



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Síntesis de compuestos antivirales contra infecciones
causadas por adenovirus humanos**

**Síntese de compostos antivirais contra infeccións
causadas por adenovirus humanos**

**Synthesis of antiviral compounds against infections
caused by human adenoviruses**

Brais Freire Cundíns

Curso: 2022 - 2023.

Convocatoria: Febrero

Director 1: Jaime Rodríguez González

Director 2: Carlos Jiménez González

Índice

Resumen	1
Resumo	2
Summary.....	3
Abreviaturas, símbolos y acrónimos	4
1- Introducción	7
1.1- Biología del adenovirus.....	7
1.1.1- Estructura del adenovirus	7
1.1.2- Ciclo infectivo del adenovirus	8
1.2- Patología de infecciones por adenovirus humano	11
1.3- Tratamiento de infecciones por adenovirus humano: fármacos antivirales	12
1.3.1 Antivirales de mayor uso: cidofovir, ribavirina, ganciclovir, y la propuesta del brincidofovir	13
1.3.2 Búsqueda de nuevos antivirales.....	15
2- Antecedentes	19
2.1 Aislamiento y actividad biológica de la Ircinialactama J	19
2.2- Síntesis de ircinialactama J	22
3- Objetivos	24
4- Resultados y discusión	26
4.1-Síntesis de 1-(3-metilbutil)pirrolidin-2,5-diona (1)	26
4.2- Síntesis de 5-hidroxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona (2)	29
4.3- Síntesis de 5-etoxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona (3).....	32
4 - Parte experimental.....	38
4.1-Materiales y equipos empleados	38
4.2- Síntesis de 1-(3-metilbutil)pirrolidin-2,5-diona (1)	38
4.3- Síntesis de 5-hidroxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona (2)	39

4.3- Síntesis de 5-etoxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona (3).....	40
5- Conclusiones/Conclusións/ Conclusions	41
Conclusiones.....	41
Conclusións	41
Conclusions	41
6- Bibliografía	42

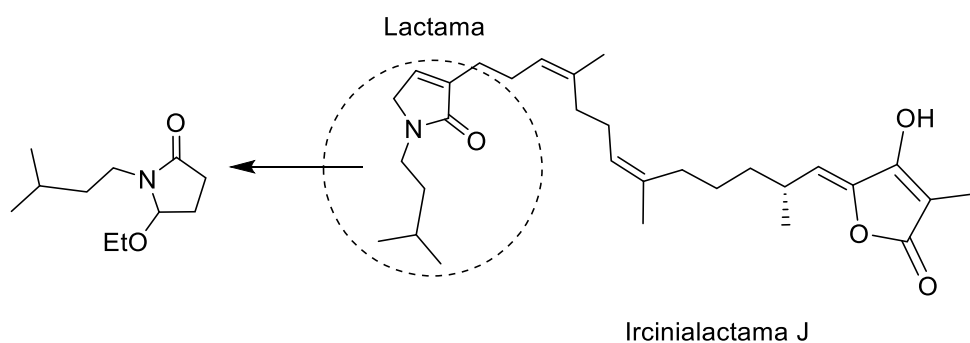
Resumen

El Adenovirus Humano (HAdV) es un virus lítico responsable de numerosas infecciones que afectan a pacientes inmuno-comprometidos (pacientes de trasplante de órgano sólido o médula ósea). Produce síntomas severos que requieren tratamiento con antivirales. Estos incluyen cidofovir, ribavirina y ganciclovir, todos ellos con efectividad dudosa y presentando importantes limitaciones. En el caso del cidofovir, actualmente es considerado estándar en el tratamiento de este tipo de infecciones, su nefrotoxicidad es un gran inconveniente.

Durante las investigaciones realizadas por el grupo QUIMOLMAT-PRONAMAR del CICA se estudió la esponja procedente de la península de Yucatán (México) *Ircinia felix*, de la que se aisló varios compuestos de origen sesterterpénico pertenecientes a la familia de las ircinialactamas. Estudios posteriores de bioactividad confirmaron su potencial como compuestos antivirales, concretamente los compuestos denominados ircinialactamas J y L presentaron unas actividades antivirales frente al virus HAdV5 mejores que el estándar cidofovir. Es por este motivo que, a lo largo de estos últimos años, el grupo de investigación se ha centrado en las síntesis de estos dos compuestos.

Este trabajo de fin de grado se enmarca en la síntesis de uno de los fragmentos de ircinialactama L, la γ -lactama 5-etoxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona, la cual se ha sintetizado en tres etapas a partir de succinimida comercial. En los compuestos sintetizados fueron comprobadas sus estructuras mediante la utilización de espectroscopia de RMN mono y bidimensionales, así como espectrometría de masas. Esta lactama se utilizará en el futuro para la síntesis total de ircinialactama L.

Palabras clave: Adenovirus Humano, Antiviral, cidofovir, *Ircinia felix*, sesterterpeno, ircinialactama L, γ -lactama.



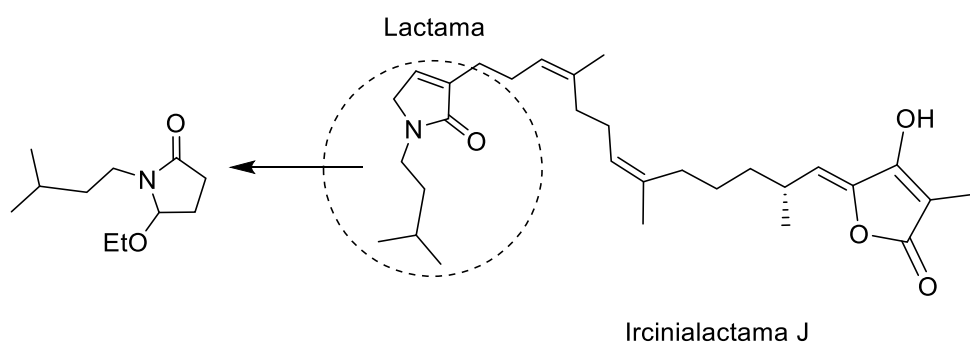
Resumo

O Adenovirus Humán (HAdV) é un virus lítico responsable de numerosas infeccións que afectan pacientes inmuno-comprometidos (pacientes de trasplante de órgano sólido ou médula ósea). Produce síntomas severos que requiren tratamento con antivirais. Estes inclúen cidofovir, ribavirina e ganciclovir, todos eles con efectividade dubidosa e presentando importantes limitacións. No caso do cidofovir, actualmente é considerado estándar no tratamento de diste tipo infeccións, a súa nefrotoxicidade é un grande inconveniente.

Durante as investigacións realizadas polo grupo QUIMOLMAT-PRONAMAR do CICA estudouse a esponxa procedente da península de Yucatán (México) *Ircinia felix*, da que se illaron varios compostos de orixe sesterterpénico pertencentes á familia das ircinialactamas. Estudos posteriores de bioactividade confirmaron o seu potencial como compostos antivirais, concretamente os compostos denominados ircinialactamas J e L presentaron unhas actividades antivirais fronte ao virus HAdV5 mellores que o estándar cidofivir. É por este motivo que o grupo de investigación centrouse nas sínteses destes dous compostos ao longo destes últimos anos.

Este traballo de fin de grao enmárcase na síntese dun dos fragmentos de ircinialactama L, a γ -lactama 5-etoxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona, a cal se foi sintetizada en tres etapas a partir de succinimida comercial. Nos compostos sintetizados foron comprobadas as súas estruturas mediante a utilización de espectroscopia de RMN mono e bidimensionais, así como espectrometría de masas. Esta lactama utilizarase no futuro para a síntese total de ircinialactama L.

Palabras clave: Adenovirus Humán, Antiviral, cidofovir, *Ircinia felix*, sesterterpeno, ircinialactama L, γ -lactama.



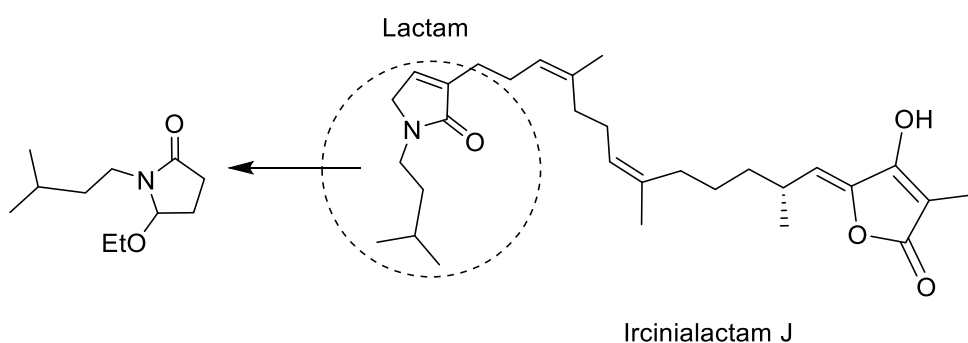
Summary

Human Adenovirus (HAdV) is a lytic virus responsible for numerous infections affecting immunocompromised patients (solid organ or bone marrow transplant patients). It produces severe symptoms that require treatment with antivirals. These include cidofovir, ribavirin and ganciclovir, all of which are of questionable effectiveness and have significant limitations. In the case of cidofovir which is currently considered standard in the treatment of this type of infections, its nephrotoxicity is a major drawback.

During the research carried out by the QUIMOLMAT-PRONAMAR group of the CICA, the sponge from the Yucatan Peninsula (Mexico) *Ircinia felix* was studied, from which several compounds of sesterterpenoid origin belonging to the family of ircinialactams were isolated. Later bioactivity studies confirmed their potential as antiviral compounds, specifically the compounds called ircinialactams J and L presented better antiviral activities against the HAdV5 virus than the standard cidofovir. It is for this reason that the research group has focused on the synthesis of these two compounds over the last few years.

This final degree project is part of the synthesis of one of the fragments of ircinialactam L, γ -lactam 5-etoxy-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona, which has been synthesized in three stages from commercial succinimide. In the synthesized compounds, their structures were confirmed using mono- and two-dimensional NMR spectroscopy, as well as mass spectrometry. This lactam will be used in the future for the total synthesis of ircinialactam L.

Keywords: Human Adenovirus, antiviral, cidofovir, *Ircinia felix*, sesterterpene, ircinialactam L, γ -lactam.



Abreviaturas, símbolos y acrónimos

δ : Desplazamiento químico

ac-ba: reacción ácido base

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AdV: Adenovirus

A_N : Adición Nucleófila

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ADP: Adenovirus Death Protein

ADP: Adenosine Triphosphate

AVP: Adenovirus Proteinase

CAR: Coxsackie-Adenovirus Receptor

CC₅₀: Concentración de fármaco que reduce las células viables en un 50%

CCF: Cromatografías de Capa Fina

CDK: CyclinDependent Kinase

COSY: COrrrelation SpectroscopY

d: doblete

DAA: Direct Acting Antivirals

DBP: DNA Binding Protein

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DMF: DiMetilFormamida

DMSO: DiMetilSulfóxido

E: Eliminación

ESI: Electrospray Ionization

FDA: Food and Drug Administration

Fig.: Figura

GTP: Guanosine TriPhosphate

h.: Hora

HAdV: Human AdenoVirus

HDT: Host-Directed Therapies

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HR-ESIMS: High Resolution ElectroSpray Ionisation Mass Spectroscopy

HSQC: Heteronuclear Simple Quantum Correlation

IC₅₀: Concentración de fármaco que inhibe del 50%

J: Constante de acoplamiento

kpb: kilopar de bases

m: Multiplete

m/z: Relación masa/carga

MOI: Multiplicity of Infection

MLP: Mayor Late Promoter

PNM: Producto Natural Marino

Pol: Polimerasa

pTP: Precursor Proteína Terminal

q: Cuartete

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction

Rf: retardation factor

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

s: Singulete

SN₂: Reacción de sustitución nucleófila biomolecular

SPE: Solid Phase Extraction

t: Triplete

t.a.: temperatura ambiente

TP: Terminal Protein

1- Introducción

1.1- Biología del adenovirus

1.1.1- Estructura del adenovirus

Los adenovirus (AdV) son virus líticos sin envoltura con una morfología icosaédrica característica que contiene una doble cadena de ADN¹. En la actualidad se conocen más de 100 tipos diferentes humanos (HAdV), los cuales pueden ser clasificados según criterios bioquímicos, inmunológicos y morfológicos, en 7 especies (de A a G)^{2,3}.

Los AdV tienen un tamaño de 90 nm aproximadamente y su estructura consiste en una cápside icosaédrica con tres componentes mayoritarios: hexones que se disponen formando las caras triangulares de la cápsula; pentones base localizados en los 12 vértices; y finas fibras unidas al pentón base (ver Fig. 1). Otros componentes minoritarios son las estructuras proteicas IIa, VI, VIII y IX que actúan como cementantes de la cápsula³. Dentro de la cápsula, en el núcleo, está el genoma, en forma de doble cadena de ADN de entre 30 a 36 kpb según el serotipo, caracterizada porque los 100 a 140 pares de cada extremo tienen la misma secuencia, con orientación invertida, de forma que una cadena sencilla se puede unir por los extremos formando un círculo. Asociado a éste se encuentran cuatro proteínas: los polipéptidos V, VII y Mu, que son proteínas básicas que se asocian de forma no covalente al ADN viral en forma de cromatina. La proteína VII es la mayoritaria y actúa como histona alrededor de la cual se enrolla el ADN. La proteína V se asocia con el ADN y, a su vez, con la base del pentón, por lo que sirve para unir el núcleo con la cápsida. Por último, en cada uno de los extremos del ADN lineal se une covalentemente a una proteína llamada proteína terminal (TP) que se une al extremo 5' de cada cadena.⁴

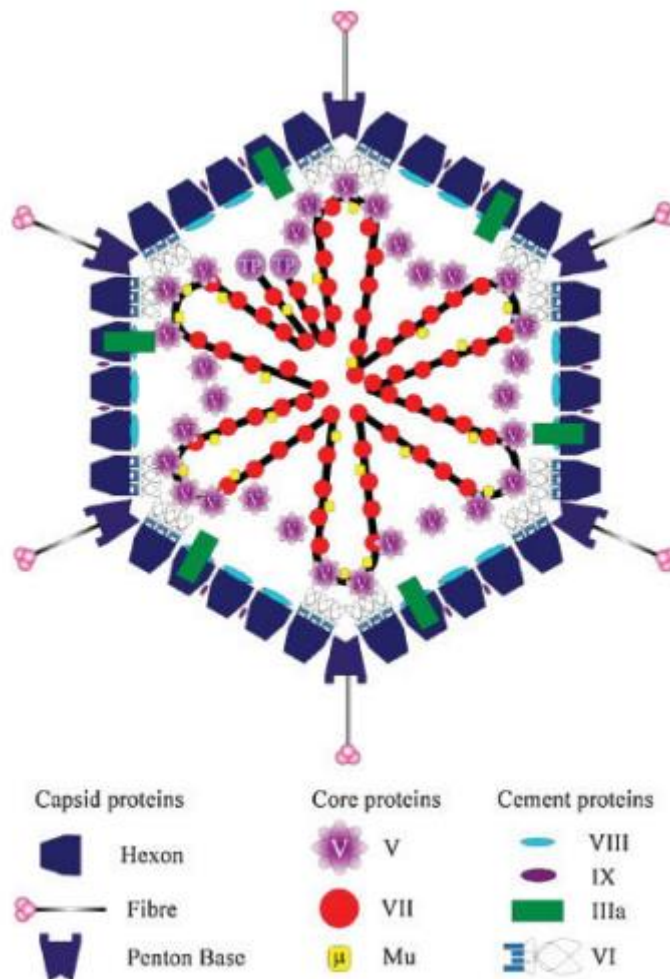


Figura 1 - Estructura del Adenovirus Humano (figura tomada de referencia 1)

1.1.2- Ciclo infectivo del adenovirus

Entrada y transporte al núcleo

La infección por AdV (Fig. 2), comienza con la unión de las fibras a un receptor específico de alta afinidad que se encuentra en la superficie de la célula (Fig. 2, paso 1). Diferentes tipos de AdV necesitan de receptores diferentes, como es el caso de los HAdV, a excepción de los del grupo B, que es una proteína de membrana denominada CAR, cuya función natural parece estar relacionada con la adhesión celular. Una vez dentro, se produce la acidificación del endosoma por fusión con lisosomas, que dispara otros cambios de la cápsida viral como la disociación del polipéptido IIa que conecta la base del pentón al hexón. El ahora liberado complejo integrina-pentón es responsable de romper la membrana endocítica (Fig. 2, paso 2), con lo que el virión pasa el citoplasma. Este mismo complejo activa una proteasa viral para degradar el polipéptido VI, que une el genoma a la cápsida. Es ahora cuando el virión, por medio de los hexones, se une al

complejo motor de dineína en microtúbulos para llegar al complejo del poro nuclear. A través de la señal nuclear del hexón, la cápsida se ancla en el poro. Finalmente se libera el polipéptido IX entre hexones, y el propio hexón y el genoma viral con sus proteínas entran en el núcleo (Fig. 2, paso 3). Ya dentro del núcleo, este ADN queda anclado en la matriz nuclear por su proteína terminal. Su localización en la matriz le permite alcanzar los centros activos de transcripción y replicación celulares.^{4,5}

Ciclo de replicación del Adenovirus

En cuanto al ciclo de replicación de AdV se puede dividir entre una fase temprana (E) y tardía (L), de acuerdo con el momento en el que genes virales particulares son expresados y separados temporalmente en el momento en el que se inicia la replicación del genoma¹.

