



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE NUCLEOZINA CON POTENCIAL ACTIVIDAD
ANTIVIRAL QUE INCORPORAN EL SISTEMA 2,5-
DIAZABICICLO[2.2.1]HEPTANO**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ERICK ALBERTO CORREA PADILLA

DR JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS
FES ZARAGOZA, UNAM

Ciudad de México, Junio, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



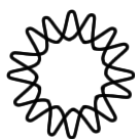
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo otorgado para mis estudios de posgrado en los semestres 2017-1, 2017-2, 2018-1 y 2018-2 (No. de CVU: 687699, No. de registro de Becario: 603778).



A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por el apoyo financiero para el proyecto PAPIIT IN225916.



A los técnicos académicos del Instituto de Química de la UNAM: M. en C. Hector Ríos Olivares y Dra. María Isabel Chávez Uribe por el apoyo en la espectroscopía de RMN ^1H y ^{13}C , y al Dr. Francisco Javier Perez Flores y la Dra. María del Carmen García González por el apoyo en la espectrometría de masas.



Al Dr. Carlos F. Arias del Instituto de Biotecnología de la UNAM, al Dr. Fernando Esquivel y a la Dra. Vanessa López de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado Morelos (UAEM) por la evaluación biológica de los análogos de nucleozina.



A la Dra. Lourdes Castillo de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z) de la UNAM por la realización de los espectros de Infrarrojo.

Al Dr. Manuel López Ortiz, Q.F.B. Sebastián Martínez Flores y Eduardo Ruíz Padilla, estudiante de la carrera de Q.F.B. de la FES-Z, por su valiosa colaboración en el presente trabajo.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Síntesis de Fármacos de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UMIEZ), UNAM.

ABREVIATURAS

AcOEt = Acetato de etilo

Bn = Bencilo

Boc = *t*-butoxicarbonilo

CCF = Cromatografía en Capa Fina

CE₅₀ = Concentración Efectiva 50

DBH = (1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano

DCM = Diclorometano

DCC = Diciclohexilcarbodimida

DMAP = 4-dimetilaminopiridina

DMF = Dimetilformamida

DMSO = Dimetilsulfóxido

EM = Espectrometría de masas

i-PrOH = Isopropanol

IE = Impacto electrónico

MTBE = Metil*tert*butiléter

NP = Nucleoproteína

PivCl = Cloruro de pivaloilo

RMN = Resonancia Magnética Nuclear.

SNAr = Sustitución Nucleofílica Aromática

TEA = Trietilamina

Índice

Índice	4
1. Introducción	5
2. Marco teórico	6
2.1. Estructura y composición del virus de la influenza	6
2.2. Cuadro clínico	8
2.3. Hospederos	8
2.4. Prevención y control	9
2.4.1. Vacuna	9
2.4.2. Terapéutica	9
2.4.2.1. Fármacos actualmente utilizados en el tratamiento contra la influenza	9
2.4.2.2. Otros grupos farmacológicos	10
2.6. El sistema (1S,4S)-2,5-diazabiclo[2.2.1]heptano en química medicinal	12
3. Planteamiento del problema	14
4. Hipótesis	15
5. Objetivos	15
6. Parte experimental	16
6.1. Esquema general de síntesis	16
6.2. Procedimientos experimentales	19
7. Resultados y análisis de resultados	25
8. Conclusiones	31
9. Anexo	31
10. Referencias	41

1. Introducción

La influenza es una enfermedad que afecta al sistema respiratorio superior. Es causada por un virus de la familia *Orthomyxoviridae*, se presenta a nivel mundial y causa brotes anuales de intensidad variable. La mutabilidad, la gran frecuencia de reordenamiento genético y los cambios antigénicos en las glucoproteínas de la superficie viral son un desafío para controlar al virus, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

En 2010 los grupos de investigación de Kao¹ y Su² y publicaron de manera independiente y casi simultánea un nuevo compuesto con actividad antiviral que se denominó nucleozina (**1**) capaz de generar dímeros u oligómeros de nucleoroteína (NP), una proteína asociada con la replicación del virus de la influenza. Se encontró que nucleozina posee mayor actividad antiviral que el fármaco oseltamivir.

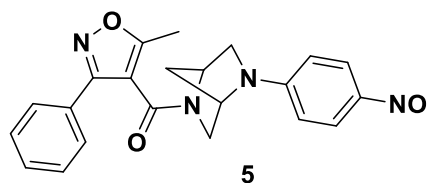
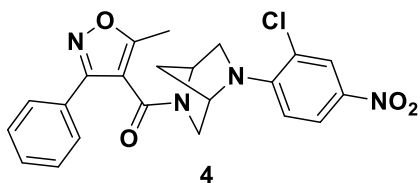


La nucleozina posee en su estructura un ciclo de piperazina el cual se puede sustituir por el sistema 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (DBH) **2** ó **3** con el propósito de modificar la actividad antiviral.



En el presente trabajo se reemplazó el anillo de piperazina de la molécula de nucleozina por el sistema DBH (**2**) obteniendo el análogo **4**, el cual se caracterizó por técnicas de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C, Infrarrojo y Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico (EMIE). También se envió para su

evaluación biológica, en colaboración, al Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Estado de Morelos. A su vez se sintetizó un nuevo análogo (5) con el propósito de aumentar su solubilidad en agua.



2. Marco teórico

La influenza es una infección viral aguda de las vías respiratorias, muy contagiosa, que puede afectar la mucosa nasal, la faríngea los bronquios y los alveolos pulmonares. Los virus de la influenza se presentan a nivel mundial y causan brotes anuales de intensidad variable. La enfermedad puede tener comportamiento endémico, epidémico o pandémico.^{3,4}

Se conocen tres tipos inmunológicos de virus designados A, B y C. La influenza tipo A es la que posee mayor variabilidad antigénica y es la causa de la mayor parte de los casos de epidemias de influenza.^{5,6} La mutabilidad, el reordenamiento genético y los cambios antigénicos resultantes en las glucoproteínas de la superficie viral, son un desafío para controlar al virus.

2.1. Estructura y composición del virus de la influenza

Las partículas virales de la influenza por lo general son esféricas y de 100nm de diámetro aproximadamente. Las partículas del virus de la influenza contienen nueve proteínas estructurales diferentes como se muestra en la Figura 1.

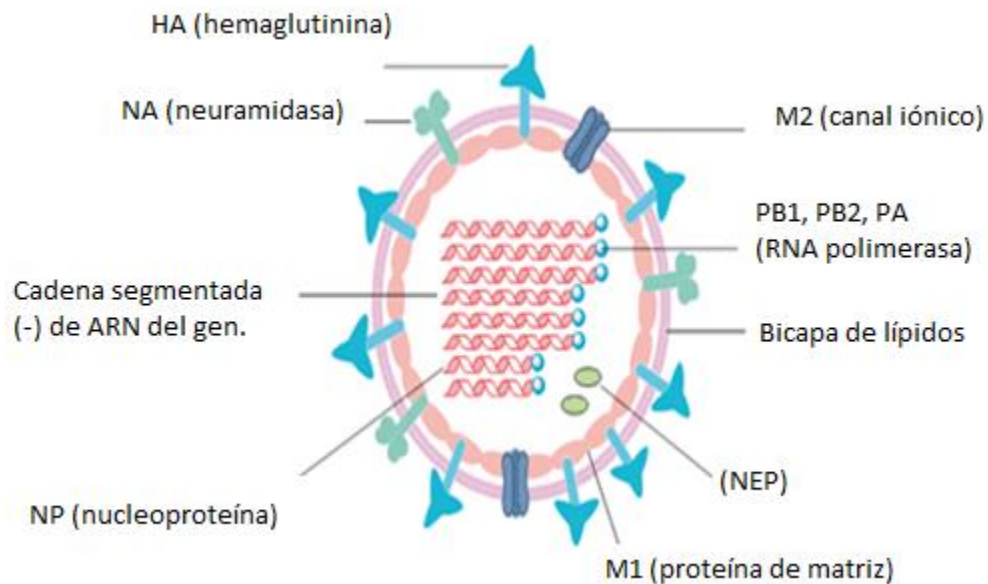


Figura 1. Estructura del virus de la influenza.

La nucleoproteína (NP) se une con el RNA viral para formar una estructura de ribonucleoproteína (RNP) como se muestra en la Figura 2. Tres grandes proteínas (PB1, PB2 y PA) se unen a la RNP viral y se encargan de la transcripción y replicación del ARN.

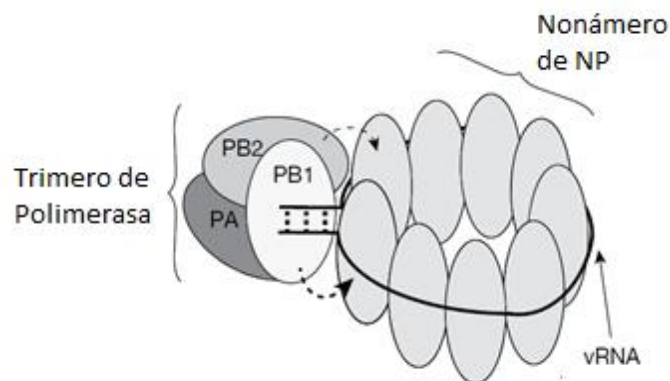


Figura 2. Estructura de la Ribonucleoproteína (RNP).⁷

La partícula viral está rodeada por una cubierta lipídica derivada de las células del hospedero. Dos glucoproteínas codificadas por el virus, la hemaglutinina (HA) y la

neuraminidasa (NA), se introducen en la cubierta y quedan expuestas como espigas de casi 10 nm de longitud sobre la superficie de la partícula. Estas dos glucoproteínas de superficie son los antígenos importantes que determinan la variación antigénica de los virus de la influenza y la inmunidad del huésped. La proteína del canal iónico M2 y la Proteína NS2 también se encuentran en la cubierta pero solo en unas pocas copias por partícula.⁸

2.2. Cuadro clínico

La enfermedad tiene un inicio súbito, fiebre mayor de 38 °C, postración, cefalea, mialgias, tos seca y manifestaciones nasales como estornudos, rinorrea y obstrucción aérea, con inflamación faríngea. La fiebre declina al segundo o tercer día de la enfermedad, al ceder la fiebre los síntomas respiratorios pueden exacerbarse, la tos y la rinorrea pueden ser más intensos. Cuando se resuelven la mayoría de los síntomas, la tos y la debilidad pueden persistir hasta una semana más. Las complicaciones que se pueden observar son neumonía bacteriana secundaria, neumonía viral primaria y neumonía mixta, viral y bacteriana.⁹

2.3. Hospederos

El virus de la influenza tipo A también se puede encontrar en cerdos, caballos, aves silvestres y aves de corral y algunas especies marinas. Existe el riesgo de que la influenza aviar o porcina se adapte por medio de mutaciones al epitelio respiratorio humano y subsecuentemente transmitirse de persona a persona.¹⁰ Un riesgo mayor reside en que las recombinaciones con cepas de virus humanas en un huésped intermedio generen híbridos virales con potencial de diseminación global y elevada patogenicidad por la ausencia de inmunidad previa en las poblaciones humanas (Figura 3).¹¹

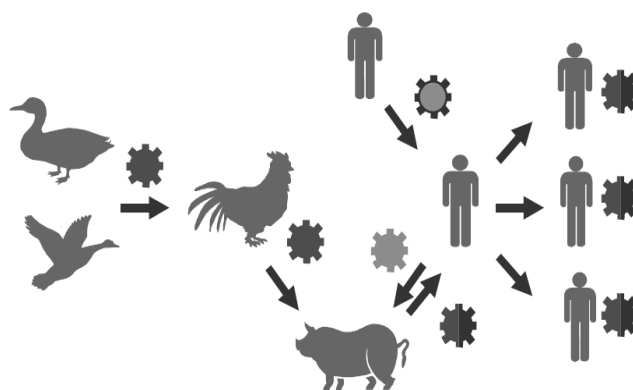


Figura 3. Eventos de recombinação genética entre aves cerdos y humanos, probable mecanismo de génesis del actual virus AH1N1 de la influenza. (Paredes CF et al, 2009).

2.4. Prevención y control

Existen dos medidas disponibles que pueden reducir el impacto de influenza: la inmunoprofilaxis que emplea vacunas y la quimioprofilaxis que depende de fármacos.

2.4.1. Vacuna

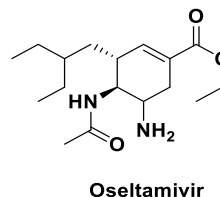
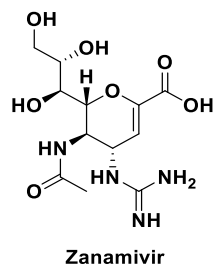
En la actualidad la vacuna usada es trivalente ya que contiene dos cepas de influenza tipo A (H1N1, H3N2) y una cepa de influenza B. La vacuna es de aplicación anual ya que la elaboración de esta vacuna varía año con año debido a los cambios antigénicos de los virus.

2.4.2. Terapéutica

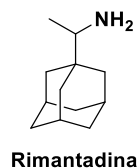
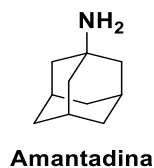
2.4.2.1. Fármacos actualmente utilizados en el tratamiento contra la influenza

Actualmente existen cinco fármacos comercialmente disponibles para el tratamiento de la influenza: oseltamivir (Tamiflu®) vía oral, zanamivir (Relenza®) vía inhalatoria y peramivir (Rapivab®) vía intravenosa que son inhibidores de la NA, y, amantadina y rimantidina que son bloqueadores del canal iónico M2.

Los inhibidores de la NA impiden la escisión del ácido siálico inhibiendo la liberación del virión y evitando que las nuevas partículas virales se diseminen a otras células.



En cuanto a los bloqueadores de M2 su acción consiste en la unión a un bolsillo específico de la proteína, estabilizando su conformación cerrada e impidiendo que después de la fusión, el virus pueda liberar el complejo ribonucleoproteínico al citoplasma para seguir con el ciclo viral.

