



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Desarrollo de antivirales: diseño y optimización de las propiedades de inhibidores de entrada de los virus dengue y Zika

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Facundo Nahuel Gallo

Directora de tesis: Dra. Mariela Bollini

Codirector de tesis: Dr. Mariano Dellarole

Consejera de estudios: Dra. Diana Elena Wetzler

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION)

Buenos Aires, 2025

Desarrollo de antivirales: diseño y optimización de las propiedades de inhibidores de entrada de los virus dengue y Zika

El virus dengue y el virus Zika son dos arbovirus pertenecientes a la familia *Flaviviridae*. Ambos son causantes de graves enfermedades de gran impacto sanitario a nivel global. El principal vector responsable de la transmisión de estos virus es el mosquito *Aedes aegypti*, el cual se encuentra ampliamente distribuido en nuestro país y en toda la región de las Américas. En la actualidad, no existe ningún tratamiento antiviral específico aprobado para combatir la infección con estos virus.

Tanto dengue como Zika son virus envueltos de genoma de ARN. La partícula viral expone en su superficie numerosas copias de la proteína de envoltura E, la cual está involucrada en las etapas tempranas de la infección. En particular, esta proteína es la responsable de la interacción con los receptores celulares de membrana, el ingreso a la célula por endocitosis, y la fusión de membranas viral y endosomal que resulta en la liberación del genoma viral al espacio intracelular. La estructura cristalográfica de la proteína E del serotipo 2 del virus dengue reveló un bolsillo hidrofóbico ocupado por una molécula de detergente *n*-octil- β -D-glucósido (β -OG). Varios autores han propuesto que la unión de pequeñas moléculas orgánicas al bolsillo β -OG podría bloquear la fusión de membranas y la subsecuente infección. El alineamiento de las secuencias de las proteínas E de dengue y Zika revela una alta tasa de conservación de residuos en la región del bolsillo β -OG, lo cual motiva el desarrollo de antivirales inhibidores de entrada de acción simultánea contra ambos virus.

Estudios previos del laboratorio identificaron moléculas sintéticas con actividad contra el virus del dengue en el orden micromolar bajo. Sin embargo, presentaron inconvenientes a la hora de ser considerados como candidatos terapéuticos debido a su elevada toxicidad, baja solubilidad acuosa, y baja capacidad de permeabilidad de membranas. En el presente trabajo se realizó el diseño, la síntesis y la evaluación biológica de análogos de estas moléculas con el objetivo de encontrar inhibidores eficaces, con menor toxicidad y mejores propiedades farmacocinéticas. Para ello, se seleccionaron candidatos prometedores haciendo uso de herramientas computacionales, los cuales fueron sintetizados y evaluados en términos de su toxicidad celular y actividad antiviral. Luego de sucesivas rondas de optimización se halló el compuesto **19** el cual presenta menor toxicidad y mejor perfil farmacocinético, manteniendo la potencia frente al virus dengue y resultando activo también frente al virus Zika. Se llevaron a cabo ensayos biológicos y biofísicos que permitieron demostrar que el compuesto inhibe las etapas tempranas de la infección, en línea con la hipótesis de trabajo. En resumen, los resultados expuestos en esta tesis representan un avance en las investigaciones para el desarrollo de un antiviral seguro y eficaz contra los virus dengue y Zika.

Palabras claves: virus dengue, virus Zika, antivirales, inhibidores de entrada, química medicinal.

Antiviral drug development: design and property optimization of entry inhibitors targeting dengue and Zika virus

Dengue virus and Zika virus are arboviruses belonging to the *Flaviviridae* family, both responsible for severe diseases that constitute a major global public health concern. The transmission of these viruses is mediated mainly by *Aedes aegypti* mosquitoes, which are widely distributed in Argentina and the Americas. Currently, there is no specific antiviral approved for the treatment of these infections.

Both dengue and Zika are enveloped, positive-sense single-strained RNA viruses. The viral particle exposes several copies of the envelope protein (E) in its surface. This protein is crucial in the early stages of the infection. In particular, the envelope protein is responsible for receptor binding, virus internalization via endocytosis, and fusion of the viral and endosomal membranes, leading to the release of the viral genome into the cytoplasm. The crystal structure of dengue virus serotype 2 E protein revealed a hydrophobic pocket occupied by a molecule of the detergent *n*-octyl- β -D-glucoside (β -OG). Several authors have proposed that small organic molecules interacting with the β -OG pocket could block viral entry and subsequent infection. Sequence alignment of the envelope proteins of dengue and Zika viruses shows a high rate of residue conservation within the β -OG pocket region, which supports the development of entry inhibitors with dual activity against both viruses.

Previous studies from our laboratory have identified synthetic molecules with low-micromolar activity against dengue virus. However, the evaluation of these molecules encountered setbacks due to their high toxicity, low aqueous solubility, and low membrane permeability. In the present work, analogs of these molecules were designed, synthesized and evaluated, aiming to find less toxic inhibitors with improved pharmacokinetic properties. For this purpose, computational approaches were used to rationally design new entities, which were synthesized and evaluated in terms of their antiviral activity and cytotoxicity. Several optimization cycles led to the discovery of compound **19**, which displays lower cytotoxicity and an improved pharmacokinetic profile, maintaining the antiviral potency against dengue virus. This compound was found to be also active against Zika virus. Biological and biophysical assays were performed to determine that the compound inhibits the early stages of the infection, in line with the hypothesis proposed. In summary, the results of this work represent a step forward in the research for the development of a safe and effective antiviral against dengue and Zika.

Keywords: dengue virus, Zika virus, antivirals, entry inhibitors, medicinal chemistry

El trabajo realizado en el marco de esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones en revistas científicas:

- Gallo, F. N., Enderle, A. G., Pardo, L. A., Leal, E. S., & Bollini, M. (2021). Challenges and perspectives in the discovery of dengue virus entry inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 29(4), 719–740. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210521213118>
- Gallo, F. N., Márquez, A. B., Fidalgo, D. M., Dana, A., Dellarole, M., García, C. C., & Bollini, M. (2024). Antiviral drug discovery: Pyrimidine entry inhibitors for Zika and dengue viruses. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 272, 116465. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116465>

A su vez, un trabajo de colaboración internacional dio lugar a la publicación del siguiente artículo:

- Loaiza-Cano, V., Pardo-Rodriguez, D., Vázquez, C. A., Restrepo, M. P., Burgos, J. C., Avila, J. S., Gallo, F. N., Dellarole, M., Cordo, S. M., García, C. C., Galeano, E., Zapata, W., Ruiz-Saenz, J., & Martinez-Gutierrez, M. (2025b). Antiviral in vitro activity of a novel dichlorinated tyrosine methyl ester derivative against the infection of two flaviviruses of public health concern, Dengue and Zika virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 775, 152057. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.152057>

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerle a la mejor directora que cualquier becario podría tener. Gracias Marie por aceptarme, por confiar en mí, por todas tus enseñanzas, por el trato diario, por las charlas, los consejos, por estar presente en cada paso que di en este camino y por hacerme brillar como sólo vos sabes hacerlo. Gracias Mariano por tu rol como codirector, por el acompañamiento a lo largo de estos años, por las ideas y las discusiones enriquecedoras.

Al comité de seguimiento: Dra. Diana Elena Wetzler, Dr. Fernando Durán y Dra. María Florencia Martini, por todas las ideas, las orientaciones y las sugerencias. Por haberse comprometido con este trabajo. A Diana en particular por haber estado presente, desde tu rol de consejera de estudios, siempre que necesité algo a lo largo de todos estos años.

Al jurado de esta tesis: Dra. Andrea Medeiros, Dr. Fernando Durán y Dra. Andrea Barquero, por haberse tomado el tiempo y la dedicación de evaluar este trabajo. Por aportar desinteresadamente a mi formación profesional.

A la Dra. Cybele García y todo su grupo de investigación por haberme abierto las puertas de su laboratorio. Gracias por las enseñanzas y el entrenamiento en temáticas novedosas para mí. En particular a la Dra. Agostina Márquez por el enorme compromiso, esfuerzo y dedicación en los experimentos que forman parte de esta tesis. Tu aporte a este trabajo es invaluable.

Al Dr. Diego Álvarez y a todos los integrantes del grupo de virología de la UNSAM: Male, Eli, Guada, May, Dani, Noe, Facu y Loren. Por haberme aceptado en su grupo, enseñarme, acompañarme y guiarme. Me llevo muchísimo de los días que compartí con ustedes. En especial a Diego por la ayuda desinteresada, por el afecto diario y la confianza.

A todos los integrantes del grupo de Química Medicinal, por haber hecho que cada día valga la pena. Me cuesta dimensionar lo afortunado que fui de haber compartido mi doctorado en este lugar y con ustedes. A aquellos que estuvieron cuando empecé y me acompañaron durante mis primeros pasos. Gracias Emi por todo el entrenamiento y por permitirme continuar tu línea de trabajo. Gracias Nati por transmitirme tus experiencias y por la ayuda cuando aparecían problemas, por tu calidez como compañera y como amiga. Gracias Nico por las charlas y los consejos.

A todos mis compañeros de grupo: Ale Dana, Jime, Agos, Dani, Abril, Ale Cristóbal, Dany y Cruz. Gracias por todos los momentos compartidos, por la alegría de todos los días, por estar ahí para prenderme el AnyDesk. Gracias por el diálogo cotidiano, la escucha y la ayuda para sobrellevar el día a día. Gracias por la amistad y compañerismo dentro y fuera del laboratorio, por cada mate, por cada birra. Gracias por conformar un grupo de excelentes profesionales y aún mejores personas. A Dany, en particular, gracias por la ayuda y el acompañamiento durante todo el trayecto, siempre con la palabra justa, la escucha empática y la buena onda diaria.

A Ori, mi gran compañera de doctorado. Gracias por todos los momentos vividos, por las risas y los llantos, por la escucha y el apoyo mutuo, por el aprendizaje compartido. A Rodri por la compañía diaria, las charlas, los mates, y por colaborar con el buen funcionamiento del labo.

A los chicos y chicas de Física: Lu López, Gonza, Alan, Lu Martínez, Flor Choque, Flor Edorna, Ana, Nahuel, Florián y Facu. Gracias por hacer de la oficina un lugar ameno, por todos los almuerzos, los mates, los *after office*, las charlas, los chismes. Gracias por la hermosa convivencia que supimos tener estos años.

A los chicos de Masa: Nico, Maxi, Majo. Gracias por la buena predisposición cada vez que necesité una mano. Gracias a Marie García y a Marie Videla, por toda su ayuda con los experimentos del espectrómetro de masas y, más que nada, gracias por la calidez humana, la amistad y el cariño a lo largo de todos estos años.

A los investigadores del Instituto: Gracias Andi por todas las veces que nos alegraste con comida y chistes. Gracias Pablo por tu ayuda con los RMN y por las discusiones valiosas. Gracias Leo, por presentarme a Marie y al CIBION. Gracias Lu por cada charla, cada consejo, por la escucha, y por ser una gran referente como investigadora y, más aún, como persona. Gracias a todos los que trabajan en CIBION y que aportan al buen clima de trabajo. A Javi, a Santi, a Nati. Y, por supuesto, a Pedro por admitirme en el Instituto y confiar en mí.

A todos los que me acompañaron durante cada paso de la licenciatura, cada materia, cada noche de estudio, cada examen. A Vicky y Naza, mis amigas más leales. Recuerdo con mucha alegría cada momento vivido juntos, las cursadas, las tardes en la biblioteca, las salidas. A Mar, a Dani Putrino, a Lorenzo, y a tantos otros queridos amigos y compañeros. Qué alegría haber podido compartir tantas cosas con gente tan piola.

A Magui y a Ceci, mis grandes amigas de la facultad. Gracias por dejarme ser parte de sus vidas, por los infinitos momentos compartidos y por todos los que nos quedan por vivir. Son muy importantes para mí. Al Carto y a Karen, mis mejores amigos. Gracias por la amistad sincera y real. Agradezco poder crecer juntos. A Nahuel, mi amigo de siempre, por muchos años más.

A mi familia. A mamá, a papá, a Franco. A mis tíos, a mi tía y a mis primos. Gracias por ser el soporte incondicional y por acompañarme en cada momento de mi vida. Este logro se los debo a ustedes también.

A Mauro, mi gran compañero. Gracias por elegirme, por acompañarme, por cuidarme y por contenerme en los momentos más difíciles. Gracias por compartir la vida conmigo.

A mis abuelas, eternamente gracias por la crianza. Sin ustedes yo no estaría acá.

Por último, a la Universidad de Buenos Aires y a mi querida Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por la formación de excelencia. A la Técnica 27 por sembrar la semilla. A cada uno de mis docentes. Y a la educación pública de calidad, sin la cual yo no estaría en este lugar.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Desarrollo de fármacos	3
1.2 Enfermedades virales	11
1.3 Incidencia e impacto regional y global de los virus dengue y Zika	17
1.4 Características de la partícula viral y ciclo de infección	23
1.5 Estado del arte de terapias para la prevención y el tratamiento de infecciones por dengue y Zika	26
2. Hipótesis y objetivos de trabajo	31
3. Diseño y síntesis de potenciales antivirales	35
3.1. Antecedentes	37
3.2. Identificación de potenciales inhibidores a través de diseño computacional	39
3.3. Síntesis química y evaluación biológica de candidatos	42
3.4. Análisis de la interacción ligando-proteína por dinámica molecular	48
3.5. Discusión	53
4. Optimización de compuestos	55
4.1. Primera ronda de optimización: Reemplazo del motivo bifenilo	57
4.2. Análisis de la interacción ligando-proteína por dinámica molecular	61
4.3. Segunda ronda de optimización: Exploración de la funcionalidad del grupo bencilamina	68
4.4. Confirmación de la actividad antiviral del compuesto 19	76
4.5. Determinación del mecanismo de acción	81
4.6. Discusión	91
5. Estudio y caracterización del perfil farmacocinético	95
5.1 Introducción	97
5.2 Estudios de solubilidad	99
5.3 Estudios de permeabilidad	103
5.4 Estudios de estabilidad	106
5.5 Discusión	111
6. Conclusiones y perspectivas	115
7. Materiales y métodos	121
7.1. Simulaciones computacionales	123
7.2. Síntesis química	125
7.3. Ensayos biológicos	150
7.4. Ensayos fisicoquímicos y farmacocinéticos	155
Referencias	161
Anexo	181

Capítulo 1

Introducción

1.1. DESARROLLO DE FÁRMACOS

En el último tiempo, los avances en la medicina han transformado profundamente la calidad de vida de la población a nivel mundial. Entre otros factores, el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades han influido de forma directa en este fenómeno [1]. El descubrimiento azaroso de la penicilina en 1928 como agente terapéutico para tratar infecciones bacterianas marcó un hito sin precedentes, salvando millones de vidas durante la Segunda Guerra Mundial [2]. Este hecho impactó directamente en la manera de concebir la investigación destinada al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, fomentando el desarrollo de tecnologías específicas y potenciando los recursos destinados por parte de entes privados y gubernamentales [3]. A pesar de los enormes avances logrados en estos años, numerosas problemáticas persisten al día de hoy. Un gran número de enfermedades actuales carecen de medicinas específicas para su tratamiento y prevención. El creciente número de agentes patógenos, producto de mutaciones genéticas y desarrollo de resistencia, agravado por la facilidad de propagación debido a factores migratorios, plantea desafíos permanentes para el control de las enfermedades infecciosas a nivel global. Además, un gran número de personas se ven actualmente expuestas a nuevos estilos de vida sedentarios y presiones sociales y laborales extremas, lo que favorece la aparición de enfermedades como la obesidad, diabetes, o trastornos de la salud mental. Por todo esto, el desarrollo de nuevas medicinas para mejorar la salud de la población global sigue siendo una demanda actual [4].

Un fármaco es una entidad química o biológica que posee un efecto farmacológico beneficioso para el organismo. Un medicamento se compone de uno o más fármacos, también denominados principios activos, junto con excipientes que determinan el modo de administración e influyen en los procesos de liberación y la biodisponibilidad del principio activo [5]. Los fármacos pueden tener un origen natural o sintético. En el período 1981-2019 se aprobaron 1740 nuevos fármacos, de los cuales el 75% son de origen sintético o semisintético, mientras que los agentes terapéuticos provenientes de fuentes naturales representan solamente el 5% del total (Figura 1.1) [6]. El restante 20% corresponde a sustancias bioactivas de origen biológico, cuyas estructuras incluyen desde pequeños péptidos hasta proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales y ácidos nucleicos. En general, estos biofármacos se obtienen mediante técnicas biotecnológicas complejas, como la expresión en bacterias u hongos. Estas estructuras grandes y complejas suelen presentar alta especificidad y selectividad, pudiendo interactuar con blancos biológicos que resultan inaccesibles para entidades químicas. Sin embargo, requieren de extensivos análisis de control, condiciones de almacenamiento específicas, y excipientes que protejan al principio activo de una degradación rápida, lo cual aumenta el costo de estos medicamentos limitando su implementación [7, 8].

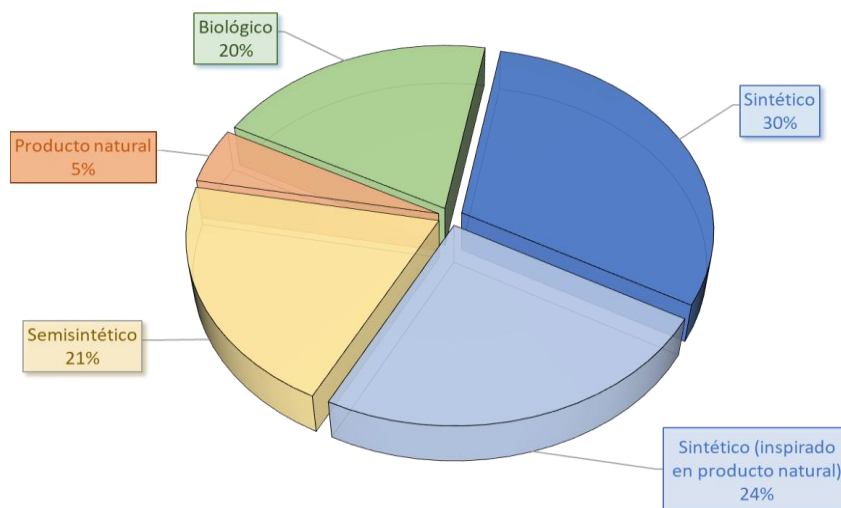


Figura 1.1. Origen de los fármacos aprobados en el período comprendido entre el 1 de enero de 1981 y el 30 de septiembre de 2019, sobre un total de 1740 entidades [6].

Históricamente, los productos naturales obtenidos a partir de extractos de plantas medicinales han sido la fuente primaria de agentes terapéuticos. En la actualidad, un gran número de medicamentos comerciales son principios activos aislados de diversas fuentes naturales. Los productos naturales, en general, poseen estructuras químicas complejas y diversas, difíciles de obtener de forma sintética. Sin embargo, los problemas para la producción de biomasa a gran escala, junto con los desafíos que lleva la purificación y caracterización del principio activo limitan su potencial como medicamentos comerciales [8].

El desarrollo de moléculas sintéticas para la búsqueda de nuevos fármacos es complementario al uso de productos naturales, ya que ambas estrategias proveen acceso a compuestos estructuralmente diferentes. En la actualidad, las moléculas orgánicas pequeñas obtenidas de manera sintética representan más del 50% de los fármacos comerciales. De hecho, la mayoría de los medicamentos de administración oral son moléculas orgánicas que cumplen con las reglas de Lipinski, una serie de reglas empíricas que delimitan valores máximos de masa molecular, lipofilicidad y cantidad de grupos donores y aceptores de puente de hidrógeno [9].

Estas moléculas orgánicas pequeñas con actividad biológica pueden surgir de bibliotecas de compuestos, o bien pueden ser diseñadas de forma racional a partir de la información disponible. En algunos casos, las estructuras de productos naturales bioactivos pueden usarse como inspiración para el diseño racional de fármacos [10]. A modo de ejemplo, el captopril es un antihipertensivo descubierto en 1977, diseñado a partir de la estructura de la bradiquinina, un péptido obtenido del veneno de una serpiente con propiedades vasodilatadoras. Pese a la respuesta farmacológica favorable de la bradiquinina, el péptido poseía un alto grado de inestabilidad por lo cual no resultaba adecuado para su administración en un organismo. La estructura de la bradiquinina fue tomada en cuenta al momento de diseñar el captopril, el cual presentó propiedades adecuadas y dio lugar al surgimiento de una nueva clase de fármacos para el tratamiento de la presión arterial [11, 12].

El desarrollo de fármacos semisintéticos permite ampliar el espacio químico de los medicamentos, habilitando la obtención de moléculas sintéticas de alta complejidad. Estos fármacos son producidos mediante reacciones químicas sobre productos naturales, modificando estratégicamente determinados fragmentos moleculares para modular las propiedades fisicoquímicas y biológicas. Actualmente, se emplea una nueva generación de antibióticos derivados de la penicilina para el tratamiento de infecciones bacterianas. Estos fármacos, entre los que se puede mencionar a la ampicilina o la amoxicilina, son obtenidos a partir de modificaciones químicas sobre la penicilina, producida en primer lugar por fermentación industrial en biorreactores [13, 14, 15].

El desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso altamente complejo, que requiere de la integración de conocimientos provenientes de distintas disciplinas, tales como la biología molecular, la farmacología, la síntesis orgánica, la química biológica y la medicina, entre otras [16]. Este proceso usualmente involucra entre 10 y 15 años de trabajo desde el descubrimiento del principio activo hasta la aprobación de la forma farmacéutica, y en promedio requiere de una inversión de alrededor de 1400 millones de dólares [17]. Los costos y tiempos de aprobación pueden variar dependiendo de la urgencia y de la cantidad de gente que resulta afectada por la enfermedad. En general, los costos de desarrollo de medicamentos huérfanos (medicamentos usados para tratar enfermedades raras y poco frecuentes) suelen ser menores [8]. Por ejemplo, el costo de desarrollo del fexinidazol, un antiparasitario utilizado para tratar la tripanosomiasis africana causada por *Trypanosoma brucei*, fue de 55 millones de dólares [18]; mientras que, por otro lado, el desarrollo de agentes antineoplásicos e inmunomoduladores ronda en promedio los 4400 millones de dólares [19].

Además, la tasa de éxito de un proyecto de descubrimiento de fármacos es baja. Numerosos candidatos fallan en ensayos clínicos debido a problemas asociados con la eficacia y seguridad requeridas para salir al mercado [20]. Según la FDA (*Food and Drug Administration*, entidad reguladora de medicamentos de los Estados Unidos), entre los años 2015 y 2020 se aprobaron 245 nuevos medicamentos, de los cuales 164 son pequeñas moléculas orgánicas. A partir de estos datos, se puede inferir que solamente 1 de cada 8000-10000 candidatos evaluados logran cumplir con los requisitos para salir al mercado [21]. Debido a esto, uno de los principales desafíos de la comunidad dedicada a la investigación farmacéutica consiste en llevar a cabo un proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos lo más eficiente posible [22].

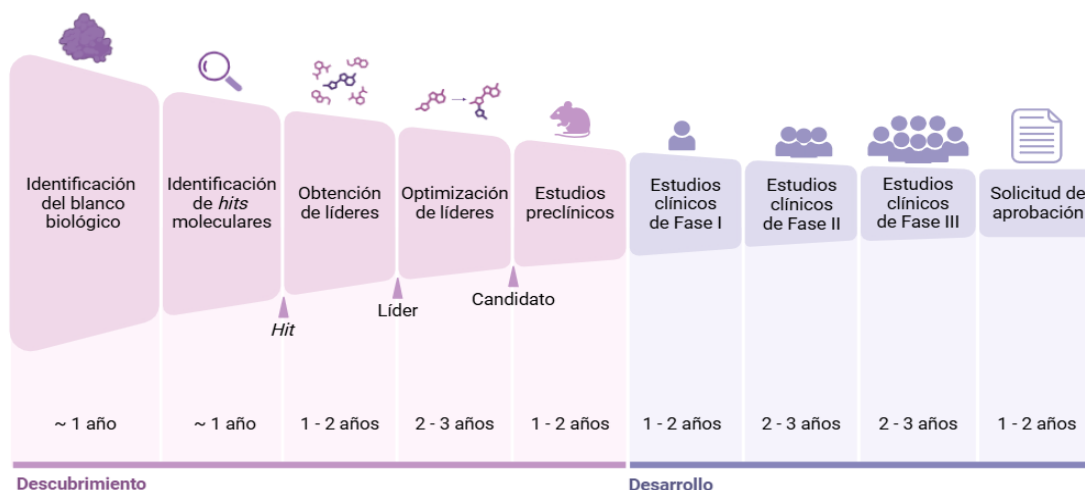


Figura 1.2. Esquema de las etapas que comprende el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos.

En líneas generales, este proceso puede separarse en una primera fase de descubrimiento, y una instancia posterior de desarrollo. A su vez, estas fases pueden subdividirse en una serie de etapas, esquematizadas en la [Figura 1.2](#). La motivación que da inicio a una campaña de descubrimiento y desarrollo de un medicamento comienza con la identificación de la enfermedad o condición clínica que requiere tratamiento. A partir del estudio de los mecanismos fisiológicos y rutas metabólicas involucradas en la enfermedad, se obtiene información de utilidad para generar la hipótesis de trabajo, cuyo fundamento se basa en que la inhibición o modulación del blanco biológico resulta en un efecto terapéutico beneficioso frente a la condición o patología que se desea tratar. Un blanco es una entidad biológica, accesible al fármaco, cuya interacción produce una respuesta fisiológica en el organismo. La mayoría de los blancos biológicos son proteínas, pero también material genético u otros componentes celulares pueden funcionar como blancos [23].

Los *hits* moleculares son estructuras químicas con la capacidad de modular la función biológica del blanco y ejercer un efecto beneficioso. Para la identificación de *hits*, se debe explorar el espacio químico de manera eficiente. Para ello, existen distintas estrategias que permiten evaluar eficazmente la actividad biológica de gran cantidad de compuestos. El cribado de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés *high-throughput screening*) consiste en el desarrollo y empleo de ensayos robustos y automatizables que permiten conocer la actividad de compuestos a una concentración determinada de manera simple, rápida y a gran escala. Complementariamente, el uso de herramientas computacionales permite la evaluación rápida y simultánea de numerosas bibliotecas virtuales de moléculas. Estas simulaciones por computadora arrojan como resultado posibles *hits*, que luego deberán ser confirmados en experimentos *in vitro*. La calidad de los *hits* encontrados en las etapas tempranas de un proyecto de descubrimiento de fármacos es un factor importante en relación a la probabilidad del éxito que pueda tener el candidato resultante en posteriores estudios clínicos [24].

La identificación de *hits* puede llevarse a cabo a partir de dos enfoques: el cribado fenotípico y el cribado basado en el blanco. En el cribado fenotípico se estudia un organismo que presenta un determinado fenotipo asociado a una enfermedad, y se evalúan bibliotecas de compuestos con el fin de identificar aquellas moléculas activas y no tóxicas. En este enfoque se desconoce la relación entre el efecto biológico y el mecanismo de acción del compuesto. En cambio, en el cribado basado en el blanco se seleccionan moléculas capaces de unirse selectivamente al blanco biológico de interés, lo que permite aplicar el conocimiento disponible acerca de los mecanismos biológicos involucrados en la enfermedad. Además, esta estrategia habilita el uso de herramientas computacionales para realizar cribados virtuales, utilizando un modelo tridimensional de la estructura de la proteína o blanco biológico para simular la interacción con ligandos [25].

La fase de obtención de compuestos líderes, también llamada *hit-to-lead*, se basa en refinar la estructura química de los *hits* con el fin de generar moléculas más potentes y selectivas [23]. Para ello, se exploran intensivamente las relaciones estructura-actividad (SAR, por sus siglas en inglés *structure-activity relationships*) introduciendo modificaciones químicas sistemáticas sobre los distintos fragmentos de los *hits* seleccionados, lo que da lugar a la obtención de series de moléculas estructuralmente similares. Una molécula líder será aquella que presente la relación más favorable entre actividad biológica y efectos farmacológicos adversos [26]. Los compuestos líderes son luego sometidos a sucesivos ciclos de optimización racional, con el fin de obtener un candidato apto para ser evaluado en ensayos preclínicos en modelos animales. En esta etapa se evalúan los factores que influyen en la absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad (propiedades ADMET) de los compuestos líderes, con el fin de maximizar la eficacia minimizando los posibles efectos adversos [27].

La etapa de descubrimiento finaliza con la realización de ensayos preclínicos en modelos animales competentes, en donde se evalúa la potencia, seguridad, farmacocinética y farmacodinámica del candidato, con el fin de determinar las dosis aptas y formulaciones adecuadas para comenzar las pruebas en humanos. Posteriormente, comienza la etapa de desarrollo clínico del candidato que consta de cuatro fases. En los estudios clínicos de fase I se evalúa la tolerancia y seguridad de la droga en un número pequeño de voluntarios sanos (entre 10 y 100). Las pruebas de fase II estudian la eficacia clínica de la droga, es decir, la capacidad de revertir el estado de enfermedad, en un número mayor de pacientes (entre 50 y 500). La mayoría de los candidatos suelen fallar en esta fase debido a problemas relacionados con la eficacia y seguridad. Los estudios de fase III sirven para confirmar la efectividad del candidato, a partir de su evaluación en un mayor número de pacientes. Un resultado favorable habilita efectuar la solicitud de aprobación del nuevo medicamento a las autoridades regulatorias. Luego de que la droga es lanzada al mercado, es necesario continuar estudiando los efectos que puede provocar a largo plazo o en poblaciones particulares, en lo que se conoce como fase IV de los estudios clínicos o fase de farmacovigilancia. En esta etapa también se analizan las posibles interacciones droga-droga o droga-enfermedad. Los resultados de estos estudios pueden alterar las indicaciones del medicamento o, incluso, el retiro del mercado si se detectan efectos adversos [27].

La química medicinal es el área de estudio que involucra el descubrimiento de un agente farmacéutico capaz de ejercer un efecto farmacológico beneficioso en un organismo. Comprende aspectos de la identificación, preparación e interpretación del modo de acción de los compuestos biológicamente activos desde un punto de vista molecular [5]. La química medicinal juega un papel fundamental en las etapas tempranas de las campañas de descubrimiento de fármacos. Un químico medicinal contribuye al proceso a partir del planteo de hipótesis y toma de decisiones respecto a los compuestos a preparar, evaluar y optimizar; la síntesis, purificación y caracterización de las moléculas bioactivas; la exploración de relaciones estructura-actividad en una serie de compuestos para potenciar sus propiedades; la preparación de las moléculas líderes para los posteriores ensayos *in vivo*, lo que involucra la evaluación de las propiedades ADMET con el fin de maximizar la eficacia minimizando los posibles efectos adversos; y la integración de saberes con conocimientos de otras disciplinas, tales como la bioinformática, la biología estructural y la farmacología clínica [28, 29].

La integración de modelos computacionales predictivos provee información valiosa que puede ser usada para guiar los experimentos y la toma de decisiones en el marco del diseño racional de fármacos, aumentando la eficiencia del proceso al disminuir costos y tiempos de trabajo. Las simulaciones computacionales pueden abordarse principalmente desde dos enfoques: el diseño basado en estructura y el diseño basado en ligando. El diseño basado en ligando consiste en el desarrollo de modelos predictivos teóricos basados en información disponible de compuestos con actividad conocida, con el objetivo de identificar nuevas moléculas con características similares. La identificación de farmacóforos y el estudio de relaciones cuantitativas entre estructura y actividad son dos de los métodos más empleados de diseño basado en ligando. Estos métodos no requieren información del blanco biológico; sin embargo, su principal limitación radica en la necesidad de contar con un número suficiente de compuestos activos y estructuralmente diversos, información que en muchos casos no se encuentra disponible. Para el diseño basado en estructura, se necesita disponer de un modelo tridimensional de la estructura del blanco biológico, sobre la cual se predice la afinidad de posibles ligandos. Las estructuras de los blancos pueden ser obtenidas por técnicas biofísicas como cristalografía de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear o criomicroscopía electrónica [30, 31]. La base de datos *Protein Data Bank* posee actualmente más de 225000 estructuras tridimensionales obtenidas experimentalmente, y más de 1000000 de estructuras obtenidas por modelado computacional, accesibles y descargables para su empleo [32].

Las simulaciones de acoplamiento molecular constituyen uno de los métodos basados en estructura más empleados en el contexto de descubrimiento de nuevos fármacos. El objetivo de estas simulaciones es predecir si un compuesto es capaz de unirse a un sitio determinado del blanco proteico, identificar la conformación más estable de ese ligando el sitio de unión y estimar la afinidad de unión del complejo. Para ello, los programas de acoplamiento utilizan un algoritmo de búsqueda que genera las posibles poses del ligando en el sitio de simulación, y una función de puntaje que las evalúa e identifica la pose más favorable [33]. Las funciones de puntaje realizan cálculos aproximados, priorizando la rapidez y el bajo costo computacional, por lo que no están diseñadas para obtener un resultado preciso de la energía de unión ligando-proteína.

Sin embargo, estas simulaciones permiten realizar estudios de cribado virtual de alto rendimiento de manera sencilla, evaluando grandes bibliotecas de compuestos y, de esa forma, explorando gran parte del espacio químico [34].

En un experimento tradicional de acoplamiento molecular, la estructura del ligando se considera flexible mientras que la de la proteína permanece rígida. Sin embargo, una proteína es un sistema dinámico cuya estructura fluctúa continuamente en función de los estados conformacionales a los que puede acceder, ocupando con mayor frecuencia aquellos estados de menor energía. En algunos casos, los ligandos pueden interactuar solamente con algunas de estas estructuras, por lo que las simulaciones de acoplamiento molecular pueden arrojar resultados que no reflejen el comportamiento real del sistema, dado que utilizan una de todas las conformaciones posibles del ensamble [35]. Existen estrategias para incorporar información acerca de la flexibilidad conformacional de la proteína en las simulaciones de acoplamiento; sin embargo, esto aumenta la complejidad y el costo computacional del proceso, volviéndolo ineficiente para cribados de alto rendimiento [36].

Las simulaciones de dinámica molecular conforman un método computacional ampliamente usado para evaluar el espacio conformacional accesible de una proteína, o de un complejo ligando-proteína. Una dinámica molecular clásica simula la evolución temporal del sistema a través de la resolución de las ecuaciones de movimiento clásicas para cada partícula del sistema, teniendo en cuenta el campo de fuerzas que actúa sobre ellas en todo momento. Para ello, cada átomo que forma parte del sistema es parametrizado teniendo en cuenta su identidad y su entorno químico. Este muestreo conformacional arroja como resultado una sucesión de configuraciones que representa la trayectoria recorrida por el sistema durante el tiempo de simulación, lo que permite estudiar la dinámica de interacción entre un ligando y su blanco biológico [37]. Los recursos computacionales requeridos para llevar a cabo una simulación de dinámica molecular son ampliamente mayores en relación a los requisitos de una simulación de acoplamiento, por lo que estos estudios suelen llevarse a cabo sobre un número menor de compuestos, con el fin de refinar los resultados de las simulaciones de acoplamiento, elucidar el modo de unión y obtener información acerca de las posibles interacciones entre ligando y proteína [38]. Es posible también estimar la energía libre de unión de un complejo ligando-proteína de manera más rigurosa a partir de técnicas basadas en simulaciones de dinámica molecular. Los métodos de integración termodinámica y energía libre de perturbaciones son técnicas altamente precisas, pero de costo computacional muy elevado. Por otra parte, los cálculos de mecánica molecular MM/PBSA o MM/GBSA (por sus siglas en inglés, *Molecular Mechanics / Poisson-Boltzmann Surface Area* o *Molecular Mechanics / Generalized Born Surface Area*) son métodos frecuentemente empleados, ya que estiman adecuadamente la energía libre de unión con un costo computacional 10 veces menor en comparación con el de las otras técnicas [33].

Si bien las simulaciones de acoplamiento y dinámica molecular son de los métodos de diseño basado en estructura más empleados, existen otras técnicas alternativas con enfoques complementarios. El diseño *de novo* es una estrategia que evalúa las características del sitio de unión de una estructura proteica y genera una serie de fragmentos moleculares con grupos funcionales adecuados para interactuar con las distintas regiones del bolsillo. Luego, los fragmentos son conectados de manera cohesiva para la generación de bibliotecas de moléculas diseñadas específicamente para el sitio de unión [36].

En los últimos años, el desarrollo de tecnologías basadas en inteligencia artificial ha impactado profundamente en innumerables aspectos de la investigación científica. La incorporación de estas nuevas tecnologías en el proceso de desarrollo de fármacos tiene el potencial de redefinir las metodologías tradicionales del diseño racional, optimizando tiempos y recursos. En la actualidad, existen herramientas que usan inteligencia artificial para realizar cribados de alto rendimiento, generación de bibliotecas de ligandos, desarrollo de modelos predictivos de propiedades ADMET, de interacciones droga-droga o droga- enfermedad, y análisis multi-ómicos para la identificación de blancos biológicos relevantes, entre otras aplicaciones [39, 40]. A modo de ejemplo, el modelo predictivo de estructura de proteínas AlphaFold ha demostrado un alto grado de precisión en la generación de estructuras proteicas no resueltas experimentalmente, impactando directamente en el desarrollo de estrategias de diseño basado en estructura [41, 42]. Si bien, hasta el momento, ninguna medicina diseñada con inteligencia artificial ha sido aprobada, nuevas moléculas para el tratamiento de enfermedades como el síndrome del X frágil o la fibrosis pulmonar idiopática se encuentran actualmente en estudios clínicos de fase II [43].

1.2. ENFERMEDADES VIRALES

Los virus son agentes biológicos capaces de infectar organismos vivos, constituyendo una de las principales causales de enfermedades a nivel global. A diferencia de otros patógenos como bacterias, hongos o parásitos protistas, los virus no son organismos celulares. Las partículas virales, denominadas viriones, son de composición simple y tamaño pequeño, que puede variar desde los 17 nm (circovirus porcino) hasta los 1200 nm de largo (*Pithovirus*) [44]. Están formados por material genético de ADN o ARN recubierto por una cápside proteica, que puede presentar geometría helicoidal o icosaédrica. Algunas familias de virus poseen una envoltura que recubre la cápside, formada principalmente por una bicapa lipídica asociada a glicoproteínas o proteínas transmembrana (Figura 1.3).

Los virus son parásitos intracelulares obligados, por lo que dependen estrictamente de la maquinaria celular para replicarse. Necesitan hospedarse en organismos vivos ya que carecen de sistemas para la producción de energía y síntesis de proteínas, por lo cual no pueden crecer en medios artificiales. El genoma viral posee la información que codifica para las proteínas que conforman la estructura del virus, así como proteínas no estructurales relacionadas con funciones de replicación y ensamblaje de nuevos viriones [45].

El concepto de virus surgió a fines del siglo XIX, a partir del estudio de la enfermedad del mosaico del tabaco. Al obtener extractos de plantas afectadas para investigar la naturaleza de la enfermedad, se encontró que ésta era causada por un agente patógeno transmisible pero que no podía ser aislado ni detectado en los extractos. Además, el agente infeccioso no podía ser retenido por filtros para separar bacterias. Subsecuentes experimentos demostraron que el agente infeccioso sólo podía aumentar su capacidad infectiva cuando se cultivaba en tejidos o células vivas. Estas observaciones llevaron a los investigadores a desarrollar el concepto de virus como agentes infecciosos de menor tamaño que las bacterias, no visibles al microscopio óptico, y capaces de reproducirse solamente en tejidos o células vivas. La primera imagen del virus del mosaico del tabaco fue obtenida recién en 1939 a partir del desarrollo de la microscopía electrónica [46]. A partir de ese momento, grandes avances se han realizado en el área de la virología, desde el estudio de enfermedades virales para el desarrollo de vacunas y antivirales, hasta el empleo de tecnologías de edición génica sobre material genético viral para la producción de organismos recombinantes, con aplicaciones biotecnológicas en el área de la medicina, agricultura y ciencia de materiales, entre otras [47].



Figura 1.3. Representación esquemática de la estructura de poliovirus como ejemplo de virus sin envoltura **(A)**, y del virus influenza como ejemplo de virus envuelto **(B)**.

Los virus se clasifican en familias de acuerdo a su morfología, estructura, características del genoma y estrategias de replicación. Según la última actualización del *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), se conocen más de 16000 especies de virus diferentes, agrupadas en 368 familias [48]. En 1971, el virólogo David Baltimore propuso un sistema de clasificación de virus en seis categorías generales, según la naturaleza del genoma y las estrategias de obtención del ARN mensajero (Figura 1.4) [49].

Los virus de clase I poseen genoma de ADN de doble cadena. Estos virus expresan sus genes y duplican su material genético a partir de procesos similares a los que usan las células. Los virus de la viruela, del herpes (HSV) y del papiloma humano (HPV) son algunos ejemplos de virus de clase I [50, 51, 52]. Por su parte, los virus de clase II son virus cuyo genoma es de ADN de simple cadena de polaridad positiva. En este caso, el ciclo de replicación comienza con la formación de ADN de doble cadena, para luego continuar de un modo similar a los virus de clase I. Los parvovirus pertenecen al grupo de virus de clase II [53].

El material genético de los virus de los grupos III a VI es ARN. En particular, los virus de clase III poseen genoma de ARN de doble cadena, en donde el ARN mensajero se sintetiza a partir de la hebra complementaria de ARN. Los rotavirus forman parte de este grupo [54]. Los virus de clase IV poseen genoma de ARN de cadena simple, de polaridad positiva. En estos virus, el material genético se traduce directamente para la síntesis de proteínas, mientras que es necesaria la síntesis de una hebra de ARN complementario para la producción de nuevas copias de material genético. Los virus del dengue (DENV), Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV), y los coronavirus (CoV) pertenecen al grupo de virus de clase IV [55, 56, 57]. Por otro lado, los virus de clase V cuentan con ARN de cadena simple de polaridad negativa (complementario al ARN mensajero) como material genético. En estos virus, el primer paso biosintético es la transcripción del genoma para formar ARN mensajero, que luego es traducido para la síntesis de proteínas. Estos virus contienen la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN dentro de la partícula viral. El virus de la rabia, el virus del Ébola y el virus influenza son ejemplos de virus de clase V [58, 59, 60].

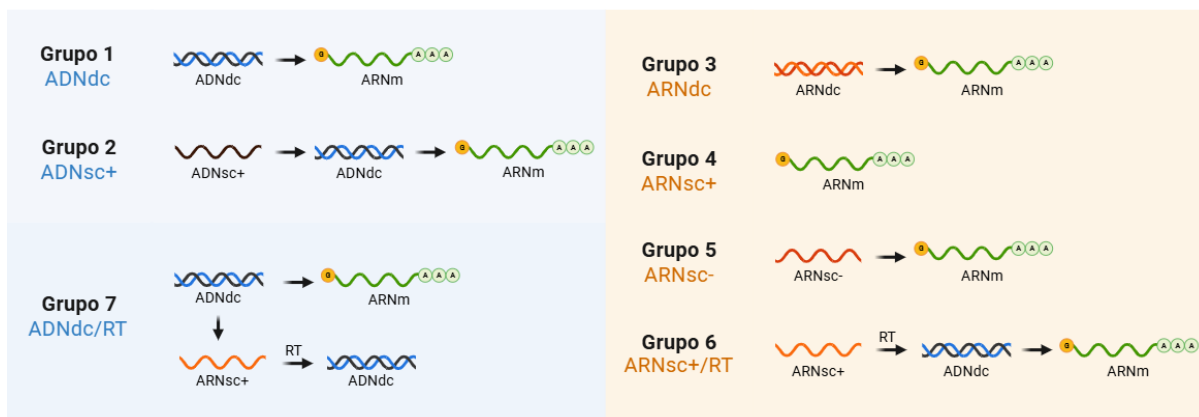


Figura 1.4. Grupos de virus según el esquema de clasificación de Baltimore [49, 62]. ARNm: ARN mensajero. dc: doble cadena. sc+: simple cadena de polaridad positiva. sc-: simple cadena de polaridad negativa. RT: transcripción reversa.

Los virus de clase VI son virus de genoma de ARN de polaridad positiva, que en su ciclo de replicación sintetizan un intermediario de ADN a partir de un proceso de transcripción reversa. Para ello, disponen de una enzima ADN polimerasa dependiente de ARN (enzima transcriptasa reversa). Esta enzima se encuentra presente dentro de la partícula viral, junto con otras enzimas necesarias para la infección como la proteasa y la integrasa. El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es un retrovirus perteneciente al grupo VI de la clasificación [61].

Poco tiempo después de establecido el criterio de clasificación de Baltimore se caracterizó el virus de la hepatitis B (HBV), perteneciente a la familia *Hepadnaviridae*, que pasó a formar parte de un séptimo grupo [62]. Estos virus poseen un genoma de ADN circular de doble cadena, con una hebra de longitud completa y la hebra complementaria incompleta. El ciclo de replicación de estos virus implica un proceso de transcripción reversa, a través de un intermediario de ARN [63].

