

Síntesis de nuevos análogos de amantadina, rimantadina y olsetamivir como posibles profármacos con actividad antiviral

Vázquez Miranda Juan Rolando, Martínez Trujillo Enrique, Villanueva Pérez Daniela

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, Ciudad de México, C.P. 04510. México.

*Autor para correspondencia: correolabs3e3f@quimica.unam.mx

Recibido:

10/junio/2022

Aceptado:

30/diciembre/2022

Palabras clave:

Amantadina,
rimantadina,
olsetamivir.

Keywords:

Amantadine,
rimantadine,
olsetamivir

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la síntesis, análisis y caracterización de moléculas análogas de amantadina, rimantadina y olsetamivir, como resultado de la búsqueda y desarrollo de nuevas moléculas con actividad antiviral para el tratamiento de enfermedades respiratorias causadas por virus. Se logró sintetizar cuatro análogos de los antivirales descritos los cuales incluyen en su estructura al ácido cinámico, molécula que se ha reportado que tiene actividad antibacteriana, antiviral y anticancer. Para la síntesis se emplearon los fármacos correspondientes como materia prima y cloruro de cinamoilo como modificador estructural. Las reacciones de síntesis de los análogos fueron seguidas empleando técnicas instrumentales como cromatografía de líquidos de alto desempeño (HPLC) y diversas técnicas espectroscópicas como FTIR y RMN ^1H y ^{13}C , fueron empleadas para la caracterización de las moléculas obtenidas.

ABSTRACT

The synthesis of amantadine, rimantadine and olsetamivir analogs is reported, as part of continuous search and development of new antiviral drugs, for treatment of respiratory infections caused by viruses. The synthesis of four new molecules was achieved, new molecules include a cinnamoyl group added to their primary structure. Cinnamic acid derivatives have been reported to have diverse biological activities such as antibacterial, antiviral and anticancer activities. In order to obtain each new molecule, amantadine, rimantadine and olsetamivir commercial drugs were used as raw material and cinnamoyl chloride was used as the drug structure modifier. All reactions in process controls were followed by chromatography instrumental techniques such as HPLC. Final molecules were characterized by FTIR and NMR ^1H and ^{13}C spectroscopic techniques.

Introducción

La influenza, comúnmente llamada gripe, es una de las principales causas de enfermedad y muerte en todo el mundo. Los brotes de gripe ocurren estacionalmente o en forma de pandemia durante el invierno y principios de la primavera, y se pueden desarrollar enfermedades graves en personas vulnerables (Olsen, 2006).

La pandemia de la gripe española, según la historia registrada, es el brote global más devastador entre todas las enfermedades infecciosas. Esta pandemia se cobró la vida de más de 50 millones de personas, una cifra superior al número de muertes asociadas a la segunda guerra mundial. (Pumarola & Anton, 2018).

Una pandemia de gripe podría cobrarse millones de vidas y perturbar por completo todas las actividades sociales en todo el mundo (Stiver, 2004).

Las pandemias de enfermedades respiratorias son raras, pero pueden ocasionar uno de los desastres naturales más devastadores, como el que acaba de ocurrir con la pandemia del COVID-19, la cual ha causado más de 6,297,253 muertes en todo el mundo. (Recuperado en 2022 <https://news.google.com/covid19/map?hl=es-419&mid=%2Fm%2F02j71&gl=US&ceid=US%3Aes-419>).

De los fármacos antivirales más importantes hoy en día está el Oseltamivir, el cual es un inhibidor de la neuroaminidasa y es uno de los más recomendados por la OMS, se trata de un profármaco que para ejercer su actividad biológica requiere hidrolizarse dentro del organismo. (Normile, 2006).

La 1-adamantilamina (amantadina) y la (α -metil-1-adamantil) metilamina (rimantadina) tienen actividad profiláctica y terapéutica en las infecciones por el virus de la influenza tipo A, e inhiben la replicación del virus en concentraciones micromolares. Su actividad se debe a que inhiben la replicación del virus al bloquear el canal iónico de la proteína M2 de la membrana del virus pequeño. (Zoidis et al., 2006).

El ácido transcinámico se presenta de forma natural en la naturaleza y es el precursor de flavonoides. Tiene un gran potencial terapéutico, ya que tiene actividad antimicrobiana, antifúngica y antitumoral (Rastogi et al., 1998; Said et al., 2004; Neves et al., 2005; Qian et al., 2010).