Con el genoma viral ya en el núcleo, en la primera hora de la infección empieza la transcripción de los genes tempranos (Fig. 2, paso 4). A medida que los ARNs de las proteínas tempranas E1a, E1a, E2a, E2b, E3 y E4 se van sintetizando, tiene lugar en el núcleo su procesamiento por corte, empalme y poliadenilación. El ARNm se transporta ahora al citoplasma para ser traducido a proteínas en los polisomas, y las proteínas resultantes vuelven al núcleo. Las unidades de transcripción tempranas dan lugar a más de una proteína con diferentes funciones. El mensajero E1a produce dos proteínas que modulan el ciclo celular para permitir la replicación viral. El mensajero E1b produce 2 proteínas, una activa el ciclo celular y está relacionada el transporte del ARNm, y la segunda inhibe la apoptosis. Los genes E2 están implicados en la replicación del genosoma viral: DBP, proteína de unión al ADN; Pol, polimerasa viral; pTP, precursor de la proteína terminal. Las proteínas E3 están implicadas en contrarrestar la respuesta antiviral. Los productos génicos derivados de E4 participan en el transporte del ARN.⁴

Con las proteínas virales DBP, Pol y pTP necesarias ya sintetizadas, junto con varios factores celulares, se forma un complejo que se une a los extremos repetidos del genoma para replicarlo y pasar a la fase tardía de la transcripción. De este modo, a medida que por un extremo se va sintetizando una cadena a una de las hebras parentales, por el otro se va copiando la otra hebra complementaria en dirección contraria. La replicación así es semiconservativa, pues en cada doble hebra resultante es una copia nueva y la otra es parental. Con la replicación se produce un cambio de los genes que se transcriben (Fig.

2, paso 4) y se pasa de la fase temprana a la tardía (aproximadamente a las 6 horas de la infección). Se produce la activación de la MLP (unidad de transcripción tardía), que genera cinco familias de transcritos a partir de un ARN único por procesamiento diferencial (L1 a L5). Funcionalmente, esta unidad tardía produce todas las proteínas estructurales del virus.⁴

Fase final

La tercera y fase final en la replicación del AdV involucra el ensamblaje de los nuevos viriones, el empaquetamiento del genoma, la liberación viral y la muerte celular (Fig. 2: pasos 6 y 7). Comienza ahora el proceso de ensamblaje viral en varios pasos: primero las proteínas estructurales se ensamblan, luego las no estructurales, seguidas por el empaquetamiento y maduración del genoma. Específicamente, la proteína VII está involucrada con el empaquetamiento del genoma uniéndose directamente al genoma del HAdV. Interacciones adicionales entre las proteínas VII y V permiten la estabilización del genoma con la cápsida. Un importante componente del ensamblaje del virion es la proteasa viral AVP, codificada en los genes L3. El AVP es absolutamente esencial para la infección, ya que transforma varias proteínas virales en sus formas funcionales finales, incluyendo las proteínas IIIa, VI, y VII y las proteínas de núcleo VII, X y pTP.^{4,5}

El ciclo de replicación del AdV culmina con niveles masivos de producción de virus, que coinciden con la muerte celular (Fig. 2 paso 7). Este proceso es desencadenado por el ADP (Adenovirus Death Protein), codificado en los genes E3 en pequeña parte al principio, pero sobre todo más tarde en la expresión de MLP. Seguramente el ADP promueve la liberación viral y la lisis celular por desestabilización de la superficie. Además de la lisis celular mediada por ADP, los detalles moleculares que tienen que ver con el ensamblaje de viriones, el ensamblaje del genoma y la liberación viral se mantienen en mayor parte desconocidos. Los virus que salen al exterior comenzarán de nuevo el ciclo de infección.^{4,5}

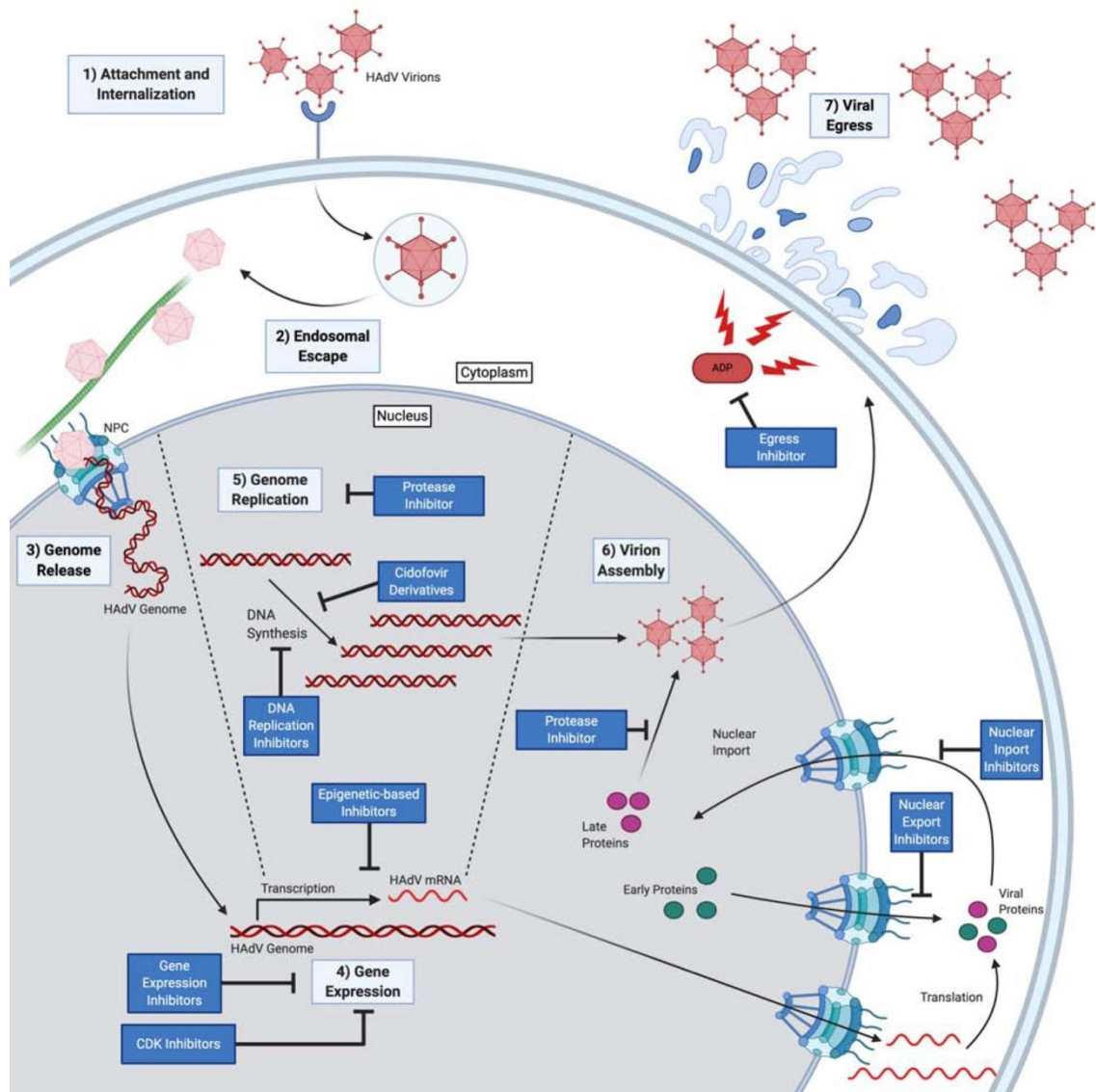


Figura 2- Ciclo viral completo esquematizado. Pasos: 1) Unión al receptor e internalización por endocitosis 2) Escape endosomal 3) Liberación del genoma 4) Expresión genética 5) Replicación del genoma 6) Ensamblaje de viriones 7) Liberación viral. Los tipos de inhibición se indican en cuadros azules, asociados al proceso que interrumpen (figura tomada de referencia 5).

1.2- Patología de infecciones por adenovirus humano

Los AdV muestran un gran tropismo por sus huéspedes naturales, es decir, son específicos de cada especie. Así, los HAdV presentan tropismo únicamente por las células humanas. De los más de 100 tipos de AdV existentes, cada uno, según el subgrupo al que pertenezca (A-G), mostrará diferente tropismo de infección para ciertos tejidos.⁴

Existe por lo tanto un gran rango de síntomas y manifestaciones clínicas que dependen en gran medida del tipo de AdV, la posición inmune en que se encuentre el huésped y el lugar de la infección. Los lugares de infección más comunes son el tracto respiratorio, el epitelio corneal, y el tracto intestinal. Los HAdV son responsables del 90% de los casos

de conjuntivitis virales, normalmente asociados a infecciones de los AdV de las especies B, D o E. Esto puede ser en forma de faringoconjuntivitis o queratoconjuntivitis. Las especies B, C y E están asociados con infecciones respiratorias, que pueden resultar en casos más serios de neumonía, letal para niños/as, y síndrome de dificultad respiratoria agudo. Por último, las especies A, F, y G están asociadas con infecciones gastrointestinales, siendo una gran causa de estos síntomas en la niñez. Infecciones del tracto urinario son también posibles, particularmente en pacientes de trasplante, normalmente presentando cistitis hemorrágica o, en receptores de trasplante, disfunción del aloinjerto.⁵

Sin embargo, la mayoría de las infecciones por HAdV son subclínicas⁶, no presentando síntomas, a excepción de los grupos de riesgo mencionados como niños (particularmente menores de cuatro años) y población militar⁷. Pacientes que están sometidos a quimioterapia, trasplante de médula, linfopenia y aquellos que sufren enfermedad de injerto contra huésped también están predispuestos para ser infectados.^{5,7}

Se han observado infecciones AdV en receptores de trasplante de hígado, riñón, corazón, intestino y pulmón. Sin embargo, las infecciones invasivas de HAdV no suelen estar relacionadas con rechazos de órganos. Muchas veces estas infecciones se producen por la reactivación de un virus del receptor o del órgano trasplantado.^{7,8} Las enfermedades por adenovirus han sido bien documentadas en receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas. Un rango amplio de síntomas, que incluye neumonía, colitis, hepatitis, cistitis hemorrágica, nefritis tubulointersticial, encefalitis y enfermedad diseminada, han sido descritos frecuentemente durante estas infecciones. De acuerdo con estudios, los trasplantes de médula ósea alogénicas presentan un gran riesgo en caso de infección de HAdV, mientras que infecciones en trasplantes de médula ósea autólogo son poco frecuentes.⁸

1.3- Tratamiento de infecciones por adenovirus humano: fármacos antivirales

En cuanto a las infecciones por HAdV, la mayoría tienen síntomas limitados y por eso se contempla sobre todo el tratamiento en pacientes inmunocomprometidos que son tratados en general con fármacos antivirales. La terapia antiviral se reserva generalmente a pacientes de tranplante de órgano sólido o médula ósea y, particularmente, a aquellos que ya presenten formas diseminadas o severas de la enfermedad. En pacientes que estén

sufriendo terapia inmunodepresiva debido a trasplante de órganos sólidos, existe un debate acerca de si se deberían someterse o no a tratamiento viral de forma preventiva o esperar hasta que el paciente presente síntomas clínicamente. Sin embargo, esta decisión cambia en favor del tratamiento preventivo en la mayoría de los casos cuando el trasplante de médula ósea alogénico se lleva a cabo, hasta que el sistema inmune se recupere al punto de curar cualquier infección por sí mismo.⁸

1.3.1 Antivirales de mayor uso: cidofovir, ribavirina, ganciclovir, y la propuesta del brincidofovir

Actualmente no hay ningún antiviral aprobado para las infecciones de HAdV. En su lugar, el tratamiento de los casos severos de infección gira en torno al uso de un amplio espectro de antivirales como cidofovir, ganciclovir, y ribavirina.⁹

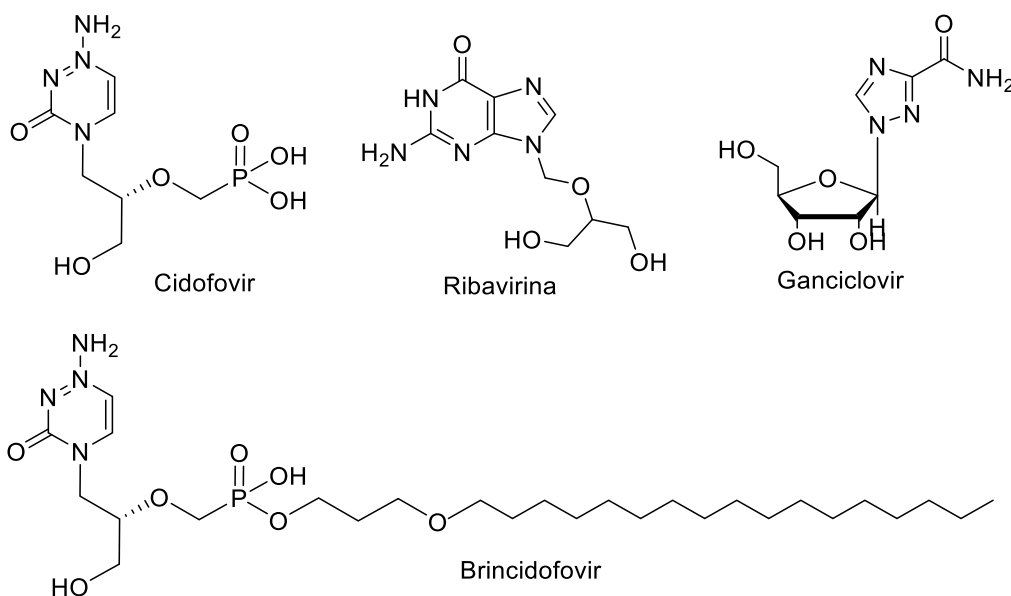


Figura 3 - Estructuras de fármacos antivirales que están siendo utilizados actualmente, así como la de brincidofovir⁹.