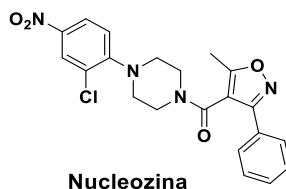


2.4.2.2. Otros grupos farmacológicos

Existe una gran cantidad de compuestos que han sido ensayados por su potencial actividad antiviral pero aún no están disponibles para su uso en la clínica. A grandes rasgos estos compuestos se pueden dividir en dos: activos contra los componentes de los virus (HA, NP o NS1) y activos contra los componentes del huésped. Ésta última tiene como objetivo modular la respuesta del huésped como estrategia que minimiza el desarrollo de cepas resistentes, sin embargo el riesgo de efectos secundarios es muy alta.¹²

La nucleoproteína (NP) es un objetivo atractivo debido a que es la proteína expresada más abundante durante el ciclo de la infección con múltiples funcionalidades, es fundamental

para la síntesis del vARN, la exportación nuclear de las RNP, el tráfico citoplasmático y el ensamblaje viral. NP no tiene ninguna contraparte en las células, por lo que usar a ésta proteína como objetivo, puede evitar efectos secundarios en las células. La nucleozina es uno de los fármacos en estudio con actividad sobre NP.



Cuando la nucleozina se enlaza a NP se forman oligómeros de la proteína, los cuales quedan indispuestos para migrar al interior del núcleo interrumpiendo la replicación del virus.¹³

Tabla 1. Concentración efectiva 50 (CE 50) de nucleozina evaluada para diferentes virus de influenza.

Virus	CE₅₀ (μM)
A/WSN/33	0.069 ± 0.003
H3N2	0.16 ± 0.01
Vietnam/1194/04 (H5N1)	0.33 ± 0.04

En la Tabla 1 se muestran la concentración efectiva 50 (CE₅₀) de nucleozina evaluada para distintos virus de Influenza, mientras que en la Figura 4 se muestra la eficacia, en comparación con oseltamivir. El compuesto tiene una concentración tóxica >250 μM lo que sugiere una amplia ventana terapéutica. Se han sintetizado diversos análogos estructurales de nucleozina para modificar la actividades antiviral así como su solubilidad y biodisponibilidad.^{14, 15, 16, 17}

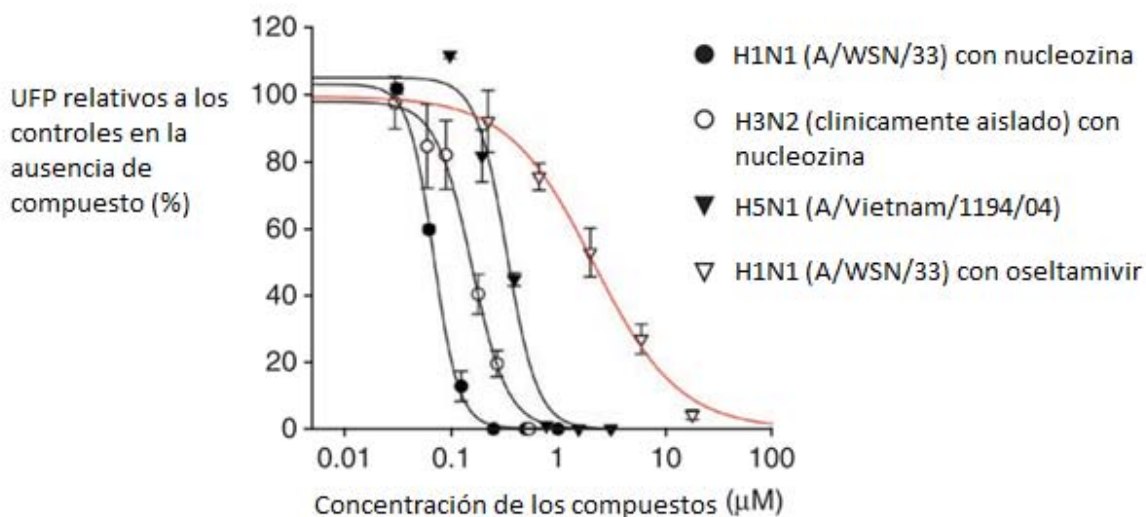
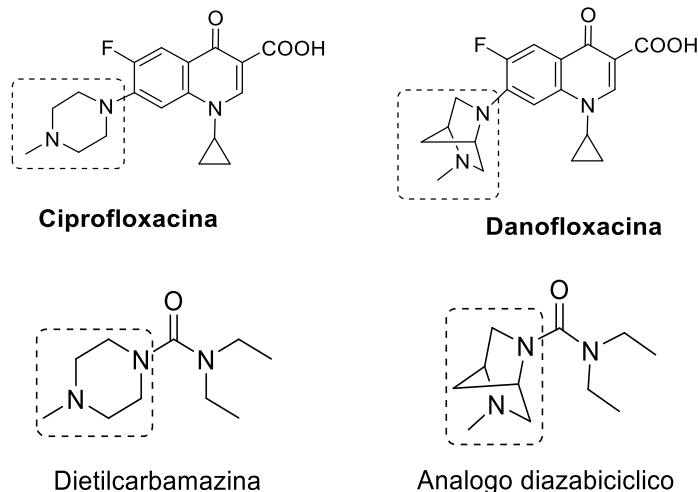


Figura 4. Tomado de Kao, R. Y. et al *Nat. Biotechnol.* **2010**, 28 (6), 600–605.

2.6. El sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano en química medicinal

Existen diversos ejemplos de fármacos a los que se le ha reemplazado el anillo de piperazina por el sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (DBH) **3** obteniendo una mejor actividad terapéutica¹⁸, por el ejemplo la danofloxacina¹⁹, un antibiótico usado en la medicina veterinaria y la dietilcarbamazina.²⁰, un antiparasitario.



La ranolazina es un fármaco actualmente empleado en el tratamiento de cardiopatía isquémica. Nuestro grupo de trabajo realizó la síntesis de los análogos diazabíclicos de ranolazina encontrando que la mezcla epimérica [(*S,S,S*)(*S,S,R*)] tiene efecto vasodilatador (Figura 5).²¹

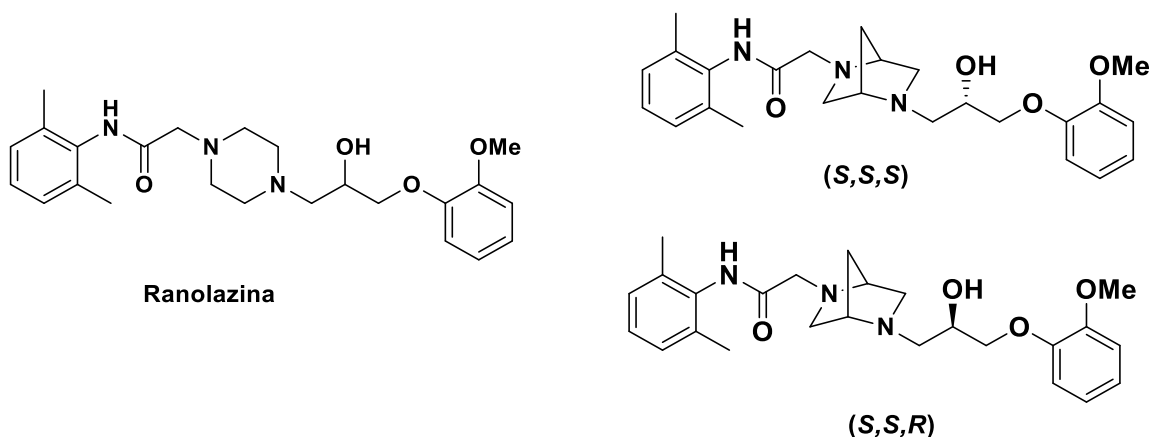


Figura 5. Ranolazina y sus análogos diazabíclicos.

También se ha reportado la síntesis e identificación de híbridos de nitroestiren-(*1S,4S*)-2,5-diazabíciclo[2.2.1]heptano (Figura 6) como potenciales antiproliferativos y agentes inductores de apoptosis contra líneas de cáncer cérvico.²²

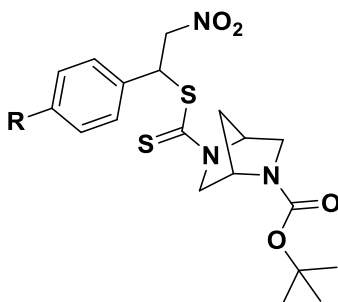
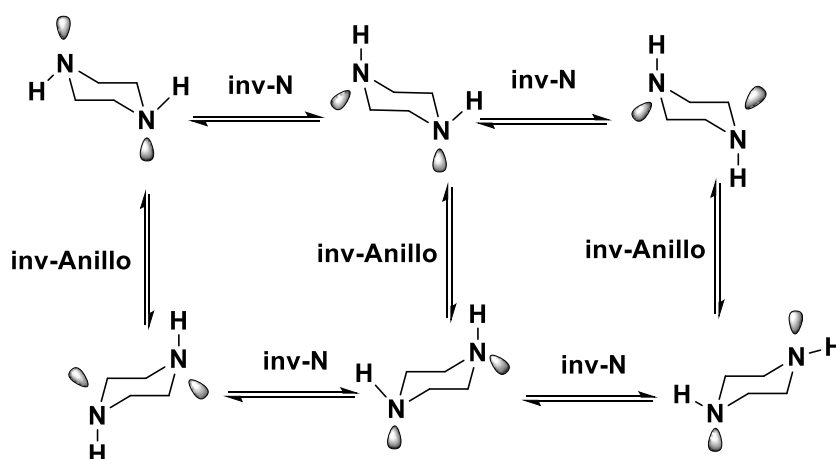
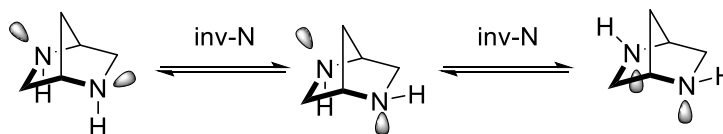


Figura 6. Derivados de nitroestiren-(*1S,4S*)-2,5-diazabíciclo[2.2.1]heptano como potenciales antiproliferativos y agentes inductores de apoptosis contra líneas de cáncer cérvico.



Esquema 1. Equilibrio conformacional y configuracional de la piperazina.

El sistema DBH es estructuralmente equivalente a la piperazina pero al ser un anillo restringido puede mejorar la interacción con algunos receptores celulares. En el Esquema 1 se muestran los cambios conformacionales y configuracionales de la piperazina para los isómeros de silla, mientras que en el Esquema 2 se muestra que el DBH solo genera tres configuraciones posibles.



Esquema 2. Equilibrio configuracional del (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1] heptano.

3. Planteamiento del problema

Los ortomixovirus son los virus responsables de la influenza, una infección que afecta al sistema respiratorio. Son virus infectivos, de alta virulencia y gran mutagenicidad y son causantes de epidemias y pandemias. Las estrategias de control de la enfermedad son la inmunoprofilaxis (uso de vacunas) y la quimioprofilaxis (uso de medicamentos). Actualmente están disponibles dos principales tratamientos para los brotes de influenza:

los bloqueadores de canales iónicos (amantadina y rimantidina) y los inhibidores de la neuramidasa (oseltamivir). Lamentablemente se han presentado casos de resistencia a estos tratamientos por lo que es fundamental la investigación en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos contra el virus de la influenza. La nucleoproteína (NP) es un candidato ideal, dado que tiene una gran participación durante la replicación viral. La molécula de la nucleozina tiene afinidad a esta proteína, la cual una vez enlazada, desactiva a NP por formación de oligómeros de diferente tamaño, inhibiendo la replicación viral. Se han sintetizado diversos análogos de nucleozina con la finalidad de mejorar la actividad terapéutica.

4. Hipótesis

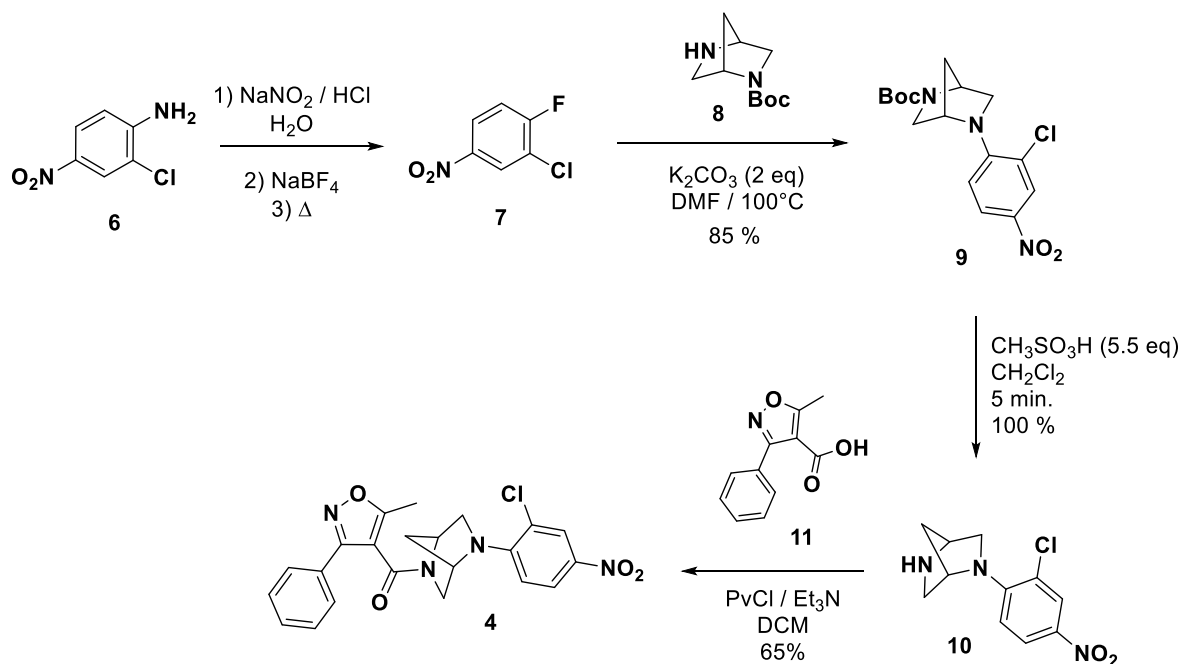
Es posible mejorar la actividad antiviral de la Nucleozina mediante el reemplazo del anillo de piperazina por el sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano.