Se han realizado diversas investigaciones respecto a la utilidad de usar infusiones de canela, que contiene diversos derivados del trans-cinamaldehído, como posibles coadyuvantes en el tratamiento de infecciones

por COVID-19. Dichas infusiones también fueron utilizadas en la medicina tradicional persa, para el tratamiento de enfermedades respiratorias (Yakhchali et al., 2021)

En el presente trabajo se sintetizaron 4 nuevas moléculas que contienen en su estructura los fármacos descritos en las figuras 1 y 2, y a los cuales se les adicionó un grupo cinamoilo para obtener el análogo sintético correspondiente.

En este caso se aprovechó el grupo amino que contienen las moléculas de partida siendo este altamente reactivo en las reacciones de sustitución nucleofílica.

Existen varias publicaciones de la síntesis de los análogos de estos fármacos, sin embargo, no se han encontrado reportados a la fecha, análogos que incluyan un grupo cinamoilo como parte de su estructura. Debido a la importancia farmacológica de los derivados del ácido cinámico se propone como modificador estructural en esta investigación (Ruwizhi & Aderibigbe, 2020).

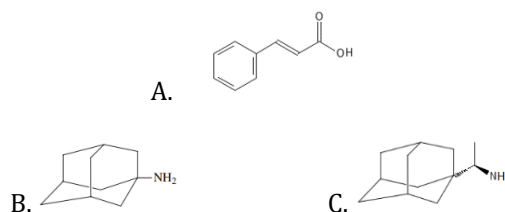


Figura 1. A. estructura del ácido cinámico, B. estructura de la amantadina, C. estructura de la rimantadina.

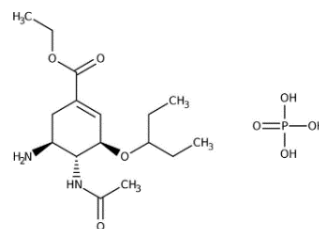


Figura 2. Estructura de fosfato de oseltamivir.

Metodología

Los fármacos empleados se aislaron de tabletas comerciales de las marcas PK-Merz (amantadina), Gabirol (rimantadina) y Alpharma (oseltamivir).

Se emplearon trietilamina (TEA) (Sigma Aldrich), hidróxido de sodio (Sigma Aldrich), ácido acético (J.T. Baker) bicarbonato de sodio (J.T. Baker), diclorometano (Sigma Aldrich), metanol (Sigma Aldrich), acetato de etilo (Mallinckrodt), fosfato de potasio (J.T. Baker), sulfato de sodio (Sigma Aldrich), cloruro de cinamoilo

(Sigma Aldrich) de grado R.A., así como cloroformo y DMSO deuterados (Sigma Aldrich).

Equipo instrumental

Para el seguimiento de las reacciones se empleó un cromatógrafo de líquidos de alto desempeño marca Agilent, modelo 1220 Infinity II LC, equipado con una columna ODS Hypersil de 150 x 4.6 mm, 5 μ m y un detector UV de onda variable.

Los controles de proceso de reacción para los compuestos **1** y **2** se registraron realizando inyecciones de 20 μ L de una dilución 1:10 de la mezcla de reacción en metanol, en el cromatógrafo de líquidos. Se utilizó una fase móvil compuesta por una fase acuosa de ácido acético al 1% mezclada con metanol. La corrida inicia con un 35% metanol, se incrementa hasta 80% metanol en 20 minutos y regresa a 35% en un tiempo de análisis de 30 minutos; con un flujo de columna de 1 mL/min y una longitud de onda del detector de 255 nm.

Los cromatogramas de los productos finales (**1,2,3** y **4**) se obtuvieron inyectando los compuestos a una concentración de 1 mg/mL en metanol: agua 90:10.

Los controles de proceso y productos **3** y **4** se analizaron con el mismo método descrito anteriormente, pero en este caso se usó como fase acuosa un buffer de fosfatos 10 mM pH= 2.5 con 0.1% de TEA.

La caracterización estructural se realizó con un espectrofotómetro FTIR marca Agilent, modelo Cary 630, equipado con ATR y un espectrofotómetro de resonancia magnética nuclear marca Varian de 400 MHz.

