



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

**DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN  
ESTRUCTURAL DE SULFONILUREAS DERIVADAS  
DE PIPERAZINA POTENCIALMENTE ACTIVAS  
FRENTE AL VHC**

María Catalina Avís Cañamero

Trabajo de Fin de Grado

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Sevilla, 4 de julio de 2017

Tutores: José Manuel Vega Pérez y José Ignacio Candela Lena

Tipología Experimental



## RESUMEN

---

El virus de la hepatitis C (VHC) es el único virus perteneciente al género Hepacivirus, cuya característica principal es su ARN monocatenario de polaridad positiva. La infección por este virus (VHC) es una de las principales causas de enfermedad hepática, provocando múltiples enfermedades como cirrosis, cáncer de hígado, esteatosis hepática y hepatitis crónica, afectando alrededor del 3% de la población mundial. En España es una de las principales causas de mortalidad y de trasplante de hígado, con una prevalencia del 3% a igual que en el mundo. Actualmente los estudios de investigación para conseguir una terapia efectiva están restringidos al tratamiento de la enfermedad tras la infección, sin posibilidad de prevenirla, focalizando el desarrollo de antivirales de acción directa (AAD) tomando como dianas terapéuticas las proteínas implicadas en proceso de replicación del ADN.

Estos antivirales presentan una alta eficacia frente a estas proteínas, pero inconvenientes como la variabilidad genética del virus, posibles nuevas mutaciones y los efectos secundarios producidos por fármacos aceptados actualmente (erupción, disgeusia y anemia) han potenciado el diseño de nuevos compuestos.

El trabajo presentado se centra en el diseño de una serie de estructuras potencialmente activas como quimioterápicos, centralizando la búsqueda en la literatura de prototipos activos frente a la proteasa NS3/4A.

En base a estos prototipos, se ha realizado la síntesis química mediante una metodología sencilla, obteniendo 4 productos finales, caracterizados con el estudio de sus espectros de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear confirmando su estructura.

**Palabras claves:** virus de la hepatitis C, proteína NS3/4A, sulfonilureas, 2-metilpiperazina.

## ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN .....	5
1.1	Ciclo viral .....	6
1.2	Variación genética.....	9
1.3	Importancia de la proteasa NS3/4A como diana terapéutica .....	10
2	ANTECEDENTES .....	14
3	OBJETIVOS .....	21
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1	Metodología general.....	22
4.2	Reacción de monoacilación selectiva de 2-piperazinas sustituidas. ....	22
4.2.1	4- [2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metilpiperazina .....	23
4.3	Reacción de formación de sulfonilureas.....	23
4.3.1	4-[2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metil-1-[(p- metilbencenosulfonil)aminocarbonil]piperazina .....	24
4.3.2	4-[2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metil-1-[(p- clorobencenosulfonil)aminocarbonil]piperazina .....	24
4.3.3	4-terc-butoxicarbonil-1-[(p-metilbencenosulfonil)aminocarbonil]piperazina 25	
4.3.4	4-terc-butoxicarbonil-1-[(p-clorobencenosulfonil)aminocarbonil]piperazina 25	
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
6	CONCLUSIONES .....	32
7	BIBLIOGRAFÍA .....	33

## 1 INTRODUCCIÓN

---

Hasta mediados de la segunda mitad del siglo XX, sólo se conocían dos tipos fundamentales de virus que causaban la hepatitis, eran: el VHB y el VHA. A mediados de los años 70, tras ensayos experimentales se descubrieron marcadores serológicos que no correspondían a los de la hepatitis A ni B, por lo que se sospechó que existía un tercer tipo de virus. En 1989, finalmente con el desarrollo de los test de detección del virus de la hepatitis B, se constató que había existencia de un nuevo virus llamado inicialmente virus no-A, no-B (NANB).

En 1989 Choo y cols. del grupo de investigación de Michael Houghton, consiguieron aislar el ARN vírico, por clonación del genoma viral presente en el plasma infeccioso de un chimpancé, al que dieron el nombre de virus de la hepatitis C (Shors, 2009).

La infección por este virus es una de las principales causas de enfermedad hepática (cirrosis, cáncer de hígado, esteatosis hepática y hepatitis crónica), (Izquierdo y Escobar, 2012), siendo también el mayor motivo de trasplantes de hígado. La prevalencia de la infección es mayor en todo el mundo en hombres entre 30 y 49 años, afectando alrededor de 185 millones de personas (Muga et al., 2015), y 10 millones de estas personas son o han sido consumidores de drogas por vía parenteral, siendo una de las principales vías de transmisión, además de inyecciones terapéuticas inseguras y las transfusiones (Hernández, 2012)

En España, el número de infectados está entre 526.000 y 877.000, también con una prevalencia de 1.5%- 2.5%, mayor en hombres de 40 años (La hepatitis C en España, 2016).

El virus de la hepatitis C (VHC) forma parte de la familia Flaviviridae, dentro del género Hepacivirus, en el cuál es el único virus.

El virus tiene un tamaño de 50-60nm de diámetro y posee estructura pleomórfica. El virión está constituido por una cápside de simetría icosaédrica, que varía de 28 a 50nm de diámetro, rodeada de una capa lipoproteica y con una envoltura donde están

ancladas dos glucoproteínas, E1 y E2 (Fig. 1); es, relativamente sensible a muchos agentes físicos y químicos.

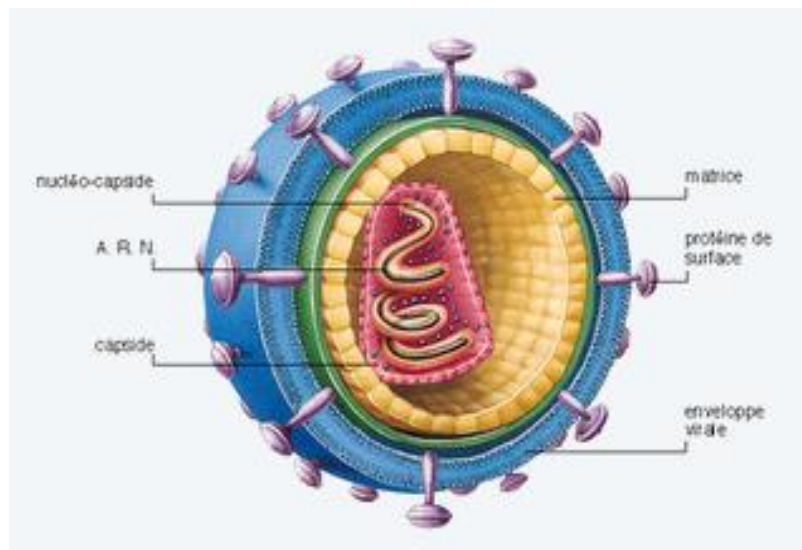


Figura 1. Virus de la hepatitis C y sus diferentes estructuras (Shors, 2009).

El genoma está formado por una cadena de ARN monocatenario de polaridad positiva (++) de 9,6 Kb y que sólo consta de una región de lectura abierta (ORF) y dos regiones no codificantes en los extremos 3' y 5' (Cuenca, 2010). A partir de esta ORF se forman proteínas estructurales y no estructurales, todas ellas importantes en el ciclo viral.

### 1.1 Ciclo viral

El ciclo viral o infeccioso del VHC tiene lugar en los hepatocitos (Fig. 3), comienza con la interacción de las glicoproteínas E1/E2 de la envoltura del virus con receptores de la membrana de la célula hepática huésped, como LDLR, CD81, SR-B1, Claudina-1, Ocludina (Aktories et al., 2013).

La segunda fase de este ciclo corresponde a la entrada del virus en la célula, tras su unión con los receptores se produce la fusión de la envoltura del virus, gracias a su naturaleza lipídica, con la membrana del hepatocito. Esta endocitosis es un proceso dependiente de Claudina-1.

Ya en el interior se libera el ARN(+) viral en el citoplasma de la célula tras la decapsidación, esta cadena se dirige al retículo endoplasmático donde comienza la traducción de la ORF y procesamiento de la poliproteína precursora.

Esta poliproteína (Fig. 2) está formada por 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales. Las primeras y el polipéptido p7 (no estructural) son procesados por peptidasas y señal péptido peptidasas (SPP) del retículo endoplasmático, y el resto de las no estructurales por las proteasas virales NS2 y NS3-4A.

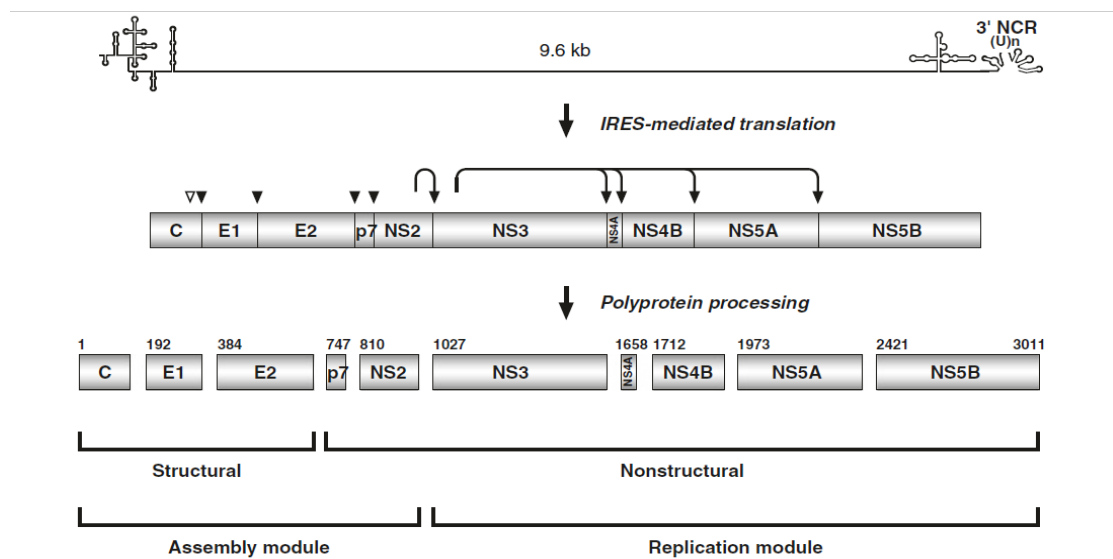


Figura 2. Poliproteína precursora (Cuenca, 2010).

