



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

**FARMACOMODULACIÓN DE UREAS DERIVADAS DE
PIPERAZINA CON ACTIVIDAD ANTIADENOVIRUS.
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL**

Sandra Medina Payán



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

**FARMACOMODULACIÓN DE UREAS DERIVADAS DE PIPERAZINA CON
ACTIVIDAD ANTIADENOVIRUS. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN
ESTRUCTURAL**

Sandra Medina Payán

Sevilla, 18 de Junio de 2018

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica
Tutores: Margarita Vega Holm y Fernando Iglesias Guerra

Tipología del proyecto: Experimental

Vº Bº Margarita Vega Holm

VºBº Fernando Iglesias Guerra

RESUMEN

Los adenovirus humanos (HAdVs) son patógenos pertenecientes a la familia *Adenoviridae*. Actualmente se han logrado identificar más de 60 serotipos distintos del virus, distribuidos en siete especies (A-G) que se diferencian entre sí en el tipo de receptor que utilizan, en el tropismo y en las manifestaciones clínicas que producen. Son virus relativamente grandes que presentan un diámetro de 70 a 90 nm, un peso molecular de 150 MDa, ADN lineal de doble cadena y diez proteínas estructurales.

En personas inmunocompetentes, la mayoría de las infecciones son autolimitadas y el espectro de las mismas varía desde una leve infección respiratoria a infecciones gastrointestinales y conjuntivitis. Por el contrario, en pacientes inmunodeprimidos el cuadro clínico es más crítico y se pueden observar neumonías, hepatitis, cistitis hemorrágica, colitis, pancreatitis, meningoencefalitis y enfermedad diseminada, siendo la causa de una alta morbilidad y mortalidad en la población pediátrica receptora de trasplantes de células hematopoyéticas, en especial.

Desde el punto de vista terapéutico no existe un tratamiento antiviral específico aprobado para tratar las infecciones. Ante esta situación, se suelen utilizar antivirales de amplio espectro tales como cidofovir, brincidofovir y ribavirina.

El objetivo de este proyecto es el diseño de nuevos compuestos potencialmente activos como antiadenovirus realizando modificaciones estructurales en prototipos activos, actualmente en estudios en modelo animal, desarrollados en el grupo de investigación en el que se ha realizado este trabajo; la síntesis de los nuevos derivados y la caracterización estructural de los mismos.

Se empleó una metodología sintética sencilla que transcurrió con buenos rendimientos químicos. Los nuevos compuestos se caracterizaron por Espectrometría de Masas, de ^1H NMR y ^{13}C NMR.

Palabras clave: adenovirus, ureas, piperazina, farmacomodulación

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ARNip: Pequeño ARN de interferencia.

CAR: Receptor Coxsackie-Adenovirus.

CCF: Cromatografía en capa fina.

CD: grupo de diferenciación.

CDV: Cidofovir.

CI: Ionización química.

DSG2: Desmoglein-2.

FAB: Bombardeo de átomos rápidos.

HAdV: Adenovirus humano.

HCMV: Citomegalovirus humano.

HRMS: Espectro de masa de alta resolución.

HSPG: Proteoglicano heparán sulfato.

MDa: Megadalton.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

MS: Espectro de masa.

MTOC: Centro organizador de microtúbulos.

SR: receptor Scavenger.

TMS: Tetrametilsilano.

TLR: Receptor tipo Toll.

VCAM: Molécula de adhesión de células vasculares.

ÍNDICE

1. Introducción	6
1.1. Morfología	7
1.2. Ciclo biológico	8
1.3. Diagnóstico	9
1.4. Transmisión	10
1.5. Prevención	10
2. Antecedentes	11
3. Objetivos	18
4. Metodología	19
4.1. Métodos generales	19
4.2. Introducción de la función urea por reacción con isocianato	19
4.3. Desprotección del grupo protector Boc	21
4.4. Reacción de acilación	22
5. Resultados y discusión	24
5.1. Diseño de los análogos	24
5.2. Metodología sintética	25
5.3. Caracterización estructural	27
6. Conclusiones	29
7. Referencias	30
8. Anexos	32

1. INTRODUCCIÓN

Los adenovirus humanos (HAdV) son patógenos pertenecientes a la familia *Adenoviridae* que fueron identificados en el año 1953 por Rowe, en un cultivo in vitro de tejido adenoide humano (Malmberg et al., 2017). Están relacionados con la producción de infecciones a nivel de las vías respiratorias, el sistema gastrointestinal, el sistema ocular y los sistemas excretores. Actualmente se ha logrado identificar más de 60 serotipos distintos del virus, distribuidos en siete especies (A-G) que se diferencia entre sí en el tipo de receptor que utilizan, en el tropismo y en las manifestaciones clínicas que producen (Tabla 1). Estas manifestaciones son distintas en función de la edad, estado inmunológico y tipo de adenovirus que se instaure en el paciente (Arnberg, 2012).

Tabla 1. Clasificación y características HAdVs (Arnberg, 2012)

Especies	Serotipos	Receptores	Tropismo
A	12, 18, 31	CAR	Respiratorio y entérico
B1	3, 7, 16, 21, 50	CD46, DSG2, CD80, CD86	Respiratorio y ocular
B2	11, 14, 34, 35	CD46, DSG2, CD80, CD86	Renal, respiratorio y ocular
C	1, 2, 5, 6	CAR, VCAM-1, HSPG, MHCI- α 2, SR	Respiratorio, ocular, linfoide y hepático
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54	SA, CD46, CAR	Entérico y ocular
E	4	CAR	Respiratorio y ocular
F	40, 41	CAR	Entérico
G	52	ND	Entérico

Los serotipos 1-4, 7 y 21 son responsables de causar enfermedades en humanos, y cada serotipo está asociado a un síndrome clínico específico (Sandkovsky et al., 2014). En personas inmunocompetentes, el espectro de infecciones varía desde una leve infección respiratoria a infecciones gastrointestinales y conjuntivitis. Sin embargo, en pacientes inmunodeprimidos el cuadro clínico es más crítico y se pueden observar neumonías, hepatitis, cistitis hemorrágica, colitis, pancreatitis, meningoencefalitis y enfermedad diseminada (Weigt et al., 2011) (Tabla 2).

Entre los factores que se asocian al padecimiento de enfermedades graves y a la obtención de deficientes resultados se encuentran: trasplante alogénico, edad temprana, enfermedad diseminada, exposición a agentes que disminuyen las células T y recuento bajo de células T después de un trasplante, entre otros (Sandkovsky et al., 2014). Además, cabe destacar que las infecciones por HAdV son más comunes en pacientes pediátricos receptores de trasplantes, con una incidencia del 10% (Sandkovsky et al., 2014).

Tabla 2. Asociación de enfermedades adenovirales y principales serotipos en inmunocompetentes e individuos inmunocomprometidos (Echavarría, 2008)

Síndromes	Serotipos implicados					
	A	B	C	D	E	F
Enfermedad respiratoria superior		Todos	Todos			
Enfermedad respiratoria inferior		3, 7, 21			4	
Tos ferina			5			
Enfermedad respiratoria aguda		7, 21				4
Fiebre faringoconjuntival				8, 19, 37		
Queratoconjuntivitis epidémica		11				
Conjuntivitis hemorrágica aguda		7, 11, 21, 35				
Cistitis hemorrágica aguda	31	Todos	todos	29, 30, 37, 43, 45		
Enfermedad del huésped inmunodeprimido	31		2			40, 41
Gastroenteritis infantiles	31					
Enfermedades del sistema nervioso central		3, 7				
Enfermedad transmitida sexualmente			2	19, 37		

Actualmente se están desarrollando líneas de investigación relacionadas con el uso de adenovirus como vectores. Entre las ventajas que supone este hecho encontramos que estos virus son fáciles de obtener, tienen un tamaño grande y que se transducen de manera eficiente tanto en células que se dividen como en las que no. Por este motivo los adenovirus son los vectores más utilizados en los ensayos clínicos. Además, dichos vectores se están utilizando para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y para elaborar vacunas para tratar o prevenir infecciones de tipo VIH, adenovirus, citomegalovirus y/o infecciones provocadas por el virus de Epstein-Barr en individuos inmunocompetentes (Arnberg, 2012).

1.1. Morfología

En cuanto a la morfología, los adenovirus humanos son virus relativamente grandes que presentan un diámetro de 70 a 90 nm, un peso molecular de 150 MDa y diez proteínas estructurales. Poseen ADN lineal de doble cadena con 35 000 – 37 000 pares de bases, cuya contenido en G+C oscila entre el 48 y 58% para los diferentes tipos de adenovirus (Hierholzer, 1992). Este ADN se encuentra rodeado por una cápside, cuyas proteínas se disponen formando un icosaedro que contiene 20 caras triangulares y 12 vértices, con 252 capsómeros de los cuales 240 son hexones y 12 son pentones. Cada pentón está formado por una base y una fibra, que es una proyección exterior en forma de varilla con una longitud variable en función del tipo de virus (Hierholzer, 1992). El hexón contiene determinantes antigénicos específicos

del grupo y del subgrupo, y neutralización específica del tipo epítipo; la fibra presenta hemaglutinas y epítipos neutralizantes que son específicos; y el pentón actúa de factor tóxico separando las células en cultivo. Las tres proteínas (hexón, pentón y fibra) encapsidan el ADN viral y se mantienen unidas gracias a las proteínas IIIa (pIIIa), IX (pIX) y otras proteínas de cemento (Figura 1). El proceso de entrada en la célula huésped está influido por los pentones y las fibras del virus.

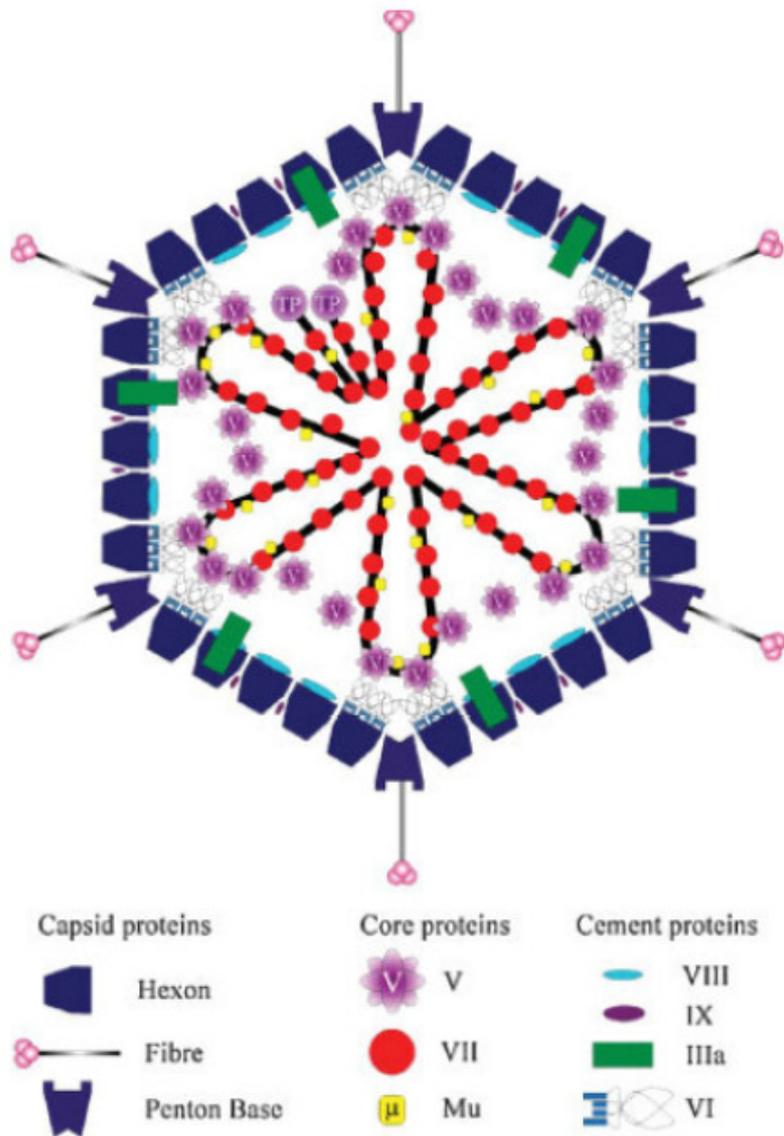


Figura 1. Estructura del adenovirus (Lenaerts et al., 2008)

1.2. Ciclo biológico

La infección inicia con la unión del dominio de control de la fibra del adenovirus al receptor coxsackie-adenovirus (CAR) ubicado en la superficie celular. Tanto el pentón como la fibra del virus son los responsables de la fijación e internalización, respectivamente, que favorece la entrada del virus a la célula huésped por endocitosis. El ambiente ácido del endosoma permite que la cápside se disocie, facilitándose la liberación de los viriones. A continuación, las partículas adenovíricas se desplazan a lo largo de los microtúbulos hasta llegar al poro nuclear

(Toth et al., 2010). Una vez instalado en el poro nuclear, el genoma del adenovirus junto con la proteína VII viaja al núcleo y se produce la transcripción de la región temprana E1A del virus por la ARN polimerasa II celular. La proteína E1A desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión génica del huésped y también es necesaria para la expresión de los genes tempranos E1B, E2, E3 y E4, así como para la replicación de ADN del virus. Por otro lado, la replicación del ADN viral requiere de la presencia de tres proteínas esenciales: el polímero de ADN viral, la proteína preterminal (pTP) y la proteína de unión al ADN (Martínez-Aguado et al., 2015).

El ciclo de replicación del adenovirus se divide en dos fases (temprana y tardía), en función del inicio de la expresión génica viral. Ambas fases comienzan con una transcripción primaria que genera ARNm monocistrónicos compatibles con el ribosoma del huésped. En la fase temprana se expresan genes virales que promueven la entrada celular en una fase tipo S, bloquean la apoptosis y previenen las respuestas inmunes celulares. Después de la expresión de genes virales tempranos que controlan componentes celulares críticos y regulan la expresión génica viral y del huésped, el ADN viral se replica. A continuación tiene lugar la fase tardía, en la cual se sintetizan proteínas estructurales y proteínas necesarias para ensamblar el material genético producido durante la replicación. Una vez finalizadas las dos fases anteriores el virus se ensambla y se libera de la célula como resultado de la lisis celular inducida por él mismo (Malmberg et al., 2017).