Las enfermedades virales constituyen una de las principales causas de mortalidad a nivel global. A lo largo de la historia, epidemias y pandemias virales de enorme impacto sanitario, social y económico han afectado a la población global. El brote que da lugar a una epidemia ocurre cuando un patógeno emergente es introducido en una población hospedadora. Las causas que pueden originar el brote son principalmente cambios en la ecología del agente infeccioso o del hospedador, así como mutaciones en el patógeno. Cuando esta epidemia se expande rápidamente e involucra un gran número de personas infectadas, o en riesgo de contagio, se clasifica como pandemia. Las pandemias están caracterizadas por una ocurrencia geográfica extendida, en la cual el agente etiológico presenta alto grado de infectividad y capacidad de mutar rápidamente para evadir la respuesta inmune del hospedador. Los virus son agentes causales de pandemias particularmente comunes, debido a la existencia de reservorios medioambientales ampliamente extendidos, el alto grado de replicación que puede provocar mutaciones adaptativas beneficiosas dando lugar a nuevas variantes, las vías de transmisión mediante las cuales se propaga, y la alta tasa de infectividad que poseen [64].

En diciembre de 2019 se reportó el primer caso de enfermedad causada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 en la ciudad de Wuhan, China. Rápidamente, el virus se propagó por todo el mundo y fue declarado pandemia global en marzo de 2020 [65]. Para noviembre de 2021, se habían reportado más de 250 millones de casos [66]. A partir de la implementación de medidas coordinadas a nivel global, que incluyeron pruebas de detección, restricciones de aislamiento y distanciamiento social, y enormes esfuerzos para el desarrollo de tratamientos y vacunas efectivas, se logró disminuir la incidencia de la enfermedad al punto que dejó de clasificar como pandemia en mayo de 2023 [67].

Además de la pandemia reciente de SARS-CoV-2, numerosas pandemias y epidemias se han sucedido en los últimos años. En 1981 se diagnosticó el primer caso de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), provocado por el VIH. Desde ese momento, más de 44 millones han fallecido por causas relacionadas con esta enfermedad. La problemática sigue vigente al día de hoy, ya que se estima que 40 millones de personas en todo el mundo se encuentran infectadas con este virus [68]. El virus influenza es otro agente infeccioso que destaca por la facilidad de generar mutaciones, producto de los procesos de cambio antigénico y deriva antigénica. Este fenómeno resulta en variantes estacionales del virus con el potencial de causar epidemias y pandemias de gripe, como las registradas en el último siglo, con millones de muertes como consecuencia [69].

La viruela ha sido una de las enfermedades con mayor letalidad en la historia. Desde su descubrimiento y diagnóstico se han registrado más de 300 millones de muertes por la infección con este virus. Gracias a campañas masivas de vacunación, la enfermedad fue declarada erradicada en 1980 [70]. El virus del Ébola, por su parte, provoca una enfermedad grave con una tasa de mortalidad cercana al 50%. Fue identificado por primera vez en 1976 en África subsahariana, en donde han ocurrido sucesivos brotes desde entonces. El mayor brote de Ébola ocurrió en 2014 en África central, llegando a expandirse a Europa debido a factores migratorios [71]. El sarampión, las hepatitis virales, la fiebre amarilla, el Zika y la poliomielitis son otros ejemplos de enfermedades epidémicas y pandémicas que han afectado a la población global y que, en algunos casos, continúan representando un desafío en materia de salud pública [72].

En este contexto, el desarrollo de antivirales constituye una estrategia fundamental para el control y tratamiento de enfermedades virales. Los antivirales pueden interactuar con factores celulares que promuevan la biosíntesis de proteínas capaces de inhibir la infección viral, o bien con componentes virales involucrados en el ciclo de infección y replicación. Los interferones de Tipo I son medicamentos utilizados para el tratamiento de distintos virus como HPV y los virus de las hepatitis B y C (HBV y HCV, respectivamente), cuyo modo de acción consiste en la interacción con factores celulares del hospedador [73]. Por otro lado, los antivirales de acción directa interactúan selectivamente con blancos virales. En términos generales, el ciclo de infección de un virus consiste en las etapas de adsorción, penetración, desnudamiento, biosíntesis de proteínas y material genético, ensamblaje de nuevos viriones, maduración y liberación. Los antivirales de acción directa interfieren en alguna de estas etapas, a partir de la interacción con componentes virales específicos como proteasas, polimerasas o proteínas estructurales [74].

El primer medicamento antiviral en salir al mercado fue la idoxuridina, desarrollado en 1959 y aprobado en junio de 1963 para el tratamiento tópico de HSV. Este compuesto es un análogo iodado de timidina, que actúa como terminador de cadena en el proceso de síntesis de ADN viral, impidiendo la replicación del genoma [75]. Desde entonces se han desarrollado numerosos antivirales con diversos mecanismos de acción, aunque sólo para el tratamiento de infecciones causadas por un número limitado de virus humanos, entre los que se encuentran el HIV, el HPV, el HSV, el virus de la varicela (VZV), el virus influenza, el HBV, el HCV, los citomegalovirus humanos (HCMV), el SARS-CoV-2, el virus sincicial respiratorio (RSV), y los virus del género *Orthopoxvirus*, entre los que se encuentran el virus de la viruela y de la viruela símica [76, 77]. En la [Figura 1.5](#) se muestran ejemplos representativos de antivirales aprobados para el tratamiento de estas infecciones. Actualmente, existen numerosas enfermedades virales para las cuales no se dispone de un tratamiento antiviral específico.

El uso combinado de agentes antivirales capaces de interactuar con diferentes blancos biológicos en simultáneo constituye una estrategia ampliamente utilizada en la actualidad. El tratamiento estándar para personas infectadas con HIV actualmente consiste en una terapia antirretroviral combinada de dos inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa reversa, en conjunto con un inhibidor no nucleosídico, inhibidor de la integrasa, o inhibidor de la proteasa. Esta estrategia permite suprimir la carga viral a niveles indetectables y minimizar la probabilidad de desarrollo de resistencia [78].

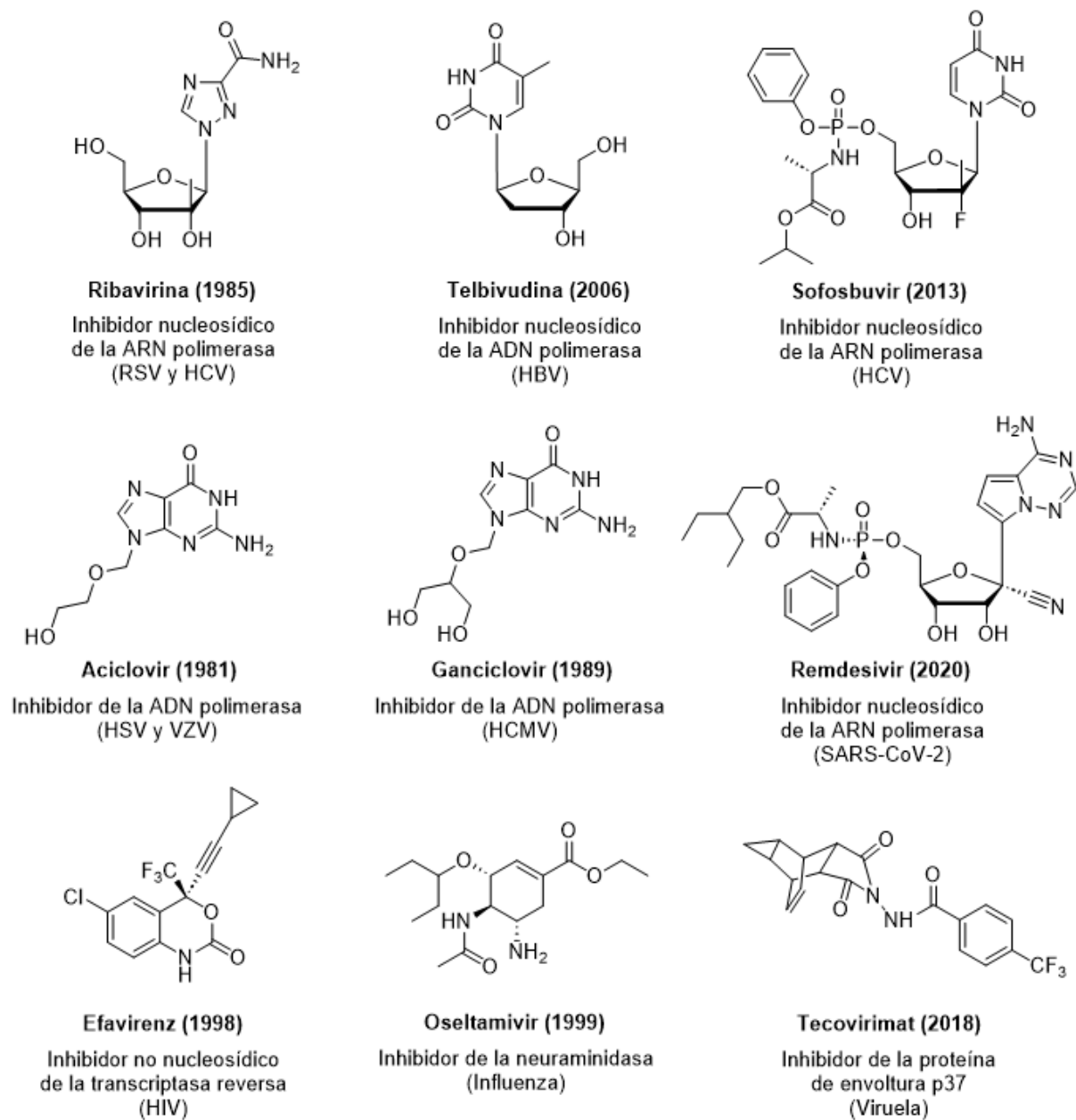


Figura 1.5. Estructura química de antivirales de acción directa aprobados por la FDA, junto con su fecha de aprobación y su blanco biológico. Se muestran ejemplos representativos de antivirales para cada virus de los que se dispone tratamiento específico [76, 77]. No se incluyen los tratamientos antivirales para la infección con HPV, debido a que no son de acción directa.

1.3. INCIDENCIA E IMPACTO REGIONAL Y GLOBAL DE LOS VIRUS DENGUE Y ZIKA

El virus dengue (DENV) y el virus Zika (ZIKV) son los agentes etiológicos de dos enfermedades infecciosas de gran impacto sanitario y económico a nivel global [79]. Estos virus pertenecen al género *Flavivirus*, junto con otros agentes infecciosos como el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV) y el virus del Nilo Occidental (WNV). Las enfermedades provocadas por dengue y Zika pertenecen a la categoría de enfermedades tropicales desatendidas (NTD, por sus siglas en inglés *neglected tropical diseases*), clasificación adoptada en los comienzos de la década del 2000 con el fin de resaltar su importancia en materia de salud pública. Las NTDs se encuentran presentes en regiones tropicales y subtropicales, y afectan de manera desproporcionada a poblaciones que viven en condiciones de pobreza y pobreza extrema [80].

El principal vector responsable de la transmisión de DENV y ZIKV son los mosquitos del género *Aedes*. En la actualidad, estos arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) se mantienen en circulación en dos ciclos ecológicos distintos. Originalmente, la transmisión de estos virus ocurría exclusivamente en un ciclo selvático, en el cual los primates no humanos son los principales hospedadores vertebrados, y especies selváticas de mosquitos, como *Aedes africanus*, actúan como vectores de transmisión. En este ciclo, la infección en humanos sucede ocasionalmente. Sin embargo, con el tiempo se ha establecido un nuevo ciclo urbano entre humanos, con la especie *Aedes aegypti* como vector principal, y *Aedes albopictus* como vector secundario (Figura 1.6). La diversidad genómica de la población de estos arbovirus favorece su adaptación a dos entornos biológicamente distintos, como lo son el hospedador vertebrado y el vector artrópodo [81, 82, 83].

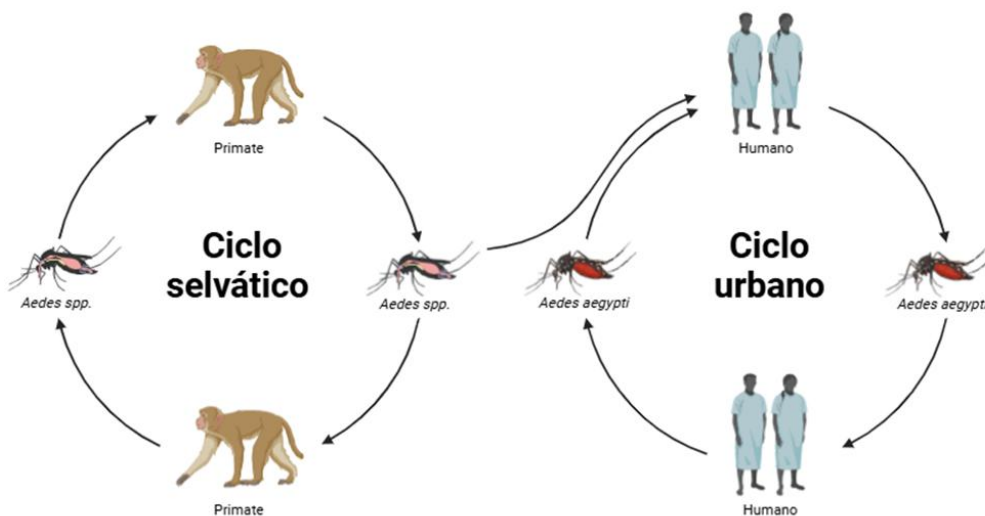


Figura 1.6. Ciclos de transmisión de DENV y ZIKV, entre hospedadores vertebrados y vectores artrópodos.

La distribución geográfica de estos virus está determinada principalmente por el rango ecológico del mosquito vector. Factores como el crecimiento poblacional, la urbanización, la globalización y el cambio climático, sumado a factores adaptativos de los mosquitos, han favorecido la expansión de las áreas geográficas de distribución del vector, aumentando la cantidad de personas en riesgo de infección y la probabilidad de nuevos brotes epidémicos [84].

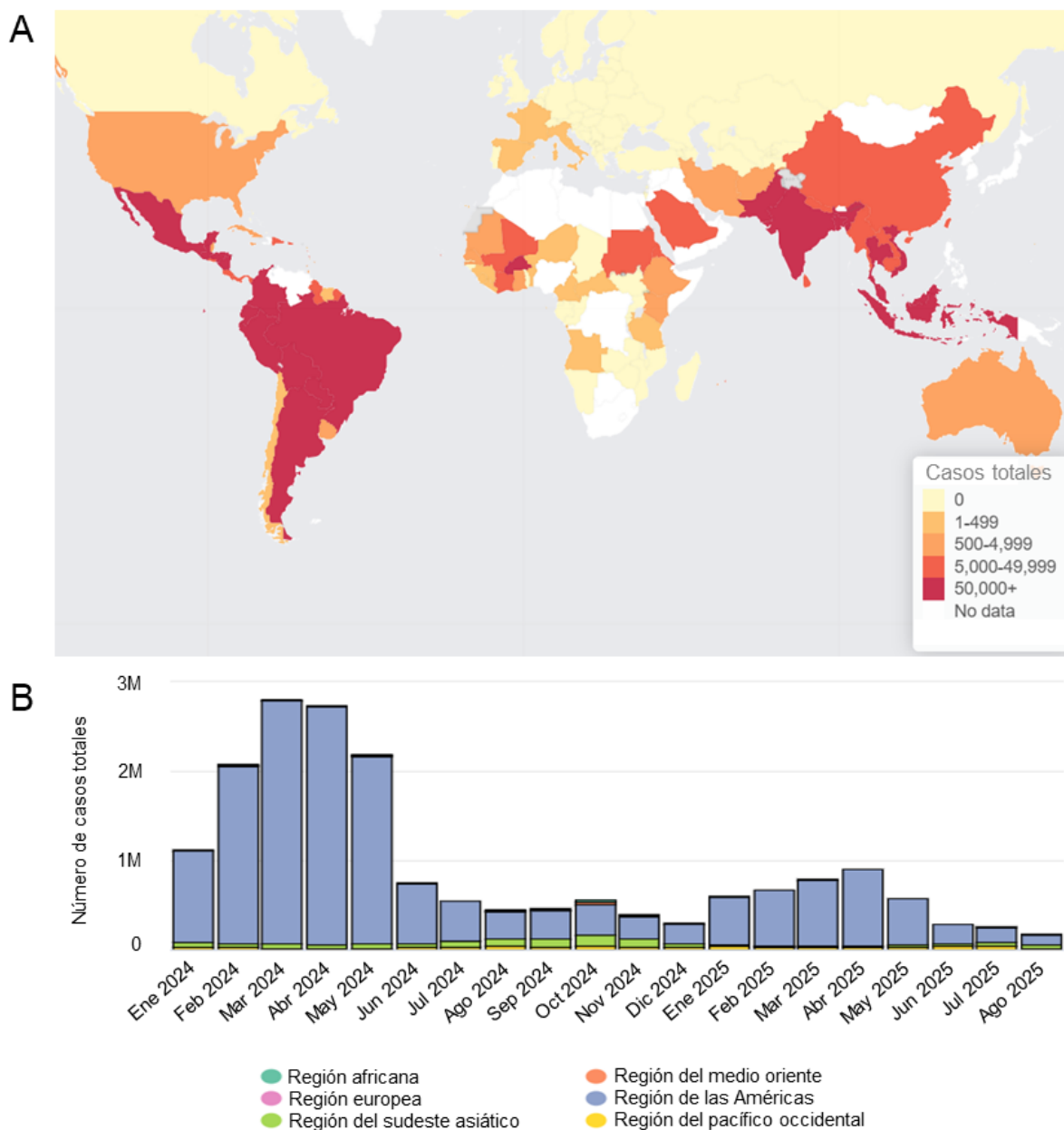


Figura 1.7. (A) Incidencia global de dengue en el año 2024. **(B)** Número de casos totales de dengue por mes y por región, para el período comprendido entre enero de 2024 y agosto de 2025 [85].

Actualmente, el dengue es la enfermedad transmitida por mosquitos de propagación más rápida a nivel global. La incidencia de la enfermedad ha crecido dramáticamente desde comienzos de siglo, aumentando desde los 500000 casos reportados en el año 2000, hasta los 6.5 millones documentados en 2023. El año 2024 registró un máximo histórico de casos de dengue en todo el mundo, con 15 millones de casos reportados y más de 12000 muertes relacionadas con esta enfermedad. La región más afectada fue la región de las Américas, concentrando más de 13 millones de casos y más de 8400 muertes ([Figura 1.7](#)). Dentro de la región, Brasil registró más de 10 millones de casos y más de 6200 muertes, siendo el país más afectado por esta enfermedad, con una tasa de incidencia de 4790 casos y 3 muertes cada 100000 habitantes. Al 21 de agosto de 2025, se han registrado más de 4 millones de casos y 3000 muertes en 97 países a nivel global [\[85, 86\]](#).

En Argentina, las epidemias de los años 2023 y 2024 constituyeron los brotes de mayor magnitud registrados hasta el momento, concentrando aproximadamente el 82% del total de casos acumulados históricamente, evidenciando la vigencia de la problemática en la región [\[87\]](#). Durante 2024 se registraron más de 500000 casos y 408 muertes, lo que refleja una tasa de letalidad relativamente baja en comparación con otros territorios. La tasa de incidencia a nivel nacional fue de 1284 casos cada 100000 habitantes; sin embargo, en la región del noroeste argentino, en particular en Salta, Tucumán y Catamarca, la tasa de incidencia alcanzó los 2100 casos cada 100000 habitantes. En lo que va del año 2025, se han registrado 17600 casos y 13 muertes, lo que representa una disminución significativa respecto al año anterior. Actualmente, los serotipos presentes en el territorio nacional son DENV-1 y DENV-2 [\[88, 89\]](#).

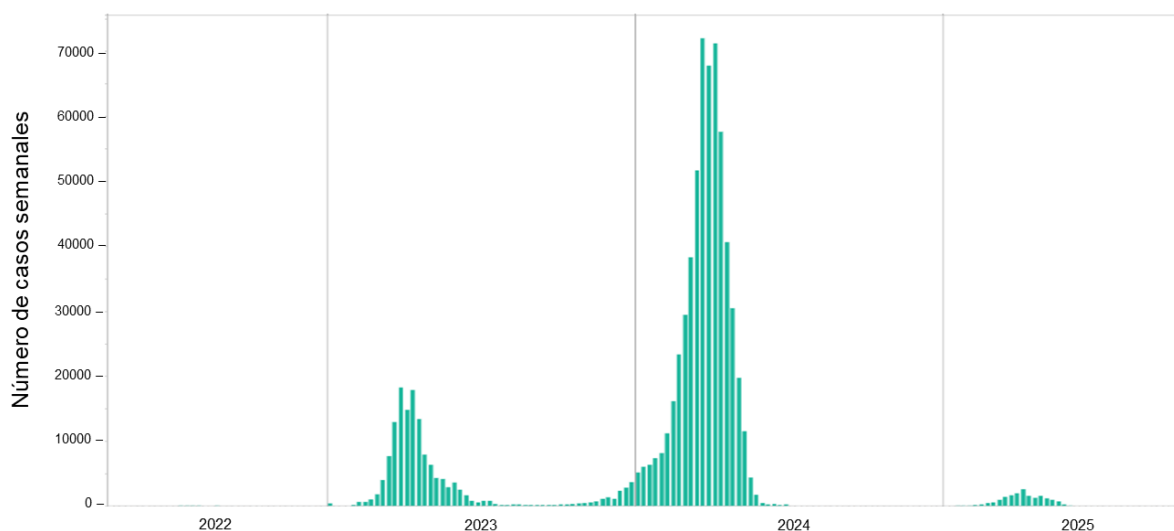


Figura 1.8. Número de casos totales de dengue por semana epidemiológica en Argentina, para el período comprendido entre enero de 2022 y agosto de 2025 [\[88\]](#).

La presencia del mosquito *Aedes aegypti* en Argentina está documentada desde inicios del siglo XX. En esa época, constituía un grave problema sanitario al ser el vector principal responsable de la transmisión del virus de la fiebre amarilla, enfermedad ampliamente extendida en el continente. Durante el período 1930-1960 se llevaron adelante campañas de fumigación a nivel continental, que derivó en la erradicación del mosquito en Argentina y países limítrofes para 1965. Sin embargo, la relajación en los programas de control provocó que el mosquito colonizara nuevamente el territorio [84, 90].

Actualmente, la dinámica de la transmisión viral en Argentina está intrínsecamente relacionada con el ciclo estacional del mosquito *Aedes aegypti*, que depende principalmente de las condiciones de temperatura y precipitaciones. Los huevos de mosquitos comienzan a eclosionar a finales de la primavera, aumentando la población de mosquitos hasta alcanzar un máximo en los meses de febrero y marzo. Con el advenimiento de las bajas temperaturas, la población vuelve a disminuir. No se registra presencia de mosquitos adultos en invierno, período en el cual los huevos permanecen en estado de latencia [90].

Las infecciones por DENV pueden ser asintomáticas, o bien presentar un rango de manifestaciones clínicas que abarcan desde fiebre elevada hasta síndrome de *shock* e incluso la muerte. El período de incubación del virus es de entre 4 y 7 días, momento en el cual pueden comenzar los síntomas. La fiebre producida por dengue se caracteriza por dolor de cabeza, dolor retroocular, dolor muscular y articular y, en menor medida, erupción cutánea, náuseas y vómitos. En algunos casos, la infección con dengue puede provocar leucopenia y trombocitopenia, incrementando el riesgo de sangrado. El período febril dura entre 5 y 7 días, coincidiendo con la desaparición del virus del organismo. El paciente puede sentir cansancio intenso tras algunos días posteriores a la infección. La mayor parte de las infecciones en menores de 15 años son asintomáticas [91].

En algunos casos, la enfermedad puede progresar a formas más graves. La fiebre hemorrágica del dengue presenta leucopenia y trombocitopenia junto con pérdida de plasma sanguíneo, a través de las paredes capilares, desde el sistema circulatorio hacia tejidos, órganos, músculos o cavidades corporales circundantes. Estudios demuestran que cerca del 40% de los pacientes sintomáticos hospitalizados alcanzan la etapa de dengue hemorrágico [92]. La aparición de fiebre hemorrágica, junto con la disminución de recuento plaquetario y el aumento de hematocrito, son señales de alarma que reflejan una mayor probabilidad de desarrollo de *shock*. El síndrome de *shock* se caracteriza por fiebre hemorrágica con signos de insuficiencia circulatoria, hipotensión y desbalance de enzimas hepáticas. Se manifiesta mediante dolor abdominal intenso, vómitos persistentes, letargo, hipotermia y sudoración excesiva. La tasa de letalidad de la infección por dengue es menor al 1%; sin embargo, puede aumentar a un valor entre 12% y 44% al alcanzar el estado de *shock* [91].

Existen cuatro serotipos distintos de dengue, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, que comparten una similitud del 60% - 75% a nivel de aminoácidos. Esta diferenciación se basa en antígenos estructurales, que inducen anticuerpos específicos al infectar un organismo [93]. En el año 2013 se detectó un quinto serotipo, DENV-5, del cual sólo se registró un brote aislado, permaneciendo limitado al ciclo selvático a diferencia de los otros serotipos [94, 95]. Las poblaciones virales dentro de un mismo serotipo presentan una diferencia del 3% a nivel de aminoácido y del 6% aproximadamente a nivel de nucleótido. Las variaciones genéticas entre serotipos e intraserotipos son determinantes importantes de la aptitud viral (o *fitness* viral), de la virulencia y del potencial epidémico. Por ejemplo, las cepas que presentan una ventaja replicativa tanto en humanos como en mosquitos pueden propagarse con mayor eficacia, y eventualmente desplazar a las cepas con menor aptitud. Asimismo, la genética viral también influye en las interacciones del virus con la respuesta inmune del hospedador, por lo que las infecciones con los distintos serotipos se asocian con diferencias en las manifestaciones clínicas y en la gravedad de la enfermedad [93].

Estudios realizados en humanos y primates no humanos han demostrado que, tras una infección con un serotipo de DENV resuelta exitosamente, el individuo adquiere anticuerpos neutralizantes de tipo inmunoglobulina G (IgG), efectivos frente a todos los serotipos de dengue. Sin embargo, los anticuerpos heterotípicos persisten durante un corto período de tiempo, tras el cual se pierde la inmunidad cruzada, y una nueva infección con un serotipo heterólogo incrementa el riesgo de desarrollar manifestaciones clínicas de dengue grave. Este fenómeno se conoce como potenciación dependiente de anticuerpos (ADE, por sus siglas en inglés *antibody-dependent enhancement*), y ocurre cuando los anticuerpos heterotípicos generados en la infección previa interactúan con las partículas virales sin lograr neutralizarlas, favoreciendo la entrada de las mismas a células portadoras de receptores Fc, como monocitos y macrófagos. Cuando el virus infecta estas células, puede replicarse sin ser detectado, generando una carga viral elevada y mayor probabilidad de derivar en dengue grave [96, 97]. Existe evidencia de que una primera infección con ZIKV también puede aumentar el riesgo de dengue grave en una infección con DENV-2 [98]. De igual forma, experimentos *in vitro* demostraron que anticuerpos anti-DENV potencian la infección provocada por el virus Zika [99].

El virus del Zika fue descubierto por primera vez en primates no humanos del bosque Zika en Uganda en 1947, pocos años antes de la detección del primer caso en humanos [100]. Durante el siglo XX, se han registrado sólo unos pocos casos esporádicos en las regiones de África y Asia. En efecto, desde 1983 hasta 2006 no se reportaron casos. Sin embargo, en el año 2007 se registró un brote en el Estado de Yap, una isla de Micronesia, en donde cerca del 75% de la población fue afectada, con manifestaciones clínicas en 1 de cada 5 personas. Pese al alto grado de transmisión, no ocurrieron hospitalizaciones. Desde ese año, sucesivos brotes de importante impacto sanitario se han reportado en la Polinesia Francesa en 2013, en la Isla de Pascua y otras islas del Océano Pacífico sur en 2014, y en Brasil en 2015 [101, 102]. A partir de ese momento, el virus se estableció en la región de las Américas. Desde 2017, el número de casos de Zika disminuyó a nivel global; sin embargo, la transmisión persiste en bajos niveles en las Américas y otras regiones endémicas. Para el año 2022, un total de 89 países y territorios han reportado transmisión local del virus Zika (Figura 1.9) [103].

1.4. CARACTERÍSTICAS DE LA PARTÍCULA VIRAL Y CICLO DE INFECCIÓN

Los virus dengue y Zika pertenecen al género *Flavivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*. Estos virus poseen características estructurales en común, tales como el tamaño de partícula, la arquitectura de la superficie del virión, la organización del genoma, el ciclo de infección y las estrategias de replicación. Los viriones poseen un tamaño de aproximadamente 50 - 60 nm y están formados por una nucleocápside recubierta por una bicapa lipídica. Estos virus pertenecen al grupo IV de la clasificación de Baltimore, ya que su material genético es ARN de simple cadena de polaridad positiva. La molécula de ARN se encuentra asociada a la proteína de la cápside (proteína C), formando la nucleocápside. Sobre la membrana lipídica externa se encuentran distribuidas 180 copias de la proteína de envoltura (proteína E), organizadas en 90 dímeros, en asociación con las proteínas de membrana (proteína M). La proteína E es el mayor determinante antigénico del virión, y está involucrada en los procesos de interacción con receptores celulares y fusión de membranas. La proteína M es un pequeño fragmento producto de la proteólisis de la proteína precursora de membrana (prM), que ocurre durante el proceso de maduración de la progenie viral [55, 108].

El genoma viral presenta un único marco de lectura abierto, que codifica para una poliproteína de alrededor de 3400 aminoácidos. Esta poliproteína, que es clivada por proteasas virales y celulares, contiene a las proteínas estructurales E, C y prM, junto con siete proteínas no estructurales (NS), denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, que están involucradas en los procesos de replicación y ensamblaje de nuevos viriones, así como en mecanismos de evasión del sistema inmune (Figura 1.10) [82, 108]. Los genes que codifican para las proteínas estructurales se localizan próximos al extremo 5', mientras que aquellos con la información de las proteínas NS se encuentran en el extremo 3'. El genoma, además, sirve como molde para el proceso de replicación de ARN, el cual ocurre a través de un intermediario de ARN de polaridad negativa. Los extremos 5' y 3' no codificantes contienen secuencias complementarias que permiten la circularización del genoma, lo que se cree que tiene un rol relevante en el proceso de replicación [109].

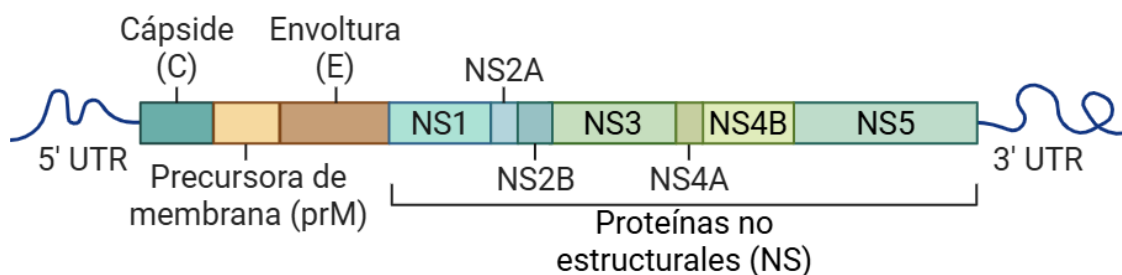


Figura 1.10. Organización del genoma viral de dengue y Zika. El genoma es directamente traducido en una poliproteína que contiene las diez proteínas virales, que luego es clivada por proteasas virales y celulares.

El ciclo de replicación de dengue y Zika comienza con el ingreso del virus a la célula. En primer lugar, la interacción entre la proteína E y receptores celulares desencadena un proceso de endocitosis mediado por clatrina. La partícula viral es entonces internalizada dentro de una vesícula endosomal. La disminución del pH dentro de este compartimiento produce cambios conformacionales sobre la proteína de envoltura, lo que induce la fusión de membranas viral y endosomal provocando la liberación del genoma viral en el citoplasma celular [108].

Dado el amplio espectro de células susceptibles a la infección por *Flavivirus*, se postula que estos virus tienen la capacidad de interactuar con diferentes tipos de receptores celulares. Existe evidencia de que el heparán sulfato y las lectinas tipo C, como DC-SIGN, cumplen un rol importante como receptores en el ingreso de DENV y ZIKV a células de mamífero. En el caso de dengue, existe un mecanismo de ingreso alternativo que puede ocurrir en infecciones secundarias, mediado por anticuerpos no neutralizantes que favorecen el fenómeno de ADE. En este caso, el complejo virus-anticuerpo interactúa con receptores Fc facilitando la internalización [82, 110]. Dentro del compartimiento endosomal, la proteína E que recubre la partícula viral sufre cambios conformacionales irreversibles. Los homodímeros de E se disocian y adoptan una estructura trimérica que expone al péptido de fusión, el cual puede interactuar con la membrana endosomal y provocar la fusión de membranas. Este proceso genera poros por los cuales la nucleocápside es liberada al citoplasma celular. El subsecuente proceso de desnudamiento libera el genoma viral para dar inicio al ciclo de replicación [82, 108].

La traducción del genoma viral ocurre en ribosomas asociados al retículo endoplasmático (RE). En primer lugar, se sintetiza una poliproteína que queda anclada a la membrana del RE, donde es clivada por proteasas celulares y virales. La proteína NS3, en conjunción con el cofactor NS2B, posee actividad proteasa y es la encargada de clivar las conexiones C/prM, NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5. Además, la región C-terminal de NS3 cuenta con actividad helicasa, nucleósido 5'-trifosfatasa (NTPasa), ARN 5'-trifosfatasa y de apareamiento de ARN, claves en el proceso de síntesis de ARN [111, 112].

Las proteínas virales sintetizadas promueven la formación del complejo de replicación, encargado de producir nuevas copias del genoma viral. En primer lugar, se sintetiza una hebra complementaria al genoma viral, que sirve de molde para la producción de nuevas copias del ARN genómico. La síntesis de ARN es asimétrica, ya que el ARN de polaridad positiva es producido en una cantidad 10 veces mayor a la de ARN de polaridad negativa [108].

Las proteínas no estructurales NS1 y NS4A son proteínas transmembrana que cumplen un rol fundamental al reestructurar la membrana del RE y anclar los componentes para la formación del complejo de replicación. NS2A, si bien no está involucrada en la formación de ARN viral, es importante para el ensamblaje y formación de partículas infectivas. NS4B es una proteína transmembrana con funciones de evasión de respuesta inmune, que también interviene en el proceso de replicación a partir de interacciones con otras proteínas virales [55, 111]. Finalmente, NS5 es la proteína no estructural de mayor tamaño y cuenta principalmente con actividad ARN polimerasa dependiente de ARN, indispensable para la replicación, y actividad metiltransferasa, para realizar el *capping* del ARN sintetizado [111].

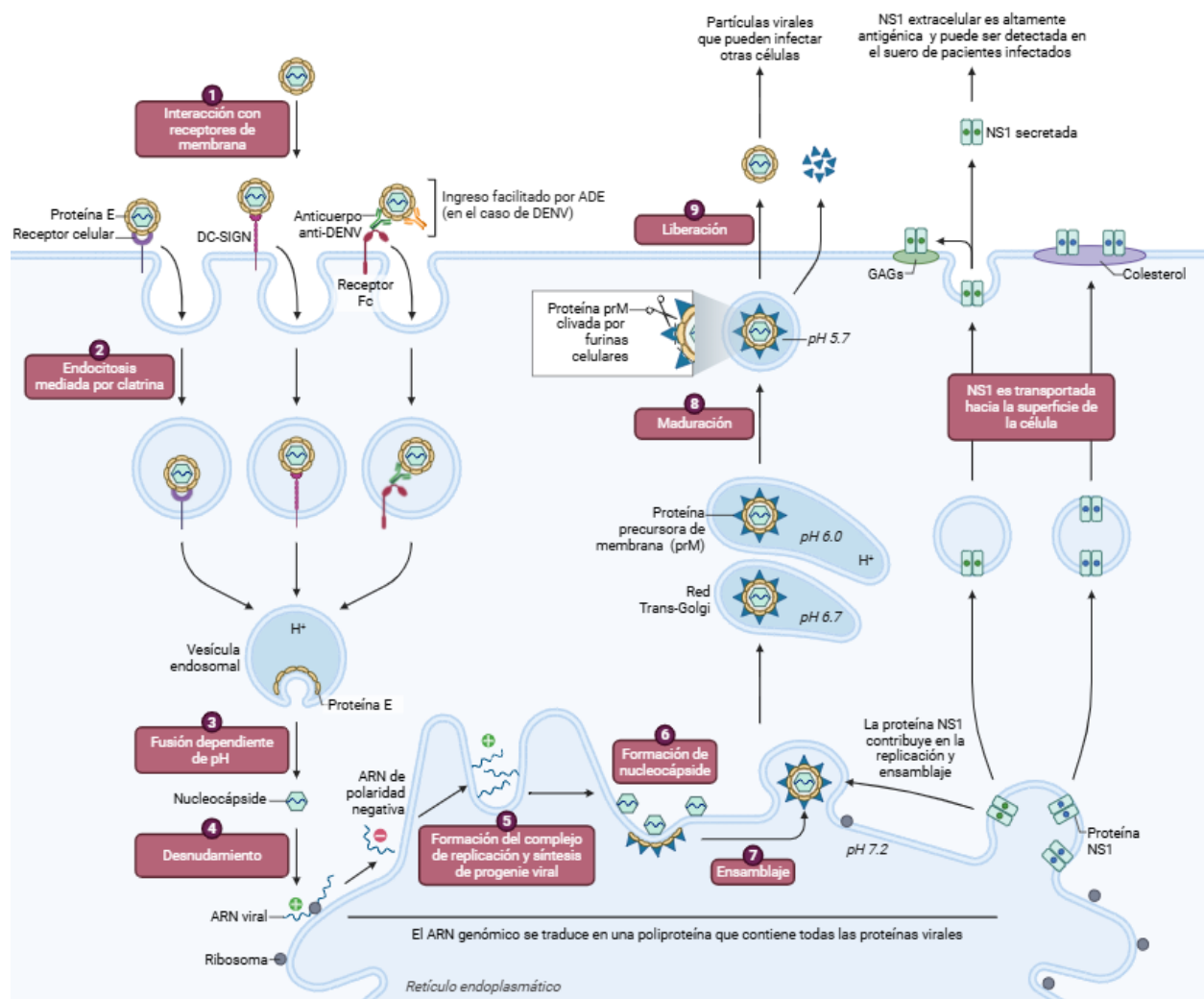


Figura 1.11. Ciclo de replicación de *Flavivirus*.

Las nuevas copias de material genómico se asocian con las proteínas de la cápside sintetizadas para formar la nucleocápside, que luego se ensambla con las proteínas prM y E en las membranas del RE para formar viriones inmaduros. Las partículas virales inmaduras son transportadas por la vía secretoria celular, a través de la red del trans-Golgi, donde ocurre el proceso de maduración. El pH ácido de estos compartimientos produce cambios conformacionales en el complejo E-prM, exponiendo un sitio de clivaje por furina que separa al péptido pr de M. Sin embargo, pr permanece asociado a E, evitando la fusión prematura con las membranas de la red del trans-Golgi. Luego de la brotación, el pH neutro del espacio extracelular libera al péptido pr de la superficie viral, resultando así en la liberación de las nuevas partículas virales infecciosas [55, 108].

1.5. ESTADO DEL ARTE DE TERAPIAS PARA LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE INFECCIONES POR DENGUE Y ZIKA

La información disponible acerca de las características estructurales y mecanismos de patogenicidad de los virus dengue y Zika puede ser empleada para el desarrollo de agentes terapéuticos, como medicamentos o vacunas, que sirvan para el tratamiento, prevención y control de estas enfermedades infecciosas.

La vacunación es actualmente una de las prácticas más significativas en materia de salud pública. Los programas de inmunización masiva han tenido un impacto enorme en el control de numerosas enfermedades infecciosas [\[113\]](#). En este sentido, la disponibilidad de vacunas para la prevención y disminución de casos de dengue y Zika resulta urgente. Para el caso particular de dengue, una vacuna efectiva debe proveer inmunidad frente a los cuatro serotipos, por lo que el diseño de vacunas actual está enfocado en lograr simultáneamente la producción de anticuerpos específicos contra cada serotipo. Al momento, tres vacunas tetravalentes a virus vivo atenuado, de administración subcutánea, han demostrado eficacia frente a la infección por dengue en estudios clínicos de fase III. La vacuna Dengvaxia, desarrollada por el laboratorio Sanofi Pasteur de Lyon, requiere de tres dosis espaciadas por un intervalo de seis meses; mientras que la vacuna Qdenga, desarrollada por el laboratorio Takeda de Tokio, se administra en dos dosis separadas por un intervalo de tres meses. Por último, la vacuna desarrollada por el Instituto Butantan en São Paulo en colaboración con el NIH (*National Institutes of Health*) de Estados Unidos, es de única administración. Contrariamente, al momento no se dispone de vacunas para la inmunización frente a ZIKV [\[114, 115\]](#).

Dengvaxia fue la primera vacuna en ser aprobada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2016, recomendada para personas mayores de 9 años que habitan en zonas endémicas [\[116\]](#). Es una vacuna quimérica basada en la estructura de la vacuna 17D de Sanofi para la fiebre amarilla, sobre la cual se reemplazan los genes de las proteínas E y prM de YFV por los de DENV. Luego de 5 años de vigilancia clínica, los estudios de eficacia mostraron que la vacunación en niños de 2 a 16 años ejerce un efecto protector en los casos en que los individuos ya presentaban anticuerpos, procedentes de una infección previa por DENV. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, el riesgo de hospitalización por dengue grave aumentaba en niños seronegativos, debido a mecanismos de potenciación dependiente de anticuerpos (ADE). En consecuencia, la OMS modificó los lineamientos vigentes, recomendando la vacunación solamente a niños con evidencia serológica de infecciones previas. En estos casos, la eficacia promedio de la vacuna es cercana al 80% en relación al desarrollo de sintomatología por DENV, presentando variaciones entre los distintos serotipos. El grado de protección frente a DENV-3 y DENV-4 es de 89% y 80% respectivamente, mientras que la eficacia disminuye a un 67% para DENV-1 y DENV-2 [\[114, 117\]](#).

Qdenga, a diferencia de Dengvaxia, está diseñada sobre un vector derivado de DENV-2 en lugar de YFV, sobre el cual también se sustituyen los genes de las proteínas E y prM por los de los cuatro serotipos de DENV. La vacuna presenta una eficacia del 80% a los 12 meses de la segunda dosis, con un 95% de eficacia en la prevención de hospitalizaciones. La eficacia resulta ligeramente menor en individuos seronegativos, arrojando un valor promedio de 75%, y hasta el momento no se ha observado ADE. A diferencia de Dengvaxia, Qdenga presenta mayor grado de protección frente a DENV-1 y DENV-2, con valores de 74% y 97%, frente al 63% de eficacia frente a DENV-3 y DENV-4. Dado que todas las proteínas no estructurales de DENV-2 están incluidas en Qdenga, es esperable que la protección serotipo-específica sea mayor para DENV-2 [114, 117]. En Argentina, Qdenga fue autorizada por la ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) en el año 2023. Actualmente, la vacunación forma parte del plan estratégico de prevención y control de dengue del Ministerio de Salud de la Nación. No forma parte del calendario nacional de vacunación, sino que por el momento se propone una estrategia de vacunación focalizada, priorizando a personas de entre 15 y 39 años que habitan en las jurisdicciones con mayor incidencia de casos [89, 118].

Por último, la vacuna del Instituto Butantan fue formulada seleccionando componentes específicos de cada serotipo, a partir de la evaluación de diversos candidatos monovalentes y tetravalentes, con el fin de obtener un balance óptimo entre seguridad e inmunogenicidad. Actualmente, se encuentra en estudios clínicos de fase III en Brasil. Al momento, la vacuna demostró buena eficacia frente a DENV-1 y DENV-2. No se dispone de datos de eficacia frente a DENV-3 y DENV-4, debido a que estos serotipos no circulan actualmente en Brasil [114, 119].

En cuanto al tratamiento de pacientes con infecciones en curso, actualmente no se dispone de fármacos específicos para ninguno de los dos virus. Este hecho representa un problema particularmente relevante en el caso de pacientes con formas graves de dengue, en donde la tasa de letalidad se vuelve significativa. Para estos casos, las terapias existentes están destinadas al alivio de los síntomas, por lo que el desarrollo de fármacos en esta área resulta necesario. Un fármaco eficaz contra dengue y/o Zika debe poder reducir el grado de viremia durante las primeras fases de la enfermedad, para evitar que progrese a formas graves. En el caso de dengue, el fármaco debe poder inhibir a los cuatro serotipos por igual, ya que en algunas regiones endémicas existe co-circulación de los cuatro serotipos [120].

El reposicionamiento de fármacos es una estrategia adoptada en muchas campañas de desarrollo, que consiste en la evaluación de medicamentos conocidos y aprobados para el tratamiento de otras enfermedades. Esto permite reducir los tiempos y costos del proceso dado que, al tratarse de medicamentos ya aprobados, se dispone de información acerca del perfil farmacológico y la seguridad del medicamento. Algunos antivirales aprobados, como la cloroquina y la ivermectina, demostraron inhibir *in vitro* a los virus dengue y Zika; sin embargo, no lograron disminuir los niveles de viremia ni de la antigenia de NS1 en ensayos clínicos. Se evaluaron también combinaciones de favipiravir/ribavirina y balapiravir/ribavirina, terapias aprobadas actualmente para el tratamiento del *Flavivirus* HCV, sin arrojar resultados exitosos en ensayos clínicos [120, 121].

