

Tabla 3.1. Tiempos de retención (t_r).

<i>Compuesto</i>	<i>t_r (min)</i>	<i>Compuesto</i>	<i>t_r (min)</i>
<i>AZT</i>	4,41	<i>4; AZT-Suc-Fen-O-met</i>	15,01
<i>1; AZT-Suc</i>	5,28	<i>5; AZT-Suc-ILeu-O-met</i>	13,11
<i>2; AZT-Glu</i>	6,64	<i>6; AZT-Glu-Fen-O-met</i>	12,82
<i>3; AZT-Adi</i>	7,21	<i>7; AZT-Adi-Fen-O-met</i>	14,84

3.1.5.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN fueron obtenidos usando un espectrómetro Bruker Avance II 400 de alta resolución, sonda de detección inversa y unidad de temperatura variable. El equipo operó a 400,16 MHz para ^1H y a 100,63 para ^{13}C . Se utilizaron tubos Merck® de 5 mm de diámetro. Todos los experimentos se desarrollaron en acetona deuterada (CD_3COCD_3 , 99,99%, Sigma Aldrich®) utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. La concentración de las muestras fue de 50 mM en todos los casos. Los corrimientos químicos se expresan en ppm.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

3.1.5.5 *Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)*

El peso molecular de los profármacos **4-7**, se determinó por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), utilizando un equipo Bruker Daltonics micro TOF QII® realizados del Instituto Superior de Investigación, Desarrollo y Servicios en Alimentos (ISIDSA). Los ensayos se realizaron, en modo positivo abarcando un rango de detección de 250 a 800 m/z, y la muestra fue sometida a una energía de colisión de 6,5 eV.

3.2 Estabilidad Química

3.2.1 Introducción

Los profármacos deben tener una adecuada estabilidad química para mejorar las propiedades biofarmacéuticas del principio activo, ya que los mismos, son farmacológicamente inactivos y biotransformarse para regeneran moléculas con actividad biológica. Si el profármaco se hidroliza rápidamente no mejorara las propiedades biofarmacéuticas del fármaco activo. Por otra parte si el proceso es muy lento va a ser eliminado del organismo, sin que el mismo regenere el fármaco activo ⁴².

Para la determinación de la estabilidad química de los profármacos **4-7** se debe tener en cuenta que presentan tres centros de hidrólisis, en los cuales se puede producir la ruptura de enlaces, y por lo tanto dar lugar a diferentes productos de degradación (Figura 3.8).

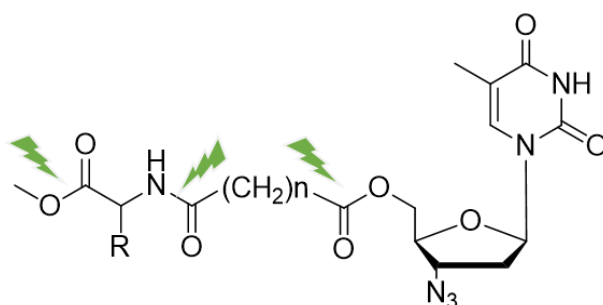


Figura 3.8. Representación de los puntos de hidrólisis en la estructura general de los profármacos **4-7**.

Es necesario tener en cuenta, que el enlace amida presenta una mayor estabilidad química que la de los ésteres, debido a la diferencia en el carácter electrónico de los átomos que los componen. El oxígeno es más electronegativo que el átomo de nitrógeno, por lo que es menos probable que done sus electrones no enlazados al carbonilo adyacente. Por este motivo los ésteres son menos estables que la amidas ¹⁵⁵.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

3.2.2 Objetivos

Teniendo en cuenta la necesidad de conocer la estabilidad química de los profármacos de AZT, se plantea como objetivo el estudio de esta propiedad para **AZT-Suc-Fen-O-met (4)**, **AZT-Suc-Ileu-O-met (5)**, **AZT-Glu-Fen-O-met (6)** y **AZT-Adi-Fen-O-met (7)**. Dicha estabilidad química será estudiada en soluciones acuosas de diferentes pH, determinándose los parámetros cinéticos asociados a tal proceso, e identificando los productos de degradación obtenidos a partir de los profármacos desarrollados

3.2.3 Resultados y discusiones

3.2.3.1. Estudios de estabilidad química a pH 2

Se realizaron los estudios de estabilidad por 24 h a 37°C en condiciones ácidas (*buffer* fosfato 0,1 M pH 2) de los profármacos **AZT-Suc-Fen-O-met (4)**, **AZT-Suc-Ileu-O-met (5)**, **AZT-Glu-Fen-O-met (6)** y **AZT-Adi-Fen-O-met (7)**. Se encontró que durante este tiempo todos los profármacos son estables, sin observarse cambios en su concentración inicial, ni la aparición de productos de degradación.

3.2.3.2 Estudios de estabilidad química a pH 7,4

Cuando se estudió la estabilidad química de los profármacos a pH 7,4 se observó que los mismos sufren procesos de hidrólisis, ya que se observa la aparición de productos de degradación. En la Figura 3.9 se presenta, a modo de ejemplo, el cromatograma de HPLC-UV correspondiente a los 5 h del estudio de degradación de **AZT-Suc-Fen-O-met** a pH 7,4.

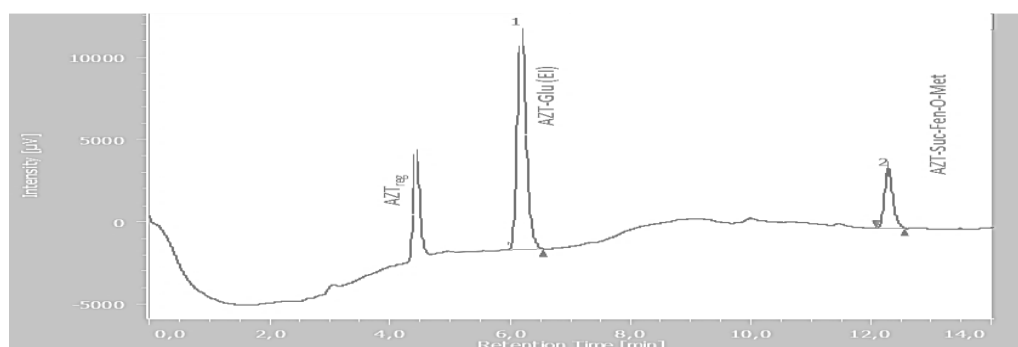


Figura 3.9. Cromatograma correspondiente al estudio de estabilidad de AZT-Suc-Fen-O-met a pH 7,4; 5 h.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Los profármacos **4-7** sufren hidrólisis posibilitando la regeneración de AZT (**AZTreg**) como uno de los productos de degradación. La mayor estabilidad química del enlace amida imposibilita la aparición de los derivados *AZT-Espaciador* como productos de degradación, observándose únicamente la ruptura de enlaces tipo éster. La Figura 3.10 y las Ecs 3.1 – 3.4 muestra los perfiles de hidrólisis obtenidos para los profármacos **4-7**.

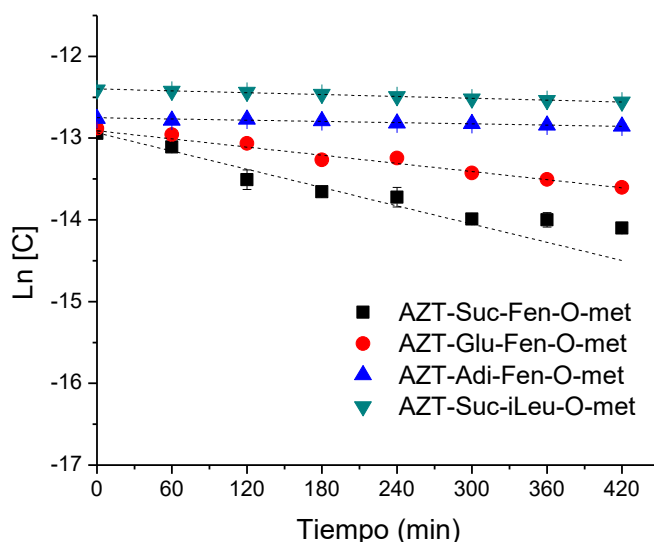


Figura 3.10. Ln concentración vs tiempo. Perfiles de hidrólisis de los profármacos AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met, AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met a pH 7,4, 37 °C, 8 h.

$$\text{Ln [AZT-Suc-Fen-O-met]} = -0,0028 (\pm 0,0003) \text{ Tiempo (min)} -13,04 (\pm 0,07) \quad \text{Ec 3.1}$$

$$n = 8; r^2 = 0,927; ds = 0,01; F = 90,78$$

$$\text{Ln [AZT-Glu-Fen-O-met]} = -0,0018 (\pm 0,0001) \text{ Tiempo (min)} -12,87 (\pm 0,03) \quad \text{Ec 3.2}$$

$$n = 8; r^2 = 0,976 ds = 0,01; F = 287,59$$

$$\text{Ln [AZT-Adi-Fen-O-met]} = -0,00023 (\pm 0,00004) \text{ Tiempo (min)} -12,76 (\pm 0,01) \quad \text{Ec 3.3}$$

$$n = 8; r^2 = 0,928 ds = 0,02; F = 91,62$$

$$\text{Ln [AZT-Suc-ILeu-O-met]} = -0,00038 (\pm 0,00001) \text{ Tiempo (min)} -12,39 (\pm 0,01) \quad \text{Ec 3.4}$$

$$n = 8; r^2 = 0,987; ds = 0,01; F = 559,71$$

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Del análisis de las constantes de hidrólisis y de los $t_{1/2}$ (Tabla 3.2), se puede observar que al adicionar el Aa-O-met al complemento molecular, se genera una mayor inestabilidad en los profármacos, ya que tal como se comentó en el capítulo anterior, **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi** a este pH son estables por 48 h, mientras que **AZT-Suc-Fen-O-met**, **AZT-Suc-ILeu-O-met**, **AZT-Glu-Fen-O-met** y **AZT-Adi-Fen-O-met** se hidrolizan en estas condiciones. Si se comparan los profármacos **4** y **5**, se observa que el aminoácido aromático confiere una menor estabilidad química, ya que **5** presenta mayor $t_{1/2}$ que **4**. En cuanto a la estabilidad de los profármacos en los cuales se utiliza el mismo aminoácido y sólo se varia el largo de la cadena carbonada del *Espaciador* (**AZT-Suc-Fen-O-met**, **AZT-Glu-Fen-O-met** y **AZT-Adi-Fen-O-met**), se puede decir que al aumentar la separación entre los grupos carbonilos, el profármaco se vuelve más estable, en el siguiente orden creciente de estabilidad, **4** < **6** < **7** (Tabla 3.2). Este comportamiento evidencia una relación directa entre la separación de los carbonilos y el $t_{1/2}$.

Tabla 3.2. Constantes de velocidad de hidrólisis observadas (k_{obs}) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) para AZT-Suc-Fen-O-met (4), AZT-Suc-ILeu-O-met (5), AZT-Glu-Fen-O-met (6) y AZT-Adi-Fen-O-met (7) a pH 7,4; 37 °C; 8 h.

Derivado	pH 7,4	
	$k_{obs} \times 10^{-3} (min^{-1})$	$t_{1/2} (min)$
AZT-Suc-Fen-O-met (4)	2,9 ($\pm 0,1$)	244,7($\pm 4,9$)
AZT-Suc-ILeu-O-met (5)	0,4 ($\pm 0,1$)	1732,8 ($\pm 30,3$)
AZT-Glu Fen-O-met (6)	1,5 ($\pm 0,1$)	452,5($\pm 16,7$)
AZT-Adi Fen-O-met (7)	0,2 ($\pm 0,1$)	3465,7 ($\pm 48,8$)

3.2.3.3 Estudios de estabilidad química a pH 10

Por último, se realizaron estudios en condiciones básicas (*buffer* fosfato 0,1 M pH 10), tomando muestras durante 30 min, dado que en ensayos preliminares se observó la hidrólisis total de los profármacos **4-7** en el lapso de 1 hora. En estos ensayos se observó que los profármacos evaluados sufren hidrólisis significativa siguiendo una cinética de pseudo-primer orden (Figura 3.11 y Ecs. 3.5 - 3.8). En condiciones alcalinas, todos los profármacos exhibieron una tasa de hidrólisis significativamente mayor a la observada a pH 2 y pH 7,4, exhibiendo en todos los

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

casos valores de $t_{1/2}$ inferiores a los 11 min (Tabla 3.3). Asimismo, en todos los casos se observó **AZTreg** como único producto de hidrólisis química.

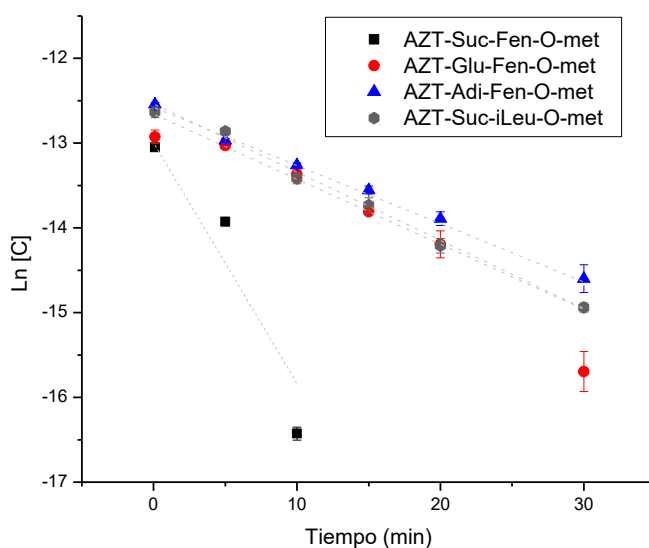


Figura 3.11. Ln concentración vs tiempo. Perfiles de hidrólisis de los profármacos AZT-Suc-Fen-O-met (4), AZT-Suc-ILeu-O-met (5), AZT-Glu-Fen-O-met (6) y AZT-Adi-Fen-O-met (7) a pH 10, 37 °C, 30 min.

$$\text{Ln [AZT-Suc-Fen-O-met]} = -0,296 (\pm 0,007) \text{ Tiempo (min)} -12,99 (\pm 0,07) \quad \text{Ec 3.5}$$

$$n = 3; r^2 = 0,843; ds = 0,02; F = 11,719$$

$$\text{Ln [AZT-Glu-Fen-O-met]} = -0,008 (\pm 0,003) \text{ Tiempo (min)} -12,66 (\pm 0,03) \quad \text{Ec 3.6}$$

$$n = 6; r^2 = 0,947 ds = 0,01; F = 90,21$$

$$\text{Ln [AZT-Adi-Fen-O-met]} = -0,067 (\pm 0,002) \text{ Tiempo (min)} -12,58 (\pm 0,02) \quad \text{Ec 3.7}$$

$$n = 6; r^2 = 0,928 ds = 0,02; F = 293,43$$

$$\text{Ln [AZT-Suc-ILeu-O-met]} = -0,081 (\pm 0,002) \text{ Tiempo (min)} -12,54 (\pm 0,04) \quad \text{Ec 3.8}$$

$$n = 6; r^2 = 0,992; ds = 0,01; F = 650,07$$

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Tabla 3.3. Constantes de velocidad de hidrólisis observadas (k_{obs}) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) para AZT-Suc-Fen-O-met (4), AZT-Suc-ILeu-O-met (5), AZT-Glu-Fen-O-met (6) y AZT-Adi-Fen-O-met (7) a pH 10.

Profármaco	pH 10 (37°C)	
	k_{obs} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
AZT-Suc-Fen-O-met (4)	0,300 (\pm 0,007)	2,3 (\pm 0,7)
AZT-Suc-ILeu-O-met (5)	0,079 (\pm 0,007)	8,8 (\pm 0,8)
AZT-Glu Fen-O-met (6)	0,077 (\pm 0,003)	7,9 (\pm 0,3)
AZT-Adi Fen-O-met (7)	0,070 (\pm 0,002)	10,4 (\pm 0,2)

3.2.4 Conclusiones parciales

Al evaluar la estabilidad química de los profármacos **AZT-Suc-Fen-O-met (4)**, **AZT-Suc-ILeu-O-met (5)**, **AZT-Glu-Fen-O-met (6)** y **AZT-Adi-Fen-O-met (7)**, se observó que la adición de Aa-O-met al complemento molecular genera un mayor grado de inestabilidad en soluciones acuosas a pH 7,4 y 10. Este nuevo segmento, permitió que los profármacos **4-7** regeneren el principio activo (**AZTreg**) con una mayor velocidad que los derivados **1-3**. Los profármacos **4-7** presentan valores de $t_{1/2}$ a pH 7,4 que van desde las 4 a las 58 h, siendo ello dependiente del largo de la cadena de espaciador incluido en el profármaco. De esta manera, para los derivados **4**, **6** y **7**, cuanto mayor es el largo de la cadena carbonada del grupo espaciador mayor estabilidad presentan los derivados. Por otra parte, también se observó una dependencia de la estabilidad química respecto del tipo de aminoácido incluido en el profármaco, siendo el $t_{1/2}$ para **AZT-Suc-Fen-O-met** significativamente inferior al de **AZT-Suc-ILeu-O-met**.

En condiciones ácidas, todos los compuestos ensayados resultaron ser estables durante el tiempo de ensayo (24 h), mientras que la velocidad de degradación aumentó notablemente cuando se sometieron a los derivados a condiciones alcalinas (pH 10), en las cuáles todos los derivados exhibieron $t_{1/2}$ inferiores a los 11 min. Este comportamiento posibilita que los profármacos en el organismo se hidrolicen principalmente por la acción de enzimas, dado que resisten de manera significativa a la hidrólisis química en prácticamente la totalidad del rango de pH fisiológico del tracto gastro intestinal.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Los estudios de degradación química de los profármacos **4-7**, presentan como único producto de degradación a **AZTreg**. Es decir, que los mismos pueden regenerar el principio activo cuando se encuentran en soluciones acuosas de *pH* 7,4.

3.2.5 Materiales y métodos

3.2.5.1 Soluciones de trabajo y soluciones *buffer*

Las soluciones madres de cada uno de los compuestos (**AZT-Suc-Fen-O-met**, **AZT-Suc-ILeu-O-met**, **AZT-Glu-Fen-O-met** y **AZT-Adi-Fen-O-met**), se prepararon pesando 10 mg de cada uno y se disolvieron en 10 mL de una mezcla ACN:MeOH (80:20), obteniéndose así una concentración de 1 mg/mL. Además, se prepararon soluciones en ACN de **AZT-Suc** y **AZT-Glu** (0,15 mg/mL), las cuales se utilizaron como estándar interno (EI) para la cuantificación de los derivados por HPLC -UV.

Para los ensayos de estabilidad se utilizaron soluciones *buffer* fosfato (0,1 M) a *pH* 2 (0,003 mg/mL H₃PO₄ 85%), *pH* 7,4 (8,63 mg/mL NaH₂PO₄; 4,70 mg/mL Na₂HPO₄) y *pH* 10 (8,63 mg/mL NaH₂PO₄). En todos los casos, se utilizaron reactivos para análisis (Anedra[®]) en agua Milli-Q, preparados el mismo día de los ensayos. El *pH* de las soluciones se determinó con un pHmetro GLP21 (Crison Instruments[®]), equipado con un electrodo de Ag/AgCl, el cual se calibró con soluciones estándar de *buffer pH* 7,00 ($\pm 0,01$) y 4,00 ($\pm 0,01$) marca Crison[®].

3.2.5.2 Ensayos de estabilidad química

Con el objetivo de estudiar la estabilidad de los compuestos **AZT-Suc-Fen-O-met**, **AZT-Suc-ILeu-O-met**, **AZT-Glu-Fen-O-met** y **AZT-Adi-Fen-O-met**, se prepararon soluciones de trabajo cuya concentración final fue de $4,7 \times 10^{-7}$ M, en *buffer* fosfato (0,1 M) *pH* 2; 7,4 y 10. Para llevar a cabo los ensayos, las soluciones de trabajo se fraccionaron en alícuotas de 2 mL cada una y se incubaron a 37°C en un baño termostatzado con agitación. A diferentes tiempos se tomaron muestras de 2 mL, a las cuales se les adicionó 80 μ L de una solución de HCl 2 M y 50 μ L de EI. Se empleó como EI AZT-Glu (0,15 mg/mL) para la cuantificación de AZT, **AZT-Suc-Fen-O-met**, **AZT-Suc-ILeu-O-met** y **AZT-Adi-Fen-O-met** y una solución de AZT-Suc (0,15 mg/mL) para la cuantificación de **AZT-Glu-Fen-O-met**.

Para los estudios realizados a *pH* 7,4, se tomaron muestras a 5, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 min, mientras que para *pH* 10, se tomaron muestras a 5, 10, 15, 20 y 30 min.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Para los ensayos de estabilidad se requirió temperatura controlada a 37 °C y agitación continua para asegurar la homogeneidad de las muestras. Para ello se empleó un baño termostatzado Vicking Masson D® con una precisión de $\pm 0,1$ °C, con agitación controlada. Las muestras fueron cuantificadas por HPLC-UV.

3.2.5.3 Preparación y cuantificación de las muestras

Las muestras se acondicionaron mediante un proceso de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés). Se utilizaron cartuchos de extracción Strata-X 30 mg, Phenomenex® y una celda de vacío Phenomenex®. La técnica consiste en el lavado de los cartuchos con 2 mL de MeOH, seguido de una etapa en la cual se equilibra la fase estacionaria con 2 mL de *buffer* fosfato (0,1 M) *pH* 2. Luego se carga de la muestra, se lava con 8 mL de una mezcla de *buffer* fosfato (0,1 M) *pH* 2 : MeOH (90:10), secado por vacío durante 1 min y por último elución del analítico con 1 mL de ACN. Finalmente, se evaporó el solvente a sequedad utilizando un concentrador Techne Sample Concentrator, Dri-Block® DB-3A. Las muestras así tratadas se almacenan a -10°C hasta el momento de análisis.

Al momento de la cuantificación, las muestras se resuspenden en 100 μ L de una mezcla *buffer* fosfato (0,1 M) *pH* 2 : MeOH 80:20. Luego se cuantificaron por HPLC-UV, utilizando los métodos validados en el *Capítulo 4*.

3.3 Estudios en plasma humano

3.3.1 Introducción

Como se mencionó anteriormente, AZT presenta una baja unión a ASH, lo cual provoca una llegada deficiente al sitio de acción, como así también un corto $t_{1/2}$ plasmático (~ 1 h). Optimizar la afinidad hacia la ASH, aumentaría la llegada del principio activo al sitio blanco y al mismo tiempo disminuiría la fracción de fármaco libre disponible para ser metabolizado, resultando en un aumento en su tiempo de permanencia en el organismo. Ésta conduciría a una disminución de la dosis del principio activo administrada a los pacientes, con la consiguiente optimización de la eficacia y seguridad terapéutica del mismo.

3.3.2 Objetivos

Teniendo en cuenta la relevancia de estudiar el comportamiento en plasma humano de los nuevos profármacos **AZT-Suc-Fen-O-met (4)**, **AZT-Suc-ILeu-O-met (5)**, **AZT-Glu-Fen-O-met (6)** y **AZT-Adi-Fen-O-met (7)**, se presentan como objetivos el estudio de su estabilidad plasmática y su unión a las proteínas presentes en este fluido. Ello permitirá conocer determinados parámetros cinéticos relevantes en el desempeño biofarmacéutico de los mismos, como así también conocer la posibilidad de regeneración de AZT a nivel plasmático.

3.3.3 Resultados y discusiones

3.3.3.1 Estabilidad en plasma humano

Se encontró que los profármacos **4-7** sufren hidrólisis en este fluido, observándose una disminución en la concentración del compuesto evaluado, presentando el siguiente orden de estabilidad: **AZT-Suc-Fen-O-met < AZT-Glu-Fen-O-met < AZT-Adi-Fen-O-met < AZT-Suc-ILeu-O-met** (Figura 3.12, Tabla 3.4 y Ecs 3.9 -3.12). Los profármacos ensayados se hidrolizaron con una velocidad dependiente de la estructura del compuesto siguiendo una cinética de pseudo primer orden, presentando valores de $t_{1/2}$ inferiores que **1-3**. Comparando los

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

profármacos **4**, **6** y **7**, es posible decir que, al aumentar la cadena carbonada del grupo *Espaciador*, los derivados presentan mayor valor de $t_{1/2}$. En el caso particular de **AZT-Suc-Ileu-O-met**, se observó una mayor estabilidad comparada a la de **AZT-Suc-Fen-O-met**. Estas dos observaciones son coincidentes a lo determinado en los estudios de estabilidad química, según lo cual se determinó que modificando la estructura del *Espaciador* y del tipo de aminoácido utilizado, es posible modular de manera muy efectiva el $t_{1/2}$ del profármaco obtenido.

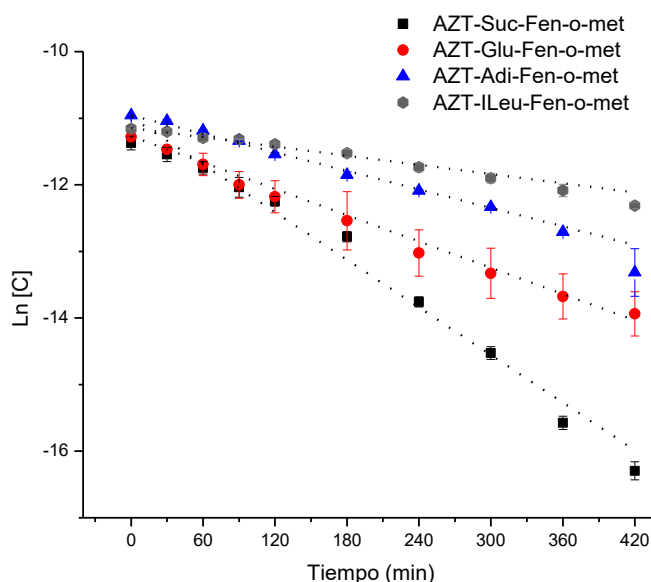


Figura 3.12. Perfiles de hidrólisis en plasma humano a 37°C. AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-Ileu-O-met, AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met.

$$\text{Ln [AZT-Suc-Fen-O-met]} = -0,011 (\pm 0,001) \text{ Tiempo (min)} -10,98 (\pm 0,05) \quad \text{Ec 3.9}$$

$$n = 10; r^2 = 0,972; ds = 0,02; F = 312,43$$

$$\text{Ln [AZT-Glu-Fen-O-met]} = -0,0079 (\pm 0,0003) \text{ Tiempo (min)} -11,29 (\pm 0,01) \quad \text{Ec 3.10}$$

$$n = 10; r^2 = 0,963 \text{ ds} = 0,01; F = 257,52$$

$$\text{Ln [AZT-Adi-Fen-O-met]} = -0,0053 (\pm 0,0005) \text{ Tiempo (min)} -10,96 (\pm 0,01) \quad \text{Ec 3.11}$$

$$n = 10; r^2 = 0,998 \text{ ds} = 0,02; F = 293,4813,42$$

$$\text{Ln [AZT-Suc-Ileu-O-met]} = -0,0027 (\pm 0,004) \text{ Tiempo (min)} -11,15 (\pm 0,01) \quad \text{Ec 3.12}$$

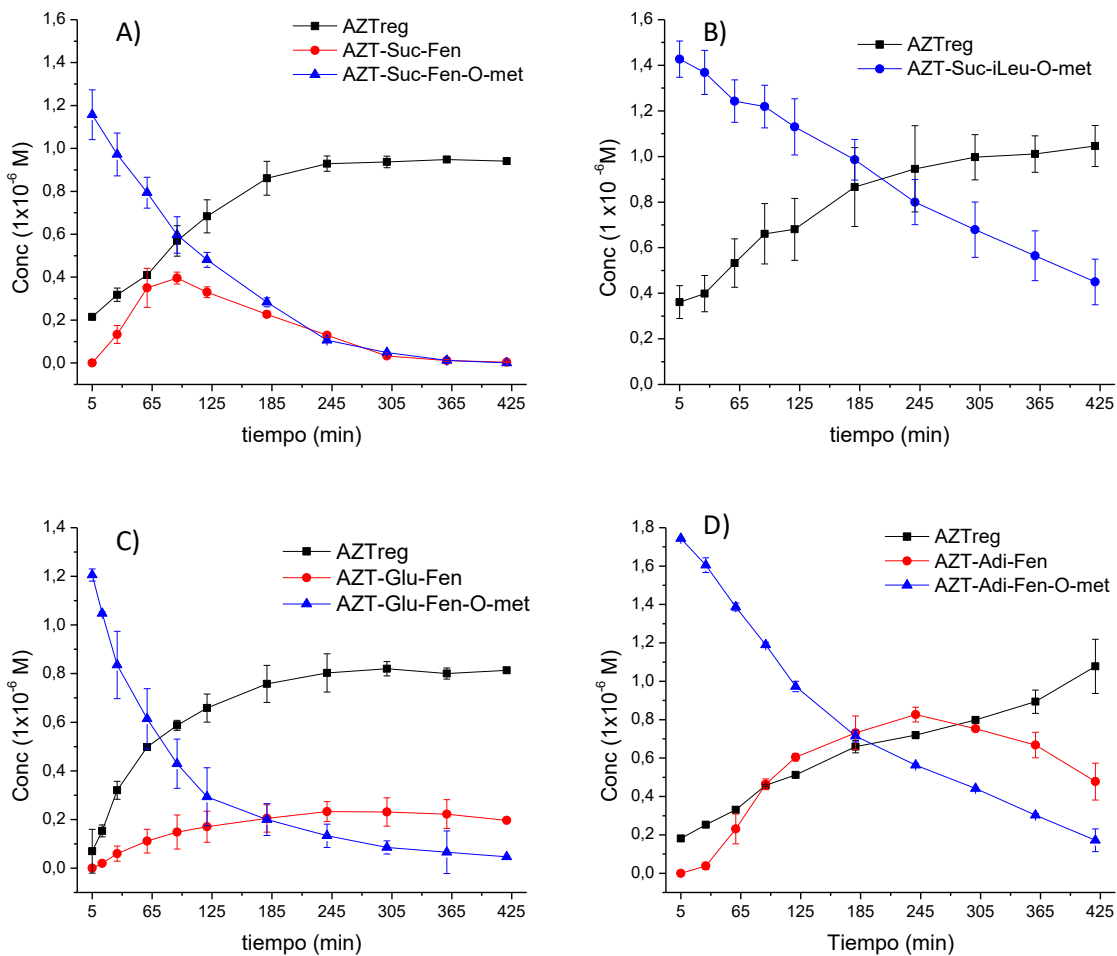
$$n = 10; r^2 = 0,957; ds = 0,01; F = 200,33$$

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Tabla 3.4. Constantes de velocidad de hidrólisis observadas (k_{obs}) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) para AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met, AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met en plasma humano 37°C; 24 h.