1.3. Diagnóstico

El adenovirus humano se puede detectar mediante métodos directos e indirectos. Los métodos directos incluyen el aislamiento del virus en un cultivo celular y la detección del genoma del virus (Matthes-Martin et al., 2013). El cultivo del virus es un método sensible para detectar la mayoría de los serotipos puesto que causan un efecto citopático característico en las líneas celulares epiteliales y en los fibroblastos humanos. El adenovirus se puede cultivar a partir de muestras de garganta, nasofaringe, conjuntiva, esputo, heces, orina, sangre y fluido cerebroespinal. No obstante, los adenovirus que están asociados a infecciones entéricas (grupo F y serotipos 40 y 41) no crecen en las líneas celulares utilizadas normalmente (Flomenberg, 2005). El diagnóstico molecular por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una herramienta relativamente rápida y sensible que permite distinguir entre especies y serotipos. Sin embargo, esta técnica tiene un alto costo y requiere un equipo especializado para llevarlo a cabo, por lo que no es muy accesible (Flomenberg, 2005).

La serología se encuentra dentro de los métodos indirectos. No obstante, presenta una serie de limitaciones a causa de su baja sensibilidad y a la producción inadecuada de anticuerpos en pacientes inmunodeprimidos (Matthes-Martin et al., 2013). Por ello, la serología queda limitada a la realización de investigaciones epidemiológicas y de asociaciones entre resultados inusuales y la detección del virus. Las pruebas más utilizadas son los ensayos de inmunofluorescencia directa (IFD) e indirecta (IFI), los test de ELISA y la reacción de fijación del complemento (RFC) (Matthes-Martin et al., 2013). No obstante, son técnicas no muy sensibles para el diagnóstico de adenovirus, en comparación con los métodos de cultivo celular y el diagnóstico molecular (Flomenberg, 2005).

1.4. Transmisión

El virus se transmite por contacto directo con el entorno del paciente, a través de secreciones y fómites contaminados. En el caso de las cepas relacionadas con la producción de gastroenteritis, la vía de transmisión es fecal-oral (Ison et al., 2009). Es importante destacar la posibilidad de contraer la infección a través de órganos adquiridos de un donante infectados, pues el virus puede quedar latente y causar la enfermedad en el receptor durante el periodo de inmunosupresión después de recibir el trasplante (Ison et al., 2009).

A pesar del impacto clínico y de ser la causa de la alta movilidad y mortalidad de pacientes inmunodeprimidos, actualmente no existen terapias antivirales aprobadas para las infecciones por HAdV (Martínez-Aguado et al., 2015). La atención de apoyo y la reducción de la inmunosupresión son fundamentales para tratar las infecciones por adenovirus (Sandkovsky et al., 2014). Es interesante saber que el virus es resistente a los desinfectantes lipídicos, pero se inactiva con calor, formaldehído y cloro (Flomenberg, 2005).

1.5. Prevención

Las estrategias propuestas para la prevención del virus incluyen agrupar a los pacientes, limitar el número de personal y visitantes en la habitación de un paciente y excluir a los miembros infectados del personal del hospital de la unidad (Weigt et al., 2011). No es probable que el lavado de manos erradique el virus que puedan estar presentes en las manos de los miembros del personal hospitalario (Weigt et al., 2011, Ison et al., 2009).

2. ANTECEDENTES

HAdV es actualmente un patógeno con una alta carga clínica de impacto en pacientes inmunodeprimidos. Sin embargo aún no existen vacunas o medicamentos antivirales específicos disponibles para tratar las infecciones.

A la hora de desarrollar medicamentos antiHAdV específicos, debemos tener en cuenta que no se suele realizar el serotipado para HAdV en las unidades de diagnóstico y que diferentes serotipos de virus pueden causar una misma patología. Por este motivo, los posibles fármacos antiHAdV deben tener un amplio espectro para abarcar todos los serotipos posibles. Con este fin, existen múltiples procesos específicos de HAdV sobre los que poder actuar como la entrada, la replicación o el ensamblaje del virión. Por otro lado, la utilización del adenovirus como vector terapéutico está ayudando a determinar las interacciones que se establecen entre las células huésped y los virus.

Aunque no existen medicamentos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) para el tratamiento de las infecciones por adenovirus humano, determinados agentes como cidofovir, brincidofovir, ribavirin y ganciclovir han demostrado actividad *in vitro* contra el virus (Ison et al., 2009). De todos ellos, cidofovir (CDV) intravenoso ha resultado ser el más eficaz, ya que presenta actividad frente a todos los serotipos de adenovirus (Ganapathi et al., 2016). CDV (Figura 2) es un análogo de fosfonato del nucleósido acíclico de desoxicitidina monofosfato que está aprobado para tratar la retinitis por citomegalovirus humano (HCMV). Además, CDV parece tener actividad antiHAdV en los humanos, especialmente pacientes pediátricos receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas (Matthes-Martin et al., 2013). No obstante, los ensayos clínicos controlados con CDV no se han completado. En modelos de ojo de cobaya y rata, CDV presenta actividad antiviral frente a infecciones de HAdVs cuando se administra por vía tópica (Kaneko et al., 2004). Desafortunadamente, la administración sistémica CDV puede causar nefrotoxicidad grave (Izzedine et al., 2005) y por lo tanto, su uso prolongado debe de ser evitado. Por esta razón, la mayoría de los centros de trasplante utilizan cidofovir por vía intravenosa para el tratamiento de la enfermedad grave, progresiva y diseminada. Una vez iniciado, el tratamiento debe continuar hasta que los síntomas se hayan resuelto por completo y hasta que den negativas tres muestras consecutivas obtenidas una semana después de la prueba que dio positiva (Florescu y Hoffman, 2013, Ison et al., 2009).

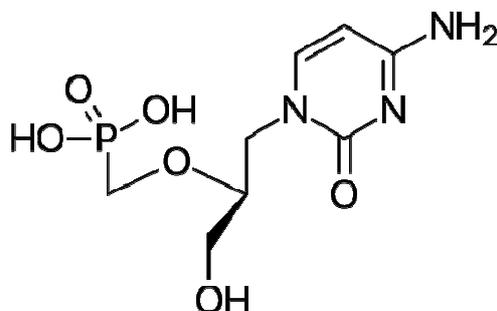


Figura 2. Estructura del cidofovir

Cidofovir también se suele utilizar como medicamento preventivo en pacientes con viremia, con un síndrome clínico compatible con la infección por adenovirus. Hay que tener en cuenta los posibles efectos secundarios de la medicación antes de comenzar la terapia antiviral (Abbas et al., 20017).

Otro medicamento utilizado ocasionalmente para tratar la infección por adenovirus humano es la ribavirina (Figura 3). La ribavirina es un análogo de guanosina cuyo uso está aprobado en el tratamiento del virus de la hepatitis C y las infecciones por el virus sincitial respiratorio. A pesar de que la ribavirina demostró tener actividad frente a ciertos serotipos de HAdVs en cultivos celulares (especialmente los del tipo C (Morfin et al., 2009)), no se ha establecido la eficacia de este antiviral en tratamientos para infecciones adenovirales en humanos o en modelos animales.

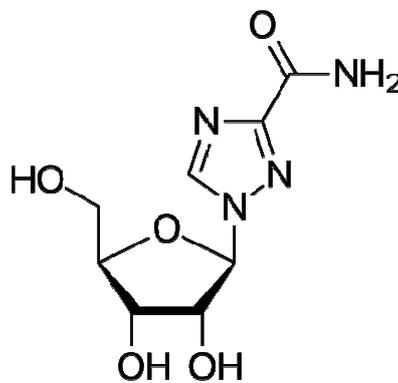


Figura 3. Estructura de la ribavirina

Brincidofovir (Figura 4) es un derivado de cidofovir con una cadena lipídica que aumenta su captación celular. Tiene buena actividad in vitro contra ADV. Los estudios de fase 2 y 3 han demostrado una reducción de la toxicidad renal y de la médula ósea, lo que lo convierte en un tratamiento alternativo prometedor para los virus de ADN bicatenario, incluido el adenovirus. El ensayo abierto no aleatorio realizado en niños y adultos receptores de trasplantes de células hematopoyéticas mostró la reducción de la carga viral ADV en la semana 4 (76% de todos los pacientes pediátricos y el 44% de los adultos), mortalidad del 19% para pacientes pediátricos frente a 43% para adultos, y mejoró la mortalidad con respuesta antiviral en pacientes con enfermedad diseminada por adenovirus. Los efectos secundarios gastrointestinales fueron la causa común de interrupción del tratamiento en este ensayo y en ensayos previos (Florescu et al., 2012, Grimley et al., 2016).

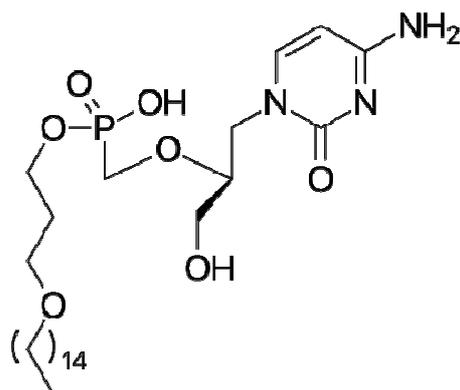


Figura 4. Estructura de brincidofovir

La necesidad de obtener medicamentos eficaces y seguros impulsó la investigación de nuevos compuestos para combatir el virus. Entre estos compuestos encontramos el galato de epigallocatequina (EGCG (Figura 5)) una catequina del té verde que ha demostrado ser capaz de bloquear los receptores de adenovirus a baja concentración. Esta pequeña molécula compite con el heparán sulfato y con el ácido siálico por la unión al virus, impidiendo la entrada del virus a la célula huésped (Martínez-Aguado et al., 2015).

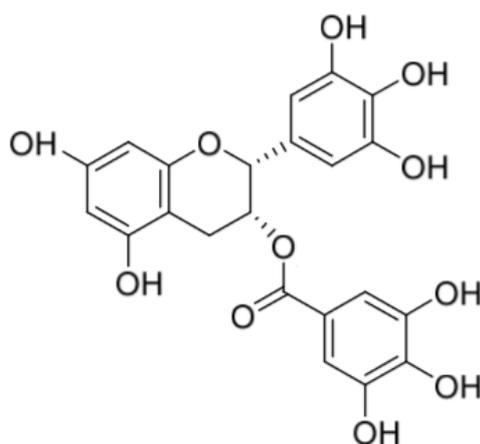


Figura 5. Estructura de EGCG

Otro enfoque que ha sido estudiado y ensayado para bloquear la entrada del adenovirus humano fue el uso de un péptido sintético de Gly-Asp-Gly-Asp-Ser-Pro (GRGDSP). Su efecto antiHAdV junto con la baja toxicidad incita a evaluar la actividad de este péptido para su posible administración local o sistémica para tratar las infecciones producidas por el virus (Martínez-Aguado et al., 2015).

Por otro lado, la lactoferrina, una glicoproteína multifuncional, ha demostrado que es capaz de inhibir la infección por adenovirus al interactuar con la base del pentón, evitando así la adsorción viral y la internalización en la célula (Martínez-Aguado et al., 2015).

Smith et al. (Smith et al., 2008) describieron la actividad antiHAdV de las α -defensinas. De esta forma descubrieron que los péptido neutrófilos humanos 1 (HNP1) y las defensina humana 5 (HD5) presentaban actividad antiadenovírica a bajas concentraciones micromolares, actuando en el desensamblaje del virus en la región del vértice y, por tanto, en el lanzamiento de la proteína VI y posterior entrada a través de la membrana. Myers et al. (Myers et al., 2013) sugirieron que la unión del anticuerpo neutralizante 9C12 alteraba la asociación entre la cápside del virus y los microtúbulos. Antes de este descubrimiento ya se estudiaron y se describieron dos inhibidores distintos, leptomicina B (Figura 6) y ratjadone (Figura 7). Ambas moléculas bloquean la entrada del ADN viral al núcleo, promoviendo la acumulación del virus en el centro organizador de microtúbulos (MTOC) (Martínez Aguado et al., 2015).

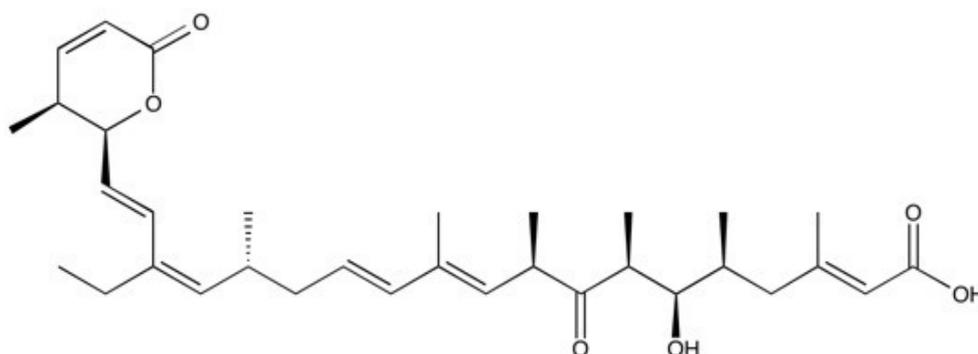


Figura 6. Estructura de leptomicina B

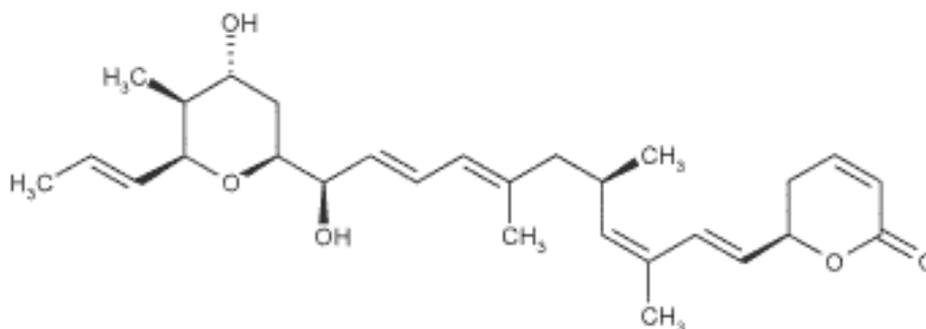


Figura 7. Estructura de ratjadone

Entre los diferentes objetivos de actuación para tratar las infecciones por HAdVs, la replicación ha sido el más explorado. En los últimos años se ha ensayado la utilización de pequeños ARN

de interferencia (ARNip), sobre todo aquellos que van dirigidos a actuar en las transcripciones de ADN polimerasa, pTP, IVa2 o E1A, puesto que son los que han mostrado mejores resultados. En este sentido, Kenindinger et al. (Kenindinger et al., 2012) propusieron que el silenciamiento del gen E1A que promueve la replicación del ADN, podría ser una línea de investigación interesante.