Las proteínas estructurales son: la región core (p21), de 22 kD y 173 aminoácidos encargada de la síntesis de la nucleocápside, participa en el ensamblaje y unión de las regiones E1 y E2, en la modulación de la respuesta inmune y en la supresión de la síntesis de proteínas previas a la replicación del virus; y las dos glicoproteínas de cubierta, E1 y E2, de 37 y 72 kD respectivamente, que forman la envoltura y participan en la unión del virus a la membrana del hepatocito.

Las proteínas no estructurales son NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5 y NS5B y tienen las siguientes funciones:

- a) NS2: codifica cisteín-proteasa asociada a membrana.
- b) NS3: es la región más estable, codifica una serín-proteasa y tiene función ARN helicasa. Forma un complejo no covalente con NS4A.
- c) NS4A: es un cofactor de la proteasa que codifica la NS3.

- d) NS4B: encargada de inducir la formación de la red de membranas donde ocurre la replicación.
- e) NS5A: contribuye en la replicación vírica, además de ser responsable de las resistencias al tratamiento con interferón atribuidas al genotipo 1, también llamada región determinante de la sensibilidad al interferón (ISDR).
- f) NS5B: participa en la síntesis de una ARN polimerasa ARN dependiente.

Gran parte de estas proteínas no estructurales se quedan unidas a membranas intracelulares, formando una red de membranas para la replicación perinuclear.

La replicación tiene lugar en esta red de membranas, donde a partir de la cadena de ARN(+) se produce la transcripción de una molécula de ARN complementaria (negativa). Esta cadena negativa sirve a su vez como molde para la síntesis de la molécula ARN genómica (positiva).

En las últimas fases del ciclo se produce el ensamblaje donde las copias de ARN(+), obtenidas anteriormente en la replicación, se unen a las proteínas del core donde se forma la nucleocápside, envolviendo al ARN.

En la salida del retículo endoplasmático, por gemación, adquieren la envuelta lipídica. Durante la ruta de secreción, el nuevo virión madura pasando por el aparato de Golgi y siendo liberado por exocitosis fuera de la célula huésped hepática.



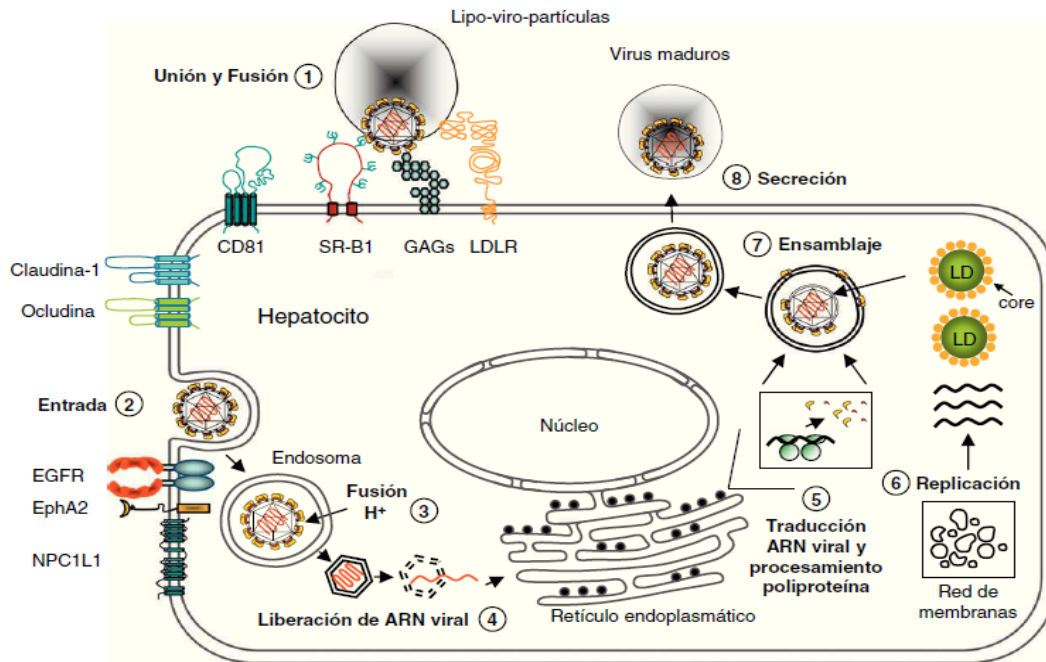


Figura 3. Ciclo viral del VHC en el hepatocito (Kinchington y Schinazi, 2011).

## 1.2 Variación genética

Se identifican principalmente 6 genotipos 1-6 y 11 subtipos denominados con las letras “a” “k” (Micheloud, 2008).

Los genotipos 1a y 1b predominan en los países de occidente, seguidos de los genotipos 2 y 3a (Marton, 2012). Los otros subtipos están mayormente repartidos, por ejemplo el 1 y 4 en África central, el 2 en el oeste de África, el 3 y 6 en el sureste de Asia y el 5 en Sudáfrica (Fig. 4) (Fields, 2011).

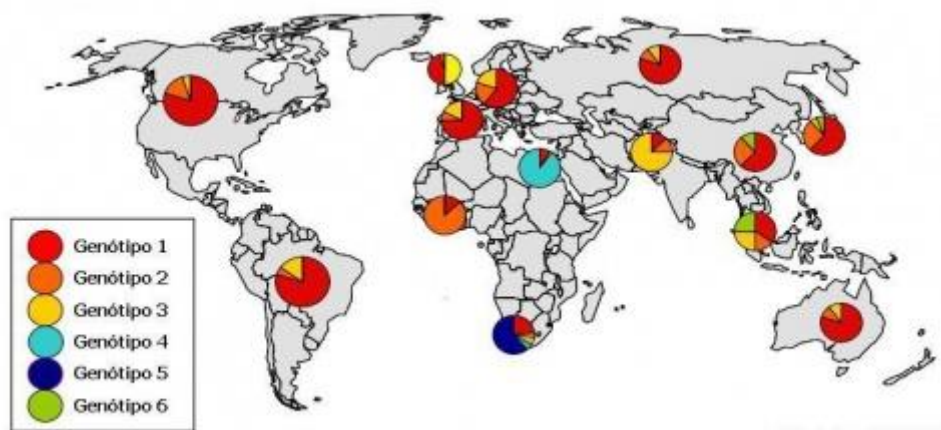


Figura 4. Distribución mundial de los genotipos del VHC (Micheloud, 2008).

El VHC se presenta en la población como genotipos y como quasiespecies, es decir, una mezcla de subpoblaciones virales que poseen variantes genéticamente únicas pero que están relacionadas (Aktories et al., 2013). El género al que pertenece el virus difiere del resto de la familia en la organización de las poliproteínas que comprenden el tercio N-terminal de su poliproteína (Choo et al., 1991).

Todos los virus de ARN(+), poseen una ARN polimerasa dependiente de ARN propensa a errores, también esto ocurre en el HCV ya que la enzima no tiene actividad correctora (Hoyos et al., 2002). Aunque éste muestra una diversidad genética especial, tanto en el número de quasiespecies dentro del mismo individuo, como en la diferencia genética entre virus que infectan a distintas personas (Fields et al., 2011).

La variabilidad genética del VHC se produce por tres características del genoma y ciclo viral.

Primero, una alta tasa de replicación en pacientes con infección crónica, con una elevada producción diaria de partículas virales de  $10^{12}$ . Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, la ARN polimerasa tiene una tasa de error de  $10^{-4}$  (Marton, 2012). Y por último, todas estas mutaciones tienden a acumularse en la región hipervariable 1 (HVR1), situada en el extremo N-terminal de la glicoproteína E2. La HVR1 es muy distinta entre las distintas quasiespecies del mismo genotipo, y varía a lo largo de la enfermedad, lo que hace que sea un tramo del genoma muy débil.

Estos tres factores favorecen el aumento de mutaciones en el genoma viral dando lugar a la variabilidad genética especial que sólo busca la adaptación a distintos entornos y también la mejora, ya que en un entorno ya adaptado una nueva mutación no tiende a transmitirse a nuevo viriones.

### **1.3 Importancia de la proteasa NS3/4A como diana terapéutica**

Como se ha mencionado anteriormente las proteínas NS3 y NS4A forman un complejo no covalente, actuando NS4A como cofactor de la proteasa NS3 (Guangdi y De Clercq, 2017). Este complejo es muy importante en el ciclo viral del virus, y hace que sea una diana terapéutica, entre otras, con gran interés de estudio para la síntesis de nuevos fármacos contra la hepatitis C.

La proteína NS3 es una enzima multifuncional, compuesta en el primer tercio N-terminal, por un dominio serín-proteasa y en el resto un dominio ARN-helicasa, unidos por un enlazador flexible (Delgadillo et al., 2015). La actividad proteasa está implicada en la escisión y procesamiento de proteínas no estructurales virales para la replicación del ARN, mientras que la actividad helicasa se requiere para el montaje del virus y el desenrollamiento de ARN 3'-5', imprescindible para la replicación del ARN vírico (McGiven et al., 2015). Otro aspecto que cabe destacar sobre la proteína NS3, es la función que desempeña bloqueando la activación de la señalización antiviral.

En la proteína NS3 el extremo N-terminal tiene un plegamiento similar al de la familia de las quimiotripsinas, y la proteína NS4A es tipo beta-plegada (Guangdi y De Clercq, 2017).