Profármaco	Plasma humano	
	k_{obs} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
AZT-Suc-Fen-O-met (4)	$0,011 \pm 0,001$	$61,6 \pm 2,2$
AZT-Glu Fen-O-met (6)	$0,0079 \pm 0,003$	$88,2 \pm 3,4$
AZT-Adi Fen-O-met (7)	$0,0053 \pm 0,0005$	$125,1 \pm 10,9$
AZT-Suc-ILeu-O-met (5)	$0,0027 \pm 0,0004$	$253,7 \pm 5,3$

En la figura 3.13 se presentan los perfiles de estabilidad plasmática para 4-7, en los cuales se observan la desaparición del profármaco en estudio, como así también la aparición de sus productos de degradación.



Figuras 3.13. Perfiles de concentración vs tiempo para la hidrólisis de AZT-Suc-Fen-O-met, B) AZT-Suc-ILeu-O-met, C) AZT-Glu-Fen-O-met y D) AZT-Adi-Fen-O-met en plasma humano a 37°C; 24 h.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Analizando los perfiles de estabilidad plasmática para **4**, **6** y **7** (Figura 3.12. A, C y D), se observa que estos profármacos se degradan generando el derivado demetilado (*AZT-Espaciador-Aa*) y **AZTreg**, por hidrólisis de las uniones tipo éster presente en los profármacos. En cambio, para *AZT-Suc-ILeu-O-met* (Figura 3.12. B), se observó como único producto de degradación a **AZTreg**, lo cual se podría atribuir a que las esterasas plasmáticas no pueden demetilar al profármaco **5**. La ausencia del producto de degradación correspondiente al *AZT-Espaciador*, indica que las enzimas plasmáticas no son capaces de hidrolizar los enlaces amidas presentes en los profármacos **4-7**. En los perfiles de degradación presentados en la Figura 3.13, se observa la presencia de especies de AZT con el 5'-OH protegido, durante casi todo el tiempo que dura el ensayo, lo cual es un indicio de que los profármacos estudiados podrían disminuir el metabolismo a nivel hepático que presenta AZT.

3.3.3.2 Unión a proteínas plasmáticas

Se evaluó la afinidad de los profármacos **4-7** por las proteínas plasmáticas, en iguales condiciones que para **1-3**. En estos estudios se pudo determinar que **4-7** presentan una afinidad de 4 a 6 veces mayor a la de AZT (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Porcentaje de unión de AZT, *AZT-Suc-Fen-O-met*, *AZT-Suc-ILeu-O-met*, *AZT-Glu-Fen-O-met* y *AZT-Adi-Fen-O-met* por las proteínas plasmáticas en estado puro (PP), en presencia de ácido salicílico (PP + SAL) y con diazepam (PP + DZP)

<i>Derivado</i>	<i>PP (%)</i>	<i>PP + SAL (%)</i>	<i>PP + DZP (%)</i>
<i>AZT</i>	13,1(±1,3)	2,5 (±1,8)	nd
<i>AZT-Suc-Fen-O-met (4)</i>	52,1(±5,3)	51,2 (±3,2)	37,8 (±1,4)
<i>AZT-Suc-ILeu-O-met (5)</i>	50,5(±1,3)	45,5(±2,8)	23,5(±7,2)
<i>AZT-Glu-Fen-O-met (6)</i>	57,7 (±4,3)	61,5 (±2,5)	50,6 (±5,9)
<i>AZT-Adi-Fen-O-met (7)</i>	72,5 (±4,3)	72,8 (±3,2)	48,8 (±4,6)

nd: no determinado.

Ordenando a los derivados según su afinidad por las proteínas plasmáticas, se encuentra que *AZT-Suc-Fen-O-met* = *AZT-Suc-ILeu-O-met* < *AZT-Glu-Fen-O-met* < *AZT-Adi-Fen-O-met*, observándose un aumento en la afinidad al aumentar el largo de la cadena del *Espaciador*. Al comparar los valores de unión por las proteínas plasmáticas de los profármacos **1-3** (Tabla

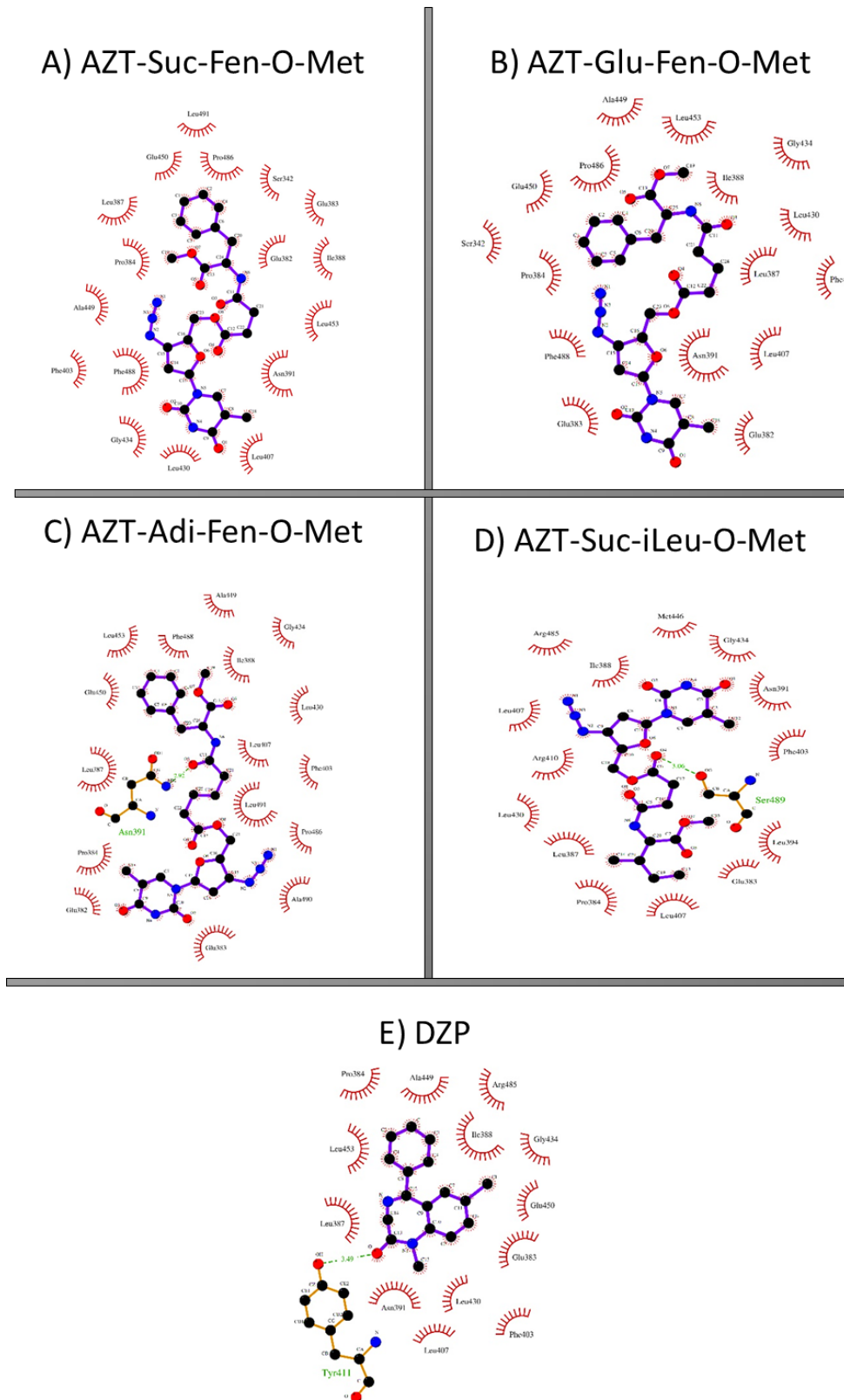
3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

2.6) con los de **4-7** (tabla 3.5), se observa que la adición de Aa-O-met como complemento molecular, aumenta considerablemente la afinidad por dichas proteínas.

Se realizaron ensayos de desplazamiento para determinar si los profármacos **4-7** se unen al sitio I de la ASH de igual forma que AZT y **1-3** (Tabla 2.6). En los ensayos de unión con SAL, no se observó una disminución significativa en las fracciones de profármaco unido, lo cual indica que los derivados *AZT-Espaciador-Aa-O-met* no se unen al sitio I de la ASH (Tabla 3.5). Por esta razón, se realizaron los estudios utilizando DZP, el cual es un marcador del sitio II ($K_a=3.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)⁹⁴. En estos estudios se observó una disminución en la afinidad de los derivados por las proteínas plasmáticas, indicando que **4-7** se unen a la ASH en el sitio II (Tabla 3.5). Dicha disminución es moderada, lo cual es consistente con la afinidad elevada por este sitio II que presentan los nuevos profármacos (Tabla 3.5).

Para comprender con mayor detalle el modo de unión de los profármacos **4-7** por el sitio II de la ASH, se realizaron estudios computacionales empleando técnicas de modelado molecular. Cuando se acoplaron en el sitio II los profármacos **4, 6 y 7** (Figura 3.14), se observó que ubican el Aa-O-met en el interior de la cavidad (Figuras 3.14 A, B y C), mientras que el resto de la molécula (*AZT-Espaciador*) está orientado hacia la entrada de la misma, la cual presenta características polares. Sobre la base de este modo de unión, los profármacos establecen interacciones intermoleculares con Glu383, Pro384, Leu387, ILeu388, Asn391, Fen403, Leu407, Tyr411, Leu430, Gly434, Ala449, Glu450, Leu453 y Arg485. Para el caso particular de *AZT-Adi-Fen-O-met*, parte del complemento molecular se ubica fuera del sitio de unión, quedando expuesto al solvente (Figura 3.14.C). En cambio, el profármaco *AZT-Suc-ILeu-O-met* (Figura 3.14 D), interacciona con Pro384, Leu387, ILeu388, Asn 391, Leu 394, Leu407 y Ser 489, ubicándose de forma invertida, es decir que hacia el interior de la cavidad se encuentra el *AZT-Espaciador* y el resto del complemento molecular, mientras que la porción correspondiente al fragmento ILeu-O-met interacciona con los residuos que conforman la entrada de la cavidad.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met



Figuras 3.14. Modelo de interacción de A) AZT-Suc-Fen-O-met, B) AZT-Glu-Fen-O-met y C) AZT-Adi-Fen-O-met D) AZT-Suc-iLeu-O-met, y E) DZP, en el sitio II de la ASH.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

La Tabla 3.6 presenta el análisis de energía libre de unión de molecular *Molecular mechanics Generalized Born surface area* MMGBSA por residuo para la unión de **4-7** y DZP al sitio II.

Tabla 3.6. Análisis de descomposición de energía libre (kcal/mol) por *Molecular mechanics Generalized Born surface area* (MMGBSA) de AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met, AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met en el sitio de unión II de la ASH.

Residuos	DZP	4	5	6	7
Ser342	-	-1,14	-	-1,10	-
Glu382	-	-0,18	-	-0,12	-0,72
Glu383	-0,35	-1,80	-0,62	-1,16	-4,11
Pro384	-0,69	-0,51	-1,07	-1,04	-0,82
Leu387	-2,16	-1,89	-1,41	-1,11	-3,84
Ile388	-2,93	-2,10	2,43	-1,61	-2,46
Asn391	-0,87	0,96	-1,83	0,68	-0,34
Leu394	-	-	-1,33	-	-
Fen403	-0,44	-0,53	-0,91	-0,76	-0,25
Leu407	-0,60	-0,56	-1,10	-1,06	-0,19
Arg410	-	-	0,96	-	-
Leu430	-0,68	-0,64	-0,29	-1,73	-1,08
Gly434	-0,37	-0,46	-0,38	-0,83	-0,54
Met446	-	-	-0,12	-	-
Ala449	-0,81	-0,33	-0,38	-0,14	-0,41
Glu450	-0,54	-1,60	-0,26	-1,44	-0,40
Leu453	-1,12	-1,41	-0,89	-1,79	-1,35
Arg485	-0,62	-	-	-	-
Pro486	-	-0,10	-0,18	-0,10	-0,59
Fen488	-	-0,71	-0,11	-0,72	-0,18
Ser489	-	-	-0,41	-	-
Ala490	-	-	-	-	-1,35
Leu491	-	-0,25	-0,13	-0,10	-0,63
ΔG_{sum}^a	-12,26	-13,22	-12,86	-14,13	-19,26

^aSuma total de todas las interacciones

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

A partir de la Tabla 3.6 se puede observar que DZP y los profármacos **4-7** comparten varios puntos de interacción con ASH, lo que es consistente con los desplazamientos obtenidos en estudios experimentales. La suma de las energías de interacción (ΔG_{sum}) calculadas para *AZT-Suc-Fen-O-met*, *AZT-Suc-ILeu-O-met*, *AZT-Glu-Fen-O-met* y *AZT-Adi-Fen-O-met*, se correlacionan con los datos experimentales, observándose para el derivado *AZT-Adi-Fen-O-met* la energía de interacción más alta y la mayor fracción de profármaco unido. Es notable que las energías de interacción calculadas para los profármacos **4-7** sean mayores a las de DZP, lo cual es consistente con la capacidad limitada de este último para desplazar a los profármacos unidos al sitio II (Tablas 3.5 y 3.6).

Para complementar estos estudios teóricos, se estudiaron las bases moleculares asociadas a la imposibilidad de los profármacos **4-7** de unirse al sitio I de ASH, realizando estudios de *docking* molecular a dicho sitio y calculando las eventuales energías de interacción (Tabla 3.7). Los resultados demuestran que los profármacos de AZT no establecen interacciones favorables con los residuos que conforman la cavidad del sitio I, obteniéndose valores de ΔG_{sum} positivos, indicando un modo de unión desfavorable para *AZT-Suc-Fen-O-met*, *AZT-Suc-ILeu-O-met*, *AZT-Glu-Fen-O-met* y *AZT-Adi-Fen-O-met*. Estos valores de ΔG_{sum} se deben fundamentalmente a que los profármacos **4-7** presentan energías de repulsión con Arg257, lo que coincide con los hallazgos experimentales, en los cuales no se observa una disminución de la afinidad de los profármacos en presencia de SAL.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Tabla 3.7. Análisis de descomposición de energía libre (kcal/mol) por Molecular mechanics Generalized Born surface area (MMGBSA) de AZT-Suc-Fen-O-met (4), AZT-Suc-ILeu-O-met (5), AZT-Glu-Fen-O-met (6) y AZT-Adi-Fen-O-met (7) en el sitio de unión I de la ASH.

Residuos	4	5	6	7
Tyr150	-1,97	-1,31	-3,60	-2,21
^a Ser192	-0,71	-0,74	-1,17	-0,78
Lys195	1,97	3,69	1,26	0,93
Gln196	-0,74	-0,79	0,61	-1,15
Lys199	3,29	1,22	1,16	3,53
Val241	-0,21	-0,18	0,17	-0,28
Cys245	-0,39	-0,27	-0,62	-0,85
Arg257	4,65	4,25	7,19	5,02
Ser287	-0,54	-0,53	-0,54	-0,62
His288	-0,16	-0,41	0,13	-0,66
Ala291	-1,32	-1,24	-1,15	-0,43
ΔG_{sum}^a	3,88	3,71	3,43	2,51

^aSuma total de todas las interacciones

3.3.4 Conclusiones parciales

De los ensayos de estabilidad en plasma humano, se encontró que los profármacos evaluados son susceptibles a hidrólisis, presentando los siguientes valores de $t_{1/2}$ de 61,6; 88,2; 125,1 y 2537,7 min, para *AZT-Suc-Fen-O-met* (4), *AZT-Suc-ILeu-O-met* (5), *AZT-Glu-Fen-O-met* (6) y *AZT-Adi-Fen-O-met* (7), respectivamente. Ésto demuestra que los profármacos con estructura *AZT-Espaciador-Aa-O-met* se hidrolizan con una velocidad mayor que **1-3**, es decir que adicionar Aa-O-met al complemento molecular permitió obtener profármacos que promueven la reconversión del fármaco activo. También se pudo determinar que los profármacos **4**, **6** y **7** sufren hidrólisis en las dos uniones tipo éster, obteniéndose como productos de degradación *AZT-Espaciador-Fen* y **AZTreg**. Por otra parte, para el profármaco **5** sólo se observó la regeneración del principio activo, sugiriendo que las enzimas plasmáticas no pueden demetilar a este profármaco.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Los estudios de unión a proteínas plasmáticas, mostraron un fuerte aumento de la fracción unida de los *AZT-Espaciador-Aa-O-met*, si se lo compara tanto con AZT (entre 4 y 6 veces más), como así también con los derivados *AZT-Espaciador* evaluados en el capítulo anterior. El porcentaje de unión depende de la estructura de los derivados, observándose que, al aumentar el largo de la cadena del espaciador, aumenta la afinidad por las proteínas plasmáticas. En cuanto a los ensayos de desplazamiento, se determinó que **4-7** no son desplazados por SAL, es decir no presentan afinidad por el sitio I de la ASH, pero si son desplazados parcialmente por DZP, indicando que se unen al sitio II de la ASH. El cambio en el sitio de unión, tendría beneficios en el perfil biofarmacéuticos, ya que tras la bioactivación y la regeneración de AZT en los fluidos corporales, no tendrá lugar un desplazamiento competitivo entre los profármacos **4-7** y el principio activo. Para comprender en mayor detalle este hallazgo, se realizaron estudios computacionales de unión a ASH, en los cuales se determinó que los profármacos **4-7** presentan un patrón de interacción similar al de DZP y diferente al de SAL, lo cual explica la evidencia observada de forma experimental.

Sobre la base de los estudios realizados en esta sección, se puede concluir que la adición de Aa-O-met al complemento molecular, le confiere un tiempo de regeneración plasmática de AZT compatible con los procesos fisiológicos, un aumento notable en la fracción unida a proteínas plasmáticas, un cambio en la selectividad del sitio de unión en la ASH y una posible disminución de la tasa metabólica que sufre el principio activo al presentar el 5'-OH protegido. Por esto, es de esperar que con estos profármacos se logren mejoras importantes en las propiedades biofarmacéuticas del AZT, alentando a continuar con los estudios de permeabilidad intestinal.

3.3.5 Materiales y métodos

3.3.5.1 Soluciones de trabajo y soluciones buffer

Se prepararon soluciones madres de cada uno de los compuestos (**AZT-Suc-Fen-O-met**, **AZT-Suc-Ileu-O-met**, **AZT-Glu-Fen-O-met** y **AZT-Adi-Fen-O-met**), de 10 mg/mL y 1 mg/mL en DMSO. Además, se prepararon soluciones en ACN de AZT-Suc y AZT-Glu (0,15 mg/mL), las cuales se utilizaron como estándar interno (EI), para la cuantificación de los derivados por HPLC-UV. El plasma humano fue generosamente donado por el *Instituto de Hematología, Hemoterapia y Banco de Sangre*, de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina y almacenado a -80 °C. Para su utilización fue descongelado en baño de agua fría y

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

luego filtrado por gravedad sobre lana de vidrio para eliminar las posibles proteínas desnaturalizadas e impurezas producidas durante procedimiento de almacenamiento y descongelado. Previo a los ensayos, se determinó la concentración de proteínas totales y de ASH utilizando el *kit* comercial Proti 2, Weiner lab®, Boston, MA. Para todas las muestras utilizadas se determinó la concentración de proteínas totales, encontrando que el mismo fue de 55 -58 g/L, mientras que para la ASH el rango fue de 36-41 g/L. Estos valores fueron determinados durante el desarrollo de los procedimientos y verificados en todos los lotes de plasma humano empleados. Se utilizó SAL como marcador del sitio de unión I y DZP como marcador del sitio II, para lo cual se prepararon soluciones en DMSO de concentración de 1 mg/mL, para ambos compuestos.

3.3.5.2 Estabilidad en plasma humano

La estabilidad plasmática de los profármacos se evaluó incubando soluciones de los mismos en 2 mL de plasma humano con una concentración final de $5,5 \times 10^{-4}$ M para cada profármaco, termostatzado a 37 °C durante 7 h en un baño con agitación continua. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (5, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 min). Los procedimientos de cuantificación se llevaron a cabo mediante HPLC-UV, realizando por triplicado los ensayos.

3.3.5.3 Unión a proteínas plasmáticas

La unión a proteínas plasmáticas se evaluó utilizando la técnica de ultrafiltración para separar el fármaco libre del unido a proteínas. A partir de las soluciones madres de cada uno de los derivados (1 mg/mL), se prepararon soluciones *stock* en *buffer* fosfato (0,1 M) *pH* 7,4 para obtener una concentración de trabajo de 0,01 mg/mL. De esta última solución, se tomaron 600 µL y se adicionó 600 µL de plasma (solución de trabajo) o 600 µL de *buffer* fosfato (0,1 M) *pH* 7,4 para referencia (muestra 100 %). Las soluciones resultantes se incubaron a 37°C durante 10 min en un baño termostatzado con agitación. Luego se tomó 1 mL de cada muestra y se lo colocó en el dispositivo de ultrafiltración (Centrifree®UF, Millipore) equipado con una membrana Ultracel YM-T (cut-off 30000 Da) y se lo sometió a centrifugación a 2000 rpm durante 5 min.

Para el desarrollo de esta técnica, se estudiaron diversos factores que pueden afectar el equilibrio de unión, entre los que se encuentran la adsorción de los derivados sobre la membrana

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

de filtración, el tiempo y la velocidad de centrifugación y la densidad de la muestra a utilizar. El tiempo y la velocidad de centrifugación son dos factores relevantes para no provocar un desplazamiento del equilibrio de unión fármaco-proteína, al separar la fracción libre de fármaco de la fracción unida a las mismas. Las condiciones experimentales finales involucraron una relación (1:1), plasma humano : *buffer* fosfato (0,1 M) *pH* 7,4, centrifugado a 2000 rpm por 5 min. Empleando dicho procedimiento, se obtuvieron 200 μ L de ultrafiltrado para su posterior cuantificación por HPLC-UV, sin provocar un desplazamiento del equilibrio de unión.

La cantidad de fracción unida (*fu*) para cada derivado se calculan como porcentaje, utilizando la Ec. 2.11

$$fu = 100 - ((A_M / A_{100\%}) \times 100) \quad \text{Ec 2.11}$$

en donde, A_M : Área de la muestra, $A_{100\%}$: Área muestra 100% y *fu*: Fracción unida.

Estos ensayos se realizaron por duplicado para cada uno de los compuestos. Cada ensayo consta de 1 muestra de 100% y 3 muestras de unión a PP, preparadas a partir de la misma solución del derivado y tratadas en forma paralela. De todos los ensayos ($n = 6$) se calcula el promedio de los resultados con su correspondiente desviación estándar.

En los ensayos de desplazamiento, se utilizaron como marcadores el ácido salicílico (SAL), el cual se conoce que se une con gran afinidad al sitio I (unión a ASH 95%) y diazepam (DZP) como marcador del sitio II^{56,102}.

3.3.5.4 Estudios computacionales de unión a ASH

Los estudios computacionales se realizaron en colaboración con el Dr. Sergio R. Ribone, investigador de UNITEFA-CONICET, en el departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

Los procedimientos de *docking molecular* se realizaron utilizando *software* desarrollado por OpenEye Scientific Software¹⁰⁵. Se empleó una estrategia de *docking* rígido exhaustivo, el cual se ejecutó a partir de dos etapas secuenciales: 1) una etapa de generación de librerías de confórmers de los ligandos, aplicando una barrera energética de 10 kcal/mol y utilizando el *software* OMEGA 2.4.3¹⁰⁶, 2) los ensayos de *docking*, se realizaron utilizando el método rígido y exhaustivo implementado en el *software* FRED¹⁰⁷. En este caso, se utilizó la función de puntuación *ChemGauss3* para evaluar y clasificar las posiciones de *docking*. Para

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

conocer los potenciales modos de unión de los profármacos a la ASH, se seleccionaron las posiciones de *docking* de menor energía.

Teniendo en cuenta que el complejo cristalográfico de ASH complejada con Myr y DZP no está disponible, se lo construyó superponiendo la estructura correspondiente al complejo cristalográfico entre ASH pura y DZP (código PDB: 2BXF)⁹¹ con la estructura cristalina de HSA conteniendo Myr (código PDB: 1E7G)¹⁵⁶. De esta forma, las coordenadas del DZP en el complejo con ASH pura fueron copiadas sobre la estructura de ASH complejada con ácido grasos, generando así el complejo cristalográfico de ASH complejada con Myr y DZP.

En base a los complejos ligando-ASH obtenidos mediante *docking molecular*, se calculó la energía de interacción utilizando el *script* MMPBSA.py¹⁰⁸ implementado en AMBER17¹⁰⁹. Se utilizaron los campos de fuerza *ff14SB* y GAFF¹¹⁰ para parametrizar a la ASH y al ligando, respectivamente. Se calculó la energía de unión, teniendo en cuenta las energías de solvatación de las moléculas, además de las energías de la mecánica molecular (MM). La contribución de las energías de solvatación polar se calculó utilizando el modelo de disolvente implícito Born generalizado (GB), mientras que la contribución no polar a la energía de solvatación se calculó en función del área superficial accesible al disolvente (SASA)¹¹¹. Las interacciones intermoleculares se calcularon y representaron usando los *software* VMD v.1.9.3. y LigPlot + v.1.4.5^{112,113}

Para identificar los residuos con los cuales interacciona el ligando, se filtraron los que presentan una mayor interacción al realizar la descomposición. La suma de las energías de interacción con los residuos correspondientes, se correlacionó posteriormente con los resultados experimentales de unión a ASH.

3.4 Estudios de permeabilidad intestinal

3.4.1 Introducción

Uno de los aspectos biofarmacéuticos que se busca mejorar con la generación de profármacos de AZT es la biodisponibilidad oral, con el objetivo de aumentar la concentración en circulación sistémica y por consecuencia, disminuir la dosis de fármaco administrado a los pacientes en la terapia antiviral. Los profármacos *AZT-Espaciador-Aa-O-met*, fueron diseñados con el objetivo de que sean reconocidos por los transportadores de péptidos (PEPT-1, por sus siglas en inglés) presentes en los enterocitos¹⁵⁷. Este transportador promueve la absorción de aminoácidos y de pequeños péptidos, facilitando el pasaje desde el lumen intestinal hacia circulación sanguínea, y está presente en el lado apical del enterocito¹⁴⁵. Estos profármacos, también se desarrollaron con el objetivo de disminuir la variabilidad en la biodisponibilidad provocada principalmente por la acción de la *P-gp* a nivel intestinal, como se mencionó anteriormente en la Sección 2.4.

Otro aspecto importante a evaluar, es el perfil de estabilidad de los profármacos cuando están en contacto con el tejido intestinal, debido a que en el mismo se expresan carboxilesterasas, tanto en la mucosa intestinal como en el interior celular, las cuales pueden hidrolizar diferentes clases de uniones como las tipo éster, amida o carbamato^{40,122}. A nivel intestinal también se encuentran enzimas degradativas de péptidos como las amidasas, las cuales hidrolizan las uniones tipo amida y se ubican en el interior de los enterocitos, como así también en la membrana apical de los mismos.

3.4.2 Objetivos

En base a los resultados prometedores de unión a proteínas plasmáticas para *AZT-Suc-Fen-O-met (4)*, *AZT-Suc-ILeu-O-met (5)*, *AZT-Glu-Fen-O-met (6)* y *AZT-Adi-Fen-O-met (7)*, se plantea evaluar la permeabilidad y la estabilidad de los compuestos durante el paso por la membrana intestinal. De esta manera, se puede determinar si estos profármacos pueden, ser reconocidos por transportadores que favorezcan su absorción y si los mismos sufren fenómenos de eflujo. Asimismo, resulta relevante evaluar si los profármacos en desarrollo pueden atravesar

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

el epitelio intestinal como tales (sin ser metabolizados) o como alguna especie que presente el 5'-OH del AZT protegido.

3.4.3 Resultados y discusiones

Se evaluó la permeabilidad intestinal de los profármacos **4-7** de manera similar a lo realizado para **1-3**, utilizando la técnica del saco intestinal evertido de ratas, descrita en la Sección 2.4. Se utilizó yeyuno proximal como segmento intestinal y se evaluaron dos concentraciones de profármaco $0,5 \times 10^{-3}$ M y $1,0 \times 10^{-3}$ M, como así también el efecto de la inhibición de las proteínas de eflujo en la permeabilidad ($1,0 \times 10^{-3}$ M+ VER). Debido a que los profármacos presentan tres centros de hidrólisis (Figura 3.8) y a la presencia de enzimas degradativas presentes en el glicocalix que recubre las microvellosidades del intestino, se evaluó de manera simultánea durante el ensayo de permeabilidad, la estabilidad de los profármacos en la solución mucosal. De esta forma se determinó el comportamiento de los profármacos **4 – 7** en la solución mucosal, y se lo correlacionó con los moles permeados en la solución serosal.

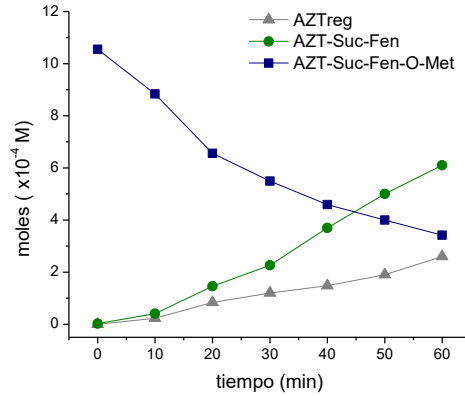
3.4.3.1 Estabilidad química de los profármacos 4-7 en TC199

Previo a los estudios de permeabilidad intestinal, fue necesario determinar la estabilidad química de *AZT-Suc-Fen-O-met*, *AZT-Suc-ILeu-O-met*, *AZT-Glu-Fen-O-met* y *AZT-Adi-Fen-O-met*, en TC199 sin la presencia del segmento intestinal. Se aplicó la misma metodología utilizada en los ensayos de permeabilidad, utilizando la solución mucosal de mayor concentración ($1,0 \times 10^{-3}$ M). De este estudio, se determinó que los profármacos **4-7** son estables en la solución mucosal durante el tiempo evaluado, por lo cual se puede atribuir todo el proceso hidrolítico que puedan sufrir durante el ensayo a las enzimas presentes en el tejido intestinal.

3.4.3.2 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Suc-Fen-O-met (4)

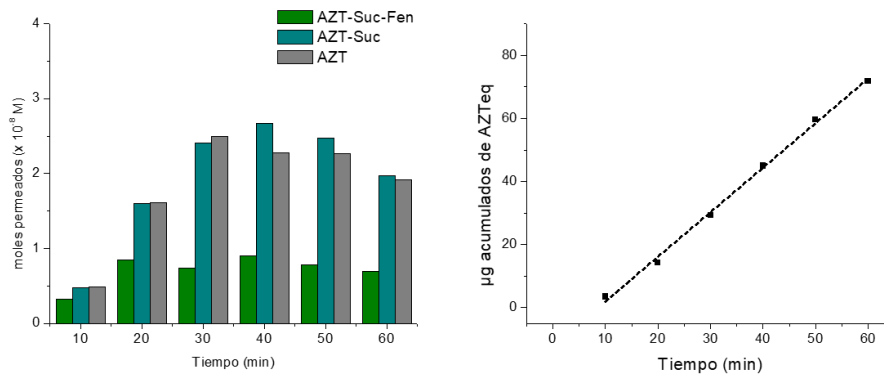
Teniendo en cuenta la presencia de enzimas degradativas en los segmentos intestinales utilizados, se realizaron estudios de estabilidad en la solución mucosal en presencia del tejido intestinal. Se observó que **AZT-Suc-Fen-O-met** es hidrolizado en un 68% durante el tiempo que dura el ensayo, obteniéndose como productos de degradación al derivado demetilado **AZT-Suc-Fen** y a **AZTreg** (Figura 3.15). Por otra parte, no se detecta la presencia del **AZT-Suc**, es decir que en la solución mucosal sólo se produce la hidrólisis de las uniones tipo éster.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met



Figuras 3.15. Estudio de estabilidad en la solución mucosal para AZT-Suc-Fen-O-met (4).