Método general para la síntesis de los compuestos 1,2,3 y 4

La síntesis de los compuestos se realizó sometiendo los fármacos previamente aislados a una reacción con cloruro de cinamoilo en diclorometano y empleando una base a baja temperatura, llevándose a cabo una sustitución nucleofílica para obtener el producto de adición del grupo cinamoilo en la molécula de fármaco original. (Figura 3).

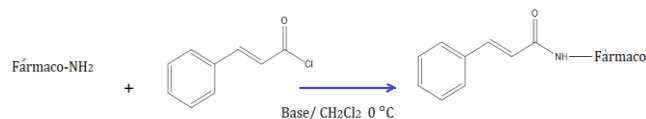


Figura 3. Diagrama de reacción general para obtener los compuestos análogos. **1** (R = oseltamivir), **3** (R = amantadina), **4** (R = rimantadina).

Síntesis del compuesto 1

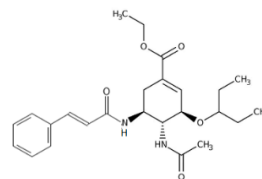


Figura 4. Estructura del compuesto **1**.

El compuesto **1** (figura 4) se preparó colocando en un matraz bola de 50 mL, 75 mg de fosfato de oseltamivir, en diclorometano, se agitó para disolver y se enfrió en un baño de hielo con agitación magnética y una atmósfera de nitrógeno. Posteriormente se adicionaron 4 equivalentes de TEA y 1.2 equivalentes de cloruro de cinamoilo y se dejaron en agitación durante 4 horas hasta llegar a temperatura ambiente.

Se tomaron muestras para verificar el avance de reacción y se analizaron por cromatografía de líquidos de alto desempeño (HPLC); y se trabajó la reacción una vez que esta había concluido.

Para la purificación de este producto se realizaron extracciones con diclorometano y agua con NaHCO₃, posterior a la extracción se conserva la fase de diclorometano (3x50mL) y se lava con agua para quitarle el posible exceso de NaHCO₃. La fase orgánica obtenida se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó el disolvente, y se obtuvo un sólido blanco. Rendimiento 73%.

Síntesis del compuesto 2

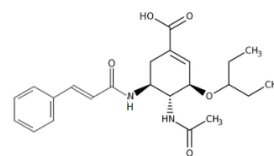


Figura 5. Estructura del compuesto **2**.

El compuesto **2** (figura 5) se preparó colocando en un matraz bola de 50 mL, 50 mg de compuesto **1**, en etanol:agua 80:20, se agitó para disolver y se enfrió en baño de hielo con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno. Posteriormente se adicionaron 5 equivalentes de hidróxido de sodio a partir de una disolución 1molL⁻¹ y se dejó en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente.

Se tomaron muestras para verificar el avance de reacción, mismas que se analizaron por HPLC y se trabajó la reacción una vez que esta había concluido.

Para la extracción de producto obtenido se utilizó acetato de etilo y agua, con el pH previamente ajustado a 2 en la fase acuosa con ácido fosfórico diluido. Se realizaron 2 extracciones con acetato de etilo, que posteriormente se secaron con sulfato de sodio anhidro, se evaporó el disolvente y se obtuvo un sólido blanco. Rendimiento 30%.

Síntesis del compuesto 3

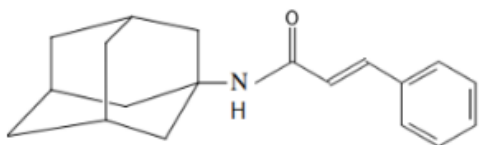


Figura 6. Estructura del compuesto 3.

El compuesto 3 (figura 6) se preparó colocando en un matraz bola de 50 mL, 100 mg de sulfato de amantadina, en diclorometano, se agitó para disolver y se enfrió en baño de hielo con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno. Posteriormente se adicionaron 3.2 equivalentes de TEA y se dejó en refrigeración durante 10 horas a 5 °C.

Se tomaron muestras para verificar el avance de reacción que se analizaron por HPLC, y se trabajó la reacción una vez que esta había concluido.