A pesar de tener este plegamiento típico, el análisis de sus estructuras cristalizadas, ha demostrado que tienen diferencias notables. Una de estas diferencias es la existencia en las quimiotripsinas de unas estructuras tipo asa, que se intercalan entre las hojas beta-plegadas. En la proteína NS3 estas estructuras asa no se observan o son más cortas, sin poder intercalarse por tanto, esto explicaría porque los inhibidores de las quimiotripsinas no son efectivos en esta proteína del VHC (Bermúdez, 2008).

La unión del complejo formado por NS3 y NS4A tiene lugar en un sitio distinto al centro activo, unión mediada por aminoácidos hidrofóbicos, unida la segunda a las cadenas A0 y A1 de NS3. Este enlace provoca la reorganización estructural formando la triada catalítica formada por His57, Asp81 y Ser139 (Fig. 5) (Fernández, 2015). Otro cofactor a destacar es el dominio dedo de zinc, que proporciona a la enzima un sitio de unión, en el que se coordina tetraédricamente gracias a tres residuos de Cys (97, 99,145) y una molécula de agua a la His149 (Chao, 2006).

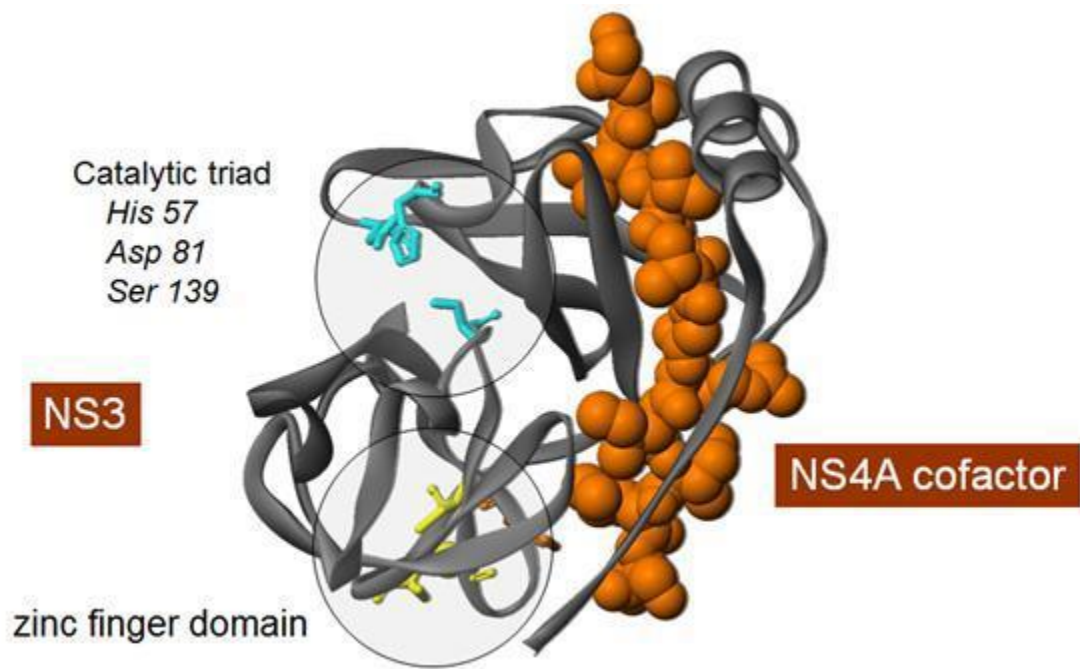


Figura 5. Proteasa NS3/4A (Fernández, 2015).

En el centro activo de la enzima, tiene lugar el mecanismo serín-proteasa (proteólisis), la catálisis del enlace peptídico (Fig. 6).

1. Acilación: ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la Ser 139 al grupo carbonilo del sustrato, formándose un intermedio covalente, a través de un intermediario tetrahédrico de transición con carga negativa. Produciéndose la rotura del enlace peptídico y formándose el acil-enzima, gracias a la transferencia del protón de la histidina al grupo amino del enlace.
2. Desacilación: una molécula de agua ocupa el lugar del grupo amino del sustrato, y ataca como nucleófilo al grupo éster del acil-enzima formándose otro intermedio tetrahédrico. Se libera un ácido carboxílico, pudiendo regenerar la enzima otro ciclo catalítico.

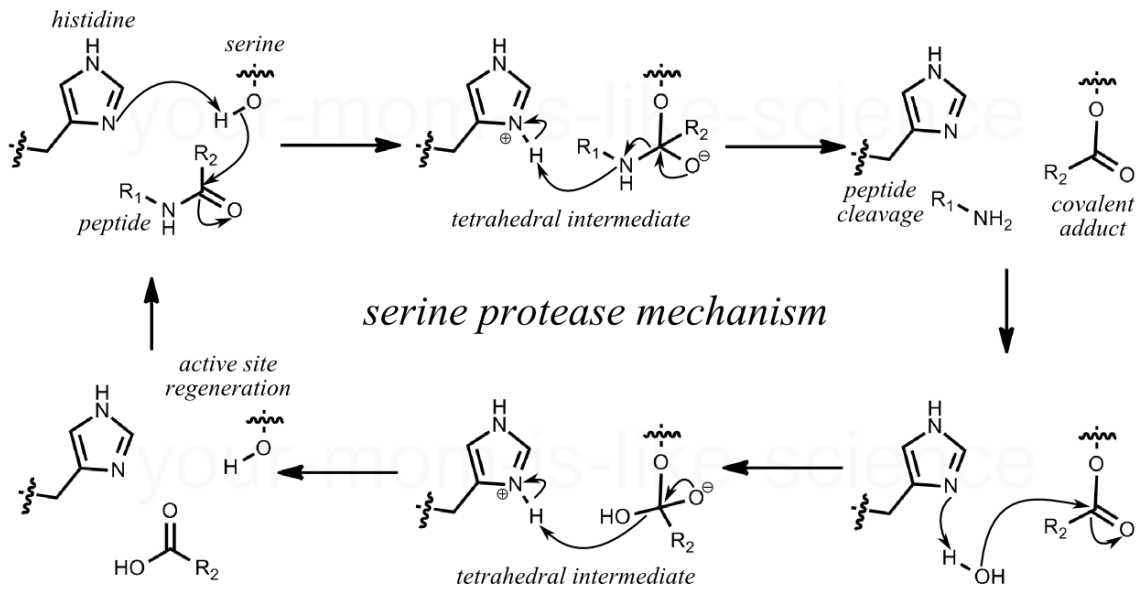
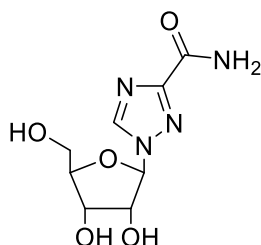


Figura 6. Mecanismo serín-proteasa de la enzima (Fernández, 2015).

## 2 ANTECEDENTES

---

En 1986 por primera vez fue empleado el Interferón Pegilado como monoterapia en pacientes con hepatitis crónica no A no B (NANB). Al unirse al ARNm, este interferón provoca la codificación de proteínas que alteran e interfiere en la replicación del VHC, también esta respuesta antiviral provoca un aumento del sistema inmune. Posteriormente, en 1994, se incluye la Ribavirina (**1**), un análogo oral de nucleósido, (Shors, 2009) en tratamiento combinado con el fin de que la vida media del interferón aumente.



**1**

Figura 7. Estructura química Ribavirina

Este tratamiento combinado ha sido el de elección hasta el año 2011 (Jiménez et al., 2014), administrándose 48 semanas para los genotipos 1,4,5 y 6 y 24 semanas para los genotipos 2 y 3, dado que se obtenía una tasas de respuesta virológica sostenida (RVS) del 75-85% (Izquierdo y Escobar, 2012). Sin embargo, esta combinación presenta problemas como efectos adversos importantes, regímenes de dosificación inconvenientes, aparición de resistencias y las variables del paciente (Gising et al., 2013).

El número de pacientes resistentes a este tratamiento fue en aumento, mayoritariamente los infectados por el genotipo 1. En 2011, cambió el escenario terapéutico del tratamiento con el desarrollo de los primeros antivirales de acción directa (ADD), estructuras que tienen como diana terapéutica proteínas no estructurales del virus como la NS3 proteasa, la polimerasa NS5B y la proteína NS5A (Muga et al., 2015).

La primera generación de ADD, actúan sobre la NS3/4A (Flint et al., 2015) siendo en el genotipo 1 más efectivos, estos inhibidores son el Telaprevir (**2**) y Boceprevir (**3**) (Fig. 8), ambos  $\alpha$ -cetoamidas, administrados junto al Interferón Pegilado y Ribavirina (**1**) (Izquierdo y Escobar, 2012). El mecanismo de acción de estos peptidomiméticos se basa en la unión covalente y reversible a la Ser139 del sitio activo de la enzima (Fig. 9), también posee grupos que le aportan hidrofobicidad, lo que permite su interacción con la proteína NS3/4A, impidiendo su función de proteasa.

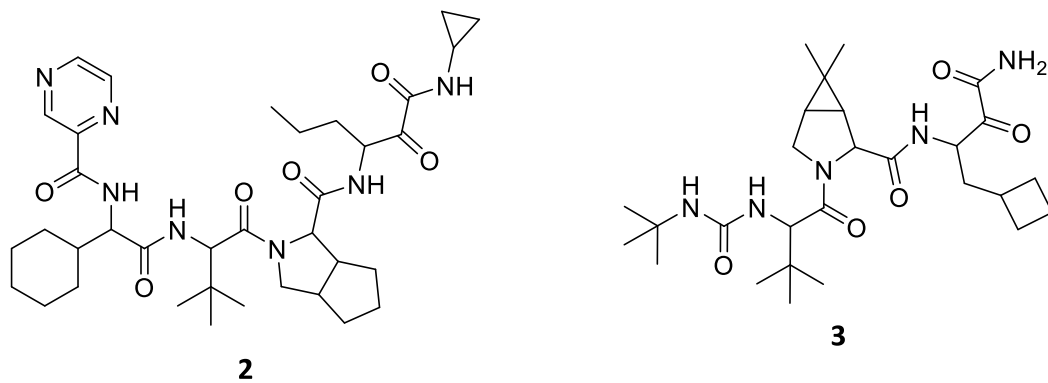


Figura 8. Estructuras químicas de Telaprevir (**2**) y Boceprevir (**3**).