El diseño racional de antivirales de acción directa específicos contra dengue y Zika constituye una de las estrategias más prometedoras para el desarrollo de terapias eficaces, dada la ausencia de tratamientos aprobados. Las proteínas virales NS3 y NS5 han sido los blancos biológicos más seleccionados en numerosas campañas de descubrimiento de fármacos. Sin embargo, pocos candidatos han presentado resultados prometedores. El compuesto AT-752 es un análogo de nucleótido diseñado como inhibidor de la polimerasa de dengue, el cual llegó a ser estudiado en ensayos clínicos de fase II (NCT05466240) [122]. Sin embargo, se decidió discontinuar su desarrollo debido a los resultados obtenidos. Actualmente, se están llevando a cabo ensayos clínicos de fase II sobre dos inhibidores dirigidos a la proteína NS4B (NCT06006559; NCT05201794). Estos compuestos, denominados JNJ-1802 y NITD-688, demostraron actividad *in vitro* del orden nanomolar frente a los cuatro serotipos de dengue. Su modo de acción involucra la unión específica con NS4B con el fin de bloquear la interacción entre esta proteína y NS3 en la etapa de replicación viral. [123, 124].

La entrada del virus a la célula es una etapa temprana y específica de la infección, constituyendo un blanco terapéutico atractivo. La inhibición de la entrada viral puede contribuir a reducir los niveles de viremia y la hiperactivación del sistema inmune, previniendo el progreso a formas graves de la enfermedad, y disminuyendo efectivamente la transmisión del virus. Diferentes estrategias se han llevado a cabo con el objetivo de identificar potenciales inhibidores de entrada, incluyendo el cribado virtual e *in vitro* de bibliotecas de compuestos, así como el diseño racional basado en la estructura de las proteínas virales. La proteína de envoltura es uno de los blancos más elegidos para el desarrollo de inhibidores de entrada, ya que está involucrada en los procesos de interacción con receptores celulares, internalización y fusión de membranas [110].

La glicoproteína E es una proteína de fusión de clase II altamente conservada entre las distintas especies de *Flavivirus*. En los viriones maduros, la proteína adopta una estructura homodimérica que yace paralela a la membrana viral. Está constituida por tres dominios estructurales: el dominio I (DI), con forma de un barril β de ocho hebras; el dominio II (DII), extendida a lo largo de la superficie viral; y el dominio III (DIII), que presenta un plegamiento característico de las inmunoglobulinas. Además, contiene una región transmembrana, conectada al resto de la proteína por una región *stem* formada por dos hélices α . (Figura 1.12 A). El péptido de fusión se ubica en el extremo distal de DII, permaneciendo inaccesible en un bolsillo formado por los dominios DI y DIII del monómero adyacente [108].

En el año 2003 se reportó la estructura cristalográfica de la proteína de envoltura de DENV-2 (PDB: 1OKE). En la misma, se encontró un bolsillo de características hidrofóbicas localizado en la interfase de los dominios DI y DII, ocupado por una molécula del detergente *n*-octil- β -D-glucósido (β -OG) [125]. Este bolsillo se encuentra en una región bisagra, relevante para los cambios conformacionales que ocurren en el endosoma debido al pH ácido, que resulta en la adopción de la estructura trimérica y exposición del péptido de fusión (Figura 1.12 B).

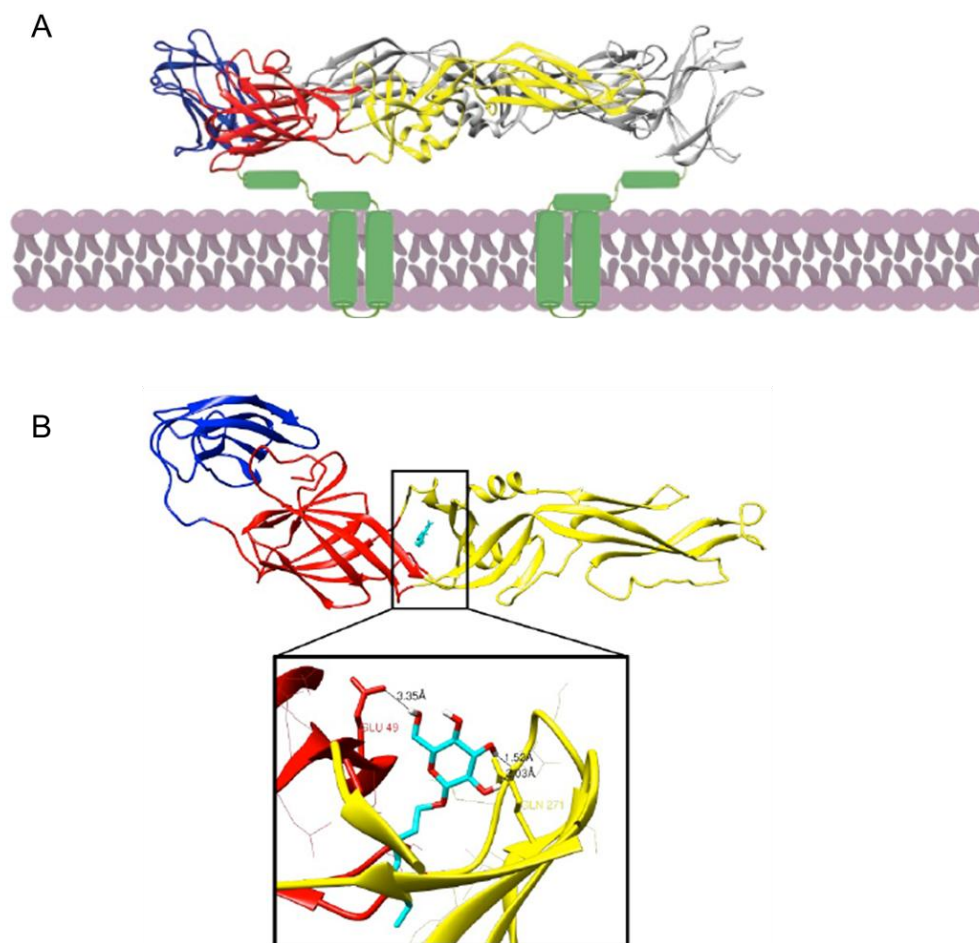


Figura 1.12. Estructura dimérica de la proteína de envoltura de DENV-2 tal como se encuentra en la superficie del virión. En rojo: dominio DI; en amarillo: dominio DII; en azul: dominio DIII. **(B)** Localización del bolsillo hidrofóbico en una región bisagra entre los dominios DI y DII, ocupada por una molécula de detergente β -OG [16].

El alineamiento de los residuos que conforman la región del bolsillo β -OG de DENV-2 con los residuos análogos de otros *Flavivirus* como ZIKV, WNV y JEV muestra un alto grado de conservación, lo que pone de manifiesto el potencial para el desarrollo de un inhibidor de entrada dirigido al bolsillo β -OG de la proteína E, con actividad simultánea frente a distintos *Flavivirus* [126]. Se han desarrollado numerosas campañas de descubrimiento de fármacos con el objetivo de encontrar pequeñas moléculas orgánicas capaces de unirse al bolsillo β -OG e inhibir la fusión de membranas viral y endosomal por bloqueo de los cambios conformacionales que ocurren a pH ácido [16, 120, 126, 127, 128, 129, 130].

Los aspectos abordados a lo largo de este capítulo ponen de manifiesto la complejidad del proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos, así como la relevancia de la problemática sanitaria de impacto global y regional que provocan los virus dengue y Zika. Este marco conceptual sienta las bases para el desarrollo experimental y las estrategias de diseño racional de antivirales que se presentarán en los capítulos siguientes.

Capítulo 2

Hipótesis y objetivos de trabajo

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO

El virus del dengue (DENV) y el virus Zika (ZIKV) son dos arbovirus pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, transmitidos por mosquitos del género *Aedes*. Gran parte de la población global se halla en riesgo de contagio, lo que genera un grave problema sanitario a nivel mundial. Actualmente no existe ningún antiviral aprobado para el tratamiento de estas enfermedades.

La entrada del virus a la célula es una etapa temprana y específica de la infección, en la cual la proteína de envoltura E cumple funciones claves ya que es la responsable de la interacción con los receptores celulares, así como del proceso de fusión de membranas. En particular, el pH ácido del compartimiento endosomal produce cambios conformacionales en la proteína E, la cual adopta una estructura trimérica que deja expuesto al péptido de fusión. Esto conduce a la fusión de membranas viral y endosomal, que resulta en la liberación del genoma viral al citoplasma celular. La estructura cristalográfica de la proteína E de DENV-2 reveló un bolsillo hidrofóbico, ocupado por una molécula de detergente *n*-octil- β -D-glucósido (β -OG), que presenta una tasa de mutación baja entre los distintos serotipos de dengue. Asimismo, el alineamiento de las secuencias de las proteínas E de DENV-2 y ZIKV muestra un alto grado de conservación en los residuos localizados en las proximidades del bolsillo.

El bolsillo β -OG se encuentra ubicado en una región bisagra entre los dominios I y II de la proteína E, de gran importancia para los cambios conformacionales necesarios para adoptar la estructura trimérica y exponer al péptido de fusión. Este trabajo se fundamenta en la hipótesis de que pequeñas moléculas orgánicas, diseñadas para unirse específicamente al bolsillo β -OG de las proteínas de envoltura de los virus dengue y Zika, pueden interferir con los cambios conformacionales que ocurren en el endosoma. De esta forma, se puede bloquear la fusión de membranas y la subsecuente liberación del genoma que da inicio al ciclo de replicación viral.

Se propone como objetivo general de este trabajo identificar ligandos capaces de interactuar con el bolsillo hidrofóbico de la proteína de envoltura e impedir el ingreso del virus a la célula. Estas moléculas deberán unirse específicamente a la proteína de envoltura y, además, tener las propiedades adecuadas para poder ser consideradas como candidatos a fármacos, para lo cual se utilizará un abordaje que combina el diseño guiado por computadora con estrategias de síntesis orgánica y la evaluación integral de la actividad y toxicidad, así como de las características fisicoquímicas y farmacocinéticas de los candidatos más prometedores. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos, a desarrollar en los capítulos de esta tesis:

1. Identificación de *hits* moleculares a partir del diseño racional asistido por computadora.
2. Síntesis química de los candidatos y evaluación de la actividad antiviral y toxicidad celular.
3. Optimización de moléculas mediante estrategias de la química medicinal, a partir del diseño, síntesis y evaluación de nuevas series de derivados.
4. Estudio *in silico* del comportamiento de los ligandos en el sitio blanco. Estudio de su mecanismo de acción y validación de la hipótesis de trabajo.
5. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los derivados más prometedores.

En conjunto, los objetivos aquí propuestos permitirán evaluar integralmente la hipótesis de trabajo. La obtención de moléculas con la capacidad de inhibir de forma eficaz a los virus dengue y Zika, con baja toxicidad y un perfil farmacocinético adecuado, contribuirá significativamente al desarrollo de antivirales frente a esta problemática sanitaria actual de relevancia regional y global.

Capítulo 3

Diseño y síntesis de potenciales antivirales

3.1. ANTECEDENTES

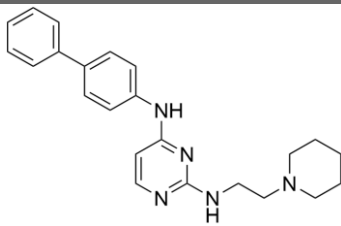
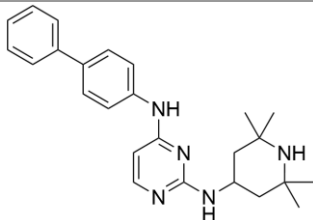
Con el objetivo de desarrollar un antiviral seguro y eficaz contra los virus dengue y Zika, se utilizó como punto de partida la información obtenida en investigaciones previas. En particular, se recurrió a los resultados de una campaña de desarrollo de fármacos realizada en nuestro grupo de trabajo, que combinó el diseño computacional *de novo* orientado a la proteína E de DENV-2 con estrategias de síntesis orgánica y optimización racional ([Figura 3.1](#)). En el marco de este trabajo se hallaron los compuestos **1** y **2** con muy buena actividad contra el virus del dengue, arrojando valores de concentración efectiva 50% (CE₅₀) en el orden micromolar bajo ([Tabla 3.1](#)) [[127](#)]. Estos compuestos demostraron ser inhibidores de entrada en ensayos celulares *in vitro*.



Figura 3.1. Esquema del trabajo de investigación desarrollado en el grupo de trabajo, que dio lugar a la obtención de los compuestos **1** y **2** [[127](#)].

Sin embargo, estas moléculas presentaron algunas desventajas a la hora de ser consideradas como candidatos a ensayos preclínicos, entre las que se puede mencionar su considerable citotoxicidad *in vitro* tras 48 horas de incubación en células Vero, su limitada solubilidad acuosa y en diferentes medios químicos, y su baja capacidad de permeabilidad de membranas biológicas, entre otros inconvenientes relacionados con la seguridad y las propiedades farmacocinéticas.

Tabla 3.1. Actividad, citotoxicidad e índice de selectividad de los compuestos **1** y **2**.

Compuesto	Estructura	CC ₅₀ (μM) ^a	CE ₅₀ (μM) ^b	IS ^c
1		18.1 ± 1.0	0.8 ± 0.2	23
2		17.3 ± 0.8	0.8 ± 0.2	22

^aCC₅₀: concentración citotóxica 50% en células Vero. Los resultados representan el promedio y desvío estándar obtenidos a partir de al menos dos experimentos independientes.

^bCE₅₀: concentración efectiva 50%. Los resultados representan el promedio y desvío estándar obtenidos a partir de al menos dos experimentos independientes.

^cIS: índice de selectividad (IS = CC₅₀/CE₅₀).

Los resultados obtenidos en estas investigaciones previas pueden considerarse un buen punto de partida en el desarrollo de antivirales que bloquean la entrada de DENV a la célula. Sin embargo, a pesar de los avances obtenidos, las limitaciones encontradas impiden que estas moléculas puedan ser consideradas como potenciales antivirales. En este contexto, se plantea la mejora de estos compuestos a través de modificaciones químicas, con el objetivo de obtener moléculas con propiedades adecuadas para ser consideradas como candidatos terapéuticos viables. Adicionalmente, resulta de interés evaluar si los compuestos diseñados tienen la capacidad de inhibir al virus Zika. La similitud genómica y estructural entre las proteínas de envoltura de dengue y de Zika habilita la posibilidad de desarrollar un inhibidor dual, lo que permitiría ampliar el espectro de acción y el alcance terapéutico.

3.2. IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES INHIBIDORES A TRAVÉS DE DISEÑO COMPUTACIONAL

Como primer objetivo, se propuso diseñar nuevas moléculas, derivadas de **1** y **2**, que logren sortear los inconvenientes encontrados y presenten propiedades mejoradas, manteniendo los valores de actividad. Para ello, se comenzó realizando un análisis computacional de posibles análogos con el objetivo de identificar las modificaciones y sustituyentes que podrían arrojar mejores resultados. Se utilizó la plataforma de acceso libre SwissBioisostere para evaluar la potencialidad de diferentes reemplazos estructurales [131]. Esta base de datos provee información acerca de los efectos que produce el reemplazo o modificación de estructuras químicas particulares en el desempeño de los compuestos resultantes en ensayos bioquímicos de determinación de propiedades, tales como la bioactividad, la solubilidad, la estabilidad metabólica o la toxicidad [132]. La plataforma opera mediante la identificación de pares moleculares coincidentes (MMPs, por sus siglas en inglés, *Matched Molecular Pairs*), que son pares de estructuras químicas idénticas salvo por una pequeña diferencia estructural. La plataforma extrae y filtra información empírica de ChEMBL relacionada a estos MMPs y genera un listado de potenciales modificaciones [133]. Este reporte no sólo informa la cantidad de veces que ese reemplazo fue realizado, sino también la cantidad de veces que resultó en mejora, detrimento, o invariabilidad en las propiedades respecto de la molécula original [134].

En primera instancia, se seleccionó el anillo de pirimidina 2,4-disustituido, andamio central en las estructuras de **1** y **2**, como fragmento a modificar, ya que en los estudios previos realizados por el grupo de trabajo no se había explorado la modificación de este grupo funcional. Al usar este andamio como entrada en la base de datos de SwissBioisostere, la consulta reveló que las modificaciones más comunes reportadas en literatura involucran la adición de pequeños sustituyentes en las posiciones 5 y/o 6 del anillo, así como la sustitución de la pirimidina por otros heterociclos ([Figura 3.2](#)). El listado completo de reemplazos bioisotéricos obtenidos se muestra en el [Anexo I](#). A modo de ejemplo, se puede mencionar la sustitución de pirimidina por 1,3,5-triazina, la cual se encuentra reportada en literatura 45 veces. Del total de veces que fue realizado este cambio, sólo 2 resultaron en la obtención de compuestos con actividad mejorada, 14 no mostraron variabilidad en la potencia, y 29 resultaron en moléculas con actividad disminuida, lo que sugiere que este reemplazo podría no ser beneficioso en una campaña de optimización. Por el contrario, el agregado de un grupo trifluorometilo ($-CF_3$) en posiciones 5 y 6 del anillo se encuentra reportado 7 y 4 veces respectivamente. Este sustituyente en ningún caso generó un derivado con menor actividad biológica, y solamente una vez generó una molécula con actividad similar, tanto en posición 5 como en posición 6. En el resto de los casos, esta sustitución produjo derivados con actividad mejorada, lo cual sugiere que esta modificación podría ser de utilidad para los objetivos buscados.



Figura 3.2. Modificaciones propuestas sobre el anillo de pirimidina 2,4-disustituido.

Resulta importante tener presente que la plataforma SwissBioisostere analiza y proporciona resultados de mejoras o detrimentos en las propiedades de las moléculas independientemente del blanco biológico que se desea modular. En la práctica, la estructura y características específicas del blanco son determinantes en la influencia que pueda ejercer una modificación estructural en la actividad y propiedades de una molécula. Es posible entonces que, frente a un determinado blanco biológico, una determinada modificación estructural produzca el efecto opuesto a las tendencias predichas por la plataforma SwissBioisostere. En consecuencia, los resultados de estos estudios deben ser considerados solamente como una orientación al momento de proponer análogos para su posterior estudio.

A partir de los resultados de la búsqueda en SwissBioisostere, se seleccionó una serie de derivados teniendo en cuenta la potencialidad de mejora de las propiedades. Se priorizó además la factibilidad sintética, es decir, aquellos análogos que puedan ser sintetizados a partir de reacciones químicas simples y de pocos pasos. Se analizó el comportamiento de estos ligandos propuestos en el sitio blanco de la proteína de envoltura de DENV-2 a partir de simulaciones de acoplamiento molecular, a fin de identificar si son capaces de unirse al bolsillo hidrofóbico, identificar la conformación más estable y compararla con la de las moléculas parentales **1** y **2**, y ordenar las mismas en un *ranking* basado en el puntaje de cada una. Las simulaciones se realizaron con el *software* AutoDock Vina, uno de los programas de acoplamiento molecular más utilizados debido a su rapidez, accesibilidad, y al hecho de ser gratuito y de código abierto [135, 136]. Adicionalmente, se empleó la plataforma SwissADME, herramienta web que permite obtener una predicción de las propiedades farmacocinéticas de los ligandos de interés [137]. El listado de predicciones de propiedades para las moléculas evaluadas se adjunta en el [Anexo II](#).

Interesantemente, se observó que, en la mayoría de los casos, la presencia de sustituyentes en la posición 5 del anillo de pirimidina genera impedimentos estéricos, lo que impide que la molécula se ubique adecuadamente en el sitio de unión. Por el contrario, cuando el mismo grupo funcional se ubica en la posición 6, el compuesto logra ingresar completamente en el bolsillo hidrofóbico, de manera similar a la molécula original ([Figura 3.3](#)). En estos casos se observa que el motivo bifénilo se encuentra inserto en el interior del bolsillo, mientras que el grupo piperidina queda expuesto al solvente.

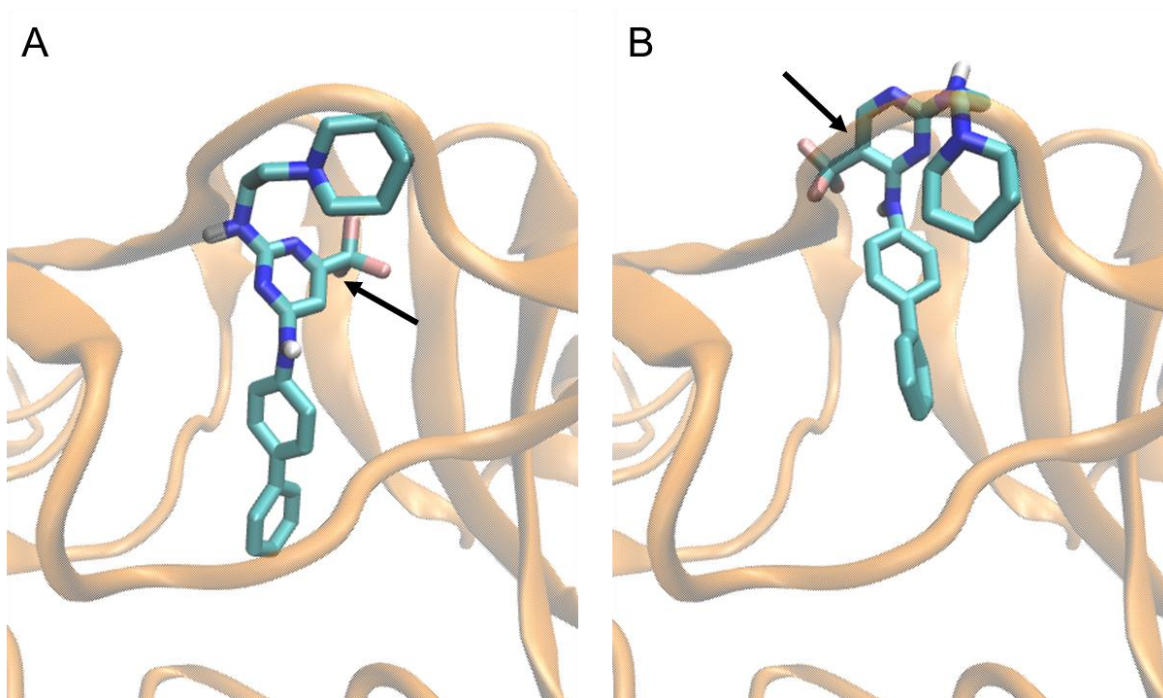


Figura 3.3. Visualizaciones de las simulaciones de acoplamiento molecular de análogos del compuesto **1** en el bolsillo β -OG de la proteína de envoltura de DENV-2 (PDB ID: 1OKE). **(A)** El sustituyente trifluorometilo en posición 6 permite el ingreso completo de la molécula en el bolsillo hidrofóbico. **(B)** El mismo sustituyente en posición 5 deja gran parte de la molécula expuesta en la superficie de la proteína. Se observó el mismo comportamiento en prácticamente todos los sustituyentes evaluados.

En concordancia con estos hallazgos, las moléculas sustituidas en posición 6 presentaron puntajes más altos que sus análogos sustituidos en posición 5 en las simulaciones de acoplamiento molecular. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió enfocar las estrategias sintéticas principalmente en la obtención de derivados sustituidos en la posición 6. Del análisis previo, se destacan los derivados que poseen el grupo trifluorometilo ($-\text{CF}_3$) y el grupo nitrilo ($-\text{CN}$) en la posición 6 del anillo de pirimidina (6- CF_3 y 6-CN, respectivamente). Los análogos 6- CF_3 presentaron los puntajes más elevados en las simulaciones de acoplamiento molecular; sin embargo, también presentaron un aumento en el valor de lipofilidad, según la predicción de SwissADME. En contraposición, los derivados 6-CN no mostraron cambios significativos en la puntuación respecto de los compuestos de referencia, pero exhibieron un mayor área polar superficial.

3.3. SÍNTESIS QUÍMICA Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LA PRIMERA SERIE DE DERIVADOS

En base a los resultados obtenidos en los estudios *in silico*, se propuso la síntesis de siete candidatos iniciales. Los compuestos **3** y **4** cuentan con el agregado del grupo trifluorometilo en la posición 6 del anillo de pirimidina, mientras que **5** y **6**, por su parte, poseen el grupo nitrilo en dicha posición. Los derivados **7** y **8** presentan un núcleo de tieno[3,2-*d*]pirimidina, el cual consiste de un tiofeno fusionado al anillo de pirimidina. Por último, el compuesto **9** es un análogo de **2** en el cual un anillo de 1,3,5-triazina reemplaza a la pirimidina central.

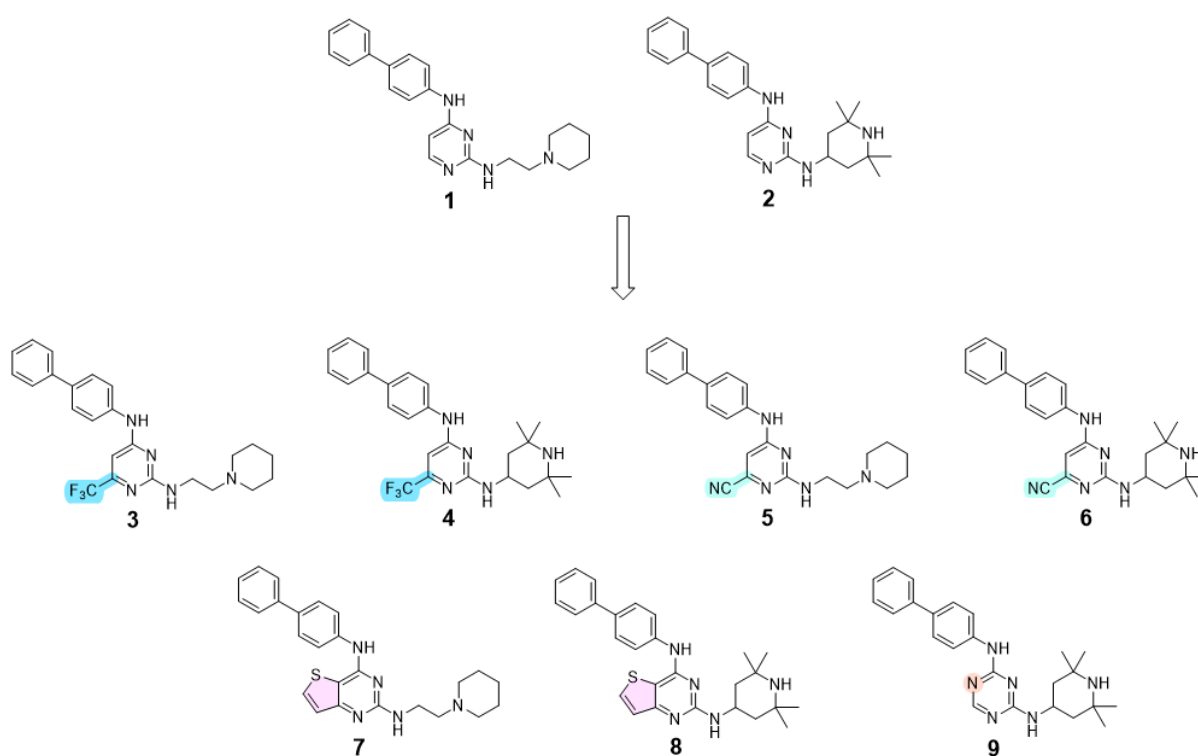
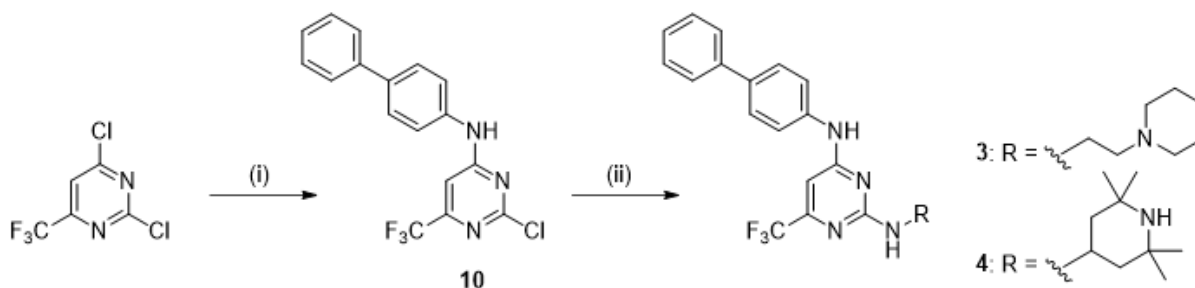


Figura 3.4. Primera serie de análogos de **1** y **2** sintetizados y evaluados.

Las síntesis de las moléculas **3**, **4**, **5** y **6** se realizaron a partir de dos reacciones consecutivas de sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) en medio básico, siguiendo protocolos descritos en literatura ([Esquema 3.1](#)) [127]. Para la preparación de los compuestos **3** y **4**, el reactivo 2,4-dicloro-6-(trifluorometil)piperidina se sometió inicialmente a una sustitución selectiva con bifenílamina, usando *n*-butanol y *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) como base. Se controló la temperatura y el tiempo de reacción de manera de propiciar únicamente la sustitución del cloro más reactivo, ubicado en la posición 4.

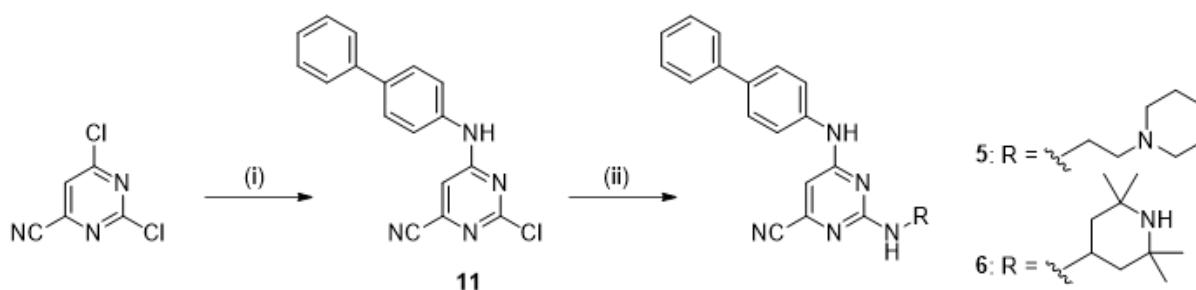


Esquema 3.1. Síntesis de los compuestos **3** y **4**. Reactivos y condiciones: (i) Bifenilamina, DIPEA, *n*-butanol, 110 °C, 24 h. (ii) Aminas, DIPEA, *n*-butanol, 180 °C, 1 h.

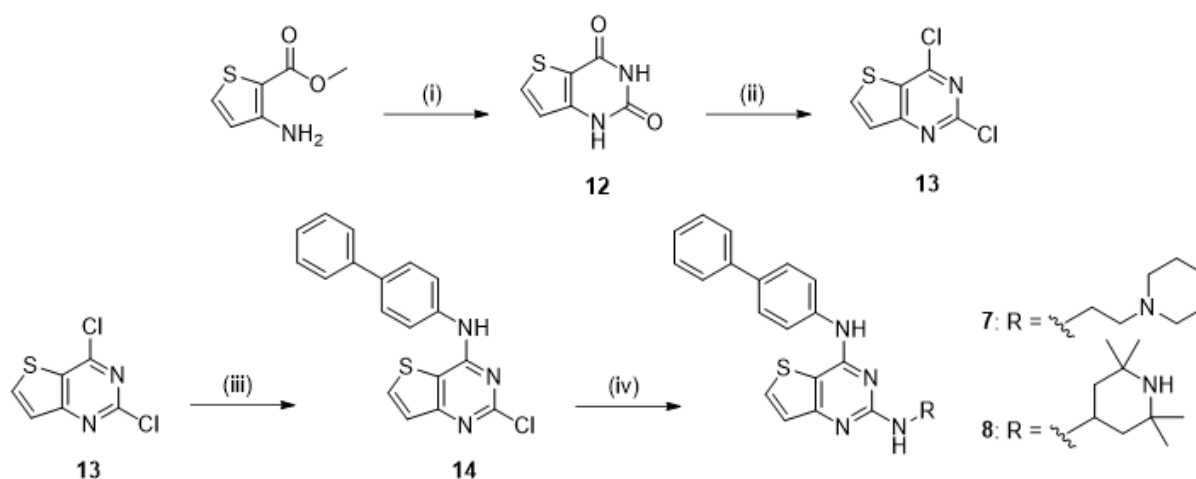
Se obtuvo el intermediario **10**, el cual fue sometido a una segunda reacción de sustitución usando 1-(2-aminoetil)piperidina o 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina y DIPEA en *n*-butanol, para la obtención de los productos finales **3** y **4** respectivamente. El átomo de cloro en posición 2 no se encuentra favorecido para la S_NAr, por lo que este paso de reacción requirió condiciones de alta presión y temperatura; sin embargo, los productos se obtuvieron con bajos rendimientos.

Los compuestos **5** y **6** se prepararon de igual forma que **3** y **4**, con la diferencia de que se partió del reactivo comercial 2,4-dicloropirimidina-6-carbonitrilo ([Esquema 3.2](#)). En este caso, el grupo nitrilo facilita la sustitución nucleofílica aromática en el átomo de cloro, en comparación con el grupo trifluorometilo, por lo que condiciones más suaves de reacción alcanzaron para la obtención del intermediario **11** con mejores rendimientos [\[138\]](#).

En paralelo, se sintetizaron los derivados **7** y **8**, los cuales poseen un núcleo de tieno[3,2-*d*]pirimidina, con el objetivo de evaluar *in vitro* moléculas que presenten simultáneamente sustituciones en posiciones 5 y 6 del núcleo central de pirimidina. La ruta de síntesis propuesta se muestra en el [Esquema 3.3](#). El reactivo comercial 3-aminotiofen-2-carboxilato de metilo se condensó con urea a 190 °C durante dos horas, según protocolos descritos en literatura [\[139\]](#). Este paso se llevó a cabo con agitación y en ausencia de solvente, ya que la temperatura de la reacción es lo suficientemente elevada como para fundir ambos reactivos. De esta manera, se obtuvo el intermediario **12**, el cual se trató con oxiclورو de fósforo y cantidades catalíticas de dimetilformamida (DMF) para dar lugar a la formación de **13**. La reacción se llevó a cabo mediante calentamiento a reflujo en ausencia de humedad, utilizando una trampa de cloruro de calcio, para evitar la formación de productos secundarios. Por último, se sometió al intermediario **13** a dos sustituciones nucleofílicas aromáticas consecutivas bajo condiciones similares a las mencionadas anteriormente, que dieron como resultado la formación de los compuestos deseados **7** y **8**.



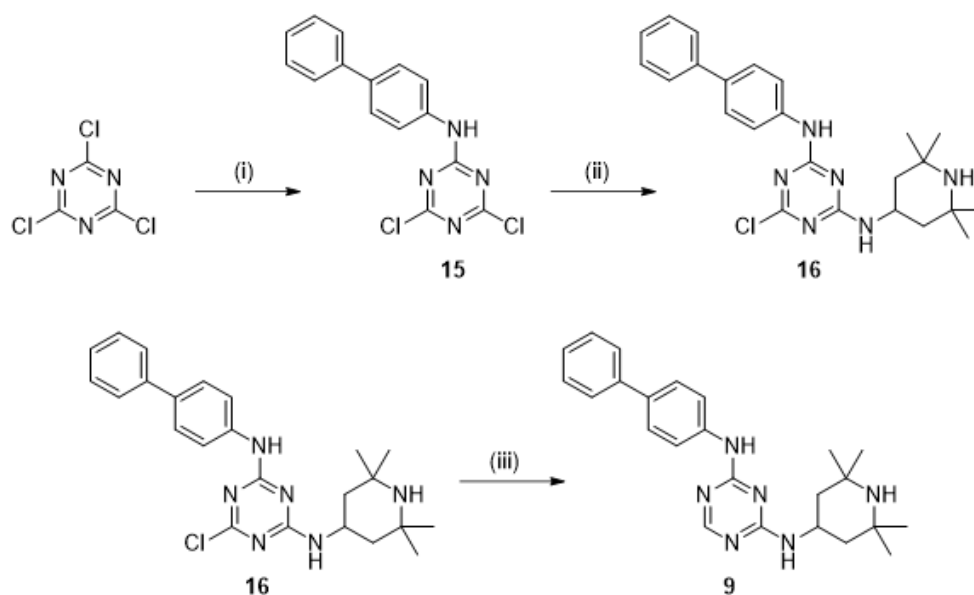
Esquema 3.2. Síntesis de los compuestos **5** y **6**. Reactivos y condiciones: (i) Bifenilamina, TEA, etanol, temperatura ambiente, 2 h. (ii) Aminas, DIPEA, *n*-butanol, 180 °C, 1 h.



Esquema 3.3. Síntesis de los compuestos **7** y **8**. Reactivos y condiciones: (i) Urea, 190 °C, 1.5 h. (ii) POCl₃, DMF, reflujo, 24 h. (iii) Bifenilamina, DIPEA, *n*-butanol, 110 °C, 24 h. (iv) Aminas, DIPEA, *n*-butanol, 180 °C, 24 h.

Adicionalmente, se propuso la síntesis del compuesto **9**, un análogo con núcleo de triazina, con el objetivo de explorar las propiedades de moléculas con un heterociclo central distinto a la pirimidina. Se escogió este andamio ya que ambos heterociclos poseen estructura y propiedades similares, sumado a que los derivados de triazina presentan mayor área polar superficial y solubilidad predicha según SwissADME, en comparación con las moléculas originales ([Anexo II](#), molécula 14). Para la obtención de este derivado, se llevaron a cabo dos reacciones consecutivas de sustitución nucleofílica aromática sobre el cloruro cianúrico, reactivo disponible comercialmente, seguido de una reacción de hidrogenación en el tercer átomo de cloro, tal como se muestra en el [Esquema 3.4](#) [140]. El primer paso de reacción consistió en la sustitución de un átomo de cloro por bifenilamina, usando acetona como solvente y Na₂CO₃ como base. El agregado de los reactivos se realizó en baño de hielo para evitar la formación de posibles productos secundarios de polisustitución. Luego, la reacción continuó por 48 horas a temperatura ambiente. El intermediario obtenido **15** fue sometido a una segunda sustitución a mayor temperatura con 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina en acetona, en presencia de K₂CO₃, lo que

permitió la obtención de **16**. Finalmente, la hidrogenación de este compuesto habilitó la obtención de **9**. En una primera instancia, se intentó realizar esta reacción utilizando hidrógeno molecular y 10% Pd/C en un equipo hidrogenador. Se evaluaron distintas condiciones variando la presión de hidrógeno; sin embargo, en todos los casos se obtuvieron trazas del producto buscado. En cambio, la hidrogenación por generación de hidrógeno *in situ* utilizando formiato de amonio y 10% Pd/C en metanol habilitó la obtención del compuesto **9** con rendimientos adecuados [141].



Esquema 3.4. Síntesis del compuesto **9**. Reactivos y condiciones: (i) Bifenilamina, Na₂CO₃, acetona, 0 °C a temperatura ambiente, 48 h. (ii) 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina, K₂CO₃, acetona, 80 °C, 48 h. (iii) Formiato de amonio, 10% Pd/C, metanol, reflujo, 24 h.

Cabe destacar que se intentó llevar a cabo también la preparación del análogo con núcleo de triazina del compuesto **1**; es decir, con la adición de la 1-(2-aminoetil)piperidina como sustituyente en el tercer paso de reacción. Sin embargo, pese a haber intentado diversas rutas sintéticas como la hidrogenación *in situ*, o en un equipo hidrogenador, en ningún caso se llegó a obtener más que trazas del producto deseado.

De esta manera, tres derivados del compuesto **1** (**3**, **5** y **7**) y cuatro derivados del compuesto **2** (**4**, **6**, **8** y **9**) fueron sintetizados. Resulta de suma importancia corroborar la identidad y comprobar la pureza de los productos finales obtenidos antes de su evaluación biológica. Por este motivo, los compuestos sintetizados fueron caracterizados mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN), de carbono (^{13}C -RMN), y por espectroscopía de masas de alta resolución (HRMS, por sus siglas en inglés, *High Resolution Mass Spectrometry*). El análisis de pureza de los productos finales fue realizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*) acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos. Todas las moléculas presentaron un grado de pureza mayor al 90%, criterio aceptado como adecuado para ensayos celulares en etapas tempranas del desarrollo de fármacos [24]. En el caso de los intermediarios **10** a **16**, se obtuvieron solamente los espectros de ^1H -RMN de los mismos, los cuales fueron suficientes para caracterizar las moléculas y poder seguir adelante con las rutas de síntesis. Las figuras de todos los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN obtenidos y procesados se encuentran adjuntas en el [Anexo III](#).

Los productos finales **3** a **9** fueron evaluados en términos de citotoxicidad en células Vero, y actividad biológica contra DENV-2 y ZIKV. Estos ensayos se realizaron en el Laboratorio de Estrategias Antivirales del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN), a cargo de la Dra. Cybele García. La citotoxicidad de los compuestos sintetizados se evaluó mediante la técnica colorimétrica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio). Este reactivo permite estimar la actividad metabólica celular a partir de la evaluación del funcionamiento de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa [142]. El MTT, de color amarillo, es captado por las células viables y reducido a su forma insoluble, el formazán, de color púrpura. Se decidió realizar en primer lugar este estudio para identificar y delimitar el rango de concentraciones adecuado para evaluar la actividad antiviral sin generar daño celular; así como para filtrar y descartar aquellas moléculas con elevada toxicidad. El ensayo se basó en la incubación de células Vero confluentes, crecidas en placa de 96 pocillos, tratadas con concentraciones seriadas de compuesto en medio de cultivo con 1% de dimetilsulfóxido (DMSO). Luego de 72 horas, se descartó el medio y se agregó MTT disuelto en medio de cultivo. Tras 30 - 40 minutos de incubación en oscuridad, se descartó el medio y se agregó etanol para disolver el formazán. La lectura de absorbancia a 590 nm y su comparación con controles de células viables permitió obtener el valor de CC_{50} para cada compuesto evaluado.

Posteriormente, se evaluó la capacidad inhibitoria de estas moléculas frente a DENV-2 y ZIKV mediante un ensayo de inhibición del rendimiento viral cuantificado por cosecha y titulación de sobrenadantes. En este experimento se incubaron células Vero en placas de 24 pocillos y se infectaron con virus a una MOI (Multiplicidad de infección, por sus siglas en inglés *multiplicity of infection*: cociente entre la cantidad de partículas virales infectivas en el inóculo y el número total de células a infectar) de 0.1. Se incubó durante 1 hora a 4 °C, para permitir la adsorción del virus a la célula. Tras ese tiempo, las células se lavaron con PBS para remover el virus no adsorbido, y se trataron con concentraciones seriadas de los compuestos en medio de cultivo con 1% de DMSO, teniendo en cuenta los rangos de concentración en los que no se observó efecto citopático. Luego de 48 horas de incubación a 37 °C, se cosecharon los sobrenadantes de los tratamientos y se cuantificó la producción viral por titulación.

Los resultados de estos experimentos se presentan en la [Tabla 3.2](#). Ninguno de los derivados estudiados presentó mejores propiedades que los compuestos parentales **1** y **2**. El compuesto **5** resultó ser menos citotóxico, en comparación con el resto de las moléculas; sin embargo, también presentó una marcada disminución en la actividad antiviral. Por otra parte, se encontró que el derivado **3** posee una destacada actividad antiviral, del orden micromolar bajo frente a ZIKV, e incluso sub-micromolar frente a DENV-2. A pesar de su considerable toxicidad, este compuesto presentó los mejores índices de selectividad de la serie. Los análogos **7** y **8**, que poseen el anillo de tiofeno fusionado al núcleo de pirimidina, presentaron considerable toxicidad y disminución de su actividad biológica. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en las simulaciones de acoplamiento molecular, ya que la estructura bicíclica fusionada de estos derivados puede considerarse como una pirimidina sustituida en ambas posiciones 5 y 6, lo cual generaría un impedimento estérico impidiendo que las moléculas ingresen al sitio blanco y ejerzan su efecto inhibitorio. Finalmente, al observar los resultados obtenidos para la molécula **9** se puede inferir que la incorporación de un núcleo de triazina no resultó en una modificación viable, ya que el compuesto presentó elevada citotoxicidad. Este resultado está en concordancia con las predicciones propuestas por la plataforma SwissBioisostere, la cual anticipaba que el reemplazo de una pirimidina por una 1,3,5-triazina va en detrimento de las mejoras buscadas en la mayoría de los casos.

Tabla 3.2. Actividad frente a DENV-2 y ZIKV, citotoxicidad e índice de selectividad de los compuestos **3** a **9**.

Compuesto	CC ₅₀ (μM) ^a	CE ₅₀ DENV-2 (μM) ^b	IS DENV-2 ^c	CE ₅₀ ZIKV (μM) ^b	IS ZIKV ^c
3	5.74 ± 0.76	0.76 ± 0.06	7.55	1.11 ± 0.11	5.17
4	2.06 ± 0.01	ND ^d	ND	ND	ND
5	25.40 ± 1.21	8.06 ± 0.21	3.15	4.31 ± 0.45	5.89
6	7.50 ± 1.10	1.96 ± 0.12	3.82	4.40 ± 0.28	1.70
7	7.50 ± 0.07	> 7.50	< 1	4.10 ± 0.32	1.83
8	6.40 ± 1.10	4.95 ± 0.01	1.30	4.15 ± 0.23	1.54
9	5.01 ± 0.16	ND	ND	ND	ND

^aCC₅₀: concentración citotóxica 50% en células Vero. Los resultados representan el promedio y desvío estándar de dos experimentos independientes.