La purificación del producto se realizó con 3 extracciones con agua a la que se adicionó NaHCO₃, posterior a la extracción se conserva la fase orgánica (3x50mL) y se lava con agua para quitarle el posible exceso de NaHCO₃. La fase de diclorometano obtenida se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó el disolvente, y se obtuvo un sólido blanco. Rendimiento 60%

Síntesis del compuesto 4

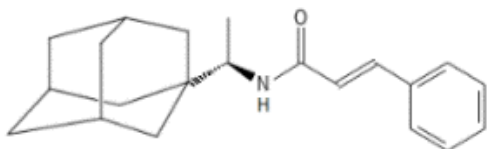


Figura 7. Estructura del compuesto 4.

El compuesto 4 (figura 7) se preparó colocando en un matraz bola de 50 mL, 100 mg de rimantadina, en forma de clorhidrato en diclorometano, se agitó para disolver y se enfrió en un baño de hielo con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno.

Posteriormente se adicionaron 3.2 equivalentes de TEA y se dejó en agitación durante 10 horas hasta que llegó a temperatura ambiente. Se tomaron muestras para verificar el avance de reacción que se analizaron por HPLC, y se trabajó la reacción una vez que esta había concluido. La purificación del producto se realizó con 3 extracciones con agua a la cual se le adiciono NaHCO₃; posterior a la extracción se conserva la fase de diclorometano (3x50mL) y se lava con agua para quitarle el posible exceso de NaHCO₃. La fase de diclorometano obtenida se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó el disolvente, y se obtiene un sólido blanco. Rendimiento 65%.

Resultados y discusión

Resultados del análisis cromatográfico de los compuestos

Controles de reacción

En la figura 8 se muestran los cromatogramas de la mezcla de reacción para obtener el compuesto 1, se puede observar que la reacción es casi instantánea ya que desde el primer control de la reacción queda sólo una pequeña cantidad de la materia prima que es el oseltamivir con un tiempo de retención de 13.9 min. El producto de reacción, compuesto 1 se observa en 17.06 min.

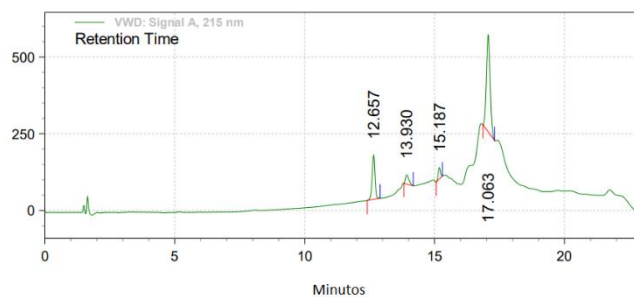


Figura 8. Cromatograma de avance de reacción para la obtención del compuesto 1.

En general, las tres reacciones de sustitución nucleofílica mostraron ser significativamente rápidas y sólo un poco de materia prima quedó sin reaccionar, misma que equivale a un 11 % de área relativa al área del producto.

En la figura 9 se muestra el cromatograma del control del proceso para obtener el compuesto 3, en este caso la amantadina no absorbe en la región UV, sin embargo, se puede observar los picos de la formación del producto (18.6 min), así como de la materia prima (16.57min) y el producto de hidrólisis del cloruro de cinamoilo (14.8min). Al término de la reacción ya no se observa incremento del área del pico del compuesto 3.

Compuesto 2

Ácido (3R,4R,5S)-4-acetamido-5-cinamamido-3-(pentan-3-iloxi)cyclohex-1-ene-1-carboxílico.
 (C₂₃H₃₀O₅N₂, M=414.49 g mol⁻¹)

FTIR (cm⁻¹), 3268 (N-H), 3071 (=CH), 2967 (C-H), 1692, 1647 y 1625 (C=O), 1100 (C-O).

RMN ¹H, DMSO-D₆: Tripletos (6H) 0.74 ppm 0.81 ppm, multiplete (4H) 1.42 ppm, singulete (3H) 1.70 ppm, doble de dobles (1H) 2.20 ppm, doble de dobles (1H) 2.50 ppm, multiplete (1H) 3.38 ppm, multiplete (1H) 3.81 ppm, multiplete (1H) 4.01 ppm, multiplete (1H) 4.08 ppm, multiplete (2H) 6.60 ppm, multiplete (4H) 7.34 ppm, multiplete (2H) 7.50 ppm, doblete (1H) 7.80 ppm, doblete (1H) 7.95 ppm, singulete ancho (1H) 12.5 ppm.