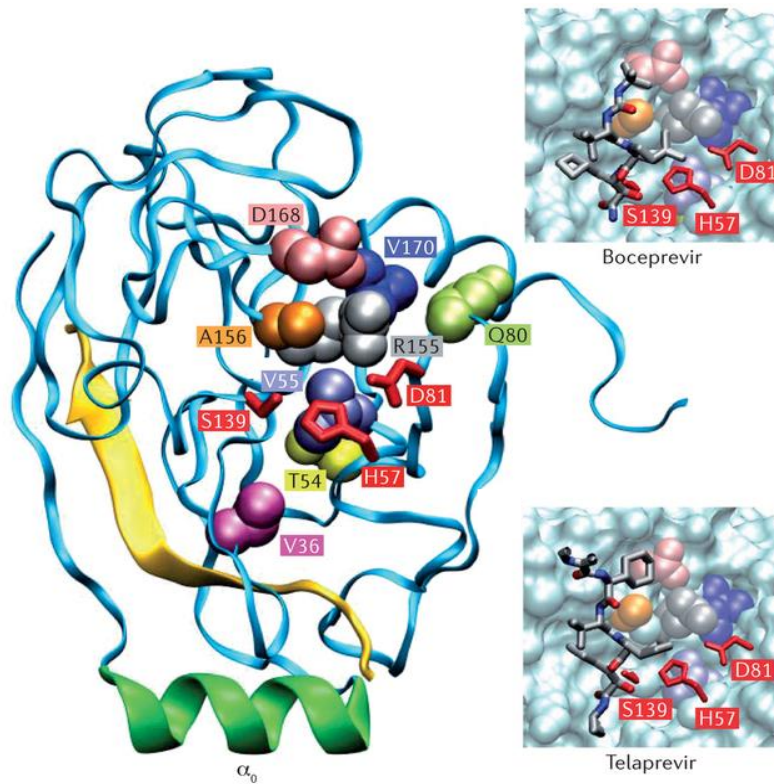


Figura 9. Interacción del Telaprevir y Boceprevir con el centro activo de la proteasa NS3/4A (Bartenschlager, Lohmann et al., 2013).

Pero la asociación de estos ADD con interferón y Ribavirina (**1**), siguen dando efectos secundarios como erupción, y anemia (Aktories et al., 2013). Debido a esto, en 2015, algunos laboratorios dejaron de comercializarlos y dieron paso a otros inhibidores de la proteasa NS3/4A como Simeprevir (**4**) y Faldaprevir (**5**) (Fig. 10), además de otros inhibidores de las demás proteínas claves en la replicación viral (Kang et al., 2016).

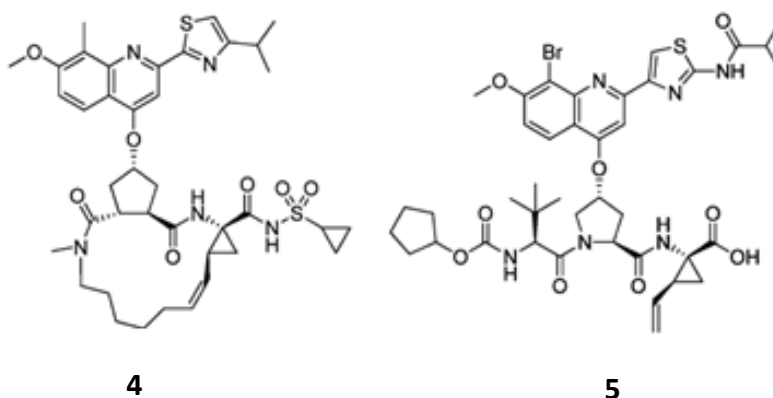


Figura 10. Estructuras química de Simeprevir (**4**) y Faldaprevir (**5**).

Se dieron paso a los ADD de segunda generación, como el Daclatasvir (**6**), inhibidor de la proteína NS5A. El cual contiene estructuras heterodiméricas y homodiméricas, debido a esto, esta estructura se sigue optimizando para obtener un compuesto de menor peso molecular y con una síntesis menos compleja (Kang et al., 2016). Una de las grandes ventajas que presenta la inhibición de esta proteína, como se ha mencionado anteriormente, es que es la responsable de las resistencia del genotipo 1 sientto entonces efectivo en todos los genotipos de VHC (Flint et al., 2015).

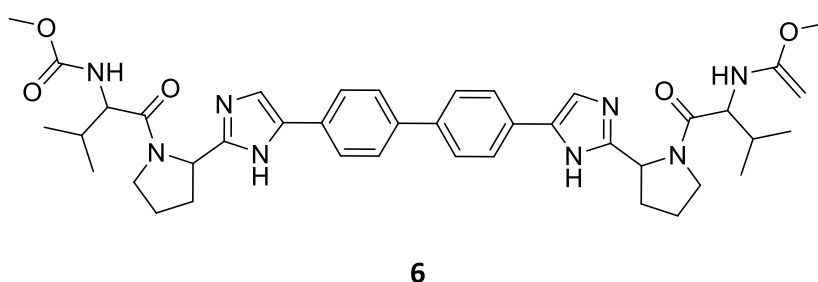


Figura 11. Estructura química del Daclatasvir (**6**).

En diciembre de 2013, en combinación con el interferón y/o la Ribavirina (**1**), se aprobó el Sofosbuvir (**7**), éste es un profármaco que en la célula se convierte en el sustrato para la terminación de la cadena de la ARN polimerasa de este virus, la NS5B. (Flint et



al., 2015) Los inhibidores de esta enzima son análogos de nucleótidos o de nucleósidos como la Mericitabina (**8**) (Fig.12).

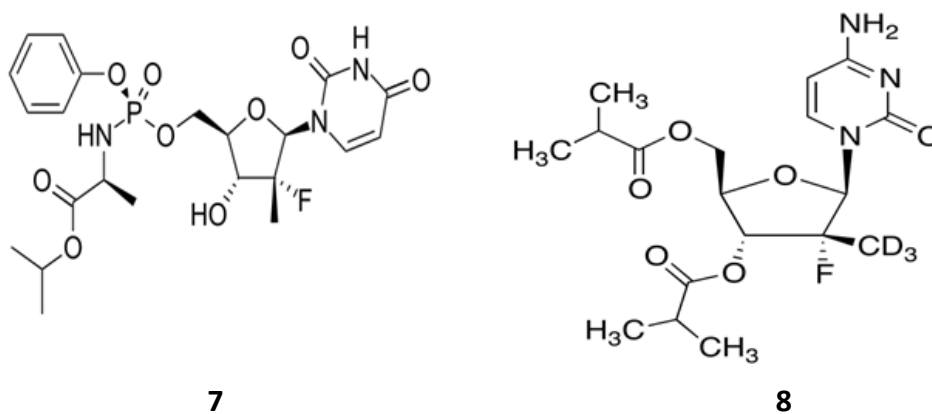


Figura 12. Estructuras químicas de Sofosbuvir (**7**) y Mericitabina (**8**).

Actualmente se sigue trabajando en la búsqueda de nuevos compuesto con actividad frente al VHC. Con este objetivo de seguir desarrollando inhibidores de la proteasa NS3/4A, se han descrito dipeptidomiméticos de glicina de pirazinona (**9**), combinados con una acil sulfonamida aromática, además de una sustitución del grupo carbamato por un grupo urea (Fig. 13). Estas modificaciones dieron resultados positivos de actividad anti-VHC ( $EC_{50} < 0,5nM$ ) (Ginsing et al., 2013).

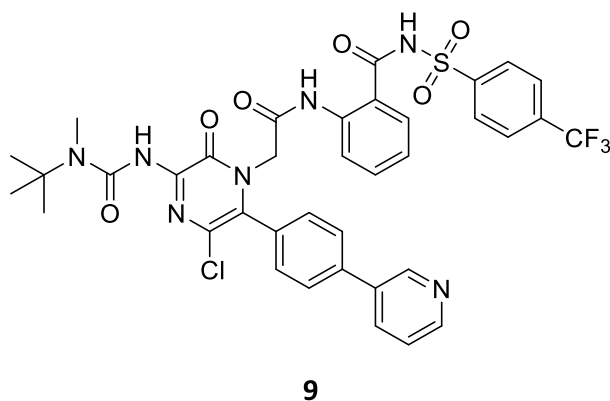


Figura 13. Estructura química del dipeptidomimético de pirazinona (**9**).

Los resultados de estudio SAR mostraron interacciones del compuesto con los aminoácidos Ala 157, Phe154, Gln41, Cys159 y con la parte helicasa (S2) de la enzima. (Fig. 14).

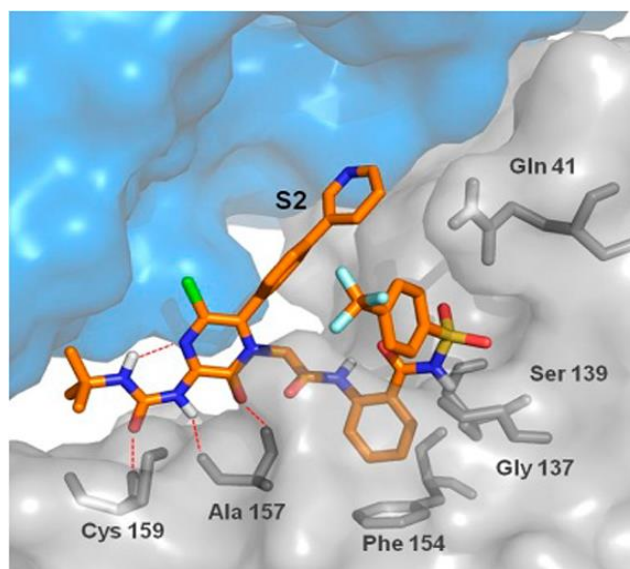


Figura 14. Interacciones del dipeptidomimético de pirazinona con el sitio activo de la proteasa NS3/4A (Ginsing, 2013)

En 2015, siguiendo con la misma diana (proteasa NS3/4A), se demostró la actividad in vitro anti-VHC ( $EC_{50} < 10nM$ ) de las cloroziclinas, se realizaron estudios de optimización con la finalidad de aumentar esta actividad y la selectividad, con las siguientes modificaciones químicas: sustitución doble de Cl en la posición para de los anillos aromáticos (lo que llevó a análogos no quirales), introducción de un alquilo pequeño, medio u oligoetilenglicol como sustitución en el anillo de piperazina y por último, pero sin resultados positivos, las modificaciones del núcleo de piperazina (He et al., 2016) (Fig.15).