5. Objetivos

- Sintetizar dos análogos de nucleozina donde se incorpore el sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano como equivalente estructural de la piperazina.
- Sintetizar nucleozina para utilizarla como control positivo durante la evaluación biológica de los análogos diazabicyclicos.
- Caracterizar espectroscópicamente los análogos diazabicyclicos sintetizados, así como la nucleozina para su empleo como control positivo.
- Enviar a evaluación biológica los análogos diazabicyclicos sintetizados para determinar la actividad antiviral

6. Parte experimental

6.1. Esquema general de síntesis

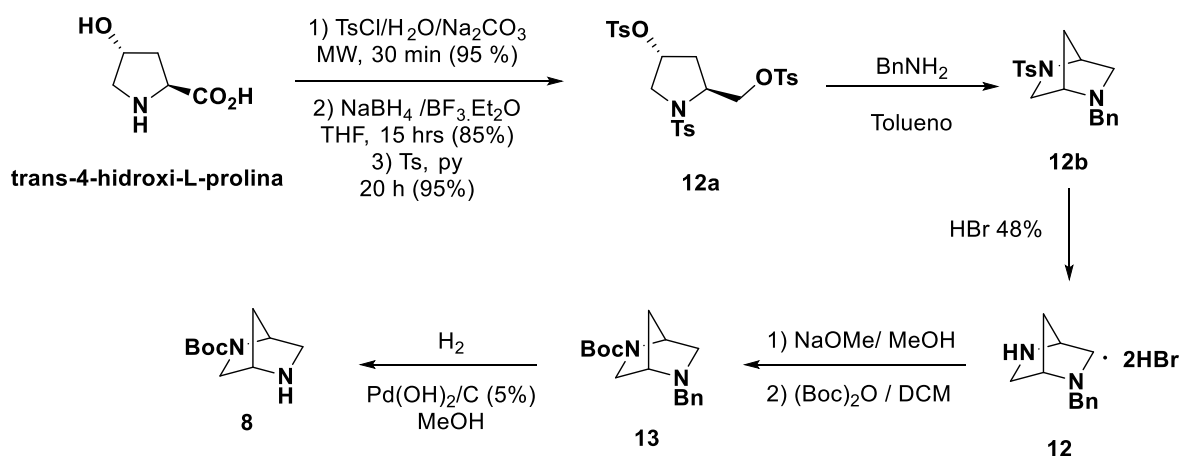


Esquema 3. Síntesis del primer análogo diazabíciclico de nucleozina.

A partir de la 2-cloro-4-nitroanilina (**6**) se obtuvo el 3-cloro-4-fluoronitrobenceno (**7**), mediante una reacción de Sandmeyer, el cual se hizo reaccionar con el *N*-BocDBH (**8**) en solución de DMF en presencia de K₂CO₃ para formar el compuesto **9**, después se removió el grupo protector *N*-Boc con 5.5 equivalentes de ácido metansulfónico en DCM; el análogo **4** se sintetizó por la formación de la amida vía anhídrido mixto con PivCl.

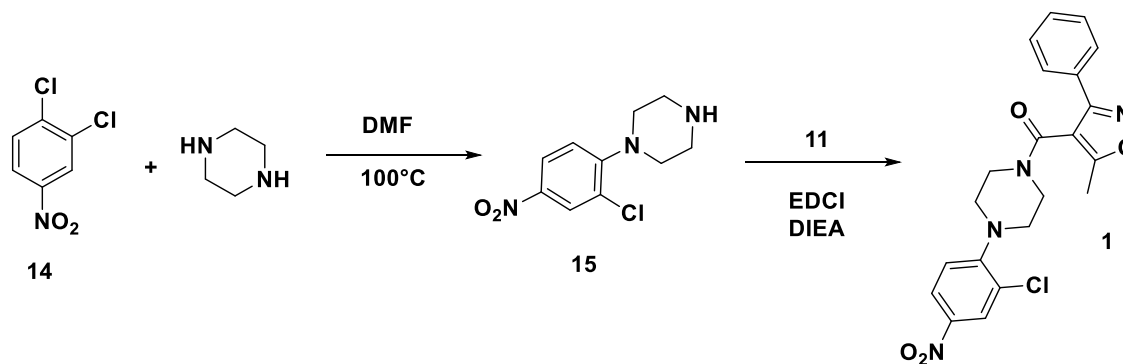
La síntesis del *N*-BocDBH (**8**) se muestra en el esquema 4. Se partió del dibromhidrato **12** el cual fue preparado siguiendo la metodología reportada.^{23, 22} Esta estrategia de síntesis comenzó con la *trans*-4-hidroxi-L-prolina, la cual se *N*-tosiló en condiciones acuosas, posteriormente el ácido carboxílico se redujo a alcohol primario y se *O*-tosilaron tanto el alcohol primario como el secundario dando lugar al intermediario tritosilado **12a** que se cicló al tratarse con BnNH₂ en tolueno para generar **12b**. El grupo protector *N*-Ts se remueve

con tratamiento de HBr concentrado obteniendo a **12**. El compuesto **12** se trató con NaOMe en MeOH para producir la diamina libre la cual se mezcló con Boc₂O en DCM para generar el *N*-Bn-*N*-BocDBH (**13**) el cual se sometió a hidrogenólisis catalizada con Pd/C en MeOH para remover el grupo *N*-bencilo.



Esquema 4. Síntesis del *N*-BocDBH (**8**).

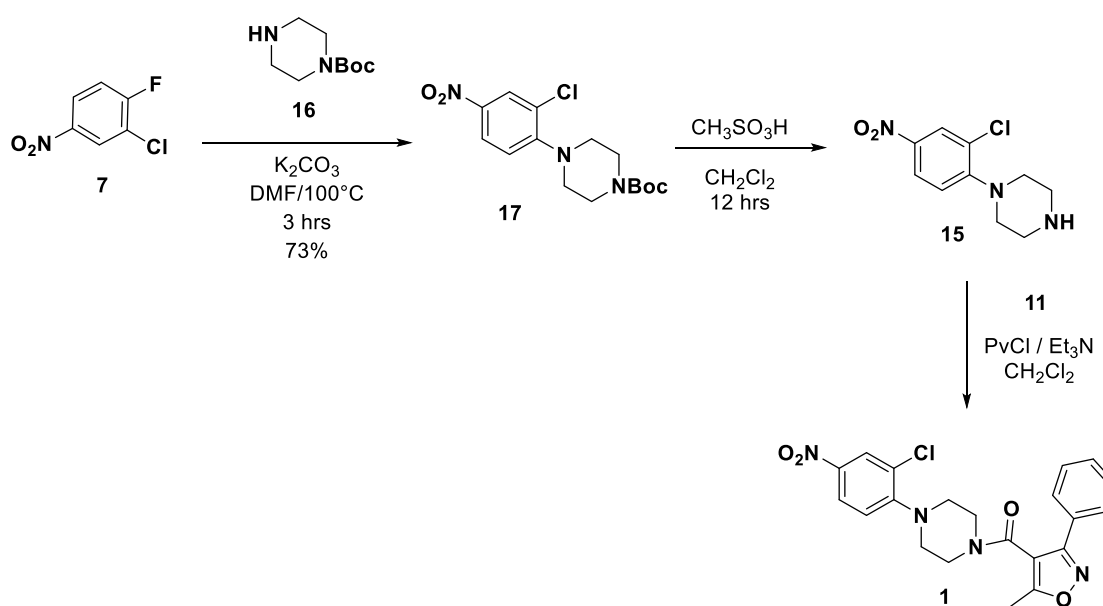
Para evaluar la actividad antiviral del análogo **4** fue necesaria sintetizar nucleozina como referencia biológica; se intentó reproducir sin éxito la ruta de síntesis que reportó Kao *et al* (esquema 5).²⁴

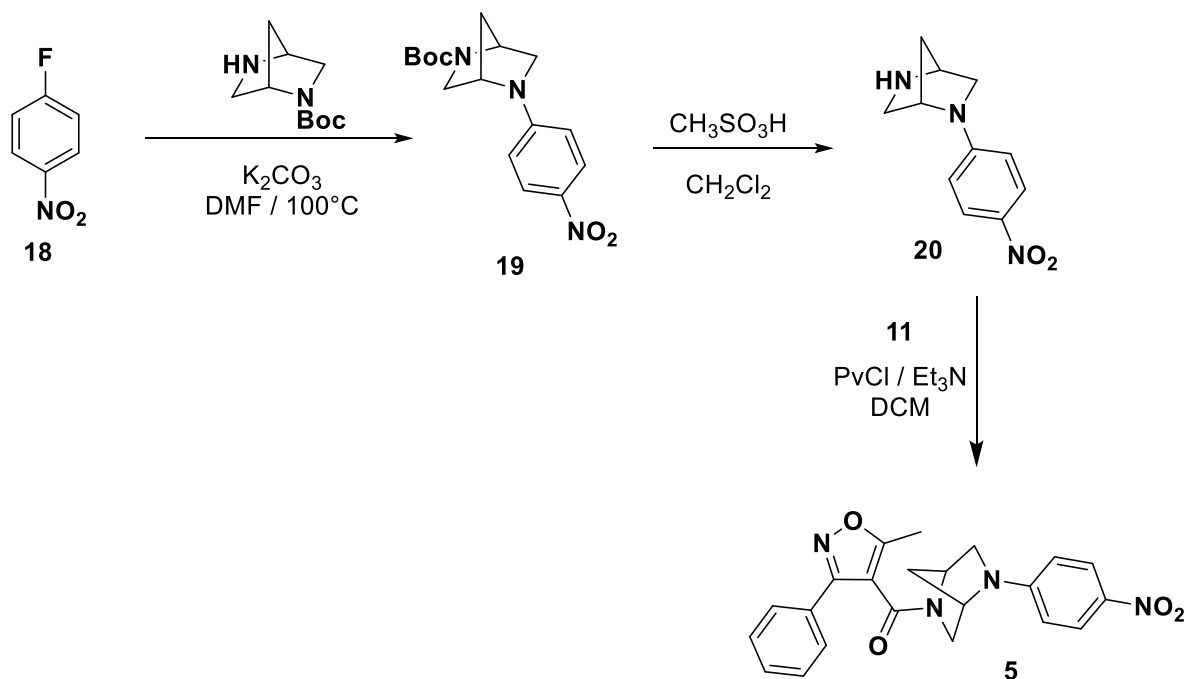


Esquema 5. Síntesis de nucleozina reportada por Kao y col.¹

En el esquema 6 se muestra la ruta de síntesis de nucleozina que se desarrolló en el presente proyecto. Se partió del compuesto **7** el cual se hizo reaccionar con *N*-Boc-piperazina en DMF, la posterior remoción de grupo *N*-Boc y la formación de la amida **1** vía anhídrido mixto.

Con la finalidad de mejorar la solubilidad del derivado diazabíclico en agua se intentó obtener la sal cuaternaria de amonio del derivado diazabíclico **4** mediante la protonación de la amina terciaria, lamentablemente no se observó reacción con ninguno de los ácidos probados (HCl, H₂SO₄, CH₃SO₃H), por ello se desarrolló la síntesis del análogo **5** carente de cloro en el anillo bencénico nitrogenado con la finalidad de aumentar la basicidad de la amina y poder formar la sal de amonio. En el esquema 7 se muestra la ruta sintética del análogo **5**, con el cual tampoco se observó reacción con los ácidos antes mencionados.

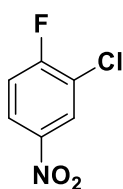




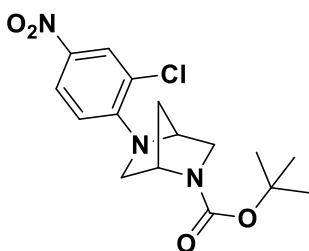
Esquema 7. Síntesis del segundo análogo diazabícliclo 5.

6.2. Procedimientos experimentales

3-Cloro-4-fluoronitrobenceno (7)

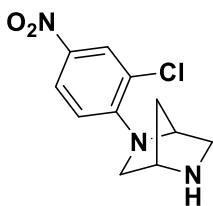


En un matraz bola de 100 mL se colocaron 5.16 g (29.9 mmol) del compuesto **6**, se agregaron 7.56 mL de agua y 7.56 mL de HCl al 30 %, la mezcla se enfrió entre -8 y -5 °C, con agitación magnética y se adicionó lentamente una solución de 2.19 g (31.74 mmol) de NaNO₂ en 4.5 mL de agua, agitó durante 30 minutos, se agregó una solución de 4.56 g (41.53 mmol) de NaBF₄ y se agitó durante 10 minutos, se filtró y se lavó con una solución fría de MeOH:H₂O (1:1) y se secó al vacío por una noche. El producto se colocó en un matraz bola de 500 mL, se adaptó un refrigerante y se calentó hasta la descomposición térmica. El producto se purificó por cromatografía en columna (Heptano como fase móvil). Se obtienen 560 mg de un líquido naranja que solidificó al enfriar, únicamente se logró un 10 % de rendimiento. **RMN ¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ 8.36 (dd, *J* = 6.3, 2.7 Hz, 1H), 8.19 (ddd, *J* = 9.0, 4.1, 2.8 Hz, 1H), 7.32 (dt, *J* = 11.8, 5.9 Hz, 1H).