El espectro de RMN ¹H muestra desplazamientos químicos que integran para 30 protones, información que se correlaciona con la estructura del compuesto ya que durante la hidrólisis del compuesto **1** hay una pérdida de un grupo etilo (5 protones).

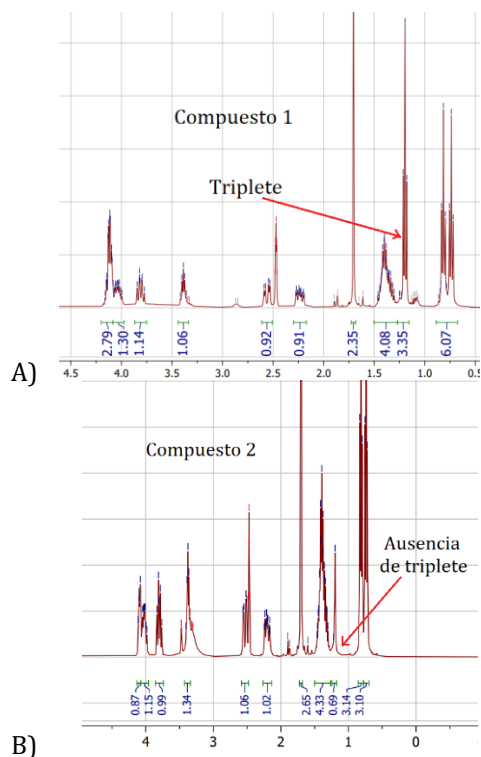


Figura 12. (A) porción del espectro de ¹H del compuesto **1**, (B) porción del espectro del compuesto **2**, se observa la ausencia del triplete debido a la pérdida del grupo etilo en el compuesto **1**.

El espectro del compuesto **2** (figura 12) solo presenta ligeras diferencias respecto al espectro del compuesto **1** debido a la pérdida del grupo etilo. También se observa

una disminución en el área del desplazamiento químico que aparece en 4.11 ppm en el espectro B) de la Figura 12 y en 12.5 ppm aparece el protón de ácido carboxílico.

Compuesto 3

N-((3s,5s,7s)-adamantan-1-il)cinamamida. (C₁₉H₂₃ON M=281.39 g mol⁻¹)

FTIR (cm⁻¹), 3317 (N-H), 3058 (=CH), 3024 (=CH), 2901 y 2849 (C-H), 1615(C=O), 1654 y 1543 (C=C), 1220 (C-N).

RMN ¹H, CDCl₃: singulete ancho (6H) 1.86 ppm, singulete ancho (9H) 2.07 ppm, singulete (1H) 5.49 ppm, doblete (1H) 6.32 ppm, multiplete (3H) 7.30 ppm, multiplete (2H) 7.40 ppm, doblete (1H) 7.50 ppm.

En el espectro se observan desplazamientos químicos que integran para 23 protones información que concuerda con la estructura del compuesto, observándose 2 señales simples y anchas en 1.86 y 2.07 ppm que corresponden a los protones de la estructura de adamantanoilo. También se observa un singulete ancho en 5.49 ppm el cual corresponde al protón de la amida, en 6.32 y 7.50 ppm se observan los dos protones olefinicos del grupo cinamoilo y también se aprecian los 5 protones del anillo aromático en 7.30 y 7.40 ppm.

Compuesto 4

N-(1-((3r,5r,7r)-adamantan-1-il) etil)cinamamida (C₂₁H₂₇ON, M=309.44 g mol⁻¹)

FTIR (cm⁻¹), 3317 (N-H), 3058 (=CH), 3024 (=CH), 2967, 2899 y 2847 (C-H), 1621(C=O), 1651 y 1528 (C=C), 1211 (C-N).

RMN ¹H, CDCl₃: doblete (3H) 1.05 ppm, multiplete (12H) 1.50 ppm, singulete ancho (3H) 1.95 ppm, multiplete (1H) 3.87 ppm, singulete ancho (1H) 5.80 ppm, doblete (1H) 6.49 ppm, multiplete (3H) 7.23 ppm, multiplete (2H) 7.45 ppm, doblete (1H) 7.59 ppm.