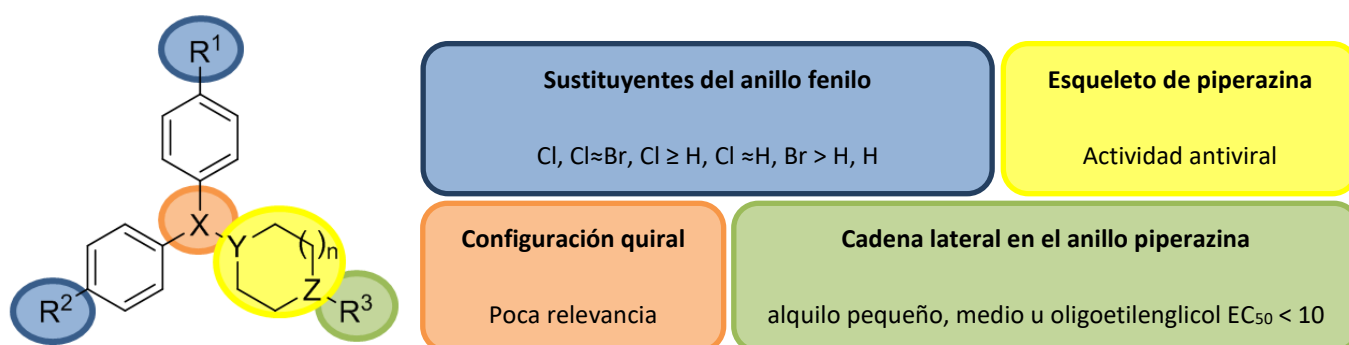
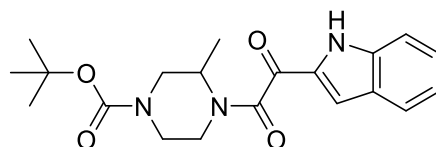


Figura 15. Esquemas de modificaciones químicas en cloroziclinas.

El trabajo de fin de grado que aquí se presenta está enmarcado en una línea de investigación dirigida a la obtención de nuevos compuestos con potencial actividad como quimioterápicos, y en este caso en concreto, como antivirales.

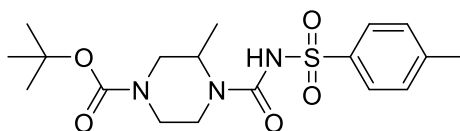
Dentro de esa línea se han diseñado nuevos compuestos empleando piperazinas 1,4-disustituídas como esqueleto central, en las que se han funcionalizado los dos nitrógenos de manera que se incorporen rasgos estructurales que se consideran importantes para la actividad biológica. En concreto, mediante grupos amida, urea o carbamato sobre los nitrógenos (funciones orgánicas presentes en los ADD mencionados anteriormente) se van introducir en la molécula o bien un centro electrófilo, que se conoce son claves para la interacción con el residuo de Ser139 del enzima, (en el caso del Telaprevir **2** y Boceprevir **3** la función ceto en  $\alpha$  al carbonilo amídico), o bien grupo sulfonamida (presente en el Simeprevir **4**).

De una colección de compuestos que se ha preparado y evaluado los dos compuestos activos que he escogido como prototipos para el diseño de los nuevos que aquí se presentan son: **10** y **11**.



**10**

Figura 16. Estructura química de 4-terc-butoxicarbonil-1-[2-(indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metilpiperazina.



**11**

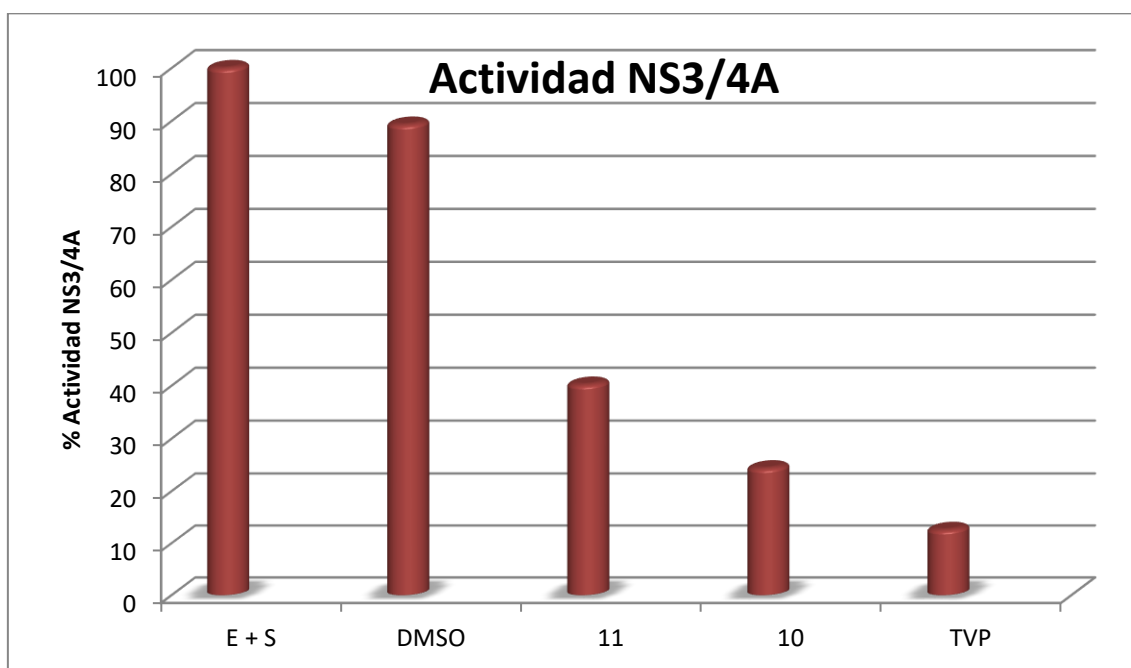
Figura 17. Estructura química de 4-terc-butoxicarbonil-2-metil-1-[(4-metilbenzenosulfonil)aminocarbonil]piperazina.

El compuesto **10** presenta el N1 funcionalizado como  $\alpha$ -cetoamida, posee el carbonilo ceto, centro electrófilo, similar al Telaprevir, empleado como control positivo.

El compuesto **11** presenta el N1 funcionalizado como una sulfonilurea, la porción sulfonamida pretende mimetizar al grupo sulfonamida presente en el Simeprevir **4**.

La evaluación de los compuestos como inhibidores de la actividad proteasa NS3/4A del VHC, proporcionó los valores recogidos en la Gráfica 1.

Teniendo los compuestos **10** y **11** como prototipos, en este trabajo de fin de grado se van a diseñar nuevos compuestos que presenten rasgos estructurales que puedan conferirle potencial actividad como inhibidores de la proteasa NS3/4A del VHC.



Gráfica 1. Actividad de la proteasa NS3/4A, en presencia de los prototipos inhibidores. Control negativo: sustrato + enzima (E+S). Control positivo: Telaprevir (TVP)

### 3 OBJETIVOS

---

Este Trabajo Fin de Grado se enmarca en esa línea de investigación, la cual se basa en la búsqueda, diseño, síntesis y caracterización de nuevos compuestos con potencial actividad como quimioterápicos, concretamente con posible actividad anti-VHC. Se plantearon diversos objetivos parciales para la obtención del objetivo global.

- 1) **Diseño de nuevos compuestos.** En base a las estructuras de los prototipos detectados en la literatura y en resultados anteriores de la propia línea de investigación (compuestos **10** y **11**), se plantea el diseño de compuestos con un esqueleto común de piperazinas 1,4-disustituídas funcionalizadas con grupos amida y sulfonilureas.
- 2) **Síntesis química de los nuevos compuestos diseñados** con posible actividad anti-VHC, con una metodología sintética sencilla que transcurra con buenos rendimientos.
- 3) **Caracterización de los nuevos compuestos.** Éstos serán sometidos a análisis estructural, realizando los estudios de sus espectros de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear. Para la realización de estos análisis se contará con la colaboración del CITIUS de la Universidad de Sevilla.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.1 Metodología general

Todos los reactivos, disolventes y materiales de partida han sido obtenidos de proveedores comerciales y usados sin purificación previa. Las reacciones brutas fueron concentradas por evaporación a presión reducida en rotavapor (BÜCHI R-200), para la eliminación de los disolventes orgánicos.

La monitorización de las reacciones ha sido controlada por cromatografía en capa fina usando soportes de aluminio Kieselgel 60 F254 (E. Merck) y detector de UV (SPECTROLINE MODEL CM-10) para su visualización.

La cromatografía en columna ha sido realizada en Silica Gel 60 (E. Merck, 0.040-0.063 mm). Todos los rendimientos obtenidos son de los productos obtenidos tras su purificación.

Los espectros de masas han sido registrados en un espectrómetro de masas Micromaas AUTOSPECQ mediante técnicas de ionización química, el CI a 150 eV y bombardeo de átomos rápidos (FAB) usando una matriz de tioglicerol. Mediciones de espectros de masa de alta resolución (HRMS) con una resolución de 10000.