2-*tert*butoxicarbonil-5-(2-cloro-4-nitrofenil)-2,5-(1*S*, 4*S*)diazabicyclo[2.2.1]heptano (**9**)

En un matraz bola de 50 mL se mezclaron 3.96 g (19.93 mmol) del compuesto **8**, 3.5 g (19.93 mmol) del compuesto **7**, 3 g de K_2CO_3 y 20 mL de DMF; la mezcla se calentó a 120 °C con agitación magnética por una noche y se confirmó el fin de la reacción por CCF (heptano). Se evaporó en el rotavapor, se adicionaron 20 mL

de DCM, se lavó dos veces con 30 mL de agua y una con 30 mL de salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó hasta sequedad. Se recrystalizó de 20 partes de AcOEt. Se obtuvieron 5.12 g de un sólido amarillo con punto de fusión de 199.7 °C, 72.4 % de rendimiento. **RMN** 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.17 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.64 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.78 (d, $J = 40.79$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 69.61$ Hz, 1H), 4.01 (dd, $J = 23.0$, 9.2 Hz, 1H), 3.61 (dd, $J = 44.0$, 9.9 Hz, 1H), 3.45 (m, 2H), 1.99 (d, $J = 11.5$ Hz, 2H), 1.44 (d, $J = 12.2$ Hz, 9H). **RMN** ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 154.13, 149.54, 138.50, 128.37, 123.72, 118.61, 114.33, 80.15, 60.39, 59.85, 56.52, 52.19, 37.13, 28.44. **EMIE** (70eV) m/z (% ar): 353 (10) M^+ , 337 (<5) M^+ , 280 (22) M^+ , 252 (20) M^+ , 252 (18) M^+ , 223 (56) M^+ , 183 (12) M^+ ,

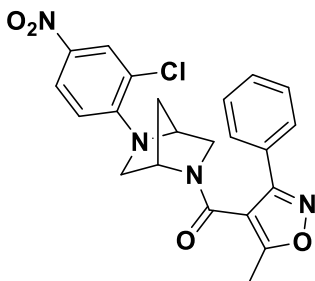
(1*S*,4*S*)-2-(2-cloro-4-nitrofenil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (**10**)

Se disolvieron 5 g (14.16 mmol) del compuesto **9** en un matraz bola de 50 mL, con 30 mL de DCM y se adicionaron 5 mL de $MeSO_3H$. Se determinó por CCF (MTBE) que la reacción terminó en 5 minutos. A la mezcla de reacción se le adiciono solución saturada de Na_2CO_3 , se filtró

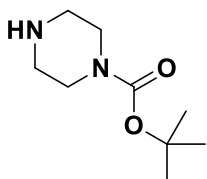
sobre celita, se separaron fases, la fase acuosa se volvió a extraer con 30 mL de DCM, las fases orgánicas se mezclaron, se lavaron con 30 mL de agua, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a sequedad obteniendo 3.2 g de un sólido amarillo con punto de fusión de 154.5 °C, 86.3 % de rendimiento. **RMN** 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.19 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.98 (dd, $J = 9.3$, 2.5 Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 4.66 (s, 1H), 4.09 (dd, $J = 9.7$, 1.6 Hz, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.35 – 3.21 (m, 2H), 3.16 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 1.96 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H),

1.89 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 1.55 (s, 1H). **RMN** ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 148.79, 137.08, 127.36, 122.62, 117.52, 113.27, 61.64, 59.25, 55.27, 49.74, 36.16.

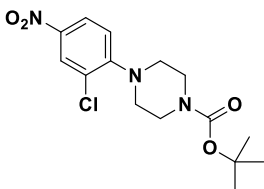
5-(2-cloro-4-nitrofenil)-(1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-il)(5-metil-3-fenilisoxazol-4-il)metanona (**4**)



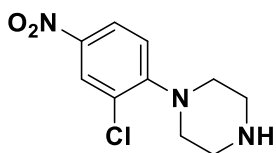
En un matraz bola de 100 mL se colocaron 2.4 g (12 mmol) del compuesto **11**, con 30 mL de DCM seco y se adicionaron 3.5 mL de TEA, se enfrió entre 0 y 5 °C, se adicionaron 1.54 mL de PivCl y se agitó durante 30 min. Se confirmó Por CCF (MTBE-Heptano, 2:1 que todo el ácido carboxílico **11** reaccionó, diluyendo 20 μL de la mezcla de reacción en 100 μL de *i*-PrOH y revelando con verde de bromocresol en MeOH. Se adicionaron 3 g (12 mmol) de la amina **10** en estado sólido y se agitó durante 30 minutos confirmado por CCF fin de la reacción. Se adicionó agua, se separaron las fases y se extrajo con 30 mL de DCM, la fase orgánica se lavó con 30 mL de agua, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se evaporó hasta sequedad y se recristalizó de AcOEt obteniendo 1.3 g de un sólido amarillo con punto de fusión de 174.5 °C, 25 % de rendimiento. **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.14 (dd, $J = 17.7, 2.3$ Hz, 1H), 7.90 (ddd, $J = 72.9, 9.2, 2.2$ Hz, 1H), 7.63-7.06 (m, 5H), 6.42 (dd, $J = 130.4, 9.2$ Hz, 1H), 5.15 (s, 1H), 4.63 (d, $J = 86.1$ Hz, 1H), 4.14 – 3.98 (m, 1H), 3.65 (ddd, $J = 89.2, 64.7, 10.8$ Hz, 2H), 3.11 (dd, $J = 39.3, 9.8$ Hz, 1H), 2.53 (d, $J = 19.9$ Hz, 3H), 1.69 (s, 2H). **RMN** ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 170.04, 161.57, 159.67, 148.97, 138.92, 130.30, 128.91, 128.22, 127.92, 126.83, 123.54, 118.93, 114.23, 111.65, 59.31, 59.01, 60.17 – 55.03, 52.29, 36.77, 11.81. **EMIE** (70eV) m/z (% ar): 438 (<5%) M^+ , 408 (<5%) M^+ , 223 (100) M^+ , 216 (42) M^+ , 144 (38) M^+

1-tertbutoxicarbonilpiperazina (16)

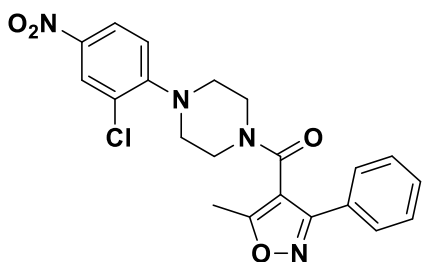
En un matraz bola de 1 L se colocaron 5 g (58 mmol) de piperazina y se disolvieron en 560 mL de agua, se adicionaron 3.14 g de ácido acético y se agitó durante 15 minutos. Se enfrió en un entre -8 y -5 °C y se adicionó por goteo lento (en aproximadamente 45 minutos) una solución de 10.43 g de Boc₂O en 45 mL de MeOH. Posteriormente, se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 5.5 con HCl al 10 % con ayuda de un potenciómetro calibrado y se extrajo con DCM (2 X 25 mL) para eliminar el intermediario disustituido (se confirmó por CCF), posteriormente el pH se ajustó a 9.5 con NaOH al 10%. El producto deseado se aisló por extracción con DCM (2 x 50 mL), las fracciones orgánicas se mezclaron y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se concentró hasta sequedad se obtienen 9.3 g de un sólido blanco, 87 % de rendimiento.

1-tertbutoxicarbonil-4-(2-cloro-4-nitrofenil)piperazina (17)

En un matraz bola de 25 mL se mezclaron 821.58 mg (4.68 mmol) del compuesto **7**, 795 mg (4.26 mmol) del compuesto **16** y 1.5 g de K₂CO₃ anhidro, se calentó a 120 °C por una noche con agitación magnética y bajo atmósfera de nitrógeno. Se confirmó fin de reacción por CCF (heptano-MTBE, 2:1). Se adicionaron 15 mL de DCM, se agitó durante 15 minutos y se filtró sobre celita. El filtrado se lavó con 20 mL de agua y 20 mL de salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó hasta sequedad, obteniendo 1.56 g de una mezcla que se calentó a reflujo con 4 mL de AcOEt, se enfrió lentamente hasta 0-5 °C y se filtró. Se obtuvieron 1.36 g de un sólido amarillo con punto de fusión de 148.6 °C, 93.7 % de rendimiento.

1-(2-cloro-4-nitrofenil)piperazina (**15**)

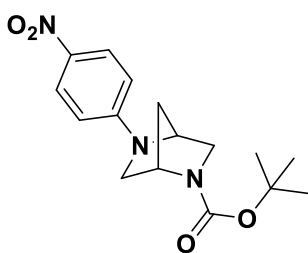
Se disolvieron 1.36 g (3.99 mmol) del compuesto **17** en un matraz bola de 50 mL con 20 mL de DCM y se adicionaron 1.42 mL de MeSO₃H. La reacción terminó en 5 minutos, se determinó por CCF (MTBE). A la mezcla de reacción se le adicionó solución saturada de NaHCO₃, se separaron fases, la fase acuosa se extrajo con DCM (2 X 10 mL) las fases orgánicas se mezclaron, se lavaron con 20 mL de salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró hasta sequedad obteniendo 961 mg de un sólido amarillo, rendimiento cuantitativo.

Nucleozina (**1**)

En un matraz bola de 50 mL se colocaron 961 mg (3.97 mmol) del compuesto **15**, 806.96 mg (3.97 mmol) del compuesto **11** y 10 mg de DMAP, se disolvieron en 20 mL de DCM seco. Se adicionó lentamente (45 minutos) una solución de 899.6 mg (4.36 mmol) de DCC en DCM seco, y se dejó en agitación por una noche. Se confirmó el fin de la reacción por CCF (MTBE-Heptano, 2:1 v/v). Se filtró sobre celita, y el filtrado se lavó con 30 mL de agua y 30 mL de salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó hasta sequedad obteniendo 1.9 g de producto crudo, el cual se disolvió en 45 mL de acetona caliente, se agregó carbón activado, se filtró en caliente sobre 2 g de sílica gel, el filtrado se concentró hasta un volumen aproximado de 10 mL, se enfrió entre 0 y 5 °C y se filtró, obteniendo 1.25 g de un sólido amarillo con un punto de fusión de 174.5 °C, 75.3 % de rendimiento. **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.05 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 7.70 – 7.62 (m, 2H), 7.52 – 7.45 (m, 3H), 6.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 3.12 (s, 2H), 2.54 (d, *J* = 3.5 Hz, 5H). **RMN** ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 169.98, 162.56, 159.96, 153.90, 142.79, 130.38, 129.10 (2C), 128.36, 128.00, 127.86 (2C), 126.54, 123.38, 119.55, 110.94, 50.14 (2C), 46.87, 41.85,

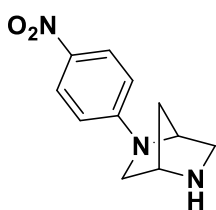
11.83. **EMIE** (70eV) m/z (% ar): 426 (42) M^+ , 411 (10) M^+ , 391 (5) M^+ , 240(23) M^+ , 211 (100) M^+ , 186 (60) M^+ , 144 (97) M^+ .

2-*tert*butoxicarbonil-5-(4-nitrofenil)-2,5-(1*S*,4*S*)diazabíciclo[2.2.1]heptano (**19**)



En un matraz bola de 25 mL se colocaron 932 mg (4.69 mmol) de *N*-BocDBH (**8**), 662.8 mg (4.69 mmol) del compuesto **18** y 1.29 g de K_2CO_3 , se adicionaron 10 mL de DMF y se calentó a 120°C por 2 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Se confirmó el fin de la reacción por CCF (MTBE - Heptano; 3:1 v/v). Se concentró hasta sequedad al vacío, el residuo se disolvió con 10 mL de DCM, se filtró sobre celita, se concentró a sequedad y se recristalizó de AcOEt. Se obtuvieron 735 mg de un sólido amarillo con punto de fusión de 200.3 °C, 49.3 % de rendimiento. **RMN 1H** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.11 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.49 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 C-H), 4.64 (d, $J = 65.8$ Hz, 1H), 4.53 (s, 1H), 3.59 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.36 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 3.51 – 3.23 (m, 2H), 2.00 (s, 2H), 1.44 (d, $J = 24.2$ Hz, 9H). **RMN ^{13}C** (125 MHz, $CDCl_3$) δ 152.97, 150.03, 136.42, 125.38, 109.64, 79.16, 56.60, 55.91, 55.33, 51.27, 36.47, 27.37.

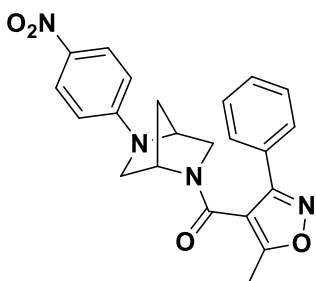
2-(4-nitrofenil)-2,5-(1*S*,4*S*)diazabíciclo[2.2.1]heptano (**20**)



Se disolvieron 735.3 mg (2.3 mmol) del compuesto **19** en un matraz de 50 mL en 10 mL de DCM y se adicionaron lentamente 840 μ L de $MeSO_3H$. Se determinó por CCF (MTBE) el fin de la reacción en 5 minutos. Se adicionó solución saturada Na_2CO_3 , hasta un pH > 8 se extrajo con DCM (2 X 10 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó hasta sequedad. Se obtuvieron 523 mg de un sólido amarillo con punto de fusión de 150.4 °C, 99 % de rendimiento. **RMN 1H** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.06 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.43 (s, 1H), 3.87 (s, 1H), 3.63 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.10 (t, $J = 15.1$ Hz, 1H), 3.03 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 1.98 – 1.91 (m, 1H),

1.88 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 1.59 (s, 1H). **RMN** ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 146.47, 132.06, 121.61, 105.76, 54.59, 52.90, 51.38, 46.12, 32.85.