Se continuó con los ensayos de permeabilidad intestinal y debido al perfil de estabilidad que presenta **4**, se evaluó la permeabilidad del profármaco, como así también de los posibles productos de degradación. Como se puede observar en la Figura 3.16.A, en la solución serosal no se detecta la presencia del profármaco intacto, pero si **AZT-Suc-Fen**, **AZT-Suc** y **AZTreg**. Relacionando este estudio con el perfil de estabilidad (Figura 3.15), se puede decir que el **AZT-Suc** detectado en la solución serosal es producido durante el pasaje del profármaco y/o sus metabolitos por la membrana intestinal, ya que en la solución mucosal no se produce la ruptura de la unión amida.



Figuras 3.16. Estudio de permeabilidad intestinal de AZT-Suc-Fen-O-met (1 x 10⁻³ M).

A) Moles permeados vs tiempo, B) µg acumulados de AZTreg vs tiempo.

$$\mu\text{g acumulados AZTreg} = 1,41 (\pm 0,04) \text{ Tiempo (min)} - 12,2 (\pm 1,3)$$

Ec 3.13

$$n = 6; r^2 = 0,996; ds = 0,002; F = 1633,02$$

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Teniendo en cuenta que el profármaco **4** no puede atravesar el tejido intestinal como tal, se determinaron los moles de AZT equivalentes (**AZTeq**), los cuales están conformados por los moles de **AZT-Suc-Fen**, **AZT-Suc** y **AZTreg** detectados en la solución serosal. A partir de los moles de **AZTeq**, se calcularon los μg acumulados y se los graficó en función del tiempo (Figura 3.16.B). Los valores encontrados de F (Ec 3.13) y de P_{app} fueron $1,4 \mu\text{g}/\text{min}$ ($\pm 0,1$) y $1,9 \times 10^{-4}$ ($\pm 0,2$) cm/min , respectivamente. El P_{app} es estadísticamente inferior al de AZT como tal, indicando que la biodisponibilidad global de AZT a partir del profármaco es inferior a la del principio activo. Sin embargo, algunas de las especies que atraviesan el tejido intestinal presentan, el 5'-OH del AZT protegido, imposibilitando así su metabolización hepática, por lo cual podrían presentar una mayor llegada a circulación sistémica que AZT como tal.

Para evaluar si el pasaje a través del tejido intestinal del profármaco y sus metabolitos ocurre por transporte activo o pasivo, se compararon los P_{app} promedio obtenidos para las dos concentraciones evaluadas (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Valores de F y P_{app} para AZT-Suc-Fen-O-met, calculados como AZTeq, ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $0,5 \times 10^{-3} \text{ M}$)

<i>Derivado</i>	<i>Concentración</i> ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<i>F</i> ($\mu\text{g}/\text{min}$)	<i>P_{app}</i> ($\times 10^{-4} \text{ cm}/\text{min}$)
<i>AZTeq</i>	$0,5 \times 10^{-3} \text{ M}$	$0,4 (\pm 0,1)$	$1,3 (\pm 0,1)$
	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,3 (\pm 0,1)$	$1,9 (\pm 0,2)$

Los coeficientes calculados indican que al disminuir la concentración del profármaco en la solución mucosal disminuye el P_{app} , evidenciando que la permeabilidad depende de la concentración, es decir que la permeabilidad intestinal del profármaco y/o sus metabolitos se produce a través de un mecanismo facilitado involucrando un transportador.

Por último, se evaluó la permeabilidad de **AZT-Suc-Fen-O-met** en presencia de VER, para evaluar el efecto de la inhibición de las proteínas de eflujo durante su pasaje por la membrana intestinal (Tabla 3.9).

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

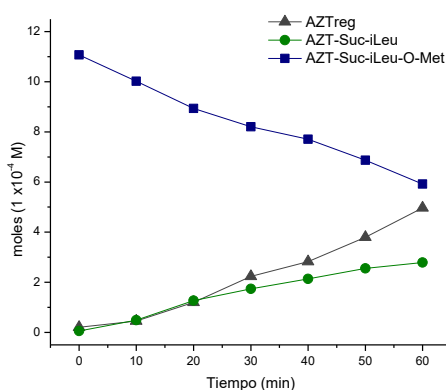
Tabla 3.9. Valores de F y P_{app} para AZT-Suc-Fen-O-me ($1,0 \times 10^{-3} M$), calculados como AZTeq, en presencia y ausencia de VER.

<i>Derivado</i>	<i>Concentración</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>F</i> ($\mu\text{g/min}$)	<i>P_{app}</i> ($\times 10^{-4} \text{cm/min}$)
<i>AZTeq</i>	$1,0 \times 10^{-3} M$	1,3 ($\pm 0,1$)	1,9 ($\pm 0,2$)
	$1,0 \times 10^{-3} M + \text{VER}$	0,9 ($\pm 0,2$)	1,8 ($\pm 0,3$)

Se obtuvo un valor de P_{app} promedio de $1,8 (\pm 0,4) \times 10^{-4} \text{cm/min}$ (Tabla 3.9), el cual no presenta una diferencia estadísticamente significativa con el ensayo realizado a la misma concentración sin la inhibición de las proteínas de eflujo. Ello demuestra que la permeación a partir de distintas especies provenientes del profármaco, no se ve afectada por la presencia de proteínas de eflujo.

3.4.3.3 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Suc-ILeu-O-met (5)

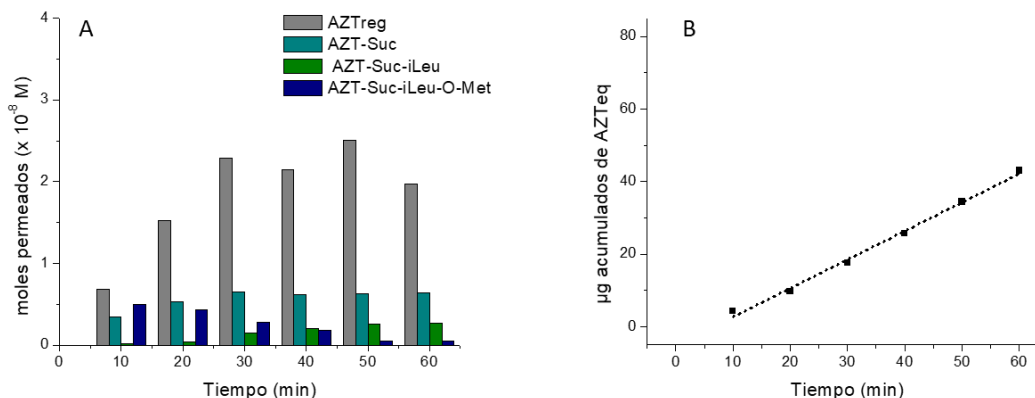
Durante los ensayos de estabilidad del profármaco **5** en la solución mucosal (Figura 3.17), se observó que la cantidad de profármaco en esta solución disminuye a medida que transcurre el experimento, determinándose un 53% de la concentración inicial del mismo al terminar el ensayo. En la Figura 3.17 se muestra el perfil de degradación, en el cual se puede observar que en la solución mucosal se detectaron dos productos de degradación **AZT-Suc-ILeu** y **AZTreg**.



Figuras 3.17. Estudio de estabilidad en la solución mucosal para AZT-Suc-ILeu-O-met (5).

Se evaluó la permeabilidad intestinal de **AZT-Suc-ILeu-O-met** (Figura 3.18) utilizando la misma concentración que en los estudios de estabilidad detallados anteriormente.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met



Figuras 3.18. Estudio de permeabilidad intestinal de AZT-Suc-ILeu-O-met (1×10^{-3} M).

A) Moles permeadas vs tiempo, B) μg acumulados de AZTeq vs tiempo.

$$\mu\text{g acumulados AZTeq} = 0,79 (\pm 0,03) \text{ Tiempo} - 5,2 (\pm 1,1). \quad \text{Ec 3.14}$$

$$n = 6; r^2 = 0,997; ds = 0,001; F = 2309,92$$

En la solución serosal (Figura 3.18.A) se detectó la presencia de **AZTreg**, **AZT-Suc** y pequeñas cantidades de **AZT-Suc-iLeu** y de **AZT-Suc-iLeu-O-met**, indicando que el profármaco **5** si puede atravesar el epitelio intestinal. La cantidad de moles de **AZT-Suc-iLeu** que pueden atravesar el tejido intestinal aumenta conforme aumenta su concentración en la solución mucosal, sugiriendo un reconocimiento por transportadores a nivel intestinal. Teniendo en cuenta todas las especies que se detectaron en la solución serosal, se calcularon los moles de **AZTeq** y a partir de éstos, se determinaron los parámetros de interés. Se obtuvo un valor de F de $0,8 (\pm 0,1) \mu\text{g}/\text{min}$ y un P_{app} de $1,2 (\pm 0,1) \text{ cm}/\text{min}$ (Figura 3.18.B, Tabla 3.10 y Ec. 3.14), observando que la suma de todas las especies que pueden atravesar el epitelio intestinal, origina un P_{app} estadísticamente inferior al de AZT.

De igual manera se analizaron los ensayos realizados a una concentración de $0,5 \times 10^{-3}$ M. Al comparar los valores de P_{app} obtenidos para las dos concentraciones ensayadas, se observó un incremento en el valor del coeficiente de permeabilidad conforme aumenta la concentración en la solución mucosal, evidenciando un proceso de transporte facilitado (Tabla 3.10).

Por otro lado, al inhibir las proteínas de eflujo con VER no se observó un aumento significativo del valor del P_{app} , siendo este coeficiente estadísticamente equivalente al de los ensayos realizados sin la presencia del inhibidor. De esta manera, se demostró que la permeación de las diferentes especies que pueden atravesar el epitelio intestinal a partir de **5**, no es afectada por proteínas de eflujo (Tabla 3.10).

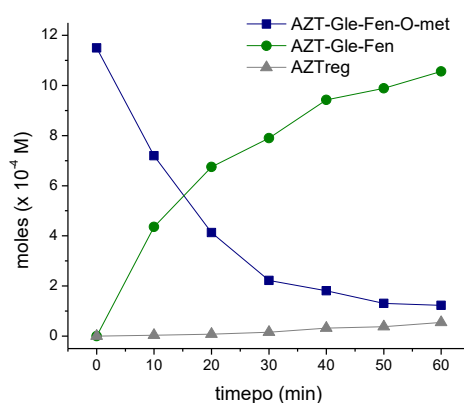
3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Tabla 3.10. Valores de F y P_{app} para AZT-Suc-ILeu-O-met, calculados como AZT_{eq},

<i>Derivado</i>	<i>Concentración</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>F</i> ($\mu\text{g/min}$)	<i>P_{app}</i> ($\times 10^{-4}\text{cm/min}$)
<i>AZT_{eq}</i>	$0,5 \times 10^{-3}\text{ M}$	$0,4 (\pm 0,1)$	$0,8 (\pm 0,1)$
	$1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$	$0,8 (\pm 0,1)$	$1,2 (\pm 0,1)$
	$1,0 \times 10^{-3}\text{ M} + \text{VER}$	$1,1 (\pm 0,2)$	$1,6 (\pm 0,3)$

3.4.3.4 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Glu-Fen-O-met (6)

Se realizaron ensayos de estabilidad en solución mucosal en presencia del tejido intestinal para **AZT-Glu-Fen-O-met (6)** $1 \times 10^{-3}\text{ M}$, presentando el perfil de degradación de la Figura 3.19.

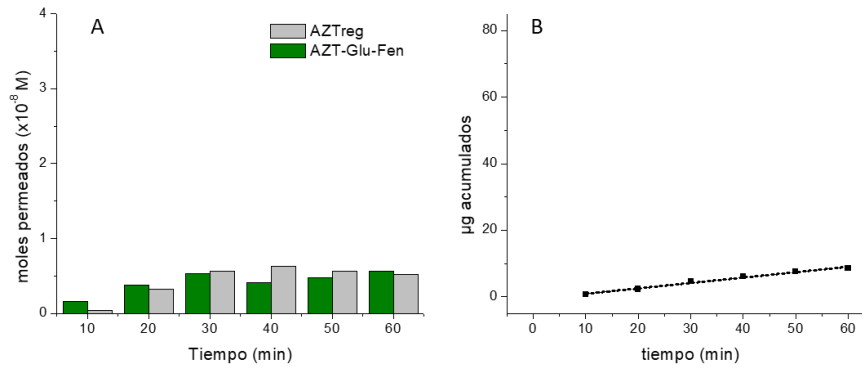


Figuras 3.19. Estudio de estabilidad en la solución mucosal para AZT-Glu-Fen-O-met (6).

Se observó que **6** es demetilado casi en su totalidad durante el tiempo que duró el ensayo, originando en la solución mucosal **AZT-Glu-Fen** y una mínima cantidad de **AZTreg**. El producto de degradación demetilado no es hidrolizado rápidamente, ya que su concentración aumenta durante todo el ensayo, indicando que el mismo no es reconocido por las enzimas degradativas presentes en el lado apical del segmento intestinal. Como en los casos anteriores, no se observó la ruptura del enlace amida (Figura 3.19).

Se realizaron los ensayos de permeabilidad intestinal para el profármaco **6** utilizando una concentración de $1 \times 10^{-3}\text{ M}$, los cuales se detallan en la Figura 3.20.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met



Figuras 3.20. Estudio de permeabilidad intestinal de AZT-Glu-Fen-O-met ($1 \times 10^{-3} M$).

A) Moles permeados vs tiempo, B) μg acumulados de AZTeq vs tiempo.

$$\mu g \text{ acumulados AZTeq} = 0,16 (\pm 0,01) \text{ Tiempo} - 0,8 (\pm 0,4) \quad \text{Ec 3.15}$$

$$n = 6; r^2 = 0,979; ds = 0,001; F = 243,64$$

Se encontró una pequeña cantidad de moles **AZTreg** y **AZT-Glu-Fen** en la solución serosal (Figura 3.20.A), los cuales son sustancialmente inferiores comparados con los moles detectados en la solución serosal de los ensayos de permeabilidad con los profármacos **4** y **5**. Este profármaco no atraviesa el epitelio intestinal como tal, ya que no es detectado en la solución serosal. Teniendo en cuenta las especies que pueden atravesar el tejido intestinal, se determinó los μg de AZTeq y a partir de éstos se calcularon los valores de **F** y del **P_{app}**, obteniéndose valores de $0,2 (\pm 0,1) \mu g/min$ y $0,3 (\pm 0,1) \times 10^{-4} cm/min$, respectivamente. Como puede observarse, se obtuvo un **P_{app}** significativamente inferior al de AZT.

Se llevaron a cabo los ensayos con VER para determinar si el derivado y/o sus metabolitos son sustratos de las proteínas de eflujo. Se observó un **P_{app}** $0,7 (\pm 0,3) \times 10^{-4} cm/min$ (Tabla 3.11), el cual es superior al del ensayo sin VER, evidenciando un fenómeno de eflujo posiblemente mediado por P-gp. Ésto explica la baja permeabilidad observada en los ensayos de permeabilidad sin la presencia del inhibidor.

Tabla 3.11. Valores de **F** y **P_{app}** para AZT-Glu-Fen-O-met, calculados como AZTeq, en presencia y ausencia de VER.

Derivado	Concentración ($\mu g/mL$)	F ($\mu g/min$)	P_{app} ($\times 10^{-4} cm/min$)
AZTeq	$1,0 \times 10^{-3} M$	$0,2 (\pm 0,1)$	$0,3 (\pm 0,1)$
	$1,0 \times 10^{-3} M + VER$	$0,6 (\pm 0,1)$	$0,7 (\pm 0,3)$

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

3.4.3.5 Estudios de permeabilidad intestinal de AZT-Adi-Fen-O-met (7)

De igual manera que los profármacos anteriormente evaluados, se realizaron con los ensayos de estabilidad para **AZT-Adi-Fen-O-met (7)** en solución mucosal en presencia del segmento intestinal (Figura 3.21).

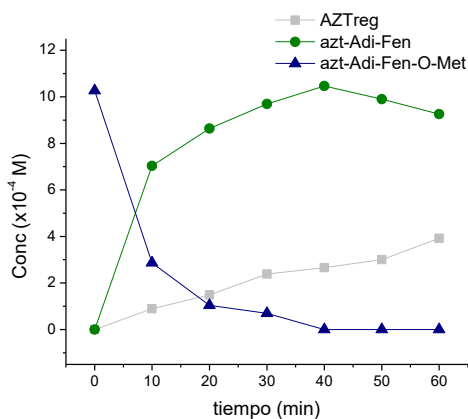
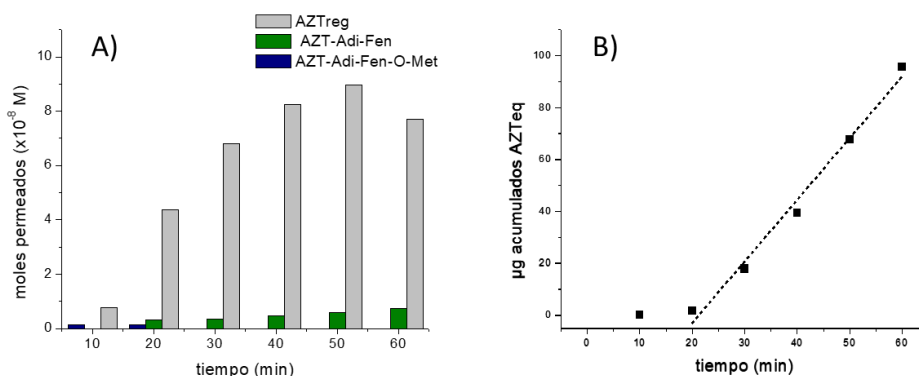


Figura 3.21. Estudio de estabilidad en la solución mucosal para AZT-Adi-Fen-O-met (7).

De esta manera se determinó que el profármaco **7** es hidrolizado casi completamente a los 20 min de comenzado el ensayo, originando principalmente **AZT-Adi-Fen** el cual también es susceptible a hidrólisis, observándose una disminución de su concentración en la solución a partir de los 40 min de ensayo; observándose la regeneración de AZT (**AZTreg**), durante todo el tiempo que duró el ensayo.

Los ensayos de permeabilidad se realizaron evaluando una concentración de 1×10^{-3} M (Figuras 3.22)



Figuras 3.22. Estudio de permeabilidad intestinal de AZT-Adi-Fen-O-met (1×10^{-3} M).

A) Moles permeados vs tiempo, B) µg acumulados de AZTeq vs tiempo.

$$\mu\text{g acumulados AZTeq} = 2,38 (\pm 0,01) \text{ Tiempo} - 50,6 (\pm 0,6)$$

Ec 3.16

$$n = 5; r^2 = 0,987; ds = 0,01; F = 240,9$$

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

En los estudios de permeabilidad intestinal para el profármaco **7**, se detectó **AZTreg** como la principal especie presente en la solución serosal. La cantidad de moles permeados fue superior a los moles de AZTreg presentes en la solución mucosal, sugiriendo que el principio activo se regenera principalmente durante el pasaje por el tejido intestinal. En la solución serosal, se detectaron cantidades mínimas de **AZT-Adi-Fen** y de **AZT-Adi-Fen-O-met** (Figura 3.22.A). A partir de los μg acumulados en función del tiempo, se determinaron los valores de F y el P_{app} presentando los siguientes valores: $2,4 (\pm 0,5) \mu\text{g}/\text{min}$ y $3,5 (\pm 0,3) \times 10^{-4} \text{ cm}/\text{min}$, respectivamente. Al comparar este P_{app} con el de AZT, se encontró que **7** presenta un coeficiente superior al del principio activo ($P_{app \text{ AZT}} = 2,9 (\pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ cm}/\text{min}$), lo que indica una mejora en la biodisponibilidad de AZT.

Este perfil de permeabilidad, se correlacionó con la estabilidad en la solución mucosal, ya que el derivado es hidrolizado casi completamente a los 20 min de ensayo, originando principalmente **AZT-Adi-Fen** y **AZTreg** (Figura 3.21). Los moles permeados de **AZTreg** no se correlacionan con la cantidad de moles regenerados en la solución mucosal, demostrando que éste se está produciendo en el interior de los enterocitos como consecuencia del metabolismo de **AZT-Adi-Fen**.

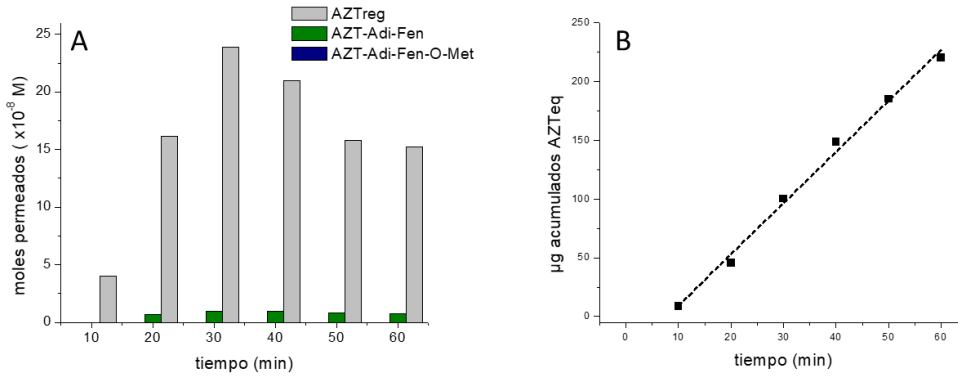
Se continuó con la evaluación de la permeabilidad de **7** en una concentración inferior ($0,5 \times 10^{-4} \text{ M}$). En este caso, se observó una diferencia estadísticamente significativa comparada con los resultados obtenidos a una concentración de $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ (Tabla 3.12). Esto indica que la permeabilidad se ve afectada por cambios en la concentración, sugiriendo que el **AZT-Adi-Fen** que se produce en la solución mucosal podría atravesar el tejido intestinal por medio de un transporte facilitado, potencialmente un transportador de péptidos.

Tabla 3.12 Valores de F y P_{app} para las diferentes concentraciones de *AZT-Adi-Fen-O-met*.

<i>Derivado</i>	<i>Concentración</i> ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	F ($\mu\text{g}/\text{min}$)	P_{app} ($\times 10^{-4} \text{ cm}/\text{min}$)
<i>AZTeq</i>	$0,5 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,0 (\pm 0,2)$	$1,4 (\pm 0,1)$
	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	$2,4 (\pm 0,5)$	$3,5 (\pm 0,3)$

Al evaluar el efecto de inhibición de las proteínas de eflujo, se observó que la P_{app} aumenta notablemente (Figura 3.23).

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met



Figuras 3.23. Estudio de permeabilidad intestinal de AZT-Adi-Fen-O-met (1×10^{-3} M+ VER).

A) Moles permeadas vs tiempo, B) μg acumulados de AZTeq vs tiempo.

$$\mu\text{g acumulados AZTeq} = 4,4 (\pm 0,2) \text{ Tiempo} - 34,3 (\pm 0,6) \quad \text{Ec 3.17}$$

$$n = 6; r^2 = 0,993; \text{sd} = 0,01; F = 680,4$$

Al comparar el perfil de moles permeados a partir del profármaco **7** en presencia y en ausencia de VER, se observó que al inhibir las proteínas de eflujo la cantidad de moles que atraviesan el tejido intestinal son superiores, originando un aumento en la cantidad de moles de **AZTreg** presentes en la solución serosal. Este incremento sugiere que el principio activo regenerado a partir de **AZT-Adi-Fen-O-met** es reconocido por proteínas de eflujo y a su vez reafirma lo supuesto anteriormente con relación a que este producto de degradación se produce durante el pasaje del profármaco a través del tejido intestinal, ya que las cantidades de **AZTreg** que se originan en la solución mucosal no podrían generar una cantidad de moles permeados tan elevada, como los que se observan en la Figura 3.23.A. Teniendo en cuenta los μg acumulados de **AZTeq**, se determinó el valor de F y del P_{app} , obteniéndose los siguientes valores $4,4 (\pm 0,3)$ $\mu\text{g}/\text{min}$ y $6,5 (\pm 0,5) \times 10^{-4}$ cm/min , respectivamente (Tabla 3.13). Este valor de coeficiente refuerza la hipótesis que el **AZT-Adi-Fen** que se produce en la solución mucosal (Figura 3.22) está siendo reconocido por transportadores, pero que a su vez es metabolizado en el interior celular regenerando el principio activo, que en este caso es reconocido por transportadores de eflujo a nivel apical.

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

Tabla 3.13 Valores de F y P_{app} para las diferentes concentraciones de AZT-Adi-Fen-O-met.

<i>Derivado</i>	<i>Concentración ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>F</i> ($\mu\text{g/min}$)	<i>P_{app}</i> ($\times 10^{-4}\text{cm/min}$)
<i>AZTeq</i>	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	2,4 ($\pm 0,5$)	3,5 ($\pm 0,3$)
	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	4,4 ($\pm 0,3$)	6,5 ($\pm 0,5$)

3.4.4 Conclusiones parciales

Cuando se evaluó la estabilidad en la solución mucosal en presencia del segmento intestinal de los profármacos *AZT-Suc-Fen-O-met* (4), *AZT-Suc-ILeu-O-met* (5), *AZT-Glu-Fen-O-met* (6) y *AZT-Adi-Fen-O-met* (7), se observó en todos los casos la hidrólisis de los enlaces tipo éster presentes en las moléculas con estructura AZT-Espaciador-Aa-O-met. Esto demuestra que los profármacos regeneran el principio activo, como así también la hidrólisis de diversos derivados de AZT que pueden ser reconocidas por transportadores presentes en la cara apical de los enterocitos, favoreciendo su absorción. Debido a la estructura de los productos de degradación, dicho transporte podría estar mediado por transportadores de péptidos.

Los resultados obtenidos al evaluar los profármacos 4-7, demuestran que presentan propiedades de absorción diferentes a las de AZT. En la solución serosal, para los ensayos de *AZT-Suc-Fen-O-met* y *AZT-Suc-ILeu-O-met*, se observó la aparición de AZT-Suc el cual se produce durante el pasaje por la membrana intestinal de las especies presentes en la solución mucosal. En cambio, para *AZT-Glu-Fen-O-met* y *AZT-Adi-Fen-O-met*, no se observó como producto de degradación al AZT-Espaciador correspondiente, indicando que las esterasas responsables de la hidrólisis no reconocen de igual manera a todos los profármacos evaluados.

Los profármacos 4, 5 y 6 originan un P_{app} inferior al del principio activo, pero presentan como ventaja la presencia de especies de AZT con el 5'-OH protegido, lo cual imposibilita el metabolismo hepático que se produce luego del pasaje por la membrana intestinal. En cambio, para el *AZT-Adi-Fen-O-met* se determinó un P_{app} estadísticamente superior al de AZT, determinado principalmente como AZT, debido a que el profármaco como tal y el producto de degradación (*AZT-Adi-Fen*), no logran atravesar el epitelio en gran medida. Esta elevada concentración de AZT en la solución serosal no es coincidente con la determinada en la solución mucosal, lo cual pone en evidencia que el *AZT-Adi-Fen* que se genera en la solución mucosal está siendo reconocido por algún tipo de transporte que promueve su absorción y una vez en el interior del enterocito es metabolizado produciendo AZTreg, el cual es detectado en la solución

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

serosal, generando así un P_{app} global mayor al del principio activo como tal. En la Figura 3.24, se esquematiza el posible proceso de permeabilidad que se genera desde *AZT-Adi-Fen-O-met*.

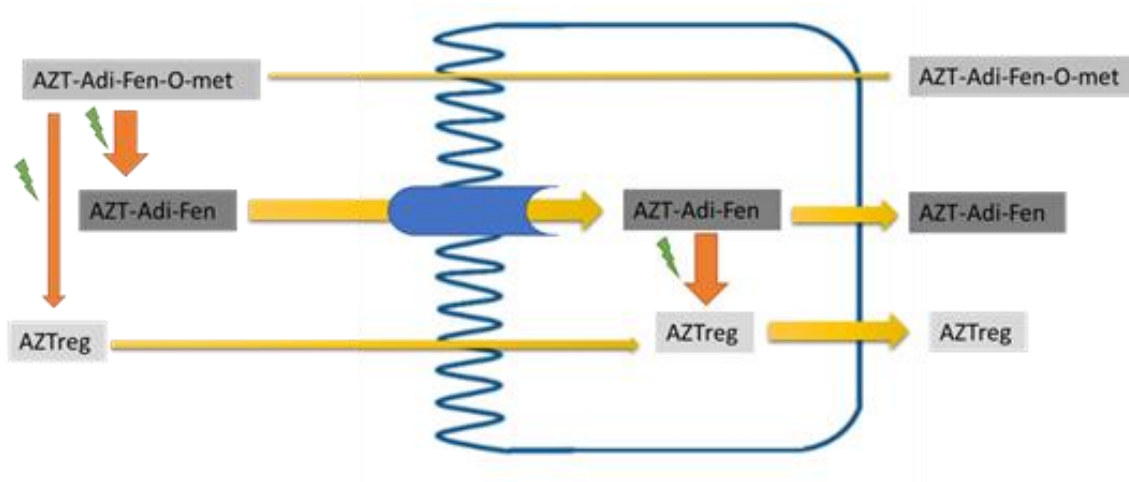


Figura 3.24. Ilustración del posible mecanismo de permeabilidad intestinal determinado para *AZT-Adi-Fen-O-met*.

Al evaluar el efecto de la inhibición de las proteínas de eflujo para los profármacos **4-7**, se observó que *AZT-Suc-Fen-O-met* y *AZT-Suc-ILeu-O-met* no son sustratos de estas proteínas, en cambio *AZT-Glu-Fen-O-met* y *AZT-Adi-Fen-O-met* son sometidos a un proceso de eflujo a nivel apical, ya que en ambos casos el P_{app} aumenta en presencia del inhibidor de P-gp. Para el caso particular del derivado **7**, se observó que este coeficiente es aproximadamente dos veces superior en presencia de VER (Tabla 3.13) demostrando que el profármaco y/o sus metabolitos presentan una permeabilidad intrínseca elevada.