- Cidofovir

Actualmente es el antiviral utilizado como estándar para virus HAdV¹⁰. Originalmente, fue desarrollado para el tratamiento de infecciones de citomegalovirus, pero existen suficientes evidencias en experimentos *in vitro* y en modelos de animales que puede utilizarse como agente anti-HAdV. El cidofovir es un nucleósido de citosina que actúa como inhibidor en la replicación del ADN (Fig. 2, paso 5). Mediante fosforilaciones por quinasas celulares, este compuesto es activado para convertirse en análogos de un 2'-

desoxiribonucleósido trifosfato¹. La actividad anti-HAdV ocurre probablemente mediante dos mecanismos: como terminador de la síntesis de nuevas hebras de ADN por la polimerasa (Pol) codificada por los genes E2 o por unión directa con la polimerasa inhibiendo esta última.³ El uso de cidofovir como agente terapéutico ha sido asociado con beneficios clínicos en pacientes pediátricos con sepsis¹¹ y en receptores de trasplante de médula ósea,^{12,13} aunque otros estudios en neonatos¹⁴ y receptores de médula ósea hematopoyética¹⁵ sugieren que tiene poco o ningún efecto. Existen importantes problemas con este medicamento que limitan su utilidad. El cidofovir presenta poca biodisponibilidad, por lo que debe ser administrado en dosis elevadas para llegar a las concentraciones adecuadas en suero y conseguir beneficios clínicos. Además, la rápida aceptación, pero lenta liberación del cidofovir en las células tubulares renales, lleva a niveles de nefrotoxicidad. Finalmente, también cabe destacar que pequeños cambios en los aminoácidos en la polimerasa viral son suficientes para conferirle resistencia al agente antiviral, con lo cual posibles mutaciones pueden resultar problemáticas. La biodisponibilidad y la nefrotoxicidad se mantienen como problemas de una importancia fundamental en las infecciones por HAdV, ya que los enfermos inmunocomprometidos suelen ser más susceptibles a sufrir nefrotoxicidad.^{3,5}

- Ribavirina

La ribavirina es un nucleósido análogo al cidofovir que actúa como antiviral contra un amplio espectro de virus.³ Se han sugerido varios mecanismos de acción entre los que se pueden mencionar el efecto directo en las polimerasas virales; la inducción de mutaciones; la interferencia en el *capping* del RNA; la terminación de las reservas de GTP intracelular; o la inmunomodulación. La ribavirina no ha mostrado muchas evidencias de mejorar los efectos de la infección HAdV. Además, existen estudios que sugieren que la eficacia de la ribavirina es específica al serotipo, lo cual la hace ineficaz a los tres serotipos de AdV relacionados con enfermedades oculares. Al existir especificidad serotípica, su uso en el tratamiento de infecciones con peligro mortal debe ser cuidadoso y siempre acompañado de identificación del serotipo.^{3,5,6}

- Ganciclovir

El ganciclovir es un nucleósido análogo de la guanina que fue originalmente desarrollado para infecciones de herpesvirus. De forma similar a la ribavirina, la evidencia indica su bajo

valor como terapéutico contra HAdV. Esto no es muy sorprendente, ya que el ganciclovir requiere su activación por fosforilación a la forma monofosfato por una timina quinasa viral que los AdV, en contraste a los miembros de los herpesvirus, no codifican. Por lo tanto la eficacia de este es menor cuando se compara al cidofovir. Su mecanismo, de forma similar al cidofovir, inhibe la polimerasa en su forma trifosfato.^{3,5}

- Derivados del cidofovir: brincidofovir

Los intentos iniciales de desarrollar nuevos antivirales que superen los problemas del cidofovir se concentraron en derivados del análogo del nucleósido. Especialmente, el brincidofovir (antes CMX-001) se desarrolló como un derivado de cidofovir lípido-conjugado biodisponible que pudiera ser consumido oralmente. De forma similar al ganciclovir, requiere modificaciones intracelulares para ser activado, primero por las fosfolipasas celulares y después por fosforilación de las quinasa celulares. Este medicamento ha demostrado ser más efectivo contra HAdV *in vitro* a concentraciones más bajas que el cidofovir, reduciendo más la replicación y mortalidad asociada. Se han realizado ensayos en fase I en la seguridad del brincidofovir, con la mayoría de los casos presentando un descenso en la viremia HAdV. Desafortunadamente, ensayos de fase II probando la eficacia del brincidofovir en infecciones en pediatría y adultos no revelaron una diferencia estadística con respecto al tratamiento placebo. Por tanto, a pesar de resultados iniciales prometedores, el brincidofovir no fue aprobado para el tratamiento con pacientes con infecciones por HAdV.⁵

1.3.2 Búsqueda de nuevos antivirales

Con el objetivo de obtener más agentes antivirales existen varias iniciativas, como la anteriormente descrita para el brincidofovir, todavía en estado de pruebas. Se procede a examinar las posibles formas de inhibición que se proponen en las distintas etapas del ciclo infeccioso que permitan el desarrollo de nuevos antivirales.

- Inhibidores post-entrada

En general la inhibición viral puede conseguirse en dos grandes momentos: en la entrada y/o en la replicación. Existen evidencias que apoyan que el mejor desarrollo de inhibidores es aquel que bloquea la infección con el HAdV en el momento de unión.⁵

Es preferible por lo tanto concentrarse en los inhibidores post-entrada del ciclo de replicación del HAdV, de dos formas diferentes. El enfoque inicial y más obvio es la búsqueda de DAA (Direct Acting Antivirals), compuestos que interfieren con proteínas producidas a partir del genoma viral, vitales para el ciclo viral. Este método tiene la desventaja de que posibles mutaciones virales pueden que ya no sean sensibles al tratamiento. Más recientemente la aproximación HDT (Host-Directed Therapies) se ha convertido en una alternativa atractiva en la terapia antiviral. Esta metodología se basa en la necesidad que tienen los virus de la célula huésped para completar sus procesos de replicación, por ejemplo proteínas para la síntesis y energía metabólica. Es por lo tanto mucho más improbable que se desarrollen mutantes ya que el objetivo es el huésped y no el virus original. La limitación de las HDT se encuentra en las posibles toxicidades asociadas a factores y procesos, para que estas propuestas tengan éxito. El objetivo debe ser crítico al proceso de replicación viral y no esencial para la supervivencia de la célula huésped. Afortunadamente, las infecciones virales crean unas condiciones especiales con respecto de las células no infectadas, que potencialmente crearían sensibilidades esenciales para la supervivencia de las células infectadas únicamente.⁵

- *Inhibidores en la replicación del ADN*

Este enfoque implica la interferencia en la replicación del ADN (Fig. 2: paso 5). La ADN polimerasa con actividad enzimática, codificada por el virus, es sensible a un sustrato inhibidor comparado con las polimerasas celulares. En esto se basa la efectividad de medicamentos antivirales tales como el cidofovir o el ganciclovir. La polimerasa Ad ha mostrado ser susceptible a un amplio número de inhibidores, al margen de los derivados del cidofovir.⁵

- *Disruptores de expresión genética*

El ciclo de replicación del HAdV requiere un programa de transcripción muy cuidadosamente orquestado, con lo cual interferencias en la expresión genética debería interrumpir el ciclo de replicación (Fig. 2, paso 5). Existen una variedad de compuestos provocan interrupciones de la expresión genética ya sea en la fase temprana, tardía o ambas, en ocasiones también bloqueando la replicación.⁵

- *Inhibición basada en regulador epigenético*

El término epigenética hace referencia a los cambios que se producen en la función de los genes que no pueden ser atribuidos a alteraciones de la secuencia de ADN¹⁶. El ciclo de replicación del HAdV está íntimamente relacionado con el entorno epigenético de la célula huésped. Cuando el genoma viral entra en el núcleo, este se ensambla con nucleosomas del huésped, que pueden sufrir modificaciones de las histonas. Además, múltiples proteínas del HAdV interactúan con la maquinaria modificadora de las histonas para reprogramar la expresión genética y así conseguir una replicación óptima. Interrumpir estos reguladores epigénicos se ha propuesto como un medio de intervenir en la replicación del HAdV (Fig. 2: paso 4).⁵

- *Inhibidores de transporte nuclear*

Como se ha visto previamente, la mayoría del ciclo de replicación tiene lugar dentro del núcleo, con la síntesis de proteínas ocurriendo en el citoplasma y, posteriormente, las proteínas virales deben entrar en el núcleo para la replicación y ensamblaje (Fig. 2.). Además, el HAdV se ha probado que redirige proteínas regulatorias celulares clave desde el citoplasma al núcleo para promover la expresión genética viral y la replicación. Por lo tanto, compuestos que puedan interrumpir este flujo esencial de materiales de dentro a fuera del núcleo son buenos candidatos para la investigación en antivirales. Estos fármacos actúan inhibiendo las importinas y las exportinas nucleares.⁵

- *Inhibidores de proteasa o de liberación*

La AVP (proteasa del adenovirus) es absolutamente esencial para la finalización del ciclo de replicación, tal y como se ha descrito anteriormente. Sin la actuación de esta no existiría pTP (precursor de la proteína terminal) en su forma final, por lo tanto no habría replicación genómica, así como tampoco sería posible la maduración y el ensamblaje del virión. Las proteasas han sido evaluadas como objetivos en el desarrollo de DAA, por su función a lo largo de diversos ciclos de replicación de virus y su potencialmente susceptible actividad enzimática.⁵

- *Inhibidores de liberación viral*

Cómo se ha mencionado anteriormente, el ensamblaje del genoma y liberación viral son áreas sin explorar dónde existen posibilidades para la actividad antiviral. Sin embargo, la proteína ADP sí ha sido estudiada en su función de inducir la muerte celular y la

culminación de la fase final de la infección (Fig. 2, paso 7). Enfocarse en las proteínas ADP podría dificultar la habilidad del virus de esparcirse y provocar viremia, potencialmente retrasando la curva de infección.⁵

- *Inhibidores CDK*

Las proteínas quinasas son objetivos atractivos para fármacos, y algunos inhibidores de quinasas ya han sido aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration), con muchos de ellos en análisis clínicos. Un tipo de quinasa que puede ser atractiva para el desarrollo de antivirales son las CDK (cyclin-dependent kinases), una familia de quinasas que tienen una función fundamental en la regulación del ciclo celular y regulación de la transcripción (Fig. 2, paso 4). Estos inhibidores son una familia de derivados de pirimidinas, flavonoides y bis-indoles que se unen al centro activo de las CDK, de tal forma que estas interacciones inhibidor-CDK compiten con las ATP-CDK.⁵

2- Antecedentes

2.1 Aislamiento y actividad biológica de la *Ircinialactama J*

La naturaleza sigue siendo una fuente directa o de inspiración para el desarrollo de numerosos fármacos, como lo demuestra el hecho de que las estructuras de más del 60% de las nuevas entidades químicas aprobadas por las autoridades sanitarias en el período comprendido entre 1981-2019 poseen alguna relación estructural con la de un producto natural.¹⁷

Dentro del campo de los productos naturales marinos, aproximadamente 29.000 han sido aislados hasta la fecha. Las estructuras de estos compuestos son completamente diferentes a las de los aislados en organismos terrestres, que se podrían atribuir a condiciones únicas de temperatura, salinidad, presión y competencia.¹⁷

En el periodo comprendido entre los años 2002 y 2017 se aprecia un incremento considerable del número de nuevos productos naturales marinos aislados (de 677 a 1490 nuevos PNM), así como de documentos publicados (de 257 a 477 artículos), respectivamente. En los últimos años, se han descrito un número significativo de nuevos metabolitos con potentes propiedades farmacológicas a partir de los organismos marinos. Aunque todavía son muy pocos los fármacos comercializados derivados de compuestos aislados de organismos marinos, en la actualidad existen al menos 22 productos naturales marinos que se encuentran en alguna de las fases de análisis clínico (III, II ó I).¹⁷

En este contexto, el grupo de investigación QUIMOLMAT-PRONAMR está desarrollando un estudio de organismos de la costa de Yucatán (México), que pueden considerarse pionero dentro del campo de los productos naturales si lo comparamos con los realizados con organismos terrestres. Los resultados obtenidos del estudio de diferentes especies de esponjas, entre ellas *Ircinia felix*, recogidas en la tesis doctoral del Dr. Pech Puch¹⁷, permitió el aislamiento de diversos compuestos bioactivos.

De esta forma, especímenes de *Ircinia felix* fueron extraídos con MeOH para dar un extracto crudo. De la distribución de este extracto orgánico entre agua y disolventes de polaridad creciente se obtuvo una fracción de n-BuOH enriquecida en sesterterpenos. La fracción de n-BuOH se sometió a extracción en fase sólida (SPE)-C18 con una mezcla de disolventes H₂O/MeOH/CH₂Cl₂ en un sistema en gradiente y las fracciones resultantes se

purificaron en HPLC de fase reversa, para dar así un total de 6 sesterterpenos (Fig. 4). Su elucidación estructural se realizaría posteriormente con RMN, espectrometría de masas y métodos quiro-ópticos.¹⁷

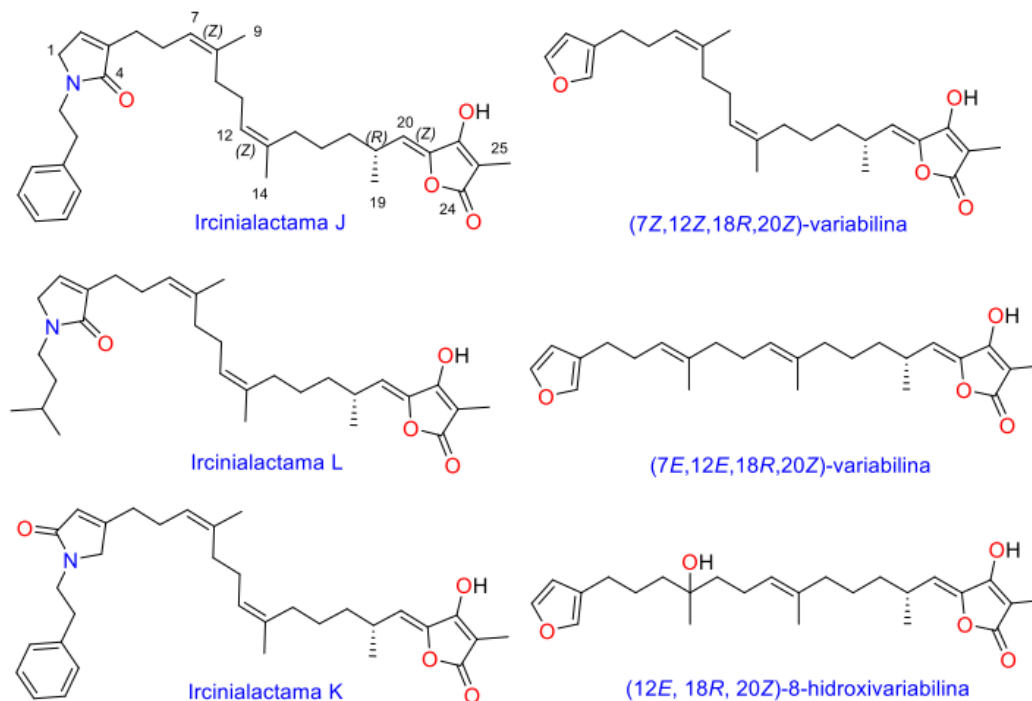


Figura 4 - Los seis sesterpenos aislados de la *Ircinia felix* (figura tomada de referencia 18).