^bCE₅₀: concentración efectiva 50%. Los resultados representan el promedio y desvío estándar de dos experimentos independientes.

^cIS: índice de selectividad (IS = CC₅₀/CE₅₀).

^dND: no determinado.

3.4. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN LIGANDO-PROTEÍNA POR DINÁMICA MOLECULAR

Con el fin de caracterizar el modo de unión del compuesto de mayor actividad, se estudió el comportamiento del ligando **3** en el bolsillo hidrofóbico de la proteína E de DENV-2 mediante una simulación de dinámica molecular de 100 ns. Como punto de partida, se utilizó la estructura del complejo ligando-proteína obtenida a partir de la simulación de acoplamiento molecular.

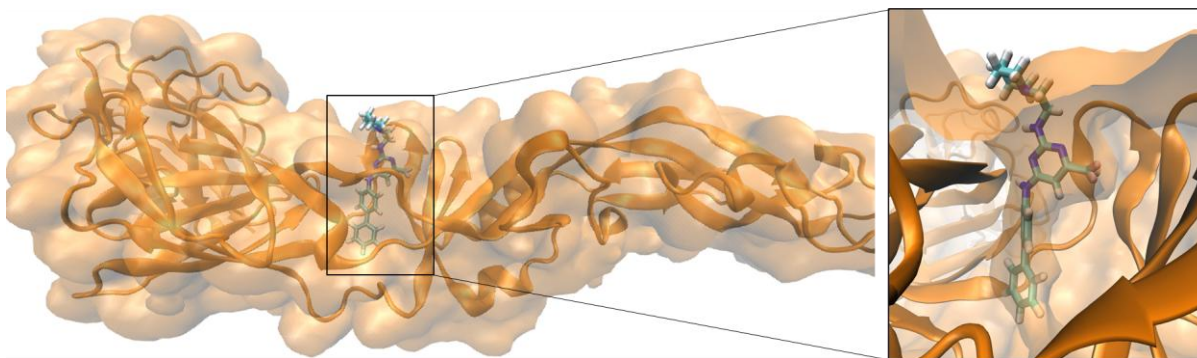


Figura 3.5. Estructura representativa obtenida de la simulación del compuesto **3** en el bolsillo hidrofóbico de la proteína E de DENV-2 (PDB ID: 1OKE). La imagen corresponde a la estructura del sistema tras 76.6 ns de simulación.

En primer lugar, una inspección visual de la simulación permitió observar que el ligando se mantiene dentro del bolsillo durante toda la trayectoria ([Figura 3.5](#)). El desvío cuadrático medio (RMSD, por sus siglas en inglés, *Root Mean Square Deviation*) es un parámetro frecuentemente empleado para representar la estabilidad del ligando a lo largo de la simulación [143]. El cálculo de RMSD mide el desvío de cada conformación adoptada por el ligando respecto a su pose inicial. En otras palabras, cuanto menor sea el valor de RMSD obtenido a un tiempo dado, mayor es la similitud entre la conformación adoptada a ese tiempo y la conformación inicial. La [Figura 3.6](#) muestra el gráfico de RMSD en función del tiempo para la simulación del ligando **3**. Se observa que el valor de RMSD se mantiene entre los 1.5 Å y los 3.5 Å a lo largo de todo el tiempo de simulación, presentando un valor promedio de 2.65 Å. Este valor se encuentra dentro del rango normalmente observado en simulaciones de complejos ligando-proteína [144]. Se puede distinguir un período, entre los 40 ns y los 80 ns, en donde el RMSD resulta algo menor que en el resto de la simulación, con un valor promedio de 2.3 Å.

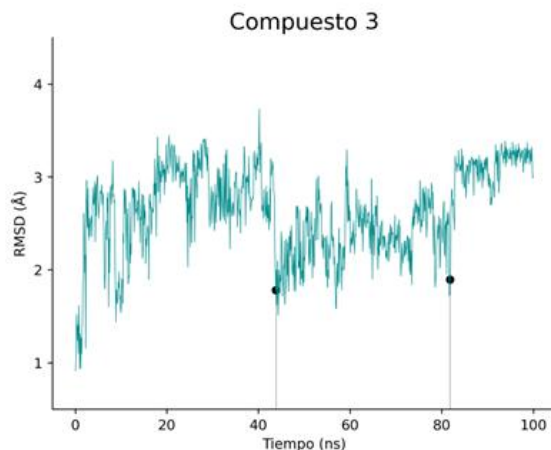


Figura 3.6. Gráfico de RMSD del ligando **3** en función del tiempo de simulación.

Para entender cuáles son las interacciones que pueden contribuir a la estabilización del ligando, se analizó la simulación en búsqueda de posibles interacciones hidrofóbicas y de puente de hidrógeno entre grupos funcionales del ligando y residuos de la proteína. Se detectó la formación de un enlace de tipo puente de hidrógeno entre el grupo amino en la posición 4 del anillo de pirimidina y el grupo carbonilo del residuo Thr48 ([Figura 3.7 A](#)). Se considera que una interacción de puente de hidrógeno ocurre cuando los átomos pesados involucrados se encuentran a 3 Å de distancia, con un ángulo mayor a 150° [145]. Esta interacción aparece tras los primeros 40 ns de simulación, y permanece estable a lo largo del tiempo ([Figura 3.7 B-C](#)). Una vez establecida esta interacción, el ligando experimentó un desplazamiento respecto a la conformación previa, y se mantuvo estable durante el resto de la simulación, lo cual explica la estabilización observada en el gráfico de RMSD.

Adicionalmente, se observó una interacción hidrofóbica entre el anillo aromático terminal del grupo bifenilo del compuesto **3** y el anillo aromático del residuo Phe279 ([Figura 3.7 A](#)). Las interacciones hidrofóbicas entre anillos aromáticos son denominadas interacciones de apilamiento π - π , ocurren debido al solapamiento de los orbitales π de los anillos, y pueden clasificarse de acuerdo a las orientaciones relativas de los anillos: apilamiento paralelo centrado, apilamiento paralelo desplazado, perpendicular en forma de T, y perpendicular en forma de Y ([Figura 3.8](#)) [146]. Una interacción perpendicular en forma de T ocurre si la distancia entre los centroides de los anillos aromáticos se encuentra entre 4.5 Å y 7 Å, siendo el valor más frecuente 5.5 Å; y con un ángulo diedro preferentemente de 90°, admitiendo ángulos en un rango de hasta 60° - 120° [147]. A lo largo de la simulación, la distancia entre los centroides del anillo aromático terminal del grupo bifenilo y el anillo aromático de Phe279 se mantiene alrededor de 6 Å ([Figura 3.7 D](#)). Sin embargo, alrededor de los 40 ns de simulación se conforma un ángulo diedro entre los planos de estos ciclos que ronda los 90° ([Figura 3.7 E](#)). Esta interacción de carácter hidrofóbica, junto con el puente de hidrógeno con Thr48, puede estar contribuyendo a la alta estabilidad de la molécula en el sitio blanco durante la segunda mitad de la simulación, y puede ser uno de los factores que explique la elevada actividad antiviral de esta molécula.

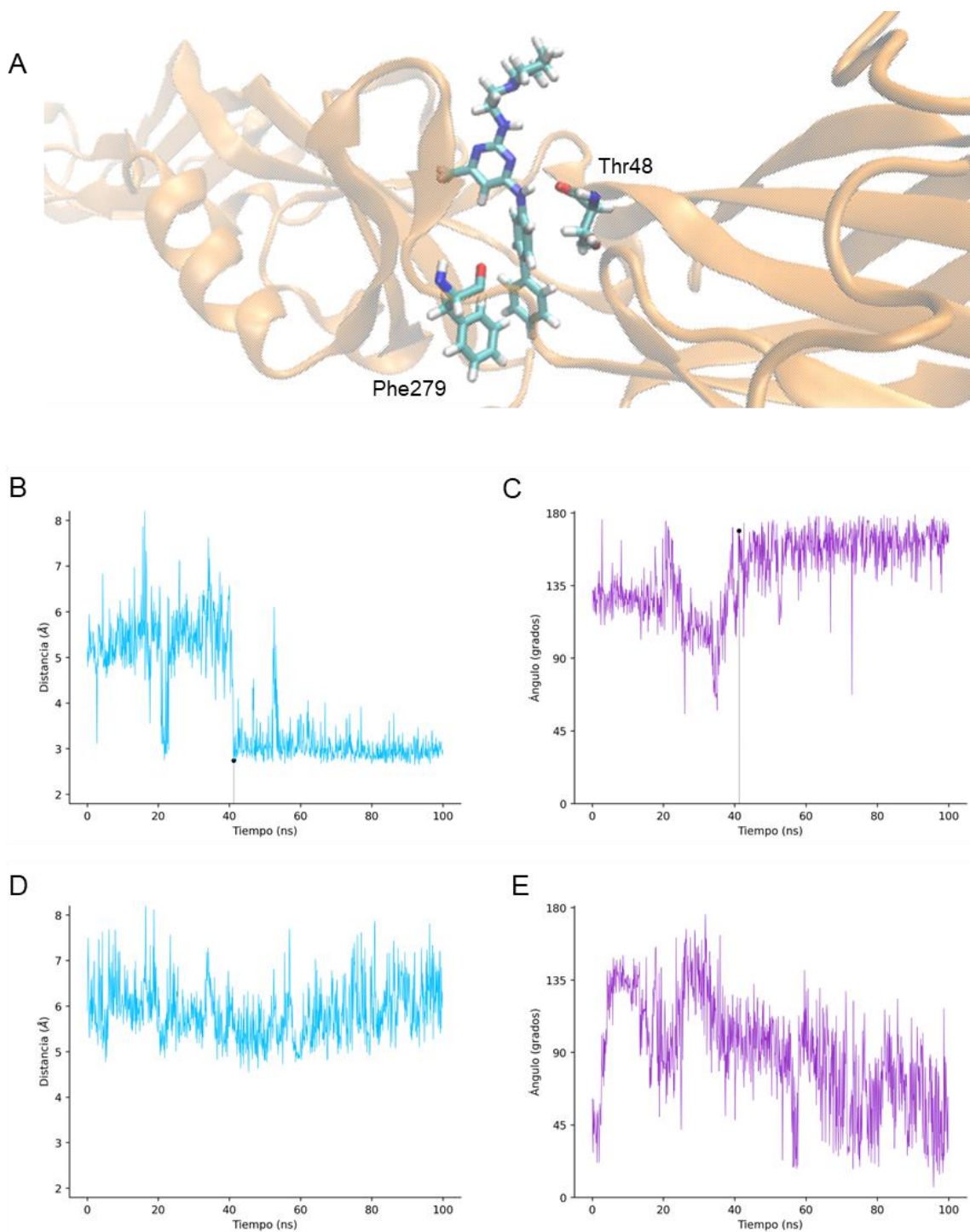


Figura 3.7. Análisis de la simulación de dinámica molecular del ligando **3** en el sitio blanco de la proteína de envoltura de DENV-2 (PDB ID: 1OKE). **(A)** Visualización de las interacciones detectadas entre el ligando **3** y residuos que conforman el bolsillo hidrofóbico. La imagen corresponde a la estructura del sistema tras 42 ns de simulación. **(B)** Distancia y **(C)** ángulo de enlace entre el átomo de nitrógeno en la posición 4 de la pirimidina de **3** y el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de Thr48. **(D)** Distancia entre centroides y **(E)** ángulo diedro formado entre el anillo terminal del grupo bifenilo de **3** y el anillo aromático de Phe279.

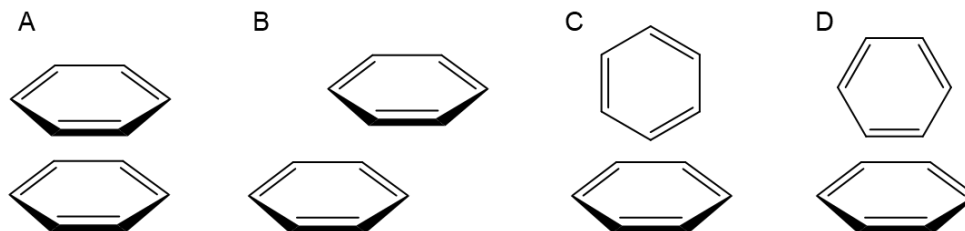


Figura 3.8. Orientaciones posibles en interacciones hidrofóbicas de apilamiento entre anillos aromáticos. **(A)** Apilamiento paralelo centrado. **(B)** Apilamiento paralelo desplazado. **(C)** Perpendicular en forma de T. **(D)** Perpendicular en forma de Y.

A partir de la simulación de dinámica molecular, se calculó la energía de unión ligando-proteína del sistema mediante el método MM/GBSA (por sus siglas en inglés *Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area*). Esta metodología evalúa la energía libre del complejo ligando-proteína y la energía libre de las moléculas individuales, promediando todas las estructuras obtenidas a lo largo de la trayectoria de dinámica molecular [148]. El ΔG de unión se calcula como la diferencia entre la energía del complejo y la de las moléculas individuales.

El cálculo de energía por el método MM/GBSA arrojó un valor de $\Delta G = (-32.7 \pm 6.3)$ kcal/mol para el compuesto **3**. En la [Figura 3.9 A](#) se muestra la deconvolución energética por residuo, lo que permite identificar cuáles contribuyen en mayor medida a la estabilización del complejo. El análisis de la deconvolución revela que existen principalmente cuatro regiones en la secuencia de aminoácidos de la proteína E con residuos que presentan interacciones favorables con el ligando **3**, destacándose 13 residuos que aportan al menos 0.5 kcal/mol a la energía de unión. La visualización de estos residuos en la estructura tridimensional de la proteína muestra que los mismos conforman estructuralmente el bolsillo hidrofóbico ([Figura 3.9 B](#)). Cabe destacar que en este grupo de 13 residuos se encuentran tanto Thr48 como Phe279. Muchos de los otros residuos que contribuyen significativamente a la energía de unión poseen cadenas laterales hidrofóbicas, tales como Val130, Leu135, Phe193, Leu198, Leu207, Ile270 y Leu277, destacando la naturaleza hidrofóbica del bolsillo y la importancia de las interacciones hidrofóbicas para la estabilización del ligando en el blanco de acción.

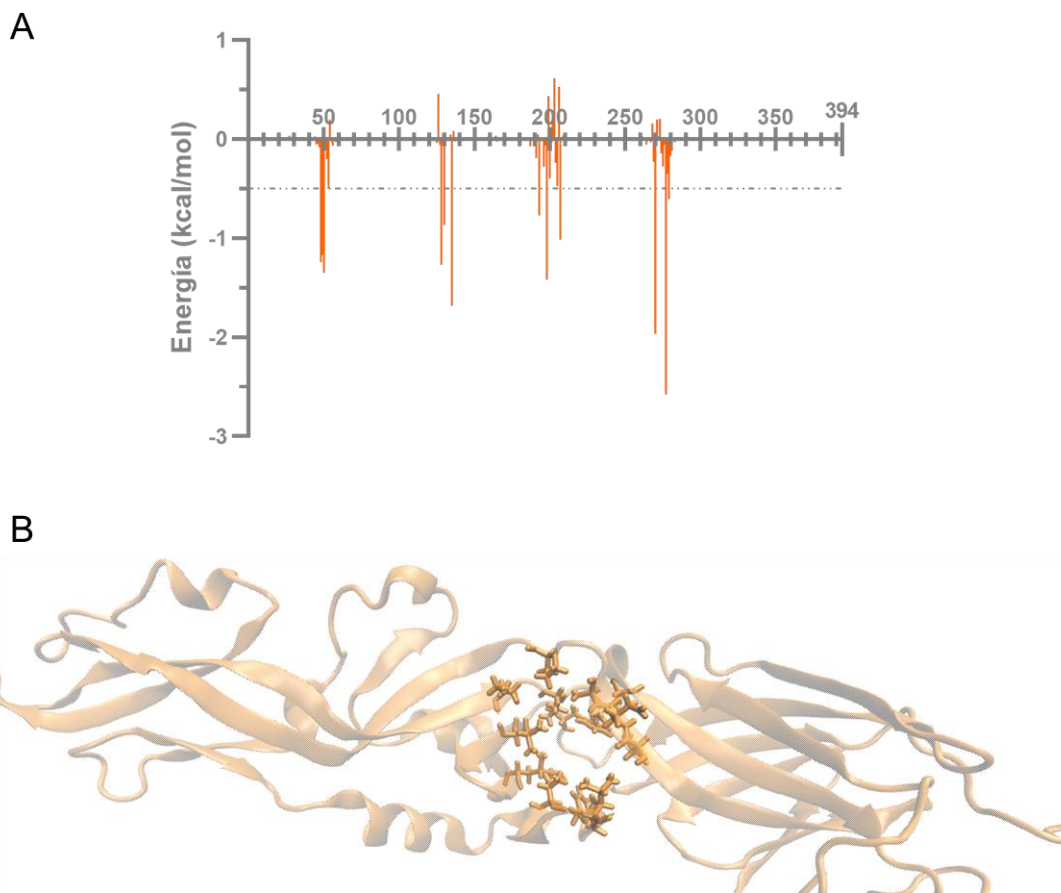


Figura 3.9. (A) Deconvolución de la energía de unión ligando-proteína por residuo. **(B)** Localización espacial de los trece residuos que contribuyen con más de 0.5 kcal/mol a la energía de unión. Todos ellos forman parte del bolsillo hidrofóbico.

3.5. DISCUSIÓN

Con el fin de encontrar nuevas entidades químicas capaces de inhibir la entrada de los virus dengue y Zika a la célula, se llevó a cabo una búsqueda computacional de posibles modificaciones estructurales a partir de las estructuras de los compuestos **1** y **2**, inhibidores de entrada de DENV. Este estudio permitió en primera instancia filtrar el espacio químico y proponer moléculas que puedan llegar a presentar mejoras en relación a las propiedades que un candidato a fármaco debe cumplir, para garantizar la eficacia y seguridad necesarias para poder ser evaluado posteriormente en ensayos preclínicos. En este contexto, se comenzó evaluando la actividad antiviral y la toxicidad celular de candidatos seleccionados, haciendo énfasis en el margen de seguridad que relaciona ambas variables, es decir, el índice de selectividad.

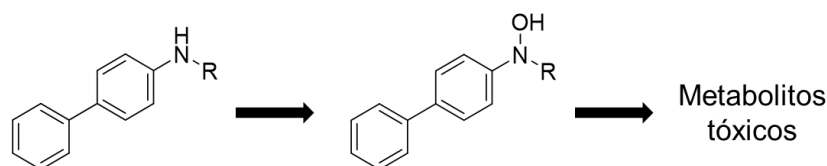
La serie de moléculas diseñadas no presentó mejoras significativas en las propiedades respecto a las moléculas parentales. En cuanto a la actividad antiviral, se destaca al derivado **3**, que presentó una actividad similar a **1** y **2** frente a DENV-2, del orden sub-micromolar. Este compuesto logró inhibir también al virus Zika, con una CE_{50} de orden similar al valor que posee contra DENV-2. El principal problema del derivado **3** es su elevada toxicidad celular: pese a ser el análogo de la serie con mejor índice de selectividad, posee una CC_{50} cercana a 5 μM , que debe ser mejorada si se pretende desarrollar un fármaco seguro. Cabe destacar que la citotoxicidad de **3**, así como la de todos los análogos de esta serie, fue evaluada tras 72 horas de incubación. En el caso de las moléculas **1** y **2**, el dato de citotoxicidad reportado en literatura refiere al tratamiento celular con compuesto durante 48 horas [127]. Subsiguientes experimentos han demostrado que estas moléculas presentan una toxicidad celular cercana al 100% a una concentración 10 μM cuando el tratamiento se efectúa durante 72 horas, por lo que no es posible afirmar que el derivado **3** sea más citotóxico que los compuestos originales **1** y **2**.

Por otra parte, de todos los análogos sintetizados, el derivado **5** fue el que presentó menor toxicidad celular, con un valor de CC_{50} de 25.4 μM medido a las 72 horas de incubación, resultando de esta forma menos citotóxico que **1** y **2**. Sin embargo, mostró una actividad antiviral considerablemente menor frente a ambos virus, en comparación con los compuestos **1**, **2** y **3**. Por esto mismo, y considerando que **5** presenta un índice de selectividad menor al de **3**, se lo considera poco adecuado para continuar su desarrollo.

Vale la pena destacar también la buena correlación entre las predicciones computacionales y los resultados experimentales de los compuestos **7**, **8** y **9**. Las simulaciones de acoplamiento molecular de análogos de **1** y **2** con sustituyentes en la posición 5 del anillo de pirimidina señalaron que estas moléculas no serían capaces de alojarse en el bolsillo hidrofóbico, lo cual coincide con la disminución de actividad biológica observada. Por su parte, la plataforma SwissBioisostere destacó la frecuencia con la que la sustitución de la pirimidina por 1,3,5-triazina resultaba en un detrimento en las propiedades del compuesto, tal cual ocurrió en este caso particular. Por todo esto, se decide continuar trabajando en la mejora del derivado **3** ya que, de las moléculas evaluadas, resultó ser la más activa y presentó el mayor índice de selectividad.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, resulta clara la necesidad de realizar modificaciones en la estructura del compuesto **3** con el objetivo de disminuir su elevada toxicidad celular. El motivo bifenilo presente, tanto en el derivado **3** como en las moléculas parentales **1** y **2**, podría ser uno de los factores causantes de la citotoxicidad. Este grupo funcional está formado por dos anillos de benceno conectados, lo que le confiere alta lipofilicidad. La lipofilicidad es una propiedad fisicoquímica clave, directamente relacionada con las propiedades ADMET (adsorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad) de los candidatos a fármaco [149]. En particular, numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han encontrado correlación directa entre lipofilicidad y promiscuidad farmacológica, calidad que refiere a la tendencia a interactuar con múltiples receptores y provocar efectos secundarios adversos indeseados [150, 151].

Además de su elevada lipofilicidad, la geometría particular del grupo funcional bifenilo habilita la posibilidad de formar un sistema aromático plano extendido, lo que favorece la presencia de interacciones de apilamiento π - π entre moléculas. Existen reportes que demuestran que este tipo de interacciones actúan como fuerza impulsora en la formación de agregados en moléculas con fragmentos bifenilos *p*-sustituídos en su estructura [152]. Esto deriva en entidades químicas de baja solubilidad que con frecuencia presentan problemas de toxicidad [153]. Otro inconveniente, relacionado particularmente con las bifenilaminas, es la capacidad de producir metabolitos tóxicos, producto de la reacción de *N*-hidroxilación catalizada por enzimas del citocromo P450 (CYP450) [154]. Este intermediario es altamente reactivo y puede ser sucesivamente metabolizado para generar múltiples especies, tales como nitrosoarilaminas, derivados *o*-acetilados, y también especies cargadas (Esquema 3.5). Estudios demuestran que tanto la *N*-hidroxibifenilamina como sus metabolitos están asociados a problemas de toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad [155, 156].



Esquema 3.5. Metabolización de bifenilaminas por efecto de las enzimas del citocromo P450 [155].

Por todo esto, se puede concluir que el motivo bifenilo presente en el compuesto **3** no resulta un fragmento óptimo si se desea desarrollar una molécula con propiedades mejoradas. Es probable que este grupo funcional pueda ser el causante de la elevada toxicidad observada. Sin embargo, el reemplazo de este grupo funcional podría también conllevar la pérdida de actividad biológica ya que, como se observó en la deconvolución energética, muchos de los residuos que favorecen en mayor medida la interacción con **3** son de características hidrofóbicas, tales como las leucinas 135, 198, 207 y 277; la isoleucina 270; las fenilalaninas 193 y 279; y la valina 130, entre otros. La naturaleza hidrofóbica del sitio de unión establece cierto grado de lipofilicidad necesario en los ligandos para que puedan interactuar y ejercer su efecto inhibitorio. En este sentido, se enfocarán los esfuerzos en encontrar una estructura de toxicidad reducida sin que se vea comprometida la eficacia antiviral contra dengue y Zika.

Capítulo 4

Optimización de compuestos

4.1. PRIMERA RONDA DE OPTIMIZACIÓN: REEMPLAZO DEL MOTIVO BIFENILO

Con el fin de obtener moléculas con menor toxicidad y propiedades farmacológicas mejoradas, se propuso la síntesis de una nueva ronda de moléculas, en donde el grupo bifenilamina se encuentre sustituido por diferentes aminas aromáticas y alifáticas. Se seleccionaron estas modificaciones en particular debido a que la elevada citotoxicidad del compuesto de referencia **3** podría deberse a factores relacionados con este grupo funcional, tales como la hidrofobicidad, planaridad, y posible formación de metabolitos tóxicos [149, 150, 151, 153, 154]. En este sentido, se planteó inicialmente la síntesis de derivados con los grupos 4-cloroanilina y 4-clorobencilamina en la posición 4 del anillo de pirimidina, en reemplazo de la bifenilamina (Figura 4.1).

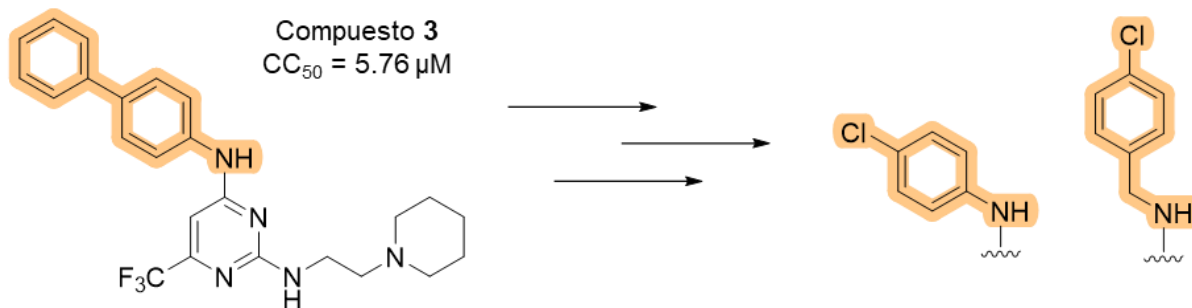


Figura 4.1. Modificaciones iniciales propuestas en reemplazo del grupo bifenilo.

Si bien el compuesto **3** fue la molécula seleccionada para su optimización, se propuso la síntesis de análogos tanto del compuesto **3** como del compuesto **4**, debido a la disponibilidad de reactivos y factibilidad sintética. De esta forma, cuatro nuevas entidades químicas fueron sintetizadas. Los compuestos **17** y **18** poseen el grupo funcional 4-cloroanilina en reemplazo de la bifenilamina, mientras que las moléculas **19** y **20**, por su parte, cuentan con el resto 4-clorobencilamina en dicha posición (Figura 4.2).

Esta nueva serie consta de moléculas que poseen un átomo de cloro en su estructura. La introducción de átomos de cloro es una estrategia frecuentemente adoptada en campañas de descubrimiento de fármacos [157]. La presencia de un halógeno puede favorecer la formación de interacciones no covalentes con residuos del bolsillo hidrofóbico, contribuyendo favorablemente a la unión proteína-ligando [158]. En particular, el reemplazo del grupo fenilo terminal por un átomo de cloro permite obtener una molécula sin un sistema aromático plano extendido como el bifenilo, con los posibles inconvenientes que este fragmento conlleva, pero manteniendo la lipofilia necesaria para interactuar con el bolsillo hidrofóbico. Por su parte, los compuestos **19** y **20** cuentan con un grupo metileno adicional, que podría favorecer la flexibilidad conformacional de estos ligandos.

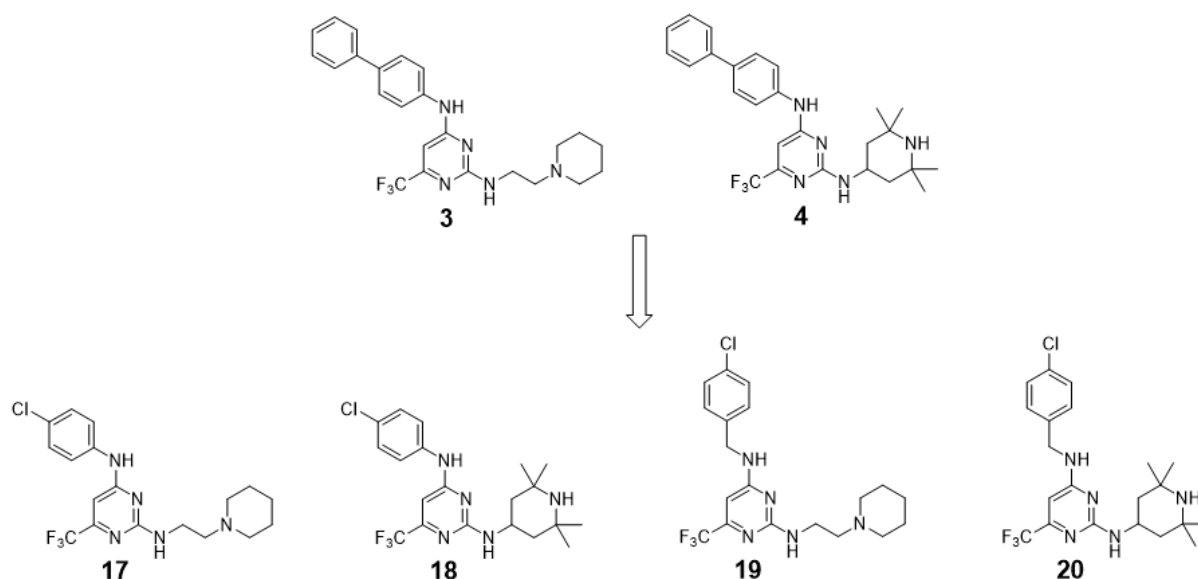
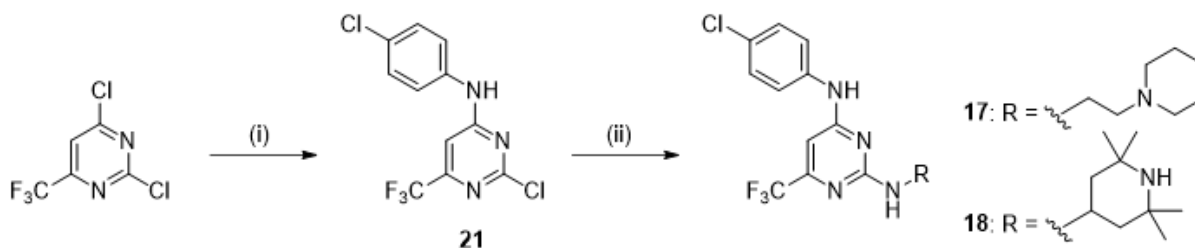


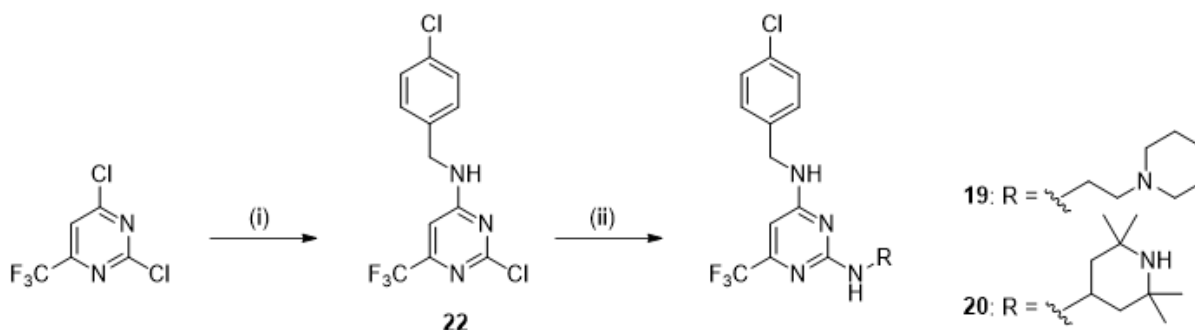
Figura 4.2. Primera serie de análogos de **3** y **4** sintetizados y evaluados.

Se llevó a cabo la síntesis de los cuatro derivados iniciales a partir de dos reacciones consecutivas de sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) en medio básico. Para el caso de los compuestos **17** y **18**, se hizo reaccionar al reactivo comercial 4-cloroanilina con 2,4-dicloro-6-(trifluorometil)piperidina en etanol, usando DIPEA como base. El calentamiento a reflujo de esta mezcla habilitó la obtención del intermediario monosustituido **21**, el cual se trató con 1-(2-aminoetil)piperidina o 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina para la obtención de los productos finales **17** y **18** respectivamente ([Esquema 4.1](#)). Al igual que para la síntesis de **3** y **4**, la sustitución del segundo átomo de cloro ocurre en condiciones de alta presión y temperatura, por lo que la reacción se llevó a cabo en *n*-butanol a 180°C, usando un vial sellado que permite trabajar a presiones altas [\[127\]](#). De esta forma, se logró la obtención de los productos deseados con rendimientos entre 25% y 50%.



Esquema 4.1. Síntesis de los compuestos **17** y **18**. Reactivos y condiciones: (i) 4-cloroanilina, DIPEA, etanol, reflujo, 24 h. (ii) Aminas, DIPEA, *n*-butanol, 180 °C, 1 h.

Para la preparación de los derivados **19** y **20**, se mezcló 2,4-dicloro-6-(trifluorometil)piperidina y 4-clorobencilamina en etanol, en presencia de trietilamina (TEA). Se observó desaparición completa del reactivo tras 1 hora de calentamiento a reflujo, indicando que la formación del intermediario **22** ocurre con mayor velocidad, en comparación con la formación de **21**. Esta diferencia se podría explicar teniendo en cuenta que la 4-clorobencilamina es una amina alifática, la cual presenta una reactividad considerablemente mayor en S_NAr debido a su mayor nucleofilia [159]. Finalmente, la sustitución del segundo átomo de cloro en condiciones similares a las mencionadas anteriormente dio lugar a la formación de los productos finales **19** y **20** (Esquema 4.2).



Esquema 4.2. Síntesis de los compuestos **19** y **20**. Reactivos y condiciones: (i) 4-clorobencilamina, TEA, etanol, reflujo, 1 h. (ii) Aminas, DIPEA, *n*-butanol, 170 °C, 1 o 3 h.

Los cuatro productos finales sintetizados fueron caracterizados por ¹H-RMN, ¹³C-RMN, y por espectroscopía de masas de alta resolución. Se analizó la pureza de los mismos por HPLC-UV, lo que permitió corroborar que todos estos compuestos presentan un grado de pureza mayor al 90%, criterio aceptado como adecuado para ensayos celulares en etapas tempranas del desarrollo de fármacos [24]. En el caso de los intermediarios **21** y **22**, se obtuvieron únicamente sus espectros de ¹H-RMN, los cuales permitieron corroborar la identidad de las moléculas para poder continuar con las rutas de síntesis correspondientes. Las figuras de los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN obtenidos se encuentran adjuntas en el Anexo III.

Se evaluó la citotoxicidad y la actividad antiviral frente a DENV-2 y ZIKV de estos cuatro compuestos. La determinación de toxicidad en células Vero se realizó mediante el ensayo colorimétrico del MTT, mientras que para la medición de la actividad antiviral se llevaron a cabo ensayos de inhibición del rendimiento viral, cuantificados por cosecha y titulación de los sobrenadantes de células tratadas. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Estrategias Antivirales del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN), a cargo de la Dra. Cybele García. Los resultados se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Actividad frente a DENV-2 y ZIKV, citotoxicidad e índice de selectividad de los compuestos **17** a **20**. Se agrega la data del compuesto **3** determinada anteriormente a fines comparativos.

Compuesto	CC ₅₀ (μM) ^a	CE ₅₀ DENV-2 (μM) ^b	IS DENV-2 ^c	CE ₅₀ ZIKV (μM) ^b	IS ZIKV ^c
17	18.82 ± 1.21	10.00 ± 1.12	1.88	10.00 ± 0.83	1.88
18	5.19 ± 0.12	3.15 ± 0.21	1.64	2.48 ± 0.45	2.09
19	23.83 ± 1.56	1.16 ± 0.03	20.54	2.61 ± 0.07	9.13
20	7.20 ± 0.23	4.67 ± 0.08	1.54	> 7.20	< 1
3	5.74 ± 0.76	0.76 ± 0.06	7.55	1.11 ± 0.11	5.17

^aCC₅₀: concentración citotóxica 50% en células Vero. Los resultados representan el promedio y desvío estándar de dos experimentos independientes.

^bCE₅₀: concentración efectiva 50%. Los resultados representan el promedio y desvío estándar de dos experimentos independientes.

^cIS: índice de selectividad (IS = CC₅₀/CE₅₀).

De todos los derivados evaluados, el compuesto **19** destaca por su menor toxicidad, con una CC₅₀ considerablemente mayor (23.83 μM, frente a 5.74 μM del compuesto **3**), manteniendo muy buenos valores de actividad antiviral. Además, exhibe los índices de selectividad más altos de toda la serie frente a ambos virus, por lo que se perfila como un candidato prometedor. En conjunto, los resultados permiten concluir que este análogo representa una mejora respecto a los compuestos originales **1** y **2**.

Por otro lado, la molécula **17** también resultó menos citotóxica respecto al compuesto **3**; sin embargo, esta estructura disminuyó su actividad antiviral frente a dengue y Zika. Al comparar los valores de CC₅₀ de las moléculas **17** y **18**, se observa que el resto 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina que se encuentra como sustituyente en la posición 2 del núcleo de pirimidina conduce a la obtención de una molécula más tóxica que aquella que posee el resto 1-(2-aminoetil)piperidina en dicha posición. El mismo efecto se evidencia si se comparan los resultados de toxicidad de **19** con **20**. La tendencia también se repite, en todos los casos, al analizar los resultados obtenidos para los compuestos de la serie anterior ([Tabla 3.2](#)). En consecuencia, puede concluirse que el sustituyente 1-(2-aminoetil)piperidina se asocia con moléculas de menor citotoxicidad, mientras que el grupo 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina resulta poco favorable para el diseño de derivados con propiedades farmacológicas mejoradas. Este resultado se tendrá en cuenta al momento de expandir la serie de análogos, con el objetivo de enfocar los esfuerzos a la síntesis de compuestos más prometedores.

4.2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN LIGANDO-PROTEÍNA POR DINÁMICA MOLECULAR

Se realizaron estudios *in silico* del comportamiento del compuesto **19** en el bolsillo hidrofóbico de la proteína E de DENV-2, con el fin de caracterizar el modo de unión y estudiar las interacciones presentes entre la proteína y este ligando. En primer lugar, se realizó una simulación de acoplamiento molecular entre el ligando y la estructura cristalográfica de la proteína E (PDB ID: 1OKE) usando el *software* AutoDock Vina. Esto permitió conocer la conformación más estable del ligando dentro del bolsillo hidrofóbico, y obtener una estructura compatible del complejo proteína-ligando para ser usada como punto de partida en una simulación de dinámica molecular.

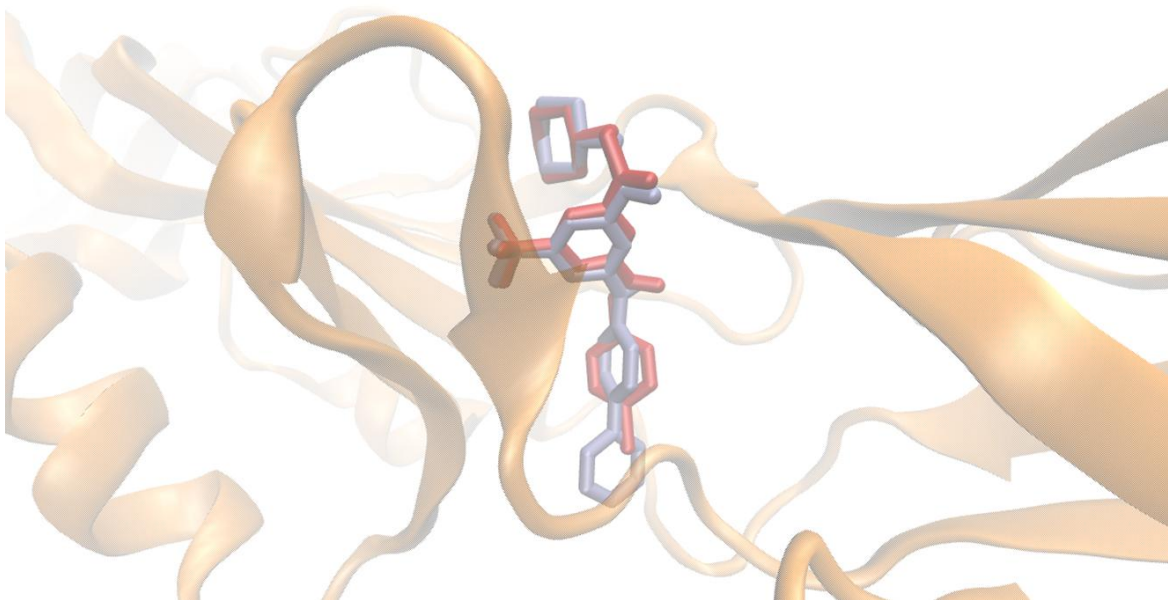


Figura 4.3. Simulaciones de acoplamiento molecular superpuestas de los ligandos **3** (azul) y **19** (rojo) en el bolsillo hidrofóbico de la proteína de envoltura de DENV-2 (PDB ID: 1OKE).

En la [Figura 4.3](#) se muestra la superposición de las estructuras de los ligandos **3** y **19** en el bolsillo hidrofóbico obtenidas tras efectuar las simulaciones de acoplamiento molecular. Se observa que los ligandos se acomodan en el sitio de manera prácticamente similar. Los puntajes obtenidos para ambos ligandos también son equivalentes, lo que sugiere que las dos moléculas podrían tener un patrón de interacciones similar con los residuos del sitio blanco y, en consecuencia, actuar con un mecanismo de acción antiviral similar. Para corroborar este supuesto, se realizó una dinámica molecular de 100 ns de duración, utilizando la estructura del complejo obtenido en la simulación de acoplamiento como conformación inicial.

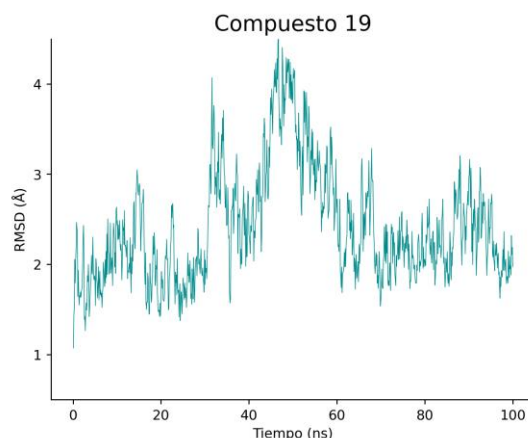


Figura 4.4. Gráfico de RMSD del ligando **19** en función del tiempo de simulación.

Una primera inspección visual permite comprobar que el ligando se mantiene en el sitio blanco durante todo el tiempo de simulación. El análisis de la trayectoria obtenida indica que el ligando **19** posee alta estabilidad en el sitio de unión. El cálculo de RMSD en función del tiempo muestra que el desvío del ligando respecto a su conformación inicial es significativamente bajo, con un valor promedio de 2.41 Å, incluso menor al encontrado para el ligando **3**, lo que refleja la elevada estabilidad del complejo formado ([Figura 4.4](#)). En particular, el valor de RMSD se mantiene cercano a los 2 Å durante la mayor parte de la simulación; salvo por un breve período de tiempo, alrededor de los 50 ns, donde se observa un incremento del mismo.

Al analizar las interacciones presentes entre el ligando y los residuos que conforman el bolsillo hidrofóbico, se detecta la interacción de tipo puente de hidrógeno entre el grupo amino en la posición 4 del anillo de pirimidina y el grupo carbonilo del residuo Thr48, también presente en el compuesto **3** ([Figura 4.5 A](#)). En esta ocasión, se observa que la interacción se presenta prácticamente desde el inicio de la simulación y se mantiene constante a lo largo de la misma, lo cual podría impactar en la elevada estabilidad del complejo ([Figura 4.5 B-C](#)). El promedio de la distancia interatómica a lo largo de la trayectoria es, en este caso, de 2.98 Å; mientras que el promedio del ángulo formado entre los átomos resulta ser de 156°.

Se investigó la formación de posibles enlaces entre el átomo de cloro de **19** y residuos del bolsillo hidrofóbico de la proteína E. Los halógenos pesados (cloro, bromo, yodo) poseen una distribución anisotrópica de sus electrones externos, localizada de forma ecuatorial al enlace covalente carbono-halógeno, lo que genera regiones de potencial electrostático negativo y positivo sobre el mismo átomo [[160](#)]. Este fenómeno conlleva a que el átomo de halógeno pueda actuar como aceptor de hidrógeno, así como también establecer interacciones no covalentes con átomos electronegativos [[161](#)].