(5-(4-nitrofenil)-(1S,4S)-2,5-diazabíciclo[2.2.1]heptan-2-il)(5-metil-3-fenilisoxazol-4-il)metanona (**5**)



En un matraz bola de 25 mL se colocaron 368.5 mg (1.69 mmol) del compuesto **20**, 343.4 mg (1.69 mmol) del ácido isoxazólico **11** y 4 mg de DMAP, se disolvieron en 10 mL de DCM seco. Se adicionó lentamente una solución de 383.6 mg de DCC en 10 mL de DCM seco, y se mantuvo con agitación por una noche. Se determinó el fin de la reacción por CCF (MTBE). Se filtró sobre celita, se concentró hasta sequedad. Se purificó por cromatografía en columna con 20 partes de sílica gel (MTBE). Se obtuvieron 400 mg de un sólido amarillo con punto de fusión de 196.2 °C, 73.23 % de rendimiento. **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.98 (dd, $J = 23.7, 9.0$ Hz, 1H), 7.68 – 7.27 (m, 3H), 7.10 (dt, $J = 38.5, 7.4$ Hz, 2H), 6.21 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.78 (d, $J = 324.2$ Hz, 1H), 4.41 – 3.90 (m, 1H), 3.80 – 2.78 (m, 2H), 2.43 (d, $J = 35.6$ Hz, 2H), 2.12 – 1.67 (m, 1H). **RMN** ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 170.10, 161.66, 159.64, 150.69, 137.89, 130.26, 129.03, 128.29, 127.28, 126.21, 111.68, 110.75, 58.26, 56.46, 55.79, 52.3, 37.25, 11.80. **EMIE** (70eV) m/z (% ar): 404 (10%) $\text{M}^{+\cdot}$, 388 (<5%) $^{+\cdot}$, 374 (<5) $^{+\cdot}$, 224 (10) M^+ , 216 (36) M^+ , 189 (100) M^+ , 144 (30) M^+ , 77 (10) M^+ .

7. Resultados y análisis de resultados

- Se sintetizaron dos análogos diazabíclicos (**4** y **5**) de nucleozina, así como nucleozina, que se usará como control positivo en las pruebas biológicas.
- Los compuestos se caracterizaron por IR, **RMN** ^1H , **RMN** ^{13}C y/o EMIE. En el anexo se muestran los espectros de las amidas **1**, **4** y **5**.

- Se enviaron los análogos diazabíclicos y la nucleozina a evaluación biológica, en colaboración al Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca en el Estado de Morelos.

- **Tabla 2.** Resultados obtenidos en la síntesis de nucleozina y sus análogos diazabíclicos.

	Nucleozina	1er Análogo	2do Análogo
SNAr			
Rendimiento (%)	93.7	72.4	49.3
Punto de fusión (°C)	148.6	199.7	200.3
PM (g/mol)	341	353	319
Desprotección			
Rendimiento (%)	Cuantitativo	86.3	Cuantitativo
Punto de fusión (°C)	No se determinó	154.5	150.4
PM (g/mol)	241	253	219
Síntesis de la amida			
Rendimiento (%)	75.3	25	72.2
Punto de fusión (°C)	174.5	184.7	196.2
PM (g/mol)	426	438	404
Rendimiento global (%)	69	15.5	35
Enviado a evaluación	500 mg	400 mg	400 mg

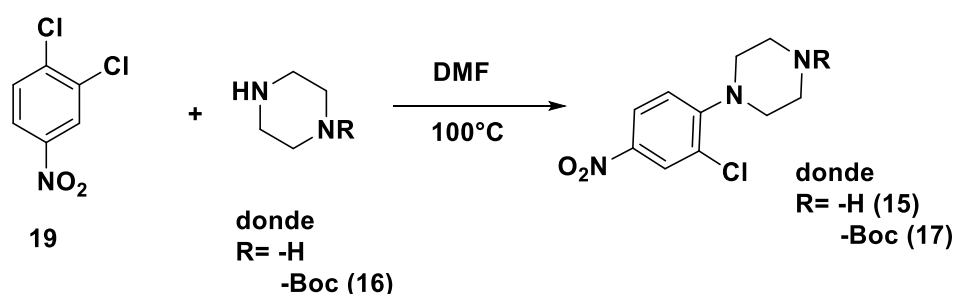
En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la síntesis de nucleozina y sus derivados diazabíclicos. Se observó que los mejores rendimientos se obtuvieron en la desprotección del grupo *N*-Boc.

Reacción de Sandmeyer

A pesar de obtener bajos rendimientos en la reacción de Sandmeyer esta reacción sirvió para obtener el análogo diazabíclico (**4**) y nucleozina (**1**) en microescala. Una vez caracterizados los compuestos finales por RMN-¹H se adquirió comercialmente el compuesto **7** a Sigma-Aldrich.

Reacción de SNAr

El principal problema fue en la obtención del compuesto **15**. Las condiciones reportadas no fueron reproducibles. Las reacciones donde se utilizó al compuesto **19** como materia prima (Esquema 8) no dieron resultados favorables, observando varios productos de reacción por CCF.



Esquema 8. Reacción de SNAr con el compuesto **19**.

Una vez obtenida y caracterizada la nucleozina, se volvió a repetir la reacción con el compuesto **14** y se comparó por CCF con el compuesto **17**, observando algo similar a lo mostrado en la Figura 7 donde es evidente que la formación del compuesto **17** es muy escasa.

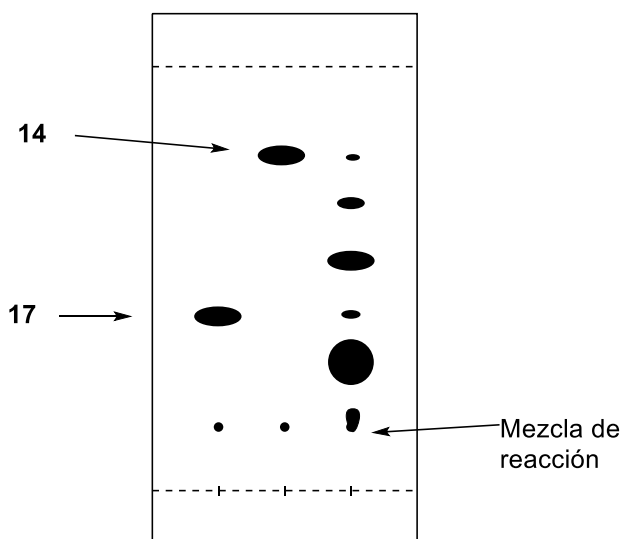
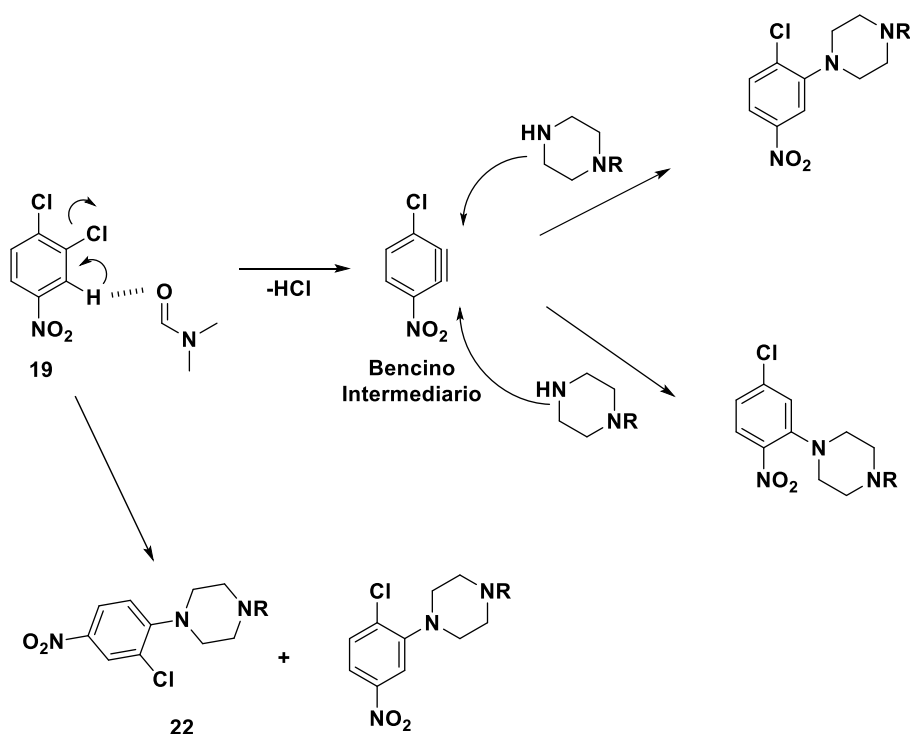


Figura 7. CCF de la reacción de SNAr con el compuesto **14** comparada contra el compuesto **17**.

Es probable que durante la reacción se forme un bencino intermediario, el cual es susceptible de ser atacado por el nucleófilo como se muestra en el Esquema 9. Por ello se decidió utilizar al compuesto **7** como materia prima para obtener las *N*-Boc-*N*-arilaminas **9**, **17** y **19**.

Después en lotes posteriores de 4 mmol se quiso reproducir la metodología desarrollada con DMF para obtener el compuesto **17** pero se observó que la mezcla de los compuestos **7** y **16** se tornaba de un color amarillo similar al del producto, por lo que se decidió no emplear DMF y realizar la reacción sin disolvente. La reacción no terminó pero la mayoría de la materia prima se consumió, una recristalización con dos volúmenes de AcOEt por gramo de mezcla fue suficiente para purificar el compuesto **17**.



Esquema 9. Formación del bencino intermediario en la reacción de SNAr con el compuesto 19.

Remoción del grupo N-Boc

No se encontraron problemas para la desprotección de las *N*-Boc-*N*-arilaminas 9, 17 y 19; con 5.5 eq. de MeSO₃H en DCM la reacción terminó en 5 minutos.

Purificación de los carbamatos.

En cuanto a la purificación de los compuestos, la recristalización de las *N*-Boc-*N*-arilaminas 9, 17 y 19 que provienen de la reacción de SNAr permitió obtener compuestos puros pero con muy bajos rendimientos debido a sus bajas solubilidades en disolventes como AcOEt, acetona, MTBE, EtOH o *i*-PrOH por lo que se usaban hasta 20 volúmenes de disolvente para recristalizar. Los compuestos anteriormente mencionados son bastantes solubles en disolventes como DMSO, DMF y CH₂Cl₂, pero no se pudo recristalizar en estos disolventes. Experimentos posteriores demostraron que colocar la mezcla a reflujo durante 30 minutos con 2 volúmenes de AcOEt (en suspensión) y la posterior filtración en frío, fue suficiente

para purificar las *N*-Boc-*N*-arilaminas **9**, **17** y **19**. La desprotección del grupo *N*-Boc produjo un solo producto, por lo que no fue necesario purificar hasta la formación de la amida.

Purificación de amidas finales

La purificación de las amidas finales por cromatografía en columna fue lenta, lo que promovió su descomposición (observaciones en CCF); una vez descompuestas las amidas se logró purificar por recristalización de acetona o AcOEt. Las amidas **1**, **4** y **5** son muy poco solubles en agua (< 5 μ M) y disolventes orgánicos como alcoholes, MTBE, AcOEt, acetona o heptano, pero son muy solubles en DCM y DMSO (soluble en dos volúmenes), aunque es bastante complicado recristalizar en estos disolventes. Fue necesario agregar al menos 30 mL de disolvente caliente (acetona o AcOEt) por cada gramo de amida. Una vez obtenido el sólido, este se filtraba pero se obtuvieron bajos rendimientos como el caso del segundo análogo.

Para mejorar el rendimiento de la recristalización, la nucleozina (**1**) se disolvió en acetona caliente, se trató con carbón activado, se filtró y se concentró a vacío hasta aproximadamente una sexta parte del volumen original, conforme se evapora el disolvente un sólido amarillo se comienza a formar. Se dejó con agitación a reflujo 10 minutos, se enfrió y se filtró al vacío obteniendo un producto puro con un rendimiento de recristalización de 80 %.