3.4.5 Materiales y métodos

3.4.5.1 Preparación de las soluciones mucosales y serosales

La preparación de la solución mucosal de cada profármaco (*AZT-Suc-Fen-O-met*, *AZT-Suc-ILeu-O-met*, *AZT-Glu-Fen-O-met* y *AZT-Adi-Fen-O-met*), se realizó pesando las cantidades necesarias de cada uno de ellos y disolviéndolas en 50 mL de medio de cultivo TC199 (sigma Aldrich®), para generar soluciones de trabajo de concentración es $0,5 \times 10^{-3}$ M y $1,0 \times 10^{-3}$ M, según corresponda. El medio de cultivo TC199, se preparó según las indicaciones del proveedor, ajustando el pH final a 7,4 y sometido a burbujeo con gas carbónico (5:95 CO₂:

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

O₂), termostaticando la solución resultante a 37 °C, para asegurar la viabilidad del tejido durante el tiempo que dura el ensayo.

La solución de verapamilo (VER) se preparó pesando 25 mg, que luego se solubilizaron en 50 mL de TC199, obteniéndose una concentración de $1,0 \times 10^{-4}$ M. La solución serosal utilizada, estuvo compuesta de medio de cultivo TC199 termostaticado a 37 °C y saturado con gas carbónico.

3.4.5.2 Obtención de segmentos intestinales

Los estudios se llevaron a cabo utilizando ratas Wistar machos, de 3 meses de edad pesando entre 300 y 450 g. Los animales se anestesiaron mediante la administración intraperitoneal de una solución de uretano (1000 mg/Kg). Posteriormente, se les realizó una incisión de 2 cm en la línea de la cavidad abdominal y se aisló el estómago, se descartaron los primeros 10 cm de tejido intestinal (duodeno), se tomó el segmento de yeyuno proximal de 10 cm. Luego, los animales se sacrificaron mediante la administración de dióxido de carbono. Los procedimientos fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC. (Res. N° 138/07), para el uso de animales en protocolos experimentales.

3.4.5.3 Montaje del dispositivo de permeación

El segmento de yeyuno proximal aislado se colocó en una varilla de vidrio y se procedió a evertirlo. Luego, se lo insertó en una cánula de vidrio (0,2 cm de diámetro) y se sujetó el segmento en su extremo superior. En el extremo inferior se colocó una pesa de 10 g para mantener estirado el segmento intestinal. Luego se ligó el extremo inferior del tejido a la cánula, quedando expuestos 10 cm de tejido intestinal para la permeación. El segmento intestinal conteniendo la cánula en su interior, se colocó en medio de cultivo TC199 termostaticado a 37 °C y saturado con gas carbónico. En el interior del saco intestinal se adicionó 1 mL de la solución serosal y se lo dejó durante 10 min para equilibrar el tejido. El mismo se mantuvo en estas condiciones hasta el momento de comenzar el experimento.

3.4.5.4 Toma, preparación y cuantificación de las muestras

Una vez montado el dispositivo de permeación, el segmento intestinal es sumergido en la solución mucosal. En el interior del segmento intestinal, se le colocó 1 mL de solución serosal

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

por medio de una cánula insertada en su interior. Transcurridos 10 min, se retira el volumen agregado y se lava con 1 mL de solución serosal, tras lo cual se vuelve a llenar con 1 mL de solución serosal fresca. De esta manera, la muestra de permeación está formada por 2 mL de solución serosal retirados del interior de la cánula (muestra de permeación + muestra de lavado), a los cuales se le adicionó 80 μ L de HCl 2 M y 50 μ L de EI. La solución de EI para la cuantificación de **AZT**, **AZT-Suc-Fen-O-met**, **AZT-Suc-Ileu-O-met** y **AZT-Adi-Fen-O-met**, fue preparada utilizando el derivado **AZT-Glu** (0,15 mg/mL), mientras que para **AZT-Glu-Fen-O-met**, se utilizó una solución de **AZT-Suc** (0,15 mg/mL). Luego se acondicionaron las muestras por extracción en fase sólida y posteriormente se cuantificaron mediante los métodos analíticos desarrollados y validados para tal fin, lo cuáles se describen en el *Capítulo 4*.

Para estudiar la estabilidad de cada compuesto en la solución mucosal en presencia y ausencia de del segmento intestinal, se tomaron muestras de 100 μ L (0, 10, 20, 30, 40 y 60 min) y se los colocó en 2 mL de *buffer* fosfato *pH*, a los cuales se le adicionó 80 μ L de HCl 2 M y 50 μ L de EI, de igual manera que lo detallado anteriormente. Luego se acondicionaron las muestras, por extracción en fase sólida y posteriormente se cuantificó por HPLC-UV, utilizando los métodos validados descriptos en el *Capítulo 4*.

3.5 Conclusiones parciales

Se sintetizaron 4 nuevos profármacos: **AZT-Suc-Fen-O-met**, **AZT-Suc-ILeu-O-met**, **AZT-Glu-Fen-O-met** y **AZT-Adi-Fen-O-met**, con el fin de optimizar el perfil biofarmacéutico que presenta AZT. Estos derivados se obtuvieron a través de un proceso sintético donde se conjugaron los profármacos **1**, **2** y **3** obtenidos en el *Capítulo 2*, con Aa-O-met, empleando como reactivos de acoplamiento DCC y Oxyma, para generar la unión amida entre ambos compuestos.

Estos derivados denominados *AZT-Espaciador-Aa-O-met*, presentaron buenos perfiles de estabilidad química, siendo estables a pH ácido y neutro, y aumentando su inestabilidad en medios alcalinos. La adición del Aa-O-met, permitió que los mismos regeneren el fármaco activo con una mayor velocidad, que los derivados *AZT-Espaciador*, evaluados en el *Capítulo 2*. Esta variabilidad depende tanto del largo de la cadena del espaciador (cuanto más larga es la cadena, mayor estabilidad presentan los derivados), como del tipo de aminoácido, siendo el $t_{1/2}$ para **AZT-Suc-Fen-O-met (4)** significativamente inferior al de **AZT-Suc-ILeu-O-met (5)**.

En los estudios en plasma humano, se observó nuevamente que la generación de este tipo de profármacos, permitió que tengan una velocidad de regeneración de AZT compatible con la administración en humanos. La velocidad de hidrólisis es dependiente de la estructura del compuesto, observándose como producto de degradación *AZT-Espaciador-Aa* y **AZTreg**. En todos los casos no se observó hidrólisis de la función amida, evidenciando que estos profármacos no son reconocidos por las enzimas plasmáticas que hidrolizan dicha unión. Los estudios en plasma determinaron que los profármacos **4 – 7**, presentan valores de afinidad por las proteínas plasmáticas, entre 4 a 6 veces mayores que AZT. Cuando se empleó DZP, se observó que esta serie de profármacos son desplazados por dicho marcador, demostrando que se unen al sitio II de la ASH. Esto fue confirmado por estudios de modelado molecular, en los cuales se observó que DZP y los profármacos **4-7** presentan un patrón similar de interacción con los residuos que conforman el sitio II de la ASH. El aumento en la afinidad y el cambio en el sitio de unión de estos profármacos mejorarían la biodistribución del principio activo.

Sobre la base de la permeabilidad intestinal evaluada con la técnica del saco intestinal evertido de ratas, se pudo determinar que las enzimas presentes en la mucosa intestinal pueden regenerar el principio activo, como así también el *AZT-Espaciador-Aa* correspondiente. Esto último es importante, ya que permitiría que el metabolito sea reconocido por transportadores de péptidos presentes en la cara apical de los enterocitos. Para el derivado **AZT-Adi-Fen-O-met** se

3. Síntesis y evaluación biofarmacéutica de profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met

observó un proceso de degradación rápida que genera principalmente AZT-Adi-Fen el cual podría ser reconocido por transportadores que facilitan el pasaje desde la solución mucosal hacia el interior del enterocito, donde es metabolizado obteniéndose **AZTreg**, el cual no es reconocido por proteínas de eflujo.

La conclusión de esta etapa indica que los profármacos **4-7** evaluados, presentan propiedades mejoradas respecto de AZT, lo cual podrían presentarían beneficios en cuanto a su farmacocinética, al poseer un perfil de degradación plasmático prometedor, asociado a un cambio en el sitio de unión en la ASH. Desde el punto de vista de la absorción intestinal, presentaron particularidades importantes, que podrían resultar en una biodisponibilidad aumentada respecto de AZT.

Capítulo 4:

*Validación de métodos analíticos y
bioanalíticos.*

Capítulo 4: Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

4.1 Introducción

La validación de un método, ya sea analítico o bioanalítico, es el proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método empleado cumple con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas^{158,159}. Una validación se realiza para determinar con fundamento estadístico, que la metodología de trabajo es la adecuada, confiable y reproducible.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es uno de los métodos más utilizados para la cuantificación de sustancias en el ámbito de las ciencias farmacéuticas, debido a su practicidad¹⁶⁰. La utilización de dicha metodología de trabajo, requiere previamente de la validación de los métodos desarrollados, incluyendo desde la obtención de la muestra hasta su cuantificación.

Existen diversas guías internacionales para el desarrollo y validación de métodos analíticos, en donde se establecen que parámetros se deben evaluar y los criterios de aceptación de los mismos. Entre las más importantes se encuentran, las directrices de la *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH)¹⁶¹ y las guías para la industria de la *Food and Drug Administration* (FDA)¹⁵⁹.

Para validar una metodología analítica, se deben determinar los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud y recuperación¹⁶², aplicando los criterios de aceptación definidos en la bibliografía¹⁶¹⁻¹⁶³.

Selectividad

La selectividad de un método analítico es la habilidad del mismo para evaluar inequívocamente el analito en presencia de otros componentes, por ejemplo: impurezas, productos de degradación, matrices, etc. Para lo cual se debe inyectar la matriz pura, observándose la ausencia de señales en el tiempo de retención del analito.

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

Linealidad

La linealidad es la proporcionalidad directa entre la concentración del analito y la respuesta que genera, siendo el rango lineal, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima del analito dentro del cual se puede analizar una muestra por extrapolación en la curva estándar. Resulta conveniente evaluar estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado, tales como:

- ✓ Pendiente (a), se determina como parámetro indicativo de la sensibilidad y permite evaluar la correlación entre diferentes métodos.
- ✓ Coeficiente de regresión lineal (r), Se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto ($y = a x + b$), el cual debe exhibir un elevado coeficiente de correlación lineal (r^2) (idealmente mayor a 0,99).
- ✓ Ordenada al origen (b), para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse únicamente a un error aleatorio.

Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico es su capacidad para discernir pequeñas variaciones en la concentración de analito. Así, la pendiente de la curva de calibrado es la medida de la sensibilidad y se denomina, sensibilidad de calibrado. Esta última es constante en todo el intervalo de linealidad. La sensibilidad está dada por los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)¹⁶⁴.

Límite de detección (LD): es la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar como un valor exacto.

Límite de cuantificación (LC): es la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas.

Precisión

La precisión está relacionada con la dispersión de los valores hallados a partir del valor medio, y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales, cuando el método se aplica repetidamente a alícuotas múltiples de una muestra homogénea. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar, o más comúnmente como la desviación estándar

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

relativa (RSD, por sus siglas en inglés). El criterio de aceptación suele ser $RSD \leq 2\%$; pero cuando se trabaja con fluidos biológicos, se considera la complejidad de la matriz, resultando apropiado un $RSD \leq 10\%$.¹⁶²

Exactitud

La exactitud, es también conocida como error sistemático, y corresponde a la diferencia entre el valor medido y el valor verdadero obtenido a partir de la concentración de la muestra y la curva de calibrado. Se expresa como el porcentaje del valor obtenido, y debe encontrarse entre el 90 y 110%, independientemente de la matriz empleada.

Recuperación

La recuperación de un analito en un ensayo, es la respuesta del detector obtenida a partir de una cantidad del analito añadido y extraído de la matriz, en comparación con la respuesta del detector obtenida para la concentración verdadera. La recuperación se refiere a la eficiencia de extracción de un método analítico dentro de los límites de la variabilidad. La recuperación del analito no debe ser necesariamente el 100%, pero el grado de recuperación de un analito y del EI debe ser consistente, preciso y reproducible.

4.2 Objetivos

El presente capítulo tiene como objetivo la validación de los métodos analíticos y bioanalíticos, para asegurar que se cuenta con metodologías de trabajo confiables y reproducibles, en los diversos estudios desarrollados con AZT y los profármacos evaluados en el presente Trabajo de Tesis.

Debido a que los estudios fueron desarrollados en diversos medios, como soluciones *buffer* o medio de cultivo tal como TC199, los métodos fueron validados considerando las diversas condiciones empleadas y aplicando los criterios de aceptación correspondientes a metodologías analíticas^{159,161,162} o bioanalíticas^{159,163}, según corresponda, teniendo estas últimas un mayor rango de aceptación, ya que se considera la complejidad de la matriz biológica utilizada.

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

4.3 Resultados y discusiones

Como se comentó anteriormente, la matriz empleada define los criterios de aceptación de los parámetros, ya sea una validación analítica o bioanalítica. Considerando, una *validación analítica* cuando el analito se encuentra en *buffer* fosfato (*pH* 2,0, 7,4 y 10,0) acidificado hasta llegar a *pH* 1 y una *validación bioanalítica* cuando se utiliza medio de cultivo TC199 para realizar los ensayos.

Debido a la elevada lipofilicidad teórica que presentan los compuestos sintetizados en el *Capítulo 3* y a la necesidad de cuantificar tanto AZT como así también los potenciales productos de degradación, se requirió la utilización de diferentes equipos de HPLC.

4.3.1 Cuantificación de AZT, AZT-Suc, AZT-Glu, AZT-Adi y AZT-Oxa en *buffer fosfato*

En los estudios de estabilidad química y plasmática, como así también de unión a proteínas plasmáticas, los analitos se encuentran disueltos en soluciones de *buffer* fosfato a diversos valores de *pH*. Dichas muestras son posteriormente acidificadas con HCl 2 M hasta llegar a un valor de *pH* 1 y luego realizar la extracción en fase sólida que permite tanto la purificación como la concentración de las mismas. Para la cuantificación de las muestras se utilizó el cromatógrafo Agilent S1100, con las siguientes condiciones cromatográficas: fase móvil MeOH: *buffer* fosfato *pH* 2 (0,1 M) : THF (55:45:2); columna analítica Phenomenex Synergi Fusion C18® (4 x 250 mm, 5 mm tamaño de partícula) con precolumna Phenomenex Security Guard Fusion RP® (4,0 x 30 mm) termostaticada a 40 °C; longitud de onda seleccionada para la cuantificación de las muestras fue de 267 nm. Los tiempos de retención para cada compuesto se detallan en la Tabla 4.1 y en las Figuras 4.1 – 4.5 se muestran los cromatogramas correspondientes, demostrando que los métodos son selectivos.

Las validaciones se realizaron en un rango de concentración de 0,05 a $10,2 \times 10^{-5}$ M, utilizando como estándar interno (EI) **AZT-Glu** 0,15 mg/mL para la cuantificación de AZT, **AZT-Suc**, **AZT-Adi** y **AZT-Oxa**; y **AZT-Suc** 0,15 mg/mL para **AZT-Glu**. En todos los casos se determinó el LC y LD utilizando el punto más bajo de la curva de calibrado. En la Tabla 4.2 se detallan los parámetros más importantes de las validaciones realizadas.

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

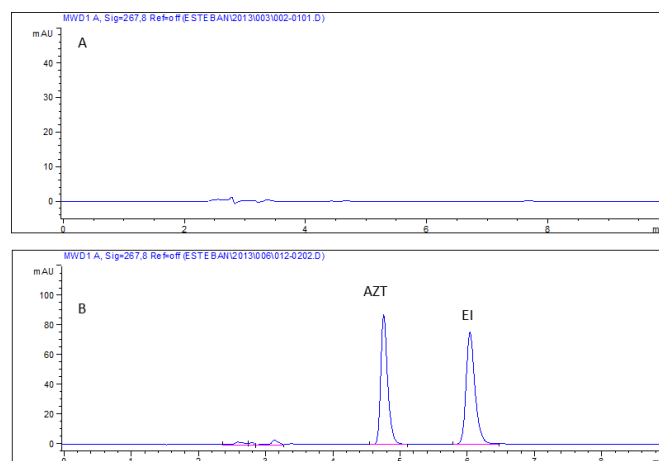


Figura 4.1. Selectividad para AZT

A) Matriz buffer fosfato acidificado. B) Muestra correspondiente a AZT ($tr = 4,7$ min).

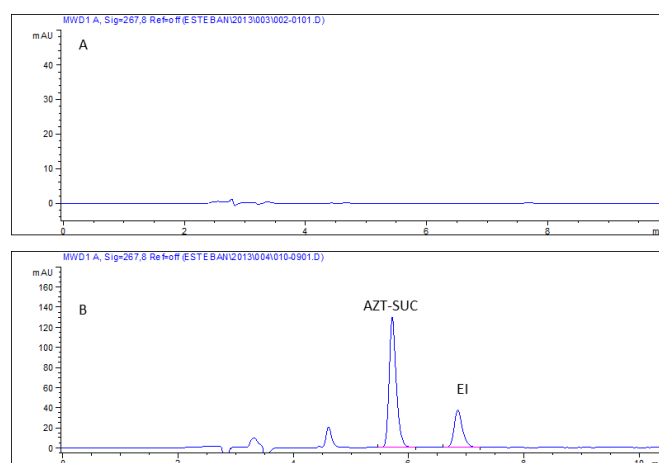


Figura 4.2 Selectividad para AZT-Suc

A) Matriz buffer fosfato. B) Muestra correspondiente a AZT-Suc ($tr = 5,7$ min).

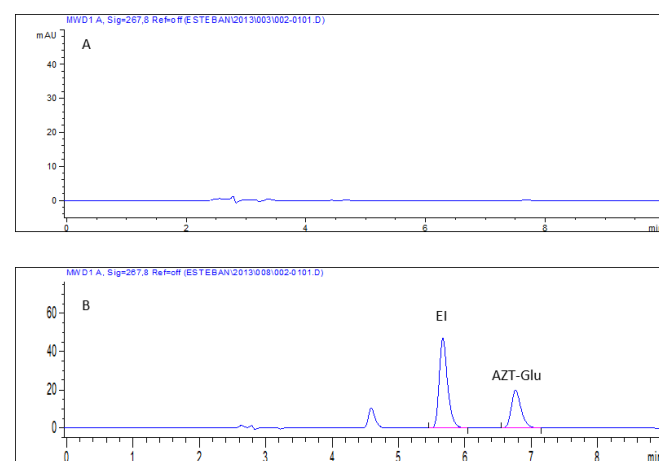


Figura 4.3. Selectividad para AZT-Glu

A) Matriz buffer fosfato. B) Muestra correspondiente a AZT-Glu ($tr = 7,1$ min).

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

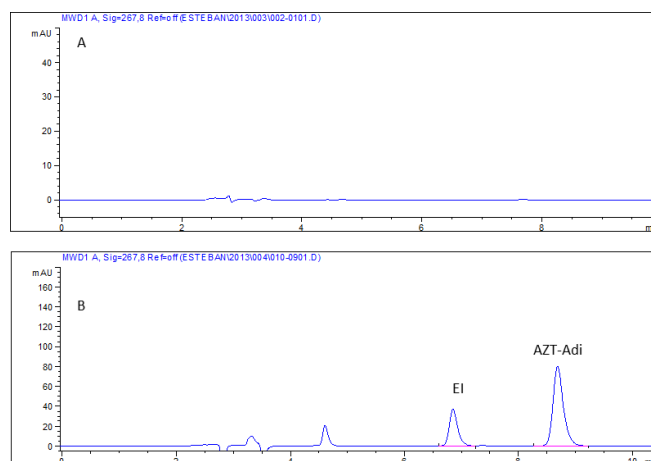


Figura 4.4. Selectividad para AZT-Adi.

A) Matriz buffer fosfato. B) Muestra correspondiente a AZT-Adi ($t_r = 9,1$ min).

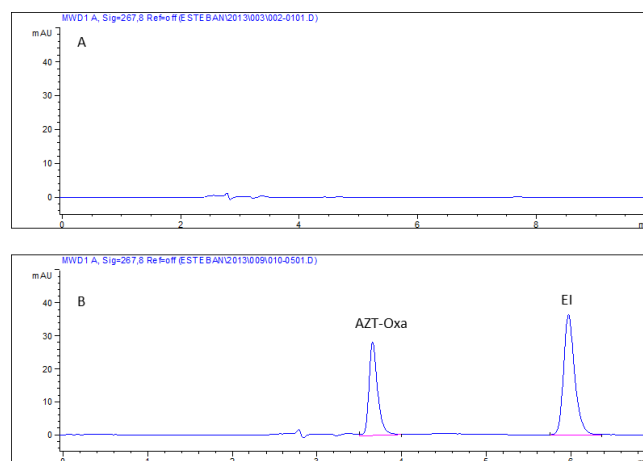


Figura 4.5. Selectividad para AZT-Oxa.

A) Matriz buffer fosfato. B) Muestra correspondiente a AZT-Oxa ($t_r = 3,7$ min).

Tabla 4.1: Tiempos de retención (t_r).

Compuestos	t_r (min)
AZT	4,7
AZT-Suc	6,2
AZT-Glu	6,9
AZT-Adi	10,2
AZT-Oxa	3,7

Tabla 4.2. Parámetros validados para AZT, AZT-Suc, AZT-Glu, AZT-Adi y AZT-Oxa en buffer fosfato.

Parámetro		AZT	AZT-Suc	AZT-Glu	AZT-Adi	AZT-Oxa
Ecuación de la recta	Pendiente	0,43 (\pm 0,01)	0,57 (\pm 0,01)	0,29 (\pm 0,01)	0,50 (\pm 0,01)	0,52 (\pm 0,01)
	Ordenada al origen	0,08 (\pm 0,05)	0,03 (\pm 0,02)	0,06 (\pm 0,09)	0,02 (\pm 0,01)	0,04 (\pm 0,01)
	r ²	0,994	0,998	0,999	0,999	0,994
	n	9	9	9	9	8
Exactitud	Baja (0,05 x 10 ⁻⁵ M)	99,5 \pm 0,6	100 \pm 1,7	90,2 \pm 0,5	92,2 \pm 0,8	93,3 \pm 0,9
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	101,2 \pm 0,9	101,4 \pm 0,5	98,1 \pm 0,8	95,7 \pm 0,3	92,7 \pm 0,5
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	95,5 \pm 0,6	98,8 \pm 0,8	96,8 \pm 0,6	94,5 \pm 0,4	96,5 \pm 0,4
Precisión (%RSD inter-día)	Baja (0,05 x 10 ⁻⁵ M)	0,66	1,67	1,79	1,72	1,89
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	0,34	0,54	0,68	1,18	0,63
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	0,68	0,73	0,64	0,42	1,31
Precisión (%RSD intra-día)	Baja (0,05 x 10 ⁻⁵ M)	0,57	1,60	1,79	0,02	0,20
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	1,52	0,95	0,68	0,71	0,19
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	0,61	0,45	0,64	0,34	1,41
% Recuperación (\pm DS)	Baja (0,05 x 10 ⁻⁵ M)	98,5 \pm 0,5	100,2 \pm 1,7	95,8 \pm 0,8	93,6 \pm 1,1	94,7 \pm 1,7
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	98,9 \pm 1,4	101,4 \pm 0,5	94,1 \pm 0,4	99,5 \pm 1,5	98,8 \pm 0,5
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	96,1 \pm 0,7	98,8 \pm 0,8	93,8 \pm 0,5	99,3 \pm 0,7	96,3 \pm 1,2

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

4.3.2 Cuantificación de AZT, AZT-Suc, AZT-Glu y AZT-Adi en medio de cultivo TC199

Estas validaciones fueron realizadas para asegurar que los resultados obtenidos en los ensayos de permeabilidad intestinal para AZT, AZT-Suc, AZT-Glu y AZT-Adi son confiables y reproducibles. Se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas que las descritas en la Sección 4.3.1, pero con una matriz diferente, motivo por el cual se debe validar nuevamente todos los parámetros. La matriz TC199 contiene rojo fenol, el cual no se elimina completamente durante el proceso de extracción en fase sólida. En las condiciones cromatográficas utilizadas el rojo fenol presenta un tiempo de retención de 7,6 min, mientras que el resto de los compuestos a cuantificar mantienen esencialmente sus tiempos de retención (Tabla 4.3), no interfiriendo con ninguno de los analitos determinados previamente, definiendo la selectividad del método (Figuras 4.6 – 4.9).

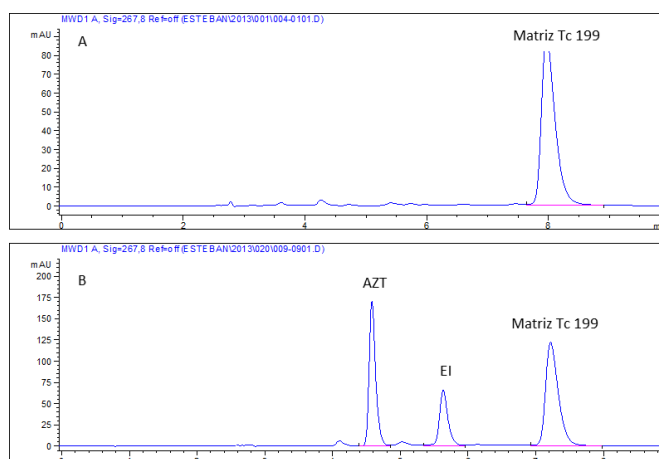


Figura 4.6. Selectividad para AZT.

A) Matriz TC199. B) Muestra correspondiente a AZT ($t_r = 4,7$ min).

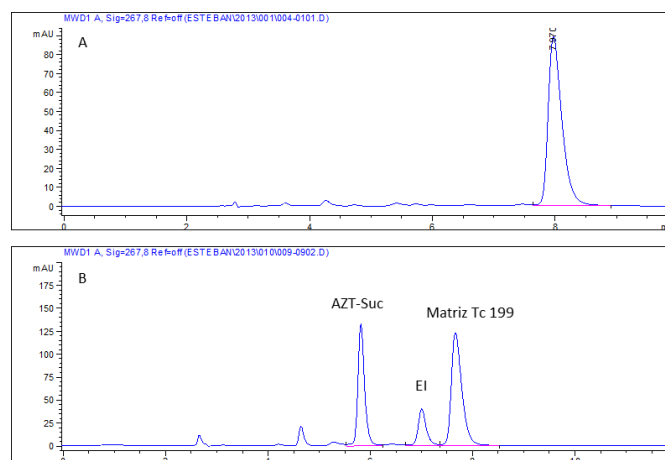


Figura 4.7 Selectividad para AZT-Suc.

A) Matriz TC199. B) Muestra correspondiente a AZT-Suc ($t_r = 5,9$ min).

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

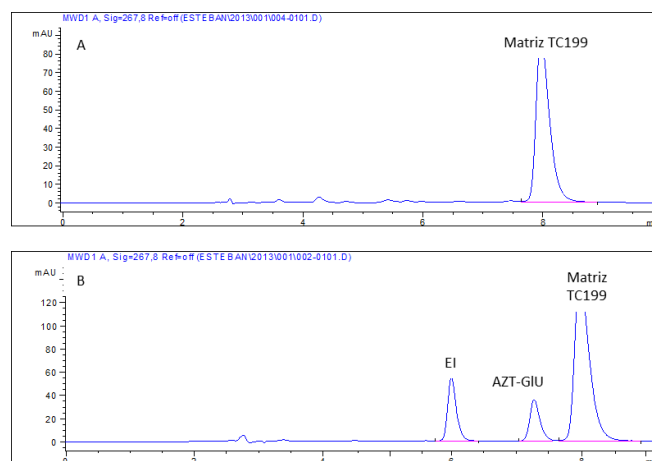


Figura 4.8. Selectividad para AZT-Glu.

A) Matriz TC199. B) Muestra correspondiente a AZT-Glu ($t_r = 7,2$ min).

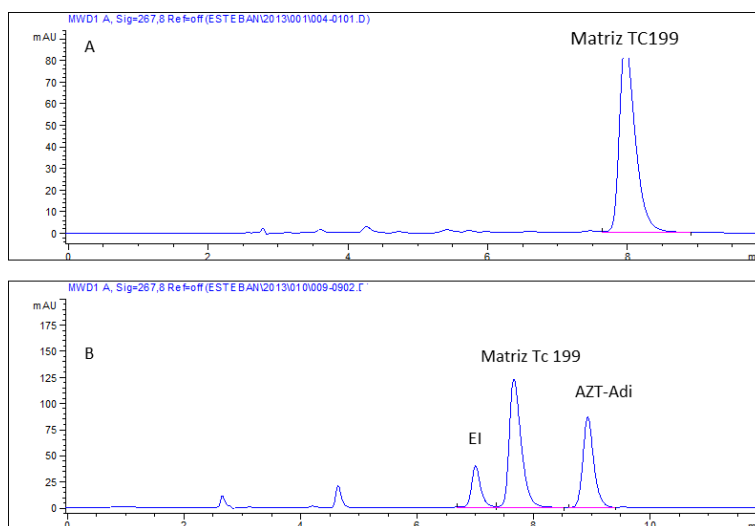


Figura 4.9. Selectividad para AZT-Adi.

A) Matriz TC199. B) Muestra correspondiente a AZT-Adi ($t_r = 9,2$ min).

Tabla 4.3: Tiempo de retención (t_r).

Compuestos	t_r (min)
AZT	4,7
AZT-Suc	5,9
AZT-Glu	7,2
AZT-Adi	9,2

En la Tabla 4.4 se detallan los resultados de las validaciones correspondientes.

Tabla 4.4. Parámetros validados para AZT, AZT-Suc, AZT-Glu y AZT-Adi en TC199.

Parámetro		AZT	AZT-Suc	AZT-Glu	AZT-Adi
Ecuación de la recta	Pendiente	0,39 (± 0,01)	0,53 (± 0,01)	0,23 (± 0,01)	0,53 (± 0,01)
	Ordenada al origen	0,06 (± 0,01)	0,01 (± 0,02)	0,05 (± 0,05)	0,01 (± 0,01)
	r ²	0,999	0,999	0,999	0,999
	n	9	9	9	9
Exactitud	Baja (0,05 x 10 ⁻⁵ M)	94,3 ± 1,7	99,3 ± 0,5	97,2 ± 0,7	93,6 ± 1,2
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	95,5 ± 0,6	98,3 ± 0,8	102,8 ± 1,2	95,5 ± 1,8
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	101,5 ± 0,8	100,2 ± 0,1	95,3 ± 0,3	94,6 ± 0,6
Precisión (%RSD inter-día)	Baja (0,05 x 10 ⁻⁵ M)	1,16	1,81	1,55	0,69
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	1,84	1,87	1,18	1,11
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	0,42	1,52	1,42	1,49
Precisión (%RSD intra-día)	Baja (0,05 x 10 ⁻⁵ M)	0,53	0,40	0,21	0,20
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	0,34	0,91	0,71	0,34
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	0,67	0,44	0,34	0,70
% Recuperación (±DS)	Baja (0,05 x 10 ⁻⁵ M)	99,6 ± 0,1	90,7 ± 1,9	94,9 ± 1,4	98,4 ± 1,3
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	99,9 ± 0,8	95,6 ± 1,8	99,3 ± 1,2	98,3 ± 0,6
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	90,7 ± 0,4	95,7 ± 1,5	98,8 ± 0,4	99,6 ± 1,5

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

4.3.3 Cuantificación de AZT, AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met en buffer fosfato

En los estudios de estabilidad química y plasmática, como así también de unión a proteínas plasmáticas, los analitos se encuentran disueltos en soluciones *buffer* fosfato de diversos valores de *pH*. Las muestras obtenidas de los ensayos son acidificadas con HCl 2 M hasta llegar a un valor de *pH* 1 para realizar la extracción en fase sólida, lo que permitirá purificar y concentrar las mismas. Debido a la elevada lipofilicidad que presentan los profármacos **AZT-Suc-Fen-O-met**, **AZT-Suc-ILeu-O-met** **AZT-Glu-Fen-O-met** y **AZT-Adi-Fen-O-met** y a la necesidad de cuantificar AZT y los diferentes metabolitos de cada uno, se empleó el Cromatógrafo Jasco 2077 Plus, el cual está equipado con una bomba cuaternaria que permite realizar cambios en la polaridad de la fase móvil durante el desarrollo de la corrida cromatográfica. Se utilizó la misma columna cromatográfica y longitud de onda que en el caso descrito anteriormente, cambiando únicamente la fase móvil y el tiempo de duración de la corrida cromatográfica. Para el método analítico el gradiente de solvente, consistió en *buffer pH* 2 (0,1 mM): MeOH (53:47 v/v) por 2,5 min, seguido por un cambio lineal de polaridad hasta llegar a (30:70 v/v) a los 9,5 min y se lo mantuvo constante por 1,5 min; luego se volvió a la composición inicial y se lo dejó estabilizar entre cada inyección durante 1,5 minutos.