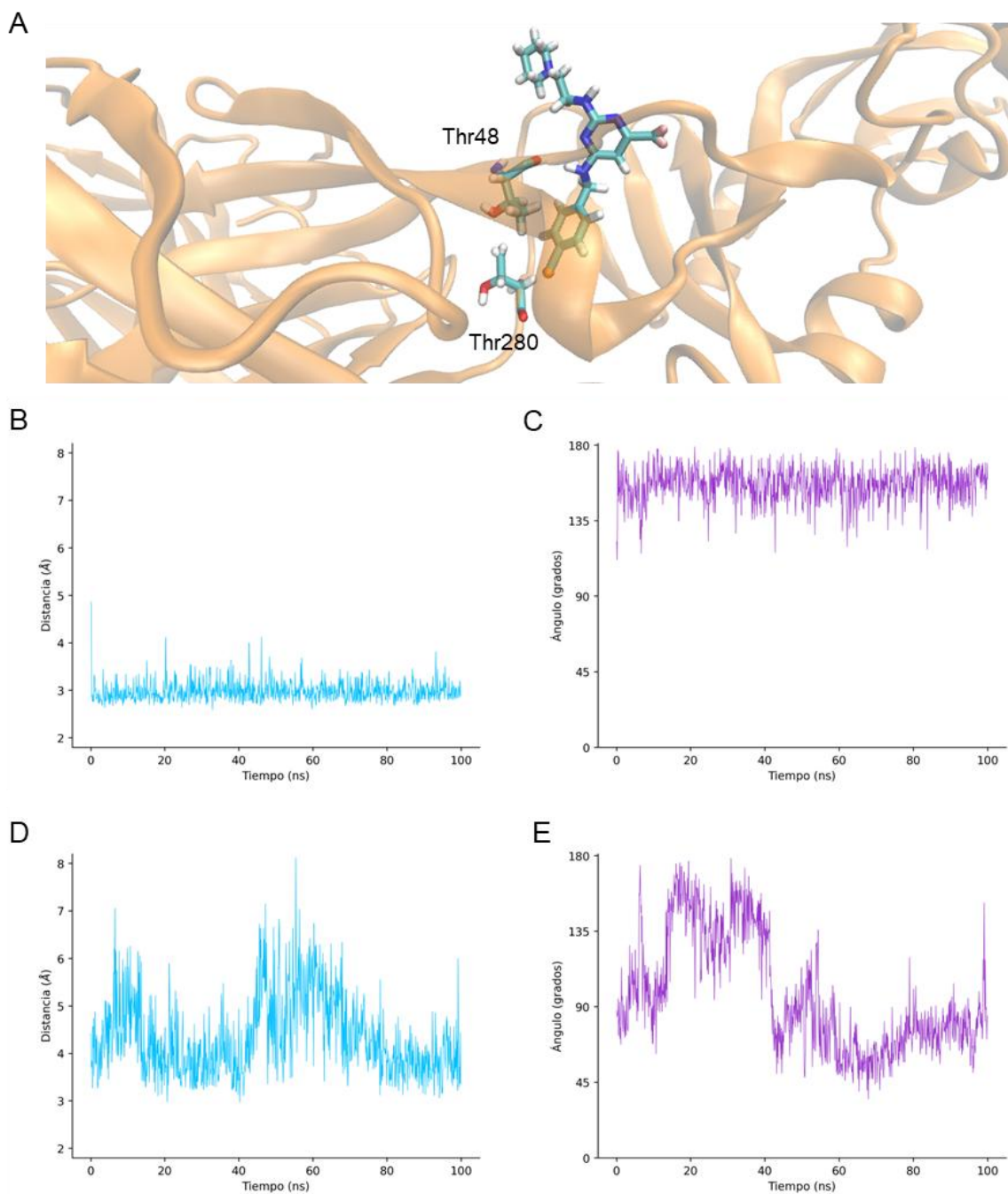


Figura 4.5. Análisis de la simulación de dinámica molecular del ligando **19** en el sitio blanco de la proteína de envoltura de DENV-2 (PDB ID: 1OKE). **(A)** Visualización de las interacciones encontradas entre el ligando **19** y los residuos que conforman el bolsillo hidrofóbico. La imagen corresponde a la estructura del sistema tras 20 ns de simulación. **(B)** Distancia y **(C)** ángulo de enlace entre el átomo de nitrógeno en la posición 4 de la pirimidina de **19** y el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de Thr48. **(D)** Distancia y **(E)** ángulo de enlace formado entre el átomo de cloro de **19** y el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de Thr280.

El análisis de la dinámica molecular sugiere la existencia de una interacción favorable entre el átomo de cloro de **19** y el oxígeno del grupo carbonilo de Thr280, formada a partir de los 15 ns de simulación ([Figura 4.5 A](#)). Este tipo de interacciones posee en promedio una distancia interatómica poco mayor a 3 Å y un ángulo cercano a los 158° [[162](#)]. Se observó que esta interacción se produce en determinados momentos entre los 15 ns y los 40 ns; luego de ese tiempo, los átomos se distancian y la interacción no vuelve a establecerse ([Figura 4.5 D-E](#)). Una inspección visual del sistema simulado permite observar que la molécula cambia ligeramente su ubicación dentro del bolsillo para acercar el átomo de cloro al residuo Thr280 y generar esta interacción. Este cambio conformacional no parece ser lo suficientemente estable, pese a la formación de este nuevo enlace, motivo por el cual el ligando vuelve a su ubicación anterior, lo que conlleva la pérdida de esta interacción. El incremento en el valor de RMSD a los 40 ns de simulación puede estar relacionado con este movimiento del ligando dentro del bolsillo ([Figura 4.4](#)).

Se calculó la energía de unión ligando-proteína del sistema mediante el método MM/GBSA. En este caso el valor de energía de unión resulta ser de $\Delta G = (-30.9 \pm 5.6)$ kcal/mol para el ligando **19**, similar en comparación con el valor de ΔG de (-32.7 ± 6.3) kcal/mol obtenido para el ligando **3**. La deconvolución de la energía de unión por residuo muestra que doce aminoácidos, que conforman el bolsillo hidrofóbico, son los que aportan al menos 0.5 kcal/mol a la energía total ([Figura 4.6](#)). Estos residuos son Thr48, Glu49, Ala50, Pro53, Lys128, Val130, Leu135, Leu198, Leu207, Ile270, Leu277 y Thr280. La mayoría de ellos son los mismos aminoácidos, de naturaleza hidrofóbica, destacados como los de mayor aporte energético en la deconvolución del cálculo del ligando **3**. Interesantemente, Phe279 no se encuentra dentro de este grupo de residuos, ya que aporta una energía favorable de sólo 0.25 kcal/mol en este caso. En la simulación del ligando **3** se encontró que el anillo aromático de Phe279 puede establecer una interacción hidrofóbica de tipo π - π con el anillo aromático terminal del grupo bifenilo, lo cual generaba un aporte a la energía total de unión de 0.61 kcal/mol, más del doble de lo que aporta en la simulación del ligando **19**. En cambio, Thr280 aparece en este caso como uno de los residuos que más aporta a la energía de unión, a diferencia de lo encontrado para el ligando **3**. Esto destaca el rol de este aminoácido en la estabilización del complejo, por medio de una posible interacción con el átomo de cloro del ligando.

Finalmente, se realizó una deconvolución de la energía de unión en función de las contribuciones de los distintos tipos de interacciones intermoleculares. El método MM/GBSA efectúa el cálculo de energía de unión ligando-proteína a partir de la diferencia entre los ΔG del complejo y de las moléculas por separado, los cuales a su vez se obtienen a partir de la evaluación de los componentes que contribuyen a la energía total. Estos componentes incluyen a la energía de mecánica molecular intrínseca de la molécula, también llamada energía de fase gaseosa; y la energía de solvatación, dependiente del medio de simulación. El término de energía de solvatación es el que emplea el modelo generalizado de Born (GB) para su cálculo [[163](#)]. A su vez, la energía de fase gaseosa, independiente del solvente, puede expresarse como la suma de una componente electrostática y una componente producto de interacciones de Van der Waals [[164](#)].

La [Figura 4.7](#) muestra comparativamente la deconvolución del cálculo de energía libre del ligando **19** y del ligando **3** en función de estas componentes energéticas. Se puede observar que las contribuciones debido a los diferentes efectos son similares para ambos ligandos. Se destaca una leve diferencia de poco más de 5 kcal/mol en el término energético de interacciones de Van der Waals entre los ligandos, en favor de **3**. En cambio, la contribución de las interacciones electrostáticas resultó ser prácticamente la misma para ambos compuestos, así como los aportes debido a efectos de solvatación. Estos resultados, en conjunto, indican que la estrategia de reemplazar el motivo bifenilamina por un resto 4-clorobencilamina derivó en una molécula con un modo de unión muy similar, lo que está en línea con los resultados de actividad antiviral obtenidos *in vitro*.

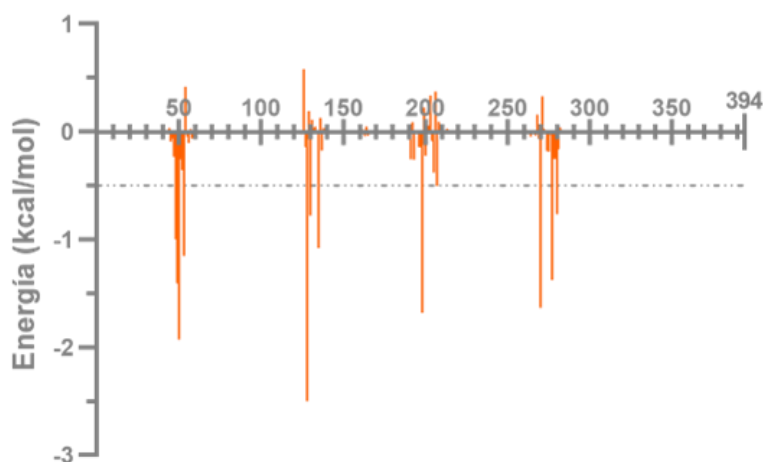


Figura 4.6. Deconvolución de la energía de unión ligando-proteína por residuo.

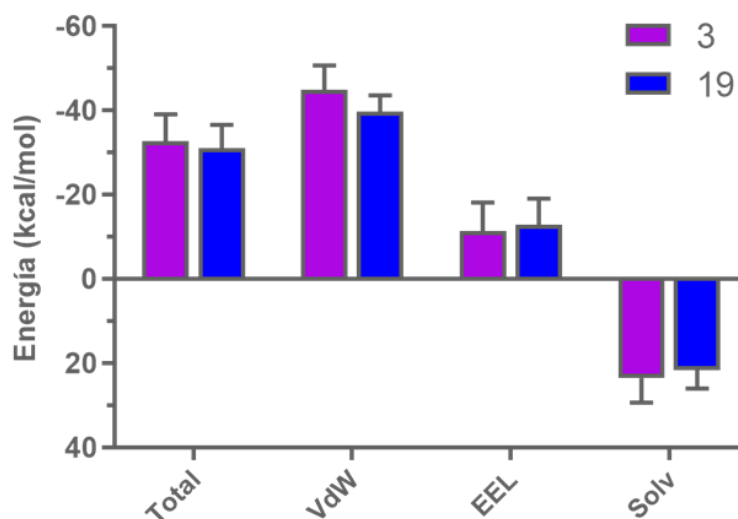


Figura 4.7. Deconvolución de la energía de unión ligando-proteína en función de las contribuciones energéticas. Se muestra la energía total y las componentes debido a interacciones de Van der Waals (VdW), electrostáticas (EEL), y la energía de solvatación (Solv).

Adicionalmente, se investigó la estabilidad del compuesto **19** en el sitio de unión cuando el sistema se encuentra a pH ácido. En línea con la hipótesis de trabajo propuesta, el compuesto actuaría como inhibidor de entrada durante el ingreso del virus a la célula por endocitosis. En particular, el ligando debe mantenerse en el bolsillo hidrofóbico para bloquear los cambios conformacionales que ocurren en la proteína E, gatillados por la disminución del pH en el compartimiento endosomal, que derivan en la liberación del genoma viral al espacio citoplasmático. Por este motivo, se realizó una nueva simulación de dinámica molecular de 100 ns de duración ajustando el pH del sistema a un valor de 5.5. El cambio de pH del medio influye en el estado de protonación de los distintos residuos de la proteína, pudiendo alterar el modo de interacción del ligando con los grupos funcionales de los residuos [165].

Se observa que el ligando se mantiene dentro del sitio de unión a lo largo de toda la simulación. Esto se refleja en el valor de RMSD calculado para el ligando, que se mantiene constante a partir de los 10 ns de simulación, presentando un valor promedio de 2.48 Å (Figura 4.8 A). Este valor es apenas mayor que el encontrado en la simulación a pH neutro; sin embargo, se halla dentro del rango esperado para simulaciones de complejos ligando-proteína, dando cuenta de que la molécula permanece estable dentro del bolsillo hidrofóbico a este pH [144]. De igual forma, el cálculo de energía libre de unión a partir del método MM/GBSA para la simulación del sistema a pH ácido arrojó un valor de $\Delta G = (-30.8 \pm 6.7)$ kcal/mol, idéntico al valor encontrado en la simulación del sistema a pH neutro.

El análisis de las posibles interacciones que el ligando posee en el sitio de unión en la simulación a pH ácido muestra que, en este caso, no se establecen las interacciones con Thr48 ni con Thr280. En cambio, se encuentra una nueva interacción de tipo puente de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno que se encuentra en posición 2 del anillo de pirimidina de **19** y el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de Ala50 (Figura 4.8 B). Esta interacción se presenta de forma intermitente durante el inicio de la simulación, consolidándose definitivamente a partir de los 40 ns (Figura 4.8 C-D). Este nuevo enlace, junto con las interacciones hidrofóbicas con los residuos no polares del sitio de unión, podría ser la fuerza impulsora que mantiene al ligando dentro del bolsillo a pH ácido.

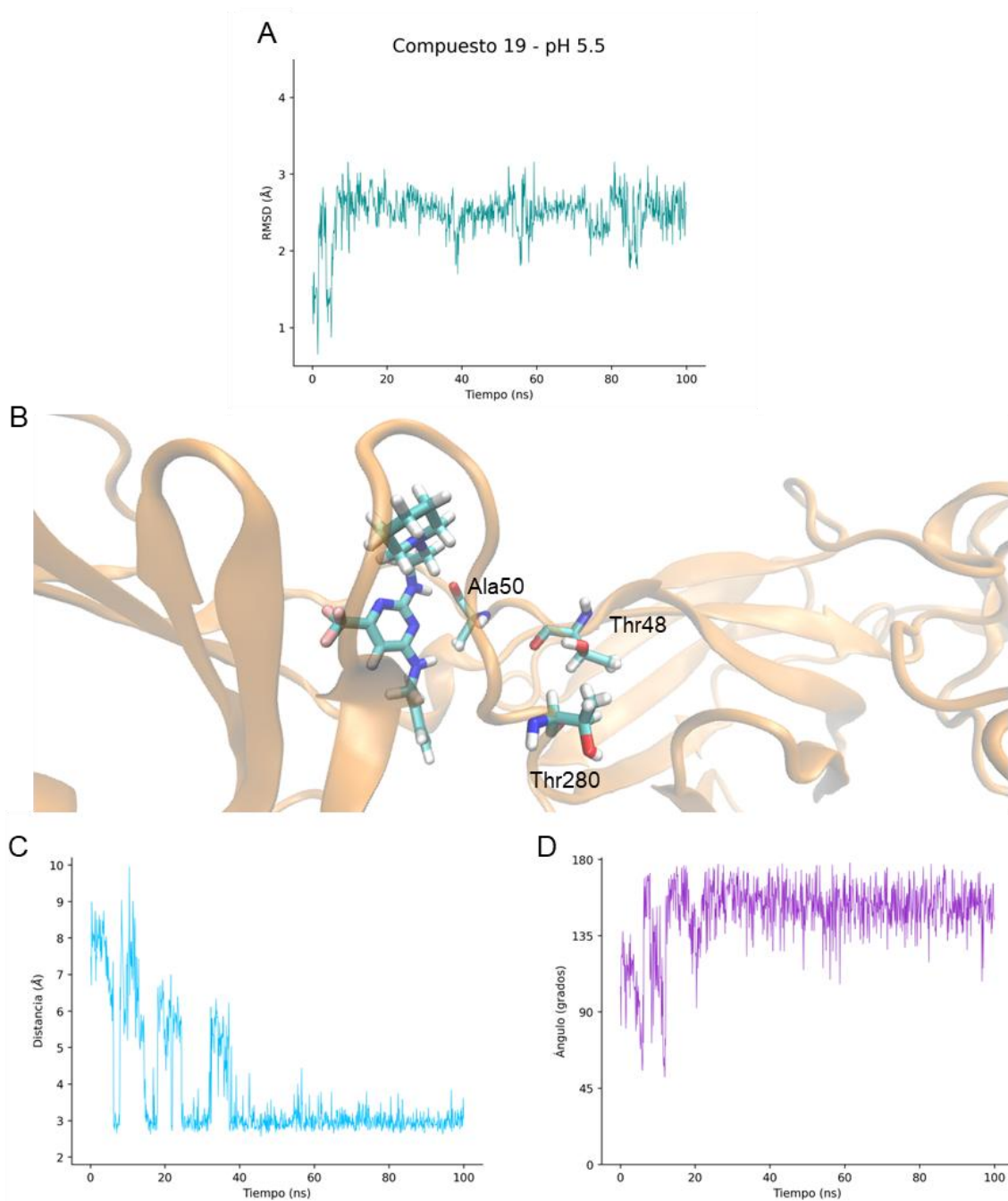


Figura 4.8. Análisis de la simulación de dinámica molecular a pH 5.5 del ligando **19** en el sitio blanco de la proteína de envoltura de DENV-2 (PDB ID: 1OKE). **(A)** Gráfico de RMSD del ligando **19** en función del tiempo. **(B)** Visualización de la interacción encontrada entre el ligando **19** y el residuo Ala50 en el bolsillo hidrofóbico de la proteína de envoltura. La imagen corresponde a la estructura del sistema tras 70 ns de simulación. **(C)** Distancia y **(D)** ángulo de enlace entre el átomo de nitrógeno en la posición 2 de la pirimidina de **19** y el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de Ala50.

4.3. SEGUNDA RONDA DE OPTIMIZACIÓN: EXPLORACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL GRUPO BENCILAMINA

Considerando los resultados obtenidos hasta el momento, se propuso la síntesis de una nueva ronda de análogos, derivados del compuesto **19**. Dado que, en todos los casos estudiados hasta el momento, las moléculas con el grupo 1-(2-aminoetil)piperidina empleado como amina sustituyente en la posición 2 del núcleo de pirimidina presentaron mejores propiedades que aquellas que contenían el resto 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina, se decidió omitir la síntesis de derivados con esta última amina, focalizando los esfuerzos en la preparación de moléculas estructuralmente más prometedoras.

De esta manera, se sintetizaron once compuestos novedosos, con el objetivo de explorar la funcionalidad del grupo bencilamina presente en el compuesto **19** ([Figura 4.9](#)). En primer lugar, se prepararon los derivados **23-28**, que incluyen bencilaminas con distintos sustituyentes en el anillo aromático. El análogo **29** incorpora en su estructura un resto 3-(aminometil)piridina en lugar de la 4-clorobencilamina. Los compuestos **30** y **31** son dos análogos de **19** diseñados específicamente para estudiar el rol del grupo amino en la posición 4 del anillo de pirimidina, y su implicancia en la posible formación de un enlace de puente de hidrógeno, tal como fue observado en las simulaciones computacionales. En el análogo **30** se introdujo una metilación en el átomo de nitrógeno, bloqueando directamente la posibilidad de establecer interacciones de puente de hidrógeno; mientras que el derivado **31** posee un carbonilo en su estructura en lugar de un metileno, reemplazando la funcionalidad amina por amida.

Por último, se sintetizaron dos análogos adicionales del compuesto **3** como parte de la estrategia destinada a disminuir la citotoxicidad asociada al motivo bifénilo, manteniendo la funcionalidad anilina. El compuesto **32** fue diseñado con un anillo alifático terminal de ciclohexano en lugar de un anillo aromático de benceno, con el objetivo de reducir las interacciones de apilamiento por medio de la disrupción de la planaridad de este fragmento de la molécula. Por otra parte, teniendo en cuenta que la elevada toxicidad podría estar relacionada con una baja solubilidad acuosa debido al gran carácter lipofílico del compuesto **3**, se diseñó el derivado **33**. Este compuesto cuenta con el agregado de una amina primaria terminal, ya que la incorporación de un pequeño grupo hidrofílico podría modular la lipofilidad de la molécula.

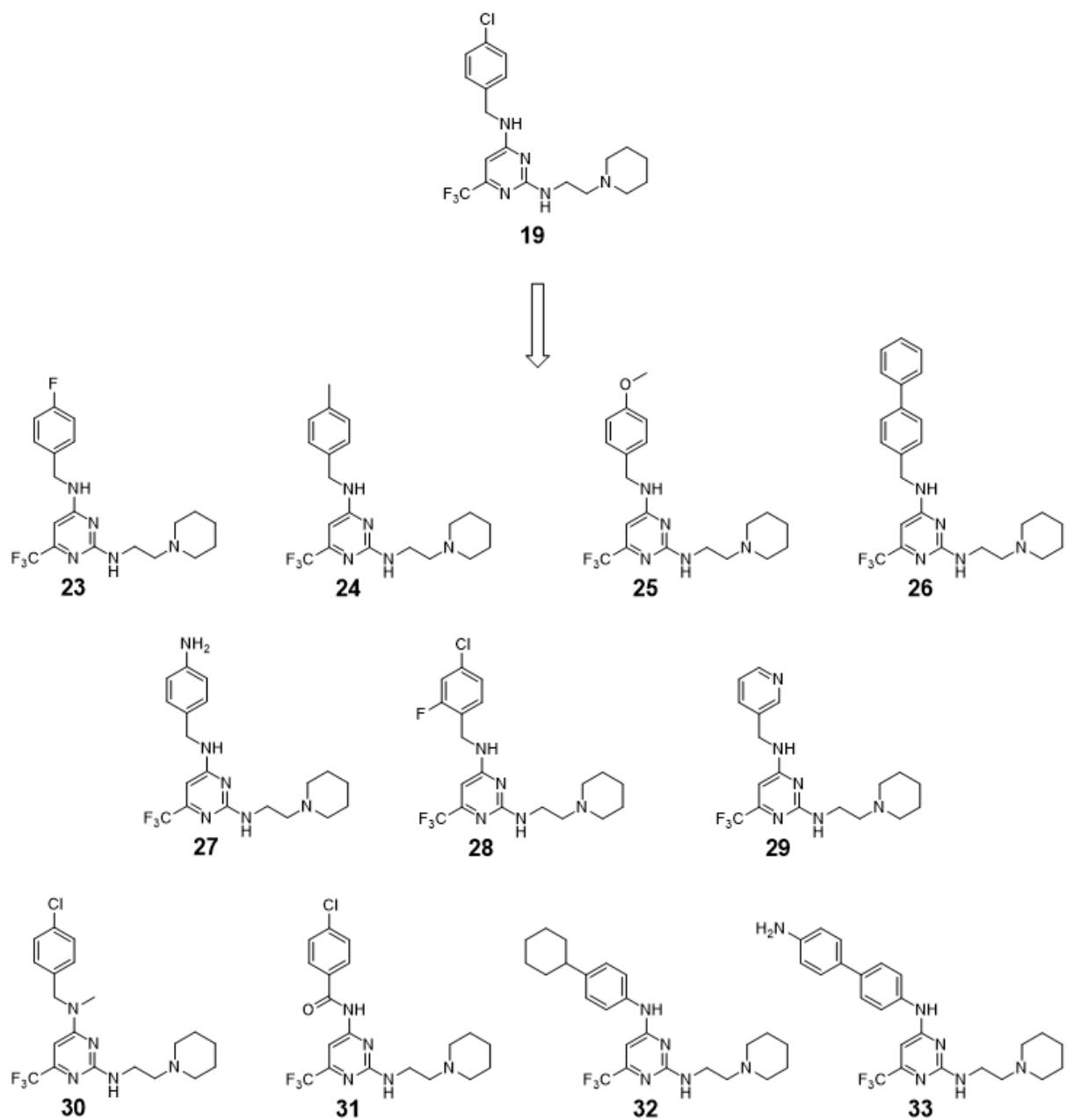
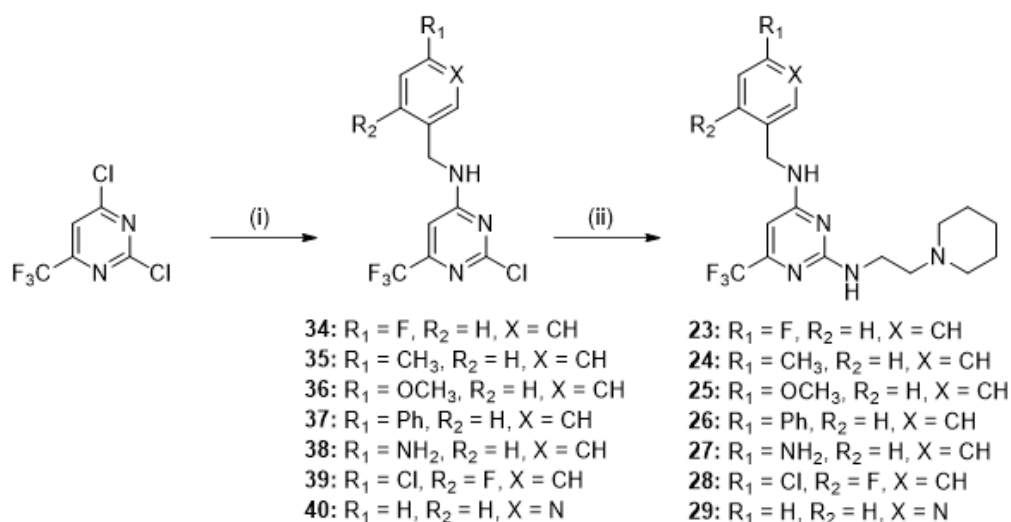


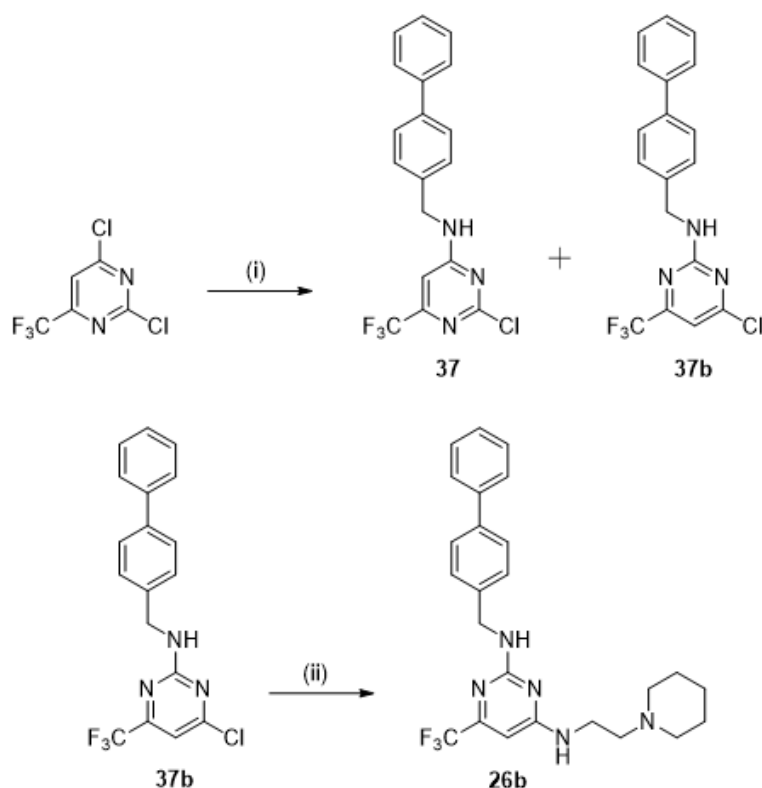
Figura 4.9. Serie de once análogos derivados de **19** sintetizados y evaluados.

Los derivados **23-29** se prepararon empleando una secuencia sintética similar a la utilizada para el compuesto **19** ([Esquema 4.3](#)). Para ello, se hizo reaccionar al reactivo comercial 2,4-dicloro-6-(trifluorometil)piperidina con la bencilamina correspondiente en etanol, empleando TEA o DIPEA como base. Algunas de estas reacciones procedieron a temperatura ambiente, mientras que para otras fue necesario calentar a reflujo. De este modo, se obtuvieron los intermediarios **34-40**. En el caso particular del compuesto **38**, la reacción a temperatura ambiente condujo mayoritariamente al producto esperado; no obstante, se obtuvo en menor proporción un subproducto derivado de la reacción de la pirimidina con el nitrógeno del grupo amino aromático del reactivo. Este resultado es consistente con la menor nucleofilicidad del grupo amino aromático en comparación con el alifático [159]. Este subproducto fue separado durante el paso de purificación. Finalmente, los intermediarios **34-40** fueron sometidos a una segunda reacción de sustitución nucleofílica aromática con el reactivo 1-(2-aminoetil)piperidina en *n*-butanol, usando TEA o DIPEA como base bajo condiciones de alta presión y temperatura [127].

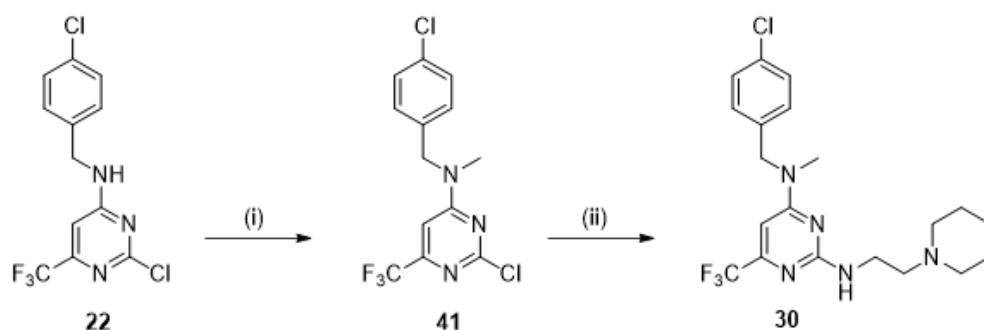


Esquema 4.3. Síntesis de los compuestos **23-29**. Reactivos y condiciones: (i) Bencilaminas, TEA o DIPEA, etanol, temperatura ambiente o reflujo, 1 o 3 h. (ii) 1-(2-aminoetil)piperidina, TEA o DIPEA, *n*-butanol, 165 - 180 °C, 3 o 24 h.

Al llevar a cabo la síntesis de los intermediarios **34-40**, en algunos casos se obtuvo minoritariamente el producto de sustitución del átomo de cloro que se encuentra en la posición 2 del reactivo 2,4-dicloro-6-(trifluorometil)piperidina. Este subproducto fue separado en el paso de purificación previo al segundo paso de reacción. En el caso particular de la reacción con la 4-fenilbencilamina para la formación del intermediario **37**, este subproducto se obtuvo con un rendimiento mayor al 10% (frente al 74% de rendimiento del intermediario **37**). Dado que se logró aislar una masa considerable de este producto secundario **37b**, se decidió someterlo a la reacción de sustitución con 1-(2-aminoetil)piperidina y de esta forma obtener el producto final **26b**, isómero de posición del derivado **26** ([Esquema 4.4](#)).



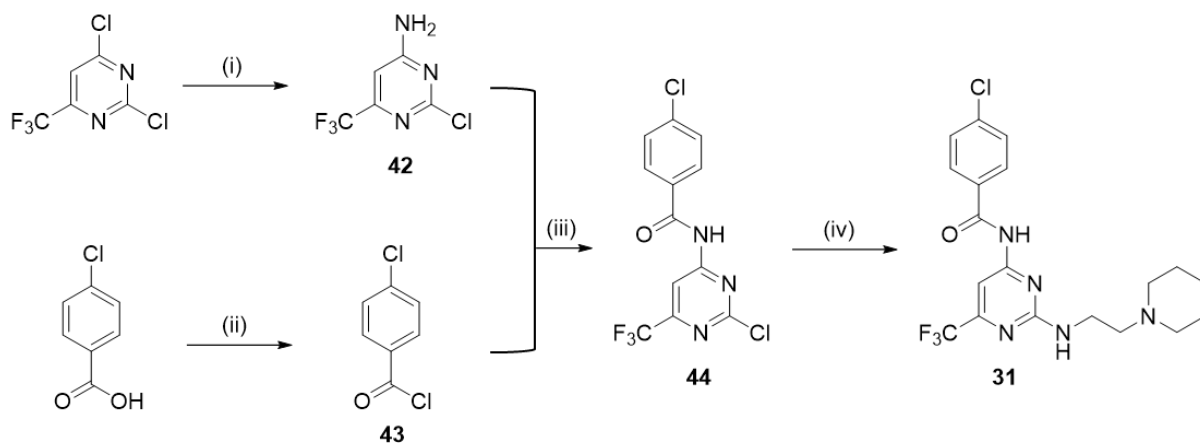
Esquema 4.4. Síntesis del compuesto **26b**. Reactivos y condiciones: (i) 4-fenilbencilamina, TEA, etanol, temperatura ambiente, 1.5 h. (ii) 1-(2-aminoetil)piperidina, TEA, *n*-butanol, 165 °C, 24 h.



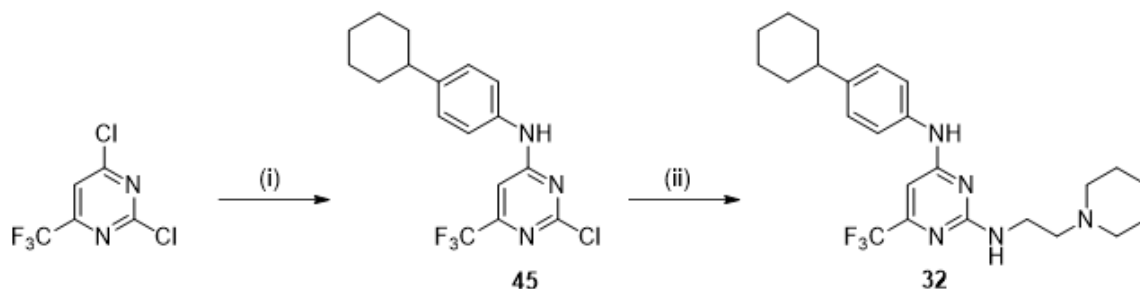
Esquema 4.5. Síntesis del compuesto **30**. Reactivos y condiciones: (i) CH₃I, Cs₂CO₃, DMF, temperatura ambiente, 72 h. (ii) 1-(2-aminoetil)piperidina, DIPEA, *n*-butanol, 170 °C, 3 h.

Para la obtención del derivado **30**, se sintetizó en primer lugar el intermediario **22** (ver [Esquema 4.2](#)). El mismo fue sometido a una reacción de metilación selectiva sobre el átomo de nitrógeno, usando yoduro de metilo y carbonato de cesio en dimetilformamida (DMF) [166]. Por último, se llevó a cabo la reacción de sustitución nucleofílica aromática sobre el intermediario **41** con 1-(2-aminoetil)piperidina para la obtención del producto final **30** ([Esquema 4.5](#)).

La preparación del compuesto **31** se llevó a cabo siguiendo la ruta de síntesis convergente mostrada en el [Esquema 4.6](#). En primer lugar, se trató al reactivo 2,4-dicloro-6-(trifluorometil)piperidina con una solución de hidróxido de amonio al 30% en agua, lo que dio lugar a la formación de **42**. En paralelo, se trató a una solución de ácido 4-clorobenzóico con cloruro de oxalilo y cantidades catalíticas de DMF en diclorometano para la obtención del cloruro de ácido **43**. El intermediario **44** se obtuvo a partir de la reacción entre **42** y **43**, usando hidruro de sodio en DMF anhidra. La reacción de acoplamiento entre una amina primaria y un cloruro de ácido típicamente ocurre de manera espontánea en condiciones suaves, en donde la misma amina en exceso actúa como base [\[167\]](#). Sin embargo, en este caso, fue necesario el uso de una base considerablemente más fuerte, como el hidruro de sodio, debido a la muy baja nucleofilia y basicidad de la aminopiperidina **42** [\[168\]](#). Pese a esto, el rendimiento de la conversión fue bajo. De todas formas, se obtuvo cantidad suficiente de **44** como para llevar a cabo la reacción de sustitución nucleofílica aromática con 1-(2-aminoetil)piperidina para formar el producto final **31**.

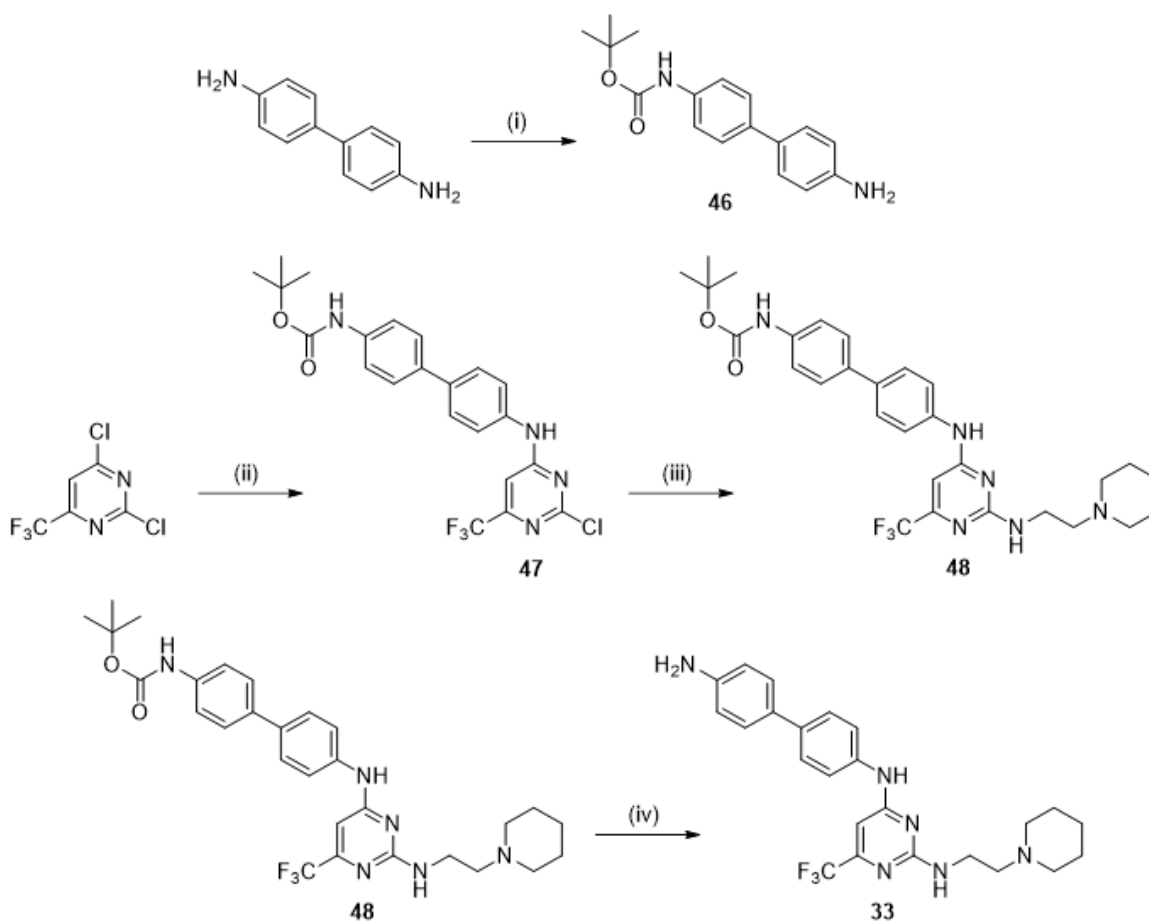


Esquema 4.6. Síntesis del compuesto **31**. Reactivos y condiciones: (i) NH_4OH 30% en agua, 80 °C, 3 h. (ii) $(\text{COCl})_2$, DMF, CH_2Cl_2 , 0 °C a temperatura ambiente, 2 h. (iii) NaH, DMF seca, temperatura ambiente, 1 h. (iv) 1-(2-aminoetil)piperidina, TEA, *n*-butanol, 150 °C, 24 h.



Esquema 4.7. Síntesis del compuesto **32**. Reactivos y condiciones: (i) 4-(ciclohexil)anilina, TEA, *n*-butanol, 90 °C, 24 h. (ii) 1-(2-aminoetil)piperidina, TEA, *n*-butanol, 120 °C, 24 h.

El derivado **32** se sintetizó de forma similar a otros análogos, a partir de dos sustituciones nucleofílicas aromáticas ([Esquema 4.7](#)). En el caso del derivado **33**, fue necesario proteger en primer lugar uno de los dos grupos amino del reactivo comercial bencidina ([Esquema 4.8](#)). Para esto se usó dicarbonato de di-*terc*-butilo (Boc_2O) y carbonato de sodio en dioxano. Se tuvo especial cuidado de utilizar un sólo equivalente de Boc_2O , con el fin de limitar la protección a un solo grupo amino, para obtener principalmente el intermediario **46** [169]. Pese a esto, se obtuvo parcialmente el producto de la doble protección, aunque en baja proporción. Este subproducto fue mayoritariamente separado en la instancia de purificación; sin embargo, en el espectro de ^1H -RMN del intermediario **46** se identificaron algunas señales correspondientes al subproducto. Posteriormente, se llevaron a cabo las dos reacciones de sustitución nucleofílica aromática consecutivas sobre el reactivo 2,4-dicloro-6-(trifluorometil)piperidina, usando en primer lugar a la bencidina monoprotegida **46**, y luego al reactivo 1-(2-aminoetil)piperidina, lo que dio lugar a la obtención del compuesto **48**. La subsecuente desprotección con ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano seco permitió la obtención del producto final **33** [169].



Esquema 4.8. Síntesis del compuesto **33**. Reactivos y condiciones: (i) Boc_2O , Na_2CO_3 , dioxano, temperatura ambiente, 24 h. (ii) **46**, TEA, *n*-butanol, 90°C , 24 h. (iii) 1-(2-aminoetil)piperidina, TEA, *n*-butanol, 120°C , 24 h. (iv) TFA, CH_2Cl_2 seco, temperatura ambiente, 2 h.

Estos doce nuevos productos finales fueron caracterizados por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, y por espectroscopía de masas de alta resolución. La pureza de estos compuestos fue determinada por HPLC-UV. Todos los productos finales presentaron un grado de pureza mayor al 90%. Por otro lado, se identificó la estructura de los intermediarios de síntesis a partir de la obtención de sus espectros de ^1H -RMN, los cuales permitieron corroborar la identidad de las moléculas para poder seguir adelante con las rutas sintéticas; a excepción de los intermediarios **42** y **43**, que fueron usados en el siguiente paso de reacción habiéndose detectado únicamente por cromatografía en capa delgada. Las figuras de todos los espectros obtenidos se encuentran adjuntas en el [Anexo III](#). En el caso de los intermediarios **37** y **37b**, se adquirieron adicionalmente sus espectros de HMBC (por sus siglas en inglés, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) los cuales permitieron determinar la conectividad de los átomos y diferenciar inequívocamente al par de isómeros.

De igual forma, esta nueva serie de compuestos fue evaluada en términos de citotoxicidad y actividad antiviral frente a dengue y Zika. En esta ocasión, tuve la oportunidad de asistir al Laboratorio de Estrategias Antivirales, a cargo de la Dra. Cybele García, y participar activamente en la realización de estos ensayos, para lo cual fui entrenado en metodologías de trabajo en cultivo celular. En primer lugar, se determinó la toxicidad de estos compuestos en cultivos de células Vero, mediante el ensayo colorimétrico del MTT. Sólo aquellos derivados de toxicidad menor o similar al compuesto de referencia **19** fueron posteriormente evaluados en ensayos de actividad antiviral; no se determinó, en cambio, la actividad de los derivados más tóxicos que **19**. La actividad antiviral frente a dengue y Zika se evaluó a partir de ensayos de inhibición del rendimiento viral. Este ensayo se llevó a cabo usando diluciones seriadas de los compuestos, comenzando en la mayoría de los casos por 20 μM . Se adoptó este criterio tomando en consideración las CC_{50} de los derivados y la elevada potencia del compuesto de referencia **19**, ya que un derivado con una CE_{50} superior a 20 μM no representa una mejora frente a dicho compuesto. El compuesto **29** fue evaluado a partir de 50 μM debido a la ausencia de toxicidad a esas concentraciones, mientras que el derivado **33** fue ensayado a partir de 10 μM a causa de la toxicidad celular observada a 20 μM .

Los resultados de estos experimentos se presentan en la [Tabla 4.2](#). El análisis comparativo de las bencilaminas con distintos sustituyentes revela que los análogos **23**, **24**, **25**, **27** y **29** poseen menor toxicidad en relación con el derivado de referencia **19**; sin embargo, en todos los casos, la actividad antiviral disminuye parcial o totalmente. Los derivados **28** y **26**, así como su isómero estructural **26b**, poseen una toxicidad similar entre sí, mayor a la del compuesto **19**. Cabe destacar que las moléculas **26** y **26b** poseen un grupo bifenilo en su estructura.

Por otra parte, la evaluación de los derivados **30** y **31** permite explorar la funcionalidad del grupo amino en posición 4 del anillo de pirimidina del compuesto **19**. La modificación del grupo metileno por el grupo carbonilo que presenta **31** derivó en un análogo de igual toxicidad, pero con pérdida total de actividad antiviral, lo que da cuenta de que la funcionalidad amina es relevante para que la molécula ejerza el efecto antiviral deseado. El aumento de toxicidad del derivado **30** respecto al compuesto **19** indica que la metilación del átomo de nitrógeno en este caso resulta desfavorable en la optimización de las propiedades.