Formación de sales de amonio

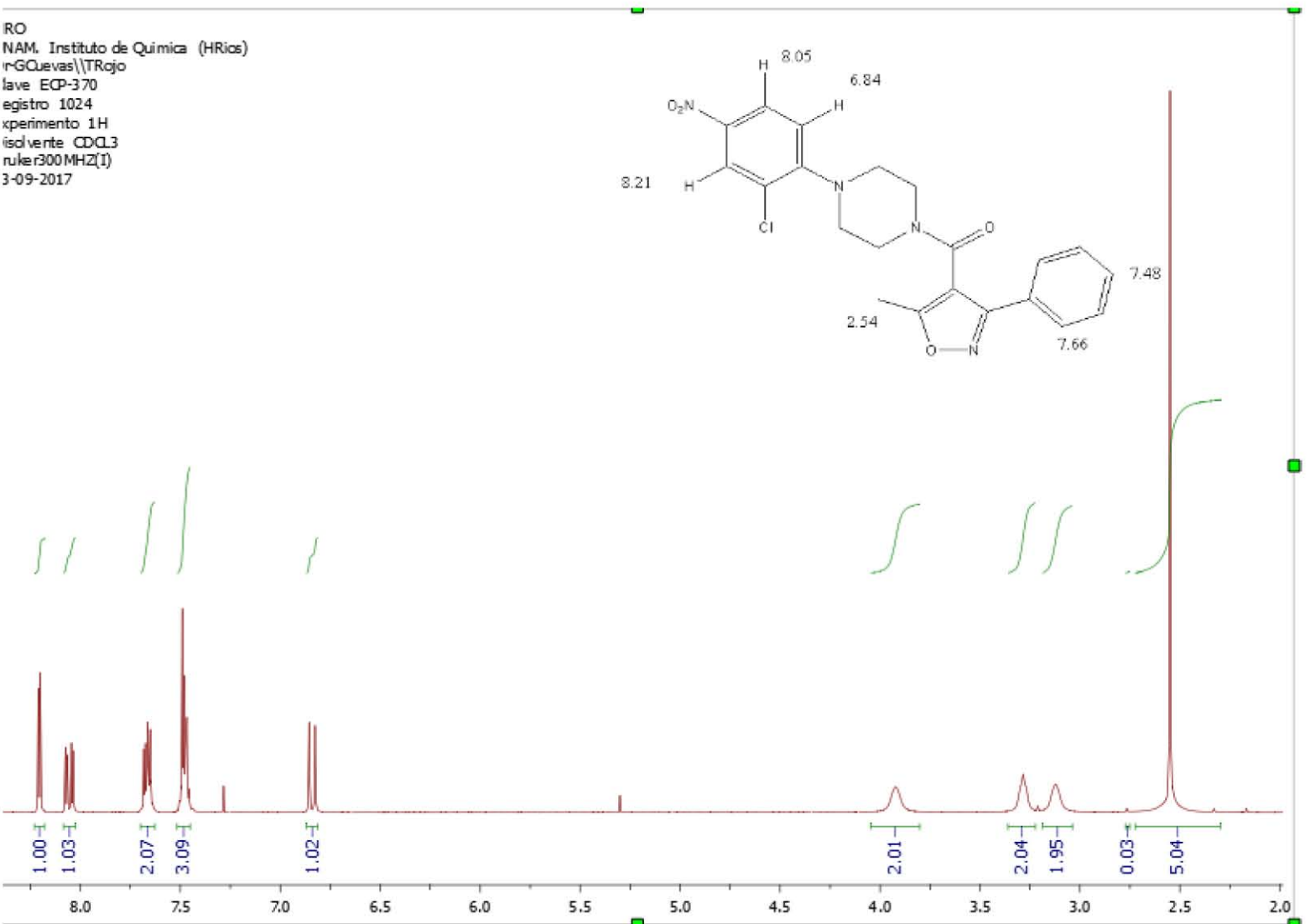
Para mejorar la solubilidad en agua de la amida **4** se intentó formar la sal de amonio derivada de la amina terciaria, por lo que se intentó formar con HCl (30%), H₂SO₄ concentrado y CH₃SO₃H sin obtener reacción. Por ello se diseñó el segundo análogo, basándonos en la hipótesis de que la eliminación de un átomo de cloro aumentaría la basicidad de la amina terciaria y sería posible formar la sal de amonio, pero lamentablemente se obtuvieron los mismo resultados que con el primer análogo.

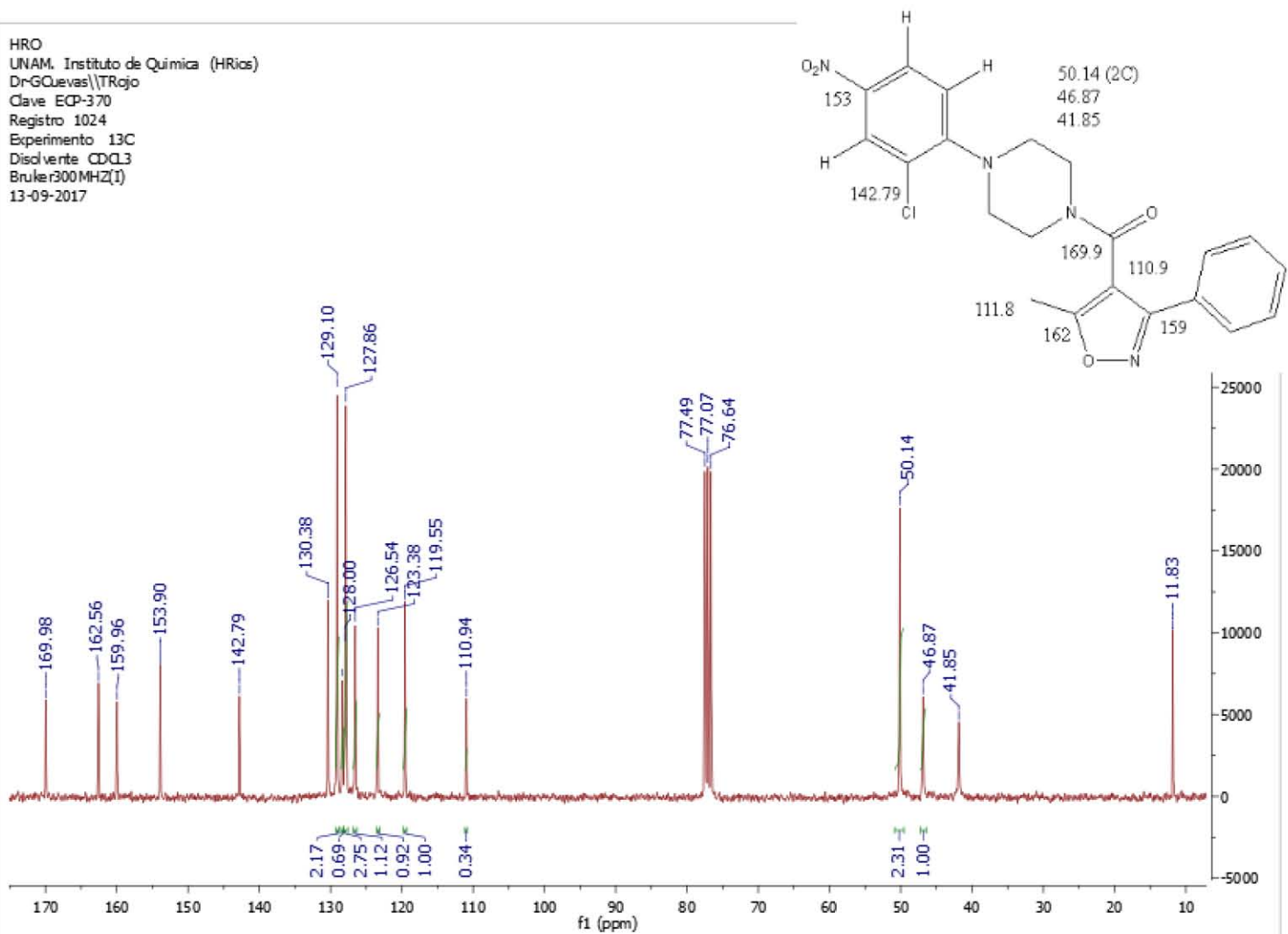
La caracterización espectroscópica proporcionó la evidencia de la identidad de los análogos diazabíclicos y concuerda con lo reportado en la literatura para el caso de la nucleozina.

8. Conclusiones

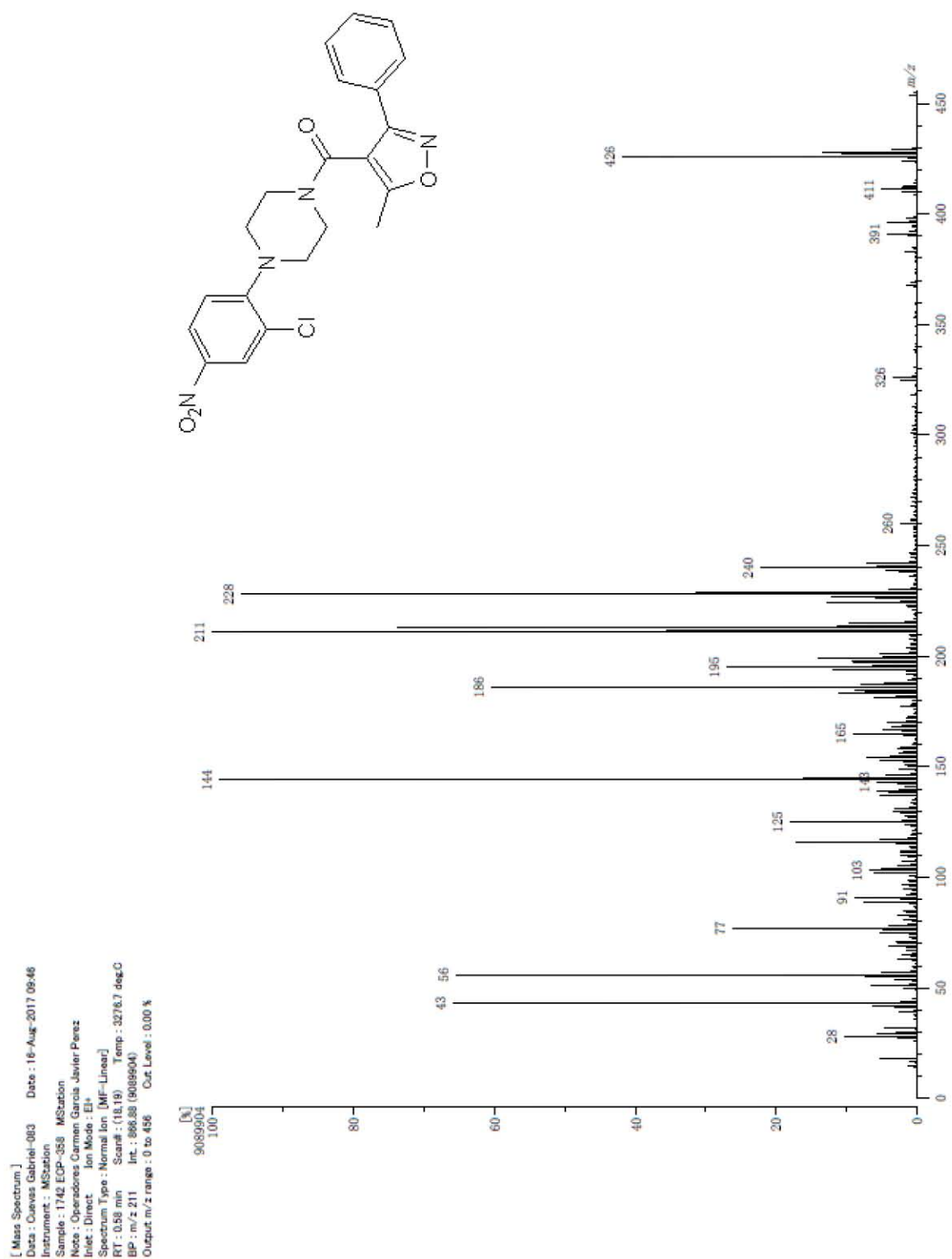
- Se logró la síntesis de dos análogos diazabíclicos (4 y 5) de nucleozina, así como de Nucleozina que se usará como control positivo en la evaluación biológica.
- Los compuestos antes mencionados, y algunos de sus intermediarios, se caracterizaron por RMN ^1H , RMN ^{13}C y EMIE.
- Los análogos diazabíclicos se encuentran en evaluación biológica, en colaboración con el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca y la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