Los espectros de RMN han sido registrados a 25°C en un espectrómetro Bruker AV500 a 500 MHz para  $^1\text{H}$  y 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se dan en partes por millón (ppm) en escala relativa al tetrametilsilano (TMS) y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz).

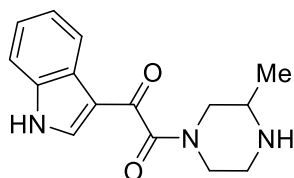
La pureza de los compuestos finales ha sido evaluada mediante análisis elemental C, H, N, S en un LECO TRUSPEC Modelo CHNS MICRO a una temperatura de combustión máxima de 1050°C.

### 4.2 Reacción de monoacilación selectiva de 2-piperazinas sustituidas.

Sobre una disolución de 2-metilpiperazina (0,5 g; 5,0 mmol) en diclorometano seco (170 mL) enfriada a 0°C, se añadió mediante embudo de presión compensada, una disolución del agente acilante apropiado (5,0 mmol) y piridina (10 mmol) en

diclorometano (30 mL). Una vez terminada la adición, se dejó reaccionar en baño de hielo y agua hasta que la cromatografía indicó que todo el producto de partida había reaccionado. Se procesó el producto obtenido evaporando el disolvente en rotavapor y se purificó por cromatografía en columna con el eluyente apropiado, obteniendo los productos correspondientes.

#### 4.2.1 4- [2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metilpiperazina (12)



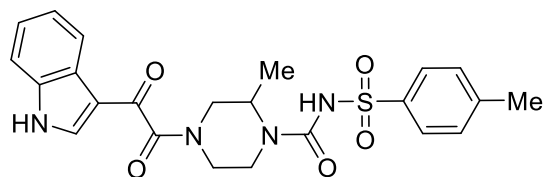
12

El producto fue obtenido como un sólido amarillento y purificado por cromatografía en columna usando acetato de etilo:metanol (9:1). (576 mg, 53% yield).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,14 (sa, 1H), 8,17-8,10 (m, 2H), 7,56 (d,  $J = 7,1$  Hz, 1H), 7,31-7,23 (m, 2H), 4,29-4,24 (m, 1H), 3,08-2,94 (m, 1H), 2,84-2,64 (m, 3H), 2,62–2.48 (m, 2H), 2.46–2,41 (m, 1H), 1.04, 0,85 (2d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  187,0, 166,3, 137,3, 125,4, 124,0, 123,0, 121,4, 121,3, 113,7, 113,2, 53,1, 51,2, 50,7, 48,0, 46,7, 46,1, 45,2, 41,5, 19,5, 19,1. HRMS ( $m/z$ ): calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$  272,1396  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; encontrado 272,1394.

#### 4.3 Reacción de formación de sulfonilureas

A una solución del derivado de monoacilo (0,3 mmol) en diclorometano seco (20 ml) se añadió el correspondiente isotiocianato (0,45 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Se dejó reaccionar en baño de hielo y agua hasta que la cromatografía en capa fina mostró que todo el producto de partida había reaccionado. Se procesó el producto obtenido evaporando el disolvente en rotavapor y se purificó por cromatografía en columna obteniendo los productos correspondientes con el eluyente apropiado, obteniendo los productos correspondientes con un rendimiento medio.

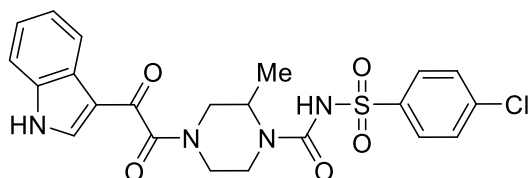
**4.3.1 4-[2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metil-1-[(p-metilbencenosulfonil)aminocarbonil]piperazina (13)**



13

El producto fue obtenido como un sólido y purificado por cromatografía en columna usando diclorometano:metanol (15:1) como eluyente. (56 mg, 41% yield).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,4 (sa, 1H), 8,25-8,13 (m, 3H), 7,65-7,51 (m, 2H), 7,33-7,13 (m, 3H), 5,24, 5,06 (2s, 1H), 4,35-4,23 (m, 1H), 3,22-3,05 (m, 2H), 2,99-2,56 (m, 4H), 2,32 (s, 3H), 1,12, 0,95 (2d,  $J = 6.1$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  186,6, 166,4, 159,3, 143,3, 140,0, 137,7, 137,4, 128,6, 127,3, 125,3, 124,1, 123,1, 121,4, 121,3, 113,6, 113,5, 113,2, 53,1, 51,2, 50,7, 46,7, 46,1, 45,1, 44,3, 41,5, 31,8, 28,5, 21,4, 18,4, 18,0. HRMS ( $m/z$ ): calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5\text{SNa}$  491,1360  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; encontrado 491,1351

**4.3.2 4-[2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metil-1-[(p-clorobencenosulfonil)aminocarbonil]piperazina (14)**

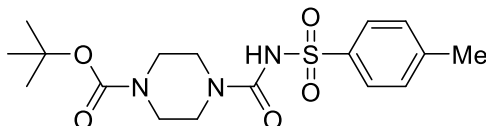


14

El producto fue obtenido como un sólido y purificado por cromatografía en columna usando acetato de etilo:metanol (6:1) como eluyente. (52 mg, 65% yield).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,30 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 8,22-8,02 (m, 2H), 7,90-7,62 (m, 3H), 7,58-7,23 (m, 4H), 4,60, 4,38 (2s, 1H), 4,33-4,15 (m, 1H), 4,14-3,91 (m, 1H), 3,56-3,47 (m, 1H), 3,26-3,14 (m, 1H), 3,05-2,69 (m, 3H), 1,06, 0,90 (2d,  $J = 7,1$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  186,1, 186,0, 166,6, 166,5, 159,4, 159,3, 143,0, 137,3, 136,9, 136,8, 136,5, 129,0, 128,7, 128,4, 127,7, 127,6, 124,9, 123,6, 123,5, 122,5, 120,9, 113,1, 112,7, 112,6, 51,0, 50,7, 49,7, 45,7, 45,0, 40,8, 14,9, 14,7. HRMS ( $m/z$ ): calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{ClO}_5\text{SNa}$  511,0813  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; encontrado 511,0808.



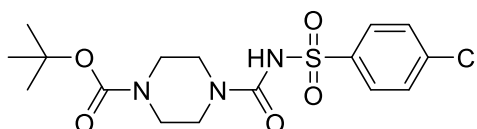
### 4.3.3 4-terc-butoxicarbonil-1-[(p-metilbencenosulfonil)aminocarbonil]piperazina (15)



15

El producto fue obtenido como un sólido y purificado por cromatografía en columna usando acetato de etilo:hexano (10:1) como eluyente. (122 mg, 67% yield).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7,74-7,65 (m, 2H), 7,26-7,21 (m, 2H) 5,76 (s, 1H), 3,39-3,26 (m, 4H), 3,24-3,18 (m, 4H), 2,34 (s, 3H), 1,41 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  158,4, 153,9, 141,8, 141,4, 129,3, 128,3, 128,2, 126,5, 125,6, 78,8, 51,2, 43,0, 28,0, 20,9, 20,8. HRMS ( $m/z$ ): calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6\text{SNa}$  406,1407  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; encontrado 406,1401.

### 4.3.4 4-terc-butoxicarbonil-1-[(p-clorobencenosulfonil)aminocarbonil]piperazina (16)



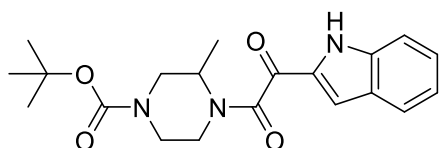
16

El producto fue obtenido como un sólido y purificado por cromatografía en columna usando acetato de etilo:hexano (4:1) como eluyente. (148 mg, 73% yield).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7,89-7,82 (m, 2H), 7,67-7,59 (m, 2H) 5,75 (s, 1H), 3,34-3,29 (m, 4H), 3,27-3,22 (m, 4H), 1,39 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  158,5, 154,7, 143,4, 137,3, 129,7, 129,3, 129,1, 128,6, 79,9, 43,8, 28,5. HRMS ( $m/z$ ): calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_6\text{SClNa}$  426,0861  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; encontrado 426,0855.

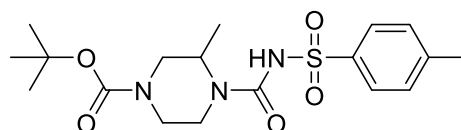
## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En este Trabajo de Fin de Grado partiendo de los prototipos (**10** y **11**) seleccionados de la línea de investigación del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Sevilla, el objetivo buscado es diseñar nuevos compuestos con potencial actividad anti-VHC, procediendo a realizar modificaciones en sus estructuras:



**10**



**11**

En estos compuestos existen varios puntos claves, que han demostrado participar en la actividad antiviral (Fig. 18 y 19):

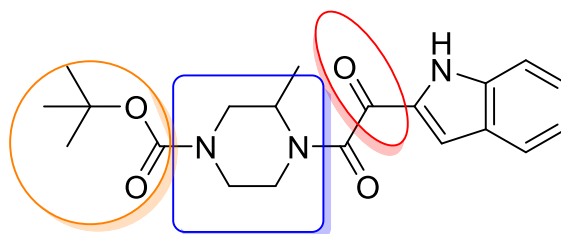


Figura 18. Grupos importantes en el prototipo **10**.

- I. Función carbamato.
- II. Anillo de piperazina: núcleo presente en compuestos inhibidores de la NS3/4A.
- III. Función  $\alpha$ -cetoamida: grupo que proporciona a la estructura un centro electrófilo, otro punto clave en la actividad, debido a su unión covalente reversible al residuo Ser139.