Los derivados **32** y **33** recuperan la funcionalidad anilina, pero plantean otras alternativas para intentar sobrellevar los problemas de toxicidad del compuesto **3**. El derivado **32** resultó ser ligeramente menos tóxico que **3**, pero no alcanzó el valor de CC₅₀ del compuesto **19**, por lo cual no se continuó con la evaluación de su actividad biológica. La molécula **33**, que posee el agregado de un grupo polar en el extremo terminal del grupo bifenilo, presentó una mejora en términos de citotoxicidad respecto al compuesto **3**. Sin embargo, el compuesto perdió toda actividad antiviral, lo que sugiere que la hidrofobicidad en esta región de la molécula es clave para que el compuesto pueda ingresar al bolsillo hidrofóbico y ejercer su acción antiviral.

Tabla 4.2. Actividad frente a DENV-2 y ZIKV, citotoxicidad e índice de selectividad de los compuestos **23** a **33**. Se agrega la data de los compuestos **3** y **19** determinada anteriormente a fines comparativos.

Compuesto	CC ₅₀ (μM) ^a	CE ₅₀ DENV-2 (μM) ^b	IS DENV-2 ^c	CE ₅₀ ZIKV (μM) ^b	IS ZIKV ^c
23	47.62 ± 0.54	16.07 ± 1.90	2.96	16.75 ± 2.48	2.84
24	48.95 ± 6.63	> 20	< 2.5	13.48 ± 0.82	3.63
25	38.21 ± 1.60	> 20	< 2	12.46 ± 1.33	3.07
26	8.92 ± 1.28	ND	ND	ND	ND
26b	9.47 ± 0.93	ND	ND	ND	ND
27	36.90 ± 2.99	> 20	< 2	> 20	< 2
28	9.07 ± 0.69	ND	ND	ND	ND
29	> 200	> 50	< 4	> 50	< 4
30	8.18 ± 0.90	ND	ND	ND	ND
31	20.80 ± 0.54	> 20	< 1.05	> 20	< 1.05
32	8.39 ± 0.55	ND	ND	ND	ND
33	17.76 ± 0.91	> 10	< 2	> 10	< 2
3	5.74 ± 0.76	0.76 ± 0.06	7.55	1.11 ± 0.11	5.17
19	23.83 ± 1.56	1.16 ± 0.03	20.54	2.61 ± 0.07	9.13

^aCC₅₀: concentración citotóxica 50% en células Vero. Los resultados representan el promedio y desvío estándar de dos experimentos independientes.

^bCE₅₀: concentración efectiva 50%. Los resultados representan el promedio y desvío estándar de dos experimentos independientes.

^cIS: índice de selectividad (IS = CC₅₀/CE₅₀).

^dND: no determinado.

4.4. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL COMPUESTO 19

Se realizaron estudios adicionales sobre el compuesto **19**, el candidato más prometedor, con el objetivo de confirmar su actividad antiviral a partir de ensayos complementarios al de inhibición del rendimiento viral. En particular, se realizaron experimentos de cuantificación relativa de ARN viral mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa (RT-qPCR, por sus siglas en inglés, *Reverse Transcription followed by the quantitative Polymerase Chain Reaction*), y ensayos de inmunofluorescencia indirecta, para confirmar la capacidad inhibitoria del compuesto **19** frente a dengue y Zika. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Estrategias Antivirales del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN), a cargo de la Dra. Cybele García.

En primer lugar, con el fin de determinar la concentración óptima de antiviral a emplear en estos experimentos, se repitió el ensayo de citotoxicidad del compuesto 19 en células Vero para evaluar la viabilidad celular tras 48 h de incubación. La determinación se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad de San Martín (IIB-UNSAM), a cargo del Dr. Diego Álvarez, al cual tuve la posibilidad de asistir para participar de la realización del ensayo. En este caso, la viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico del MTS/PMS. La [Figura 4.10](#) presenta los resultados de esta determinación, mientras que la [Figura 4.11](#) muestra los gráficos dosis-respuesta del ensayo de actividad antiviral realizado previamente para la determinación de la CE₅₀. Se puede observar que el compuesto 19 inhibe prácticamente por completo a ambos virus a una concentración de 10 μ M, manteniendo una viabilidad celular del 100%. En consecuencia, se decidió emplear una concentración fija de 10 μ M de 19 para los ensayos de RT-qPCR e inmunofluorescencia indirecta.

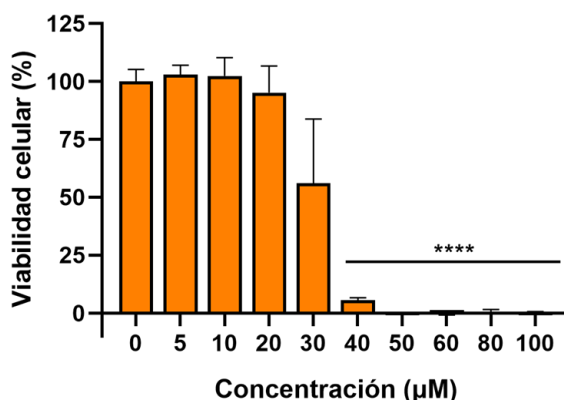


Figura 4.10. Citotoxicidad del compuesto **19**. Monocapas de células Vero se incubaron con concentraciones crecientes del compuesto **19** durante 48 h. Luego de ese tiempo, se evaluó la viabilidad celular mediante el método del MTS/PMS. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se efectuó un análisis ANOVA de un solo factor seguido de la prueba *post-hoc* de Dunnett para asegurar la validez estadística de las diferencias. **** $p < 0.0001$.

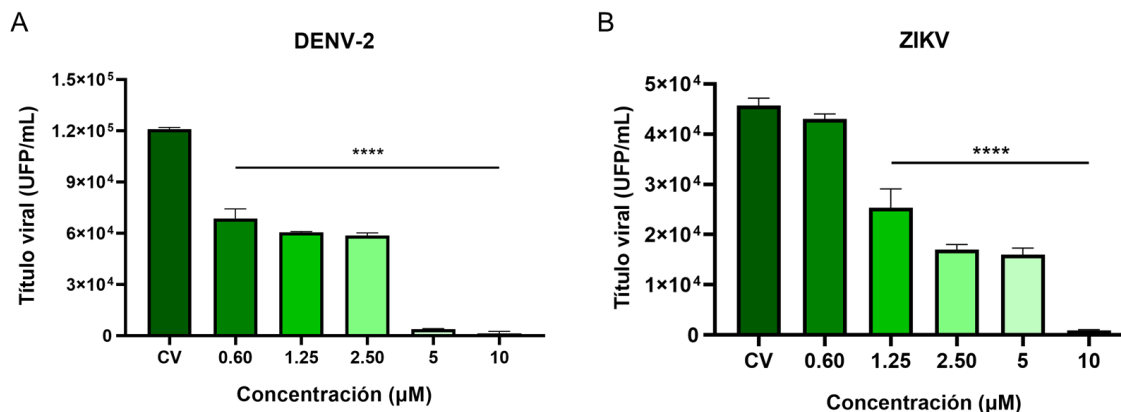


Figura 4.11. Actividad antiviral del compuesto **19** obtenida mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral. Células Vero infectadas con DENV-2 (**A**) y ZIKV (**B**) a una MOI de 0.1 se trataron con concentraciones crecientes del compuesto **19** durante 48 h. Se incluyó un control viral (CV) de células infectadas sin compuesto. Luego de ese tiempo, se realizó la cosecha y titulación de los sobrenadantes. Se calculó el título viral a partir del recuento de unidades formadoras de placas. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se efectuó un análisis ANOVA de un solo factor seguido de la prueba *post-hoc* de Dunnett para asegurar la validez estadística de las diferencias. *****p* < 0.0001.

La técnica de RT-qPCR permite cuantificar el ARN viral en una muestra a partir de su retrotranscripción a ADN y posterior amplificación. La enzima transcriptasa reversa (RT) es la encargada de producir el ADN complementario al ARN de interés. Para ello, se usan oligonucleótidos denominados cebadores o *primers*, diseñados específicamente para unirse por complementariedad a la hebra de ARN que se desea retrotranscribir. Los *primers* funcionan como punto de partida para que la enzima RT pueda iniciar la síntesis de ADN [170].

Una vez obtenido el ADN complementario, se lleva a cabo la etapa de amplificación. El ADN se amplifica mediante una serie de ciclos de polimerización que constan de tres pasos, en donde la temperatura juega un rol clave en cada uno de ellos: la hibridación o *annealing* de nuevos *primers* sobre la hebra de ADN previamente sintetizada; la síntesis de nuevo ADN, a cargo de la enzima ADN polimerasa, produciendo de esta manera ADN de doble cadena; y la desnaturalización del ADN de doble cadena, que separa las hebras permitiendo que comience un nuevo ciclo de polimerización [171]. Este último paso es el que requiere mayor temperatura, por lo cual se necesita una ADN polimerasa termoestable [172]. Para poder detectar y cuantificar el ADN a medida que progresa la reacción, se agrega la sonda fluorescente SYBR Green, un agente intercalante que se une específicamente al ADN de doble cadena. Esta sonda posee muy alta sensibilidad, aunque se puede ver limitada por la formación de productos de amplificación secundarios, ya que se une a cualquier ADN de doble cadena [173].

Inicialmente, cada ciclo de polimerización duplica la cantidad de ADN presente en el sistema, por lo que la concentración de ADN aumenta de forma exponencial [172]. En una primera etapa, conocida como fase *lag*, el aumento en la concentración de ADN tras cada ciclo no es suficiente como para mostrar diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia de la sonda SYBR Green. Sin embargo, tras un determinado número de ciclos de polimerización, la intensidad de fluorescencia comienza a incrementarse significativamente, iniciando así la etapa exponencial de la PCR. Se define como Ct (por sus siglas en inglés *Cycle threshold*) al ciclo en el cual la reacción supera su fase *lag* y pasa a la etapa exponencial, lo cual se evidencia cuando la señal de fluorescencia sobrepasa el umbral de detección [174]. El número de ciclos necesario para que la reacción entre en su fase exponencial dependerá de la cantidad de ADN inicial [170].

Se llevó a cabo la reacción de RT-qPCR con el fin de evaluar la actividad antiviral del compuesto **19**. Se infectaron monocapas de células Vero con DENV-2 y ZIKV, y se comparó la producción de virus en células sin tratamiento antiviral frente a células tratadas con el compuesto **19** a una concentración de 10 μ M. Tras 48 horas de incubación, se extrajo el ARN total de las células infectadas, y se cuantificó el ARN viral por RT-qPCR. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 4.12. Se observa una marcada disminución en la cantidad de genoma viral en los sobrenadantes de células tratadas con el compuesto **19** en comparación con las células que no fueron tratadas (CV), lo que confirma la actividad antiviral del candidato **19**.

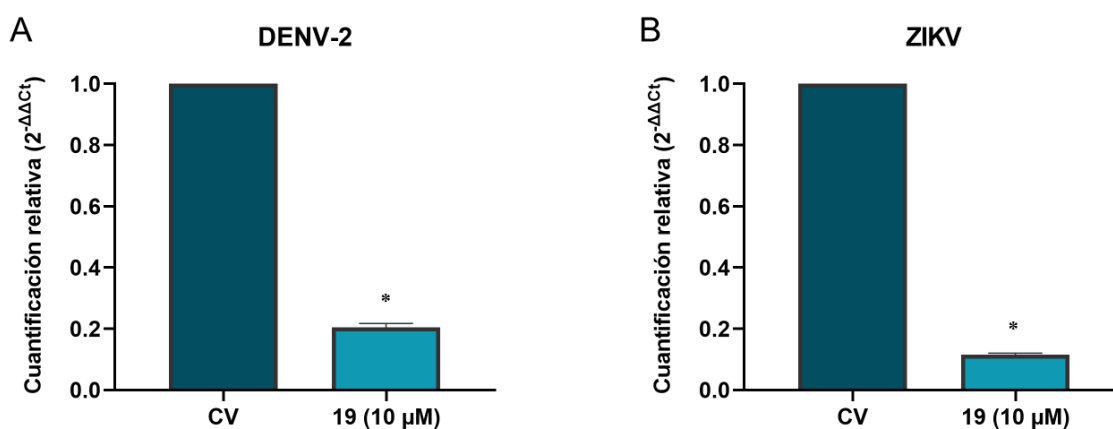


Figura 4.12. Cuantificación relativa de ARN viral obtenido mediante el ensayo de RT-qPCR. Células Vero infectadas con DENV-2 (A) y ZIKV (B) a una MOI de 0.1 se trataron con una dilución 10 μ M del compuesto **19** durante 48 h. Se incluyó un control viral (CV) de células infectadas sin compuesto. Los resultados fueron analizados mediante la prueba *t* de Student para asegurar la validez estadística de las diferencias. El tratamiento estadístico se hizo sobre los valores de ΔC_t antes de aplicar la transformación exponencial para la normalización de los resultados, a fin de conservar la variabilidad real y cumplir con los supuestos del análisis de varianza [175]. **p* < 0.1.

El ensayo de inmunofluorescencia permite la visualización y obtención de imágenes de cultivos celulares infectados con virus, lo que ofrece una alternativa para evaluar la capacidad de inhibición de un candidato a antiviral. Para ello, es necesario marcar con fluoróforos a los componentes virales y celulares [176]. En el ensayo de inmunofluorescencia indirecta, los antígenos virales que se desean detectar son marcados con anticuerpos primarios específicos. Luego de sucesivos lavados para eliminar excedentes, se agrega un anticuerpo secundario conjugado a una sonda fluorescente, el cual se une al anticuerpo primario y habilita la visualización de los componentes virales marcados [177]. En paralelo, los núcleos de todas las células (infectadas y no infectadas) son marcados con la sonda fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), la cual posee la capacidad de formar un complejo fluorescente con las zonas del ADN ricas en adenina y timina [178]. De esta manera, se puede calcular el porcentaje de células infectadas.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta sobre cultivos de células Vero infectados con los virus dengue y Zika, en presencia o ausencia del compuesto **19**. Células crecidas sobre cubreobjetos fueron infectadas con virus y tratadas con el compuesto **19** a una concentración de 10 μ M. Tras 48 horas de incubación, se fijaron las células y se agregó el anticuerpo primario correspondiente. Se utilizó un anticuerpo anti-cápside para dengue, y un anticuerpo anti-envoltura en el caso de Zika. Luego de agregar el anticuerpo secundario, las células se tiñeron con la sonda DAPI y se tomaron las imágenes en un microscopio de epifluorescencia.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 4.13. Se observa una notable disminución en el número de células positivas para la tinción contra el antígeno viral presente en las células tratadas con el compuesto **19**, en contraste con el control de células sin tratamiento antiviral, tanto para dengue (Figura 4.13 A-B) como para Zika (Figura 4.13 C-D). Estos resultados, en su conjunto, ratifican la eficacia del compuesto **19** y lo posicionan como un candidato a fármaco antiviral con alto potencial.

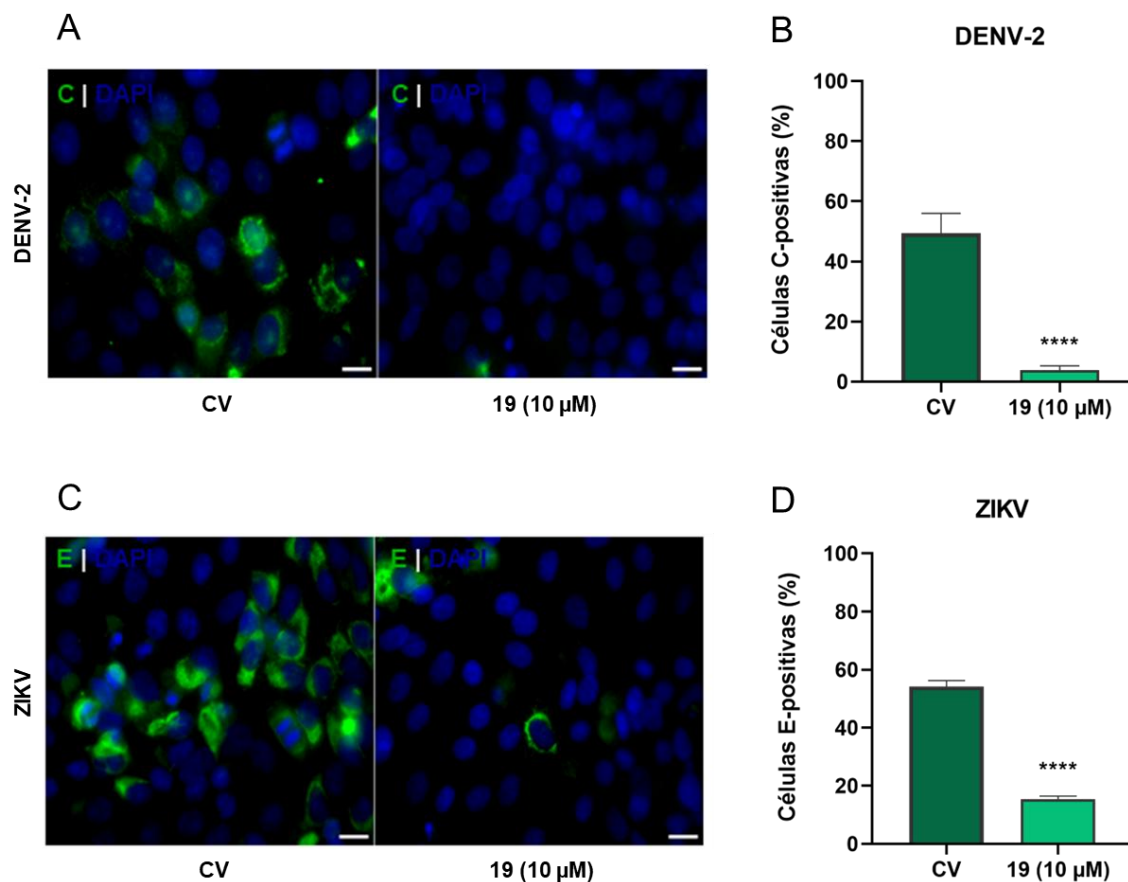


Figura 4.13. Actividad antiviral del compuesto **19** obtenida mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Células Vero infectadas con DENV-2 (**A-B**) y ZIKV (**C-D**) a una MOI de 0.1 se trataron con una dilución 10 μ M del compuesto **19** durante 48 h. Se incluyó un control viral (CV) de células infectadas sin compuesto. Luego de ese tiempo, se fijaron las células con metanol y se marcaron con un anticuerpo anti-C para DENV-2 y anti-E en el caso de ZIKV. Se usó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con AlexaFluor488. Se adquirieron imágenes de campos microscópicos aleatorios para determinar el porcentaje de células infectadas, usando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71. La cuantificación celular se realizó con el software Fiji, contando 30 células por muestra. Barra de escala: 10 μ m. Los resultados fueron analizados mediante la prueba *t* de Student para asegurar la validez estadística de las diferencias. *****p* < 0.0001.

4.5. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN

La identificación del mecanismo de acción de una molécula con actividad antiviral constituye una etapa relevante en el proceso de optimización de un fármaco, ya que proporciona información clave para orientar las estrategias de diseño racional hacia el desarrollo de análogos más potentes y selectivos. Conocer el mecanismo de acción de una droga involucra elucidar la interacción específica por medio de la cual la sustancia produce su efecto farmacológico, lo que se conoce como validación del blanco biológico, así como también determinar la serie de procesos fisiológicos que se ven afectados producto de esta interacción [179]. El compuesto **19**, junto con los otros derivados de la serie, fue diseñado para unirse específicamente al bolsillo hidrofóbico de la proteína de envoltura del virus del dengue, bajo la hipótesis de que esa interacción puede bloquear el evento de fusión que ocurre en el endosoma debido al pH ácido y que resulta en la liberación del genoma viral al citoplasma celular [125]. Los ensayos de actividad *in vitro* realizados no permiten determinar en qué etapa de la infección actúan las moléculas estudiadas, debido a que en el tiempo de incubación ocurren varios ciclos de infección. Es por esto que resulta relevante validar la hipótesis de trabajo y lograr demostrar que el compuesto **19** efectivamente inhibe la entrada del virus bloqueando el proceso de fusión de membranas.

Se llevaron a cabo ensayos biológicos *in vitro* con el objetivo de evidenciar el mecanismo de acción del compuesto **19** frente a DENV-2 y ZIKV, haciendo especial énfasis en su posible rol como inhibidor de entrada. En particular, se realizaron los ensayos de tiempo de adición, actividad virucida, actividad en las etapas de adsorción e internalización, y pretratamientos celulares; siguiendo protocolos estandarizados reportados en literatura [177, 180]. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Estrategias Antivirales del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN), a cargo de la Dra. Cybele García. Para estos experimentos también se utilizó una concentración fija de 10 μ M de **19**, ya que el compuesto inhibe prácticamente por completo a ambos virus y no posee toxicidad celular asociada a esa concentración.

En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo de tiempo de adición para determinar la etapa del ciclo de infección viral en la que actúa el compuesto **19**. El experimento se realizó en monocapas de células crecidas en una placa de 24 pocillos infectadas con virus, y consiste en la adición del antiviral a distintos tiempos post-infección (Figura 4.14 A). Se evaluó el rendimiento viral de cada tratamiento por cosecha y titulación de sobrenadantes tras 24 horas post-infección (hpi). Los resultados revelaron que el compuesto **19** inhibe efectivamente a los virus dengue y Zika cuando es adicionado durante las primeras horas de la infección, mostrando una marcada disminución de la actividad antiviral cuando se adiciona luego de las primeras 8 horas de infección (Figura 4.14 B-C). Esto sugiere que el compuesto **19** actúa sobre las etapas tempranas de la infección.

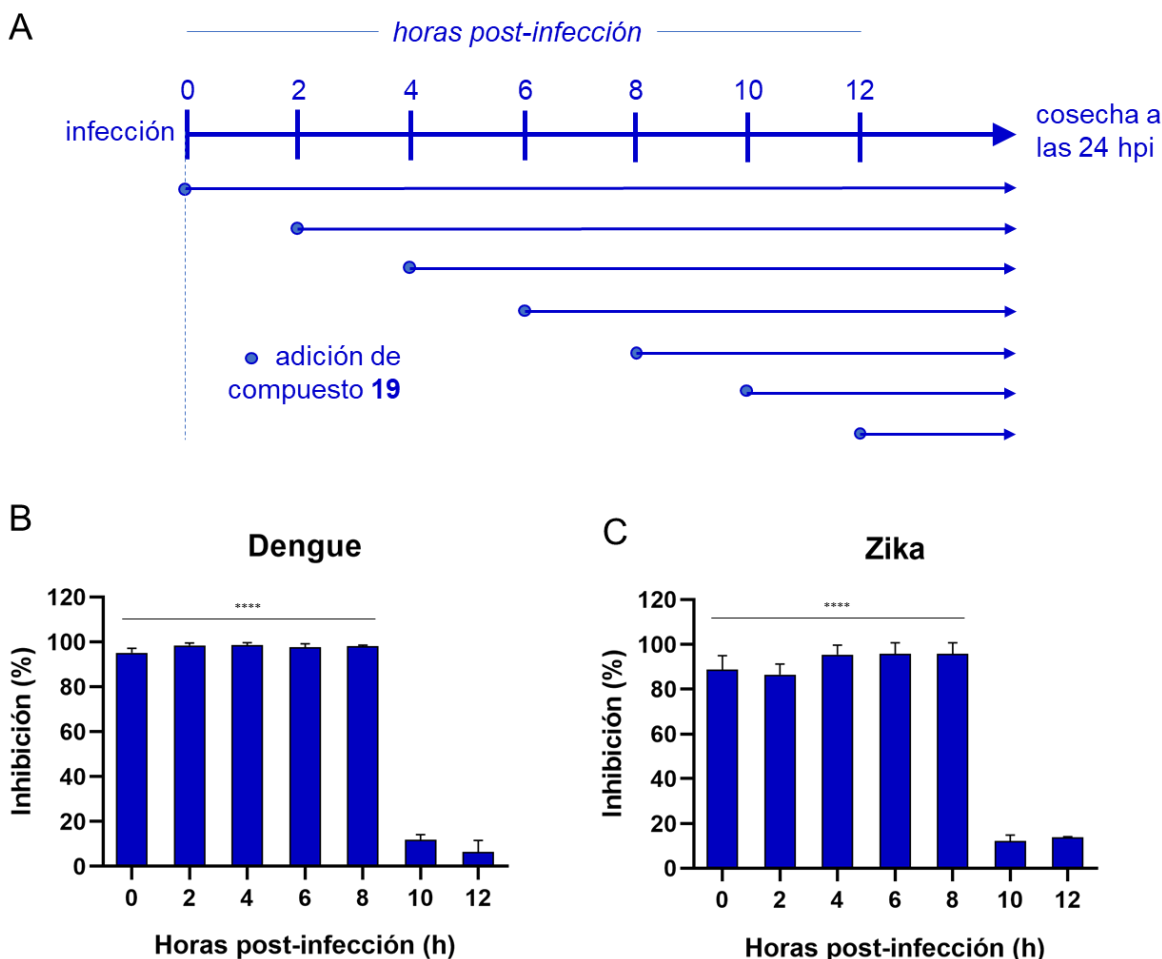


Figura 4.14. (A) Representación esquemática del ensayo de tiempo de adición. Monocapas de células Vero infectadas con DENV-2 **(B)** y ZIKV **(C)** a una MOI de 0.5 se trataron con una dilución 10 μ M del compuesto **19** adicionado a distintos tiempos post-infección. Se incluyeron controles virales de células infectadas sin compuesto. Los sobrenadantes de los tratamientos se cosecharon tras 24 hpi y se calculó el título viral a partir del recuento de unidades formadoras de placas. Los experimentos se realizaron por triplicado, y los resultados representan el promedio y desvío estándar de tres réplicas independientes. Los resultados fueron analizados mediante la prueba *t* de Student para asegurar la validez estadística de las diferencias. *****p* < 0.0001.

De manera complementaria, se llevó a cabo un ensayo de entrada viral que permite discriminar el efecto del compuesto **19** sobre las etapas de adsorción (ADS), internalización (INT) y post-internalización (POST-INT). El experimento consiste en el tratamiento de células infectadas con compuesto **19** únicamente durante el tiempo en el que transcurren los eventos específicos de la entrada del virus a la célula, removiendo al antiviral del medio tras ese tiempo. En la [Figura 4.15 A](#) se muestra un esquema del ensayo realizado. Para estudiar la adsorción, las células se infectaron durante 1 h en presencia del compuesto a 4 °C. Por otro lado, el compuesto se agregó a 1 hpi y se trató durante 1 h para evaluar la internalización, y a 2 hpi con tratamiento durante 3 h para la post-internalización, respectivamente. Se evaluó el rendimiento viral de cada tratamiento por cosecha y titulación de sobrenadantes tras 24 y 48 hpi.

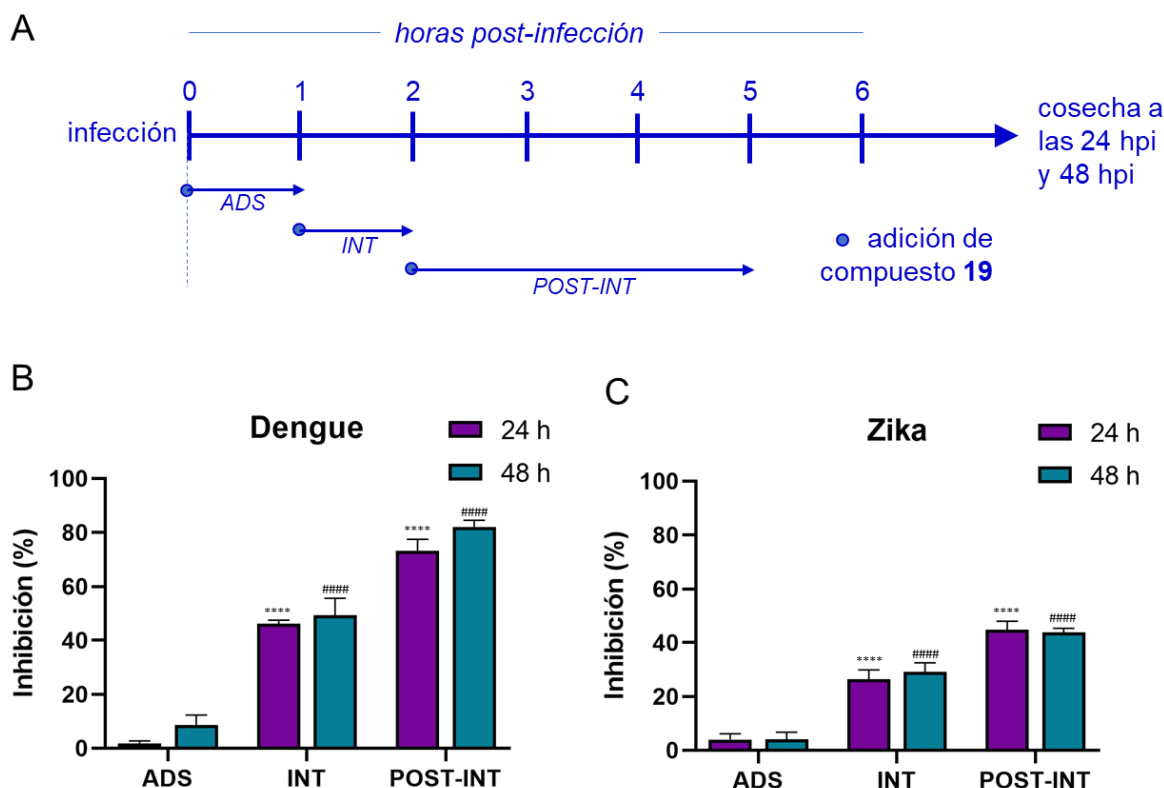


Figura 4.15. (A) Representación esquemática del ensayo de entrada viral. Se infectaron monocapas de células Vero con DENV-2 **(B)** y ZIKV **(C)** a una MOI de 0.1 a 4 °C para sincronizar la infección. Para evaluar la adsorción (ADS), se incubó el compuesto **19** durante 1 h a 4 °C. Por otro lado, el compuesto se agregó a 1 hpi y se incubó durante 1 h a 37 °C para evaluar la internalización (INT), o bien se agregó a 2 hpi y se incubó durante 3 h a 37 °C para monitorear la etapa de post-internalización (POST-INT). Se incluyeron controles virales (CV) de células infectadas sin compuesto. Los sobrenadantes se cosecharon a las 24 y 48 hpi y se calculó el título viral a partir del recuento de unidades formadoras de placas. Los experimentos se realizaron por triplicado, y los resultados representan el promedio y desvío estándar de tres réplicas independientes. Se efectuó un análisis ANOVA de un solo factor seguido de la prueba *post-hoc* de Dunnett para asegurar la validez estadística de las diferencias. ****p < 0.0001 frente al CV recolectado a las 24 h; #####p < 0.0001 frente al CV recolectado a las 48 h.

Los resultados demostraron que la etapa de adsorción no se ve afectada por la presencia del compuesto **19**. Sin embargo, se detectó una inhibición estadísticamente significativa tanto en la internalización como en la post-internalización, para ambos virus estudiados ([Figura 4.15 B-C](#)). Notablemente, en el caso de DENV-2 el porcentaje de inhibición en la internalización fue cercano al 50%, mientras que la etapa de post-internalización se observó una inhibición del 73.2% y 82.5% a las 24 y 48 hpi, respectivamente. Para ZIKV, la inhibición fue del 26.4% y 29.2% en la etapa de internalización, y del 44.9% y 43.7% en post-internalización. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de trabajo propuesta, ya que el compuesto fue diseñado específicamente para interactuar con la proteína de envoltura DENV-2 y bloquear el evento de fusión.

Se llevaron a cabo experimentos de inactivación viral con el objetivo de determinar si el compuesto **19** posee actividad virucida frente a dengue y Zika. Para ello, los *stocks* virales se incubaron con diferentes concentraciones del compuesto a 37 °C durante 1.5 h. Tras este tiempo, se determinó el título de los *stocks* por recuento de placas. Los resultados muestran que el compuesto **19** no posee actividad virucida, sugiriendo que la actividad se manifiesta en el contexto de los eventos que ocurren durante la infección celular, en línea con la hipótesis de trabajo ([Figura 4.16](#)).

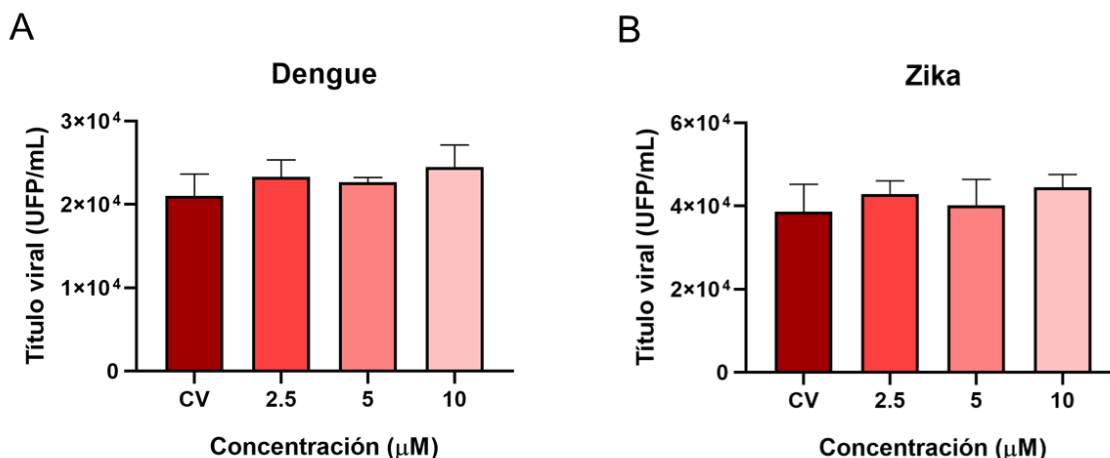


Figura 4.16. Ensayo de actividad virucida del compuesto **19** frente a DENV-2 (A) y ZIKV (B). Se trataron *stocks* virales con diluciones de compuesto **19** durante 1.5 h a 37 °C. Se incluyeron controles virales (CV) de células infectadas sin compuesto. Luego de ese tiempo, se diluyeron los *stocks* y se titularon por recuento de unidades formadoras de placas. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se efectuó un análisis ANOVA de un solo factor seguido de la prueba *post-hoc* de Dunnett para asegurar la validez estadística de las diferencias.

Adicionalmente, se realizaron experimentos de pretratamiento celular para determinar el posible efecto que puede tener el compuesto **19** sobre los cultivos celulares. Para ello, monocapas de células Vero sin infectar fueron tratadas con compuesto **19** a una concentración de 10 μM durante 2 y 4 h. Luego, se lavaron las células con PBS y se infectaron con DENV-2 y ZIKV. Tras 48 h de incubación, se cosecharon los sobrenadantes y se determinaron los títulos virales. Interesantemente, se observó una leve pero significativa diferencia en las células infectadas con DENV-2 tras un pretratamiento de 2 h con el compuesto, mientras que en células infectadas con ZIKV se detectó un efecto antiviral luego del pretratamiento de 4 h ([Figura 4.17](#)). Esto sugiere que el compuesto **19** podría tener un blanco celular alternativo, que le podría conferir a la célula cierto grado de protección frente a la infección. También es posible que el efecto antiviral observado se deba a remanentes de compuesto **19** que no pudieron ser removidos en los lavados.

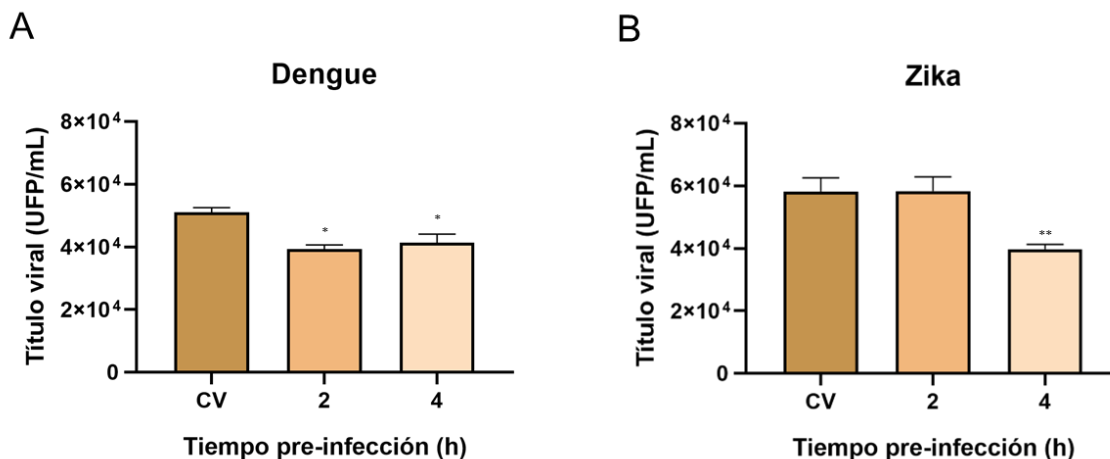


Figura 4.17. Ensayo de pretratamientos de cultivos celulares. Monocapas de células Vero se incubaron con compuesto **19** a una concentración de 10 μ M a 37 °C durante 2 y 4 h. Las células se lavaron con PBS para remover el compuesto y luego se infectaron con DENV-2 (**A**) y ZIKV (**B**) durante 48 h. Se incluyó un control viral (CV) de células sin pretratar. Luego de ese tiempo, se realizó la cosecha y titulación de los sobrenadantes. Se calculó el título viral a partir del recuento de unidades formadoras de placas. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se efectuó un análisis ANOVA de un solo factor seguido de la prueba *post-hoc* de Dunnett para asegurar la validez estadística de las diferencias. ** $p < 0.01$; * $p < 0.1$.

Por último, se trabajó en la puesta a punto de un ensayo biofísico de fusión de membranas como abordaje complementario para la validación del mecanismo de acción. La técnica se basa en el fenómeno de transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET, por sus siglas en inglés *Förster resonance energy transfer*) que ocurre entre dos fluoróforos cuando el espectro de emisión de uno de ellos se superpone con el espectro de excitación del segundo, siempre que ambas sondas se encuentren próximas en el espacio [181]. El ensayo consiste en el monitoreo del evento de fusión entre viriones y liposomas conjugados con sondas fluorescentes. Los liposomas son vesículas lipídicas artificiales, formadas a partir del autoensamblaje de fosfolípidos en medios acuosos cuando el sistema recibe energía mediante técnicas como sonicación, calentamiento u homogeneización [182]. Para el ensayo de fusión de membranas se deben utilizar liposomas de composición lipídica definida, con el propósito de simular las propiedades del compartimiento endosomal [183]. Además, estos liposomas deben poseer en su composición dos sondas fluorescentes, cuya densidad superficial sea tal que la energía absorbida por el fluoróforo donador pueda ser transferida por FRET al fluoróforo aceptor. Dado que la eficiencia de FRET depende directamente de la separación espacial de los fluoróforos, es posible monitorear la dilución lipídica que ocurre durante la fusión de membranas mediante cambios en la intensidad de fluorescencia [184].

Para este experimento, la preparación de los liposomas fluorescentes se llevó a cabo utilizando colesterol, esfingomielina, dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) y dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) en proporción 3:1:1:1. Se emplearon las sondas nitrobenzoxadiazol (NBD) y rodamina B (Rho) conjugadas covalentemente a fosfatidiletanolamina (NBD-PE y Rho-PE, respectivamente) como par donador/aceptor de FRET [185]. La proximidad de estas sondas habilita la transferencia de energía de NBD-PE a Rho-PE por lo cual, cuando el liposoma se encuentra íntegro, la emisión de NBD-PE se encuentra apagada. Sin embargo, durante el proceso de fusión, los lípidos se diluyen en la membrana viral y aumenta la distancia entre fluoróforos, lo que se manifiesta como un incremento en la señal de fluorescencia de NBD-PE, que se utiliza como lectura del ensayo.

Para determinar si el compuesto **19** bloquea específicamente el evento de fusión, se debe incubar conjuntamente virus y liposomas fluorescentes en un medio ácido, en presencia y ausencia de compuesto (Figura 4.18). El pH ácido induce los cambios conformacionales sobre la proteína E que provocan la fusión de la envoltura viral con la membrana lipídica, lo que se evidencia por medio del aumento en la intensidad de fluorescencia de NBD-PE durante el tiempo en el que transcurre la fusión. Si el compuesto **19** posee la capacidad de bloquear la fusión de membranas, los liposomas se deberían mantener íntegros y no se observaría el incremento en la emisión de NBD-PE. Finalmente, el agregado de detergente permite solubilizar completamente a los lípidos, y de esa forma obtener el máximo valor de fluorescencia de NBD-PE libre para la normalización de los resultados [185].

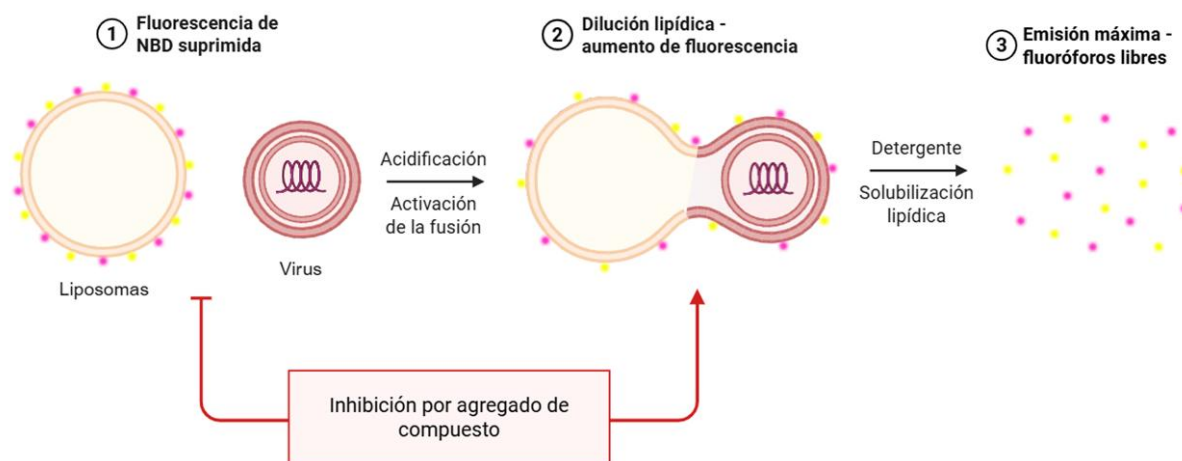


Figura 4.18. Esquema del fundamento del ensayo biofísico de fusión de membranas. La incubación conjunta de virus y liposomas fluorescentes a pH ácido gatilla los cambios conformacionales de la proteína de envoltura viral provocando la fusión de membranas. Los fluoróforos lipídicos se diluyen en la membrana viral, aumentando la emisión del NBD-PE. Finalmente, el agregado de detergente solubiliza a los lípidos y se obtiene el máximo de emisión de fluorescencia. El evento de fusión puede ser bloqueado por el agregado de compuesto.

En primer lugar, se llevó a cabo la preparación de los liposomas fluorescentes. La mezcla lipídica, resuspendida en una solución reguladora de Tris(hidroximetil)aminometano (*buffer* Tris), fue sometida a 10 ciclos de congelado-descongelado con nitrógeno líquido y agua a 50 °C para inducir el autoensamblaje de los lípidos. Las vesículas formadas se filtraron a través de una extrusora de 100 nm de diámetro de poro, con el objetivo de obtener una distribución homogénea de tamaños, cercana al tamaño de las partículas virales [55]. Los liposomas obtenidos fueron caracterizados según su distribución de tamaños, mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés *Dynamic Light Scattering*). Este experimento se realizó en el Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (FFyB-UBA). También, se caracterizaron las propiedades de fluorescencia de los liposomas sintetizados en un espectrofluorímetro. En particular, se adquirieron los espectros de emisión de fluorescencia de los liposomas en presencia y ausencia de detergente, en el rango de 480 a 700 nm usando una longitud de onda de excitación de 460 nm, coincidente con el máximo de absorbancia de la sonda NBD-PE [186].

Los liposomas presentaron un diámetro hidrodinámico promedio de 175.2 ± 6.6 nm (Tabla 4.3). Se evidenció una sola población de tamaños, y no se encontraron agregados (Figura 4.19 A). El valor de PDI de 0.105 ± 0.030 sugiere una distribución homogénea, indicando que el tamaño de los liposomas obtenidos es adecuado para el ensayo de fusión con virus. Se observó que los liposomas también poseen adecuadas propiedades de fluorescencia. Considerando que la longitud de onda de máxima emisión es 535 nm para la sonda NBD-PE y 583 nm para la sonda Rho-PE [186, 187], se encontró que la emisión del NBD-PE está fuertemente suprimida cuando el liposoma está íntegro, lo que indica una eficiente transferencia de energía hacia Rho-PE. El agregado del detergente Tritón X-100 desestabiliza la estructura de los liposomas y solubiliza a los lípidos, lo que se evidenció a partir del aumento en la emisión del NBD-PE libre debido a la pérdida de FRET (Figura 4.19 B). En este sentido, se puede concluir que el monitoreo de la emisión de fluorescencia de los liposomas a 535 nm se puede usar como indicador de la integridad de los mismos. En conjunto, estos resultados evidencian la calidad de la preparación de los liposomas y su aptitud para el uso en el ensayo de fusión de membranas.