En el espectro se observan desplazamientos químicos que integran para 27 protones información que se correlaciona con la estructura del compuesto, observándose un doblete en 1.05 ppm y un multiplete en 3.87 ppm señales que corresponden los sustituyentes metilo y metino presentes en la molécula. Se observan igualmente un multiplete y un singulete en 1.50 y 1.95 ppm que corresponden a las señales de los protones de la estructura de la amantadina, también se observa un singulete ancho en 5.80 ppm el cual corresponde al protón del grupo amida, en 6.49 y 7.59 ppm se observan los dos protones olefinicos del grupo cinamoilo y

también se observan los 5 protones del anillo aromático en 7.30 y 7.40 ppm.

Se registró el espectro de RMN ^{13}C para cada uno de los compuestos sintetizados, los cuales se correlacionan con las estructuras propuestas. Esta información ya no se discute en este trabajo, sin embargo, se puede consultar con el autor.

Conclusiones

El principal objetivo que se planteó en el presente trabajo fue la obtención y caracterización de nuevos análogos de los fármacos empleados, en este caso adicionando una subestructura de ácido cinámico al fármaco original, objetivo que se cumplió. Los compuestos se obtuvieron en general con una pureza aceptable sin requerir mayor purificación que el aislamiento por extracción con disolventes. También los resultados espectroscópicos fueron los esperados ya que la caracterización y asignación de las estructuras fue relativamente directa.

Se pretende continuar con el estudio de las moléculas desarrolladas para determinar si podrán funcionar como profármacos y si la adición del grupo cinámico tiene una repercusión en su actividad antiviral.

Como se revisó en este trabajo, existen reportes sobre la actividad in-vitro del ácido cinámico comparados con otros fármacos comerciales, además de que esta molécula no se ha reportado que tenga efectos tóxicos lo que la hace idónea para continuar con su uso en el desarrollo de nuevas moléculas con posible actividad farmacológica.

Agradecimientos

Se agradece al jefe del Departamento de Química Analítica, Facultad de Química UNAM, Dr. José de Jesús García Valdés† por el apoyo brindado para la realización del presente proyecto y al Dr. Francisco Hernández Luis, Facultad de Química UNAM, por su apoyo para la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear.

Referencias

Neves, F.M., Kawano, C.Y. & Said, S. (2005). Effect of benzene compounds from plants on the growth and hyphal morphology in *Neurospora crassa*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36: 190–195.

Normile D. (2006) Avian influenza: WHO proposes plan to stop pandemic in its tracks. *Science (Wash DC)*. 311: 315–316.

Olsen B., Munster V.J., Wallensten A., Waldenstrom J, Osterhaus A.D., & Fouchier R.A. (2006). Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science (Wash DC)*. 312: 384–388

Pumarola, T. & Anton A. (2018). La Pandemia de gripe de 1918. Una incógnita 100 años después. *Rev Enf Emerg*. 17(2): 63-66.

Qian, Y., Zhang, H.J., Zhang, H., Xu, C., Zhao, J. & Zhu, H.L. (2010). Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of cinnamic acid metronidazole ester derivatives as novel anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18: 4991–4996

Rastogi, N., Goh, K.S., Lionel Horgen, L. & Barrow, W.W., (1998). Synergistic activities of antituberculous drugs with cerulenin and trans-cinnamic acid against *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 21: 149–157.

Ruwizhi N. & Aderibigbe B.A.. (2020). Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, p.5712.

Said, S., Neves, F.M., Griffiths & A.J.F., (2004). Cinnamic acid inhibits the growth of the fungus *Neurospora crassa*, but is eliminated as acetophenone. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 54: 1–6.

Stiver H.G. (2004) The threat and prospects for control of an influenza pandemic. *Expert Rev Vaccines*. 3: 35– 42.

Yakhchali M., Taghipour Z., Ardakani M. M., Vaghasloo M. A., Vazirian M. & Sadrai S. (2021). Cinnamon and its possible impact on COVID-19: The viewpoint of traditional and conventional medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 143, 1122221.

Zoidis G, Fytas C., Papanastasiou I., Foscolos G.B., Fytas G., Padalko E., Clercq E., Naesens L., Neytsb J. & Kolocourisa N. (2006). Heterocyclic rimantadine analogues with antiviral activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 14: 3341-3348.

Página web:

Los datos y estadísticas sobre COVID-19, provienen de ministerios de salud de los Gobiernos, The New York Times y otras fuentes autorizadas, según cómo se asignen.

<https://news.google.com/covid19/map?hl=es-419&mid=%2Fm%2F02j71&gl=US&ceid=US%3Aes-419>