9. Anexo

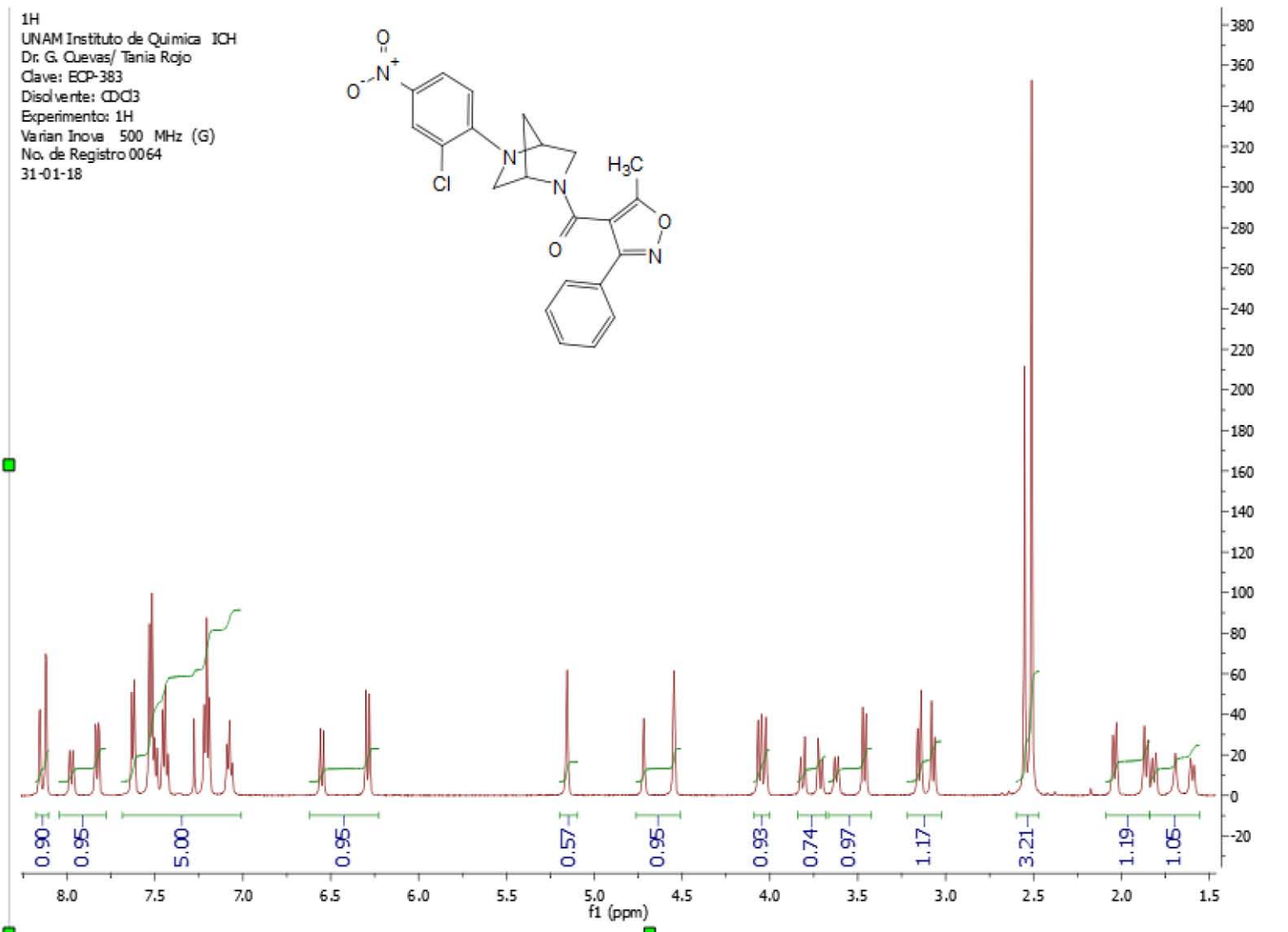




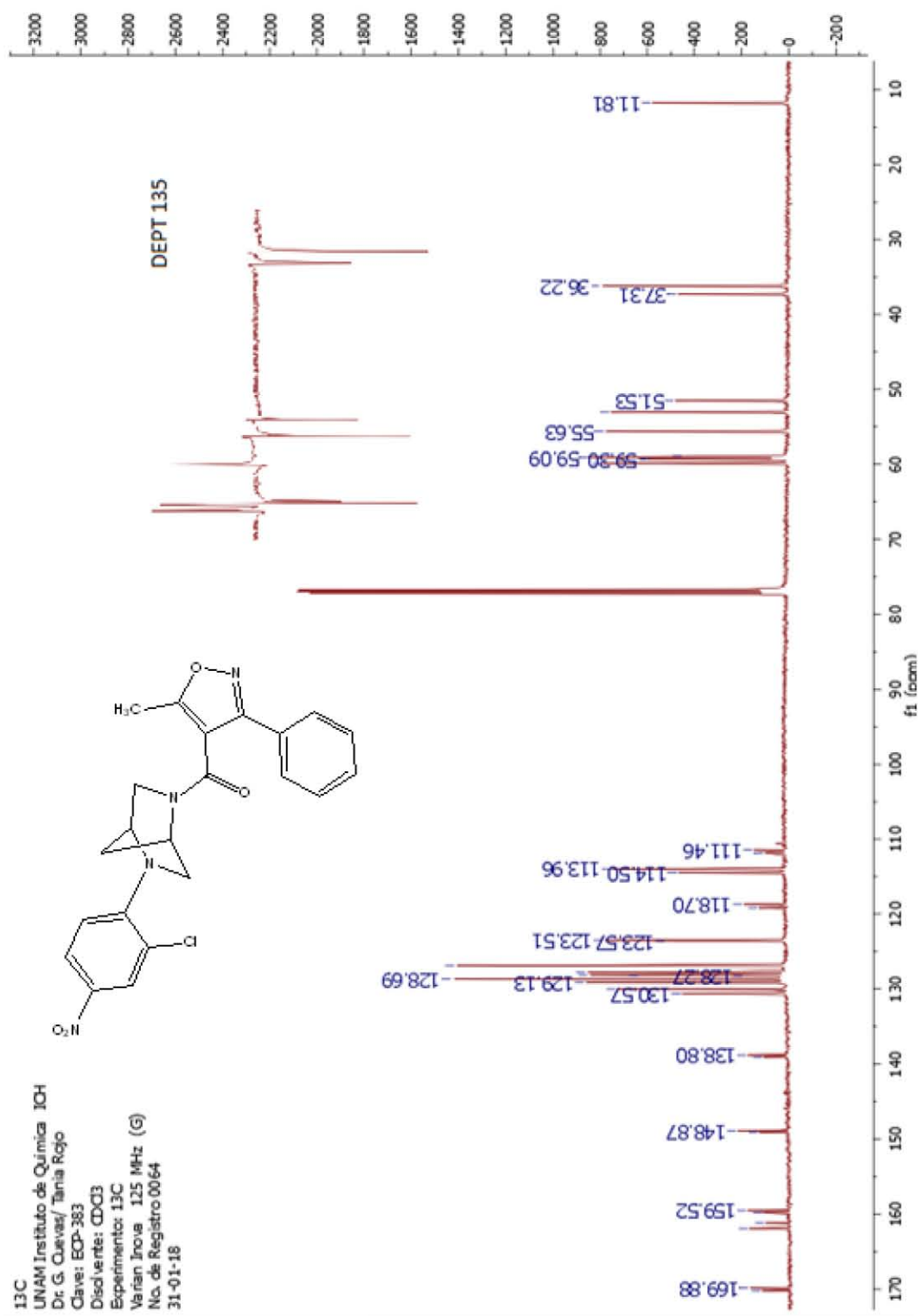
Espectro 2. Espectro de RMN ¹³C a 125 MHz de la nucleosina (1).



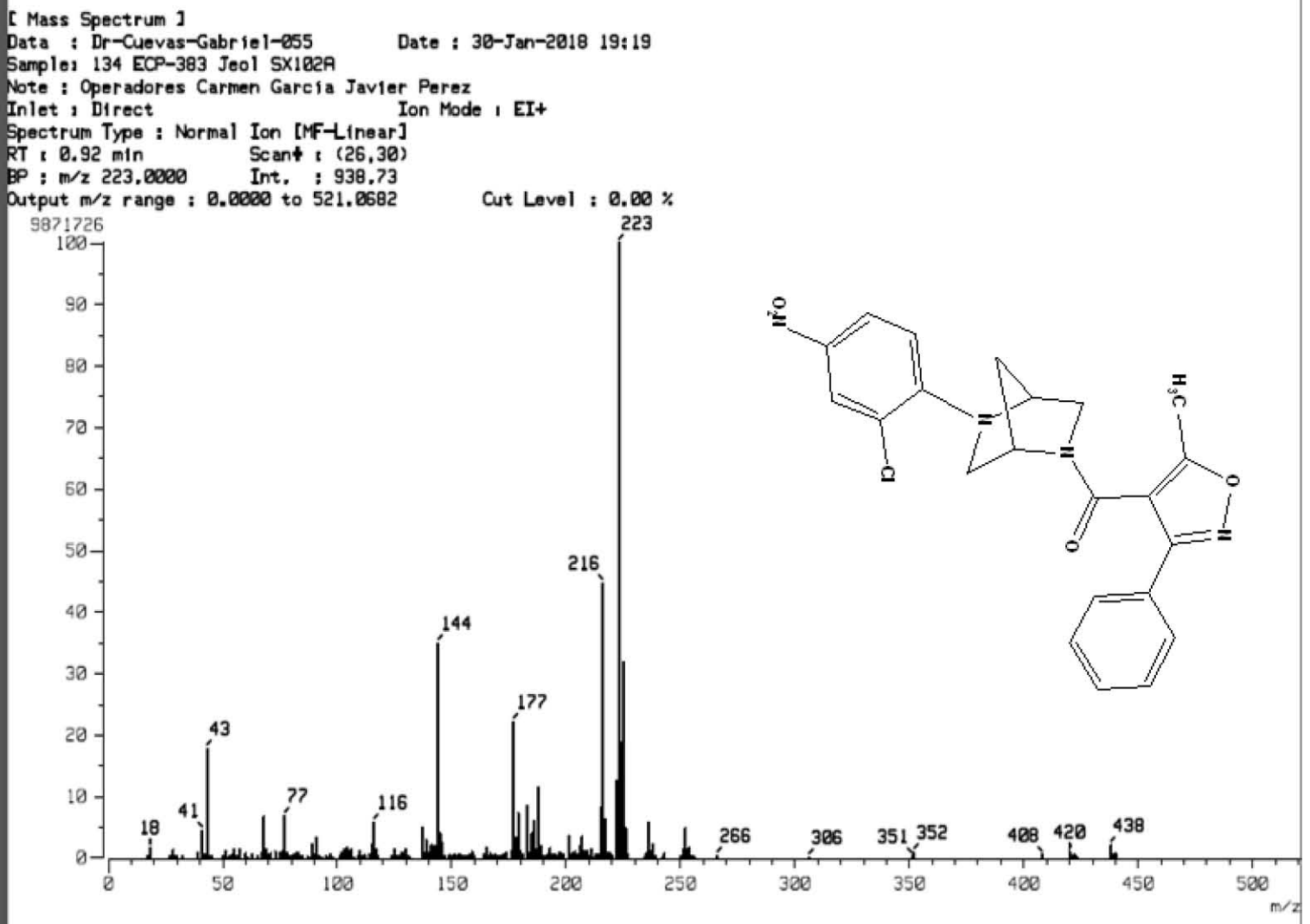
Espectro 3. Espectro de masas de nucleosina (1). Técnica de ionización: impacto electrónico (70 eV).



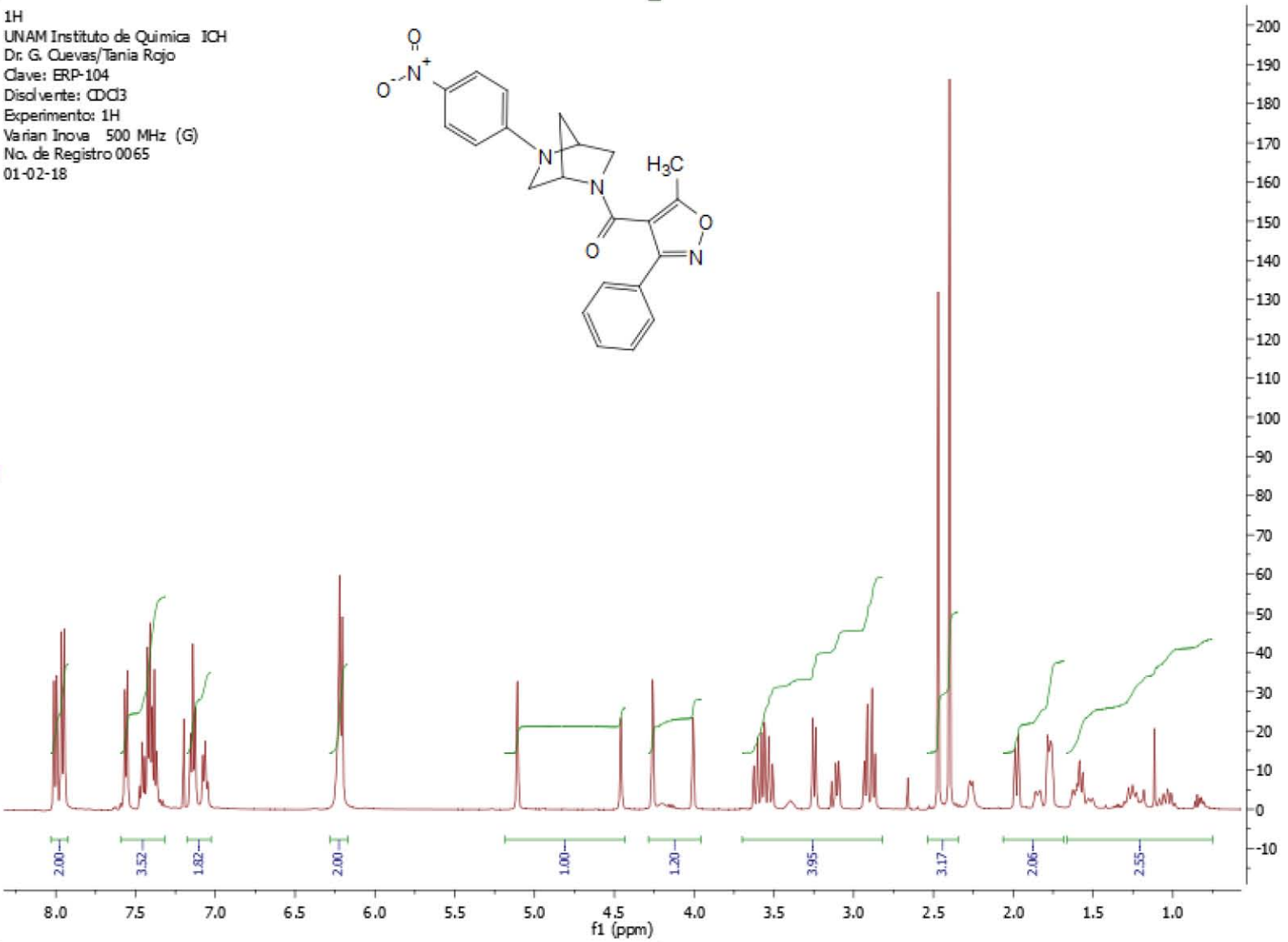
Espectro 4. Espectro de RMN ¹H a 500 MHz del análogo diazabíclico de nucleosina 4.