Los tiempos de retención para cada compuesto se detallan en la Tabla 4.4 y 4.5, y en las Figuras 4.10 – 4.14 se muestran los cromatogramas correspondientes, demostrando la selectividad de los métodos desarrollados. Las curvas de calibrado se construyeron empleando un rango de concentración de los analitos de $0,05 \times 10^{-5}$ M a $10,2 \times 10^{-5}$ M, cumpliéndose la linealidad en todo el rango evaluado. EL LD y LC se tomó como la menor concentración del analito cuantificada en la curva de calibrado. Los resultados de cada validación se detallan en la Tabla 4.6.

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

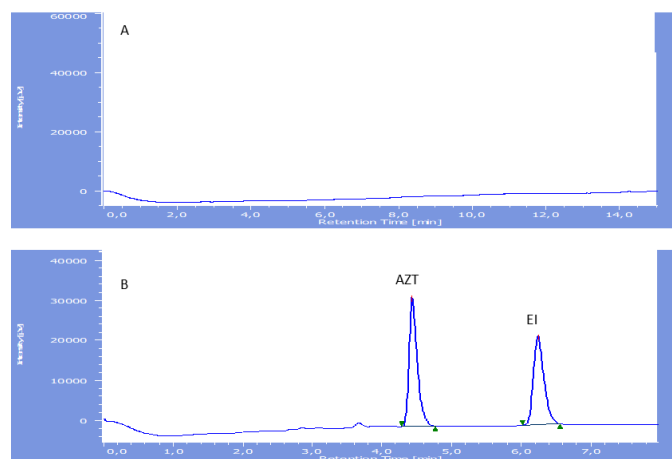


Figura 4.10. Selectividad para AZT. A) Matriz buffer fosfato acidificado. B) Muestra correspondiente a AZT ($tr=4,4$ min).

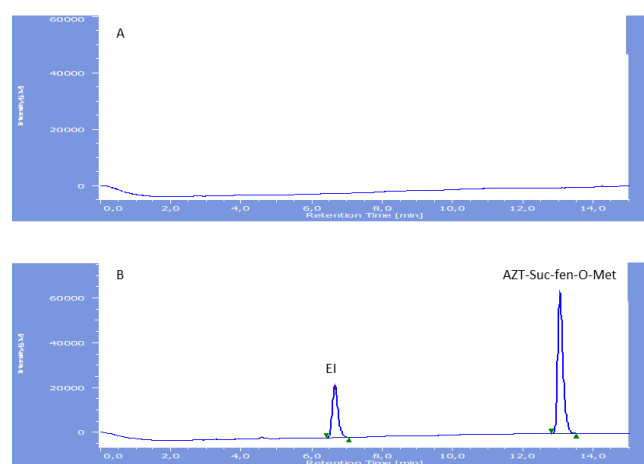


Figura 4.11. Selectividad para AZT-Suc-Fen-O-Met. A) Matriz buffer fosfato. B) Muestra correspondiente a AZT-Suc-Fen-O-Met ($tr = 13,0$ min).

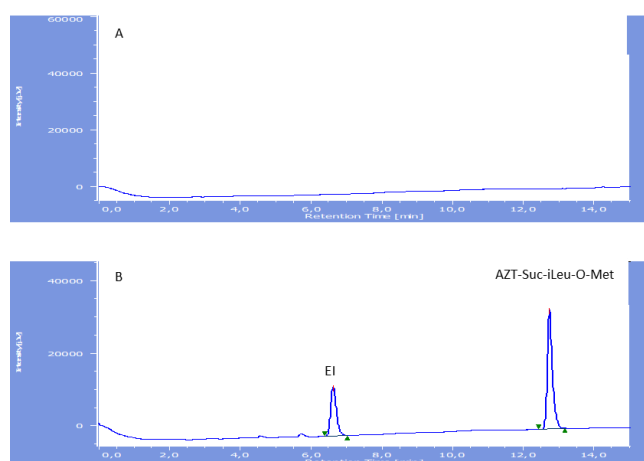


Figura 4.12. Selectividad para AZT-Suc-Ileu-O-Met. A) Matriz buffer fosfato. B) Muestra correspondiente a AZT-Suc-Ileu-O-Met Met ($tr=12,7$ min).

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

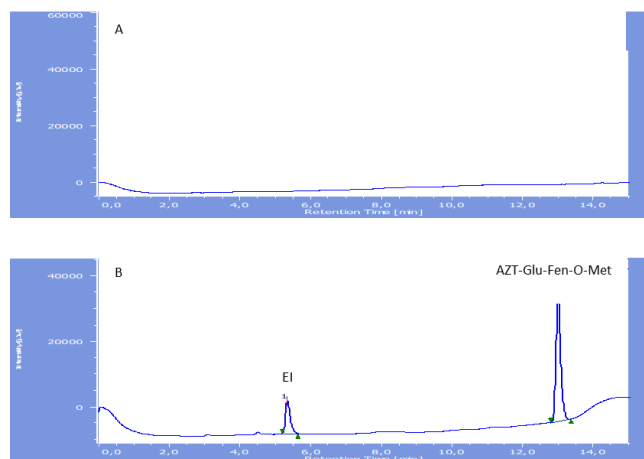


Figura 4.13. Selectividad para AZT-Glu-Fen-O-Met. A) Matriz buffer fosfato. B) Muestra correspondiente a AZT-Glu-Fen-O-Met ($t_r=12,5$ min).

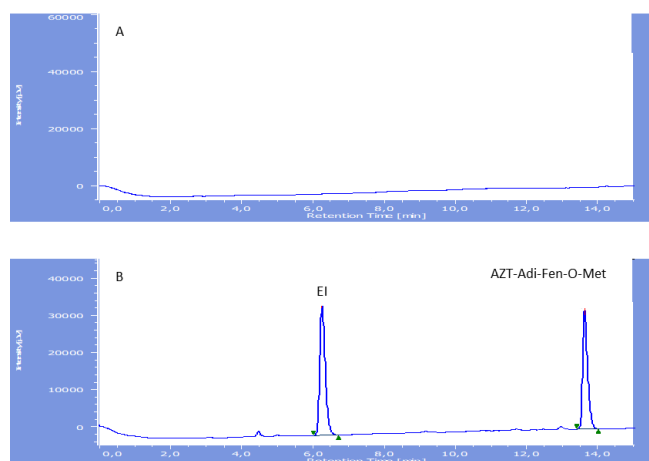


Figura 4.14. Selectividad para AZT-Adi-Fen-O-Met. A) Matriz buffer fosfato. B) Muestra correspondiente a AZT-Glu-Adi-O-Met ($t_r=13,8$ min).

Tabla 4.5: Tiempo de retención (t_r). Para AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met

Compuestos	t_r (min)
AZT	4,4
AZT-Suc-Fen-O-met	13,0
AZT-Suc-ILeu-O-met	12,7
AZT-Glu-Fen-O-met	12,5
AZT-Adi-Fen-O-met	13,8

Tabla 4.6. Parámetros validados para AZT, AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met, AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met en *buffer* fosfato acidificado.

Parámetro		AZT	AZT-Suc-Fen-O-met	AZT-Suc-ILeu-O-met	AZT-Glu-Fen-O-met	AZT-Adi-Fen-O-met
Ecuación de la recta	Pendiente	1,76 (± 0,03)	1,25 (± 0,01)	1,26 (± 0,01)	1,06 (± 0,01)	0,71 (± 0,01)
	Ordenada al origen	0,07 (± 0,01)	0,01 (± 0,01)	0,01 (± 0,01)	0,05 (± 0,02)	0,05 (± 0,03)
	r ²	0,999	0,999	0,999	0,998	0,998
	n	9	9	9	9	9
Exactitud	Baja (0,05 x 10 ⁻⁵ M)	92,3 ± 1,5	102,9 ± 1,1	94,4 ± 1,3	94,3 ± 1,9	96,5 ± 0,3
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	96,5 ± 0,4	101,3 ± 0,3	99,9 ± 0,3	91,9 ± 1,1	102,1 ± 0,1
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	99,5 ± 0,3	100,4 ± 0,1	99,8 ± 1,1	98,4 ± 0,5	100,6 ± 0,2
Precisión (%RSD inter-día)	Baja (0,05x 10 ⁻⁵ M)	1,56	1,95	1,97	1,45	1,64
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	0,87	1,69	0,67	1,22	1,51
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	0,65	0,81	1,77	1,28	1,28
Precisión (%RSD intra-día)	Baja (0,05 x 10 ⁻⁵ M)	0,89	1,49	1,91	1,15	0,91
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	0,64	1,22	0,44	1,55	0,19
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	0,43	0,62	0,82	1,13	0,40
% Recuperación (±DS)	Baja (0,05 x 10 ⁻⁵ M)	95,6 ± 0,2	101,2 ± 1,1	99,2 ± 1,2	92,4 ± 1,2	102,7 ± 1,3
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	98,2 ± 0,9	101,6 ± 0,3	108,5 ± 0,7	96,3 ± 1,6	104,4 ± 0,6
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	95,5 ± 0,3	98,8 ± 0,1	100,6 ± 1,9	98,5 ± 0,8	101,2 ± 0,2

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

4.3.4 Cuantificación de AZT, AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met en medio de cultivo TC199

Los estudios de permeabilidad intestinal de los profármacos **AZT-Suc-Fen-O-met**, **AZT-Suc-ILeu-O-met**, **AZT-Glu-Fen-O-met** y **AZT-Adi-Fen-O-met**, se cuantificaron empleando las mismas condiciones cromatográficas descritas en la Sección 4.3.2, salvo el gradiente de fase móvil utilizado, debido a que en las matrices de TC199 se encuentra el rojo fenol, que como se explicó anteriormente no puede eliminarse completamente de las muestras por el proceso de extracción. El gradiente de solventes utilizado para los métodos bioanalíticos, consistió en *buffer pH 2* (0,1 mM):MeOH (55:45 v/v) por 5 min, seguido por un cambio lineal de polaridad hasta llegar a (30:70 v/v) a los 6 min y se lo mantuvo constante hasta llegar a los 11 min; luego se volvió a la composición inicial y se lo dejó estabilizar entre cada inyección durante 2 min, más el tiempo entre inyección que fue de 1,5 min.

Los tiempos de retención para cada compuesto se detallan en la Tabla 4.7 y en las Figuras 4.15 - 4.19 se muestran los cromatogramas correspondientes, demostrando la selectividad de los métodos. Las curvas de calibrado se construyeron empleando un rango de concentración de los analitos desde $0,05 \times 10^{-5}$ M a $10,2 \times 10^{-5}$ M, cumpliéndose la linealidad en todo el rango evaluado. EL LD y LC se tomó como la menor concentración de analito cuantificada en la curva de calibrado. Los resultados de cada validación se detallan en la Tabla 4.8.

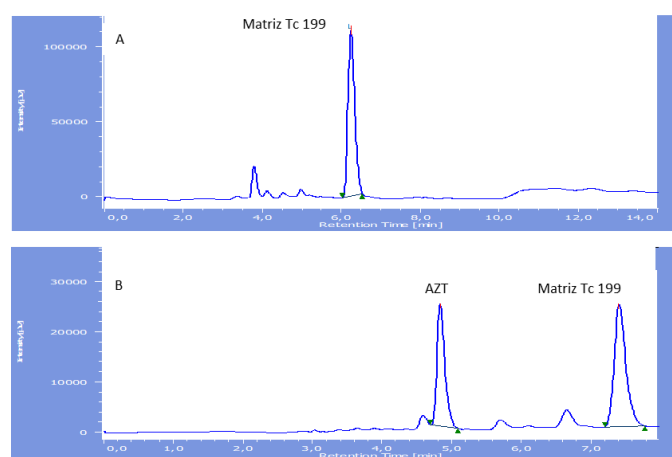


Figura 4.15. Selectividad para AZT.

A) Matriz TC199. B) Muestra correspondiente a AZT ($tr = 4,8$ min).

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

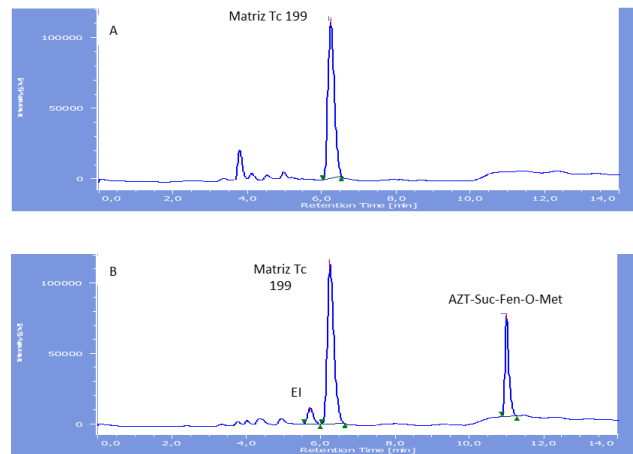


Figura 4.16 Selectividad para AZT-Suc-Fen-O-met.

A) Matriz TC199. B) Muestra correspondiente a AZT-Suc-Fen-O-met ($tr = 10,9$ min).

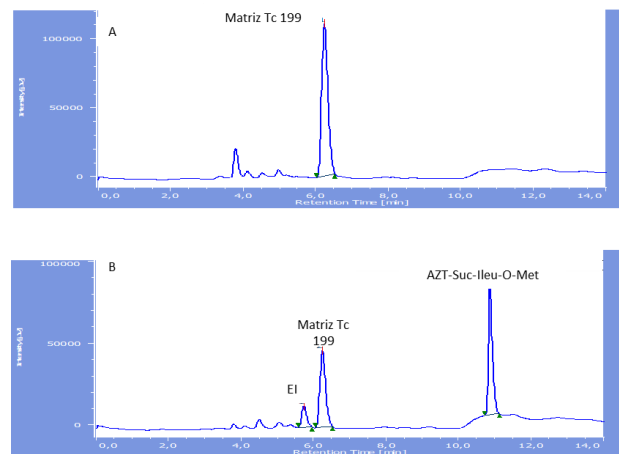


Figura 4.17 Selectividad para AZT-Suc-Ileu-O-met.

A) Matriz TC199. B) Muestra correspondiente a AZT-Suc-Ileu-O-met ($tr = 10,8$ min).

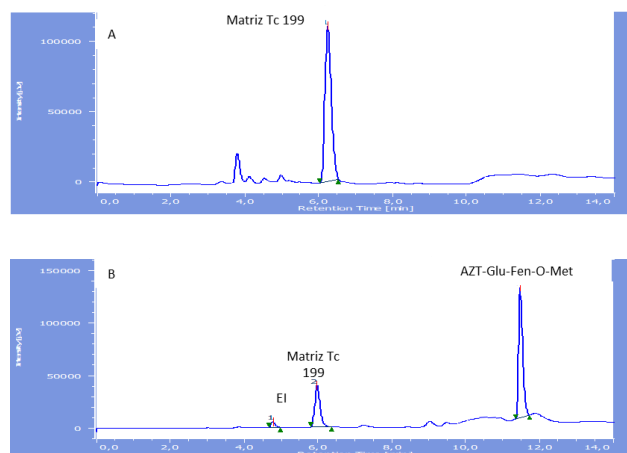


Figura 4.18 Selectividad para AZT-Glu-Fen-O-met.

A) Matriz TC199. B) Muestra correspondiente a AZT-Glu-Fen-O-met ($tr = 11,6$ min).

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

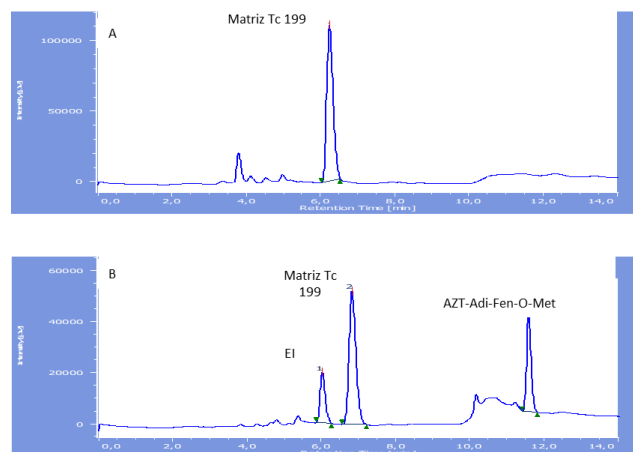


Figura 4.19 Selectividad para AZT-Adi-Fen-O-met TC199

A) Matriz TC199. B) Muestra correspondiente a AZT-Adi-Fen-O-met ($t_r = 11,8$ min).

Tabla 4.7: Tiempo de retención (t_r) para AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met, AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met.

Compuestos	t_r (min)
AZT	4,8
AZT-Suc-Fen-O-met	10,9
AZT-Suc-ILeu-O-met	10,8
AZT-Glu-Fen-O-met	11,6
AZT-Adi-Fen-O-met	11,8

Tabla 4.8. Parámetros validados para AZT, AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met, AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met en TC199

Parámetro		AZT	AZT-Suc-Fen-O-met	AZT-Suc-ILeu-O-met	AZT-Glu-Fen-O-met	AZT-Adi-Fen-O-met
Ecuación de la recta	Pendiente	1,55 (\pm 0,01)	2,23 (\pm 0,02)	2,17 (\pm 0,03)	0,88 (\pm 0,01)	0,71 (\pm 0,01)
	Ordenada al origen	0,04 (\pm 0,01)	0,07 (\pm 0,05)	0,09 (\pm 0,06)	0,03 (\pm 0,03)	0,05 (\pm 0,03)
	r ²	0,999	0,999	0,997	0,999	0,998
	n	9	9	9	9	9
Exactitud	Baja (0,051 x 10 ⁻⁵ M)	92,3 \pm 0,4	91,1 \pm 1,7	93,7 \pm 1,2	102,6 \pm 1,7	96,5 \pm 0,3
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	96,4 \pm 0,9	94,8 \pm 2,5	98,6 \pm 0,2	94,1 \pm 0,4	102,1 \pm 0,1
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	100,9 \pm 0,8	99,4 \pm 0,9	99,3 \pm 1,1	99,3 \pm 0,9	100,6 \pm 0,2
Precisión (%RSD inter-día)	Baja (0,051 x 10 ⁻⁵ M)	1,25	8,80	5,95	5,09	1,64
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	1,53	6,91	1,24	2,52	1,51
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	0,85	4,38	6,87	6,28	1,28
Precisión (%RSD intra-día)	Baja (0,051 x 10 ⁻⁵ M)	1,56	7,95	6,58	4,37	0,91
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	1,34	6,37	1,32	3,17	0,19
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	1,47	3,50	5,45	3,54	0,40
% Recuperación (\pm DS)	Baja (0,051 x 10 ⁻⁵ M)	98,2 \pm 0,1	93,8 \pm 0,7	96,8 \pm 0,7	98,6 \pm 1,4	102,7 \pm 1,3
	Media (1,02 x 10 ⁻⁵ M)	95,9 \pm 0,7	96,2 \pm 0,1	101,5 \pm 0,4	109,7 \pm 0,5	104,4 \pm 0,6
	Alta (10,2 x 10 ⁻⁵ M)	92,7 \pm 0,8	99,5 \pm 0,9	104,9 \pm 1,1	104,5 \pm 0,9	101,2 \pm 0,2

4.4 Conclusiones parciales

Ante la necesidad de obtener resultados seguros, confiables y reproducibles, se validaron los métodos analíticos y bioanalíticos para la cuantificación de los profármacos sintetizados, como así también para el principio activo. Estas metodologías de trabajo fueron validadas teniendo en cuenta los criterios de aceptación sugeridos por reconocidas agencias internacionales¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Estos lineamientos permitieron concluir que los métodos desarrollados y validados durante el desarrollo de esta Tesis, presentan parámetros analíticos adecuados para su aplicación en el laboratorio.

Se determinó que los procedimientos desarrollados mediante los análisis realizados, resultaron ser sensibles, exactos y precisos, con un buen grado de recuperación de la SPE, además de selectivos, ya que no se observaron interferencias de las matrices utilizadas con los compuestos de interés.

4.5 Materiales y métodos

4.5.1 Curva de calibrado y determinación de los parámetros de validación

Tanto las metodologías analíticas como las bioanalíticas, se validaron siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación. Para la construcción de las curvas de calibrado, se utilizaron sustancias sintetizadas previamente en el laboratorio, a excepción de AZT el cual fue donado por laboratorios Filaxis (Buenos Aires, Argentina). Se prepararon 3 curvas de calibrado diferentes, cada una conteniendo 9 muestras de concentraciones crecientes, que abarcan todo el rango de concentraciones de interés, con el agregado del EI en concentración constante. Para evaluar la **selectividad** del método, dentro de las muestras que constituyen la curva de calibrado, se incluyeron la matriz pura (Ma) y la matriz con EI (Mb).

Las curvas de calibrado se construyeron graficando la relación de Área Analito/Área EI en función de la relación de Concentración Analito/Concentración EI. La **linealidad** del rango de concentraciones empleado se determinó considerando los promedios de todos los puntos, con sus correspondientes desviaciones estándares, y de esta recta se determinaron los estimadores de regresión lineal (r^2 , a y b). En todos los casos, la linealidad se evaluó por el método de los cuadrados mínimos, utilizando las herramientas estadísticas de Microcal Origin v.8.0 para Windows.

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

Teniendo en cuenta el rango de concentraciones evaluadas, se determinó como **LD** y **LC** al punto más bajo de cada curva de calibrado, ya que este punto es la mínima concentración detectable y cuantificable de analito.

La **precisión**, se expresa matemáticamente como la desviación estándar, o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD, por sus siglas en inglés), Ec. 4.1. El criterio de aceptación varía según el nivel de precisión considerado,

$$\%RSD = \frac{100 \sigma}{X} \quad \text{Ec. 4.1}$$

donde, σ corresponde a la desviación de las medidas y X es la media poblacional. La precisión se determinó a tres concentraciones diferentes de la curva de calibrado (baja, media y alta). Para la determinación de la precisión intra-día se utilizaron 6 determinaciones realizadas en el mismo día, en cambio para las inter-día se utilizaron 6 puntos inyectados en dos días consecutivos (3 cada día).

La **exactitud** se determinó para concentraciones baja, media y alta, relacionando el valor de respuesta promedio hallado, con el valor esperado, según se describe en la Ec. 4.2

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Valor hallado}}{\text{Valor esperado}} * 100 \quad \text{Ec. 4.2}$$

En este Trabajo de Tesis, se evaluó la capacidad del método de extracción en fase sólida. Para ello, se determinó el porcentaje de recuperación durante el procedimiento de preparación y preparación de las muestras, mediante una curva de calibrado preparada en acetonitrilo (ACN), sin el proceso de SPE correspondiente, utilizando estas muestras como referencia de 100%. Estos valores se compararon con el promedio de las 3 curvas de calibrado, determinándose a 3 concentraciones (baja, media y alta) del rango utilizado.

En la Tabla 4.9 se muestran los criterios de aceptación utilizados para la validación de los métodos analíticos y bioanalíticos.

4. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos

Tabla 4.9. Criterios de aceptación para validaciones analíticas y bioanalíticas

Parámetro	Criterios de aceptación ^a	
	Analítico	Bioanalítico
Linealidad	$y = a x + b$ $r^2 \geq 0,998$	$y = a x + b$ $r^2 \geq 0,998$
Precisión inter e intra- día	% RSD $\leq 2,0$	% RSD $\leq 10,0^a$
Exactitud	90-110 %	90-110 %
Recuperación	Rec $\geq 90\%$	Rec $\geq 90\%$

^aInternational Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)¹⁶¹ y la guías para la industria de la Food and Drug Administration (FDA)¹⁵⁹.

Capítulo 5:
Conclusiones generales y
proyecciones

Capítulo 5: Conclusiones generales y Proyecciones

5.1 Conclusiones generales

El grupo de investigación donde se desarrolló este Trabajo de Tesis acredita numerosos antecedentes en el desarrollo de profármacos de AZT. Uno de los más representativo es el **AZT-Oxa**, el cual se utilizó como intermediario para la generación de nuevos profármacos, por conjugación con aminoácidos esenciales **AZT-Oxa-Aa**, diseñados principalmente para optimizar la biodisponibilidad que presenta AZT. Estos profármacos con ácido oxálico como espaciador, han demostrado propiedades fisicoquímicas de interés, pero ninguno de ellos ha exhibido beneficios significativos en lo referido a su performance *in vitro*, debido principalmente a su limitada estabilidad química.

La motivación para el rediseño y optimización de este tipo de profármacos, ha dado origen a las actividades e hipótesis propuestas en el presente Trabajo de Tesis. Se planteó como objetivo principal, la obtención de profármacos que mejoren las propiedades biofarmacéuticas subóptimas que presenta AZT. Para ello, se propuso obtener derivados por conjugación con ácidos dicarboxílicos de cadena lineal como el ácido succínico, glutárico y adípico (**AZT-Espaciador**, *Anexo I*), y luego conjugarlos con Aa-O-Met (**AZT-Espaciador-Aa-O-Met**, *Anexo I*), con el fin de obtener profármacos múltiples de AZT que optimicen las propiedades desfavorables del principio activo.

En una primera etapa se sintetizaron los derivados **AZT-Suc**, **AZT-Glu** y **AZT-Adi**, los cuales se obtuvieron por optimización de una estrategia sintética, la cual permitió generar ésteres de AZT por conjugación con diácidos de cadena alquílica lineal. Debido a que AZT-Oxa, presentaba una limitada estabilidad química, se realizaron ensayos en diferentes condiciones de pH, en los cuales se determinó que los derivados **1-3** presentan una mejora en la estabilidad química al compararlo con AZT-Oxa. Este mismo comportamiento, se observó en los estudios de estabilidad enzimática desarrollados en plasma humano, indicando que la separación de los grupos carbonilos en el *Espaciador* otorga una mayor estabilidad a los derivados sintetizados. En todos los ensayos de estabilidad, tanto química como enzimática, se observó como único producto de degradación a AZT (AZTreg), por lo cual estos derivados pueden regenerar el principio activo, lo cual es fundamental para el desarrollo correcto de un profármaco.

5. Conclusiones generales y Proyecciones

Continuando con la evaluación biofarmacéuticas de los derivados **1-3**, se realizaron estudios de afinidad por las proteínas plasmática, determinándose que estos derivados presentan mayor afinidad que el fármaco original y que se unen al sitio I de la ASH. Estos resultados se complementaron mediante estudios teóricos de unión a ASH, en los cuales se determinó que los derivados **1-3** establecen interacciones iónicas con Arg257 en el sitio I lo que le permite estabilizar la carga negativa que presentan. Dicha interacción explica el aumento de la afinidad de **AZT-Suc**, **AZT-Glu**, y **AZT-Adi**, frente a la ASH.

La última etapa de evaluación de los derivados *AZT-Espaciador*, fueron los estudios de permeabilidad intestinal, en los cuales se determinó que **1-3** atraviesan el epitelio intestinal como tales con una permeabilidad intrínseca menor a la de AZT. A su vez, durante el pasaje por el tejido los mismos son metabolizados regenerando el principio activo, siendo más extenso el metabolismo para **1 y 3** que para **2**. Al realizar los estudios de permeabilidad intestinal en presencia de un inhibidor de las proteínas de eflujo, se observó que solo **AZT-Glu** es susceptible a sufrir eflujo, en cambio **AZT-Suc** y **AZT-Adi** no son sustratos de ellas. Si bien los P_{app} observados no son superiores al de AZT, el cambio en el mecanismo de permeabilidad posibilita que algunos los derivados de no sean reconocidos por proteínas de eflujo y la presencia de especies de AZT con el 5'-OH protegido que impiden que el fármaco sea metabolizado, posibilitaría una mayor llegada a nivel sistémico de AZT y por consiguiente una posible optimización de las propiedades biofarmacéuticas.

Avanzando con los objetivos planteados, se sintetizaron 4 nuevos profármacos por conjugación de **1-3** con Fen-O-Met e ILeu-O-Met, obteniéndose **AZT-Suc-Fen-O-met**, **AZT-Suc-ILeu-O-met**, **AZT-Glu-Fen-O-met** y **AZT-Adi-Fen-O-met** (**4-7, Anexo 1**), a través de la generación de un enlace amida. Los derivados *AZT-Espaciador-Aa-O-met*, presentaron excelentes perfiles de estabilidad química, siendo estables a pH ácido y aumentando su inestabilidad en medios alcalinos. La adición del Aa-O-met, posibilitó que los profármacos regeneren el principio activo a una mayor velocidad, si se los compara **1 - 3**. La velocidad de hidrólisis depende tanto del largo de la cadena del espaciador, como del tipo de aminoácido utilizado. Los estudios de estabilidad en plasma humano, demostró nuevamente que la velocidad de hidrólisis es fuertemente dependiente de la estructura del compuesto, observándose dos procesos de degradación que corresponden a la hidrólisis de las uniones tipo éster que llevan a la regeneración del principio activo. En todos los casos se obtuvieron $t_{1/2}$ menores a las 4 h, indicando que la regeneración de AZT en el organismo sería compatible con la administración de fármacos en humanos.

5. Conclusiones generales y Proyecciones

En los estudios de afinidad en plasma humano de los profármacos **4-7**, determinó que los mismos presentan una alta afinidad por dichas proteínas, siendo 4 a 6 veces mayores que para AZT y que se unen al sitio II de la ASH, debido a que son desplazados por DZP. Esto último se confirmó mediante estudios computacionales, en los cuales se determinó que los profármacos evaluados interaccionan fuertemente con los residuos de dicha cavidad, pero no con los residuos que conforman la cavidad del sitio I. Este cambio en el sitio de unión posibilita que al regenerarse AZT, no se produzca una competición por el sitio de unión entre AZT y los profármacos, posibilitando así una optimización de la biodistribución del antiviral.