Los seis compuestos aislados son de origen sesterterpénico, tres de ellos pertenecientes a la familia de las variabilinas y los otros tres de la familia de las ircinialactamas. Las variabilinas son furanosterterpenos funcionalizados con una unidad de ácido tetrónico. Las ircinialactamas fueron aisladas por primera vez en 2010 y se identificaron como una familia de sesterterpenos, que se diferenciaban de las variabilinas en que, en lugar de un anillo la unidad de furano presentan uno de γ -lactama con un sustituyente unido al átomo de nitrógeno.¹⁸

Desde un punto de vista estructural, la ircinialactama J es un sesterterpeno funcionalizado en un extremo con un anillo de γ -lactama α,β -insaturada que contiene un grupo homobencílico en el nitrógeno. Presenta un esqueleto central con tres dobles enlaces trisustituídos de estereoquímica Z y un estereocentro de configuración R en C18. Además, en el otro extremo posee un anillo de ácido tetrónico (C21-C26). Ircinialactama L posee la misma estructura que ircinialactama J salvo que el anillo de lactama presenta un sustituyente isopentílico unido al átomo de nitrógeno. Por otra parte, ircinialactama K también posee una estructura muy similar a ircinialactama J, con la diferencia de que el

anillo de lactama se encuentra unido con el resto de la cadena carbonada por la posición β del grupo carbonilo.¹⁸

Ensayos de actividad antiviral realizados por el grupo de investigación de los Doctores Pachón y Céspedes del IBIS (Instituto de Biomedicina de Sevilla) perteneciente al Hospital Universitario Virgen del Rocío, demostraron que a bajas concentraciones de infección (MOI) (0.06 partículas virales/célula) la ircinialactama J inhibía significativamente al virus HAdV5 (especies C) en células 293 β 5 humanas embrionarias de riñón. La concentración que produce una inhibición del 50% (IC₅₀) fue de 2.23 μ M, significativamente menor que el mostrado por cidofovir, único fármaco comercializado en la actualidad. En cuanto a la citotoxicidad celular, la concentración que reduce el número de células viables al 50% (CC₅₀) fue 139.45 μ M, en el mismo rango que el CC₅₀ del estándar cidofovir, cuyo valor es 181.24 μ M.¹⁷

Esta actividad antiviral junto con la novedad estructural de estas ircinialactamas, llevaron a proteger bajo patente tanto sus estructuras como sus actividades biológicas.¹⁹

La ircinialactama J también mostró actividad viral de una forma dependiente a la dosis a una alta MOI (2.000 partículas virales/célula) en un ensayo de una sola ronda de infección. Aunque todavía no es concluyente, los resultados obtenidos en este ensayo sugieren que el mecanismo de acción podría estar relacionado con las primeras fases del ciclo de replicación del HAdV. El tratamiento con ircinialactama J inhibe la expresión del transgen HAdV5-GFP, sugiriendo la inhibición anterior a la transcripción y replicación de genes HAdV, ya que el vector utilizado es un virus no replicativo, con el gen GFP sustituyendo regiones E1 y E3 del genoma HAdV.¹⁷

Para conseguir información sobre el mecanismo de inhibición y establecer si la actividad se produce en fases tempranas o tardías del ciclo de replicación, se volvió a evaluar el papel de la ircinialactama J en la síntesis de ADN HAdV *de novo*. Se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) para medir la replicación de ADN HAdV en presencia del antiviral en un ensayo de 24 h para evitar el impacto de partículas virales nuevamente generadas de rondas de infección posteriores. La presencia de la ircinialactama J en un concentración de 50 μ M inhibió un 99.79% la replicación del virus HAdV5.¹⁷

La inhibición en el ADN HAdV en el núcleo 24 horas post-infección en presencia de estos compuestos sugiere 2 posibilidades. En primer lugar, la ircinialactama J podría

bloquear la accesibilidad del genoma al núcleo después del escape endosómico. En segundo lugar, podrían estar involucrados en la inhibición de la replicación HAdV bloqueando alguna de las proteínas implicadas en este proceso, como la ADN polimerasa, o como alternativa podrían bloquear la transcripción de genes tempranos, un prerequisite de la replicación de ADN. Para identificar el momento exacto en el que actúa este agente en el ciclo de replicación, se decidió evaluar si la presencia de este compuesto permite la llegada del genoma HAdV al núcleo. A los 45 minutos se observa una diferencia en la cantidad de ADN HAdV5 aislada del núcleo de las células tratadas con ircinialactama J con respecto de aquellas tratadas con DMSO (blanco de control). Estos ensayos sugieren que el agente antiviral actuaría en fases tempranas del ciclo de replicación antes de que el genoma llegue al núcleo de la célula huésped.¹⁷

2.2- Síntesis de ircinialactama J

Una vez probada la efectividad de ircinialactama J, el paso siguiente fue llevar a cabo una síntesis total que permitiese acceder tanto al producto natural como a diversos análogos en cantidades suficientes, que nos posibiliten realizar estudios que permitan establecer relaciones estructura-actividad y el descubrimiento de análogos más activos.¹⁸

El método de síntesis de ircinialactama J está recogido en la memoria de tesis doctoral del Dr. Ramón Millán Álvarez,¹⁸ en donde se plantea la síntesis de ircinialactama J mediante dos desconexiones que dividieron a la molécula en tres fragmentos principales: una unidad con el anillo de lactama (**A**), un fragmento central (**B**) con los dos dobles enlaces trisustituídos de configuración *Z* y un centro estereogénico *R* en C18, y por último el anillo de ácido tetrónico (**C**) (ver Fig. 5).

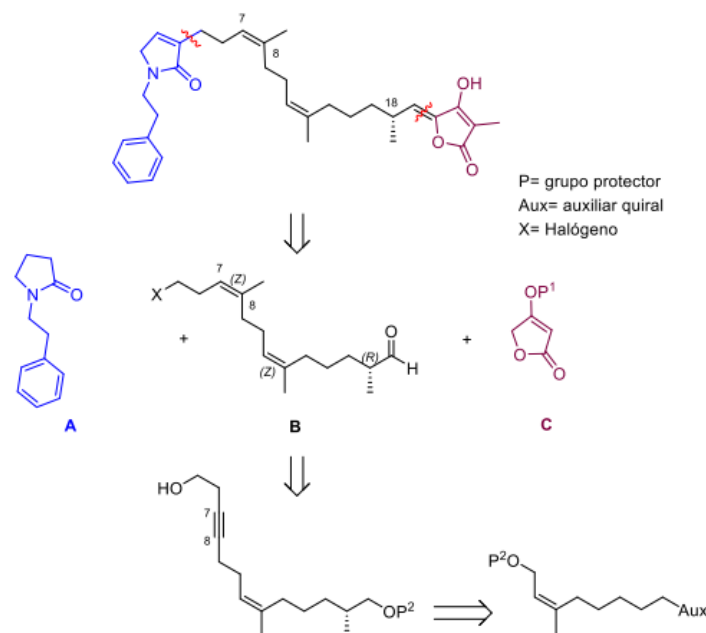


Figura 5 - Análisis retrosintético de ircinialactama J (figura tomada de la referencia 18)

En la síntesis de ircinialactama J desarrollada por el Dr. Millán, se prepara el fragmento A, la γ -lactama 5-etoxi-1-fenilpirrolidin-2-ona, a partir de la succinimida tal como se indica en la Fig. 6.¹⁸

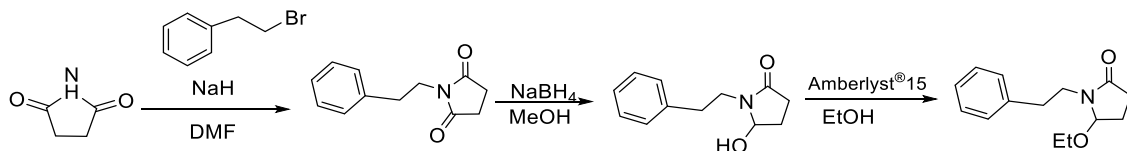


Figura 6 - Síntesis del análogo del fragmento A, 5-etoxi-1-fenilpirrolidin-2-ona utilizado en la síntesis total de ircinialactama J.

Tal como describe Lipshutz,²⁰ esta γ -lactama se puede alquilar en la posición alfa al carbonilo y después transformar en una γ -lactama α,β -insaturada presente en el compuesto final. De manera más concreta, la succinimida se trató con NaH y se adicionó bromuro de feniletilo obteniéndose el producto de *N*-alquilación²¹, que seguidamente se redujo con NaBH₄ para dar lugar al alcohol con buen rendimiento después de dos etapas sintéticas.²² Finalmente, el tratamiento con la resina Amberlyst®15 en etanol permitió obtener el etiléter en un rendimiento de 66%.¹⁸

Esta aproximación será muy parecida a la que se llevará a cabo en este trabajo de fin de grado para sintetizar el análogo del fragmento A de la fig. 5.

3- Objetivos

Existe una necesidad real en el desarrollo de nuevos antivirales, que incrementen su efectividad y en el caso del cidofovir, considerado estándar en infecciones HAdV, solventen el problema de su nefrotoxicidad. Estudios llevados a cabo en el grupo de investigación QUIMOLMAT-PRONAMAR del CICA, permitieron aislar un nuevo sesterterpeno denominado ircinialactama J que mostró una importante propiedad como antiviral. Para este potencial fármaco antiviral se obtuvieron valores similares de citotoxicidad que cidofovir y se logró mejorar los valores de inhibición de dicho fármaco. Si bien, los resultados obtenidos para ircinialactama J son prometedores, es importante comprobar si puede ser un cabeza de serie que sirva para el desarrollo de nuevos antivirales.

Aprovechando que se dispone de una ruta sintética para ircinialactama J ya completada por miembros del grupo de investigación, en este trabajo se pretende fijar la atención en la síntesis de ircinialactama L, un análogo sesterterpénico que se diferencia únicamente en el sustituyente unido al único nitrógeno presente en el anillo de lactama (Fig. 7). Teniendo en cuenta que los fragmentos B y C son idénticos en ambos compuestos, y que el anillo de lactama presente en ircinialactama L es muy semejante al de ircinialactama J, se plantea una estrategia sintética muy similar en la preparación de ircinialactama L.

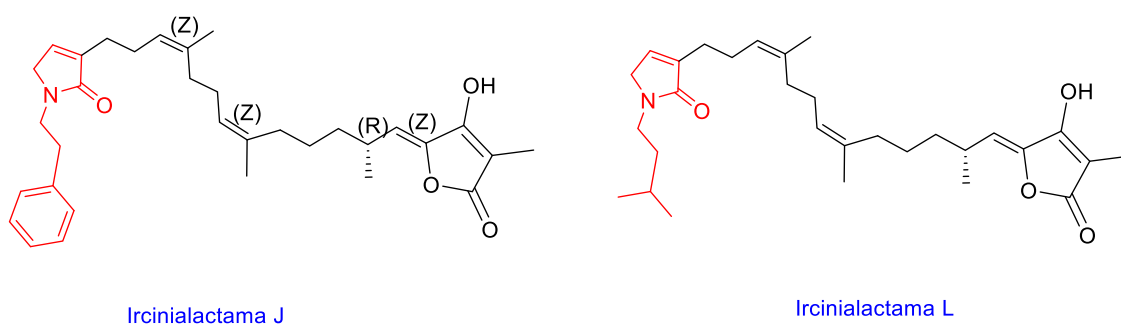


Figura 7 - Ircinialactamas J y L

Por lo tanto, el objetivo final de este trabajo de fin de grado es sintetizar un análogo de del fragmento A utilizando la síntesis de ircinialactama J y adaptándola al fragmento presente en la ircinialactama L (Fig.8).

Se plantea de esta forma la síntesis de la 5-etoxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona a partir también de succinimida como producto de partida, así como la confirmación de sus

intermedios y la estructura final mediante técnicas espectroscópicas de RMN y espectrometría de masas.

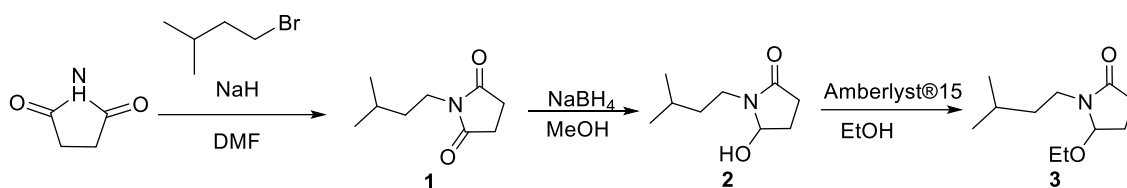


Figura 8 – Esquema sintético planteado para la preparación de la 5-etoxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona.

4- Resultados y discusión

4.1-Síntesis de 1-(3-metilbutil)pirrolidin-2,5-diona (1)

Para la síntesis de 1-(3-metilbutil)pirrolidin-2,5-diona (**1**) se partió del compuesto comercial succinimida, a la cual se somete a una reacción de alquilación con 1-bromo 3-metilbutano. Para ello se lleva a cabo una desprotonación de la imida con NaH durante 1 hora con el fin de aumentar su carácter nucleofílico, con posterior adición de 1-bromo 3-metilbutano para que tenga lugar la reacción de sustitución nuclear bimolecular (SN₂), primero a 50 °C durante 2 horas y a continuación a temperatura ambiente durante 16 horas, obteniéndose así el producto alquilado **1** con un rendimiento moderado del 42%.

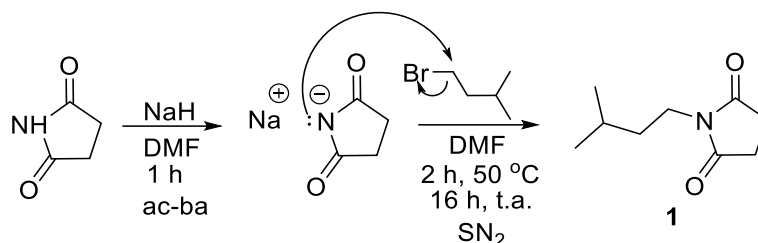


Figura 9 - Esquema de reacción para dar el producto alquilado **1**.

La caracterización de **1** se realizó mediante sus espectros de RMN de protón (Fig. 10), carbono-13 y DEPT Q-135 (Fig.11), tal como se explica a continuación:

En el espectro de RMN-¹H se observa una señal doblete a δ_H 0.92 ppm, que integra por 6 protones, inequívocamente asignada a los dos grupos metilo equivalentes (protones H_e). En la zona 1.3-1.7 ppm encontramos otras 2 señales que se corresponderían a H enlazados a carbonos *sp*³, que se asignan al grupo metino y metileno cercanos a los dos grupos metilo. De esta forma, la señal a δ_H 1.43, un multiplete que integra por 2 H, se asigna a los protones H_c y a δ_H 1,54, un multiplete que integra por un solo protón, se asigna al protón H_d (ver Fig 10). Más desplazadas, encontramos la señal de un singulete a δ_H 2.67 (4H), fácilmente asignable a los protones a H_a presentes en la lactama, que resuenan a mas ppm debido a su proximidad al grupo carbonilo. Por último, el triplete a 3.50 ppm, se asignó fácilmente a los protones H_b del grupo metileno unido al átomo de nitrógeno.