Una vez preparados y caracterizados los liposomas fluorescentes, se trabajó en la puesta a punto del ensayo de fusión. El objetivo de esta etapa fue optimizar las variables experimentales y condiciones de medición que permitan evidenciar el aumento de la emisión de fluorescencia a 535 nm al incubar virus y liposomas a pH ácido. Como sistema control, se llevó a cabo una incubación bajo las mismas condiciones a pH neutro. En este caso no debería observarse el incremento en la emisión, de manera de confirmar que la señal observada se debe específicamente al proceso de fusión inducido por el pH. Las condiciones iniciales evaluadas fueron obtenidas de protocolos reportados en literatura [185], las cuales se detallan en la Figura 4.20. Para el ensayo se empleó virus concentrado y purificado en un medio libre de rojo fenol, debido a que este indicador interfiere con la lectura de fluorescencia. Tuve nuevamente la oportunidad de asistir al Laboratorio de Estrategias Antivirales del IQIBICEN, a cargo de la Dra. Cybele García, y participar activamente de la producción y purificación de DENV-2 para el ensayo de fusión. Las incubaciones de virus y liposomas se realizaron en una placa de 96 pocillos de color negro, apta para experimentos de fluorescencia.

Tabla 4.3. Tamaño medio, distribución de tamaños e índice de polidispersión del *stock* de liposomas, medido por DLS a 25°C.

Muestra	Promedio Z (nm)	Diámetro hidrodinámico promedio por intensidad (nm)	Índice de polidispersión (PDI)
Liposomas	155.9 ± 2.6	175.2 ± 6.6	0.105 ± 0.030

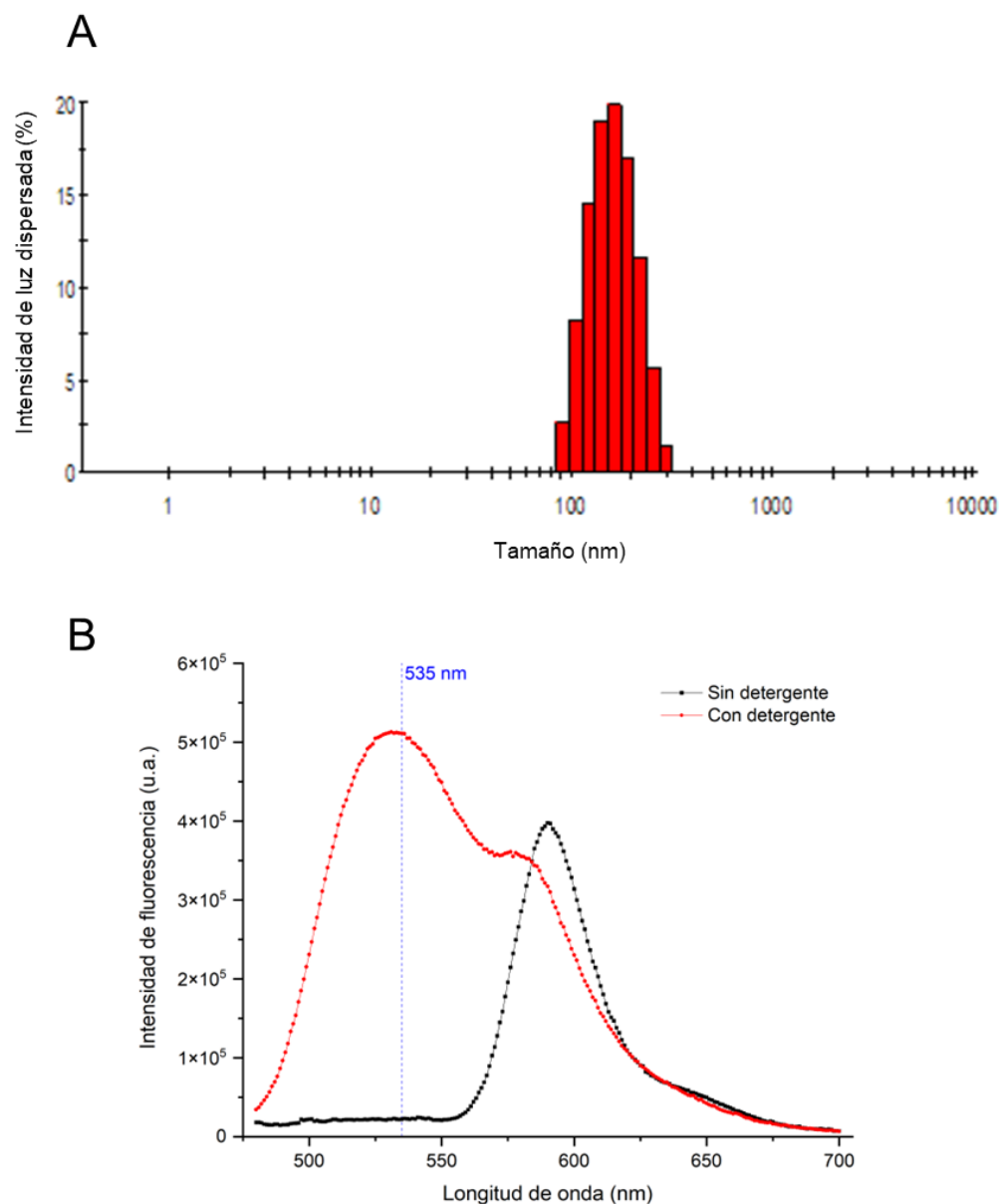


Figura 4.19. Caracterización del *stock* de liposomas según su tamaño y propiedades de fluorescencia. **(A)** Histograma promedio de la distribución de tamaños de partícula según porcentaje de intensidad de luz dispersada por DLS a 25 °C. **(B)** Espectro de emisión de fluorescencia de liposomas marcados 20 µM en *buffer* Tris de pH 6.7 adquirido con una longitud de onda de excitación de 460 nm, en presencia y ausencia de detergente Tritón X-100. Se resalta la longitud de onda de emisión usada para monitorear el ensayo de fusión de membranas (535 nm).

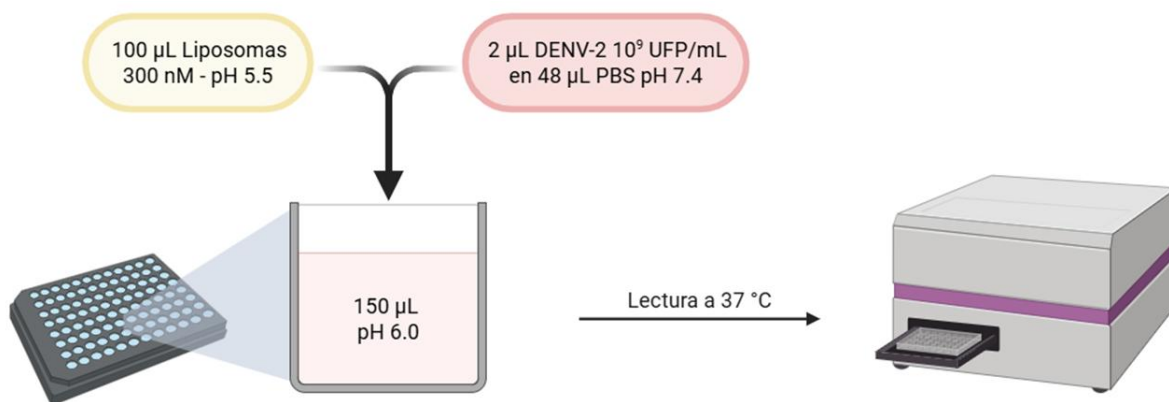


Figura 4.20. Protocolo experimental del ensayo de fusión. 100 µL de una suspensión de liposomas 300 nM a pH 5.5 se mezclan con 50 µL de una suspensión de DENV-2 a pH 7.4. Se obtiene una mezcla de pH 6.0, suficiente para gatillar el evento de fusión. La emisión se mide en un lector de microplacas con detección por fluorescencia a 37 °C. Se incluyó un control en donde los liposomas se encontraban inicialmente a pH 7.4.

Bajo las condiciones evaluadas, no se logró observar un aumento estadísticamente significativo en la intensidad de la señal de fluorescencia en la incubación a pH ácido, en relación con la fluorescencia a pH 7.4. Se modificaron variables con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas que permitan obtener los resultados esperados. En particular, se estudió el efecto de la cantidad de partículas de virus presentes, modificando el volumen de inóculo viral inicial desde 2 µL hasta 10 µL; el pH del medio, abarcando distintos puntos en el rango de 5 a 6; el empleo de soluciones reguladoras de otras sales; la temperatura del ensayo, realizado a 25 °C y 37 °C; parámetros relacionados con la lectura de fluorescencia tales como la ganancia, altura focal y condiciones de agitación; y el uso del detergente C₁₂E₈ (octaetilenglicol monododecil éter) en lugar de Tritón X-100 [188]. Sin embargo, no se logró obtener el resultado esperado bajo ninguna de estas condiciones. No se obtuvo reproducibilidad en los resultados y, en más de una ocasión, se observaron diferencias en la intensidad máxima de la señal tras el agregado de detergente, situación que no debería suceder si no se modifica la concentración de liposomas.

Frente a los inconvenientes encontrados, se optó por trabajar en la puesta a punto del ensayo con el virus de la fiebre amarilla (YFV). Este virus, perteneciente también a la familia de los *Flavivirus*, comparte muchas similitudes estructurales con DENV y ZIKV [55]. En particular, se decidió trabajar con este virus debido a que, en los protocolos en los que se describe este ensayo, se emplea YFV para monitorear el evento de fusión con liposomas [185]. El *stock* de este virus también fue producido y purificado en el Laboratorio de Estrategias Antivirales del IQUBICEN. Se llevaron a cabo distintas mediciones replicando las condiciones y variables evaluadas anteriormente con DENV-2; sin embargo, se obtuvieron resultados similares, sin lograr evidenciar experimentalmente el proceso de fusión de membranas.

En la búsqueda de estrategias alternativas, se consideró llevar a cabo el ensayo empleando virus marcados fluorescentemente en lugar de liposomas. La carbocianina DiO (perclorato de 3,3'-dilinoileloxacarbocianina) es una sonda fluorescente lipofílica que puede ser usada para marcar la membrana viral. Si la densidad superficial de la sonda es lo suficientemente alta, la emisión de fluorescencia resulta prácticamente nula debido a mecanismos de auto-supresión. En el proceso de fusión de membranas, la sonda DiO se diluye en la membrana liposomal, lo cual se manifiesta como un aumento en la emisión de fluorescencia [189]. Si bien el fundamento del ensayo es similar, la ausencia de señal observada anteriormente podría deberse a cantidades insuficientes de partículas virales para detectar el evento de fusión. De ser así, este enfoque alternativo permitiría evidenciar dicho proceso.

La marcación de DENV-2 se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología del IIB-UNSAM, a cargo del Dr. Diego Álvarez, donde participé activamente en la realización de los experimentos. Para ello, se siguieron protocolos descritos en literatura [190]. Se incubó el inóculo viral con DiO durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación en vórtex. Luego, se eliminó el excedente de DiO por cromatografía de exclusión empleando una columna Sephadex G-50. Se corroboró la infectividad del virus obtenido por titulación. Las propiedades de fluorescencia del virus marcado se determinaron por espectrofluorimetría. Se comprobó que la marcación fue efectiva debido a que el virus presentaba emisión de fluorescencia únicamente luego del agregado del detergente C₁₂E₈. Por su parte, se prepararon liposomas siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente, reemplazando el uso de NBD-PE y Rho-PE por DOPE.

Se evaluaron distintas condiciones experimentales empleando virus marcados con DiO y liposomas sin marcar. A pesar de los esfuerzos realizados, estos experimentos tampoco permitieron evidenciar experimentalmente el proceso de fusión con liposomas. Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad inherente que conlleva la puesta a punto de ensayos biofísicos *in vitro* de este tipo. Sin embargo, cabe destacar que estas limitaciones metodológicas no invalidan la hipótesis de que el compuesto **19** actúa como inhibidor de la fusión de membranas. La información obtenida puede ser usada como punto de partida para futuros experimentos de optimización de las condiciones metodológicas, para lograr la realización del ensayo de fusión y validación del mecanismo de acción propuesto.

4.6. DISCUSIÓN

El compuesto **3**, obtenido tras la primera ronda de diseño de antivirales, resultó ser un potente inhibidor de los virus dengue y Zika, tal como se comprobó en los ensayos celulares *in vitro*. Pese a tener el mayor índice de selectividad de todos los derivados estudiados, resultaba necesario optimizar su estructura con el objetivo de modular su citotoxicidad y ampliar su margen de seguridad, para poder lograr la obtención de un potencial candidato terapéutico. Se llevaron a cabo dos ciclos de optimización del compuesto **3**, a partir de los cuales se sintetizaron y evaluaron numerosos análogos. Este trabajo permitió identificar al candidato **19** y extraer conclusiones valiosas acerca de las relaciones existentes entre la estructura de los compuestos y sus propiedades biológicas.

En primera instancia, teniendo en cuenta que el grupo bifenilo podría estar relacionado con la elevada toxicidad del compuesto **3**; se diseñaron, sintetizaron y evaluaron cuatro nuevos derivados usando fragmentos de benceno *p*-cloro sustituidos en lugar del grupo bifenilo. Se propusieron moléculas con este motivo ya que numerosos medicamentos aprobados para el tratamiento de infecciones bacterianas, virales, fúngicas, y otras enfermedades como malaria y tuberculosis, contienen átomos de cloro en su estructura [191]. El análisis de la composición elemental de los fármacos aprobados por la FDA hasta 2012 permite observar que el cloro es el sexto elemento más frecuente, detrás de C, H, O, N y S, demostrando que la presencia de átomos de cloro es compatible con estructuras químicas de propiedades farmacológicas adecuadas [192]. Cabe destacar que el 83% de los átomos de cloro en estos compuestos están enlazados a átomos de carbono con hibridación sp^2 , mayoritariamente anillos aromáticos.

En todos los casos, la sustitución del grupo bifenilo por bencenos *p*-cloro sustituidos produjo moléculas con menor toxicidad celular, pasando de valores de CC_{50} de 5.74 μM del compuesto **3** a 18.82 μM y 23.83 μM de los derivados **17** y **19** respectivamente; y de 2.06 μM del compuesto **4** a 5.19 μM y 7.20 μM de los compuestos **18** y **20** respectivamente (Figura 4.21). El metileno adicional de las bencilaminas **19** y **20** favoreció la disminución en la citotoxicidad, en comparación con las cloroanilinas **17** y **18**. Asimismo, en todos los casos estudiados, se encontró que las moléculas con el resto 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina en la posición 2 del núcleo de pirimidina resultaron más tóxicas que las que poseen el resto 1-(2-aminoetil)piperidina en dicha posición. Este hecho fue tenido en cuenta al momento de expandir la serie de derivados, sintetizando solamente derivados con el resto 1-(2-aminoetil)piperidina.

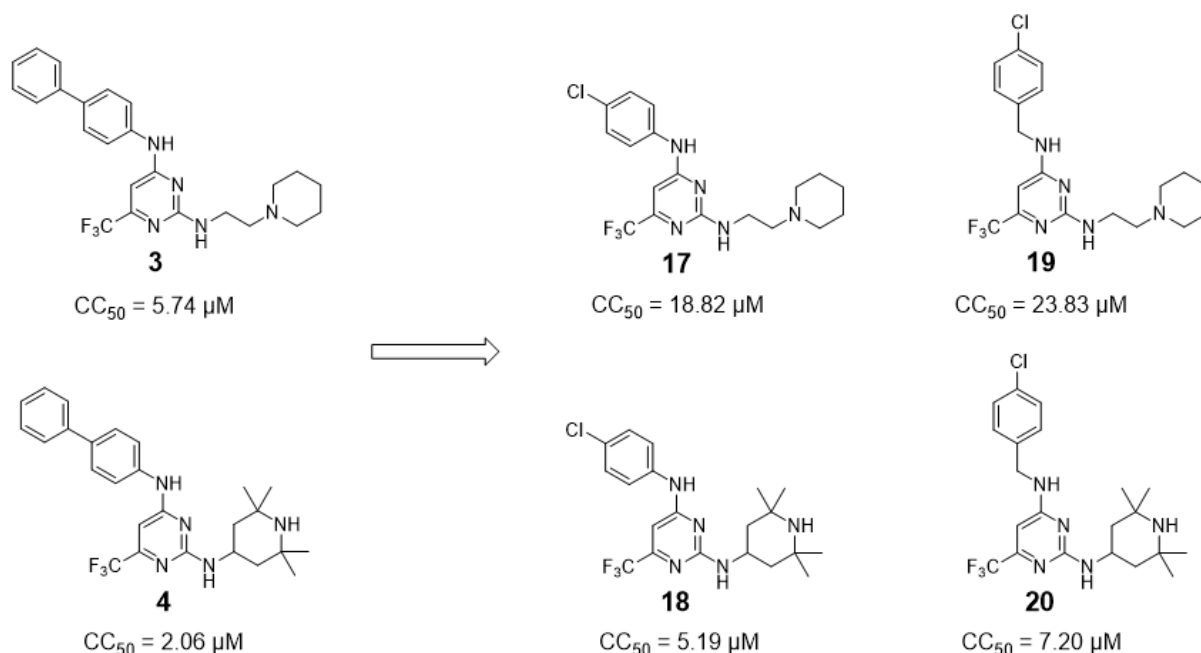


Figura 4.21. Derivados de **3** y **4** sintetizados en la primera ronda de análogos con sus valores de citotoxicidad determinados en células Vero tras 72 h de tratamiento.

La segunda ronda de síntesis consistió en una expansión de la serie de derivados, tomando como referencia al compuesto **19**, el compuesto más destacado de la serie anterior. En primer lugar, se decidió explorar la funcionalidad bencilamina, preparando siete derivados con distinto patrón de sustitución en el anillo terminal. Cinco de estas siete bencilaminas (**23**, **24**, **25**, **27** y **29**) resultaron menos tóxicas que **19**, reforzando la idea de que este grupo funcional plantea una mejora en términos de citotoxicidad, en relación con otras opciones evaluadas como, por ejemplo, las anilinas **32** y **33** que resultaron más tóxicas que **19**. Sin embargo, ninguna de estas cinco bencilaminas logró inhibir la replicación de los virus *in vitro*, lo que pone de manifiesto la importancia del átomo de cloro del compuesto **19** en relación a la acción antiviral. En la simulación de dinámica molecular del compuesto **19** se puede observar que el átomo de cloro juega un papel clave al establecer una interacción no covalente con el carbonilo del residuo Thr280, que influye favorablemente a la unión entre **19** y la proteína de envoltura, según el análisis de deconvolución energética por residuo. El derivado **28**, que mantiene el átomo de cloro y posee además un átomo de flúor, resultó más tóxico que su análogo **19**, indicando que la adición de este halógeno en reemplazo del hidrógeno en la posición 2 del resto bencilamina no representa una mejora en términos de citotoxicidad. De igual forma, tanto la bencilamina **26** como su isómero estructural **26b** resultaron más tóxicas que **19**. Cabe destacar que ambos derivados poseen un grupo bifenilo en su estructura, lo cual está en línea con la hipótesis de que este grupo funcional es un factor influyente en la toxicidad de los compuestos.

La síntesis y evaluación de los análogos **30** y **31** proporcionó información relevante acerca de la importancia del grupo amino presente en la posición 4 del anillo de pirimidina. En particular, el átomo de hidrógeno del grupo amino cumple un rol clave modulando tanto la citotoxicidad como la actividad del derivado **19**, ya que se encontró que la metilación del nitrógeno produjo un derivado de mayor toxicidad celular, mientras que el reemplazo del grupo funcional amina por un grupo amida generó un compuesto con pérdida total de la actividad antiviral.

El compuesto **19** destaca entre los derivados de esta serie, ya que presentó una disminución en la citotoxicidad manteniendo la elevada capacidad inhibitoria de las moléculas parentales frente a DENV-2. Asimismo, resultó igual de potente frente a ZIKV. Los resultados de las simulaciones de dinámica molecular indican que el compuesto posee alta afinidad por el bolsillo hidrofóbico de la proteína de envoltura de DENV-2, en línea con la elevada actividad biológica observada. Esta afinidad se evidenció tanto a pH fisiológico (7.4) como a pH ácido (5.5), hallazgo que cobra relevancia ya que el complejo ligando-proteína debe mantenerse estable bajo las condiciones ácidas del compartimiento endosomal durante el ingreso del virus a la célula [193]. Este aspecto es clave para el desarrollo de un compuesto que posea la capacidad de inhibir eficazmente el evento de fusión de membranas viral y endosomal [194]. En este sentido, los ensayos biológicos de mecanismo de acción arrojaron resultados compatibles con lo esperado para un inhibidor de entrada, apoyando la hipótesis de que el compuesto **19** ejerce su efecto antiviral en las etapas tempranas de la infección [195]. Pese a que no se logró concluir la puesta a punto del ensayo biofísico de fusión de membranas con liposomas, experimento que hubiese determinado inequívocamente que el compuesto **19** bloquea específicamente la fusión, los esfuerzos realizados aportan información relevante que puede servir como base para futuras optimizaciones metodológicas de dicho ensayo.

Los resultados obtenidos en estos estudios permiten postular al compuesto **19** como un candidato prometedor en el desarrollo de antivirales contra dengue y Zika, puntualmente debido a su potente capacidad inhibitoria y su margen de seguridad mejorado. Teniendo en cuenta además que se puede sintetizar en sólo dos pasos de reacción, este compuesto se posiciona como un candidato promisorio. Sin embargo, para que una molécula pueda ser considerada para su evaluación en ensayos preclínicos, debe cumplir con determinados requisitos relacionados con su farmacocinética [196]. Considerando que se desea desarrollar un fármaco de administración oral para el tratamiento de estas infecciones virales, el candidato a fármaco debe presentar un adecuado perfil de candidato (TPC, por sus siglas en inglés, *target candidate profile*), el cual establece un criterio en las propiedades y atributos moleculares, entre las que se encuentran las propiedades ADME (adsorción, distribución, metabolismo y excreción) [24, 197]. Por ejemplo, tener en cuenta la relación entre solubilidad y permeabilidad resulta útil al momento de seleccionar potenciales candidatos que posean adecuada absorción intestinal [198]. De igual forma, la estabilidad química de la molécula en el rango de pH del tracto gastrointestinal es esencial para alcanzar una biodisponibilidad oral adecuada [199]. En este contexto, resulta necesaria la evaluación de estos y otros parámetros farmacocinéticos previo a la evaluación del candidato en modelos *in vivo* [23].

Capítulo 5

Estudio y caracterización del perfil farmacocinético

5.1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es un proceso que requiere una gran inversión de tiempo y recursos económicos. Numerosos candidatos descubiertos en etapas tempranas fallan en ensayos preclínicos y clínicos, en gran medida por presentar propiedades farmacocinéticas poco favorables [198]. Por más que el principio activo tenga una gran potencia intrínseca, si no logra alcanzar y mantener una concentración suficiente en el sitio de acción, en la práctica se comportará como si no tuviera actividad [200]. En este sentido, el estudio de las propiedades farmacocinéticas durante las etapas tempranas del desarrollo de un fármaco juega un papel clave en relación al éxito que pueda tener en las posteriores etapas preclínicas y clínicas, ya que permite detectar y prevenir problemas relacionados con una baja solubilidad, deficiente biodisponibilidad, e interacciones indeseadas [16].

La farmacocinética se puede definir como el estudio de la evolución temporal de un fármaco y de sus metabolitos dentro del organismo [201]. Se puede entender como la serie de eventos por los cuales el organismo procesa, distribuye y transforma al fármaco, en contraposición a la farmacodinámica, que consiste en el estudio de los efectos (deseados e indeseados) que el fármaco ejerce sobre el organismo. En conjunto, la farmacocinética y la farmacodinámica conforman la farmacología [202, 203].

Existen cuatro procesos principales que determinan la farmacocinética de un compuesto bioactivo: la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción (propiedades ADME). El fenómeno de absorción describe el proceso por el cual el fármaco migra desde el sitio de administración hasta alcanzar la circulación sistémica, mientras que la distribución refiere al aumento de la concentración de droga en los distintos tejidos y órganos, incluyendo el sitio blanco, producto de su desplazamiento a lo largo del organismo. El metabolismo de un fármaco comprende su transformación enzimática, lo que constituye el mecanismo de defensa primario por el cual el organismo expulsa xenobióticos. Este proceso genera metabolitos que son subsecuentemente eliminados en el paso de excreción, el cual implica el transporte activo o pasivo de estos metabolitos hacia la orina o la bilis. Los metabolitos muchas veces pueden contribuir a la actividad biológica y/o a la toxicidad, por lo que resulta esencial conocer las rutas metabólicas de la droga y la farmacocinética de los metabolitos para el desarrollo exitoso de un fármaco [202].

En general, el metabolismo de xenobióticos ocurre en el hígado y, en menor medida, en el intestino delgado y el riñón. El proceso de metabolización de un fármaco puede dividirse en dos fases. La fase I del metabolismo incluye reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, catalizadas principalmente por enzimas del complejo citocromo P450 (CYP450) y flavin monooxigenasas (FMO), entre otras. En las reacciones de la fase II, los metabolitos producidos en la fase I sufren reacciones de conjugación, mediadas por enzimas transferasas y sulfotransferasas (UGTs, GSTs, SULTs, NATs, entre otras) [204, 205]. Es posible estudiar la estabilidad metabólica *in vitro* de un compuesto a partir de su incubación con modelos metabólicos competentes adecuados. Los sistemas más comúnmente utilizados *in vitro* incluyen el uso de enzimas recombinantes aisladas, como las del complejo CYP450 y las UGTs; la incubación con fracciones subcelulares, entre las que se encuentran microsomas, fracciones citosólicas y fracciones S9; y el uso de hepatocitos enteros o secciones de hígado [204, 206].

Además de la estabilidad metabólica, factores como la solubilidad acuosa, la capacidad de permear a través de membranas biológicas, y el grado de unión a proteínas plasmáticas influyen de manera directa en la eficacia de un fármaco. La solubilidad acuosa y la permeabilidad de membranas son dos propiedades fisicoquímicas claves en el proceso de desarrollo de fármacos, ya que ambos parámetros están intrínsecamente relacionados con la biodisponibilidad de un medicamento, lo que se define como la velocidad y el grado en que el principio activo es absorbido y alcanza el sitio donde ejerce su acción [201]. Una baja solubilidad acuosa suele conducir a una absorción deficiente, lo que deriva en una baja biodisponibilidad. En línea con esto, la necesidad de administrar dosis más altas para lograr la respuesta biológica deseada puede generar problemas de toxicidad asociados [207]. Por su parte, dado que la difusión pasiva constituye el mecanismo principal de absorción en el tracto gastrointestinal para gran parte de los medicamentos de administración oral, la evaluación de la permeabilidad de membranas biológicas de los candidatos a fármacos resulta de utilidad al momento de seleccionar, descartar o priorizar compuestos [208].

Existen numerosos experimentos *in vitro* que permiten predecir y estimar los parámetros fisicoquímicos y farmacocinéticos relevantes antes de progresar hacia los ensayos preclínicos y clínicos. Entre ellos, se pueden destacar el ensayo de permeabilidad PAMPA (por sus siglas en inglés, *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*), las determinaciones de solubilidad en medios fisiológicos simulados, y los ensayos de estabilidad química, plasmática y microsomal. Estos experimentos permiten obtener información clave acerca de la viabilidad farmacocinética de los candidatos a fármacos. Durante el proceso de optimización de los compuestos de referencia **1** y **2**, se sintetizaron numerosos derivados con diversas modificaciones estructurales con el objetivo de mejorar la relación citotoxicidad/actividad. El derivado **3** resultó el más destacado de la primera serie de análogos sintetizados, el cual fue optimizado estructuralmente para dar lugar al derivado **19**, el candidato más prometedor. En este capítulo se describe la puesta a punto de las metodologías realizadas para evaluar las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas, así como los resultados obtenidos en estos ensayos para los derivados **3** y **19**, y su comparación con los compuestos de referencia **1** y **2**.

5.2. ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD

Conceptualmente, la solubilidad se puede definir como la cantidad de una sustancia, denominada soluto, que se disuelve en un determinado volumen de un solvente bajo ciertas condiciones de pH y temperatura especificadas [209]. En particular, las determinaciones de solubilidad se pueden clasificar en dos grandes grupos según la metodología experimental empleada: la solubilidad cinética y la solubilidad termodinámica. En la determinación de la solubilidad cinética, se parte de una solución y se mide la máxima concentración alcanzada antes de que ocurra la precipitación. En general, estas mediciones son rápidas y fáciles de automatizar en ensayos de cribado de alto rendimiento [210]. Sin embargo, los resultados no suelen ser reproducibles entre diferentes métodos cinéticos. Además, debido a la posibilidad de formación de soluciones sobresaturadas, los resultados tienden a sobreestimar la solubilidad real [211]. En contraste, para la determinación de la solubilidad termodinámica se parte de una solución saturada con exceso de sólido sin disolver, de manera de garantizar el equilibrio termodinámico. La solubilidad en el equilibrio termodinámico representa adecuadamente la solubilidad real del analito, aunque también puede depender de factores experimentales como el grado de pureza, el tamaño de partícula, la estabilidad del soluto, y las condiciones de agitación y temperatura [210].

En este trabajo se determinó la solubilidad termodinámica en medios acuosos de los compuestos seleccionados a partir del método *shake-flask*, un procedimiento estandarizado y ampliamente usado para medir la solubilidad en el equilibrio [212]. Resulta de interés evaluar el perfil de solubilidad en función del pH de estos compuestos, abarcando particularmente el rango de pH de los fluidos corporales que interactúan con los fármacos a lo largo del proceso de absorción. Para ello, se prepararon tres soluciones reguladoras (o *buffers*) con valores de pH y concentración salina ajustados de manera de simular las condiciones de estos fluidos corporales. Se preparó un *buffer* PBS de pH 7.4 para simular las condiciones fisiológicas, un *buffer* SIF (fluido intestinal simulado) de pH 6.8, y un *buffer* SGF (fluido gástrico simulado) de pH 1.2, siguiendo protocolos estandarizados [213].

En primer lugar, se trabajó en la puesta a punto de la técnica con el objetivo de adaptar la metodología de medición a una placa de 96 pocillos. De esta forma, resulta posible obtener los valores de concentración de las muestras incógnita y de todos los puntos de las curvas de calibración, con las réplicas correspondientes, en una sola medición, lo que agiliza el ensayo reduciendo notablemente el tiempo de trabajo. Para ello, se evaluó la solubilidad de distintos fármacos comerciales como el ibuprofeno, el diclofenac sódico, la loratadina y el clorhidrato de verapamilo; y los resultados obtenidos se compararon con datos bibliográficos [214, 215, 216, 217]. La cuantificación de las concentraciones en solución se realizó por espectroscopía de absorción en el rango de luz ultravioleta-visible (espectroscopía UV-Vis). Para la determinación se utilizó una placa de cuarzo de 96 pocillos que habilita el paso de luz UV-Vis. La [Figura 5.1](#) muestra la distribución de la placa de 96 pocillos propuesta.

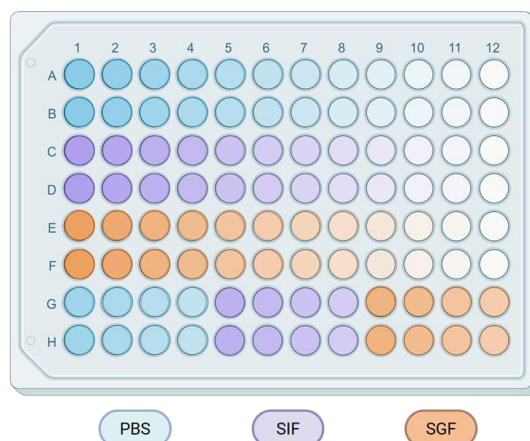


Figura 5.1. Diagrama propuesto de la placa de cuarzo para la determinación de solubilidad. Filas A y B: curvas de calibración en PBS. Filas C y D: curvas de calibración en SIF. Filas E y F: curvas de calibración en SGF (Columna 12: blancos de medios sin compuesto). Filas G y H: diluciones seriadas de la muestra incógnita en medios PBS, SIF y SGF.

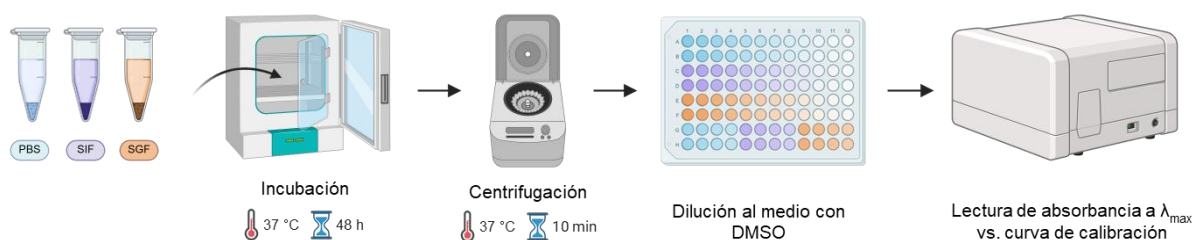


Figura 5.2. Esquema del protocolo de trabajo realizado para la medición de solubilidad por el método *shake-flask*.

La [Figura 5.2](#) esquematiza el flujo de trabajo realizado en el ensayo de solubilidad por el método *shake-flask*. En primer lugar, se prepararon soluciones saturadas del analito en medios PBS, SIF y SGF y se incubaron durante 24 horas a 37 °C en un agitador orbital. Luego, se dejó reposar durante otras 24 horas para alcanzar el equilibrio termodinámico. En este punto fue necesario comprobar que las soluciones se mantuvieran saturadas, es decir, que hubiera sólido sin disolver. Se centrifugaron las soluciones, se tomó el sobrenadante y se diluyó al medio con DMSO. Se realizaron diluciones secuenciales al medio en la placa de 96 pocillos, con el fin de evaluar un rango de concentraciones de analito y seleccionar para la cuantificación aquella que se ubique dentro del ámbito dinámico lineal de la curva de calibración. En paralelo, se prepararon diluciones seriadas del compuesto en DMSO:buffer 50:50 por cada medio por duplicado para la curva de calibración, cubriendo un rango de concentraciones desde 500 µg/mL hasta 1 µg/mL. Se obtuvieron los espectros de absorción en el rango de 254 a 400 nm para encontrar la longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia (λ_{max}) para cada compuesto. Luego, se midió la absorbancia a λ_{max} de las soluciones incógnita y de los puntos de las curvas de calibrado. Se determinó la solubilidad como la concentración de la solución saturada obtenida por extrapolación con la curva de calibración, por cada medio evaluado. La incubación, centrifugación y medición se realizó en equipos termostatzados a 37 °C.

Tabla 5.1. Solubilidad de fármacos comerciales determinada por el método *shake-flask* en los medios PBS, SIF y SGF; y comparación con datos bibliográficos [214, 215, 216, 217].

Fármaco	Solub. PBS (mg/mL)		Solub. SIF (mg/mL)		Solub. SGF (mg/mL)	
	experimental ^a	bibliografía ^b	experimental ^a	bibliografía ^b	experimental ^a	bibliografía ^b
Ibuprofeno	1.6 ± 0.1	3.4	2.4 ± 0.2	3.4	0.05 ± 0.01	0.04
Diclofenac	5.4 ± 0.2	5.2	0.6 ± 0.1	0.7	0.001 ± 0.001	0.001
Loratadina	-0.003 ± 0.001	0.004	0.006 ± 0.002	0.006	2.9 ± 0.1	4.6
Verapamilo clorhidrato	1.8 ± 0.1	0.8	4.7 ± 0.2	2.7	-	>100

^aSolubilidad experimental. Los resultados representan el promedio y desvío estándar de tres experimentos independientes.

^bSe indica la solubilidad bibliográfica a 37 °C, a excepción del diclofenac sódico que está reportada a 20 °C.

Los resultados de las mediciones experimentales y su comparación con los datos bibliográficos se presentan en la [Tabla 5.1](#). En todos los casos, los valores obtenidos se encuentran dentro del orden de magnitud esperado, así como las variaciones de los mismos en función del pH. Si bien en algunos casos se observan discrepancias, particularmente en aquellos valores mayores a 1 mg/mL, éstas pueden atribuirse a fenómenos de agregación del soluto o formación de soluciones sobresaturadas transitorias, que conducen a valores de solubilidad aparente mayores a los del equilibrio real. No obstante, se considera que el ensayo muestra un grado de confianza adecuado para comparar resultados relativos, establecer relaciones y obtener información valiosa acerca de la solubilidad de los compuestos sintetizados. No se pudo determinar la solubilidad del clorhidrato de verapamilo en medio SGF, ya que no se logró preparar una solución que se mantuviese saturada luego de las primeras 24 h de incubación con agitación. Se corroboró en bibliografía que el fármaco es altamente soluble en medio SGF, lo cual está en línea con lo observado experimentalmente.

Una vez realizada la puesta a punto de la técnica, se procedió con las determinaciones experimentales de la solubilidad de los compuestos **1**, **2**, **3** y **19** en medios PBS, SIF y SGF. Se aplicó el mismo procedimiento utilizado para la determinación de la solubilidad de los fármacos comerciales. Los resultados obtenidos se muestran en la [Tabla 5.2](#), y en forma de gráfico comparativo en la [Figura 5.3](#).

Tabla 5.2. Solubilidad de compuestos **1**, **2**, **3** y **19** determinada por el método *shake-flask* en los medios PBS, SIF y SGF.

Compuesto	Solubilidad experimental ^a (µg/mL)		
	PBS	SIF	SGF
1	118 ± 21	216 ± 9	489 ± 9
2	297 ± 3	1265 ± 19	573 ± 11
3	4 ± 2	10 ± 2	108 ± 3
19	507 ± 8	1687 ± 43	2285 ± 14

^aSolubilidad experimental. Los resultados representan el promedio y desvío estándar de tres experimentos independientes.

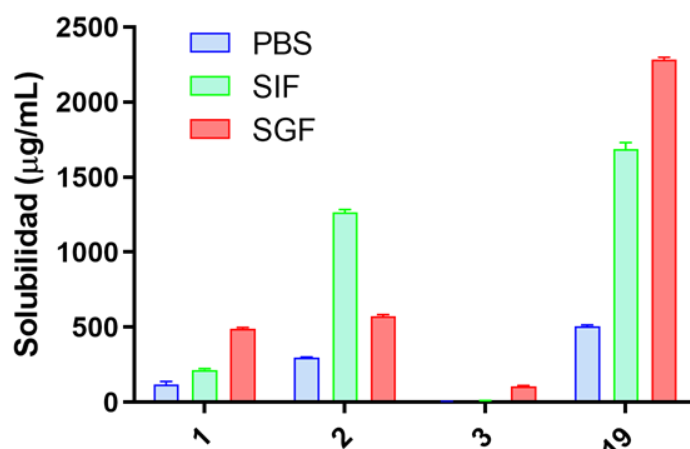


Figura 5.3. Gráfico comparativo de valores de solubilidad de los compuestos **1**, **2**, **3** y **19** obtenidos por el método *shake-flask* en los medios PBS, SIF y SGF. Las barras representan el promedio y desvío estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos muestran un incremento considerable en la solubilidad acuosa del derivado **19** respecto de los compuestos de referencia **1** y **2**, así como de su predecesor **3**. De acuerdo a las definiciones de la Farmacopea Europea, el derivado **19** califica como ligeramente soluble en medios SIF y SGF, y muy ligeramente soluble en PBS. En contraste, los compuestos **1**, **2** y **3** se mantienen prácticamente insolubles o, a lo sumo, muy ligeramente solubles en todos los medios evaluados [218]. Estos compuestos presentan un perfil de solubilidad dependiente del pH, resultando más solubles en condiciones ácidas, lo cual es consistente con la presencia de grupos funcionales básicos ionizables en su estructura. El compuesto **2** fue la excepción, ya que resultó menos soluble en SGF que en SIF. Estos resultados sugieren una disolución gastrointestinal favorable para el compuesto **19**, cuyos valores de solubilidad acuosa son comparables a los de los fármacos comerciales (Tabla 5.1). En particular, este resultado evidencia una mejora notable en el proceso de optimización de las propiedades.

5.3. ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD

La capacidad de un fármaco de permear membranas biológicas es una propiedad crucial a considerar en las etapas tempranas del desarrollo de medicamentos. Para que un fármaco de administración oral pueda entrar en el sistema circulatorio, previamente debe ser absorbido en el tracto gastrointestinal y transportado al hígado a través de la vena porta hepática [219]. La absorción de xenobióticos se produce fundamentalmente mediante dos mecanismos: el transporte activo, mediado por proteínas transportadoras, y la difusión pasiva a través de membranas. Debido a las características lipofílicas de la mayoría de los fármacos, la difusión pasiva constituye el principal mecanismo de absorción [220].

La capacidad de una sustancia de atravesar membranas biológicas depende de propiedades moleculares tales como el coeficiente de partición octanol/agua, el estado de ionización, el peso molecular y la capacidad de formar enlaces de hidrógeno [221, 222]. Si bien estas propiedades pueden usarse para estimar la permeabilidad de membranas, existen métodos que permiten evaluar este parámetro de manera directa. En este contexto, el ensayo PAMPA se presenta como un método de alto rendimiento, simple y de bajo costo, que permite predecir la absorción gastrointestinal de una molécula a partir de la capacidad de difundir a través de una membrana artificial, que simula las características de la membrana biológica en estudio [221]. Este ensayo permite evaluar únicamente el fenómeno de difusión pasiva, a diferencia de otros métodos basados en el uso de líneas celulares, entre los cuales se destaca el ensayo de permeabilidad a través de células de carcinoma de colon Caco-2. Sin embargo, el uso de células resulta mucho más laborioso y no es fácilmente aplicable a ensayos de alto rendimiento [222]. Para moléculas cuya absorción ocurre a través de la difusión pasiva, el ensayo PAMPA brinda resultados similares a los obtenidos con el uso de células Caco-2, reduciendo el tiempo del experimento entre 50 y 100 veces [223]. Además, modulando las características de la membrana artificial, el ensayo puede adaptarse para estudiar la difusión a través de otras membranas biológicas, como la barrera hematoencefálica, de particular relevancia en el caso de compuestos que ejercen su efecto en el sistema nervioso central [224].

En la [Figura 5.4](#) se muestra un esquema del ensayo PAMPA. Se utilizó el *kit* comercial PAMPA-096 de BioAssay Systems, siguiendo los lineamientos provistos por el fabricante [225]. El *kit* comprende una placa de 96 pocillos de doble compartimiento, separados por una superficie sobre la cual se coloca una dilución de lecitina al 4% en dodecano, para simular las características de la membrana gastrointestinal. Se preparó una solución madre 10 mM en DMSO del analito, la cual se diluyó a una concentración de 500 μ M en PBS. Se colocaron 200 μ L de esta solución sobre el compartimiento superior de un pocillo (solución donador), mientras que en el compartimiento inferior se colocó sólo PBS (solución aceptor). Tras incubación 18 h a 37 °C, se cuantificó la concentración de analito en la solución aceptor por absorbancia, junto con soluciones de referencia de concentración conocida, para determinar la permeabilidad aparente de la sustancia (P_{app}). Alternativamente, la detección podría realizarse por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), para el caso de compuestos que no contienen grupos cromóforos o que poseen un bajo coeficiente de extinción en el UV-Vis [226].

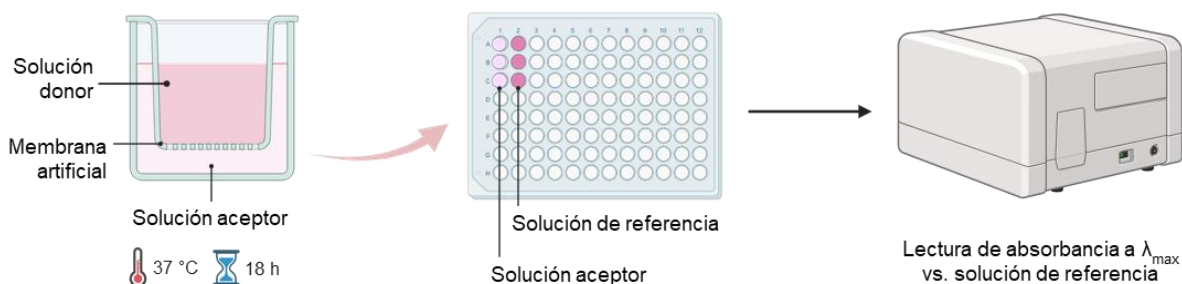


Figura 5.4. Esquema del protocolo de trabajo realizado para la determinación de la permeabilidad gastrointestinal con el ensayo PAMPA.

En primer lugar, se trabajó en la puesta a punto de la metodología evaluando la permeabilidad de fármacos de referencia y comparando los resultados obtenidos con datos bibliográficos, provistos por el fabricante [227]. Los fármacos de referencia fueron cloranfenicol, diclofenac y teofilina, los cuales representan controles de alta, media y baja permeabilidad respectivamente. Adicionalmente, se evaluó la permeabilidad del fármaco comercial warfarina, para ser usado como control interno del laboratorio. La absorbancia de cada analito fue medida a su propia $\lambda_{\max}$, la cual fue previamente determinada para la warfarina (en el caso de los otros controles, esta información también fue brindada por el fabricante). A partir de estos valores se calculó la permeabilidad aparente para cada compuesto.

Tabla 5.3. Permeabilidad determinada por el ensayo PAMPA de compuestos usados como control; y comparación con datos bibliográficos [227].

Compuesto	P_{app} experimental ^a ($\times 10^{-6}$) cm/s	P_{app} bibliográfica ($\times 10^{-6}$) cm/s
Teofilina (control de permeabilidad baja)	1.85 ± 0.21	1.04 ± 0.03
Diclofenac (control de permeabilidad media)	3.73 ± 0.44	3.25 ± 0.12
Cloranfenicol (control de permeabilidad alta)	6.85 ± 0.25	5.60 ± 0.57
Warfarina (control interno de laboratorio)	1.64 ± 0.10	-

^aPermeabilidad experimental. Los resultados representan el promedio y desvío estándar de dos experimentos independientes.