Por último, se determinó la permeabilidad intestinal, observándose que el paso de los profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-met depende principalmente de su estabilidad en la solución mucosal, como así también de procesos degradativos que suceden en el interior del enterocito. En particular, los derivados con Fen-O-met presentaron mayor susceptibilidad a la hidrólisis, comparado con ILeu-O-met. El profármaco **AZT-Adi-Fen-O-met**, presentó una velocidad de hidrólisis elevada generando principalmente el derivado demetilado (**AZT-Adi-Fen**). El derivado **AZT-Suc-Fen-O-met** originó un P_{app} inferior a **AZT**, pero no sufre eflujo a nivel intestinal, en cambio **AZT-Adi-Fen-O-met** si sufre eflujo a nivel intestinal, pero presenta un P_{app} mayor al de **AZT**.

En todos los casos se observó que los profármacos y/o sus metabolitos presentan mecanismos de difusión facilitada, lo cual hace suponer que debido a su estructura podrían ser reconocidos por transportadores de péptidos presentes en la cara apical de los enterocitos. Este fenómeno se observó con mayor notoriedad para **AZT-Adi-Fen-O-met**.

En conclusión, los profármacos AZT-Espaciador-Aa-O-Met podrían optimizar las propiedades biofarmacéuticas de AZT, ya sea por un mejoramiento en la permeabilidad (**AZT-Adi-Fen-O-met**), inhibición del metabolismo de primer paso hepático por presencia de especies con el 5'-OH protegido o por un aumento en la afinidad por la ASH sumado al cambio de sitio de unión que presentan los profármacos **4-7**. Todas estas particularidades hacen suponer que los profármacos con estructura Espaciador-Aa-O-met podrían optimizar la farmacoterapia de AZT. De esta manera estos profármacos como sus metabolitos pueden regenerar el principio activo para que el mismo pueda inhibir la replicación del virus.

5. Conclusiones generales y Proyecciones

5.2 Proyecciones

Considerando las características favorables que presentan **AZT-Suc-Fen-O-met**, **AZT-Suc-Ileu-O-met**, **AZT-Glu-Fen-O-met** y **AZT-Adi-Fen-O-met**, surgen numerosas perspectivas tendientes a un estudio y análisis más exhaustivo de las mismas.

Por lo tanto, uno de los próximos objetivos se encuentra orientado a realizar estudios farmacocinéticos *in vivo* en animales de experimentación, con el fin de obtener información sobre la biodistribución de los profármacos, el metabolismo hepático asociado al flujo sanguíneo y la concentración plasmática de los mismos como así también del AZT regenerado. Todos ellos son imprescindibles para continuar con la evaluación preclínica completa de estos profármacos.

Otro aspecto importante a estudiar, es la actividad biológica y la toxicidad de los profármacos, lo cual motiva a la medición de dichas propiedades en cultivos celulares.

Debido a la elevada afinidad de los profármacos por la ASH y al cambio en el sitio de unión, otra actividad que surge es el rediseño de nuevos profármacos manteniendo la estructura **AZT-Espaciador-Aa-O-met**, que optimicen aún más la afinidad frente a la ASH. Dichos estudios se podrían comenzar con una etapa teórica basándose en los estudios realizados en el presente Trabajo de Tesis, y de esta manera optimizar la búsqueda de profármacos, en los cuales se podrá evaluar cambios en el aminoácido, como así también la utilización de otros *Espaciadores* que mantengan la separación de los grupos carbonilos. Una vez realizado el estudio teórico, se podrá continuar con la síntesis y evaluación biofarmacéutica de los candidatos seleccionados.

Capítulo 6:
Bibliografía

6. Bibliografía

1. ONUSIDA. Hoja informativa 2017 [consultado 05 dic 2017]. Disponible en: <http://www.unaids.org>.
2. Gutiérrez, F. HIV/AIDS infection: The beginning of the end for today's greatest pandemic? *Rev. Clínica Española (English Ed.* 217, 468–472 (2017).
3. ONUSIDA. Monitoreo Global del SIDA 2017. Indicadores para el seguimiento de la Declaración Política de las Naciones Unidas sobre el VIH y el SIDA de 2016. (2017).
4. ONUSIDA. El SIDA en Cifras [consultado 05 dic 2017]. Disponible en: <http://www.unaids.org>. *El Sida en Cifras* (2015).
5. Chomont, N. y col. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* 15, 893–900 (2009).
6. Hurwitz, S. J. y Schinazi, R. F. Practical considerations for developing nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Drug Discov. Today. Technol.* 9, e175-226 (2012).
7. Arenzana-Seisdedos, F. La entrada viral como diana terapéutica. Situación actual de los inhibidores de la entrada. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26, 5–11 (2008).
8. Gutiérrez, F. Infección por el VIH/sida: ¿El principio del fin de la primera gran pandemia contemporánea? *Rev. Clin. Esp.* 217, 468 – 472 (2017).
9. Moir, S. y col. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 223 – 248 (2011).
10. Gutierrez, F. y col. Clinical outcome of HIV-infected patients with sustained virologic response to antiretroviral therapy: Long-term follow-up of a multicenter cohort. *PLoS One* 1, 1–7 (2006).
11. Walmsley, S. L. y col. Dolutegravir plus Abacavir–Lamivudine for the treatment of HIV-1 Infection. *N. Engl. J. Med.* 369, 1807–1818 (2013).
12. Fernando Bernal, Q. F. Farmacología de los Antirretrovirales. *Rev. Médica Clínica Las Condes* 27, 682–697 (2016).
13. Prieto, L. M. y col. Low rates of mother to child transmission of HIV-1 and risk factors for infection in Spain: 2000-2007. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31, 1053–1058 (2012).
14. Moreno, S. y col. Disorders of body fat distribution in HIV-1 infected patients. *Aids Rev.* 10, 36–46 (2010).
15. Masiá, M. y col. The role of C-reactive protein as a marker for cardiovascular risk

6. Bibliografía

- associated with antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis* 195, 167 – 171 (2007).
16. Marshall, J. y col. Re-emergence of HIV microscopic chaos from. *Nature* 401, 874 – 875 (1999).
 17. Alexaki, A. y col. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr. HIV Res.* 6, 388 – 400 (2008).
 18. Codina, C., y col. in *Farmacia Hospitalaria* 1493–1516 (2002).
 19. Turner, B. G. y Summers, M. F. Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* 285, 1–32 (1999).
 20. De Clercq, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int. J. Antimicrob. Agents* 33, 307 – 320 (2009).
 21. Danial, M. y col. Combination anti-HIV therapy via tandem release of prodrugs from macromolecular carriers. *Polym. Chem.* 7, 7477 – 7487 (2016).
 22. Words, K. y col. Targets for inhibition of HIV replication: Entry, enzyme action, release and maturation. *Intervirology* 55, 84 – 97 (2012).
 23. Eckhardt B. y Gulick O. in *Haemophilia*. 6, 79 – 83 (2000).
 24. Höschele, D. Cell culture models for the investigation of NRTI-induced mitochondrial toxicity. Relevance for the prediction of clinical toxicity. *Toxicol. Vitro.* 20, 535 – 546 (2006).
 25. Pau, A. K. y Jomy M. George. Antiretroviral therapy. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 28, 371 – 402 (2014).
 26. D’Andrea, G. y col. AZT: An old drug with new perspectives. *Curr. Clin. Pharmacol.* 3, (2008).
 27. Quevedo, M. A. y col. Binding to human serum albumin of zidovudine (AZT) and novel AZT derivatives. Experimental and theoretical analyses. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 2779 – 2790 (2008).
 28. Dalpiaz, A. y col. Zidovudine and ursodeoxycholic acid conjugation: Design of a new prodrug potentially able to bypass the active efflux transport systems of the central nervous system. *Mol. Pharm.* 9, 957 – 968 (2012).
 29. Sengupta, S. y Siliciano, R. F. Targeting the Latent Reservoir for HIV-1. *Immunity* 48, 872 – 895 (2018).
 30. Zhang, J. C. y col. Expression levels of P-glycoprotein in peripheral blood CD8+ T lymphocytes from HIV-1-infected patients on antiretroviral therapy. *Int. J. Mol. Med.* 33 , 431 – 440 (2014).

6. Bibliografía

31. Kumar, P. y col. Improved safety, bioavailability and pharmacokinetics of zidovudine through lactoferrin nanoparticles during oral administration in rats. *PLoS One*. 10, 1 – 17 (2015).
32. Sastry, G. y Sudhir, G. Expression levels of P-glycoprotein in peripheral. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 1002–1007 (1990).
33. Ettmayer, P. y col. Lessons learned from marketed and investigation prodrugs. *Am. Chem. Soc.* 47, 2393–2404 (2004).
34. Lombardino, J. G. y Lii, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery .Then and now. *Nat. Rev.* 3, 853–862 (2004).
35. Ekins, S. y col. Techniques : Application of systems biology to absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity. *Tends Pharmacol. Sci.* 26, 202–209 (2005).
36. Kubinyi, H. Drug research: myths, hype and reality. 2, 5–8 (2003).
37. Testa, B. Prodrugs: Bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 338–344 (2009).
38. Cabrera, S. y col. Profármacos : pasado, presente y futuro. *An. Quím.* 106, 207–214 (2010).
39. Abet, V. y col. Chemistry prodrug approach : An overview of recent cases. *Eur. J. Med. Chem.* 127, 1–18 (2016).
40. Casey Laizure, S. y col. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: Have we overlooked their importance? *Pharmacotherapy.* 33, 210–222 (2013).
41. Vistoli, G. y col. In silico prediction of human carboxylesterase-1 (hCES1) metabolism combining docking analyses and MD simulations. *Bioorganic Med. Chem.* 18, 320–329 (2010).
42. Jornada, D. H. y col. The prodrug approach: A successful tool for improving drug solubility. *Molecules.* 21, 1–31 (2016).
43. Redasani, V. K. y Bari, S. B. Approaches for Prodrugs. *Prodrug Des. Perspect. approaches Appl. Med. Chem.* 33–48 (2015).
44. Vig, B. S. y col. Amino acids as promoieties in prodrug design and development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1370–1385 (2013).
45. Nasa, P. y Phougat, P. Prodrug : A novel approach of drug delivery. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 25, 188–191 (2014).
46. Anastasi, C. y col. Are 5'-O-Carbamate-2',3'-dideoxythiacytidine new anti-HIV and anti-hbv nucleoside drugs or prodrugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 2459–2463 (2003).

6. Bibliografía

47. Vlieghe, P. y col. New 3'-azido-3'-deoxythymidin-5'-yl O-(4-hydroxyalkyl or -alkenyl or -alkylepoxide) carbonate prodrugs: Synthesis and anti-HIV evaluation. *J. Med. Chem.* 44, 3014–3021 (2001).
48. Moroni, G. N. y col. Synthesis and in vitro antibacterial activity of novel 5'-O-analog derivatives of zidovudine as potential prodrugs. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 21, (2002).
49. Motura, M. I. y col. 3'-azido-3'-deoxy-5'-O-isonicotinoylthymidine, a new prodrug of zidovudine. Synthesis, solid state characterization, and anti HIV-1 activity. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 21, 217–230 (2002).
50. Santos, C. y col. Dipeptide derivatives of AZT: Synthesis, chemical stability, activation in human plasma, hPEPT1 affinity, and antiviral activity. *Chem Med Chem.* 3, 970–978 (2008).
51. Aggarwal, S. K y col. Synthesis and Biological Evaluation of Prodrugs of Zidovudine. *J. Med. Chem.* 33, 1505–1510 (1990).
52. Sharma, A. P. y col. Synthesis and anti-HIV activity of prodrugs of azidothymidine. 4, 93–96 (1993).
53. Hong, C. I. y col. Nucleoside conjugates. Synthesis and biological activity of anti-HIV nucleoside conjugates of ether and thioether phospholipids. *J. Med. Chem.* 39, 1771–1777 (1996).
54. Namane, A. y col. Improved brain delivery of AZT using a glycosyl phosphotriester prodrug. *J. Med. Chem.* 35, 3039–3044 (1992).
55. Turk, G. y col. Antiretroviral activity and cytotoxicity of novel zidovudine (AZT) derivatives and the relation to their chemical structure. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 20, 282–288 (2002).
56. Quevedo, M. A. y col. Human serum albumin binding of novel antiretroviral nucleoside derivatives of AZT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 954–960 (2001).
57. Quevedo, M. A. y Briñon, M. C. In vitro and in vivo pharmacokinetic characterization of two novel prodrugs of zidovudine. *Antiviral Res.* 83, 103–111 (2009).
58. Quevedo, M., y col. P-glycoprotein limits the absorption of the anti-HIV drug zidovudine through rat intestinal segments. *Eur. J. Pharm. Sci.* 43, 151–159 (2011).
59. Mahdi, M. F. y Alsaad, H. N. Design, synthesis and hydrolytic behavior of mutual prodrugs of NSAIDs with gabapentin using glycol spacers. *Pharmaceuticals (Basel)*, 5, 1080–91 (2012).
60. Otera, J. Esterification: Methods, Reactions and Applications By J. Otera. *Wiley VCH:*

6. Bibliografía

- Weinheim. 2003. *Organic Process Research & Development*. (2004).
61. Akiyama, T. Stronger Brønsted acids. *Chem. Rev.* 107, 5744–5758 (2007).
 62. Lortie, R. Enzyme catalyzed esterification. *Biotechnol. Adv.* 15, 1–15 (1997).
 63. Mirzarakhmetova, D. T. Enzymatic esterification of carboxylic acids and higher alcohols in organic medium. *Eng. Technol.* 64, 743–745 (2012).
 64. Vlieghe, P. y col. Synthesis and anti-HIV evaluation. *J. Med. Chem.* 44, 777–786 (2001).
 65. Lazrek, H. B. y col. A glutaric acid ester as carrier system for sustained delivery of lamuvidine (3TC) dimers. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 26, 1103–1106 (2007).
 66. Trabelsi, I. y col. Synthesis of mixed anhydrides of fatty acids: stability and reactivity. *Ind. Crops Prod.* 97, 552–557 (2017).
 67. Neises, B. y Steglich, W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angew. chemie Int.* 17, 522–524 (1978).
 68. Steglich, W. Esterification of carboxylic acids with dicyclohexylcarbodiimide/4-dimethylaminopyridine: tert-butyl ethyl fumarate. *Org. Synth.* 63, 183–184 (1985).
 69. Sam, S. y col. Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. *Langmuir.* 26, 809–814 (2010).
 70. Takács, E. y col. Synthesis of new steroidal derivatives by the reaction of steroid-amino acid conjugates with N,N-dicyclohexyl-carbodiimide. Unusual formation of steroidal imide derivatives. *Tetrahedron.* 65, 4659–4663 (2009).
 71. Gilles, V. y col. A new, simple and efficient method of steglich esterification of juglone with long chain fatty acids: synthesis of a new class of non-polymeric wax deposition inhibitors for crude oil. *J. Braz. Chem. Soc.* 26, 74–83 (2015).
 72. Montalbetti, C y Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron.* 61, 10827–10852 (2005).
 73. Iwasawa, T. y col. Reaction of an introverted carboxylic acid with carbodiimide. *Tetrahedron* 63, 6506–6511 (2007).
 74. Aubin, D. y col. One and two dimensional NMR techniques for biopharmaceuticals *Techniques for Biopharmaceuticals. S.A. Berkowitz (Ed.), Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals (2015). 341-383*
 75. Ribone, S. R. y col. Evaluation and synthesis of AZT prodrugs with optimized chemical stabilities: experimental and theoretical analyses. *New J. Chem.* 40, (2016).
 76. Kirkpatrick, S. y col. Optimization by simulated annealing. *Science.* 220, 671–680 (2009).
 77. Wang, J. M. y col. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput.*

6. Bibliografía

- Chem.* 25, 1157–1174 (2004).
78. Salomon-Ferrer, R. y col. An overview of the AMBER biomolecular simulation package. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 3, 198–210 (2013).
 79. Becker, O. M. *Conformational Analysis. Computational Biochemistry and Biophysics* (2001).
 80. Lee, C. y col. Development of the Colic-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* 37, (1988).
 81. Tomasi, J. y col. Quantum Mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* 105, 2999–3093 (2005).
 82. Improta, R. y col. A state-specific polarizable continuum model time dependent density functional theory method for excited state calculations in solution. *J. Chem. Phys.* 125, (2006).
 83. Improta, R. y col V. Toward effective and reliable fluorescence energies in solution by a new state specific polarizable continuum model time dependent density functional theory approach. *J. Chem. Phys.* 127, 1–9 (2007).
 84. Frisch, M. J. y col. Gaussian 09, Revision D.01. *Gaussian Inc.* Wallingford CT (2009).
 85. McIver, J. W. y Komornicki, A. Structure of transition states in organic reactions. General theory and an application to the cyclobutene-butadiene isomerization using a semiempirical molecular orbital method. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 2625–2633 (1972).
 86. P. Atkins y J. de Paula, *Physical Chemistry*, Oxford University Press, New York, 8th edn, 2006.
 87. Roe, D. R. y Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J Chem Theory Com.* 9, 3084–3095 (2013).
 88. Anagha A. y Damre, K. The Significance and Determination of Plasma Protein Binding. *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions. III:1–18. Encycl. Drug Metab. Interact.* 1–18 (2012).
 89. Bonate, P. L. Pharmacokinetics. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* 3, 332–342 (2011).
 90. Pellegatti, M. y col. Plasma protein binding and blood-free concentrations: which studies are needed to develop a drug? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7, 1009–1020 (2011).
 91. Ghuman, J. y col. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 353, 38–52 (2005).
 92. Zhu, L. y col. A new drug binding subsite on human serum albumin and drug-drug interaction studied by X-ray crystallography. *J. Struct. Biol.* 162, 40–49 (2008).

6. Bibliografía

93. Sudlow, G. y col. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* 11, 824–832 (1975).
94. Kragh-Hansen, U. y col. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 695–704 (2002).
95. Zsila, F. y col. Evaluation of drug-human serum albumin binding interactions with support vector machine aided online automated docking. *Bioinformatics.* 27, 1806–1813 (2011).
96. Caldwell, G. W. Optimization in drug discovery. *In vitro Methods.* (2014).
97. Li, B. y col. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem. Pharmacol.* 70, 1673–1684 (2005).
98. Fu, J. y col. Interspecies differences in the metabolism of a multiester prodrug by carboxylesterases. *J. Pharm. Sci.* 105, 989–995 (2016).
99. Bahar, F. y col. Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma. *J. Pharm. Sci.* 1–10 (2012).
100. Howard, M. L. y col. in *Combinatorial chemistry; high throughput screening.* 13, 170–187 (2010).
101. Hartman, D. A. Determination of the stability of drugs in plasma. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 1–8 (2003).
102. Zhang, F. y col. Compilation of 222 drugs plasma protein binding data and guidance for study designs. *Drug Discov. Today.* 17, 475–85 (2012).
103. Schenfeld, E. M. y col. Stability and plasmatic protein binding of novel zidovudine prodrugs: Targeting site ii of human serum albumin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 115, 109–118 (2018).
104. Yang, F. y col. Effect of human serum albumin on drug metabolism: Structural evidence of esterase activity of human serum albumin. *J. Struct. Biol.* 157, 348–355 (2007).
105. OpenEye.Scientific.Software <http://www.eyesopen.com>. (2018)
106. Omega.2.4.3 OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM <http://www.eyesopen.com>. (2018)
107. Fred.3.0.0. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM <http://www.eyesopen.com>. (2018)
108. Miller, B. R. y col. MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations. *J. Chem. Theory Comput.* 8, 3314–3321 (2012).
109. Case, D.A. y col., AMBER 2017, University of California, San Francisco. (2017).
110. Wang, J. y col. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* 25, 1157-1174,(2004).

6. Bibliografía

111. Kollman, P. *y col.* Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.* 33, 889–897 (2000).
112. Humphrey, W. *y col.* VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38 (1996).
113. Wallace, A. *y col.* LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* 8, 127–134 (1995).
114. Donald J.A. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, sixth ed., Wiley- VCH, New York, 2003.
115. Moore K. *y col.* Pharmacokinetics and bioavailability of zidovudine and its glucuronidated metabolite in patients with human immunodeficiency virus infection and hepatic disease (AIDS Clinical Trials Group Protocol 062). *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2732–2737 (1995).
116. Buckley S. *y col.* In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45, 235–250 (2012).
117. Harvey L. *y col.* *Molecular Cell Biology.* (2000).
118. Imai, T. *y* Ohura, K. The role of intestinal carboxylesterase in the oral absorption of prodrugs. *Curr. Drug Metab.* 11, 793–805 (2010).
119. Ambudkar, S. V. *y col.* The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 392–400 (2006).
120. Szakács, G. *y col.* The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov. Today* 13, 379–393 (2008).
121. Chan, L. *y col.* The ABCs of drug transport in intestine and liver: Efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 25–51 (2004).
122. Taketani, M. *y col.* Carboxylesterase in the liver and small intestine of experimental animals and human. *Life Sci.* 81, 924–32 (2007).
123. Panhard, X. *y col.* Population pharmacokinetic analysis of lamivudine, stavudine and zidovudine in controlled HIV-infected patients on HAART. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 63, 1019–1029 (2007).
124. Eilers, M. *y col.* MRP (ABC) Transporters-Mediated Efflux of Anti-HIV Drugs, Saquinavir and Zidovudine, from Human Endothelial Cells. *Exp. Biol. Med.* 233, 1149–1160 (2008).
125. Varatharajan, L. *y* Thomas, S. A. The transport of anti-HIV drugs across blood-CNS interfaces: Summary of current knowledge and recommendations for further research.

6. Bibliografía

- Antiviral Res.* 82, 99–109 (2009).
126. Alam, M. y col. Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: Limitations and applications. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 326–336 (2012).
 127. Gualdesi, M. S. y col. Intestinal permeability of lamivudine (3TC) and two novel 3TC prodrugs. Experimental and theoretical analyses. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 965–978 (2012).
 128. Ferrec, E. y col. In Vitro models of the intestinal barrier. *Atla* 29, 649–668 (2001).
 129. Wilson, B. y Wiseman, G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J. Physiology.* 123, 116–125 (1954).
 130. Barthe, L. y col. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 13, 154–168 (1999).
 131. Onnainty, R. y col. Permeability Profiles and Intestinal Toxicity Assessment of Hydrochlorothiazide and Its Inclusion Complex with β -Cyclodextrin Loaded into Chitosan Nanoparticles. *Mol. Pharm.* 13, 3736–3746 (2016).
 132. Dixit, P. y col. Standardization of an ex vivo method for determination of intestinal permeability of drugs using everted rat intestine apparatus. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 65, 13–7 (2012).
 133. Dezani, A. y col. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 67, 194–202 (2013).
 134. Schiffelers, M. J. y col. Regulatory acceptance and use of 3R models for pharmaceuticals and chemicals: Expert opinions on the state of affairs and the way forward. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69, 41–48 (2014).
 135. Pasupuleti, M. K. y col. Ethical guidelines, animal profile, various animal models used in periodontal research with alternatives and future perspectives. *J. Indian Soc. Periodontol.* 20, 360 (2016).
 136. Richmond, J. Refinement, Reduction, and Replacement of Animal Use for Regulatory Testing: Future Improvements and Implementation Within the Regulatory Framework. *ILAR. J.* 43, S63–S68 (2002).
 137. Lifschitz, A. y col. Combined use of ivermectin and triclabendazole in sheep: in vitro and in vivo characterisation of their pharmacological interaction. *Vet. J.* 182, 261–268 (2009).
 138. Quevedo, M. A. y col. In vitro and in vivo pharmacokinetic characterization of two novel prodrugs of zidovudine. *Antiviral Res.* 83, 103–111 (2009).
 139. Barthe, L. y col. The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-

6. Bibliografía

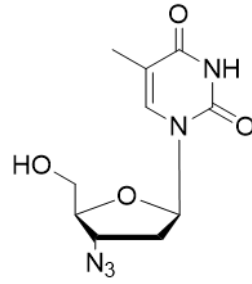
- glycoprotein. *Int. J. Pharm.* 173, 255–258 (1998).
140. Dahan, A. y Amidon, G. L. Small intestinal efflux mediated by MRP2 and BCRP shifts sulfasalazine intestinal permeability from high to low, enabling its colonic targeting. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 297, G371–G377 (2009).
141. Pastor-Anglada, M. y col. Cell entry and export of nucleoside analogues. *Virus Res.* 107, 151–164 (2005).
142. Pan, G. y col. Abcg2/Bcrp1 mediates the polarized transport of antiretroviral nucleosides abacavir and zidovudine. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1165–1173 (2007).
143. Hamada, Y. Recent progress in prodrug design strategies based on generally applicable modifications. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 27, 1627–1632 (2017).
144. MacDougall, C. y Guglielmo, B. J. Pharmacokinetics of valaciclovir. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 899–901 (2004).
145. Estudante, M. y col. Intestinal drug transporters: An overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1340–1356 (2013).
146. Giacomini, K. M. y col. Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 215–236 (2010).
147. Brandsch, M. y col. The intestinal H⁺/peptide symporter PEPT1: Structure-affinity relationships. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 53–60 (2004).
148. Joullié, M. y Lassen, K. Evolution of amide bond formation. *ARKIVOC* 2010, 189–250 (2010).
149. Jad, Y. E. y col. TOMBU and COMBU as Novel Uronium-type peptide coupling reagents derived from Oxyma-B. *Molecule.* 19, 18953–65 (2014).
150. Subirós-Funosas, R. y col. Oxyma: An efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chem. A Eur. J.* 15, 9394–9403 (2009).
151. Jad, Y. E. y col. Oxyma-T, expanding the arsenal of coupling reagents. *Tetrahedron Lett.* 57, 3523–3525 (2016).
152. El-Faham, A. y col. Ketoamino acid ester derivatives as promising MAO inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 25, 70–74 (2015).
153. El-Faham, A. y col. OxymaPure/DIC: An Efficient Reagent for the Synthesis of a Novel Series of 4-[2-(2-Acetylamino-phenyl)-2-oxo-acetylamino] Benzoyl Amino Acid Ester Derivatives. *Molecules.* 18, 14747–14759 (2013).
154. Li, J. y Sha, Y. A convenient synthesis of amino acid methyl esters. *Molecules.* 13, 1111–1119 (2008).

6. Bibliografía

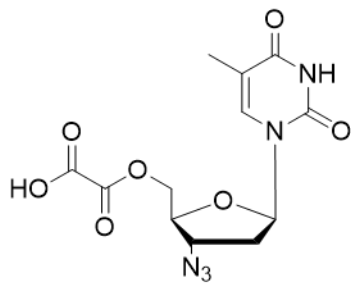
155. Deruiter, J. Amides and related functional groups. *Princ. Drug Action.* 1, 1–16 (2005).
156. Bhattacharya, A. y col. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 303, 721–732 (2000).
157. Del Amo, E. y col. Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. *Eur. J. Pharm. Sci.* 35, 161–174 (2008).
158. Farmacopea Argentina, 2011.
159. Department of Health and Human Services. Food and drug administration (US). guidance for industry, bioanalytical and method validation. Rockville (MD); 2001.
160. Locatelli, M. y col. Recent application of analytical methods to phase I and phase II drugs development: a review. *Biomed. Chromatogr.* 26, 283-300, (2011).
161. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Harmonised tripartite guideline Q2(R1). Validation of analytical procedures: Text and methodology; 2005.
162. Quattrocchi O. y col. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. (1992).
163. Europe Medicine Agency (EMA). Guideline on bioanalytical method validation. London.
164. Shrivastava, A. y Gupta, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci.* 2, 21 (2011).
165. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry: bioanalytical method validation. U.S.
166. Food and Drug Administration (FDA) .Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. U.S.
167. Ich. ICH Topic Q2 (R1) Validation of analytical procedures : Text and methodology. *Int. Conf. Harmon.* (2005).