La niclosamida (Figura 8) ha demostrado actividad antiviral frente a una amplia gama de virus dependientes de pH, incluyendo el adenovirus humano, reduciendo en un 20% la infección durante un ensayo. A pesar de que su citotoxicidad cuando se administra por vía sistémica es preocupante, realizar modificaciones estructurales podría ser útil para reducir la toxicidad y generar una alternativa para el tratamiento de las infecciones. Así mismo, la capacidad de los virus para inducir vías de señalización de receptores tipo Toll (TLR) se ha convertido en una nueva ruta para la síntesis de compuestos terapéuticos dirigidos a actuar sobre los TLR (Martínez-Aguado et al., 2015).

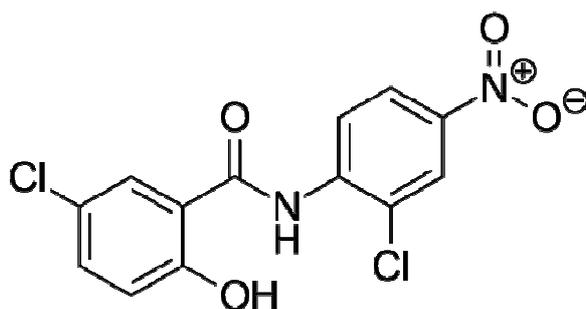


Figura 8. Estructura de la niclosamida

Del cribado de un conjunto de compuestos derivados de la piperazin-2-ona se seleccionó el compuesto 15D8 (Figura 9); se trata de una piperazin-2-ona trisustituida que presenta actividad antiviral con poca o ninguna citotoxicidad a bajas concentraciones micromolares. El mecanismo de acción consiste en la inhibición selectiva de la replicación del ADN del adenovirus, produciendo un bloqueo en la replicación que, indirectamente, va a producir impactos en la transcripción. Es un potencial candidato para el desarrollo de una nueva clase de compuestos antivirales para tratar infecciones del Adenovirus (Sánchez-Céspedes et al., 2014).

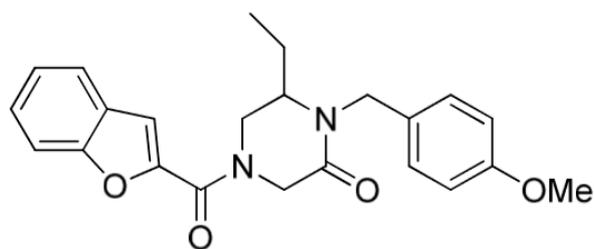
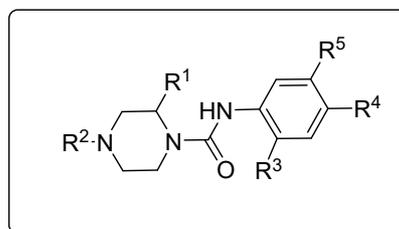


Figura 9. Estructura del compuesto 15D8

Teniendo este compuesto como prototipo, el grupo de investigación en que se ha desarrollado este trabajo de fin de grado, ha descrito el diseño, síntesis y evaluación biológica de una colección de 54 compuestos con estructura general de ureas derivadas de 2-metil y 2-fenilpiperazina, como eficaces agentes antiadenovirus (Figura 10) (Sánchez-Céspedes et al., 2016).



R¹: Me, Ph
R²: Boc, Benzofurano-2-carbonil
R³: Cl, NO₂, H
R⁴: NO₂, CN, Cl, H
R⁵: CF₃, H

Figura 10. Estructura general de las ureas derivadas de piperazinas con actividad antiadenovirus

Se seleccionaron seis compuestos por su potente actividad y baja citotoxicidad, que se sometieron a estudios mecanísticos así como de estabilidad en suero. Actualmente están siendo sometidos a estudios farmacocinéticos en modelo animal (compuestos **1-6**, Figura 11).

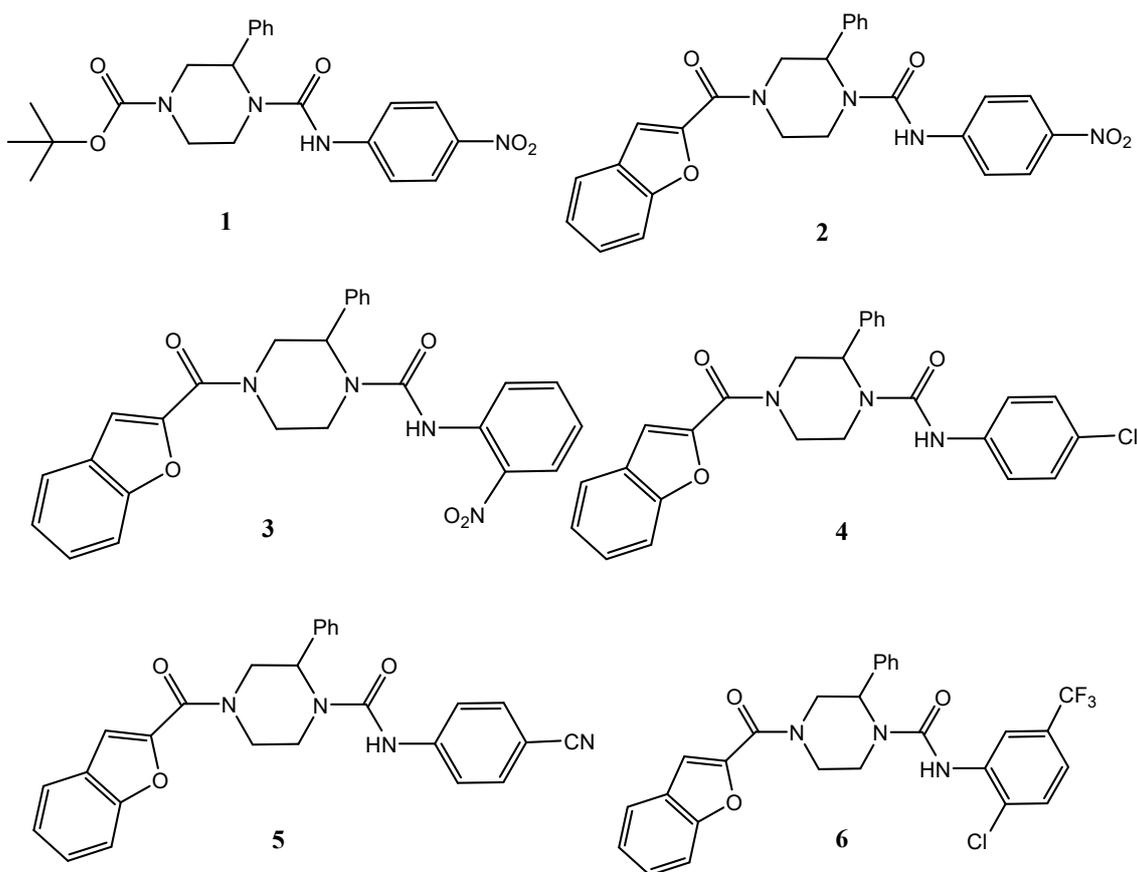


Figura 11. Estructura de los compuestos seleccionados 1-6

Cuando se dispone de un cabeza de serie, un aspecto clave en la búsqueda de nuevos compuestos activos y que tiene mucha relevancia en Química Terapéutica es la farmacomodulación, diseño de análogos relacionados estructuralmente con el modelo, mediante la modificación molecular del cabeza de serie, lo que va a permitir su exploración sistemática.

En este contexto, el presente Trabajo Fin de Grado (TFG), que se engloba dentro de una de las líneas de investigación que se llevan a cabo en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia sobre la búsqueda de nuevos compuestos con potencial actividad anti-adenovirus, se ha centrado en realizar farmacomodulación en las piperazinas seleccionadas, tomándolas como modelo para la introducción de cambios estructurales que permitan obtener nuevos análogos. La posterior evaluación de los mismos, actividad, toxicidad, estudios mecanísticos, permitirá conocer si se han optimizado sus propiedades así como proporcionará datos para poder profundizar en las relaciones estructura actividad.

3. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Grado se enmarca en una de las líneas de investigación del Departamento, basada en la búsqueda, diseño, síntesis y caracterización de nuevos compuestos con potencial actividad como antiadenovirus. El objetivo final es obtener una serie de análogos de compuestos activos descritos por el grupo de investigación, mediante la introducción de modificaciones en su estructura. Para ello se plantearon diversos objetivos parciales:

- 1) **Diseño de nuevos compuestos.** En base a las estructuras de los prototipos escogidos, resultados anteriores de la propia línea de investigación (compuestos **1-6**), se plantea el diseño de los nuevos compuestos en base a la introducción de modificaciones en los tres rasgos estructurales clave para la actividad, el anillo de piperazina, la función urea sobre un nitrógeno y la función amida sobre el otro.
- 2) **Síntesis química de los nuevos compuestos diseñados.** Emplear una metodología sintética sencilla y corta que transcurra con elevado rendimiento y que facilite obtener en el menor número de pasos posible una pequeña colección de compuestos análogos.
- 3) **Caracterización de los nuevos compuestos.** Los nuevos compuestos obtenidos serán sometidos a los estudios pertinentes que permitan confirmar la estructura propuesta teórica. En concreto, se realizarán sus espectros de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear. Para alcanzar este objetivo se contará con la colaboración de los Servicios de Espectrometría de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear, respectivamente, del CITIUS de la Universidad de Sevilla.

4. METODOLOGÍA

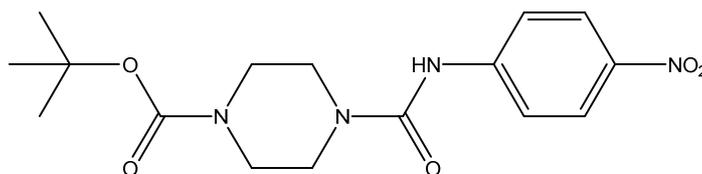
4.1. Métodos generales

Todos los reactivos, disolventes y materiales de partida fueron obtenidos a partir de proveedores comerciales y usados directamente sin previa purificación. Las evaporaciones fueron realizadas a presión reducida en rotavapor. Las reacciones fueron monitorizadas por cromatografía en capa fina (CCF) en soportes de aluminio Kieselgel 60 F254 y detector UV para su visualización. La cromatografía en columna fue realizada en Silica Gel 60. Los rendimientos obtenidos proceden de los productos purificados. Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Stuart Melting Point SMP 10 y están sin corregir. Los espectros de masas (MS) fueron registrados en un espectrómetro de masas Micromass AUTOSPECQ mediante las técnicas de ionización química (CI) a 150 eV y bombardeo de átomos rápidos (FAB) usando una matriz de tioglicerol. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron con una resolución de 10.000. Los espectros de resonancia magnética nuclear (NMR) fueron realizados a 25°C en un espectrómetro Bruker AV500 a 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C . Los desplazamientos químicos están expresados en ppm en la escala relativa al tetrametilsilano (TMS).

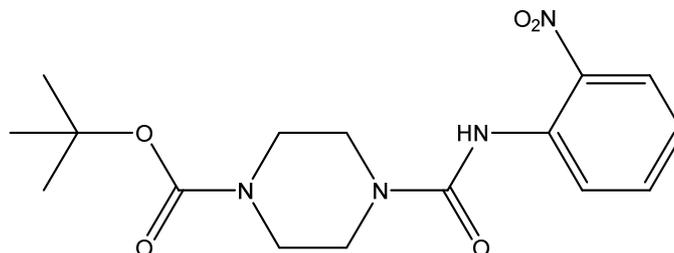
4.2. Introducción de la función urea por reacción con isocianato

A) A una disolución de la piperazina N-Boc precursora (**7**) (4 mmoles, 1 equivalente) en diclorometano seco (30 mL) se le añade el correspondiente isocianato (4,8 mmol, 1,2 equivalentes) manteniéndose en agitación a temperatura ambiente hasta que la cromatografía en capa fina indica el producto de partida ha reaccionado. El medio de reacción se evapora a sequedad y el producto se purifica por cromatografía en columna, utilizando los correspondientes eluyentes para cada compuesto.