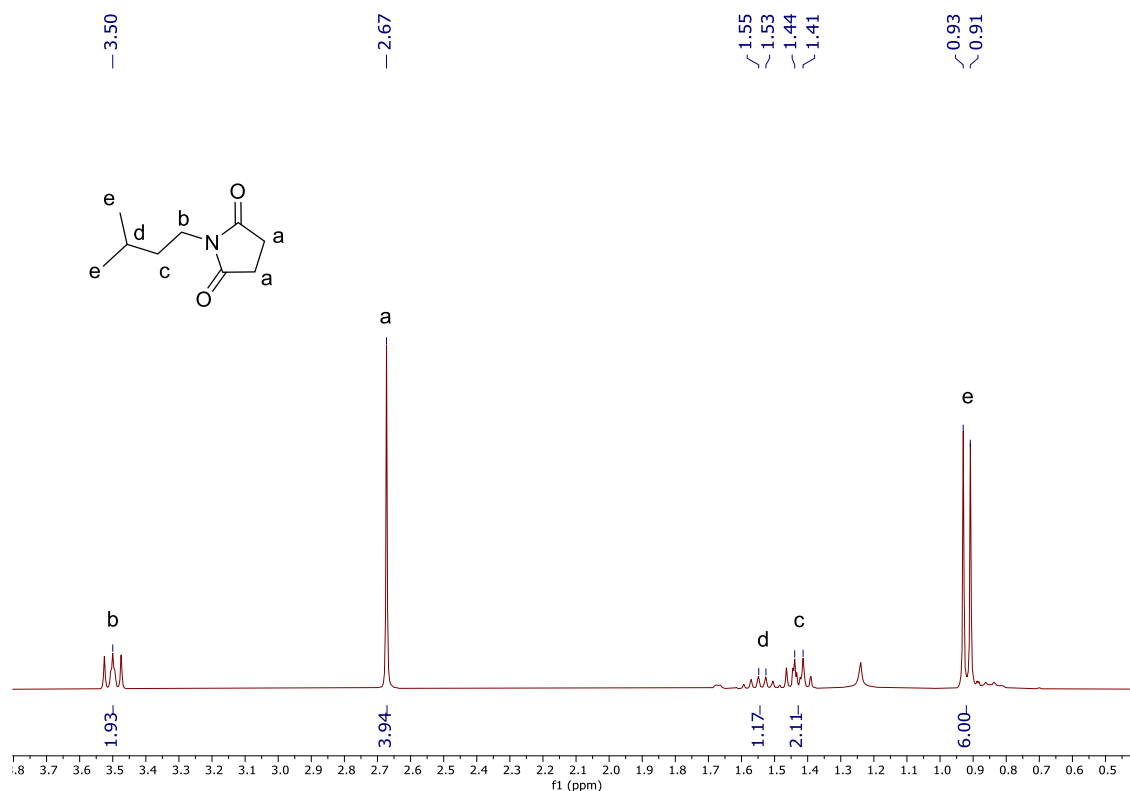


Figura 10 - Espectro de ^1H RMN de del compuesto **1**, donde se indica la asignación de las señales con letras.

Por otra parte, el espectro de ^{13}C RMN junto con el experimento DEPT-Q 135 (Fig. 11), nos dió información acerca del número de hidrógenos a los que está unido cada carbono. En el experimento DEPT Q-135, las señales que aparezcan en fase positiva corresponden a los grupos $-\text{CH}-$ o $-\text{CH}_3$, mientras las que aparecen en antifase (negativa) corresponden a los grupos $-\text{CH}_2-$ y a los carbonos que no tienen ningún protón unido. Es por ello que la señal más fácil de asignar es la de los carbonilos, que en el caso del compuesto **1** se corresponde con el desplazamiento químico más alto a 176.90 ppm, que asignamos con C_B .

La señal menos desplazada, a δ_C 22.01, está en fase positiva por lo que podría tratarse de un grupo $-\text{CH}$ o un grupo $-\text{CH}_3$. Sin embargo, por ser la de menos desplazamiento químico, la asignamos a los grupos metilo (C_F) presentes. Con un desplazamiento similar se observa una señal a 25.72 ppm, en la misma fase que la anterior, y que fue asignada al único grupo metino ($-\text{CH}$) de la molécula, C_E . Las señales a 37.05, 36.09 y 27.87 ppm están en antifase y corresponden a los 3 grupos metilenos (C_A , C_C , C_D), sin embargo, es difícil asignar con exactitud estas señales a sus carbonos correspondientes sólo con la información de este espectro.

De todas formas, habiendo comprobado la presencia del grupo carbonilo (C_B) y las señales propias de la cadena 3-metilbutil que se pretendían incorporar (C_F y C_E), podemos confirmar la obtención del producto deseado y por tanto el correcto transcurso de la reacción.

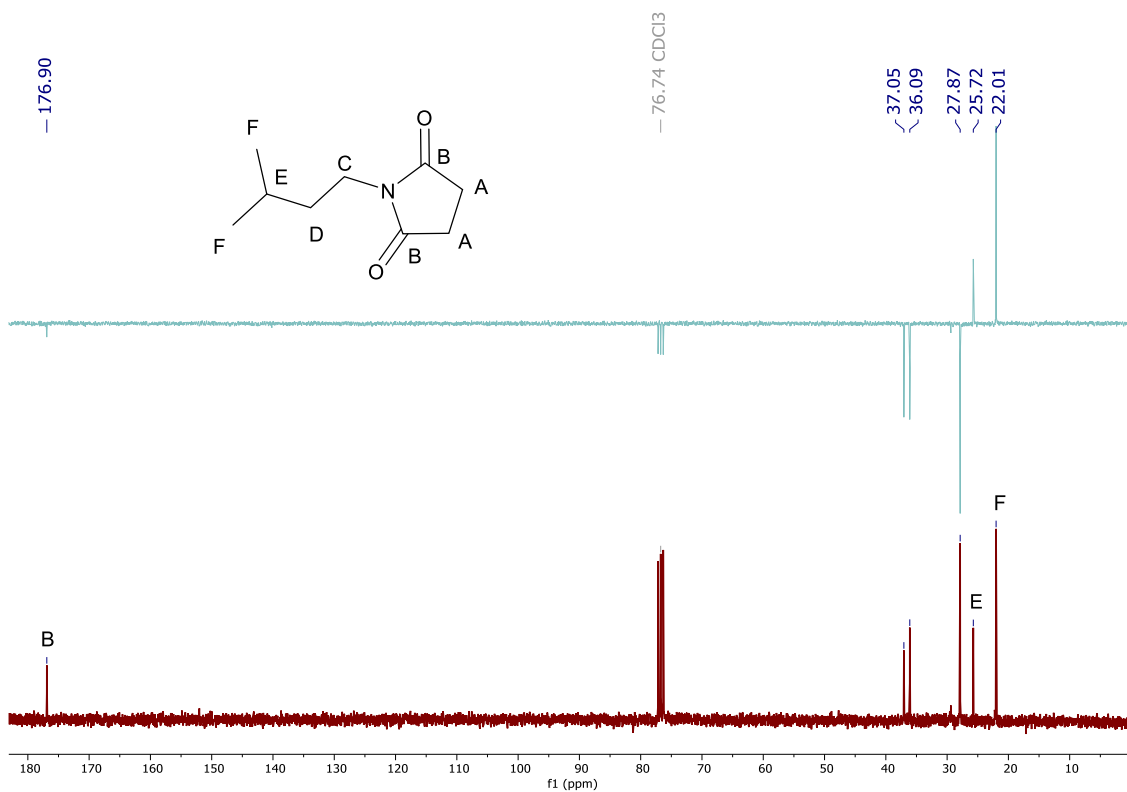


Figura 11 - Espectro de ^{13}C RMN (rojo) y DEPT Q-135 (azul) de del compuesto 1, donde se indica la asignación de las señales con letras.

Por último, en el espectro de masas de alta resolución ((+)-HR-ESIMS, Fig. 12 se observó el ion $[M+H]^+$ a m/z 170.1175 (calculado para $C_9H_{16}NO_2^+$ 170.1176) que confirmó la obtención del producto.

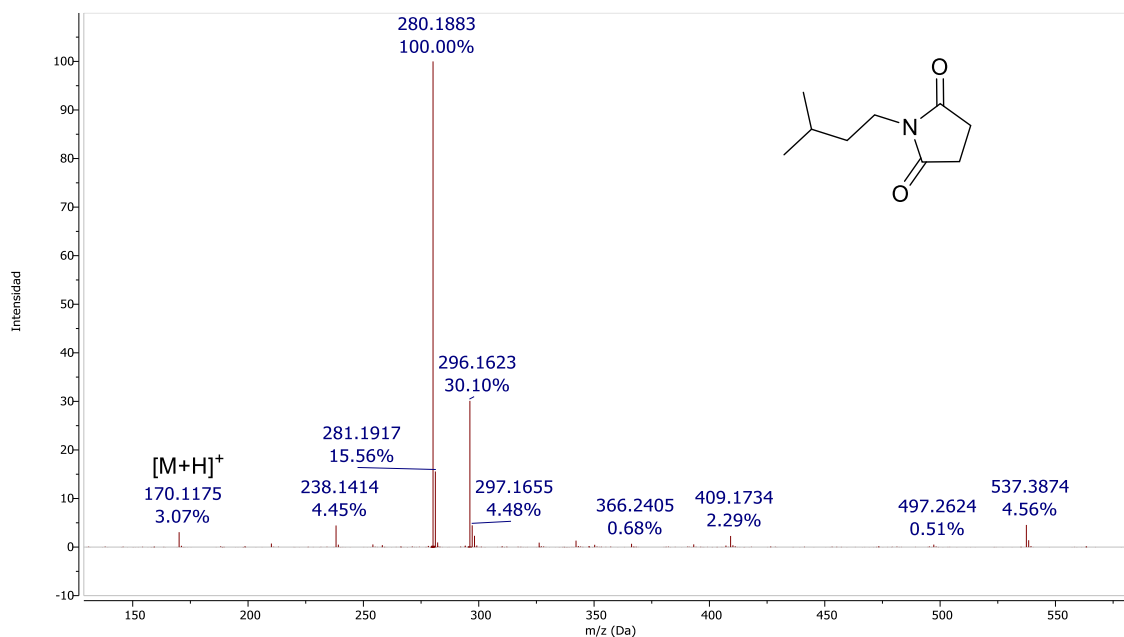


Figura 12- Espectro de masas (+)- HR-ESI del compuesto **1**.

4.2- Síntesis de 5-hidroxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona (**2**)

A partir de **1**, se preparó la 5- hidroxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona (**2**), mediante una reducción con NaBH₄ de uno sólo de los carbonilos a alcohol. La reacción se llevó acabo a 0 °C durante 3 horas, obteniéndose tras elaboración un rendimiento del 93%.

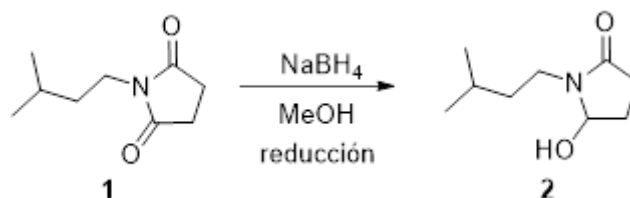


Figura 13 - Esquema de reacción para dar el alcohol **2**.

La caracterización de **2** se realizó mediante sus datos de RMN (Fig. 14 y 15) y espectrometría de masas (Fig. 16). En su espectro de RMN ¹H se observa como señal más fácil de establecer el protón que resuena como un triplete a 5.21 ppm, integrando por 1 H, (esta señal no aparecía en el espectro ¹H RMN de **1**, Fig. 10), y que fue asignada al protón H_c (ver Fig. 14). Su multiplicidad como triplete se explica debido a que las dos constantes de acoplamiento de H_c con H_b y H_{b'} son idénticas ($J_{H_a-H_b} \approx J_{H_a-H_b'}$). De nuevo pudimos asignar las señales que pertenecen a la cadena 3-metilbutil de la siguiente manera: La señal menos desplazada, y que integra por 6 H, se corresponde a los protones H_g, el multiplete a 1.44 ppm que integra por 2 H se asoció a H_e, y teniendo en cuenta que para el compuesto **1** la señal para el H_b aparece desplazada a 3.50 ppm (Fig. 10), podemos

concluir que las señales 3.13 y 3.50 se corresponden a los que ahora son los protones diastereotópicos H_d y H_{d'}, que aparecen como multipletes y que integran por 1H cada uno. Por último, las señales de los 4 multipletes entre el intervalo 1.91-2.54 ppm, que integran por 1H, fueron asignados a los protones H_a, H_{a'}, H_b y H_{b'} que forman parte del anillo de lactama.

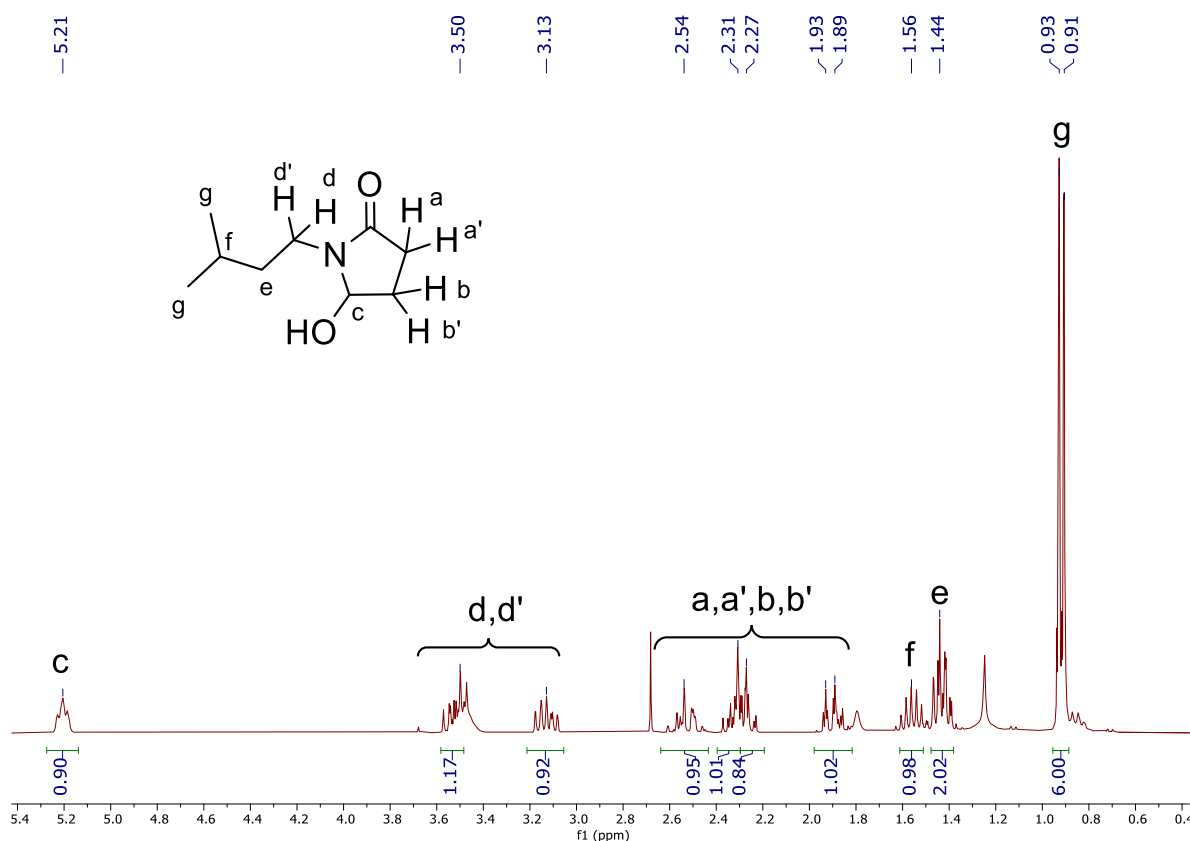


Figura 14 - Espectro de ¹H RMN de del compuesto **2**, donde se indica la asignación de las señales con letras.