Anexo I

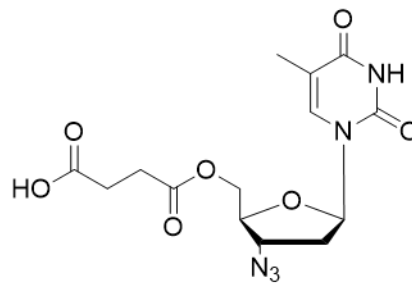
*Estructuras de los derivados 1 - 3 y
de los profármacos 4 - 7*



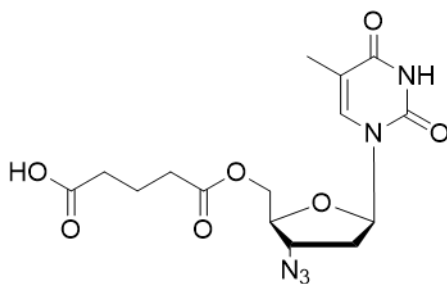
AZT



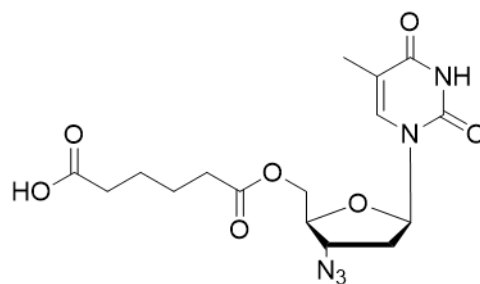
AZT-Oxa



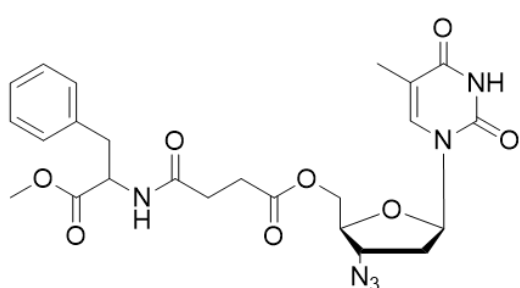
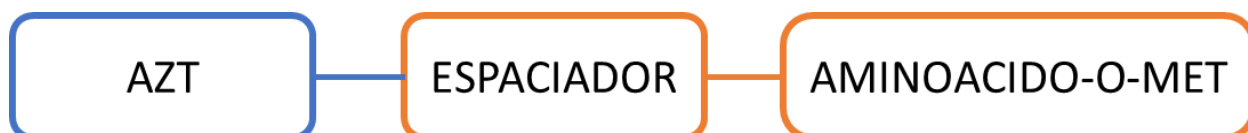
AZT-Suc (1)



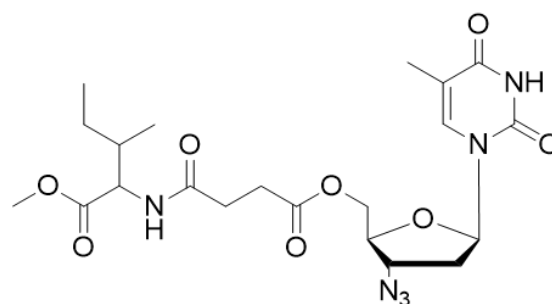
AZT-Glu (2)



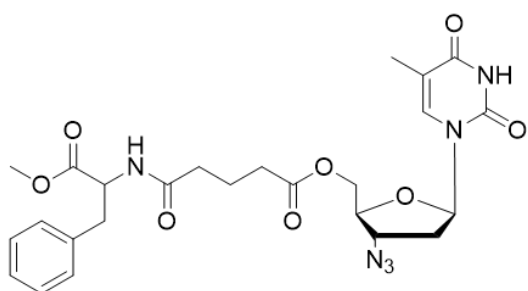
AZT-Adi (3)



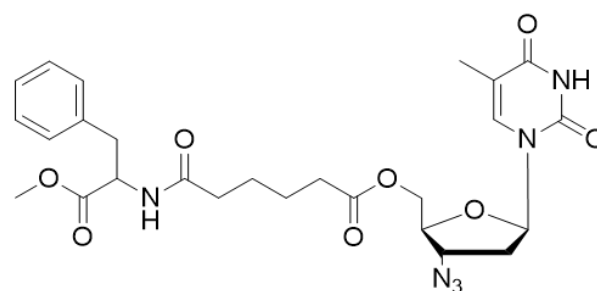
AZT-Suc -Fen-O-met (4)



AZT-Suc -Ileu-O-met (5)



AZT-Glu -Fen-O-met (6)

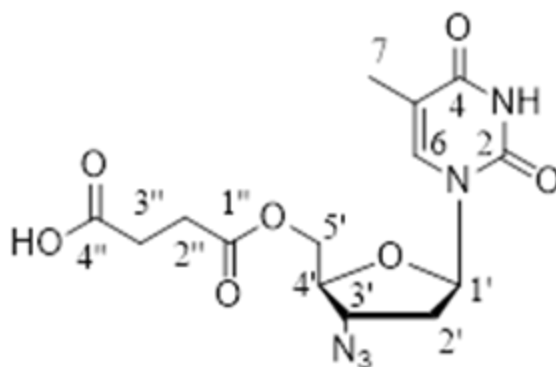


AZT-Adi -Fen-O-met (6)

Anexo II

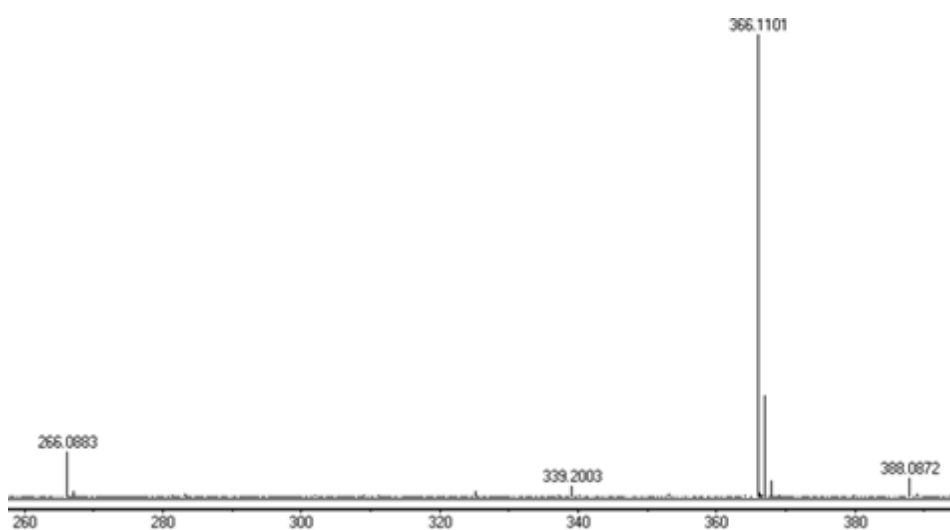
Espectros de RMN y HRMS

AZT-Suc (1)

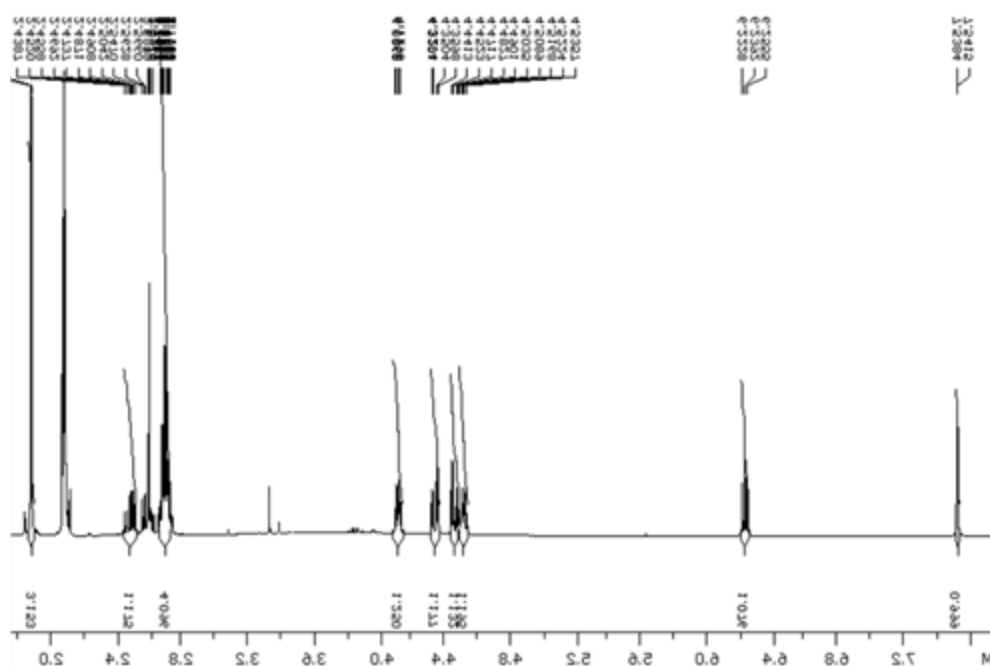


Nombre: Ácido 3'-Azido deoxy-5'-O-succiniltimidina

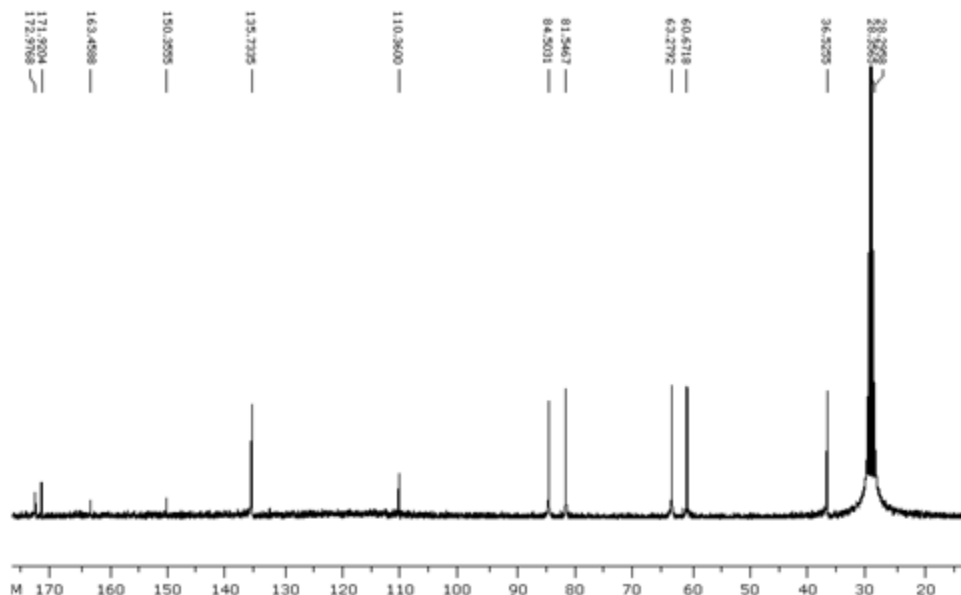
HRMS



m/z $C_{14}H_{16}N_5O_7^-$ [M-H]⁻: calculado: 366,1055; experimental 366,1101.

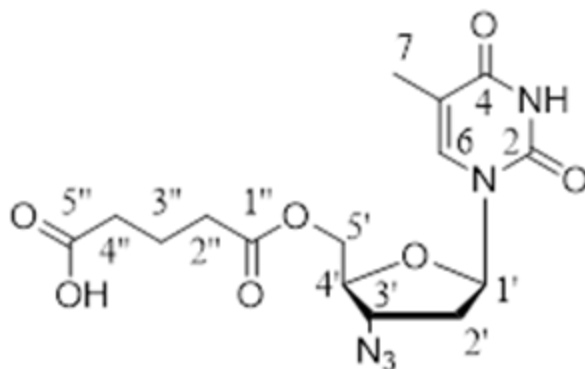
¹H-RMN

¹H-RMN (400 MHz, Acetona-d₆): δ [ppm] = 1,87 [d, 3H, J = 1,2 Hz, 7H], 2,52 [dm, 2H, J = 26,2 Hz, 2'H], 2,69 [m, 4H, J = 25,2, 2''H y 3''H], 4,11 [c, 1H, J = 13,4 Hz, 4'H], 4,40 [dd, 2H, J = 16,6Hz, 5H], 4,51 [dt, 1H, J = 18,0 Hz, 3'H], 6,24 [t, 1H, J = 13,1 Hz, 1'H], 7,54 [d, 1H, J = 1,2 Hz, 6H].

¹³C-RMN

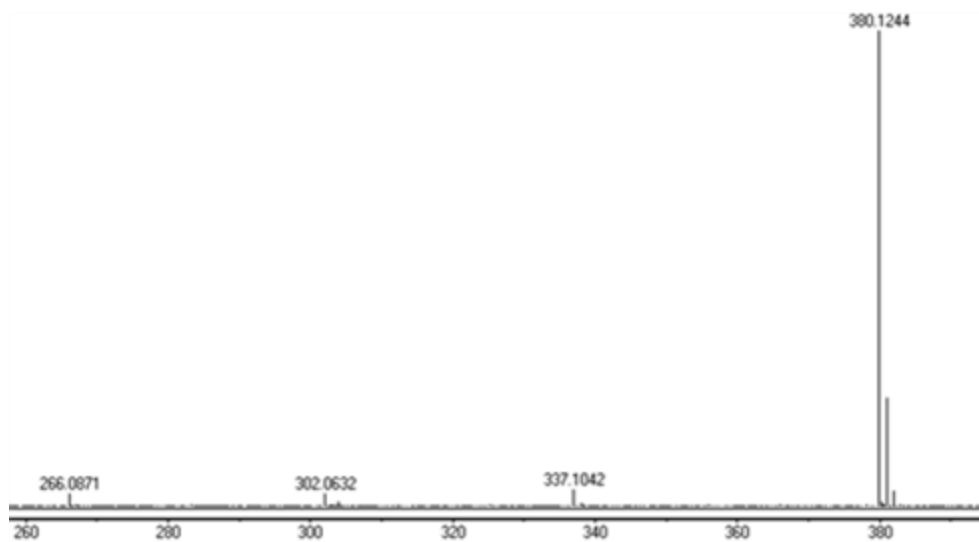
¹³C-RMN (100,63 MHz, Acetona-d): δ [ppm] = 11,59 [C7], 28,30 [C3'], 28,36 [C2'], 36,53 [C2], 60,67 [C3], 63,27 [C5], 81,55 [C4], 84,50 [C1], 110,36 [C5], 135,73 [C6], 150,36 [C2], 163,46 [C4], 171,92 [C1''], 172,98 [C4''].

AZT-Glu (2)



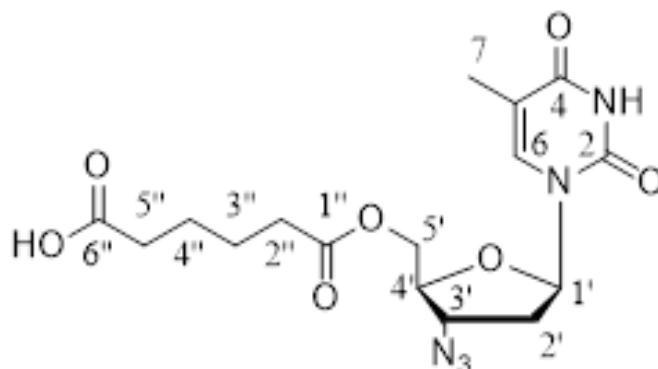
Nombre: Ácido 3'-Azido deoxy-5'-O-glutariltimidina

HRMS



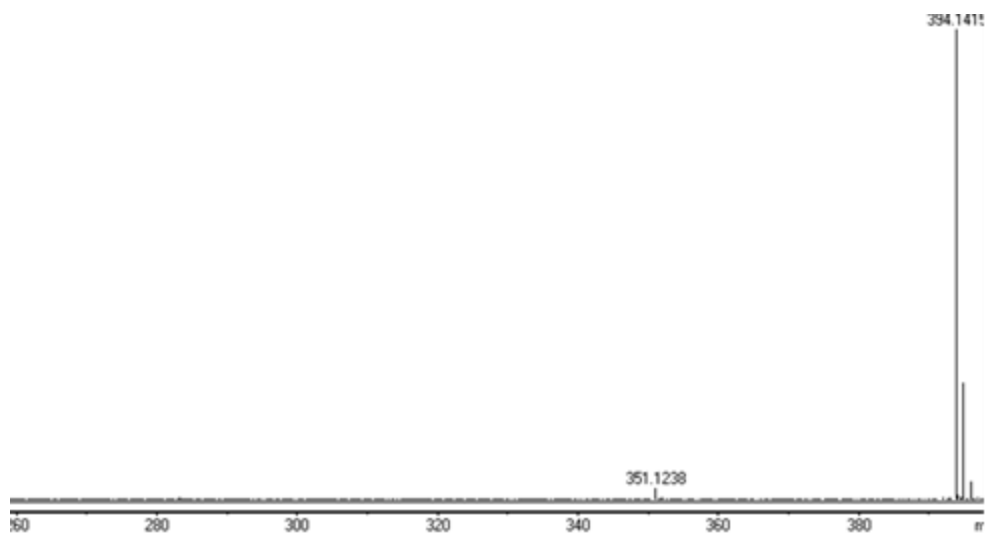
m/z $C_{15}H_{18}N_5O_7^-$ $[M-H]^-$: calculado: 380,1212; experimental 380,1244

AZT-Adi (3)



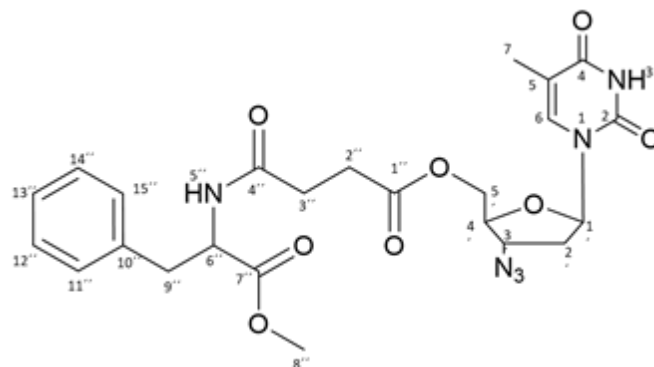
Nombre: Ácido 3'-Azido deoxy-5'-O-adipitimidina.

HRMS



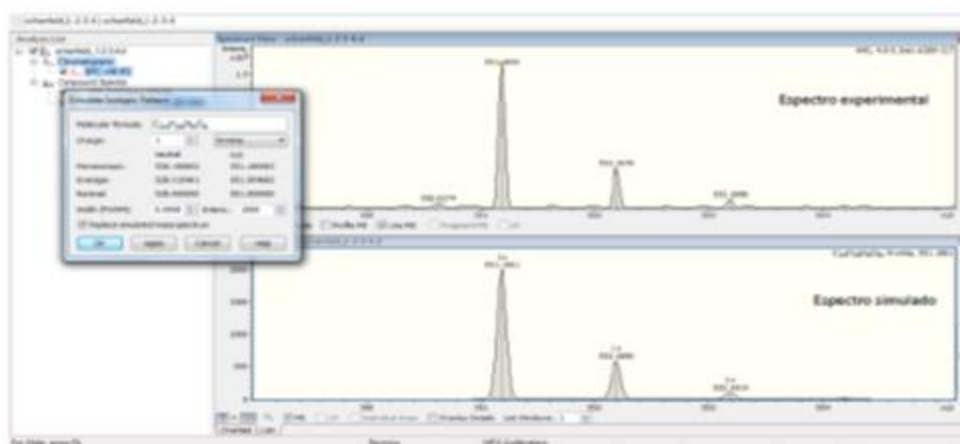
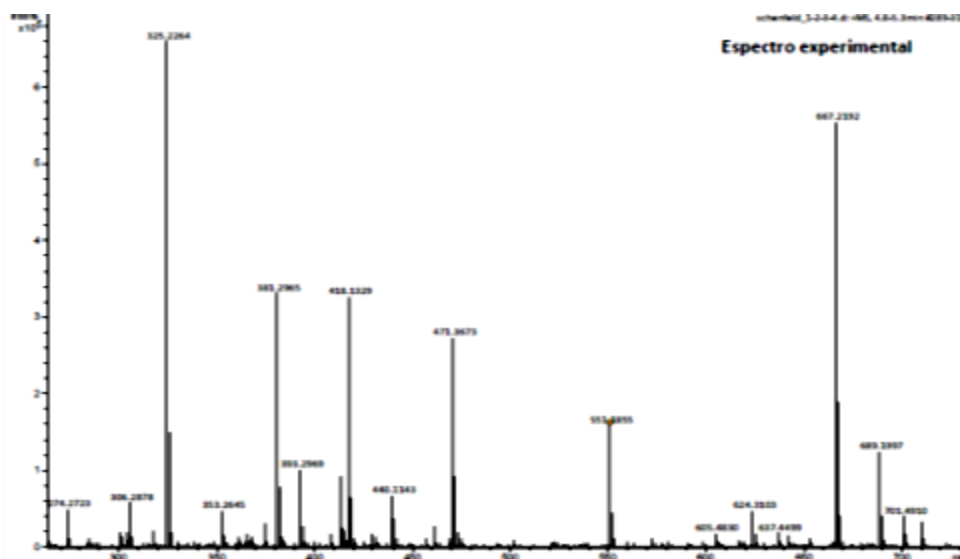
m/z $C_{16}H_{20}N_5O_7^-$ $[M-H]^-$: calculado: 394,1368; experimental 394,1415.

AZT-Suc-Fen-O-Met (4)



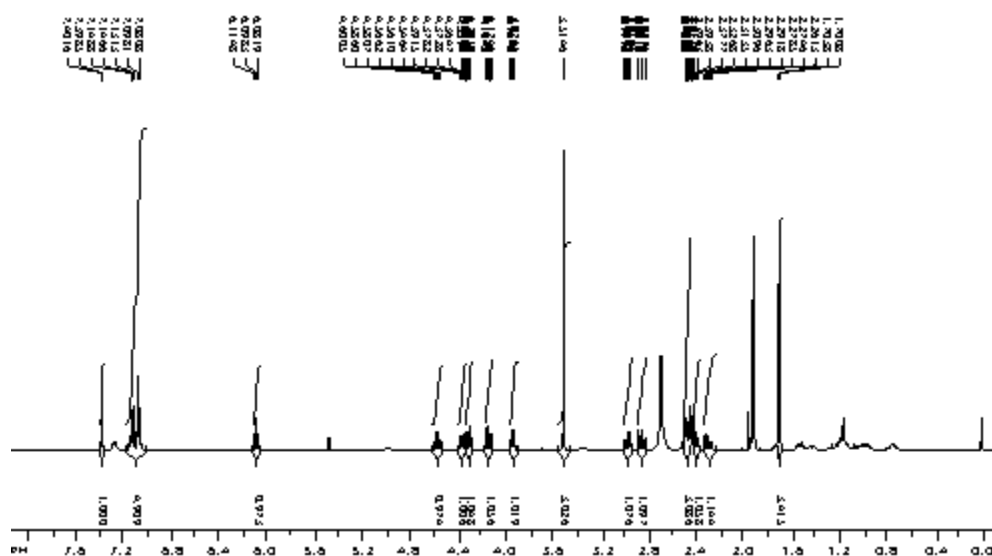
Nombre: 3'-Azido-3'-deoxi-5'-O-succinil-N-metoxifenilalanina timidina

HRMS



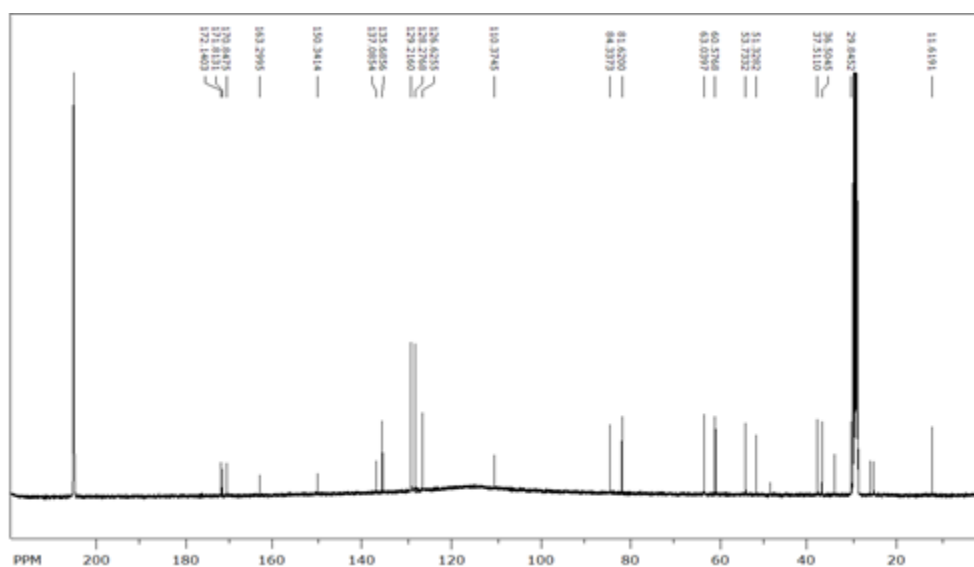
m/z C₂₄H₂₈N₆O₈Na [M+Na]⁺: calculado 551,861, experimental 551,855.

¹H-RMN



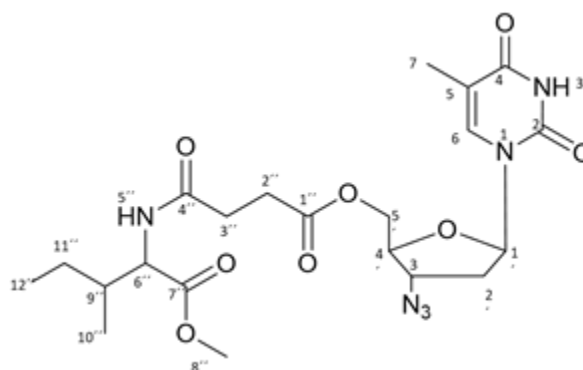
¹H-RMN (400 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 1,70 [M, 3H, J = 1,2 Hz, 7-H], 2,37 [M, 1H, J = 22,4 Hz, 2b'-H], 2,25 [M, 1H, J = 24,4 Hz, 2a'-H], 2,42 [M, 4H, J = 31,6 Hz, 2'' y 3''-H], 2,81 [M, 1H, J = 33,6 Hz, 9b''-H], 2,94 [M, 1H, J = 28,8 Hz, 9a''-H], 3,49 [s, 3H, J = 18,4 Hz, 8''-H], 3,90 [M, 1H, J = 33,2 Hz, 4'-H], 4,11 [DD, 1H, J = 24,8 Hz, 5b'-H], 4,29 [DD, 1H, J = 22,0 Hz, 5a'-H], 4,34 [DM, 1H, J = 28,4 Hz, 3'-H], 4,54 [DM, 1H, J = 31,2 Hz, 6''-H], 6,07 [T, 1H, J = 24,4 Hz, 1'-H], 7,04 [M, 5H, J = 56,0 Hz, 11''-15''-H], 7,38 [D, 1H, J = 16,8 Hz, 6-H].

¹³C-RMN



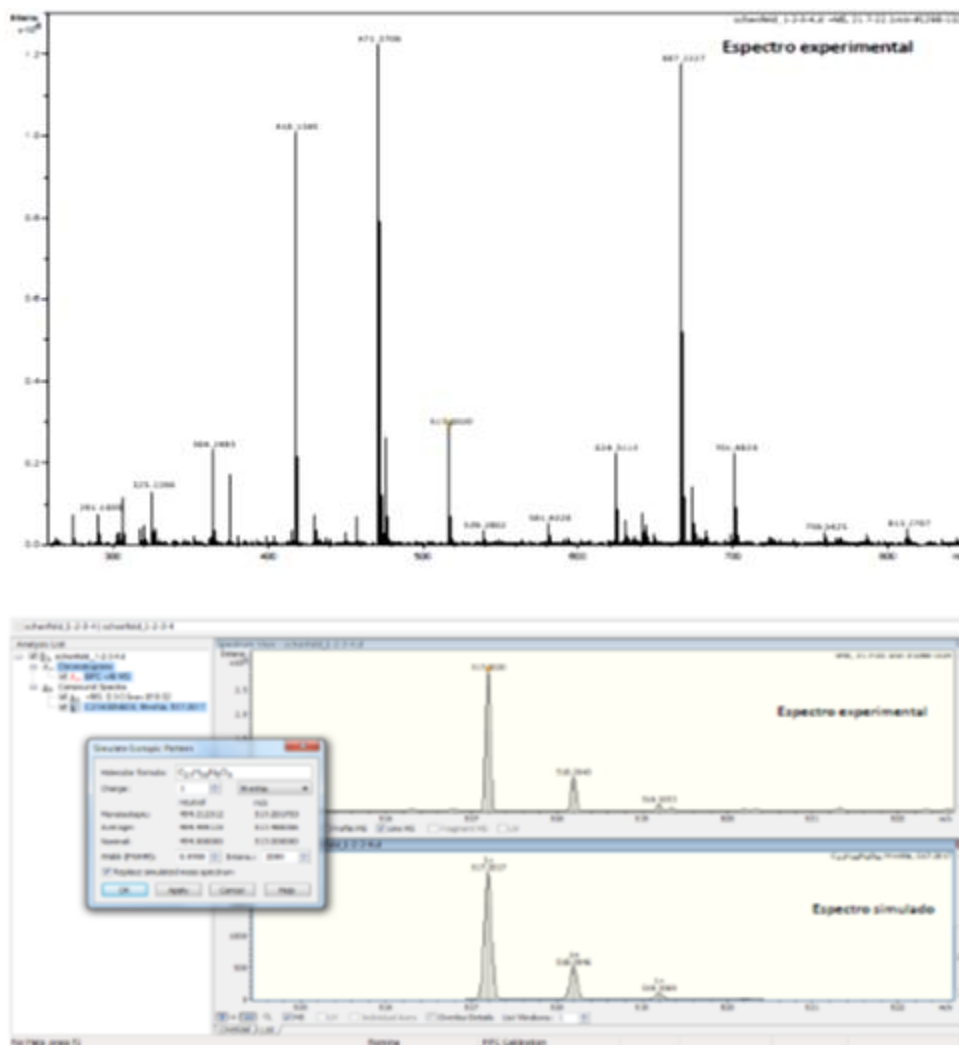
¹³C-RMN (400 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 11,61 [C7], 29,84 [C 2'' y 3''], 36,50 [C 2'], 37,51 [C 9'], 51,32 [C 8'], 53,73 [C 6'], 60,57 [C 3'], 63,03 [C5'], 81,62 [C4'], 84,33 [C 1'], 110,37 [C 5], 126,63-129,21 [C 10''-15''], 135,68 [C 6], 150,34 [C 2], 163,29 [C 4], 170,84 [C 1'], 171,81 [C 4'], 172,14 [C 7''].

AZT-Suc-ILeu-O-Met (5)



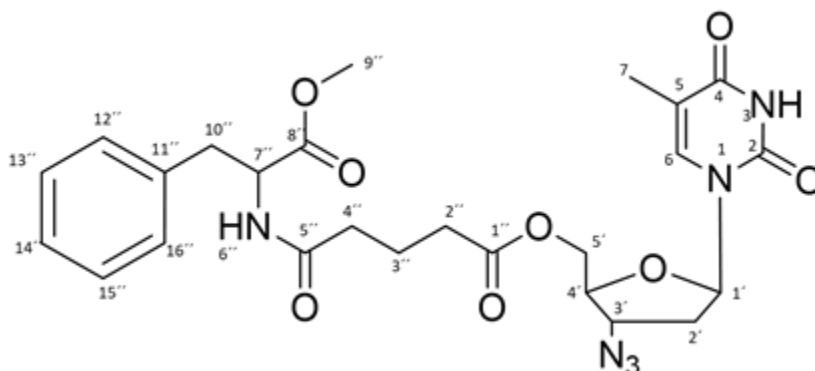
Nombre: 3'-zido-3'-deoxi-5'-O-succinil-N-metoxiisoleucina timidina

HRMS



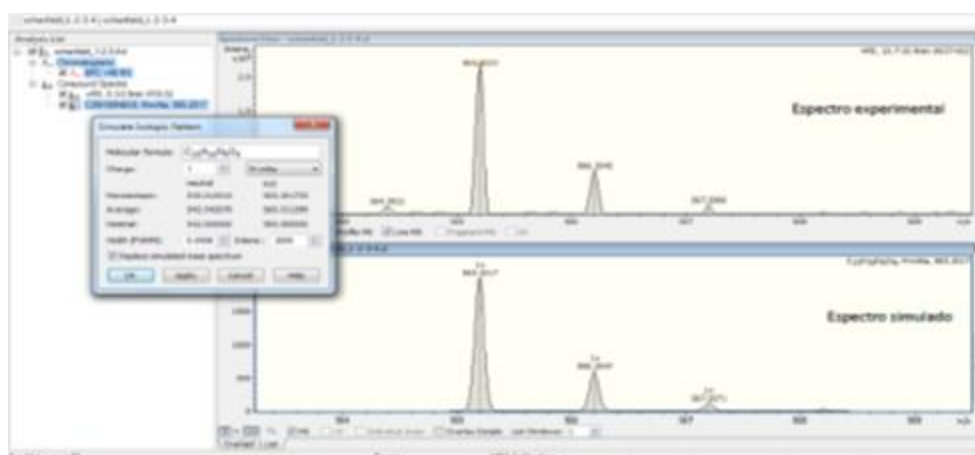
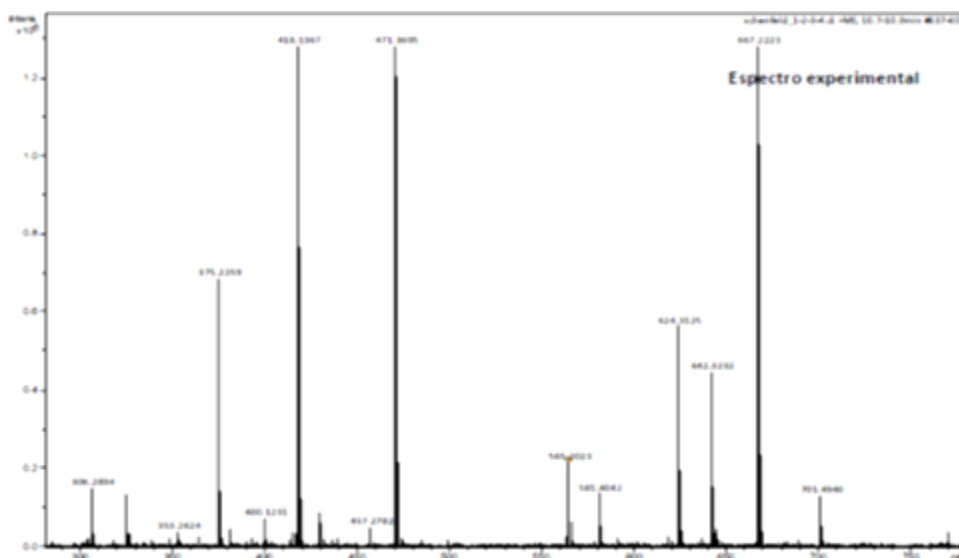
m/z C₂₀H₂₈N₆O₈Na [M+Na]⁺: calculado 517,2017, experimental 517,2020.