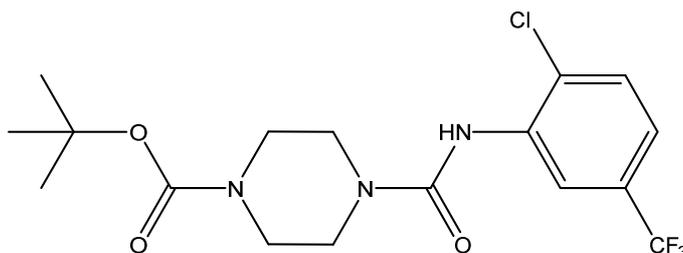
4.2.1. 1-tert-Butoxicarbonil-4-[(4-nitrofenil)-aminocarbonil] piperazina (**8**)



Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (100:1) como eluyente (1,4 g, 94% rendimiento); P.F. 188-192 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,27 (s, 1H), 8,17 (d, $J = 9,5$ Hz, 2H), 7,37 (d, $J = 9,5$ Hz, 2H), 3,50-3,48 (m, 4H), 3,40-3,38 (m, 4H), 1,43 (m, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 154,0, 153,8, 147,3, 140,9, 124,7 118,3, 79,1, 43,6, 28,0. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}$ 373,1482 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; encontrado 373,1476.

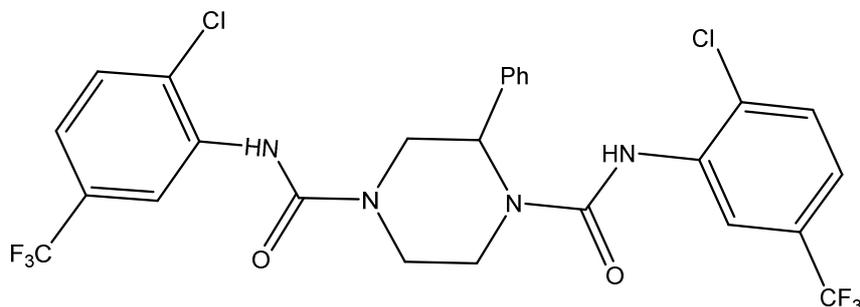
4.2.2. 1-tert-Butoxicarbonil-4-[(2-nitrofenil)-aminocarbonil] piperazina (9)

Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (100:1) como eluyente (1,2 g, 89 % rendimiento); P.F. 91-94 °C. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9,34 (s, 1H), 7,96 (dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,2$ Hz, 1H), 7,71-7,63 (m, 2H), 7,26-7,22 (m, 1H), 3,48-3,46 (m, 4H), 3,40-3,38 (m, 4H), 1,44 (m, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154,2, 153,9, 140,6, 134,5, 134,0, 125,0, 123,8, 123,0, 79,2, 43,6, 28,0. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}$ 373,1482 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; encontrado 373,1476.

4.2.3 1-tert-Butoxicarbonil-4-[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)-aminocarbonil] piperazina (10)

Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (150:1) como eluyente (1,5 g, 92 % rendimiento); P.F. 153-155 °C. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,45 (s, 1H), 7,96 (dd, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,71 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,49 (dd, $J = 1,9$ Hz, $J = 8,3$ Hz, 1H), 3,48-3,46 (m, 4H), 3,41-3,39 (m, 4H), 1,44 (m, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154,5, 153,9, 137,6, 131,3, 130,4, 122,3, 121,5, 79,1, 43,6, 28,0. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{F}_3\text{ClNa}$ 430,1116 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; encontrado 430,1110

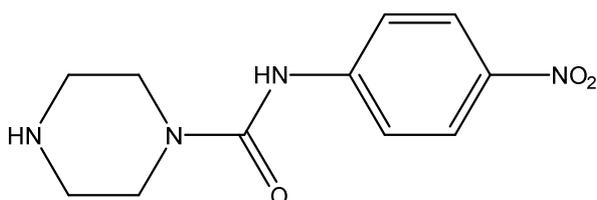
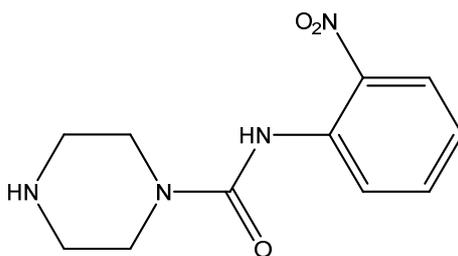
B) A una disolución de la 2-fenilpiperazina precursora (1 mmoles, 1 equivalente) en diclorometano seco (15 mL) se le añade el correspondiente isocianato (2,4 mmol, 2,4 equivalentes) manteniéndose en agitación a temperatura ambiente hasta que la cromatografía en capa fina indica el producto de partida ha reaccionado. El medio de reacción se evapora a sequedad y el producto se purifica por cromatografía en columna.

4.2.4. *N,N'*-Bis[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)-aminocarbonil]-2-fenilpiperazina (16)

Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando hexano-acetato de etilo (4:1) como eluyente (540 mg, 90 % rendimiento). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,35 (s, 1H), 8,27 (s, 2H), 8,06 (dd, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,84 (m, 1H), 7,70 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,50-7,45 (m, 4H), 7,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H) 7,30 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 5,45 (t, $J = 4,0$ Hz, 1H), 4,36 (dd, $J = 4,1$ Hz, $J = 13,9$ Hz, 1H), 4,18-4,12 (m, 1H), 3,93-3,88 (m, 1H), 3,75 (dd, $J = 4,4$ Hz, $J = 13,9$ Hz, 1H), 3,54-3,40 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154,5, 154,4, 139,2, 137,4, 137,3, 131,3, 130,4, 128,6, 127,3, 126,6, 122,6, 122,2, 121,6, 121,3, 54,9, 45,4, 43,5. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2\text{F}_6\text{Cl}_2\text{Na}$ 627.0760 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; encontrado 627.0752.

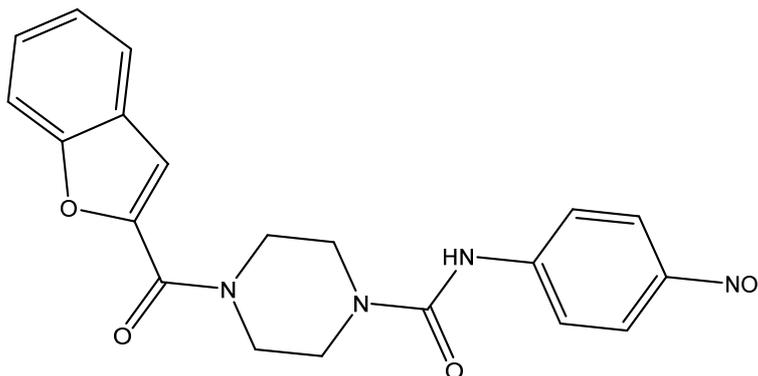
4.3. Desprotección del grupo protector Boc (Duan y cols., 2013).

A una disolución, enfriada en baño de hielo, de los productos **8** y **9**, (1,3 mmol) en 15 ml de CH_2Cl_2 , se añade 13 mmol de CF_3COOH . Se mantiene en agitación dejándola evolucionar a temperatura ambiente. Tras comprobar mediante cromatografía en capa fina que la reacción ha finalizado, se evapora a sequedad, coevaporando con tolueno para eliminar el exceso de CF_3COOH . Los productos obtenidos **11** y **12** se detectan por Espectrometría de Masa (EM) y se emplean sin purificar en la siguiente reacción.

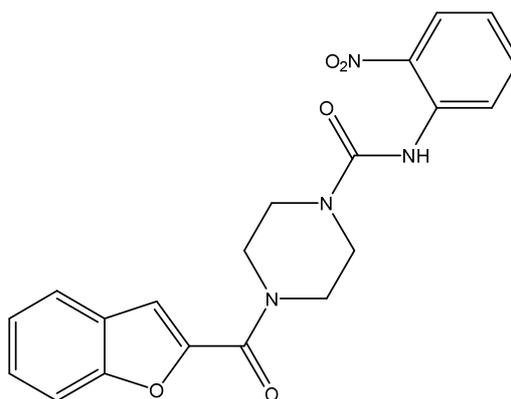
**11****12**

4.4. Reacción de acilación

A) Los productos *N*-desprotegidos **11** y **12** se disuelven en diclorometano (30 ml), se añade trietilamina (10 mmol), y cloruro de benzofuran-2-carbonilo (2,6 mmol, 2 equivalentes). La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente hasta que la cromatografía en capa fina indica que se ha agotado el producto de partida. El medio de reacción se evapora a sequedad y el producto se purifica por cromatografía en columna.

4.4.1. 4-(Benzofuran-2-carbonil)-1-[(4-nitrofenil)-aminocarbonil]piperazina (13)

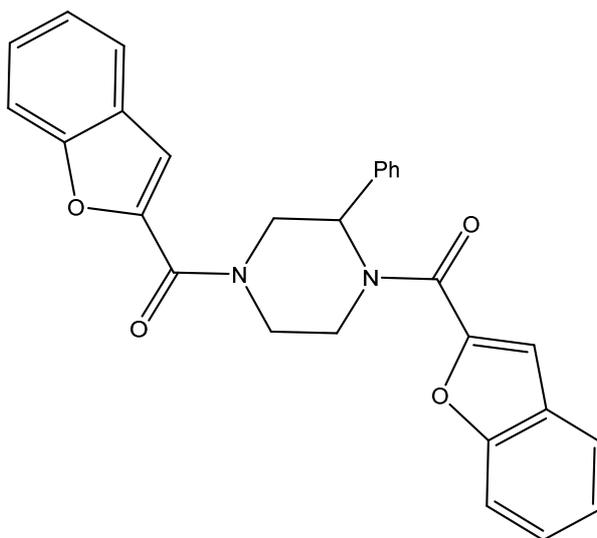
Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (80:1) como eluyente (410 mg, 80 % rendimiento); P.F. 165-167 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,34 (s, 1H), 8,19-8,15 (m, 2H), 7,81-7,65 (m, 4H), 7,52-7,45 (m, 2H), 7,38-7,33 (m, 1H), 3,93-3,75 (m, 4H), 3,52-3,22 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159,1, 154,1, 153,9, 148,9, 147,3, 141,0, 126,7, 126,5, 124,7, 123,7, 122,5, 118,4, 111,7, 111,1, 43,8. HRMS (*m/z*): calcd. para C₂₀H₁₈N₄O₅Na 417,1169 [M+Na]⁺; encontrado 417,1163

4.4.2. 4-(Benzofuran-2-carbonil)-2-fenil-1-[(2-nitrofenil)-aminocarbonil]piperazina (14)

Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando hexano-acetato de etilo (1:1) como eluyente (450 mg, 88 % rendimiento); P.F. 134-137 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,41 (s, 1H), 8,00-7,94 (m, 1H), 7,85-7,64 (m, 4H), 7,57-7,21 (m, 4H), 3,89-3,73 (m, 4H), 3,69-3,58 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159,1, 154,1, 153,9, 137,6, 148,1, 147,3, 141,1, 126,7, 126,6, 124,7, 123,7, 122,5, 118,4, 111,8, 111,1, 43,8. HRMS (*m/z*): calcd. para C₂₀H₁₈N₄O₅Na 417,1169 [M+Na]⁺; encontrado 417,1163

B) A una disolución de la 2-fenilpiperazina (1 mmol) en diclorometano seco (15 mL) se le añade cloruro de benzofuran-2-carbonilo (4 mmol, 4 equivalentes) y piridina (6 mmol). La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente hasta que la cromatografía en capa fina indica que se ha agotado el producto de partida. El medio de reacción se evapora a sequedad y el producto se purifica por cromatografía en columna.

4.4.3. N,N'-Bis(Benzofuran-2-carbonil)2-fenil-piperazina (17)



Se obtuvo el producto como un sólido mediante cromatografía en columna empleando diclorometano-metanol (60:1) como eluyente (370 mg, 83 % rendimiento); P.F. 159-162 °C. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7,79-7,74 (m, 2H), 7,69-7,64 (m, 2H), 7,54-7,24 (m, 11H), 5,98-5,74 (m, 1H), 5,01-4,75 (m, 1H), 4,55-4,38 (m, 1H), 4,36-4,08 (m, 2H), 3,88-3,42 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 160,0, 159,3, 154,0, 153,9, 147,8, 128,6, 127,3, 126,7, 126,6, 126,5, 123,7, 122,5, 111,8, 111,3. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}$ 473,1472 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; encontrado 473,1464

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Diseño de los análogos

Con objeto de explorar las propiedades de estos compuestos así como de optimizarlas, es necesario el diseño de análogos relacionados estructuralmente, mediante modificaciones moleculares en los prototipos seleccionados. Es éste un aspecto clave en todo el proceso de búsqueda de nuevos compuestos candidatos a fármacos. El disponer de una batería de derivados y su posterior evaluación, permitiría obtener compuestos con mejores propiedades, o compuestos más simples que mantienen o mejoran las propiedades del cabeza de serie, además de proporcionar datos para poder establecer relaciones estructura actividad.

La Figura 12 refleja la estructura general que se va a someter a modificación y los puntos de actuación, claves en la actividad biológica, el esqueleto de piperazina, la función urea y la función amida. Las modificaciones estructurales realizadas son:

a) El anillo de 2-fenilpiperazina es reemplazado por piperazina.

Las ureas derivadas de piperazina descritas previamente tienen 2-metil piperazina y 2-fenil piperazina como esqueletos centrales (Figura 10) y están preparados como racémicos. Fueron diseñados a partir del compuesto 15D8 (Figura 10), que posee un grupo etilo en posición 6 del anillo de piperazin-2-ona. El diseño de estos análogos está pensado por una parte para evaluar si es necesaria la presencia de esos sustituyentes en el anillo de piperazina para la actividad así como su influencia en la toxicidad y por otra, en caso de tener resultados positivos, trabajar con compuestos aquirales.

b) Obtención del derivado diurea.

Se preparó el derivado con esqueleto central de 2-fenilpiperazina con la misma función urea en los dos nitrógenos.

c) Obtención del derivado diamida.

Se preparó el derivado de 2-fenilpiperazina con la misma función amida en ambos nitrógenos.

Los análogos planteados en b) y c) pretenden estudiar en qué medida contribuyen ambas funciones orgánicas a la actividad biológica.