En cuanto al espectro de ¹³C RMN y DEPT-135 (Fig. 15), de nuevo podemos asignar con facilidad los desplazamientos a los C_G y C_F siguiendo el mismo el mismo razonamiento que en el espectro RMN ¹³C del compuesto **1**. A diferencia del espectro DEPT Q-135, en el espectro DEPT-135 no aparecen los carbonos sin protones unidos a ellos, por lo que también se asignó con facilidad C_A, (grupo carbonilo) además de estar extraordinariamente desplazado a mas ppm. De nuevo nos resultó difícil asignar las señales en antifase en el experimento DEPT-135 para los carbonos C_B, C_C, C_E y C_F, ya que todas aparecen a desplazamientos similares. Finalmente, se observa una señal en fase que no aparece en el espectro DEPT Q-135 del compuesto **1** (Fig. 11) a 83.50 ppm, que podemos asignar a C_D al tratarse de un carbono unido a un átomo de oxígeno y a un átomo

de nitrógeno. Es de señalar, por lo tanto, que aunque no hayamos podido asignar completamente la estructura de la molécula, esta última señal confirma que se ha llevado a cabo la reducción en la posición deseada.

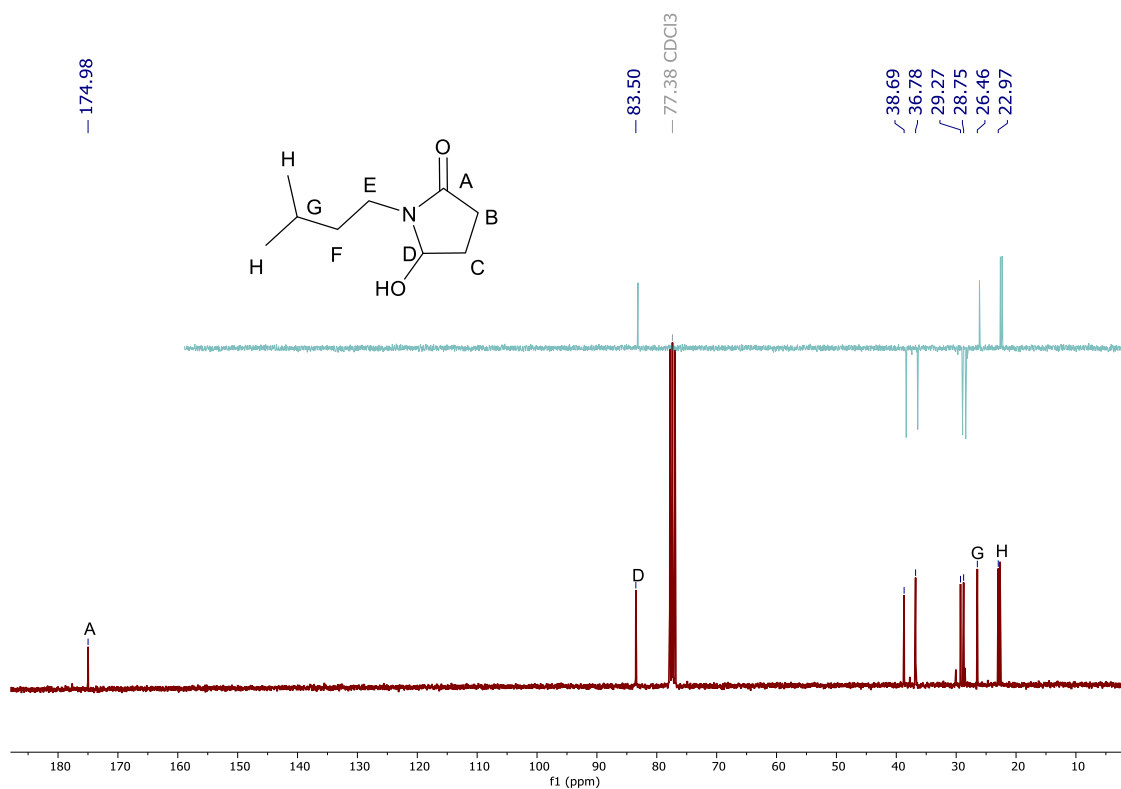


Figura 15 - Espectro de ^{13}C RMN (rojo) y DEPT-135 (azul) del compuesto **2**, en donde se indica con letras la asignación de los carbonos de la molécula.

El espectro de masas (+)-HR-ESI (Fig. 16) de **2** mostró el ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a m/z 194.1151 (calculado para $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NNaO}_2$, 194.1151), así como los iones correspondientes al ion dímero $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ a m/z 365.2202 (calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{NaO}_4^+$ 365.2411) y el ion $[2\text{M}+\text{Na}-\text{O}]^+$ a m/z 349.2462 (calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{NaO}_3^+$ a 349.2462), que de nuevo confirmaron la obtención del compuesto.

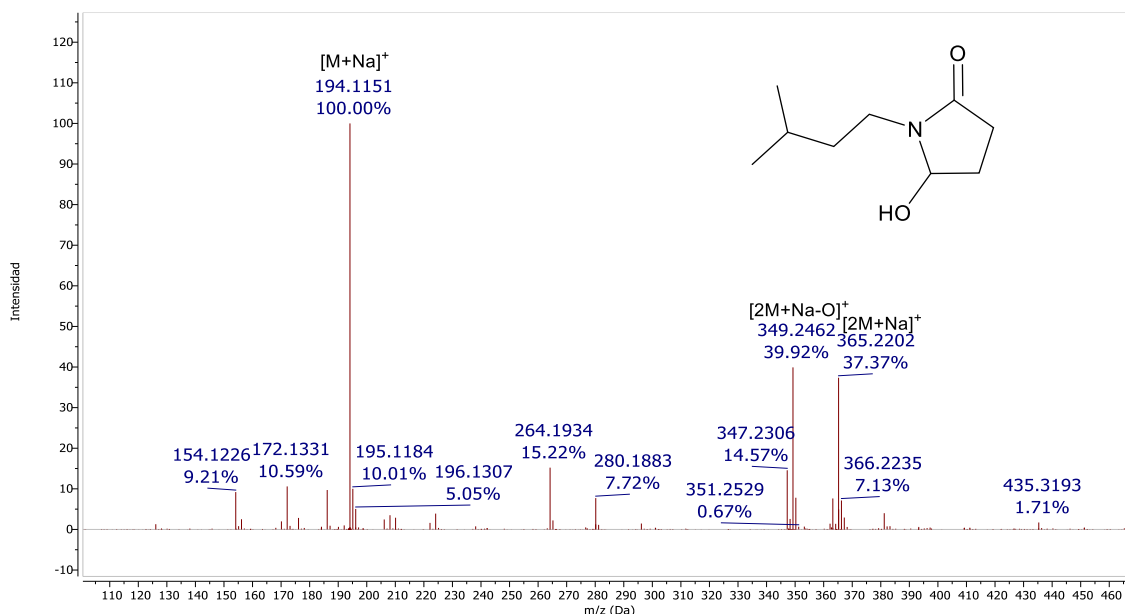


Figura 16 - Espectro de (+)- HR-ESIMS del compuesto **2**.

4.3- Síntesis de 5-etoxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona (**3**)

A partir del compuesto **2**, se obtiene el 5-etoxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona (**3**), por conversión del grupo alcohol a un etil éter. Esta reacción es catalizada por una resina de intercambio iónico fuertemente ácida, Amberlyst® 15, funcionalizada con grupos sulfónicos (-SO₃H). El mecanismo de formación del hemiaminal etil éter transcurre mediante una eliminación (E)-adición nucleófila (A_N) catalizada por ácido. Se utiliza etanol tanto como disolvente como reactivo y la reacción se lleva a cabo durante 5 horas a temperatura ambiente. Tras la elaboración y la purificación el rendimiento obtenido es del 33%.

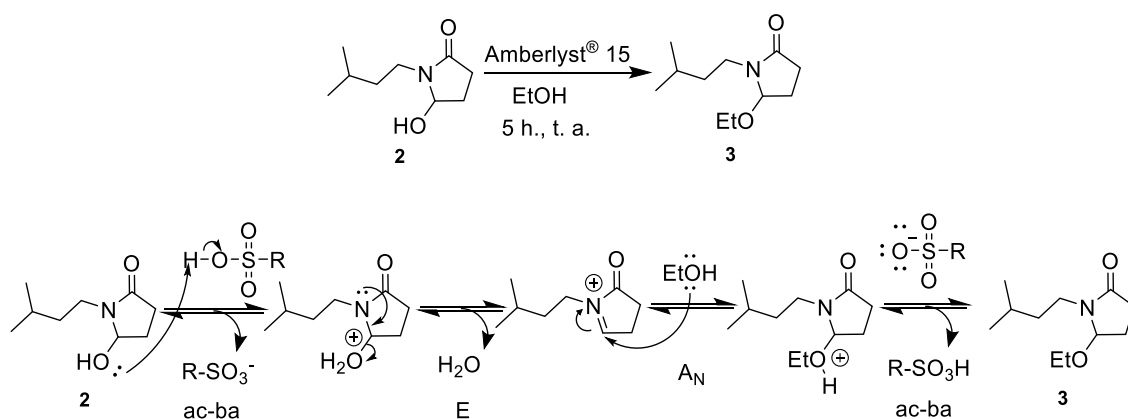


Figura 17 – Esquema y mecanismo de la formación del hemiaminal etil éter **3**.

La caracterización del compuesto **3** se realiza mediante análisis de los espectros uni- y bi-dimensionales de RMN para la asignación inequívoca de las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C .

En el espectro de ^1H RMN de **3** (Fig. 18) se puede asignar con facilidad las nuevas señales del grupo etilo. Se asigna como H_h al tetraplete que resuena a 3.45 ppm, ya que se acopla con los protones H_i que integran por 3H (triplete a 1.20 ppm). En cuanto al resto del espectro, se observan señales con desplazamientos similares a los asignados para el compuesto **2** (Fig. 14), de forma que se lleva a cabo la asignación de H_a a H_g . De nuevo nos es imposible distinguir entre los cuatro protones diastereotópicos H_a , $\text{H}_{a'}$, H_b y $\text{H}_{b'}$.

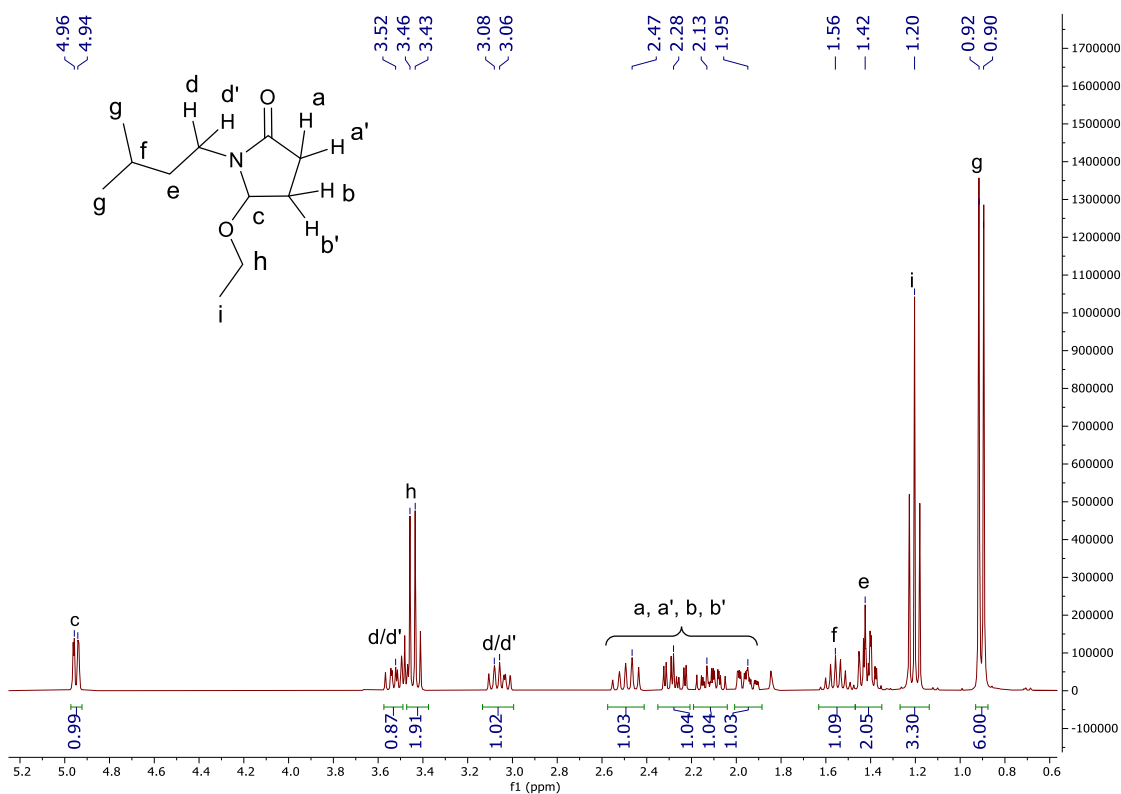


Figura 18 - Espectro de ^1H RMN del compuesto **3**, donde se indica con letras la asignación de las señales.

Mediante el experimento 2D ^1H - ^1H COSY (COrelation SpectroscopY bidimensional protón-protón) podemos relacionar los núcleos de protón acoplados entre sí, es decir, protones vecinales o protones geminales (a 3 y 2 enlaces de distancia, respectivamente). Podemos ver en la Fig. 19 que los picos de cruce fuera de la diagonal indican los protones

que están acoplados. De esta manera podemos asignar las 4 señales que aparecen el espectro de ^1H RMN entre 1.95 a 2.47 correspondientes a los protones H_a , $\text{H}_{a'}$, H_b y $\text{H}_{b'}$.

La señal a 4.95 ppm se acopla con las señales a 1.95 y 2.13 ppm, que por lo tanto son las que están a 3 enlaces, por lo que los asignamos a los protones H_b y $\text{H}_{b'}$. Estas señales se encuentran a su vez acoplados con las señales a 2.28 y 2.47 ppm, por lo que son asignadas a H_a y $\text{H}_{a'}$.