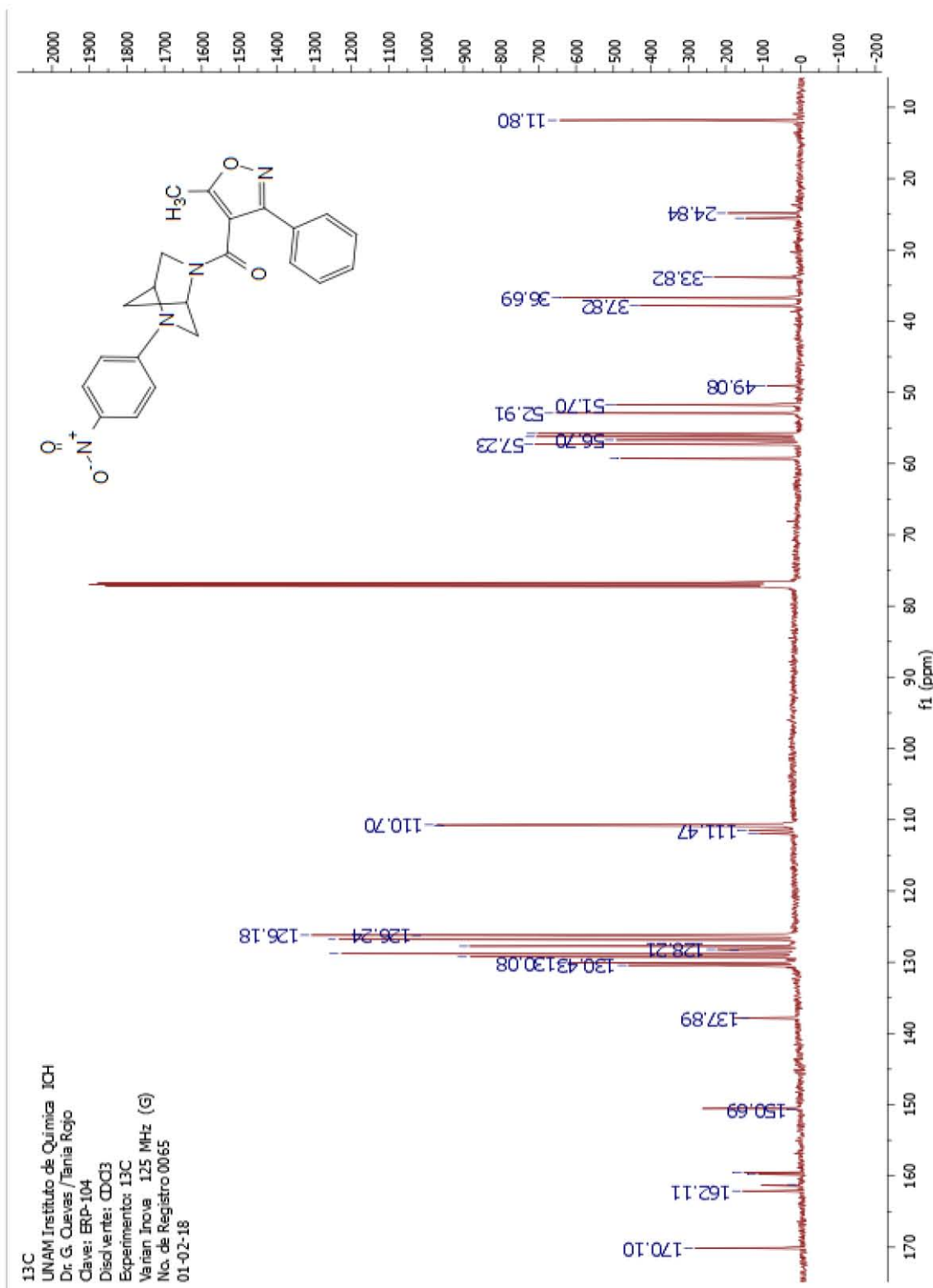


Espectro 5. Espectro de RMN ¹³C a 125 MHz del análogo diazabicclico de nucleozina **4**.

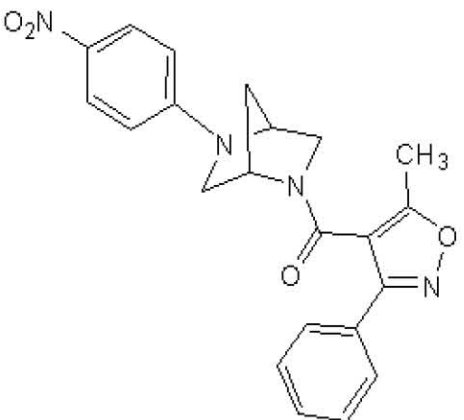


Espectro 6. Espectro de masas del análogo diazabíclico de nucleosina **4**. Técnica de ionización: Impacto electrónico (70 eV).

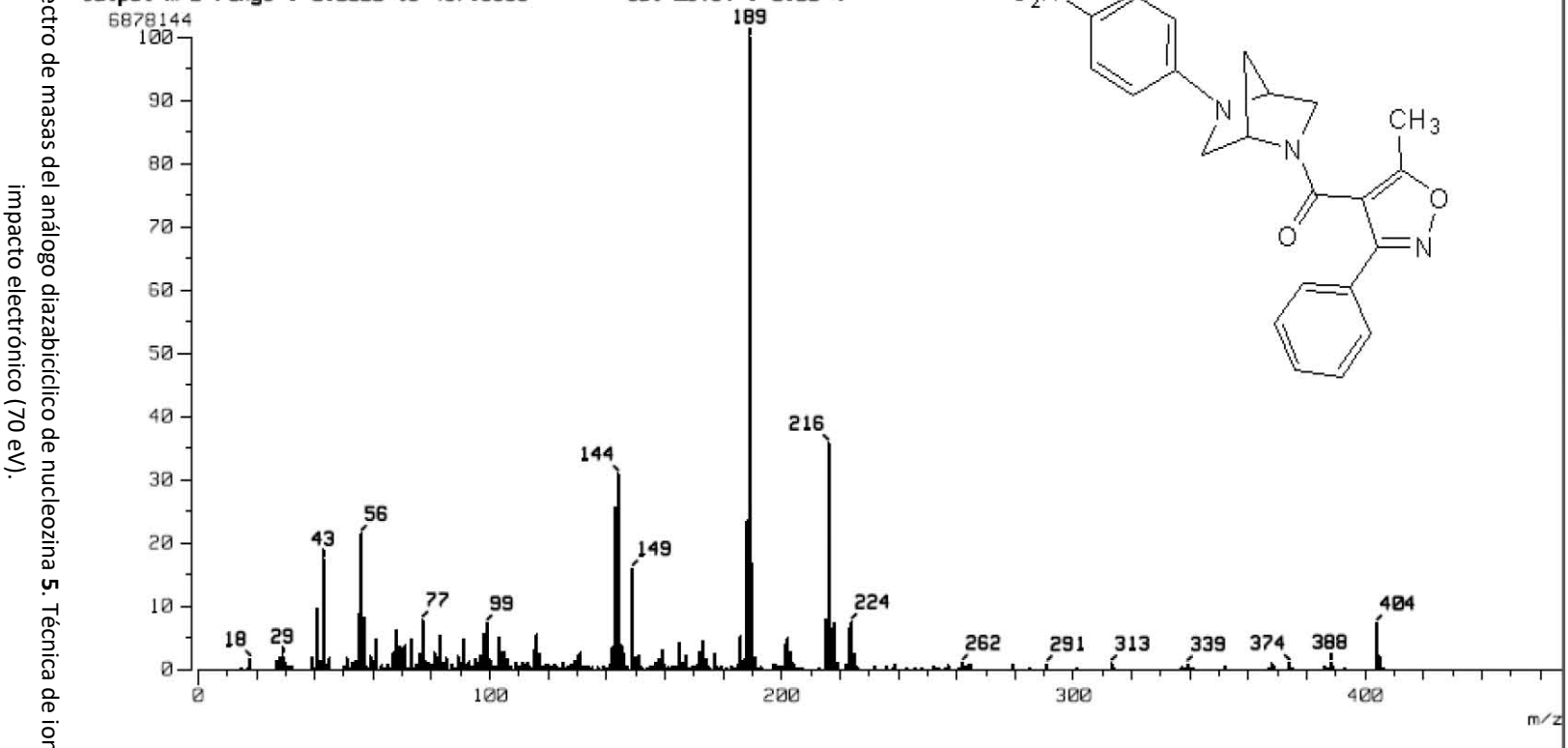




Espectro 8. Espectro de RMN ¹³C a 125 MHz del análogo diazabicclico de nucleozina 5.



[Mass Spectrum]
 Data : Dr-Cuevas-Gabriel-056 Date : 30-Jan-2018 19:23
 Sample: 135 ERP-104 Jeol SX102A
 Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.48 min Scan# : (12,18)
 BP : m/z 189.0000 Int. : 655.95
 Output m/z range : 0.0000 to 467.6558
 Cut Level : 0.00 %



Espectro 9. Espectro de masas del análogo diazabíclico de nucleosina **5**. Técnica de ionización: impacto electrónico (70 eV).

10. Referencias

- ¹ Kao, R. Y.; Yang, D.; Lau, L. S.; Tsui, W. H. W.; Hu, L.; Dai, J.; Chan, M. P.; Chan, C. M.; Wang, P.; Zheng, B. J.; Sun, J.; Huang, J. D.; Madar, J.; Chen, G.; Chen, H.; Guan, Y.; Yuen, K. Y. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28* (6), 600–605.
- ² Su, C. Y.; Cheng, T. J.; Lin, M. I.; Wang, S. Y.; Huang, W. I.; Lin-Chu, S. Y.; Chen, Y. H.; Wu, C. Y.; Lai, M. M.; Cheng, W. C.; Wu, Y. T.; Tsai, M. D.; Cheng, Y. S.; Wong, C. H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107* (45), 19151–19156.
- ³ Boltz, D. A.; Aldridge, J. R.; Webster, R. G.; Govorkova, E. A. *Drugs* **2010**, *70* (11), 1349–1362.
- ⁴ Solórzano Santos, F.; Miranda-Navales, G. *Bol Med Hosp Infant Mex* **2009**, *66*, 461–473.
- ⁵ López-Cervantes, M. *Rev. Digit. Univ.* **2010**, *11* (64), 1–19.
- ⁶ Perez-Padilla, R.; de la Rosa-Zamboni, D.; Ponce de Leon, S.; Hernandez, M.; Quiñones-Falconi, F.; Bautista, E.; Ramirez-Venegas, A.; Rojas-Serrano, J.; Ormsby, C. E.; Corrales, A.; Higuera, A.; Mondragon, E.; Cordova-Villalobos, J. A. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361* (7), 680–689.
- ⁷ Cianci, C.; Gerritz, S. W.; Deminie, C.; Krystal, M. *Antivir. Chem. Chemother.* **2013**, *23* (3), 77–91.
- ⁸ Brooks, G. F.; Butel, J. S.; Carroll, K. C.; Mietzner, T. A.; Morse, S. A. *Jawetz, Melnick Y Adelberg. Microbiología Médica*, 25th ed.; McGraw-Hill: China, 2011.
- ⁹ Martinez, I. Lopéz. INFLUENZA - Recursos en Virología - UNAM
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/influenza.html>.
- ¹⁰ Gao, R.; Cao, B.; Hu, Y.; Feng, Z.; Wang, D.; Hu, W.; Chen, J.; Jie, Z.; Qiu, H.; Xu, K.; Xu, X.; Lu, H.; Zhu, W.; Gao, Z.; Xiang, N.; Shen, Y.; He, Z.; Gu, Y.; Zhang, Z.; Yang, Y.; Zhao, X.; Zhou, L.; Li, X.; Zou, S.; Zhang, Y.; Li, X.; Yang, L.; Guo, J.; Dong, J.; Li, Q.; Dong, L.; Zhu, Y.; Bai, T.; Wang, S.; Hao, P.; Yang, W.; Zhang, Y.; Han, J.; Yu, H.; Li, D.; Gao, G. F.; Wu, G.; Wang, Y.; Yuan, Z.; Shu, Y. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368* (20), 1888–1897.
- ¹¹ Franco-Paredes, C.; del Río, C.; Carrasco, P.; Santos Preciado, J. I. *Salud Publica de Mexico*. D.F. 2009, pp 183–186.
- ¹² Amarelle, L.; Lecuona, E.; Sznajder, J. I. *Arch. Bronconeumol.* **2017**, *53* (1), 19–26.
- ¹³ Pang, B.; Cheung, N. N.; Zhang, W.; Dai, J.; Kao, R. Y.; Zhang, H.; Hao, Q. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29684.
- ¹⁴ Homman M, Kingi N, Bergman J, Engqvist R. Methanethione compounds having antiviral activity. WO2013171334A1.pdf, 2013. p. 45.
- ¹⁵ Kao, Y. R. Antiviral compounds and methods of marking and using there of cross reference to related applications. WO 2011/015037 A1, 2011.
- ¹⁶ Cheng, H.; Wan, J.; Lin, M.-I.; Liu, Y.; Lu, X.; Liu, J.; Xu, Y.; Chen, J.; Tu, Z.; Cheng, Y.-S. E.; Ding, K. J. *Med. Chem.* **2012**, *55* (5), 2144–2153.

- ¹⁷ Gerritz, S. W.; Cianci, C.; Kim, S.; Pearce, B. C.; Deminie, C.; Discotto, L.; McAuliffe, B.; Minassian, B. F.; Shi, S.; Zhu, S.; Zhai, W.; Pendri, A.; Li, G.; Poss, M. A.; Edavettal, S.; McDonnell, P. A.; Lewis, H. A.; Maskos, K.; Mortl, M.; Kiefersauer, R.; Steinbacher, S.; Baldwin, E. T.; Metzler, W.; Bryson, J.; Healy, M. D.; Philip, T.; Zoeckler, M.; Schartman, R.; Sinz, M.; Leyva-Grado, V. H.; Hoffmann, H.-H.; Langley, D. R.; Meanwell, N. A.; Krystal, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (37), 15366–15371.
- ¹⁸ Murineddu, G.; Asproni, B.; Pinna, G.; Curzu, M. M.; Dore, A.; Pau, A.; Deligia, F.; Pinna, G. A. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (31), 5342–5363.
- ¹⁹ Remuzon, P.; Bouzard, D.; Guiol, C.; Jacquet, J. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (15), 2898–2909.
- ²⁰ Sturm, P. A.; Henry, D. W.; Thompson, P.; Zeigler, J.; McCall, J. *J. Med. Chem.* **1974**, *17* (5), 481–487.
- ²¹ López-Ortiz, M.; Monsalvo, I.; Demare, P.; Paredes, C.; Mascher, D.; Hernández, C.; Hernández, M.; Regla, I. *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *83* (6), 710–720.
- ²² Laskar, S.; Sánchez-Sánchez, L.; Flores, S. M.; López-Muñoz, H.; Escobar-Sánchez, M. L.; López-Ortiz, M.; Hernández-Rodríguez, M.; Regla, I. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 621–635.
- ²³ Melgar-Fernández, R.; González-Olvera, R.; Olivares-Romero, J. L.; González-López, V.; Romero-Ponce, L.; Ramírez-Zárate, M. D. R.; Demare, P.; Regla, I.; Juaristi, E. *European J. Org. Chem.* **2008**, No. 4, 655–672.
- ²⁴ Kao, Y. R. Antiviral compounds and methods of marking and using there of cross reference to related applications. WO 2011/015037 A1, 2011.