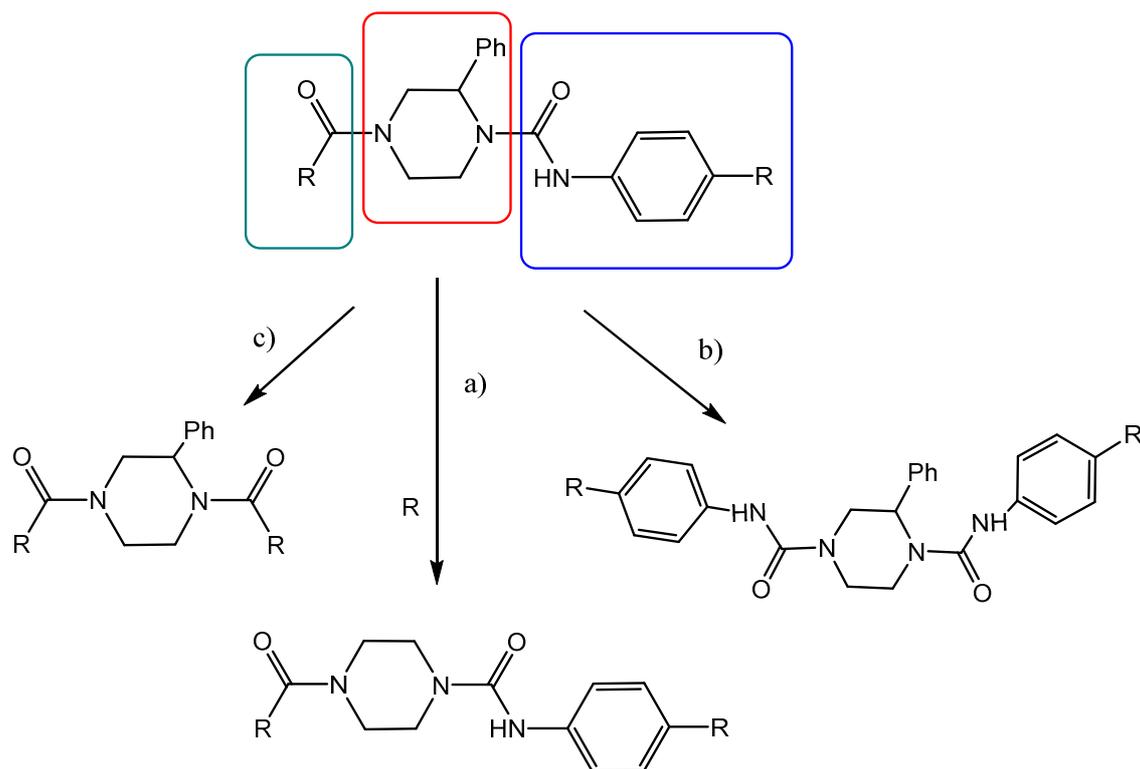


Figura 12. Puntos de modificación estructural en el prototipo

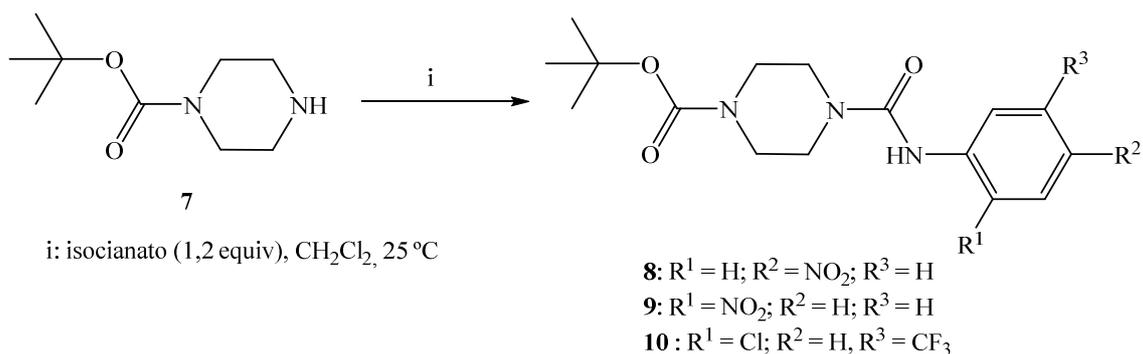
La obtención de los nuevos derivados se llevó a cabo mediante una metodología sintética corta constituida por reacciones químicas sencillas que transcurren con elevado rendimiento químico.

5.2. Metodología sintética

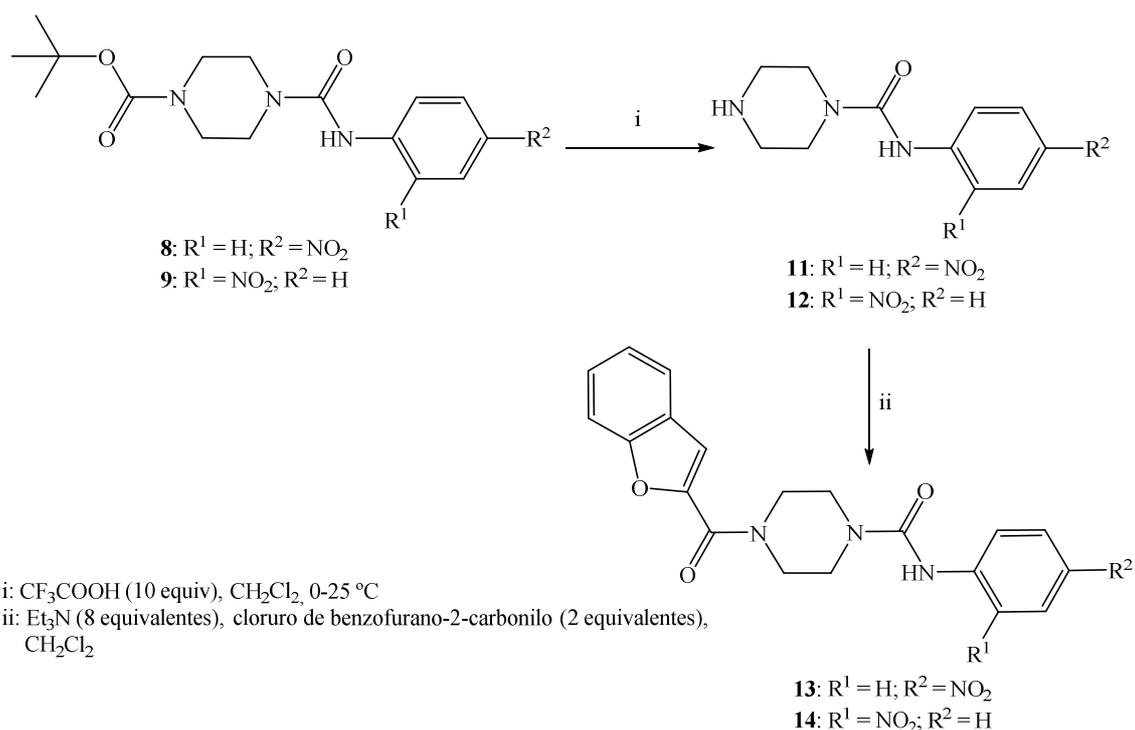
a) Con objeto de diseñar nuevas familias de análogos, lo primero que se hizo fue reemplazar el anillo de 2-fenilpiperazina por piperazina manteniendo las dos funciones sobre los nitrógenos, como en los compuestos **1-6**, es decir, la urea con grupos electrón donador en uno de los nitrógenos y la amida o carbamato en el otro.

Se escoge la función urea con grupo *p*-nitro, *o*-nitro y la disustituida (Cl y CF₃), y las dos funciones, grupo Boc y grupo benzofurano-2-carbonilo en el otro nitrógeno.

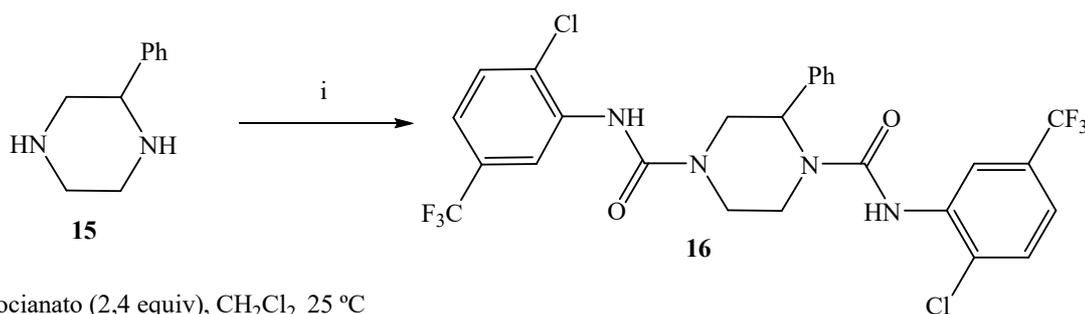
Para la preparación de estos derivados se parte de la Boc-piperazina comercial (**7**) que se somete a reacción con el apropiado isocianato, obteniéndose los compuestos **8-10**. Estos compuestos son análogos a **1** y **6** (Esquema 1).

Esquema 1. Síntesis de los compuestos **8-10**

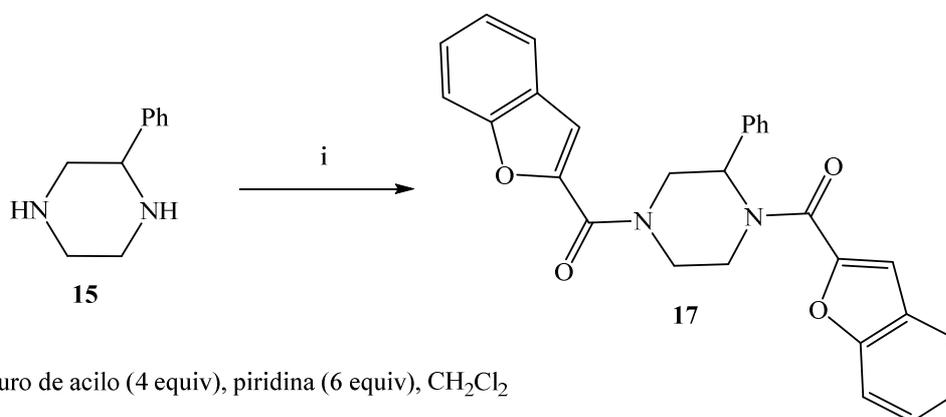
En los compuestos **8** y **9** se retira el grupo Boc por reacción con CF₃COOH obteniéndose los compuestos **11** y **12**, que se detectan por Espectrometría de Masas y se emplean sin purificar en la siguiente reacción, la acilación del nitrógeno por reacción con el cloruro de benzofurano 2-carbonilo. Se obtienen los compuestos **13** y **14** (análogos a **2** y **3**) (Esquema 2).

Esquema 2. Síntesis de los compuestos **13-14**

b) El análogo diurea **16**, se prepara a partir de la 2-fenilpiperazina **15** por reacción con el isocianato correspondiente empleando 2,4 equivalentes del reactivo. Se escoge el isocianato disustituido, para tener un análogo al compuesto **6** (Esquema 3).

Esquema 3. Síntesis del compuesto **16**

c) El derivado diamida **17** se obtiene por reacción de la 2-fenilpiperazina con cloruro de benzofurano-2-carbonilo en presencia de piridina. Posee los dos nitrógenos acilados con el mismo grupo, común en los compuestos seleccionados **1-6** (Esquema 4).

Esquema 4. Síntesis del compuesto **17**

5.3. Caracterización estructural

Los datos obtenidos de los espectros de Masas, de ¹H-NMR y ¹³C-NMR permiten confirmar la estructura de todos los productos.

En la Tabla 3 se presentan los datos de desplazamiento químico (δ) en ppm de las señales más características de ¹H-NMR de los compuestos **8-10**, **13**, **14**.

En los espectros de ¹H-NMR de los compuestos **8-10**, **13** y **14**, además de las señales debidas al protón de la función urea presente en todos los compuestos en torno a 8,5-9,4 ppm, se aprecian los protones de los anillos aromáticos en el rango de 7-8 ppm. Las señales de los protones de los 4 metilenos presentes en todos los compuestos, aparecen como dos multipletes cada uno de ellos con integral para 4 protones.

Tabla 3. Señales de ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) más características para los compuestos **8-10**, **13** y **14**

Entry	Comp	NH	Ph	CH ₂ -N-CH ₂	CH ₂ -N-CH ₂
1	8	9,27	8,17-7,37	3,50-3,48	3,40-3,38
2	9	9,34	7,96-7,22	3,48-3,46	3,40-3,38
3	10	8,45	7,96-7,49	3,48-3,46	3,41-3,39
4	13	9,34	8,19-7,35	3,93-3,75	3,52-3,22
5	14	9,41	8,00-7,21	3,89-3,73	3,69-3,58

Los compuestos **16** y **17** derivados de 2-fenilpiperazina presentan diferentes señales. Destacar el mayor número de señales en el intervalo 7-8 ppm debidas a mayor número de protones aromáticos y diferentes señales debidas a los protones del anillo de piperazina. En estos compuestos aparece el protón del grupo metino a 5,45 ppm (**16**) y 5,98 ppm (**17**). El derivado diurea **16**, posee dos protones que aparecen a 8,35 y 8,27 ppm atribuidos a las dos funciones urea.

En los espectros de carbono destacamos las señales del carbonilo del grupo urea en los compuestos **8-10**, **13**, **14** y **16** en torno a 154,5 ppm. El carbonilo del grupo Boc aparece a 153,9 ppm (**8-10**) y el carbonilo de la amida derivada del benzofurano en torno 159-160 ppm. Los Boc derivados presentan a 28 ppm la señal debida a los metilo del grupo *tert*-butilo y a 79,2 ppm la del carbono cuaternario.