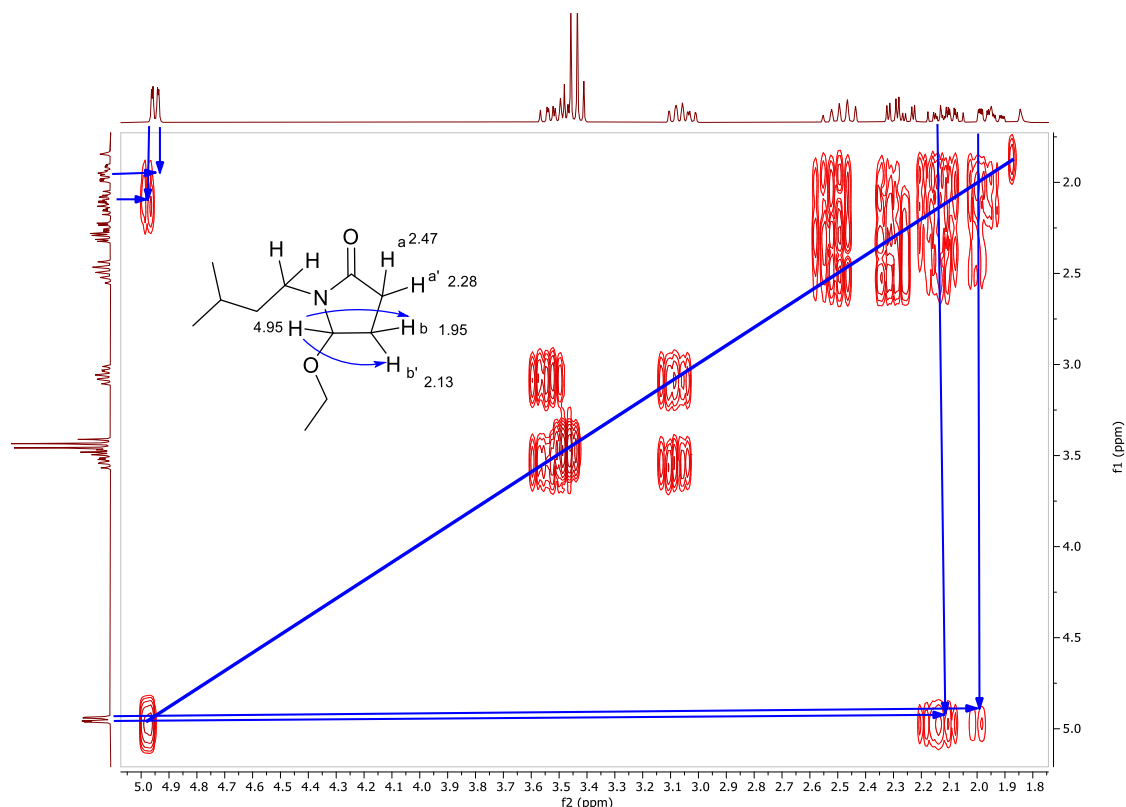


Figura 19 - Espectro ^1H - ^1H COSY de **3**. Los picos de cruce indicados con flechas muestran los acoplamientos entre los protones correspondientes.

En el espectro de ^{13}C RMN de **3** (Fig. 20) podemos asignar de forma inequívoca la señal que aparece a 174.86 ppm al único grupo carbonilo de la molécula, sin embargo, es difícil extraer información más información con este espectro en una molécula que es relativamente compleja, por lo que decidimos utilizar el experimento HSQC (Heteronuclear Simple Quantum Correlation)-editado de **3**. Este es un experimento en el que podemos relacionar los desplazamientos químicos entre dos núcleos distintos, en este caso ^1H - ^{13}C . En la Fig. 21 se muestra el experimento HSQC de **3**, en donde un espectro ^1H RMN se representa en el eje x frente al espectro de ^{13}C RMN en el eje y. Los picos de

cruce muestra los núcleos ^1H que están unidos directamente su correspondientes ^{13}C . El espectro al estar editado, podemos obtener la misma información que nos daría un espectro DEPT-135: los picos de cruce que aparecen en rojo se corresponde a un grupo $-\text{CH}_2$ y las que aparecen en azul a los grupos $-\text{CH}_3$ o $-\text{CH}$. De esta forma se pudo determinar qué carbono está enlazado a cada uno de los H, facilitando la asignación.

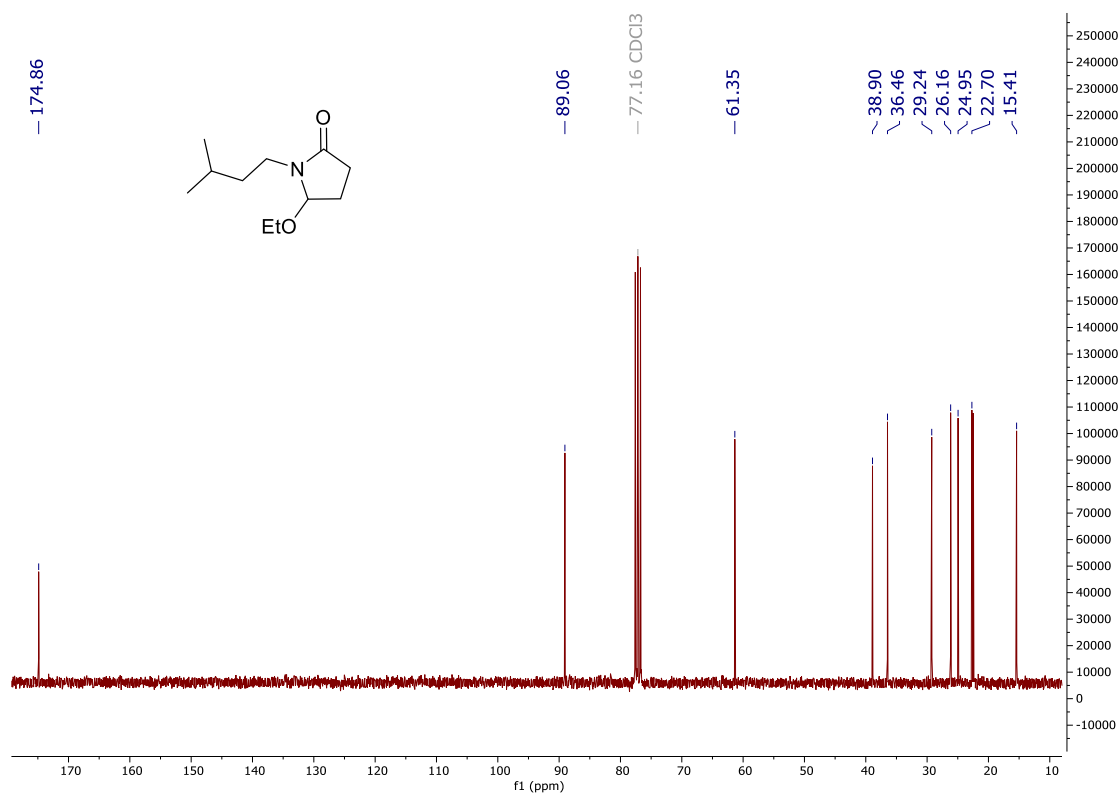


Figura 20 - Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 3.

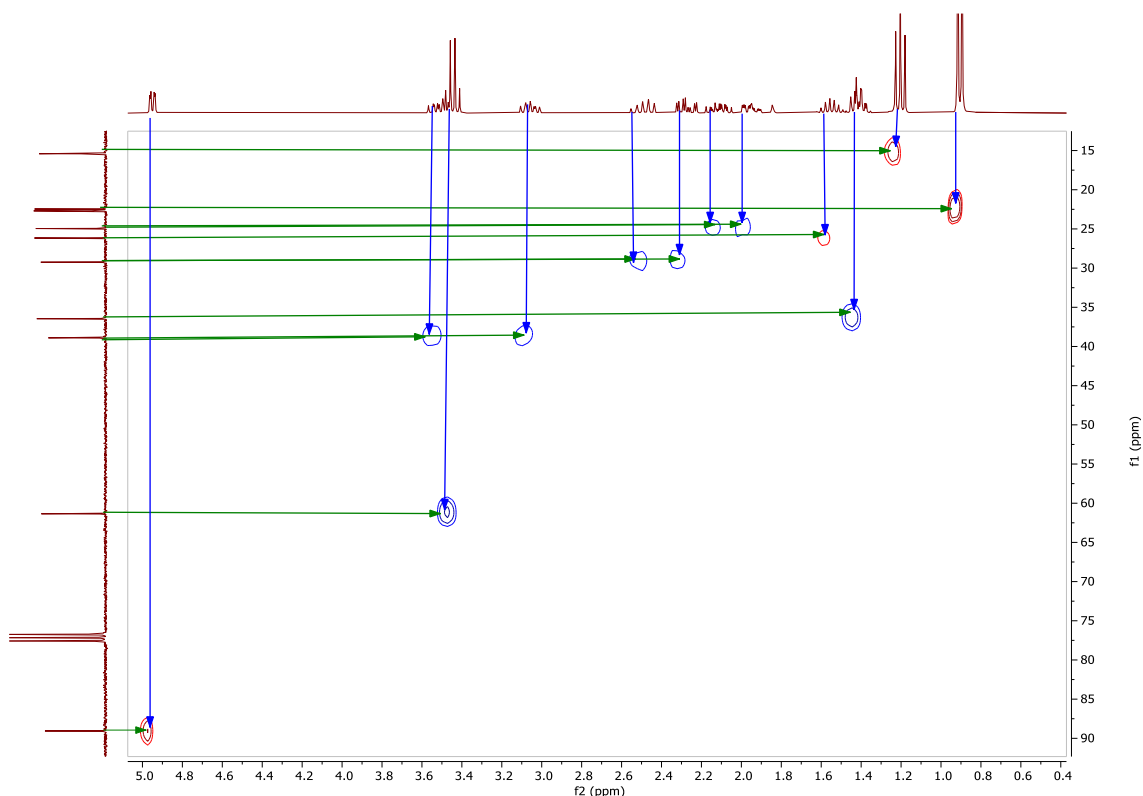


Figura 21 - Espectro HSQC editado del compuesto **3**. Se muestran las correlaciones entre los protones (eje horizontal - azul) y los carbonos (eje vertical- verde) con flechas. Se muestra la región de 15-90 ppm del espectro de ^{13}C RMN en el eje y en el que no se encuentra la señal del carbonilo porque al no estar unido a un protón muestra pico de cruce.

Combinando toda la información obtenida, se pudo asignar todas las señales del espectro ^{13}C y ^1H RMN, tal como se muestra en la Fig. 22.

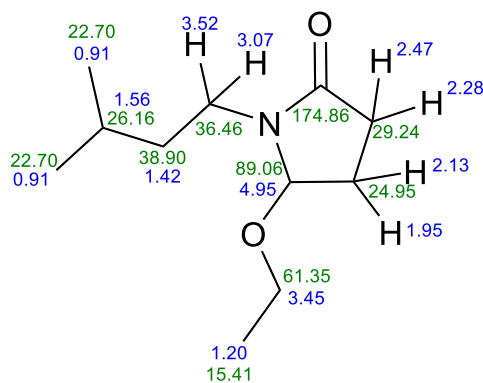


Figura 22 – Asignación de los desplazamientos químicos de ^1H RMN (azul) y de ^{13}C RMN (verde) (ppm) del compuesto **3**.

En el espectro de masas (+)-HR-ESI de **3** (Fig. 23) se observa el pico base a m/z 222.1463 que asignamos al ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$, (calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{NNaO}_2^+$ 222.1465), así como el ion $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ a m/z 421.3035 (calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{NaO}_2^+$ 421.3037), que confirmó la formación del producto.

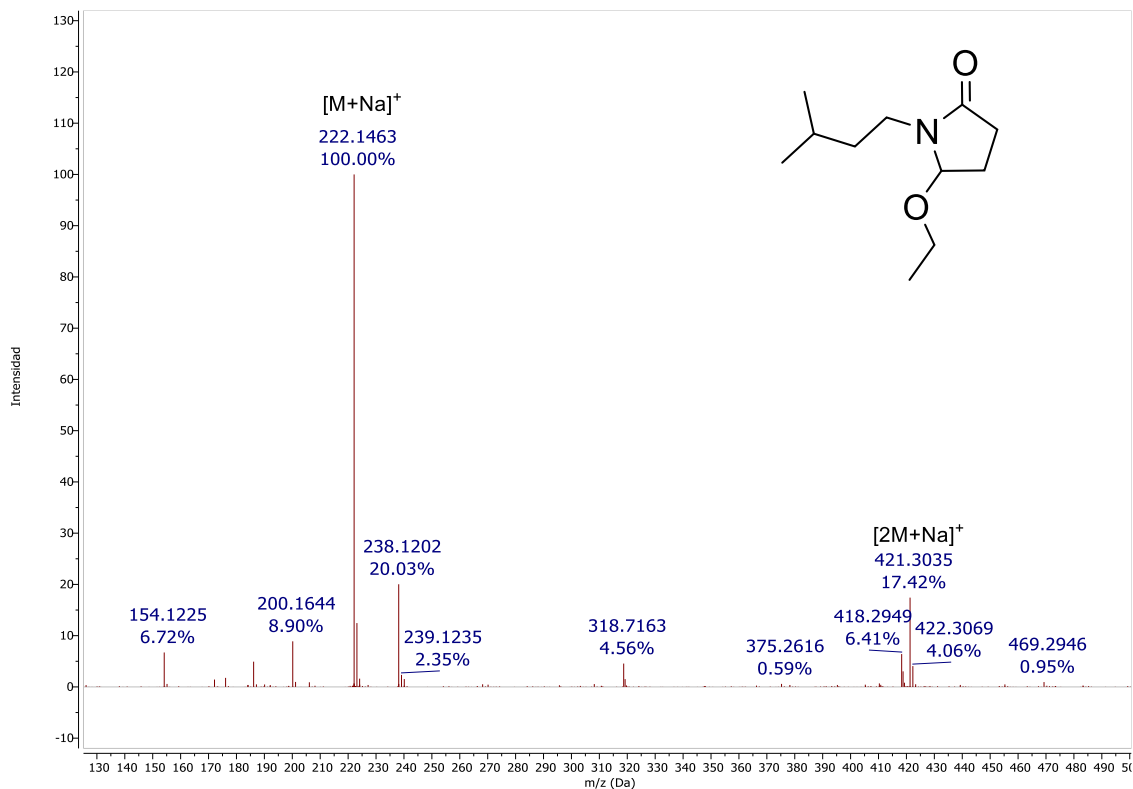


Figura 23 - Espectro de masas (+)- HR-ESI del compuesto 3.

Hemos obtenido, finalmente el compuesto objetivo de este TFG, el cual será utilizado como intermedio en la síntesis total de ircinialactama L.

4 - Parte experimental

4.1-Materiales y equipos empleados

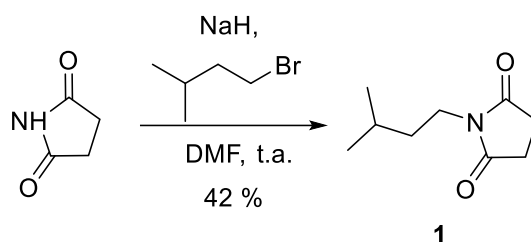
Las reacciones se siguieron mediante cromatografía en capa fina empleando placas de gel de sílice Alugram® Xtra SIL G/UV254 de 0.20 mm de grosor, visualizando las manchas bajo luz ultravioleta UV 254 nm o revelándolas al calor tras la inmersión de la capa fina en una disolución etanólica de ácido fosfomolibdico. Las purificaciones en cromatografía en columna se llevaron a cabo utilizando gel de sílice de 230–400 mesh.

Los espectros de RMN se realizaron en el CICA- Centro Interdisciplinar de Química e Biología y se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 300 (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C) a temperatura ambiente, empleando CDCl_3 como disolvente.