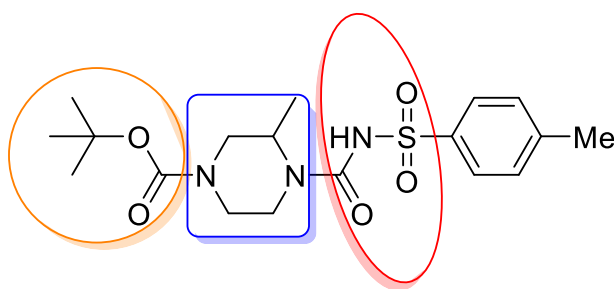


Figura 19. Grupos importantes en el prototipo **11**.

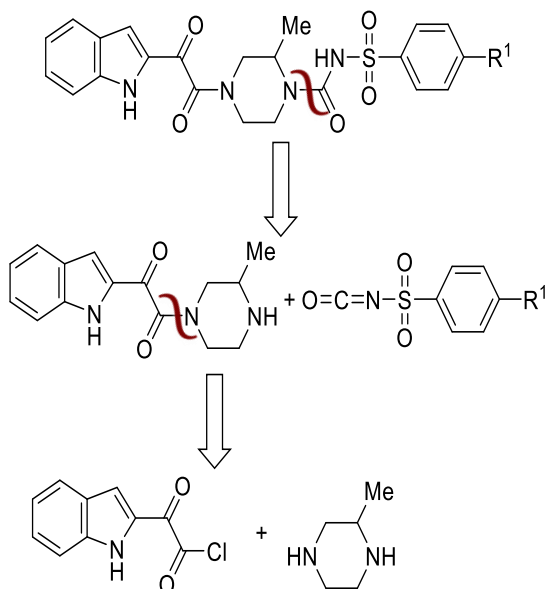
- I. Función carbamato
- II. Anillo de piperazina: núcleo presente en compuestos inhibidores de la NS3/4A.
- III. Función sulfonilurea: la función urea está presente en varios compuestos de la literatura, inhibidores de la NS3/4A.

El planteamiento elegido para el diseño y síntesis de los nuevos compuestos fue el siguiente, por un lado (Fig.20 Análisis retrosintético A)

- a) Unificar en una misma estructura la función ceto indol (presente en el prototipo **10**) y el grupo sulfonilurea (presente en **11**) en el anillo de 2-metilpiperazina.
- b) Dotar al anillo aromático de diferente densidad de cargas mediante la presencia de grupos atractores (Cl) o donadores de electrones (Me) en posición para del anillo.

Y por otro, basándonos en el prototipo **11**, preparar sulfonilureas derivadas de la Boc-piperazina comercial, de forma que se obtengan análogos carentes del metilo en posición 2 del anillo de piperazina, y poder determinar así si su presencia es necesaria para la actividad biológica, además de incorporar en el anillo aromático de grupos atractores o donadores de electrones (Fig.20 Análisis retrosintético B).

Análisis retrosintético A



Análisis retrosintético B

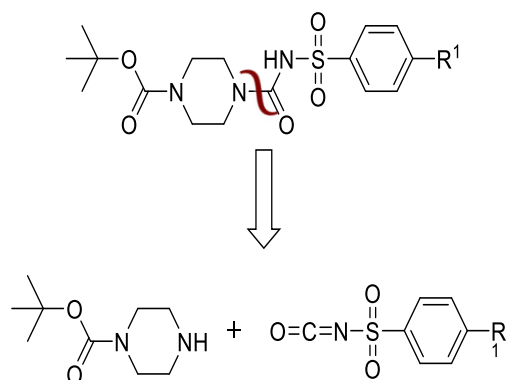
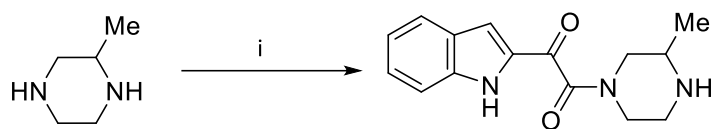


Figura 20. Estructuras generales y análisis retrosintético

La obtención de los compuestos se llevó a cabo mediante reacciones sencillas y por una metodología sintética corta obteniendo compuestos de rendimiento moderado-alto.

La metodología experimental consistió en la síntesis de diferentes derivados de 2-metilpiperazina y piperazina con una función sulfonilurea en posición 1 y una función cetoamida o carbamato en posición 4. Estos procesos se basan en reacciones de acilación de los grupos amino de las moléculas 2-metilpiperazina y piperazina.

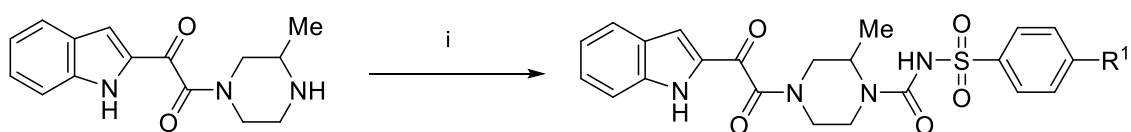
Para la síntesis del producto de partida **12** la acilación se produce de forma selectiva en el nitrógeno 4 de la 2-metilpiperazina, ya que es el menos impedido estéricamente. Esta reacción se realiza a baja temperatura, y añadiendo una disolución del cloruro de 2-oxo-2-(1H-indol-3-il)acetilo gota a gota para favorecer la síntesis de un único producto (Esquema 1).



i: producto de partida 1 eq, cloruro de cetoindol 1 eq, piridina 2 eq y diclorometano

Esquema 1

El compuesto **12** se empleó como precursor para la síntesis de los compuestos **13** y **14**, por reacción con diferentes isocianatos de sulfonilurea. (Esquema 2).



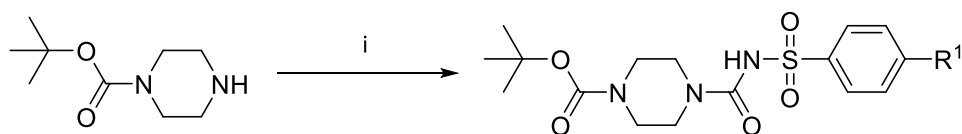
**13:** R<sup>1</sup>: Me

**14:** R<sup>1</sup>: Cl

i: monoamida 1 eq, isocianato 1,5 eq, y diclorometano

Esquema 2

A partir del producto comercial Boc-piperazina se sintetizaron los compuestos **15** y **16**, por reacción con diferentes isocianatos de sulfonilurea en las mismas condiciones anteriores (Esquema 3).



**15:** R<sup>1</sup> Me

**16:** R<sup>1</sup> Cl

i: boc-piperazina 1 eq, isocianato 1,5 eq, y diclorometano

Esquema 3

Cada compuesto tiene señales de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN características de sus grupos funcionales, mostradas en las siguientes tablas (Tabla 1 y 2).

**Tabla 1.** Señales de  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) más características para los compuestos **13-16**.

Entry	Comp	NH indol	NH urea	CH piperazina	Ph- $\text{CH}_3$	$\text{CH}_3$ piperazina	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$
1	<b>13</b>	12,4	5,24, 5,06	4,35, 4,23	2,32	1,12, 0,95	-
2	<b>14</b>	12,3	4,60, 4,38	4,33, 4,15	-	1,06, 0,90	-
3	<b>15</b>	-	5,76	-	2,34	-	1,41
4	<b>16</b>	-	5,75	-	-	-	1,39

La señal presente en los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de los 4 productos finales es el protón de la función urea, entre 4.5-5,5 ppm. En los compuestos **13** y **14** se aprecian tres señales características ausentes en **15** y **16**, a campo bajo, sobre 12 ppm el protón del grupo indol, la señal del metino del anillo de piperazina sobre 4,3 ppm y a campo alto, la señal debida al metilo en la posición 2 del anillo de piperazina sobre 1,0 ppm. En los compuestos **15** y **16**, se observa a 1,4 ppm el singulete que integra para nueve protones debido al grupo tert-butoxilo del Boc. Para los dos derivados que poseen un metilo en la posición para del anillo aromático, **13** y **15**, se aprecia a 2,3 ppm un singulete que integra para tres protones.

**Tabla 2.** Señales de  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) más características para los compuestos **13-16**.

Entry	Comp	C=O (cetona)	CO (amida)	CO (urea)	CO (carbamato)	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	CH anillo	Ph- $\text{CH}_3$	$\text{CH}_3$ anillo	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$
1	<b>13</b>	186,6	166,4	159,1	-	-	53,1	21,4	18,4, 18,0	-
2	<b>14</b>	186,1 186,0	166,6 166,5	159,4 159,3	-	-	59,7	-	14,9, 14,8	-
3	<b>15</b>	-	-	158,4	153,9	78,8	-	20,9, 20,8	-	28,0
4	<b>16</b>	-	-	158,5	154,7	-	-	-	-	28,5

En los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN existe también una señal presente en los 4 productos finales, la del carbonilo de la función urea en torno a 158-159 ppm. Se aprecian señales

características en los dos derivados de 2-metilpiperazina, **13** y **14**, el carbonilo de la función ceto a 186 ppm, el carbonilo de la función amida en el nitrógeno 4 a 166 ppm, el carbono del metino del anillo de piperazina sobre 53 ppm y el metilo de la posición 2 de la piperazina. En los compuestos **15** y **16**, aparecen a 154 ppm la señal del carbonilo de grupo carbamato en el nitrógeno 4, a 79 ppm el carbono cuaternario del grupo *terc*-butilo y a 28 ppm la señal para los tres metilos de dicho grupo.

## 6 CONCLUSIONES

---

Como parte de la línea de investigación que se lleva a cabo en el Dpto. de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Sevilla dirigida a la síntesis de nuevos compuestos con posible actividad anti-VHC, en este Trabajo de Fin de Grado se ha realizado:

1. El diseño de compuestos derivados de 2-metilpiperazina potencialmente activos como quimioterápicos, planteadas sus estructuras a partir de los prototipos seleccionados previamente por mostrar actividad como inhibidores de la NS3/4A
2. La síntesis de los nuevos compuestos diseñados empleando una metodología sintética sencilla y corta, que transcurre con rendimientos de moderado a altos. Se ha sintetizado un producto precursor y 4 productos finales.
3. La caracterización estructural de los nuevos compuestos. Confirmando que el producto obtenido correspondía con la estructura propuesta. Para el análisis estructural se han realizado sus Espectros de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, para lo cual se ha contado con la colaboración de los Servicios de Espectrometría de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear del CITIUS de la Universidad de Sevilla.
4. Debido a la falta de tiempo, los resultados de las pruebas biológicas para saber el grado de inhibición de la enzima NS3/4A por estos compuestos no ha sido posible incluirlos en este Trabajo de Fin de Grado.