En los compuestos finales **8-10** se ha conseguido una modificación adicional al suprimir el sustituyente en dos del anillo de piperazina, ahora estereoquímica: no existen estereocentros, a diferencia de los prototipos, que se trataban de racémicos. En caso de ser compuestos activos esto podría resultar ventajoso, en un futuro, dado que para moléculas bioactivas quirales aunque ambos enantiómeros resultaran idénticos desde el punto de vista de la actividad buscada, es necesario probar y estudiar ambos enantiómeros por separado para detectar diferencias entre ellos desde el punto de vista de efectos adversos, perfil farmacocinético o tóxico. Ello supone un enorme esfuerzo adicional al proceso de diseño y preparación de nuevos compuestos, el derivado de la necesidad de una síntesis estereoselectiva. La quiralidad no es un requisito exigible para tener compuestos activos.

La siguiente etapa del proyecto, consistiría en proceder a la evaluación de su actividad como agentes antiadenovirus. Para ello el grupo de investigación trabaja en colaboración con el grupo del Dr. Sánchez Céspedes, del Instituto de Biomedicina de Sevilla, así como la citotoxicidad de los nuevos compuestos.

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 actividad antiadenovirus se ha realizado:

- 1) El diseño de una serie de compuestos análogos a unos escogidos como cabezas de serie por su buen perfil de actividad y toxicidad. Se plantearon modificaciones estructurales en los cabezas de serie en tres puntos clave para la actividad, la primera centrada en modificar el esqueleto de central de piperazina, la segunda en suprimir la función amida sobre uno de los nitrógenos presente en los prototipos, y la tercera, suprimir la función urea sobre el otro nitrógeno; manteniendo el resto de los rasgos estructurales necesarios para la actividad.
- 2) La síntesis de los nuevos compuestos diseñados empleando una metodología sintética sencilla que transcurre con altos rendimientos. A partir de dos precursores comerciales se han sintetizado 7 productos finales
- 3) El análisis estructural de los nuevos compuestos, permitiendo confirmar la estructura propuesta. En concreto, se han realizado sus espectros de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear. Para la realización de estos estudios 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.

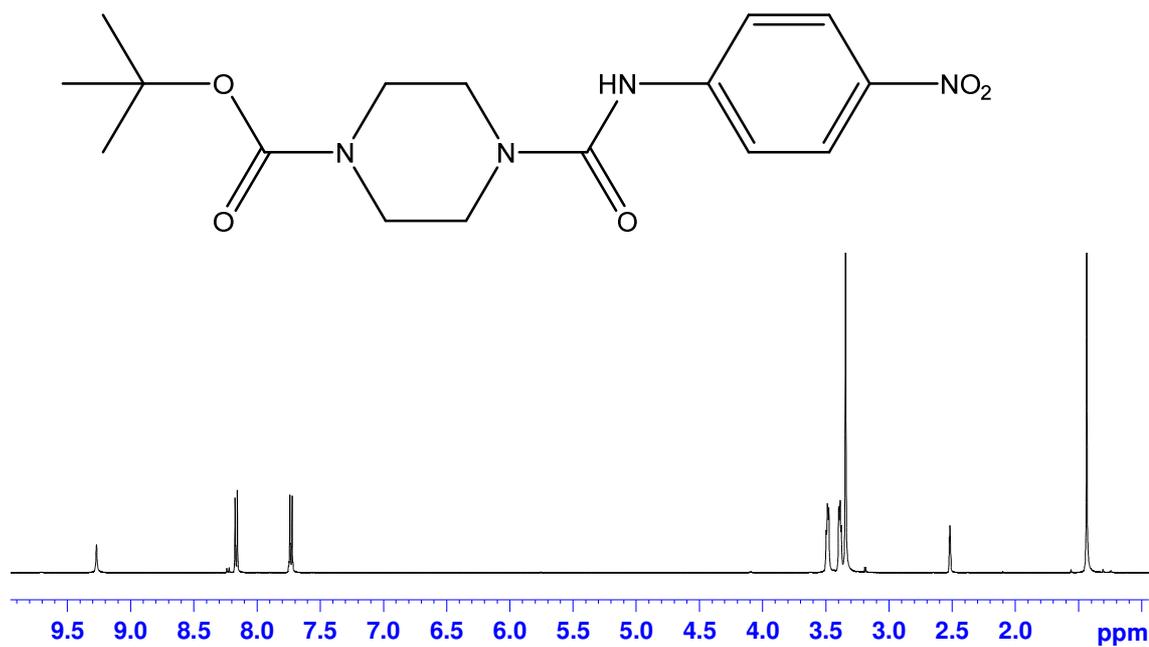
7. REFERENCIAS

1. Abbas BM, El-Mogy MA, Haj-Ahmad Y. Oncolytic E1B 55KDa-deleted adenovirus replication is independent of p53 levels in cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2017; 63(7): 1-11.
2. Arnberg N. Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends Pharmacol. Sci.* 2012; 33(8): 442-448.
3. Echavarría M. Adenoviruses in Immunocompromised Hosts. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21(4): 704–715.
4. Feghoul L, Mercier-Delarue S, Salmona M, Ntsiba N, Dalle JH, Baruchel A et al. Genetic diversity of the human adenovirus species C DNA polymerase. *Antiviral Res.* 2018; 156: 1-9.
5. Flomemberg P. Adenovirus infections. *Medicine.* 2005; 33(5): 128-130.
6. Florescu DF, Hoffman JA. Adenovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2013;(Suppl. 4):206–11.
7. Ganapathi L, Arnold A, Jones S, et al. Use of cidofovir in pediatric patients with adenovirus infection. *Version 2. F1000Res* 2016; 5(758).
8. Giberson A, Saha B, Campbell K, Christou C, Poulin KL, Parks RJ. Human adenoviral DNA association with nucleosomes containing histone variant H3.3 during the early phase of infection is not dependent on viral transcription or replication. *Biochem Cell Biol.* 2018: 10.1139/bcb-2018-0117.
9. Hage E, Huzly D, Ganzenmueller T, Beck R, Schulz TF, Heim A. A human adenovirus species B subtype 21^a associated with severe pneumonia. *J Infect.* 2014; 69(5): 490-9.
10. Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev.* 1992; 5(3): 262-274.
11. Ison MG, Green M, AST Infectious Diseases Community of Practice. Adenovirus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; (Suppl. 4): 161–5.
12. Izzedine H, Launay-Vacher V, Deray G. Antiviral Drug-Induced Nephrotoxicity. *Am. J. Kidney Dis.* 2005; 45(5): 804-817.
13. Kaneko H, Mori S, Suzuki O, Tomohiro L, Shigeta S, Abe M et al. The cotton rat model for adenovirus ocular infection: antiviral activity of cidofovir. *Antiviral Res.* 2004; 61(1): 63-66.
14. Kneidinger D, Ibrišimović M, Lion T, Klein R. Inhibition of adenovirus multiplication by short interfering RNAs directly or indirectly targeting the viral DNA replication machinery. *Antiviral Res.* 2012; 94(3): 195-207.
15. Lasswitz L, Chandra N, Arnberg N, Gerold G. Glycomics and Proteomics Approaches to Investigate Early Adenovirus-Host Cell Interactions. *J Mol Biol.* 2018; 430(13): 1863-1882.
16. Lenaerts L, De Clercq E, Naesens L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev. Med. Virol.* 2008; 18(6): 357–374.
17. Malmberg M, Rubio-Guerri C, Hayer J, García-Párraga D, Nieto-Peigrín E, Melero M et al. Phylogenomic analysis of the complete sequence of a gastroenteritis-associated cetean adenovirus (bottlenose dolphin adenovirus 1) reveals a high degree of genetic divergence. *Int J Infect Dis.* 2017; 53: 47-55.

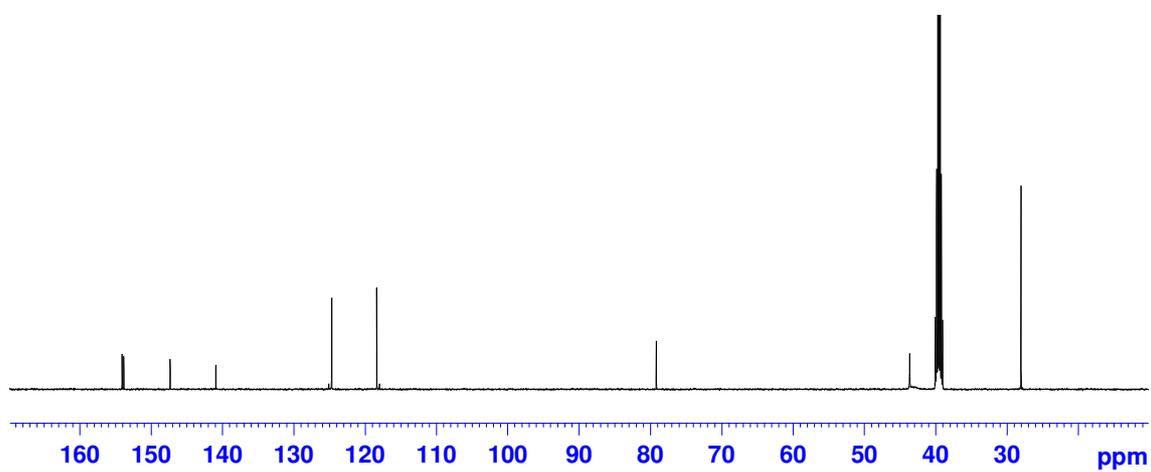
18. Martínez-Aguado P, Serna-Gallego A, Marrugal-Lorenzo JA, Gómez-Marín I, Sánchez-Céspedes J. *Drug Discover Today*. 2015; 20(10): 1235-42.
19. Matthes-Martin S, Boztug H, Lion T. Diagnosis and treatment of adenovirus infection in immunocompromised patients. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013; 11(10): 1017-28.
20. Myers ND, Skorohodova KV, Gounder AP, Smith JG. Directed evolution of mutator adenoviruses resistant to antibody neutralization. *J. Virol*. 2013; 87(10): 6047-50
21. Paulini I, Siqueira-Silva J, Thomaz L, Rocha L, Harsi C, Bellei N, Granato C. development of a prototype immunochromatographic test for rapid diagnosis of respiratory adenovirus infection. *Braz J Infect Dis*. 2017; 21(5): 500-506.
22. Sánchez-Céspedes J, Moyer CL, Whitby LR, Boger DL, Nemerow GR. Inhibition of adenovirus replication by a trisubstituted piperazin-2-one derivative. *Antiviral Res*. 2014; 108: 65-73.
23. Sánchez-Céspedes J, Martínez-Aguado P, Vega-Holm M, Serna-Gallego A, Candela JJ, Marrugal-Lorenzo JA, Pachón J, Iglesias-Guerra F, Vega-Pérez JM. New 4Acyl-1-phenylaminocarbonyl-2-phenylpiperazine derivatives as potential Inhibitors of Adenovirus Infection. Synthesis, Biological Evaluation, and Structure–activity Relationships. *J. Med. Chem*. 2016; 59: 5432–5448.
24. Sandkovsky U, Vargas L, Florescu DF. Adenovirus: current epidemiology and emerging approaches to prevention and treatment. *Curr Infect Dis Rep* 2014; 16(8):416.
25. Smith, J.G., Nemerow, G.R. (2008) Mechanism of adenovirus neutralization by human alpha-defensins. *Cell Host Microbe* 3, 11–19
26. Tollefson AE, Spencer JF, Ying B, Buller RM, Wold WS, Toth K. Cidofovir and brincidofovir reduce the pathology caused by systemic infection with human type 5 adenovirus in immunosuppressed Syrian hamsters, while ribavirin is largely ineffective in this model. *Antiviral Res*. 2014; 112: 38-46.
27. Toth k, Kuppaswamy M, Shashkova EV, Spencer JF, Wold WS. A fully replication-competent adenovirus vector with enhanced oncolytic properties. *Cancer Gene Ther*. 2010; 17(11): 761-70.
28. Weigt SS, Gregson AL, Deng JC, et al. Respiratory Viral Infections in Hematopoietic Stem Cell and Solid Organ Transplant Recipients. *Semin Respir Crit Care Med* 2011; 32(4):471–93.
29. Wiethoff CM, Nemerow GR. Adenovirus membrane penetration: Tickling the tail of a sleeping dragon. *Virology*. 2015; 479-480: 591-9.