Los espectros de masas fueron realizados en el SAI en un espectrómetro Thermo-Orbitrap con una fuentes de ionización por electrospray (ESI).

Todas las reacciones han sido llevadas a cabo en condiciones de atmósfera inerte de Ar. Por lo tanto, es necesario que el material empleado esté seco, para lo cual se deja una noche antes en la estufa y se enfría posteriormente en un desecador. Antes de comenzar las reacciones, el recipiente de reacción se purga, tapándolo con un septum y se introducen dos agujas, una de ellas conectada a un globo con Argon, de forma que el Ar desplace el aire dentro del recipiente saliendo por la otra aguja. Se repite este proceso 3 veces para asegurar la atmósfera inerte.

4.2- Síntesis de 1-(3-metilbutil)pirrolidin-2,5-diona (1)

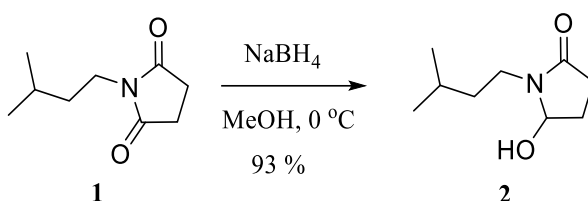


En un matraz de fondo redondo seco se añaden 1.01 g de succinimida (10.09 mmol), se le ajusta un septum y se purga el contenido con Argon. Se añaden 10 mL de DMF y 302 mg de NaH (12.5 mmol), y se deja la mezcla en agitación durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo a la mezcla, que adquiere un color marrón claro, se añaden 1.4 mL (11.7 mmol) de 1-bromo 3-metilbutano y se deja en agitación a 50 °C durante 2 horas y posteriormente,

a temperatura ambiente durante 16 h. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción tornó a un color marrón-rojizo, se vierte en un embudo de decantación en dónde se añaden 20 mL de AcOEt. La fase orgánica se lava 3 veces con una disolución acuosa saturada de NaCl (20 mL), se seca con MgSO₄ anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtienen 722 mg de un aceite de color marrón (4.26 mmol, 42%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ_H 3.50 (t, 2H), 2.67 (s, 4H), 1.54 (m, 1H), 1.43 (m, 2H), 0.92 (d, 6H); ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃) δ_C 176.90, 37.05, 36.09, 27.87, 25.72, 22.01; HRMS (ESI) *m/z*: [M+H]⁺ calculado para C₉H₁₆NO₂⁺ 170.1176, encontrado a 170.1175.

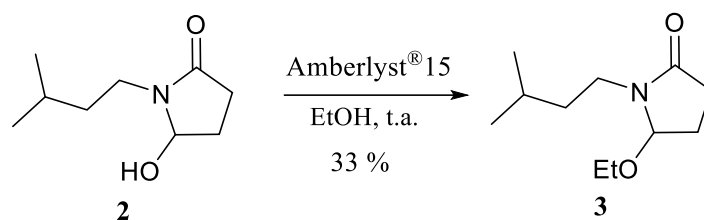
4.3- Síntesis de 5-hidroxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona (2)



En un matraz de fondo redondo seco se añaden 404 mg de la imida **1** (2.39 mmol), bajo Argon y se disuelven en 10 mL de MeOH. El matraz de reacción se deja a 0°C, se añaden 476 mg (12.58 mmol) de NaBH₄, en 4 porciones y se deja bajo agitación durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se aprecia la aparición de un color amarillento claro en la mezcla de reacción. Se evapora el disolvente del crudo de reacción a presión reducida, obteniéndose un sólido amarillento, que se redisuelve en 15 mL de cloroformo, se vierte a un embudo de decantación y se lava con 15 mL de una disolución 5% de NaHCO₃. La fase acuosa se extrae 3 veces con 15 mL de cloroformo y las fases orgánicas combinadas se lavan con 30 mL de una disolución saturada de NaCl, se seca con MgSO₄ anhidro y se evapora el disolvente por presión reducida. Se obtienen 372.8 mg de un sólido blanco (2.18 mmol, 93%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ_H 5.21 (1H, t), 3.50 (1H, m), 3.13 (1H, m), 2.54 (1H, m), 2.31 (1H, m), 2.27 (1H, m), 1.91 (1H, m), 1.56 (1H, m), 1.44 (2H, m), 0.92 (d, 6H); ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃) δ_C 174.98, 83.50, 38.69, 36.78, 29.27, 28.75, 26.46, 22.97; HRMS (ESI) *m/z*: [M+Na]⁺ calculado para C₉H₁₇NNaO₂⁺ 194.1151, encontrado 194.1151.

4.3- Síntesis de 5-etoxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona (3)



En un matraz de fondo redondo seco se añaden 372.8 mg de **2** (2.18 mmol), se purga el matraz de fondo redondo con Argon y se disuelve en 10 mL de etanol y se añaden 112 mg de la resina Amberlyst[®] 15. La mezcla de reacción se deja en agitación durante 5 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se filtra el contenido del matraz por gravedad y se concentra por presión reducida.

Para encontrar las condiciones de purificación de **3** por cromatografía de columna, se realizan en primer lugar cromatografías de capa fina (CCF) al crudo del producto obtenido, variando la composición de AcOEt y hexano, hasta obtener una diferencia del $R_f \sim 0.25$ entre el producto de reacción y el producto de partida (**2**), consiguiéndose con una mezcla de AcOEt/hexano 60:40.

Para el aislamiento del producto a partir de los ~400 mg del crudo de reacción se utiliza una columna de 30 mm de diámetro, que se rellena con 16 cm de gel de sílice. Se compacta, haciendo pasar por la columna la fase móvil y acelerando el proceso con una corriente de aire comprimido. A continuación, se introduce el crudo de reacción, y sobre el que se sigue haciendo pasar más eluyente también utilizando aire comprimido. Se recogen una serie de fracciones en tubos que se analizan por CCF de gel de sílice, que se revelan, para localizar la presencia del compuesto. Se reúne el contenido de todos los tubos en los que haya producto de reacción y se evaporan a presión reducida. El producto obtenido son 142 mg. aceite incoloro (0.71 mmol, 33%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ_H 4.95 (1H, t), 3.52 (1H, m), 3.45 (2H, q), 3.07 (1H, m), 2.47 (1H, m), 2.28 (1H, m), 2.13 (1H, m), 1.95 (1H, m), 1.56 (1H, m), 1.42 (2H, m), 1.20 (3H, t), 0.91 (6H, d); ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃) δ_C 174.86, 89.06, 61.35, 38.90, 36.46, 29.24, 26.16, 24.95, 22.70, 15.41; HRMS (ESI) m/z : [M+Na]⁺ calculado para C₁₁H₂₁NNaO₂⁺ 222.1465, encontrado 222.1463.

5- Conclusiones/Conclusións/ Conclusions

Conclusiones

Teniendo en cuenta los objetivos propuestos y los resultados conseguidos, se deducen las siguientes conclusiones:

- Se ha sintetizado el fragmento sintético 5-etoxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona, que se utilizará para la síntesis de la ircinialactama L (Fig. 7).
- Se han obtenido 142 mg del producto final una vez purificado.
- Se han caracterizado correctamente tanto el producto final como los intermedios de síntesis mediante espectrometría de masas de alta resolución y espectroscopia de RMN mono y bidimensional.

Conclusións

Tendo en conta os obxectivos propostos e os resultados obtidos, dedúcense as seguintes conclusión:

- Sintetízase o fragmento sintético 5-etoxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-ona, que se utilizará para a síntese da ircinialactama L (Fig. 7).
- Obtense 142 mg do produto final unha vez purificado.
- Caracterízase correctamente o produto final e os intermedios mediante espectrometría de masas de alta resolución e espectroscopía de RMN mono e bidimensional.

Conclusions

Considering the proposed objectives and the results achieved, the following conclusions can be drawn:

- The synthetic fragment 5-etoxi-1-(3-metilbutil)pirrolidin-2-one has been synthesized, which will be used for the synthesis of ircinialactam L (Fig. 7).
- 142 mg of the final product has been obtained after purification.
- The final product and intermediates have been correctly characterized by high-resolution mass spectrometry and mono- and bi-dimensional NMR spectroscopy.

6- Bibliografía

- (1) Lenaerts, L.; de Clercq, E.; Naesens, L. Clinical Features and Treatment of Adenovirus Infections. *Rev. Med. Virol.* **2008**, *18*, 357–374. <https://doi.org/10.1002/RMV.589>.
- (2) *HAdV Working Group*. <http://hadvwg.gmu.edu/> (fecha de acceso 2023-02-06).
- (3) Waye, M. M. Y.; Sing, C. W. Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 3343–3354. <https://doi.org/10.3390/ph3103343>.
- (4) Carrasco, L.; Almendral del Rio, J. M. *Virus Patógenos*; Serie base (Hélice); Hélice: Madrid, **2006**.
- (5) Dodge, M. J.; MacNeil, K. M.; Tessier, T. M.; Weinberg, J. B.; Mymryk, J. S. Emerging Antiviral Therapeutics for Human Adenovirus Infection: Recent Developments and Novel Strategies. *Antiviral Res.* **2021**, *188*, 105034. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2021.105034>.
- (6) Kinchington, P. R.; Romanowski, E. G.; Jerold Gordon, Y. Prospects for Adenovirus Antivirals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2005**, *55*, 424–429. <https://doi.org/10.1093/jac/dki057>.
- (7) Lynch, J. P.; Kajon, A. E. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *37*, 586–602. <https://doi.org/10.1055/S-0036-1584923>.
- (8) Khanal, S.; Ghimire, P.; Dhamoon, A. The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly. *Biomedicines* **2018**, *6*, 30. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010030>.
- (9) Martínez-Aguado, P.; Serna-Gallego, A.; Marrugal-Lorenzo, J. A.; Gómez-Marín, I.; Sánchez-Céspedes, J. Antiadenovirus Drug Discovery: Potential Targets and Evaluation Methodologies. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 1235–1242. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2015.07.007>.

- (10) Saha, B.; Parks, R. J. Recent Advances in Novel Antiviral Therapies against Human Adenovirus. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1284. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091284>.
- (11) Alcamo, A. M.; Wolf, M. S.; Alessi, L. J.; Chong, H. J.; Green, M.; Williams, J. v.; Simon, D. W. Successful Use of Cidofovir in an Immunocompetent Child With Severe Adenoviral Sepsis. *Pediatrics* **2020**, *145*, e20191632. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-1632>.
- (12) Fanourgiakis, P.; Georgala, A.; Vekemans, M.; Triffet, A.; de Bruyn, J. M.; Duchateau, V.; Martiat, P.; de Clercq, E.; Snoeck, R.; Wollants, E.; Rector, A.; van Ranst, M.; Aoun, M. Intravesical Instillation of Cidofovir in the Treatment of Hemorrhagic Cystitis Caused by Adenovirus Type 11 in a Bone Marrow Transplant Recipient. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *40*, 199–201. <https://doi.org/10.1086/426594>.
- (13) Neofytos, D.; Ojha, A.; Mookerjee, B.; Wagner, J.; Filicko, J.; Ferber, A.; Dessain, S.; Grosso, D.; Brunner, J.; Flomenberg, N.; Flomenberg, P. Treatment of Adenovirus Disease in Stem Cell Transplant Recipients with Cidofovir. *Biol. Blood Marrow Transplant* **2007**, *13*, 74–81. <https://doi.org/10.1016/J.BBMT.2006.08.040>.
- (14) Ronchi, A.; Doern, C.; Brock, E.; Pagni, L.; Sánchez, P. J. Neonatal Adenoviral Infection: A Seventeen Year Experience and Review of the Literature. *J. Pediatr.* **2014**, *164*, 529-535.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.11.009>.
- (15) Zając-Spychała, O.; Pieczonka, A.; Wachowiak, J.; Frączkiewicz, J.; Salamonowicz, M.; Kałwak, K.; Gorczyńska, E.; Kazanowska, B.; Wróbel, G.; Chybicka, A.; Czyżewski, K.; Dziedzic, M.; Wysocki, M.; Zalas-Więcek, P.; Szmydki-Baran, A.; Hutnik; Matysiak, M.; Irga-Jaworska, N.; Biń, E.; Drożyńska, E.; Stolpa, W.; Sobol-Milejska, G.; Pierlejewski, F.; Młynarski, W.; Gryniewicz-Kwiatkowska, O.; Gietka, A.; Dembowska-Bagińska, B.; Semczuk, K.; Dzierżanowska-Fangrat, K.; Gamrot-Pyka, Z.; Woszczyk, M.; Urbanek-Dądela, A.; Karolczyk, G.; Płonowski, M.; Krawczuk-Rybak, M.; Zaucha-Prażmo, A.; Kowalczyk, J.; Goździk, J.; Styczyński, J. Adenovirus Infection among Pediatric Patients with Cancer and in Pediatric Recipients of Hematopoietic Stem

- Cell: A Multicenter Nationwide Study. *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 3187–3193.
<https://doi.org/10.1002/JMV.25756>.
- (16) National Human Genome Research Institute. *Epigenética*.
<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Epigenetica> (fecha de acceso 2023-02-06).
- (17) Productos Naturales Bioactivos de Organismos Marinos de La Península de Yucatán, México. Pech Puch, D. J., Tesis Doctoral, **2020**.
<http://hdl.handle.net/2183/27041>.
- (18) Determinación de la estereoquímica de telepamida y enigmazol C mediante cálculos computacionales, Reacciones de cicloisomerización de 1,5-eninos catalizadas por indio (III), y síntesis total de ircinialactama J. Millán Álvarez, R. E., Tesis Doctoral, **2020**. <http://hdl.handle.net/2183/30567>.
- (19) Sanchez Céspedes, J.; Berastegui Cabrera, J.; Pachón Díaz, J.; Rodríguez González, J.; Jiménez González, C.; Pech-Puch, D. Furan, Thiophene or Gamma-Lactam, Sesterterpene Tetrionic Acids Useful, as Antiviral Compounds against Infections Caused by Human Adenovirus. Número de solicitud: PCT/EP2020/071980, P5160EP00, EP19382697.1. 05/08/2020. Universidade da Coruña y IBIS Campus Hospital Universitario Virgen del Rocío, Servicio Andaluz de Salud. Países a los que se ha extendido: AE, AG, AL, AM, AO, AAT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (20) Lipshutz, B. H.; Kozlowski, J. A. A Reiterative Route to Chiral All-Syn-1,3-Polyols. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1147–1149.
<https://doi.org/10.1021/jo00180a045>.

- (21) Crestey, F. ; Jensen, A. A. ; Soerensen, C. ; Magnus, C.; Busk, ; Andreasen, T. ; Peters, G. H. J. ; Kristensen, J. L.; Crestey, F.; Jensen, A. A.; Soerensen, C.; Magnus, C. B.; Andreasen, J. T.; Peters, G. H. J.; Kristensen, J. L. Dual Nicotinic Acetylcholine Receptor A4 β 2 Antagonists/A7 Agonists: Synthesis, Docking Studies, and Pharmacological Evaluation of Tetrahydroisoquinolines and Tetrahydroisoquinolinium Salts. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1719–1729. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.7B01895>.
- (22) Barco, A.; Benetti, S.; Pollini, G. P.; Baraldi, P. G.; Simoni, D.; Vicentini, C. B. Synthesis of 5-Hydroxy-2-Oxotetrahydropyrroles. *Synthesis (Stuttg)* **1979**, 68–70. <https://doi.org/10.1055/s-1979-28563>.