## 7 BIBLIOGRAFÍA

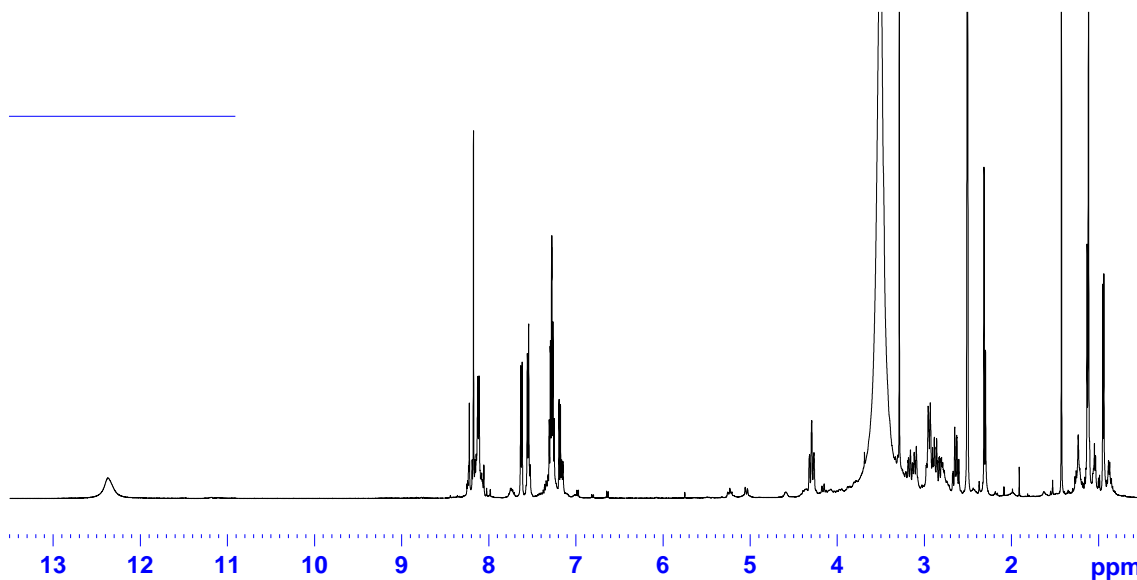
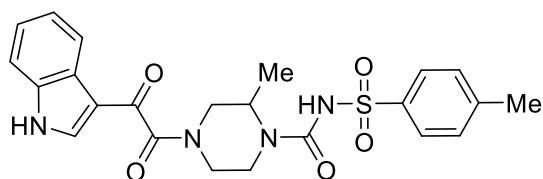
---

1. Shors, T. (2009). Virus: Estudio molecular con orientación clínica: Ed. Médica Panamericana
2. Izquierdo, E. y Escobar, I. (2012). Interacciones de los nuevos inhibidores de la proteasas para el tratamiento de la hepatitis C: Telaprevir y Boceprevir. *Farmacia Hospitalaria*, 36(6): 469-482.
3. Muga, R. et al. (2015). Hepatitis C asociada al abuso de sustancias: nunca tan cerca de un tratamiento sin Interferón. *Adicciones*, 27(2): 141-149.
4. Hernández, H. (2012). Efectos del ácido acetilsalicílico sobre la actividad proteasa-helicasa de la proteína NS3/4A del virus de la hepatitis C (VHC) (Tesis de maestría). Universidad autónoma de nuevo León, México.
5. La hepatitis C en España: Reflexiones con una visión multidisciplinar [PDF]. (2016). Madrid, España.
6. I.E.S. Rayuela. Recuperado el 20 de mayo de 2017, de (URL-<http://ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org/deptos/dbiogeno/recursos/Apuntes/ApuntesBioBach2/2-GenMolecular/Virus.htm>).
7. Cuenca, F. (2010). Factores predictivos basales de respuesta al tratamiento combinado con interferón pegilado y ribavirina en pacientes con infección crónica por virus de hepatitis C genotipo 1 (Tesis doctoral). Universidad complutense de Madrid, España.
8. Aktories, K. et al. (2013). Hepatitis C Virus: From molecular virology to antiviral therapy. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
9. Micheloud D. (2008) Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas EMEI El virus de la Hepatitis C [Internet]. Recuperado el 22 de mayo de 2017, de <http://epidemiologiamolecular.com/virus-hepatitis-vhc/>
10. Marton, S. (2012). Selección y caracterización de RNAs dirigidos contra en dominio genómico CRE del virus de la hepatitis C (HCV) (Tesis doctoral). Universidad de Granada, España.
11. Fields, B., Knipe, D. y Howley, P. (2011). Fields virology. Philadelphia: Lippincott-Raven.

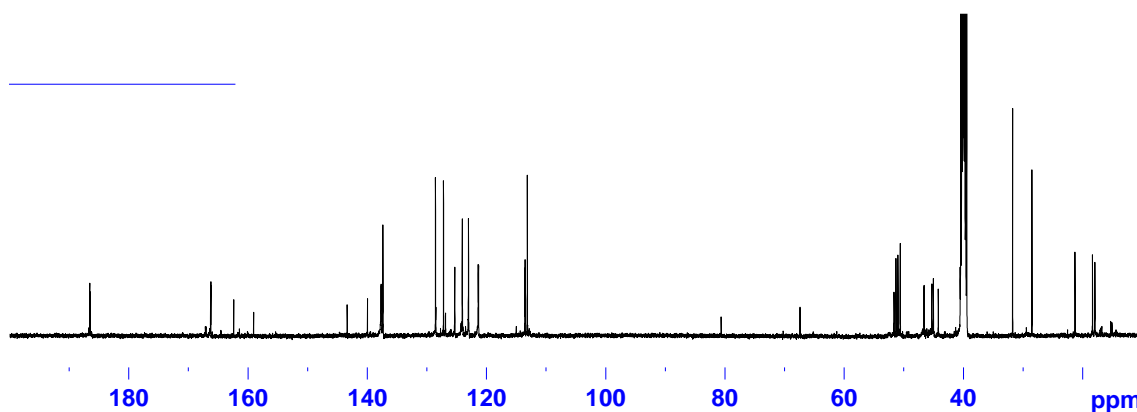
12. Choo, Q. et al. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the national academy of sciences*, 88: 2451-2455.
13. Hoyos, A., Vanegas, N. y Páez, E. (2002) Acta médica Colombiana. [Internet] Recuperado el 20 de mayo de 2017, de [www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/04-2002-06.htm](http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/04-2002-06.htm).
14. Guangdi, L., De Clercq, E. (2017). Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals. *Antiviral Research*. 142: 83-122.
15. Delgadillo, S. G., Del Razo, B., López, L. y Corbalá, G. (2015). Diseño de agentes antivirales de acción directa inhibidores de la proteasa de serina NS3/4A y la polimerasa NS5B RNA dependiente para el tratamiento de Hepatitis C mediante acoplamiento molecular. *Memorias del XVII concurso Lasallista de investigación*. 8: 17-21.
16. McGiven, D., Masaki, T., Lovell, W., Hamlett, C., Saalau-Bethel, S. y Graham, B. (2015). Proteasa inhibitors block multiple functions of the NS3/4A protease-helicase during the hepatitis C virus life cycle. *Journal of virology*. 10(89): 5362-5370.
17. Bermúdez, A. D. (2008). Función de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis *Revista de educación bioquímica*. 27(3): 79-84.
18. Fernández, M. (2015) Fármacos inhibidores de proteasa virales. Optimización de su relación estructura-actividad (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
19. Chao Lin. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. Chapter 6: HCV NS3-4A Serine Protease. [internet] Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006.
20. Jiménez, R., Albacete, A., Monje, P., Borrego, Y. y Morillo, R. (2014). Nuevos fármacos en el abordaje terapéutico de la hepatitis C. *Farmacia hospitalaria*. 38(3): 231-247.
21. Gising, J., Belfrage, A. K., Alogheli, H., Ehrenberg, A., Akerblom, E., Svensson, R., et al. (2013). Achiral Pyrazinone-Based Inhibitors of the Hepatitis C Virus NS3 Protease and Drug-Resistant Variants with Elongated Substituents Directed Toward the S2 Pocket. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57: 1790-1801.
22. Flint, S. J. et al. (2015) Principles of virology. Washington, DC: ASM Press

23. Kang, I., Hsu, S., Yang, H., Yeh, T., Lee, C., Lee, Y. et al. (2016). A Potent, Selective, and Orally Bioavailable HCV NS5A Inhibitor for Treatment of Hepatitis C Virus: (S)-1-((R)-2-(Cyclopropanecarboxamido)-2-phenylacetyl)-N-(4-phenylthiazol-2-yl)pyrrolidine-2-carboxamide. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60: 228-247.
24. He, S., Xiao, J., Dulcey, E., Lin, B., Rolt, A., Hu, Z., et al. (2016). Discovery, Optimization, and Characterization of Novel Chlorcyclizine Derivatives for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59: 841-853.
25. Kinchington, D. y Schinazi, R.F. (2011) Antiviral Methods and Protocols. Human Press.
26. Bartenschlager, R., Lohmann, V. y Penin, F. (2013). The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Microbiology*, 11: 482-496.

## Anexo



Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 4-[2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetyl]-2-metil-1-[(p-metilbencenosulfonil)aminocarbonil]piperazina (**13**)



Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 4-[2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetyl]-2-metil-1-[(p-metilbencenosulfonil)aminocarbonil]piperazina (**13**)