8. ANEXOS

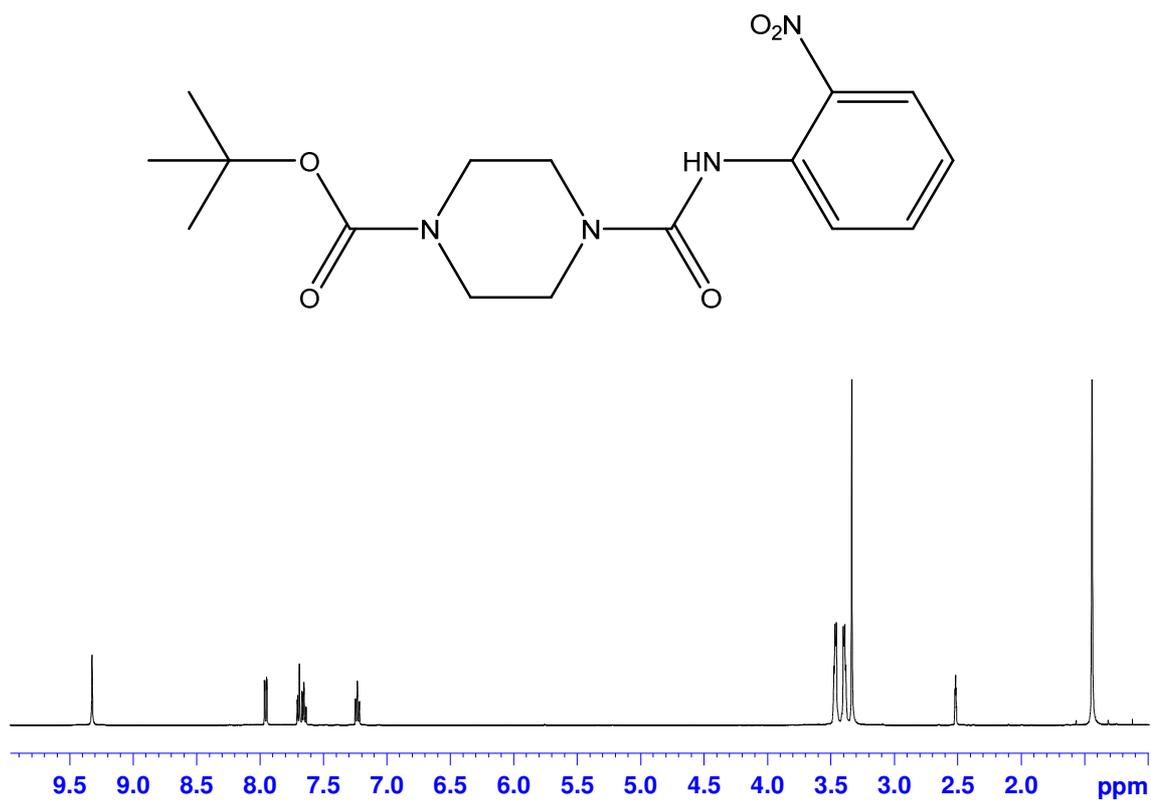
- Espectro de ^1H y ^{13}C NMR de 1-tert-Butoxicarbonil-4-[(4-nitrofenil)-aminocarbonil] piperazina (**8**) 33
- Espectro de ^1H y ^{13}C NMR de 1-tert-Butoxicarbonil-4-[(2-nitrofenil)-aminocarbonil] piperazina (**9**) 34
- Espectro de ^1H y ^{13}C NMR de 1-tert-Butoxicarbonil-4-[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)-aminocarbonil] piperazina (**10**) 35
- Espectro de ^1H y ^{13}C NMR de *N,N'*-Bis[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)-aminocarbonil]-2-fenilpiperazina (**16**) 36
- Espectro de ^1H y ^{13}C NMR de 4-(Benzofuran-2-carbonil)-1-[(4-nitrofenil)-aminocarbonil]piperazina (**13**) 37
- Espectro de ^1H y ^{13}C NMR de 4-(Benzofuran-2-carbonil)-2-fenil-1-[(2-nitrofenil)-aminocarbonil]piperazina (**14**) 38
- Espectro de ^1H y ^{13}C NMR de *N,N'*-Bis(Benzofuran-2-carbonil)-2-fenil-piperazina (**17**) 39



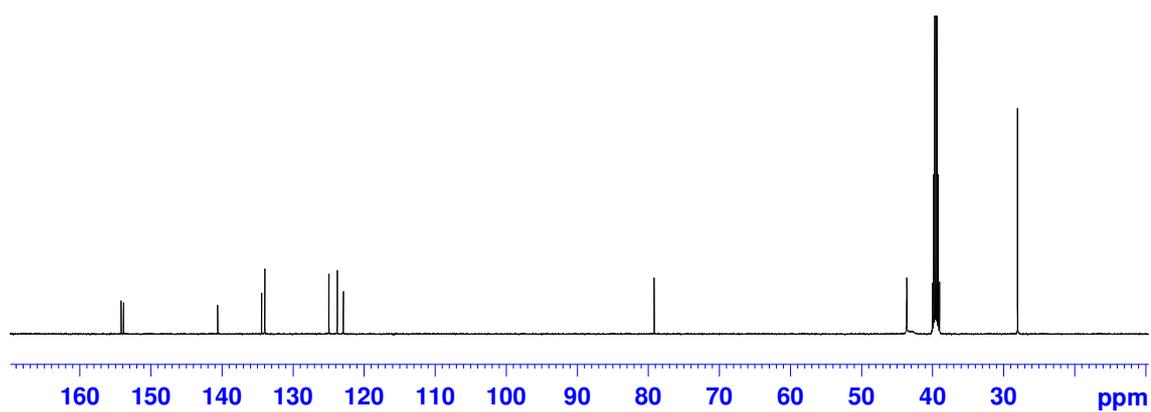
Espectro de ¹H-NMR de 1-tert-Butoxicarbonil-4-[(4-nitrofenil)-aminocarbonyl] piperazina (8)



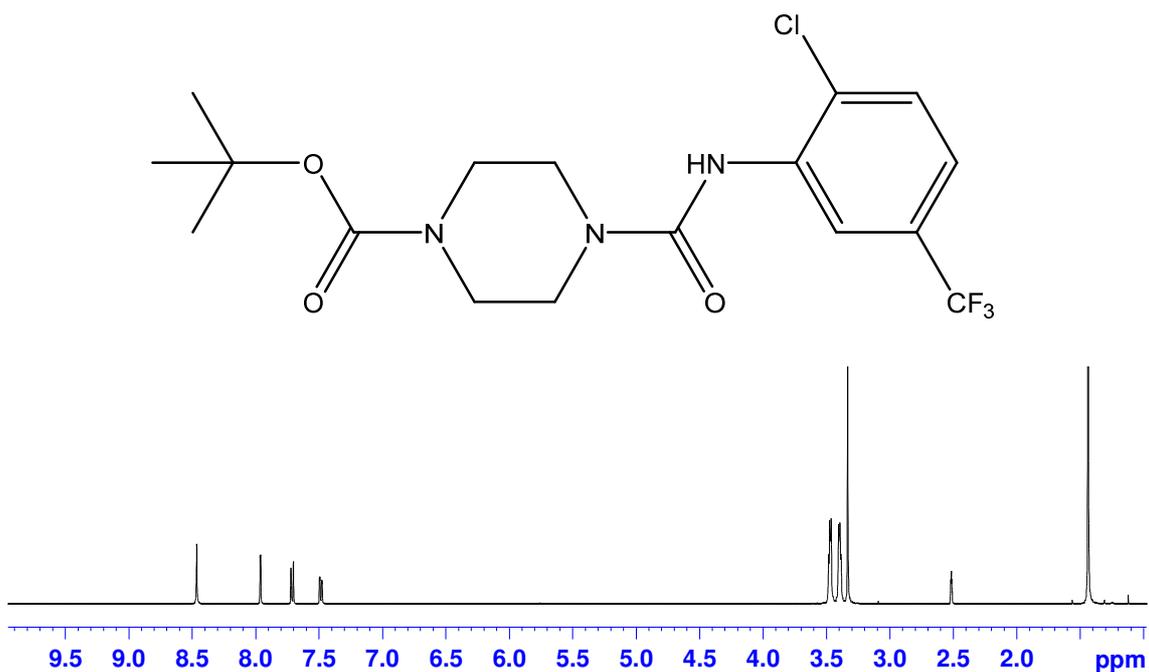
Espectro de ¹³C-NMR de 1-tert-Butoxicarbonil-4-[(4-nitrofenil)-aminocarbonyl] piperazina (8)



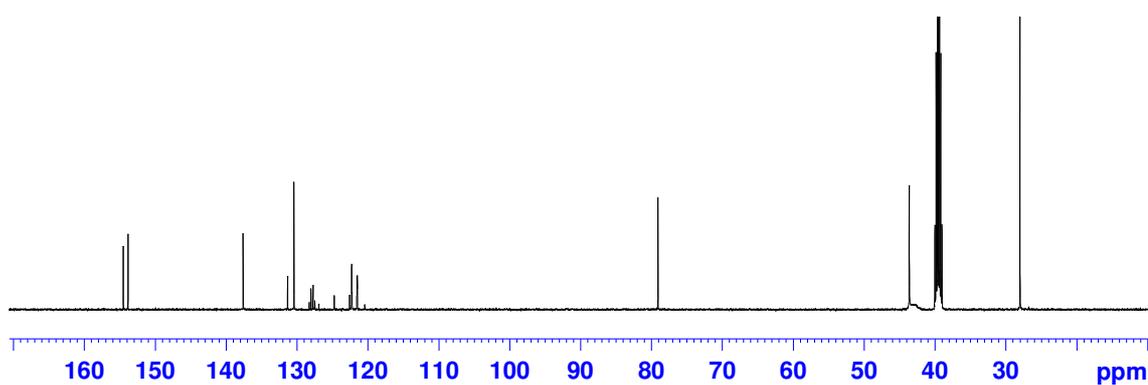
Espectro de ¹H-NMR de 1-tert-Butoxicarbonyl-4-[(2-nitrofenil)-aminocarbonyl] piperazina (9)



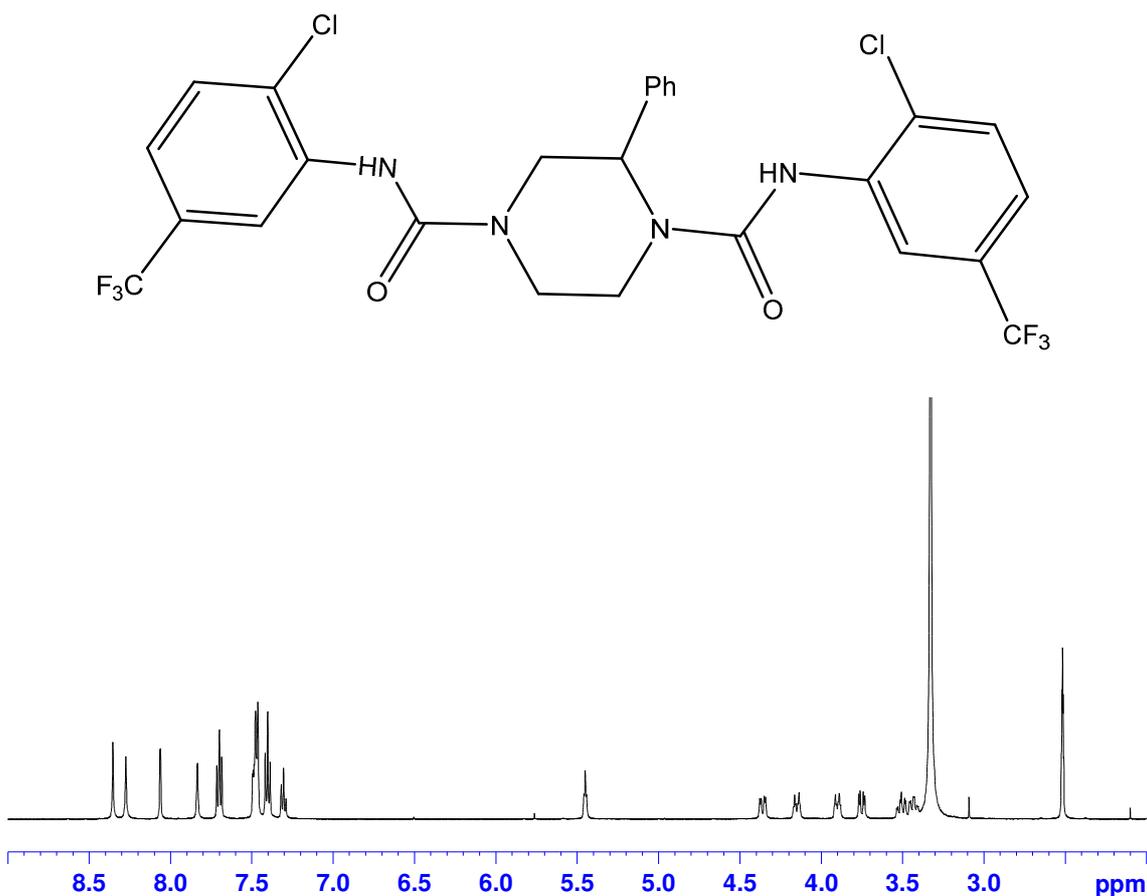
Espectro de ¹³C-NMR de 1-tert-Butoxicarbonyl-4-[(2-nitrofenil)-aminocarbonyl] piperazina (9)



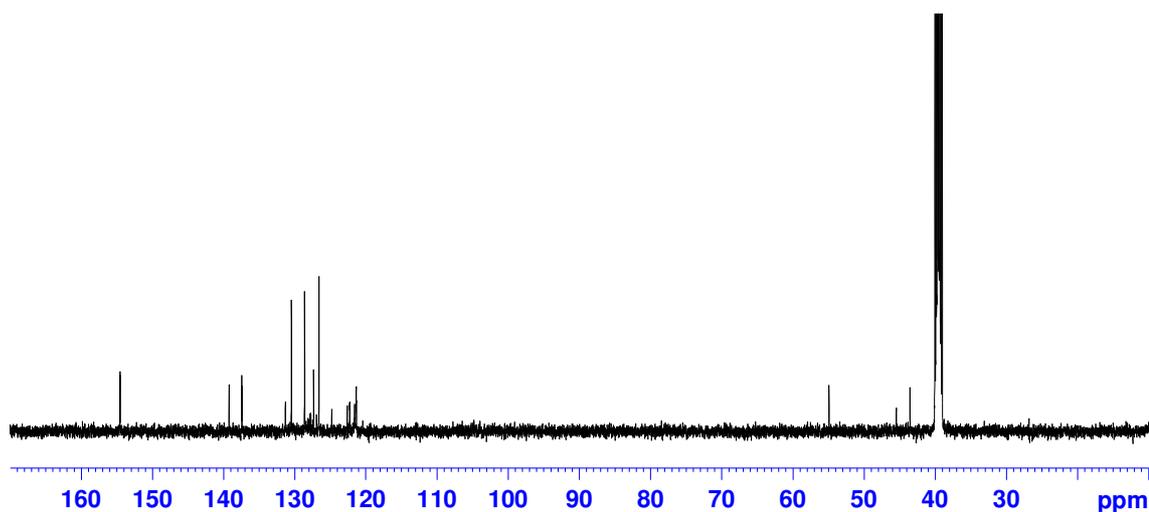
Espectro de ¹H-NMR 1-tert-Butoxicarbonil-4-[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)-aminocarbonil] piperazina (10)