AZT-Glu-Fen-O-Met (5)



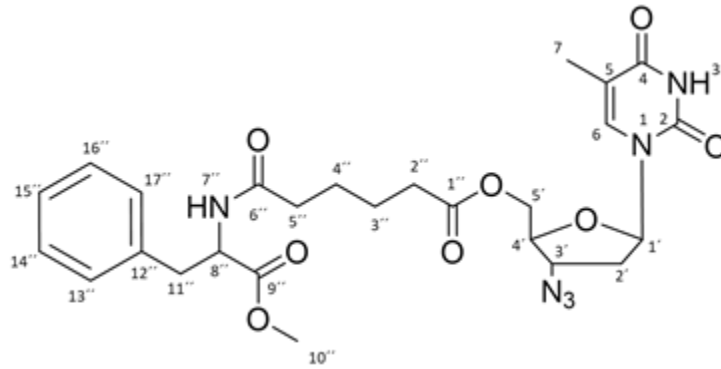
Nombre: 3'-Azido-3'-deoxi-5'-O-glutaril-N-metoxifenilalanina timidina

HRMS



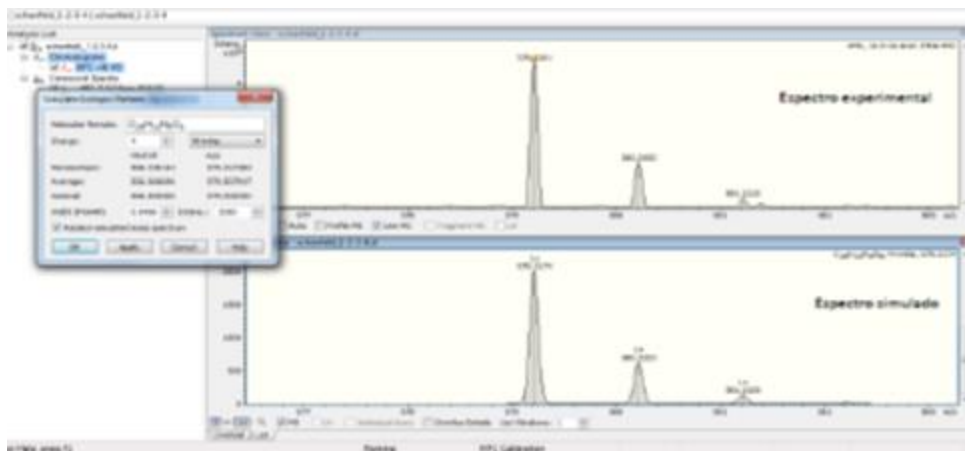
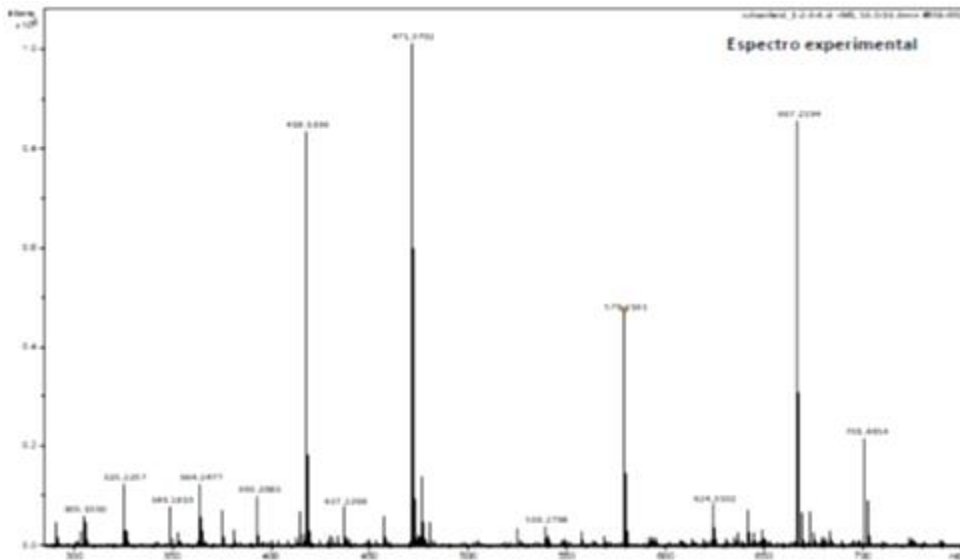
m/z $C_{25}H_{30}N_6O_8Na$ $[M+Na]^+$: calculado 565,2071, experimental 565,2023.

AZT-Adi-Fen-O-Met (7)

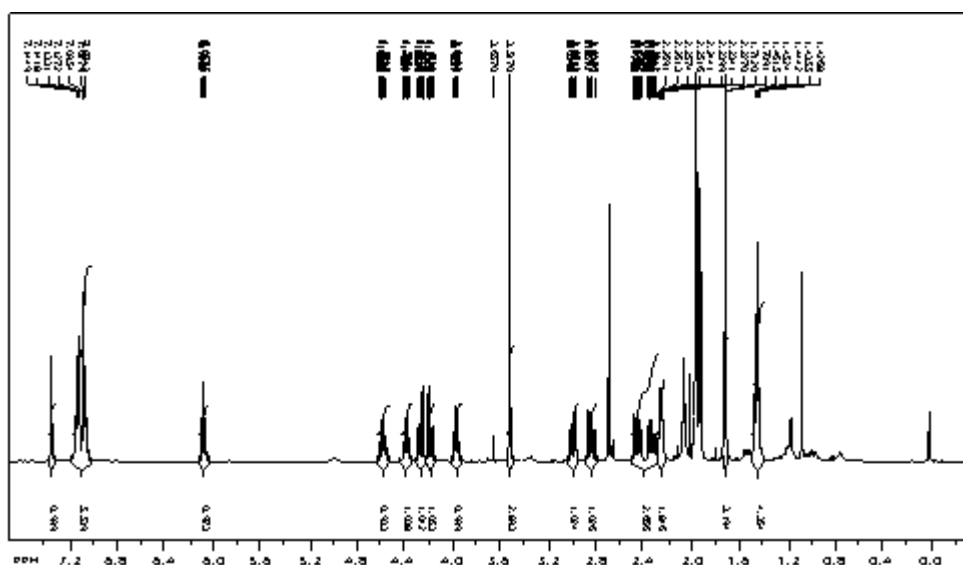


Nombre: 3'-Azido-3'-deoxi-5'-O-adipil-N-metoxifenilalanina timidina

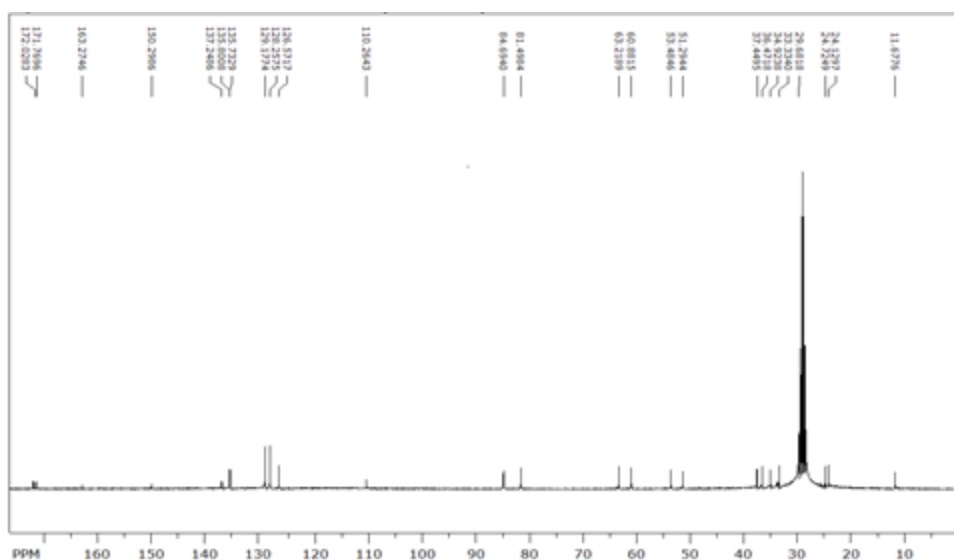
HRMS



m/z $C_{26}H_{32}N_6O_8Na$ $[M+Na]^+$: calculado 579,2174, experimental 579,2161.

¹H-RMN

¹H-RMN (400 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 1,44 [M, 4H, J = 36,8 Hz, 3''-4''-H], 1,71 [M, 3H, J = 13,6 Hz, 7-H], 2,25 [M, 2H, J = 24,4 Hz, 2'-H], 2,39 [M, 4H, J = 88,5 Hz, 2''-5''-H], 2,83 [M, 1H, J = 36,8 Hz, 11b''-H], 2,99 [M, 1H, J = 36,0 Hz, 11a''-H], 3,52 [S, 3H, J = 18,4 Hz, 10''-H], 3,96 [M, 1H, J = 33,6 Hz, 4'-H], 4,18 [DM, 1H, J = 30,4 Hz, 5b'-H], 4,26 [DM, 1H, J = 30,0 Hz, 5a'-H], 4,39 [M, 1H, J = 41,2 Hz, 3'-H], 4,58 [M, 1H, J = 40,0 Hz, 8''-H], 6,08 [T, 1H, J = 36,0 Hz, 1'-H], 7,11 [M, 5H, J = 70,0 Hz, 13''-17''-H], 7,37 [S, 1H, J = 13,6 Hz, 6-H]

¹³C-RMN

¹³C-RMN (400 MHz, Acetona-d₆, TMS): δ [ppm] = 11,67 [C7], 24,12 [C3''], 24,72 [C4''], 33,34 [C2], 36,47 [C2''-5''], 37,44 [C 11'], 51,29 [C 10'], 53,49 [C 8'], 60,85 [C 3], 63,22 [C5], 81,49 [C4], 84,69 [C 1], 110,25 [C 5], 126,57-129,18 [C 12''-17''], 135,74 [C 6], 150,29 [C 2], 163,27 [C 4], 171,76 [C 1'], 172,02 [C 6'], 172,42 [C 9'].

Anexo III

*Estudios computacionales de
hidrólisis química*

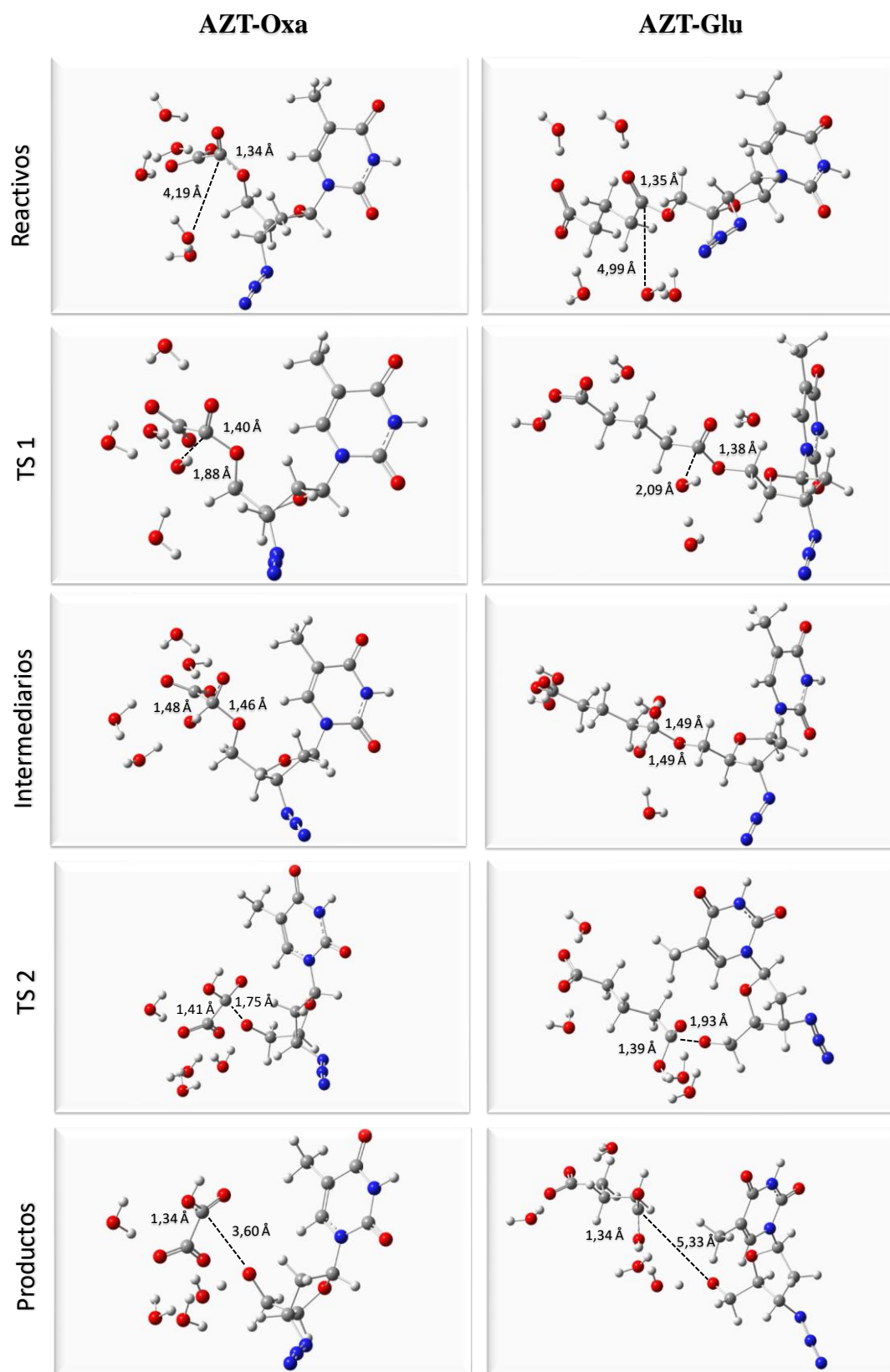


Figura III.1. Geometría para los diferentes estados en la simulación de la hidrólisis para AZT-Oxa y AZT-Glu

De este análisis se pudo observar que los grupos carboxilo terminal y carbonilo del éster poseen una alta densidad de moléculas de solvente en su entorno, las cuáles presentaron un alto porcentaje de permanencia de puente de hidrógeno. A la luz de estos resultados, se mantuvieron las moléculas de agua como esferas de solvatación explícita. En el siguiente paso se modelaron las coordenadas de reacción correspondientes a la hidrólisis, obteniéndose las coordenadas de reacción que se muestran en la Figura III.2.

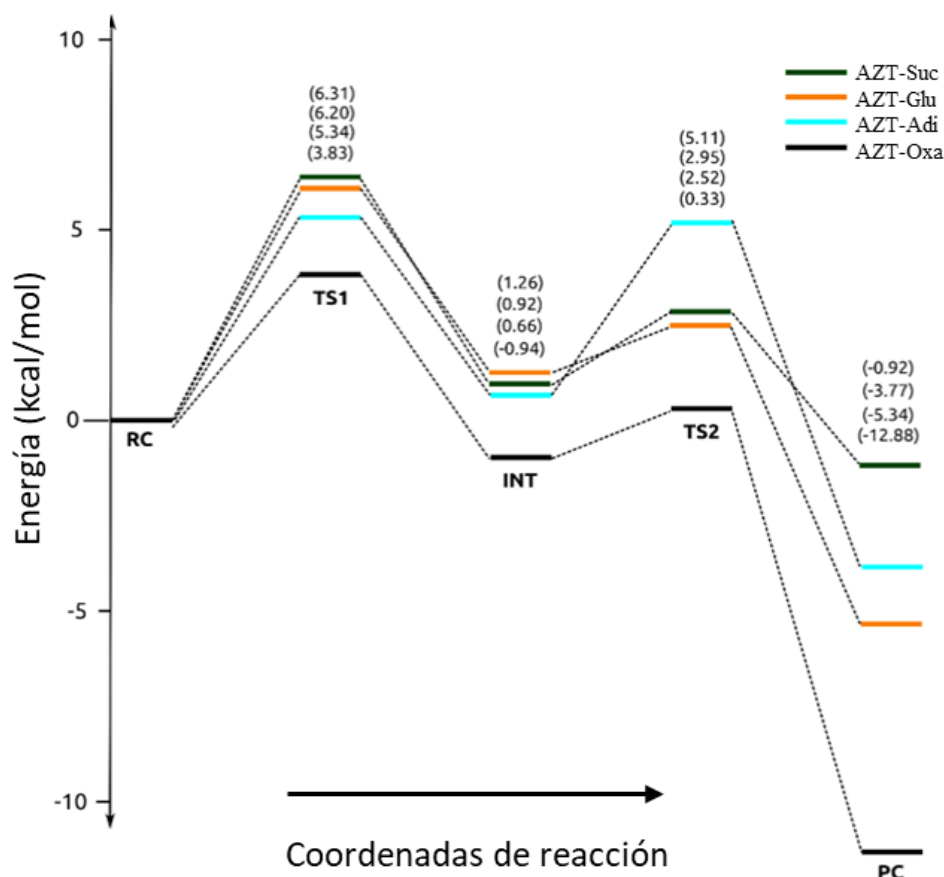


Figura III.2. Perfil de coordenadas de reacción para la hidrólisis de AZT-Suc, AZT-Glu, AZT-Adi y AZT-Oxa.

En la Figura III.2, se puede observar que el primer estado de transición (*TS1*) es el paso limitante en la reacción de hidrólisis de los derivados estudiados. Comparando las energías de dichos *TS1*, podemos decir que el orden de las mismas se correlaciona directamente con los resultados experimentales de estabilidad química a pH 10, ya que la energía del *TS1* para **1** es la más alta (6,31 kcal/mol), siendo éste el compuesto más estable, mientras que **AZT-Oxa** muestra una energía de su *TS1* como la más baja (3,83 kcal/mol), siendo el mismo el más inestable de la

serie. Esta diferencia de energías entre los derivados **1-3** y **AZT-Oxa** se debe a que, este último, posee el grupo carboxilo adyacente al carbonilo del éster que sufre el ataque por el ión hidroxilo, con lo cual atrae una mayor densidad de moléculas de agua alrededor del centro catalítico. La presencia de dichas moléculas de agua estabiliza por medio de una red de puentes de hidrógeno el *TSI* de la reacción (Figura III.2), lo cual produce la disminución en la energía de la misma y la correspondiente reducción en la estabilidad de **AZT-Oxa**. Este fenómeno no ocurre con los otros tres profármacos dada la distancia entre el grupo carboxílico ionizado y el centro catalítico, razón por la cual la energía del *TSI* es más alta para ellos.

Materiales y métodos

Los estudios computacionales fueron desarrollados por el *Dr. Sergio R. Ribone*, investigador de UNITEFA-CONICET, en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

Los conformeros iniciales de los profármacos estudiados se obtuvieron utilizando técnicas de dinámica molecular aplicando el procedimiento de *simulated annealing*⁷⁶. Para llevar a cabo estas simulaciones, las moléculas de los profármacos fueron parametrizadas utilizando el campo de fuerza *GAFF*⁷⁷ y simuladas empleando solvente explícito y considerando condiciones periódicas de contorno. Las moléculas de agua explícitas fueron parametrizadas mediante el campo de fuerza *TIP3P*. Para la obtención de los conformeros correspondientes, se aplicaron procedimientos de dinámica molecular estándar, que incluyen dos fases de minimización (solvente y sistema completo, respectivamente) y una etapa de calentamiento (de 0 a 300° K) seguida de una fase de equilibración (1 ns, 300° K). Los sistemas resultantes constituyeron las conformaciones iniciales para realizar los esquemas de *simulated annealing*, en los cuales se aplicaron rampas de calentamiento controlado de 300 a 1200° K, mantenidos durante 1.000.000 de pasos, para luego ser enfriados lentamente hasta 0 °K en rampas de 100 °K con 100.000 pasos cada una. El esquema de simulación completo involucró 10 ns de trayectoria, incluyendo 5.000.000 pasos. Los protocolos de *simulated annealing* se repitieron 10 iteraciones. Se continuó con los análisis de *clustering* de las estructuras finales resultantes de cada iteración, concluyendo que se obtienen conformaciones reproducibles, las cuales constituyeron la geometría de inicial para los estudios relacionados con la exploración de coordenadas de reacción. Se aplicó un intervalo de tiempo (*timestep*) de 2 fs en todos los procedimientos de dinámica molecular. Para la realización de estos estudios se utilizó el paquete de software Amber14⁷⁸.

Las conformaciones de menor energía obtenidas mediante *simulated annealing*, fueron sometidas a una optimización de geometría a nivel DFT utilizando *B3LYP* y la base *6-311+G**^{79,80}. El efecto del solvente se evaluó utilizando el modelo de continuo polarizado de Tomasi (PCM)⁸¹⁻⁸³ implementados en el software Gaussian09⁸⁴. Los estados de transición (TS) y los intermediarios correspondientes se identificaron mediante un escaneo de la coordenada de reacción con la optimización completa de los parámetros geométricos correspondientes. La caracterización de puntos estacionarios se realizó mediante cálculos de matriz *Hessiana*, obteniendo valores propios positivos para estados mínimos de energía (reactivo, intermediario y producto) y un valor propio negativo para cada TS⁸⁵. Los valores de energía informados para todas las especies incluyeron correcciones de punto cero que fueron calculadas aplicando la relación estadística-mecánica estándar para un gas ideal⁸⁶.

La contribución de moléculas de agua a la hidrólisis de los profármacos estudiados se exploró preliminarmente mediante análisis de la función de distribución radial (*RDF*, por sus siglas en inglés) y enlace puente de hidrógeno (*HB*, por sus siglas en inglés). Partiendo de la estructura molecular optimizada y aplicando el procedimiento de dinámica molecular mencionado anteriormente, cada profármaco fue sometido a una nueva simulación de dinámica molecular durante 50 ns para obtener trayectorias extendidas, en las cuales se realizaron los análisis cuantitativos de *RDF* y *HB*, incluyendo moléculas de agua dentro de un radio de 10 Å alrededor del centro reactivo (carbono carbonílico correspondiente al este hidrolizado). Ambos análisis se llevaron a cabo utilizando el módulo *cpptraj*⁸⁷ de Amber14⁷⁸. Se seleccionaron las moléculas de agua que presentan el mayor porcentaje de interacción y se mantuvieron explícitas durante las simulaciones de las coordenadas de reacción; mientras que el resto del sistema disolvente se eliminó como modelo explícito. Los sistemas resultantes se volvieron a optimizar a niveles de DFT, y los sistemas minimizados se utilizaron para iniciar el estudio de coordenadas de reacción de hidrólisis. El ión oxidrilo también fue solvatado con una molécula de agua adicional y se optimizó completamente antes de la obtención de las coordenadas de reacción.

Anexo IV

Tablas

Tabla IV.1. Constantes de velocidad observadas (k_{obs}) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) para AZT-Oxa, AZT-Suc (1), AZT-Glu (2) y AZT-Adi (3) a pH 2, 7,4 y 10.

Derivado	pH 2		pH 7,4		pH 10	
	k_{obs} (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	k_{obs} (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	k_{obs} (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
<i>AZT-Oxa</i>	0,04 (± 0,01)	19,0 (± 3,0)	0,06 (± 0,01)	12,0 (± 2,0)	3,9 (± 0,2)	0,21 (± 0,01)
<i>AZT-Suc</i>	Estable	Estable	Estable	Estable	0,053 (± 0,002)	13,2 (± 0,4)
<i>AZT-Glu</i>	Estable	Estable	Estable	Estable	0,093 (± 0,003)	7,4 (± 0,3)
<i>AZT-Adi</i>	Estable	Estable	Estable	Estable	0,109 (± 0,004)	5,7 (± 0,5)

Tabla IV.2. Constantes de velocidad observadas (k_{obs}) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) para AZT-Suc-Fen-O-met (4), AZT-Suc-ILeu-O-met (5), AZT-Glu-Fen-O-met (6) y AZT-Adi-Fen-O-met (7) a pH 2, 7,4 y 10.

Profármaco	pH 2		pH 7,4		pH 10	
	k_{obs} (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	$k_{obs} \times 10^{-3}$ (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	k_{obs} (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
<i>AZT-Suc-Fen-O-met</i>	Estable	Estable	2,9 (± 0,1)	244,7(±4,9)	0,300 (± 0,007)	2,3 (± 0,7)
<i>AZT-Suc-ILeu-O-met</i>	Estable	Estable	0,4 (±0,1)	1732,8 (± 30,3)	0,079 (± 0,007)	8,8 (± 0,8)
<i>AZT-Glu Fen-O-met</i>	Estable	Estable	1,5 (±0,1)	452,5(±16,7)	0,077 (± 0,003)	7,9 (± 0,3)
<i>AZT-Adi Fen-O-met</i>	Estable	Estable	0,2 (±0,1)	3465,7 (±48,8)	0,070 (± 0,002)	10,4 (± 0,2)

Tabla IV.3. Constantes de velocidad observadas (k_{obs}) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$), para AZT-Oxa, AZT-Suc, AZT-Glu y AZT-Adi en plasma humano 37°C; 24 h.

Derivado	Plasma humano	
	k_{obs} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
AZT-Oxa	0,135 (\pm 0,009)	5,1 (\pm 0,5)
AZT-Suc	0,005 (\pm 0,001) ^a	138,6 (\pm 1,6) ^a
AZT-Glu	0,027 (\pm 0,001) ^a	25,6 (\pm 0,7) ^a
AZT-Adi	0,016 (\pm 0,002) ^a	43,3 (\pm 0,4) ^a

^a Valores estimados. k_{obs} : constante de velocidad observada y $t_{1/2}$: tiempo de vida media

Tabla IV.4. Constantes de velocidad observadas (k_{obs}) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) para AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met, AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met en plasma humano 37°C; 24 h.

Profármaco	Plasma humano	
	k_{obs} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
AZT-Suc-Fen-O-met	0,011 \pm 0,001	61,6 \pm 2,2
AZT-Glu Fen-O-met	0,0079 \pm 0,003	88,2 \pm 3,4
AZT-Adi Fen-O-met	0,0053 \pm 0,0005	125,1 \pm 10,9
AZT-Suc-ILeu-O-met	0,0027 \pm 0,0004	253,7 \pm 5,3

Tabla IV.5. Porcentaje de unión de AZT-Oxa, AZT, AZT-Suc, AZT-Glu, AZT-Adi, AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met, AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-met por las proteínas plasmáticas en estado puro (PP), en presencia de ácido salicílico (PP + SAL) y con diazepam (PP + DZP)

<i>Derivado</i>	<i>PP (%)</i>	<i>PP + SAL (%)</i>	<i>PP + DZP (%)</i>
<i>AZT-Oxa</i>	8,0 ($\pm 1,4$)	1,3 ($\pm 1,1$)	nd
<i>AZT</i>	13,1 ($\pm 1,3$)	2,5 ($\pm 1,8$)	nd
<i>AZT-Suc</i>	33,2 ($\pm 1,8$)	8,1 ($\pm 2,6$)	nd
<i>AZT-Glu</i>	26,8 ($\pm 0,5$)	1,8 ($\pm 1,3$)	nd
<i>AZT-Adi</i>	34,1 ($\pm 1,5$)	4,8 ($\pm 2,2$)	nd
<i>AZT-Suc-Fen-O-met (4)</i>	52,1 ($\pm 5,3$)	51,2 ($\pm 3,2$)	37,8 ($\pm 1,4$)
<i>AZT-Suc-ILeu-O-met (5)</i>	50,5 ($\pm 1,3$)	45,5 ($\pm 2,8$)	23,5 ($\pm 7,2$)
<i>AZT-Glu-Fen-O-met (6)</i>	57,7 ($\pm 4,3$)	61,5 ($\pm 2,5$)	50,6 ($\pm 5,9$)
<i>AZT-Adi-Fen-O-met (7)</i>	72,5 ($\pm 4,3$)	72,8 ($\pm 3,2$)	48,8 ($\pm 4,6$)

nd: no determinado.

Anexo IV

Tabla IV.6 Valores de F y P_{app} para las diferentes concentraciones de AZT, AZT-Suc, AZT-Glu, AZT-Adi, AZT-Suc-Fen-O-met, AZT-Suc-ILeu-O-met, AZT-Glu-Fen-O-met y AZT-Adi-Fen-O-et.

		Concentración (M)	F ($\mu\text{g}/\text{min}$)	P_{app} ($\times 10^{-4} \text{ cm}/\text{min}$)
AZT	AZT	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,8 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,3$
		$1,0 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	$1,2 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$
AZT-Suc	AZT-Suc	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	$0,48 \pm 0,05$	$0,52 \pm 0,06$
	AZTeq		$0,79 \pm 0,06$	$1,17 \pm 0,02$
	AZT-Suc	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	$0,36 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,02$
	AZTeq		$0,75 \pm 0,05$	$1,12 \pm 0,03$
AZT-Glu	AZT-Glu	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,23 \pm 0,06$	$1,32 \pm 0,06$
	AZTeq		$1,09 \pm 0,06$	$1,61 \pm 0,02$
	AZT-Glu	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	$2,21 \pm 0,02$	$2,41 \pm 0,02$
	AZTeq		$1,99 \pm 0,06$	$2,9 \pm 0,02$
AZT-Adi	AZT-Adi	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	$0,19 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$
	AZTeq		$0,46 \pm 0,09$	$0,68 \pm 0,10$
	AZT-Adi	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	$0,38 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,05$
	AZTeq		$0,60 \pm 0,08$	$0,89 \pm 0,06$
AZT-Suc-Fen-O-met	AZT-eq	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,3 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2$
	AZTeq	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	$0,9 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,3$
AZT-Suc-ILeu-O-met	AZT-eq	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	$0,8 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
	AZTeq	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	$1,1 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$
AZT-Glu-Fen-O-met	AZT-eq	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
	AZTeq	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,3$
AZT-Glu-Fen-O-met	AZT-eq	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$	$2,4 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,3$
	AZTeq	$1,0 \times 10^{-3} \text{ M} + \text{VER}$	$4,4 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,5$