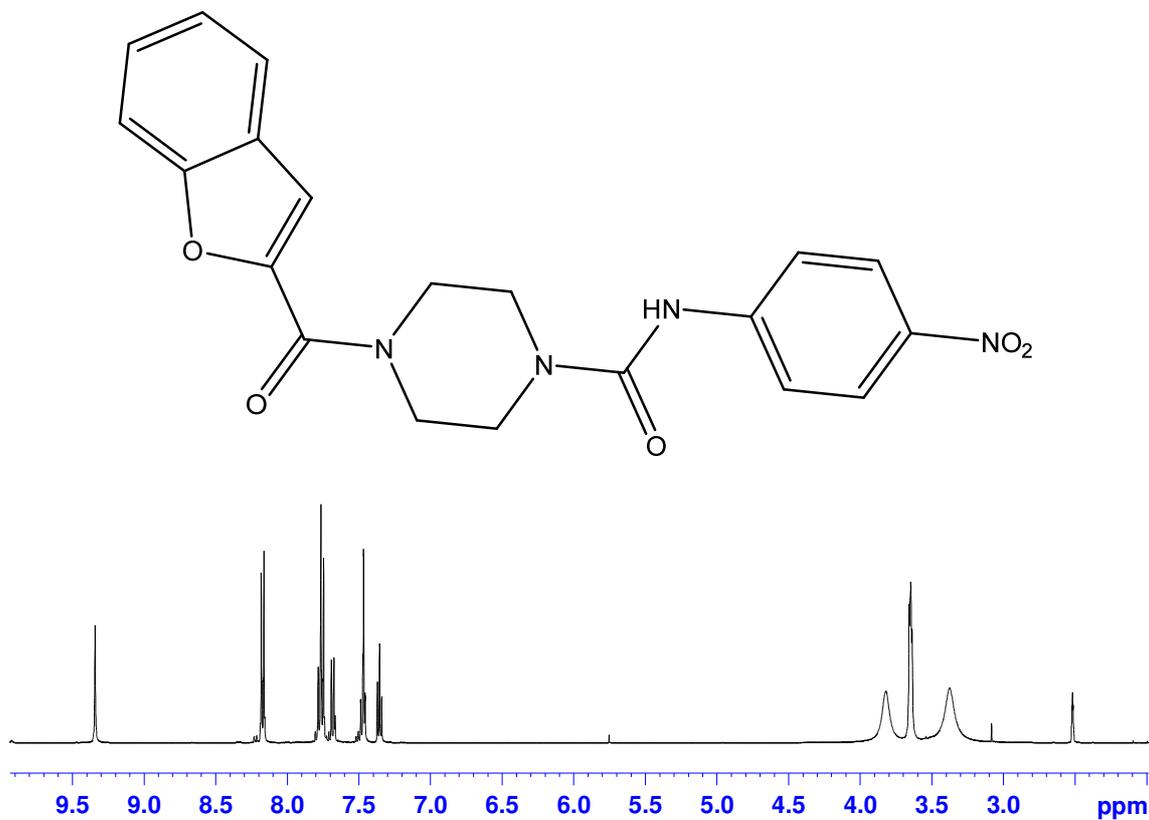
Espectro de ¹³C-NMR de 1-tert-Butoxicarbonil-4-[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)-aminocarbonil] piperazina (10)



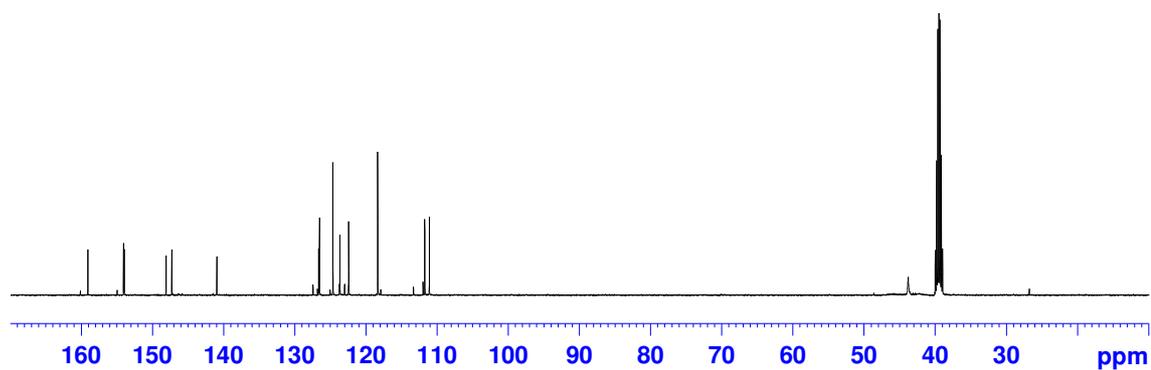
Espectro de ¹H-NMR *N,N'*-Bis[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)-aminocarbonil]-2-fenilpiperazina (16)



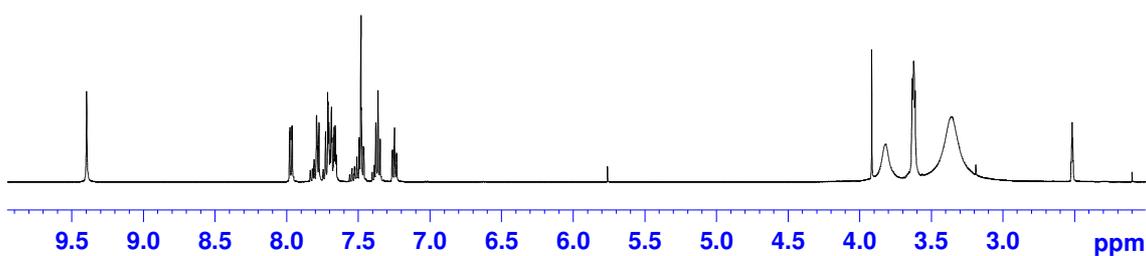
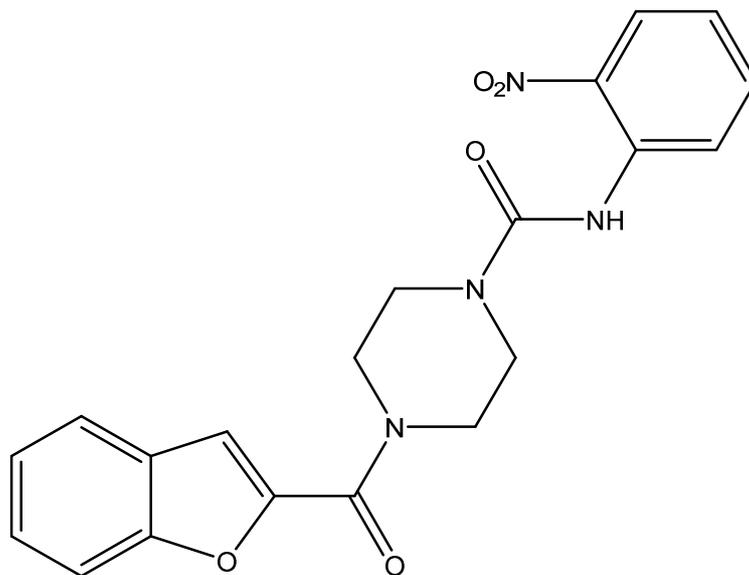
Espectro de ¹³C-NMR de *N,N'*-Bis[(2-cloro-5-trifluorometilfenil)-aminocarbonil]-2-fenilpiperazina (16)



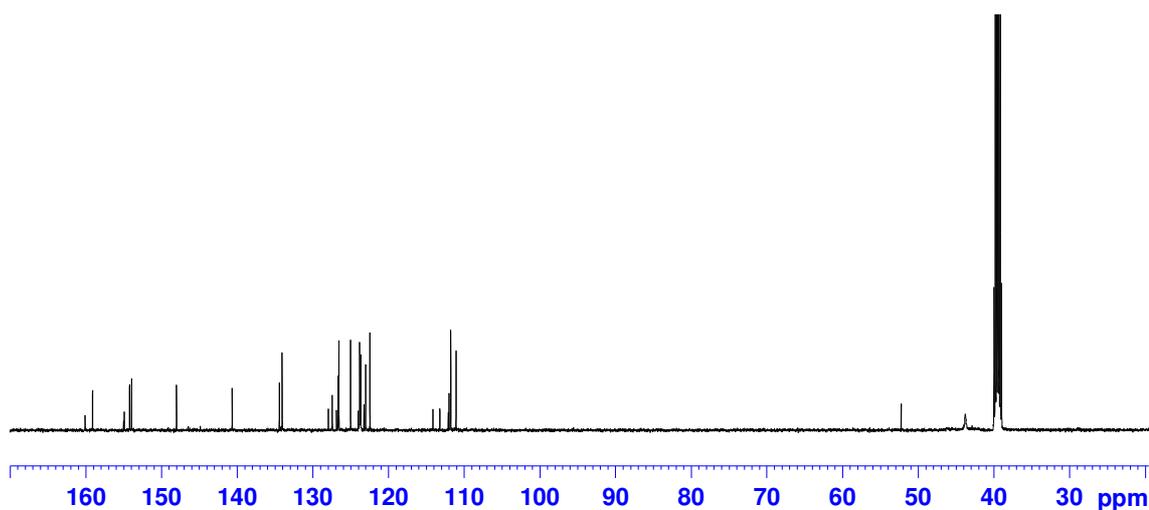
Espectro de ¹H-NMR 4-(Benzofuran-2-carbonil)-1-[(4-nitrofenil)-aminocarbonil]piperazina (13)



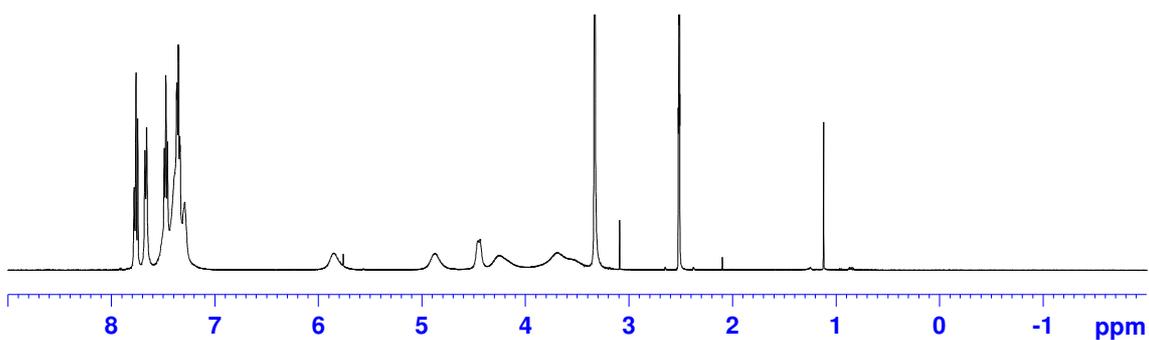
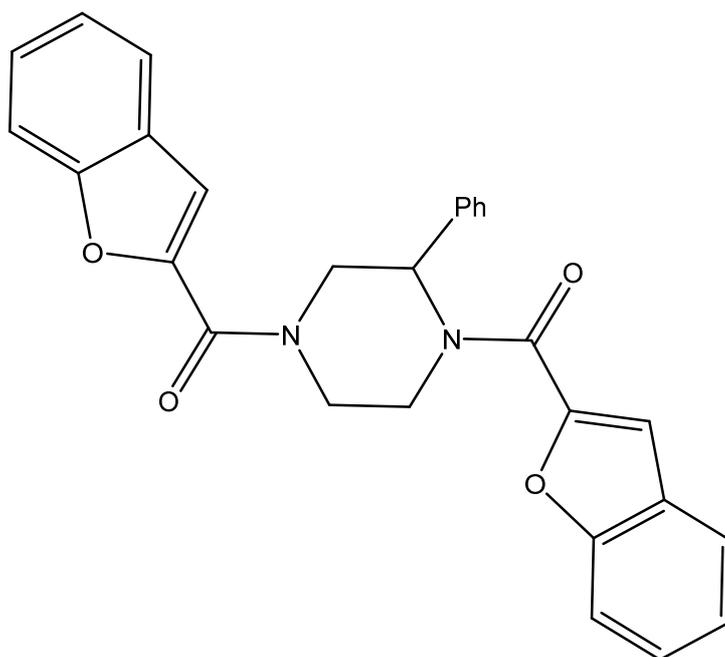
Espectro de ¹³C-NMR de 4-(Benzofuran-2-carbonil)-1-[(4-nitrofenil)-aminocarbonil]piperazina (13)



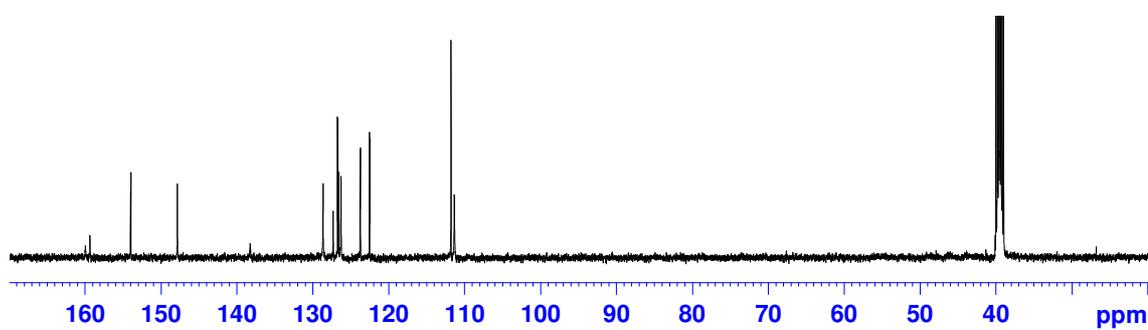
Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de 4-(Benzofuran-2-carbonil)-2-fenil-1-[(2-nitrofenil)aminocarbonil]piperazina (**14**)



Espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ de 4-(Benzofuran-2-carbonil)-2-fenil-1-[(2-nitrofenil)aminocarbonil]piperazina (**14**)



Espectro de ^1H -NMR de *N,N'*-Bis(Benzofuran-2-carbonil)2-fenil-piperazina (**17**)



Espectro de ^{13}C -NMR de *N,N'*-Bis(Benzofuran-2-carbonil)2-fenil-piperazina (**17**)