Los resultados de estas determinaciones y su comparación con los datos de bibliografía se muestran en la [Tabla 5.3](#). Al igual que en el ensayo de solubilidad, los valores obtenidos se encuentran dentro del rango esperado. De igual forma, se logra reproducir el aumento de permeabilidad aparente entre los distintos fármacos. La evaluación de la permeabilidad de la warfarina en este ensayo permite disponer de un control interno, que asegura la reproducibilidad de las condiciones experimentales y la calidad de los resultados obtenidos.

Luego de la puesta a punto del método, se procedió con la determinación de permeabilidad de los compuestos **1**, **2**, **3** y **19**. Se utilizó la misma metodología experimental que la usada para la medición de permeabilidad de los controles. Cada analito fue medido a su propia $\lambda_{\max}$. Los resultados obtenidos se muestran en la [Tabla 5.4](#), y en forma de gráfico comparativo en la [Figura 5.5](#).

Tabla 5.4. Permeabilidad de compuestos **1**, **2**, **3** y **19** determinada por el ensayo PAMPA.

Compuesto	P_{app} experimental ^a ($\times 10^{-6}$) cm/s
1	1.22 ± 0.22
2	2.22 ± 0.40
3	0.75 ± 0.02
19	3.05 ± 0.93
Warfarina	1.65 ± 0.08

^aPermeabilidad experimental. Los resultados representan el promedio y desvío estándar de tres experimentos independientes.

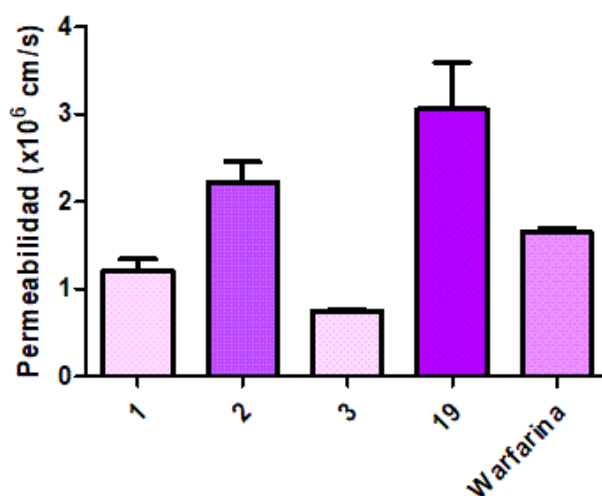


Figura 5.5. Gráfico comparativo de valores de permeabilidad de los compuestos **1**, **2**, **3**, **19** y warfarina obtenidos a partir del ensayo PAMPA. Las barras representan el promedio y desvío estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados muestran que el derivado **19** posee una permeabilidad gastrointestinal mejorada, en relación a los compuestos de referencia **1** y **2**. En comparación con los fármacos comerciales previamente evaluados, el valor de P_{app} encontrado se ubica dentro del rango de fármacos de permeabilidad media [220, 227, 228]. De hecho, el compuesto **19** presenta propiedades de permeabilidad gastrointestinal superiores a las del fármaco comercial warfarina. Contrariamente, el derivado **3**, obtenido en la primera serie de compuestos diseñados, mostró los valores de permeabilidad más bajos de todos los compuestos evaluados. Estos resultados en conjunto con los obtenidos en los experimentos de solubilidad, resultan prometedores en el marco de la optimización de las propiedades de los candidatos a antivirales.

5.4. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Los estudios de estabilidad constituyen una parte fundamental en la evaluación temprana del perfil farmacocinético de un candidato. Para que una molécula pueda alcanzar su sitio de acción y ejercer su efecto biológico, debe mantenerse íntegra durante las etapas de absorción y distribución, sin degradarse tempranamente en lo que se conoce como “efecto de primer paso” [200]. En este contexto, resulta de particular interés conocer la estabilidad química del fármaco, es decir, la capacidad de mantener su estructura inalterada en los medios químicos que simulan los fluidos corporales (PBS, SIF y SGF) [199]. De igual forma, el estudio de estabilidad en plasma sanguíneo permite evaluar la posible degradación en un medio donde la actividad enzimática puede cumplir un papel importante en la formación de metabolitos [229]. Si bien estos compuestos fueron diseñados para su uso en humanos, también resulta relevante la determinación de la estabilidad en plasma de ratón, ya que los estudios preclínicos suelen realizarse en modelos murinos y las enzimas plasmáticas pueden presentar variabilidad entre especies, dando lugar a diferentes perfiles de degradación [229].

En este trabajo se midió la estabilidad química y plasmática del compuesto **19**, el candidato más prometedor de la serie. Los experimentos de estabilidad química en PBS, SIF y SGF se llevaron a cabo siguiendo protocolos validados descritos en literatura [230, 231]. Para la cuantificación del analito se usó la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento con detección por espectrometría de masas (HPLC-MS). En la [Figura 5.6](#) se esquematiza el flujo de trabajo realizado. A partir de una solución madre del compuesto **19** 1 mM en acetonitrilo, se prepararon soluciones de concentración 50 μ M en los tres medios químicos, por triplicado. Estas soluciones se incubaron a 37 °C con agitación orbital. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos, las cuales se diluyeron en acetonitrilo frío para cortar la reacción. Se realizaron diluciones en metanol:agua 50:50 hasta alcanzar concentraciones de 1 μ M (suponiendo 0% de degradación) y se analizó por HPLC-MS. Se utilizó el fármaco comercial warfarina como estándar interno para la cuantificación.

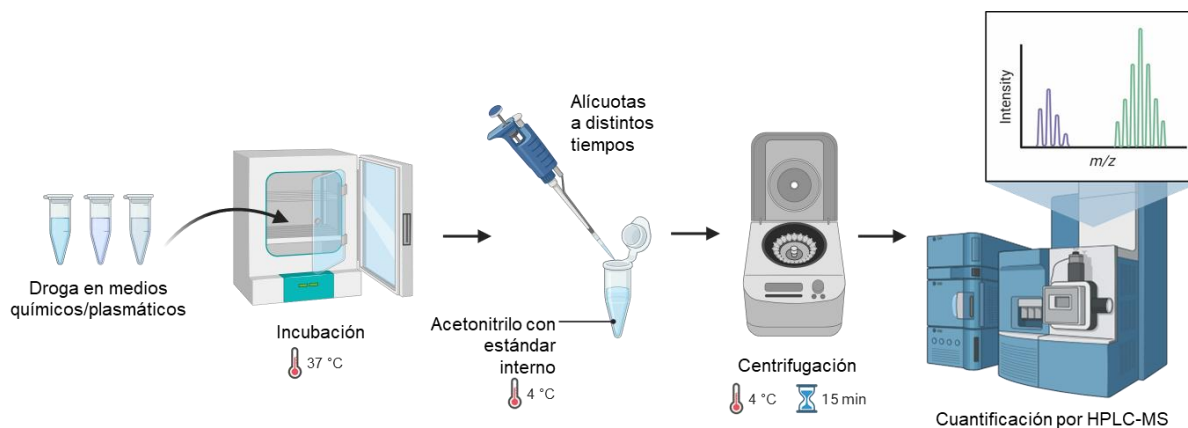


Figura 5.6. Esquema del protocolo de trabajo realizado para la determinación de la estabilidad química y plasmática del compuesto **19**.

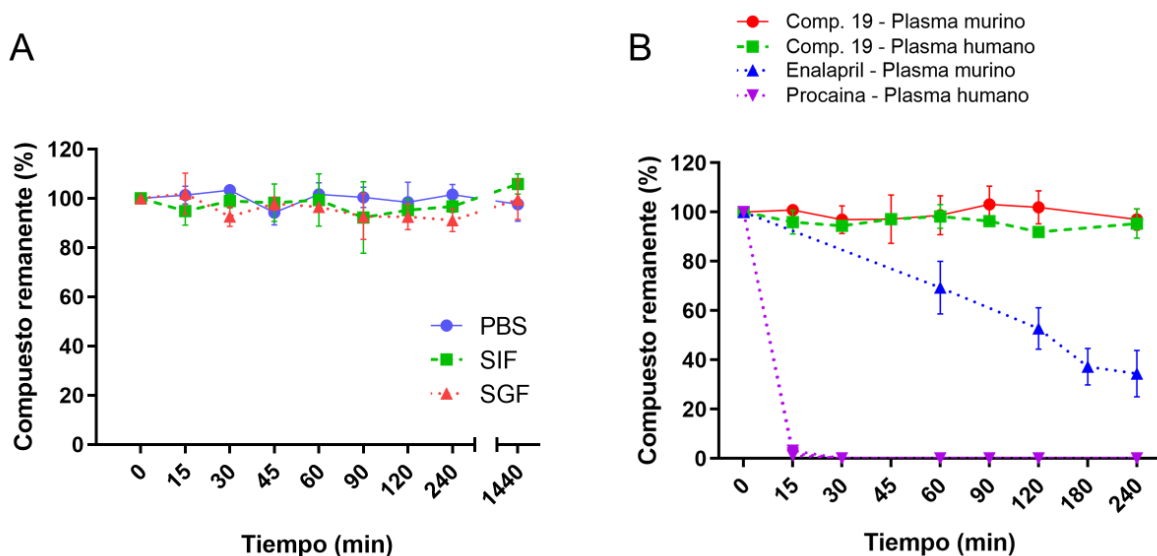


Figura 5.7. Perfil de estabilidad química (A) y plasmática (B) del compuesto **19** obtenido experimentalmente. La cuantificación del compuesto remanente en función del tiempo se calculó como la relación de áreas entre el compuesto a un tiempo dado y a tiempo = 0 min, esta última representando el 100% de la concentración. Los valores graficados representan el promedio y desvío estándar de tres experimentos independientes.

La determinación de la estabilidad del compuesto **19** en plasma de ratón y humano se llevó a cabo siguiendo un protocolo similar al anterior, con algunas modificaciones de acuerdo a procedimientos descritos en literatura [229]. La incubación se realizó a una concentración de 50 μ M al igual que en el protocolo anterior; sin embargo, resultó necesario reducir la proporción de solvente orgánico (acetonitrilo) presente, dado que a esa concentración se observó inhibición de la actividad enzimática. También fue necesario agregar un paso de centrifugación luego de cortar la reacción para separar las proteínas plasmáticas, precipitadas a causa del acetonitrilo. En paralelo, se evaluó el funcionamiento e integridad de las enzimas del plasma usando controles positivos. Se usó el fármaco comercial enalapril como control positivo para plasma murino, y procaina para plasma humano. En todos los casos se usó warfarina como estándar interno para la cuantificación.

Los resultados de los ensayos de estabilidad química y plasmática se muestran en la [Figura 5.7](#). Se encontró que el compuesto **19** es altamente estable en medios PBS, SIF y SGF, manteniendo el 100% de su concentración inicial tras un día de incubación. Consistentemente, el compuesto **19** resultó estable tanto en plasma humano como en plasma de ratón, sin presentar degradación tras 4 horas de incubación. Sin embargo, la concentración de **19** se vio reducida a un 20% de su concentración inicial tras 24 h de incubación en plasma humano (datos no mostrados). En base a estos resultados, es posible concluir que el compuesto **19** presenta un adecuado perfil de estabilidad en las condiciones evaluadas.

Adicionalmente, se llevaron a cabo experimentos de estabilidad en microsomas de ratón, con el objetivo de determinar la estabilidad metabólica del compuesto **19**. Los microsomas hepáticos son pequeñas vesículas obtenidas del retículo endoplasmático de hepatocitos por ultracentrifugación diferencial [201, 219]. Los microsomas contienen las enzimas que catalizan las reacciones de fase I del metabolismo, incluyendo a las enzimas del complejo CYP450, pero solo algunas de las que catalizan las reacciones de fase II, entre ellas las UGTs. Otros modelos metabólicos, como los hepatocitos enteros que contienen todas las enzimas hepáticas que pueden encontrarse *in vivo*, brindan información más detallada acerca de las rutas metabólicas de los xenobióticos [232]. Sin embargo, no se suelen emplear de manera rutinaria ya que deben prepararse regularmente para no perder funcionalidad [23]. En cambio, los microsomas mantienen su funcionalidad durante largos períodos de tiempo si se almacenan a -80 °C, y los ciclos de congelado y descongelado no afectan significativamente su actividad metabólica [200]. Debido a su robustez, accesibilidad, simplicidad del procedimiento experimental y capacidad de adaptarlo a ensayos de cribado de alto rendimiento, y la poca cantidad de compuesto requerida, los microsomas constituyen una herramienta ampliamente usada para evaluar la estabilidad metabólica *in vitro* y obtener información relevante previo al estudio en modelos animales [204].

Se determinó la estabilidad metabólica del compuesto **19** empleando microsomas de ratón, siguiendo protocolos reportados en literatura [206, 233, 234]. El procedimiento general utilizado fue similar al de los ensayos de estabilidad química y plasmática (Figura 5.6), con algunas particularidades. En primer lugar, se ajustaron las concentraciones y los volúmenes de incubación para lograr usar la menor cantidad posible de microsomas. Para iniciar la reacción se agregó NADPH, cofactor necesario para el funcionamiento de las enzimas metabólicas del complejo CYP450. En paralelo, se realizó una incubación control de microsomas y compuesto sin NADPH. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos durante 45 minutos, las cuales se diluyeron en acetonitrilo frío para cortar la reacción. Fue necesario también realizar el paso de centrifugación para separar las enzimas y otros componentes microsomales. Para la detección por HPLC-MS se usó warfarina como estándar interno. Se realizó un control positivo con el fármaco comercial verapamilo, para garantizar el correcto funcionamiento de los microsomas.

Los resultados del experimento de estabilidad microsomal muestran que el compuesto **19** presenta una metabolización rápida, disminuyendo su concentración remanente en un 50% tras 8.6 minutos de incubación (Figura 5.8 A). Con el objetivo de conocer los sitios de metabolización y productos formados, se llevó a cabo un estudio preliminar de búsqueda de posibles metabolitos. En primer lugar, se utilizó la herramienta computacional en línea BioTransformer 3.0, que permite predecir los posibles productos de metabolismo de fase I del compuesto **19** y conocer las masas de los isótopos más abundantes de estos metabolitos [235]. Con esta información, se buscaron específicamente los iones $[M+H]^+$ de los posibles metabolitos en las muestras de estabilidad a distintos tiempos, usando la herramienta SIR (por sus siglas en inglés, *single ion recording*) del espectrómetro de masas. Se consideró que el metabolito estaba presente en las muestras en los casos en que la intensidad de la señal del ion aumenta en función del tiempo. En particular, se buscaron cuatro iones, cuyas características se resumen en la Tabla 5.5. El listado de todos los metabolitos predichos por la plataforma BioTransformer se adjunta en el Anexo IV.

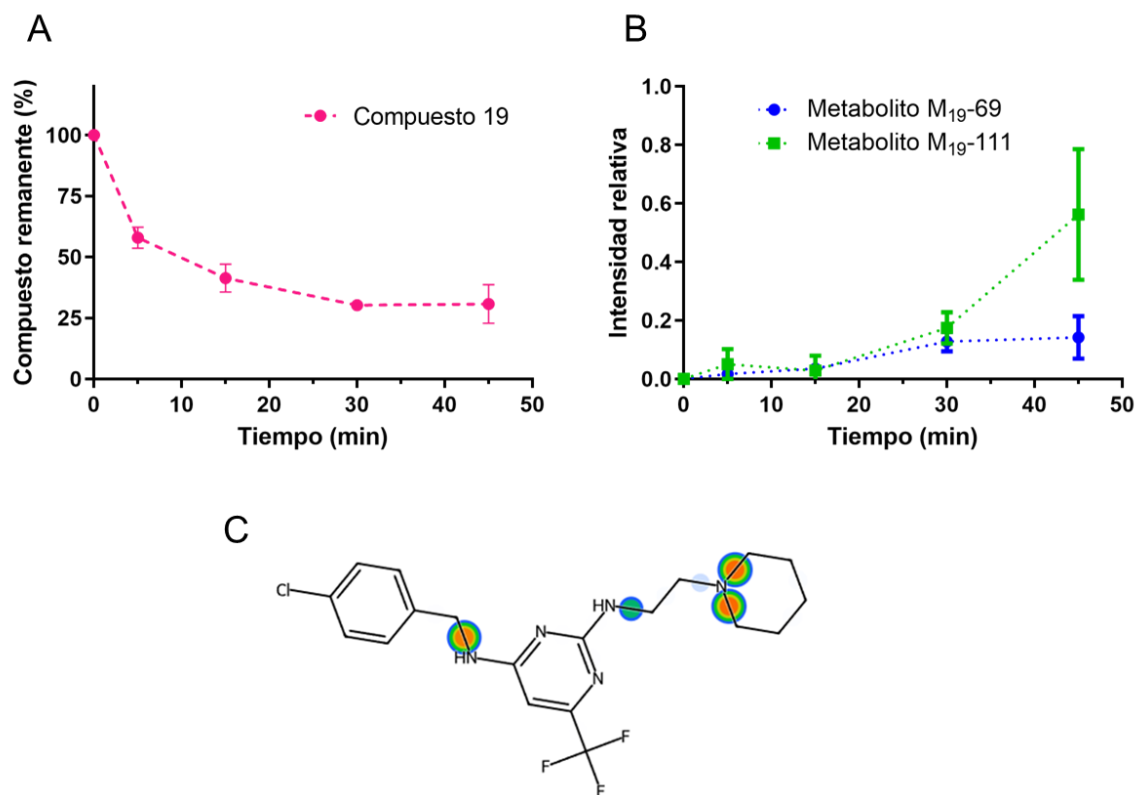


Figura 5.8. (A) Perfil de estabilidad metabólica del compuesto **19** en microsomas de ratón obtenido experimentalmente. La cuantificación del compuesto remanente en función del tiempo se calculó como la relación de áreas entre el compuesto a un tiempo dado y a tiempo = 0 min, esta última representando el 100% de la concentración. (B) Evolución de la señal en función del tiempo para los metabolitos del compuesto **19** encontrados. La masa de los posibles metabolitos fue predicha por BioTransformer 3.0 y analizada por espectrometría de masas. La intensidad se calculó como el cociente entre la señal del analito y la señal del estándar interno warfarina. En ambos casos, los valores graficados representan el promedio y desvío estándar de tres experimentos independientes. (C) Mapa de calor de sitios sujetos a reacciones de *N*-dealquilación del compuesto **19**, obtenido a través del sitio XenoSite.org.

Tabla 5.5. Metabolitos buscados por espectrometría de masas bajo la configuración SIR, predichos por BioTransformer 3.0 [235].

Metabolito	Masa isotópica mayoritaria ^a	Relación con la masa de 19	Posible reacción metabólica
1	429.15	M ₁₉ +16	Hidroxilación y <i>N</i> -oxidación
2	344.06	M ₁₉ -69	<i>N</i> -dealquilación
3	289.15	M ₁₉ -124	<i>N</i> -dealquilación
4	302.05	M ₁₉ -111	<i>N</i> -dealquilación

^aEn la tabla se informan las masas reales de los metabolitos; sin embargo, en el espectrómetro de masas se buscaron las masas correspondientes a los iones [M+H]⁺ de cada posible metabolito.

A partir de los experimentos de espectrometría de masas fue posible detectar la presencia de los metabolitos 2 y 4, correspondientes a reacciones de *N*-dealquilación catalizadas por la enzima CYP1A2 ([Figura 5.8 B](#)). Para corroborar estos resultados, se realizó un mapeo de sitios sujetos a reacciones de *N*-dealquilación usando el servidor en línea [XenoSite.org](#) [236]. Se encontró que algunos de los sitios predichos más propensos a sufrir transformaciones de este tipo producen metabolitos que coinciden con los encontrados experimentalmente ([Figura 5.8 C](#)). Esta información resulta particularmente valiosa para el diseño racional de nuevos derivados, orientado a la introducción de modificaciones estructurales que puedan conferir mayor estabilidad metabólica sin comprometer la actividad antiviral. No obstante, es importante aclarar que el estudio de posibles metabolitos realizado es preliminar, y debe ser corroborado realizando la síntesis y caracterización de los metabolitos propuestos para poder determinar inequívocamente su identidad y extraer conclusiones precisas.

5.5. DISCUSIÓN

En este capítulo se realizó un estudio integral de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas del compuesto **19**, el candidato más prometedor de la serie de derivados sintetizados. Este compuesto demostró una excelente capacidad de inhibición *in vitro* frente a los virus dengue y Zika, y un perfil de seguridad mejorado. La evaluación del perfil farmacocinético del compuesto **19** proporciona información clave para poder determinar si el compuesto efectivamente posee potencial como fármaco. El perfil farmacocinético refiere al conjunto de propiedades que determinan los procesos ADME y que influyen en la capacidad de un compuesto de alcanzar el sitio blanco y ejercer su efecto terapéutico *in vivo* [237]. Estas propiedades, tales como la solubilidad acuosa, la permeabilidad de membranas y la estabilidad, dependen de características fisicoquímicas y estructurales de la molécula. Debido a su importancia, la evaluación de las mismas durante las etapas tempranas del desarrollo usando métodos *in vitro* incrementa la eficiencia del proceso y las probabilidades de éxito en etapas posteriores [232].

Con respecto a la solubilidad acuosa y permeabilidad gastrointestinal, el compuesto **19** presentó una mejora significativa en comparación con las moléculas **1**, **2** y **3**, lo que se relaciona directamente con una mayor biodisponibilidad. Desde la perspectiva del diseño racional, las modificaciones estructurales realizadas, como la interrupción de la planaridad del grupo bifenilo y la inserción de un metileno que aporta flexibilidad conformacional, están en línea con estrategias comúnmente utilizadas en química medicinal para la optimización temprana de las propiedades fisicoquímicas sin comprometer la actividad biológica [153, 207]. En efecto, el compuesto **19** califica como ligeramente soluble según los lineamientos de la Farmacopea Europea, y posee una permeabilidad media en comparación con otros fármacos de referencia [218, 220, 227, 228]. El sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS, por sus siglas en inglés *Biopharmaceutics Classification System*) proporciona un marco para la clasificación de fármacos según su solubilidad acuosa y permeabilidad gastrointestinal. El sistema propone cuatro categorías: fármacos de alta solubilidad y permeabilidad (Clase I), fármacos de baja solubilidad y alta permeabilidad (Clase II), fármacos de alta solubilidad y baja permeabilidad (Clase III), y fármacos de baja solubilidad y permeabilidad (Clase IV) [238]. Esta categorización permite predecir el comportamiento *in vivo* de un fármaco y guiar los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia necesarios para la aprobación de un fármaco por parte de las entidades regulatorias, lo que pone de manifiesto la importancia de estas propiedades [239]. Sin embargo, se ha puesto en duda la aplicabilidad de estos criterios en las etapas tempranas del desarrollo de fármacos, ya que los lineamientos para la clasificación según la BCS se basan en la solubilidad y permeabilidad de la dosis más alta comercializada de un fármaco [240]. De todas formas, valores de solubilidad acuosa y permeabilidad similares a los del compuesto **19** son frecuentemente encontrados en numerosas drogas comerciales, lo que destaca su potencial como fármaco dentro del proceso de optimización de las propiedades de los candidatos a antivirales.

El compuesto **19** presentó una adecuada estabilidad en medios químicos, así como en plasma humano y de ratón. Sin embargo, el punto débil de este compuesto es su baja estabilidad microsomal, observándose una rápida metabolización del mismo cuando se incubó con microsomas de ratón en presencia de NADPH. Dos parámetros frecuentemente utilizados para describir y comparar la estabilidad de un fármaco son el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y el aclaramiento o *clearance* intrínseco (Cl_{int}). Como su nombre lo indica, el $t_{1/2}$ representa el tiempo en el cual la concentración de la droga disminuye a la mitad [202]. Por su parte, el aclaramiento refiere a la capacidad del organismo, o de un órgano en particular, de eliminar un fármaco de la circulación sanguínea. Expresa el volumen aparente de fluido biológico que ese órgano u organismo aclara por unidad de tiempo, siendo inversamente proporcional al tiempo de vida media [200]. Cuando el modelo usado para evaluar la estabilidad metabólica son microsomas de ratón, se puede determinar el aclaramiento intrínseco microsomal ($Cl_{int,micr}$), medido en unidades de $\mu\text{L}/\text{min}.\text{mg}$. A partir del $Cl_{int,micr}$ se puede extrapolar el aclaramiento intrínseco hepático *in vivo* (Cl_{int}), expresado en unidades de $\text{mL}/\text{min}.\text{kg}$, utilizando factores de escalado adecuados, tales como el contenido de proteína microsomal por gramo de hígado y la masa hepática promedio de la especie [204].

Tabla 5.6. Parámetros indicadores de la estabilidad del compuesto **19** calculados a partir del ensayo de estabilidad metabólica en microsomas de ratón.

Compuesto	$t_{1/2}$ (min)	$Cl_{int,micr}$ ($\mu\text{L}/\text{min}.\text{mg}$)	Cl_{int} ($\text{mL}/\text{min}.\text{kg}$)
19	8.6	179	705

A partir de la linealización de la curva de degradación microsomal obtenida en el ensayo de estabilidad metabólica (Figura 5.8 A) es posible obtener el $t_{1/2}$ del compuesto **19** y calcular los parámetros que se muestran en la Tabla 5.6, usando las ecuaciones y los factores de escalado correspondientes [204, 241, 242]. En comparación con otros fármacos comerciales, se puede clasificar al derivado **19** como un compuesto de alto aclaramiento [243]. El bajo tiempo de vida media y elevado aclaramiento intrínseco obtenido sugiere que la biodisponibilidad *in vivo* puede llegar a ser baja, dado que los fármacos con alto aclaramiento hepático suelen metabolizarse de manera considerable antes de alcanzar la circulación sistémica por efecto de primer paso [200, 204]. La detección temprana de esta limitación resulta importante para evitar inconvenientes en futuros ensayos *in vivo*. Se pueden encontrar ejemplos en literatura en donde la evaluación *in vitro* de las propiedades ADME de candidatos a antivirales con actividad contra dengue resultó fundamental para identificar compuestos con un perfil farmacocinético favorable y biodisponibilidad mejorada para su posterior evaluación *in vivo* [244].

La detección por espectrometría de masas de dos iones, correspondientes a M_{19-69} y M_{19-111} , y el aumento de su intensidad en función del tiempo de incubación, sugiere la formación de dos posibles metabolitos de **19**, producto de reacciones de *N*-dealquilación. La confirmación de estos hallazgos mediante la síntesis y caracterización estructural de los posibles metabolitos resulta necesaria para su identificación de manera concluyente. Esta información puede ser usada para llevar adelante estudios de actividad y citotoxicidad sobre los metabolitos, lo que aportaría información adicional acerca de la viabilidad del compuesto **19** como potencial fármaco. Asimismo, la identificación de los metabolitos confirmaría la existencia de sitios lábiles, o *soft spots*, en la estructura de la molécula. Los sitios lábiles son motivos estructurales susceptibles a la actividad de enzimas metabólicas [245]. De acuerdo a las predicciones del servidor en línea XenoSite.org, la mayor parte de estos sitios lábiles se encuentra en el grupo 1-(2-aminoetil)piperidina (Figura 5.8 C), motivo estructural que no ha sido estudiado extensivamente durante las rondas de optimización. De acuerdo a las simulaciones computacionales realizadas en estudios anteriores, este fragmento se encuentra expuesto al solvente cuando la molécula se acomoda en el sitio blanco de la proteína de envoltura. Toda esta información genera nuevas preguntas de investigación, proponiendo una extensión de este estudio con enfoque en una nueva ronda de diseño racional de análogos basado en estructura, con el objetivo de obtener derivados de mayor estabilidad metabólica sin pérdida de actividad biológica.

Capítulo 6

Conclusiones y perspectivas

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las enfermedades tropicales desatendidas constituyen uno de los principales desafíos en materia de salud pública global, ya que afectan principalmente a poblaciones que se encuentran en regiones subdesarrolladas [80]. Entre ellas, se destacan las enfermedades provocadas por los virus dengue y Zika, debido a la gravedad de los cuadros clínicos en que pueden derivar, a la amplia distribución geográfica del mosquito vector, y a la ausencia de medicinas específicas para su tratamiento [84, 85, 103]. Estos virus pertenecen a la familia *Flaviviridae*, junto con otros patógenos de relevancia como el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la fiebre amarilla (YFV) o el virus del Nilo Occidental (WNV). El genoma está conformado por ARN monocatenario de polaridad positiva, que codifica para tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales, que cumplen funciones relevantes en el ciclo de replicación [108]. Todas estas proteínas virales constituyen blancos potenciales para el desarrollo de antivirales eficaces.

El desarrollo de inhibidores de entrada surge como una estrategia terapéutica atractiva, dado que previene etapas posteriores de replicación viral. En el caso de los virus dengue y Zika, la entrada a la célula huésped involucra múltiples eventos secuenciales: la adsorción a receptores específicos de membrana, la internalización mediante endocitosis, y la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal, lo que finalmente libera el genoma viral al citoplasma [110]. A lo largo del desarrollo de esta tesis, se han adoptado enfoques provenientes del área de la química medicinal para contribuir a la identificación de pequeñas moléculas orgánicas capaces de inhibir de manera eficaz la entrada de los virus a la célula por bloqueo del evento de fusión de membranas. El trabajo se fundamentó en la hipótesis de que estas moléculas pueden bloquear los cambios conformacionales que sufre la proteína de envoltura debido al pH ácido del endosoma, que exponen al péptido de fusión dando inicio al evento de fusión [125]. Por ello, el blanco biológico seleccionado para el descubrimiento de antivirales fue el bolsillo hidrofóbico localizado entre los dominios DI y DII de la proteína E.

Como punto de partida de este trabajo, se consideró la estructura de los derivados de pirimidina **1** y **2**. Las pirimidinas son grupos funcionales con propiedades fisicoquímicas y moleculares compatibles con las de los medicamentos. A modo de ejemplo, el análisis de las moléculas orgánicas aprobadas por la FDA entre 2015 y 2020 revela que el 88% de las mismas contienen heterociclos nitrogenados en su estructura. Los motivos estructurales encontrados con mayor frecuencia son las piridinas, las piperidinas, las piperazinas y las pirimidinas [21].

A partir de las estructuras de los compuestos **1** y **2**, y teniendo en cuenta sus valores de actividad y toxicidad, inicialmente se llevó a cabo el diseño racional asistido por computadora y la síntesis de derivados con modificaciones en el anillo de pirimidina. Se encontró que la incorporación del grupo trifluorometilo en la posición 6 resultó en una molécula de elevada actividad frente a ambos virus DENV y ZIKV. Sin embargo, presentó elevada toxicidad, por lo cual se llevaron a cabo distintas estrategias para aumentar el índice de selectividad de la molécula.

Sucesivos ciclos de optimización permitieron identificar al compuesto **19**, que introduce un fragmento 4-clorobencilamina en la posición 4 del anillo de pirimidina. La incorporación de este sustituyente habilitó la obtención de un compuesto con un margen de seguridad mejorado, elevada capacidad inhibitoria, y adecuadas propiedades de solubilidad y permeabilidad, similares a las de numerosos fármacos comerciales. La introducción de un átomo de cloro en la estructura química como estrategia para reemplazar al motivo bifenilo, así como la inserción de un metileno adicional para aportar flexibilidad conformacional, constituyen estrategias características de la química medicinal frecuentemente empleadas en campañas de descubrimiento y desarrollo de fármacos [28, 207].

En adición a las mejoras observadas respecto a las moléculas predecesoras, el compuesto **19** cumple con las reglas de Lipinski [9], y es fácilmente sintetizable en sólo dos pasos de reacción. Sin embargo, su principal limitación es la rápida metabolización observada en la incubación con microsomas de ratón. El compuesto mostró un alto aclaramiento intrínseco y corto tiempo de vida media, lo que limitaría su biodisponibilidad *in vivo* al impedirle alcanzar el sitio de acción [200, 204]. El mapeo de sitios sujetos a metabolización, en conjunto con la identificación de dos metabolitos por espectrometría de masas, aporta información acerca de posibles pasos a seguir en la búsqueda de estructuras con mayor estabilidad microsomal.

El empleo de herramientas computacionales ha sido un recurso de gran ayuda que permitió guiar la toma de decisiones y obtener evidencias que respaldan la hipótesis de trabajo. La primera serie de moléculas preparadas resultó de una búsqueda de análogos a través de la plataforma SwissBioisostere, seleccionadas a partir de su desempeño en simulaciones de acoplamiento molecular en conjunto con los resultados de la predicción computacional de las propiedades fisicoquímicas. Luego, las moléculas más prometedoras de cada serie fueron estudiadas en simulaciones de dinámica molecular, lo que permitió obtener información acerca de la estabilidad y modo de interacción de los ligandos en el sitio de unión. En particular, se logró obtener información acerca del desvío cuadrático medio (RMSD) del ligando en el sitio de unión, la energía libre de unión, y las interacciones atractivas entre los grupos funcionales de los ligandos y los residuos del bolsillo. Adicionalmente, se investigó la estabilidad del compuesto **19**, el candidato más prometedor, en una simulación a pH ácido, aspecto clave en el desarrollo de un inhibidor de entrada cuyo modo de acción propuesto es el bloqueo de la fusión de membranas [125].

Se realizaron experimentos biológicos con el objetivo de obtener información acerca del mecanismo de acción. Conocer el modo de acción, si bien no resulta un requisito fundamental para la evaluación *in vivo* de un candidato, proporciona información clave que permite orientar el proceso de optimización, diseñar moléculas más potentes, entender algunas de las limitaciones que puedan aparecer tales como el desarrollo de resistencia, e incluso pensar en tratamientos combinados que involucren la inhibición de dos blancos en simultáneo, como es el caso de las terapias antirretrovirales actuales para el tratamiento y prevención del HIV [78].

Los resultados de los ensayos biológicos de mecanismo de acción obtenidos son compatibles con los esperados para un inhibidor de entrada, lo que está en línea con la hipótesis de trabajo. Sin embargo, no se ha logrado validar de forma directa la interacción con la proteína de envoltura. El ensayo biofísico de inhibición de la fusión con liposomas representó una propuesta alternativa para la elucidación del mecanismo de acción. Si bien la puesta a punto de la metodología no llegó a concretarse favorablemente, los avances realizados sirven como base para continuar con la optimización de las condiciones experimentales.

En conclusión, a lo largo de este trabajo se han logrado avances importantes en la búsqueda de un inhibidor de entrada eficaz contra los virus dengue y Zika. El compuesto **19** logró sobrellevar muchos de los inconvenientes que presentaban las moléculas parentales **1** y **2**; en particular, relacionadas a la toxicidad, solubilidad y permeabilidad de membranas. Este compuesto también mostró una adecuada estabilidad química y plasmática. A su vez, a partir del trabajo llevado a cabo se pueden plantear nuevos interrogantes, principalmente en relación a la validación del blanco molecular y, por otro lado, a la optimización de la estabilidad metabólica.

En relación a la validación del blanco molecular, existen diferentes aproximaciones para evidenciar la unión del compuesto **19** a la proteína E. Técnicas como la cristalografía de rayos X, la microscopía crioelectrónica, o la resonancia magnética nuclear por diferencia de transferencia de saturación (STD-RMN) permiten detectar la ubicación específica del ligando en la proteína [246, 247, 248]. Estas técnicas, sin embargo, requieren disponer de la proteína o de partículas tipo-virus (VLPs, por sus siglas en inglés *virus-like particles*). Los experimentos de fotocruzamiento (*photocrosslinking experiments*) se constituyen como una alternativa para la identificación del blanco de unión. Estos experimentos se basan en la conjugación química del ligando con un grupo funcional fotoactivable, capaz de generar un enlace covalente con el sitio de unión cuando es irradiado con luz. La posterior digestión y análisis por espectrometría de masas permite elucidar el sitio de unión de manera específica [126].

En cuanto a la optimización de la estabilidad metabólica, los resultados aquí generados sirven como punto de partida para el desarrollo de nuevos proyectos de investigación, enfocados en la obtención de moléculas con estabilidad favorable sin comprometer el resto de las propiedades. En este sentido, se puede pensar en la generación de series de análogos con modificaciones en el resto 1-(2-aminoetil)piperidina, fragmento con sitios lábiles propensos a sufrir transformaciones metabólicas. La evaluación integrada de la actividad biológica, toxicidad y estabilidad de estos derivados surgen como perspectivas de trabajo a futuro, para lograr la identificación de un candidato adecuado para ser estudiado en ensayos *in vivo*, contribuyendo de esa forma al desarrollo de un medicamento efectivo para el tratamiento de las infecciones por dengue y Zika.

Capítulo 7

Materiales y métodos

7.1. SIMULACIONES COMPUTACIONALES

Simulaciones de acoplamiento molecular

Las simulaciones de acoplamiento molecular fueron realizadas con el *software* AutoDock Vina usando la estructura cristalográfica de la proteína de envoltura de DENV-2 (PDB ID: 1OKE). Se empleó un modelo de receptor rígido y ligando flexible. En primer lugar, se removieron de la estructura original los iones, las moléculas de agua y otras moléculas pequeñas presentes; y se agregaron los átomos de hidrógeno faltantes. Se asignaron cargas positivas a todos los residuos lisina y arginina, y cargas negativas a los residuos aspartato y glutamato. El estado de protonación y la tautomería de los residuos histidina se seleccionaron teniendo en cuenta la red de enlaces de hidrógeno. Se generó una estructura tridimensional minimizada para cada ligando simulado con el programa Chem3D. Las estructuras de la proteína y de los ligandos fueron preparadas con el programa AutoDock Tools. Se asignaron cargas parciales Gasteiger para cada átomo, y las estructuras obtenidas se guardaron en formato PDBQT. Se definió una caja de búsqueda que abarca la región del bolsillo β -OG, centrada en las coordenadas $X = 12.174$, $Y = 79.549$, y $Z = 44.603$; y con dimensiones de 36, 22 y 26 Å para las coordenadas XYZ respectivamente. La exhaustividad de búsqueda se estableció en un valor de 20. Los parámetros restantes fueron usados en su valor por defecto. Las simulaciones de acoplamiento se realizaron en el *cluster* de computadoras Nabucodonosor del Centro de Computación de Alto Desempeño de la Universidad Nacional de Córdoba (CCAD-UNC).

Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con el *software* Amber20 y el paquete de herramientas AmberTools20. Se usaron las estructuras de los complejos ligando-proteína obtenidas a partir de las simulaciones de acoplamiento molecular como configuración inicial del sistema. Los ligandos se parametrizaron con los módulos Antechamber y Parmchk2, incluidos en AmberTools20, usando el campo de fuerzas general de Amber (GAFF). Para la proteína se usó el campo de fuerzas Amberff14SB. El estado de protonación de los residuos ácidos y básicos en las simulaciones a pH fisiológico y ácido, así como los puentes disulfuro presentes en los residuos cisteína, se determinaron usando el servidor PropKa. El complejo fue solvatado en una caja triclínica periódica cuyos bordes se ubicaron a 10 Å del átomo más externo de la proteína, usando el modelo de aguas TIP3P. Se agregaron iones de Na^+ y Cl^- para neutralizar el sistema y emular la concentración salina fisiológica de 0.15 M. Los enlaces de átomos unidos a hidrógeno se restringieron con el algoritmo SHAKE. El valor de corte para interacciones no covalentes se estableció en 10 Å o 12 Å, según el sistema, y las interacciones electrostáticas de largo alcance se evaluaron mediante el método *Particle Mesh Ewald* (PME).

La minimización de energía se realizó en una primera instancia con el algoritmo de descenso de gradiente más pronunciado, y luego se cambió al de gradiente conjugado. El sistema se equilibró en el ensamble NVT durante 200 ps y luego en el ensamble NPT durante 800 ps. Durante los pasos de equilibración, la temperatura se elevó hasta 300 K y luego se mantuvo constante aplicando un termostato Langevin con frecuencia de colisión de 2 ps^{-1} . La presión se fijó en 1 bar y se mantuvo constante aplicando un barostato Berendsen, con una constante de acoplamiento de 1 ps. Finalmente, se obtuvieron las dinámicas de producción de 100 ns de simulación para cada sistema en estudio. Las simulaciones se realizaron en el *cluster* de computadoras Mendieta del Centro de Computación de Alto Desempeño de la Universidad Nacional de Córdoba (CCAD-UNC).

Se utilizó el programa computacional VMD para la visualización de las trayectorias obtenidas. El análisis de simulaciones se realizó con el módulo CPPTRAJ del paquete Amber, con el cual se calcularon los desvíos cuadráticos medios y se detectaron los enlaces existentes entre el ligando y la proteína. La energía libre de unión total, la deconvolución por residuo y las contribuciones energéticas individuales se calcularon a partir del método MM/GBSA utilizando la herramienta MMPBSA.py del paquete Amber. Estos cálculos se realizaron sobre todas las estructuras de la trayectoria, por lo que los valores reportados representan el promedio de la energía libre de unión de todas las estructuras obtenidas en la simulación.

7.2. SÍNTESIS QUÍMICA

Consideraciones generales

Las reacciones químicas que se describen a continuación se llevaron a cabo utilizando equipamiento y material de vidrio de laboratorio de uso general. Todos los reactivos y solventes (incluyendo ácidos, bases, sales, catalizadores y otros compuestos químicos) empleados para las reacciones de síntesis fueron adquiridos comercialmente y usados sin purificación adicional, salvo que se indique lo contrario.

El grado de avance de las reacciones se comprobó mediante cromatografía en capa delgada (CCD) en fase normal. Se utilizaron placas de *silica gel* 60 F₂₅₄ de 0.2 mm de espesor de Merck. Para revelar las placas se usó luz ultravioleta a 254 nm y, en algunos casos, una solución de ninhidrina al 2% en etanol. Las purificaciones de los intermediarios y productos finales se llevaron a cabo mediante cromatografía en capa delgada preparativa, cromatografía en columna o cromatografía *flash*, según el compuesto y la cantidad a purificar. Para la cromatografía en columna se empleó *silica gel* 60 de Merck (0.063 - 0.2 mm), mientras que la cromatografía *flash* se realizó en un sistema Buchi Pure C-810 con cartuchos FlashPure Ecoflex de 4, 12 o 25 g de sílice irregular de 50 µm. En los casos en que se usó cromatografía en capa delgada preparativa, las placas se prepararon sobre vidrio utilizando *silica gel* 60 GF₂₅₄ de Merck.

La caracterización de los productos finales se realizó por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN), de carbono (¹³C-RMN), y por espectroscopía de masas de alta resolución (HRMS). Los intermediarios fueron caracterizados únicamente a partir de sus espectros de ¹H-RMN, salvo que se indique lo contrario. Los espectros de RMN se registraron en los espectrómetros Bruker Avance II de 500 MHz de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Bruker Biospin AVIII600 de 600 MHz de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, y Bruker Avance NEO de 500 MHz del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del CIBION. Para la adquisición de los espectros, los compuestos se disolvieron en solventes deuterados (CDCl₃, CD₃OD o DMSO-*d*₆, según el caso). Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN fueron procesados y analizados con el *software* MestReNova 11.0.3. Los desplazamientos químicos (δ) están reportados en ppm, y las constantes de acoplamiento (J) están reportadas en Hz. Las figuras de los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se adjuntan en el [Anexo III](#).

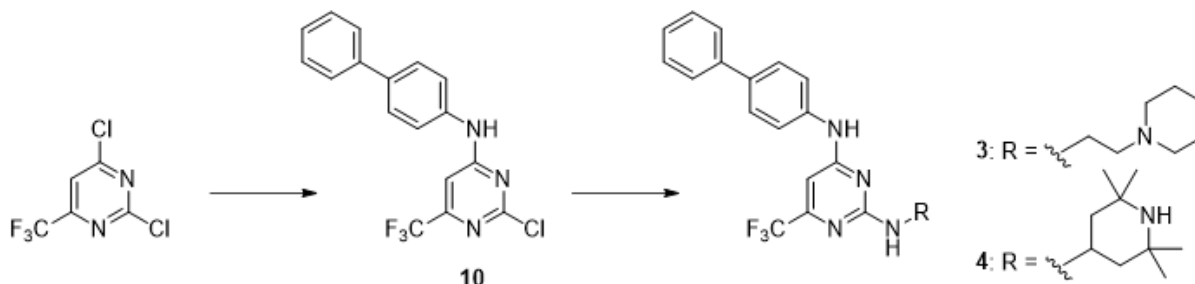
Para el análisis por espectrometría de masas de alta resolución se utilizó un equipo Xevo G2S Q-TOF de Waters, equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI). Las mediciones se hicieron en colaboración con el Laboratorio de Espectroscopía de Masas Bioanalítica del CIBION. El equipo se operó en modo positivo, con un voltaje de 2.5 kV aplicado al capilar de la sonda, y de 30 V en el cono. La temperatura de la fuente y del gas de desolvatación fue de 120 y 300 °C, respectivamente. El flujo del gas de desolvatación utilizado fue de 600 L/h, mientras que el flujo del gas de desolvatación en el cono fue de 10 L/h. El espectrómetro de masas fue calibrado en el intervalo de 50–1200 m/z, utilizando una solución

de formiato de sodio 0.5 mM preparada en una mezcla de isopropanol:agua 90:10. Los datos fueron corregidos durante la adquisición utilizando un compuesto de referencia, empleando la fuente de iones *LockSpray* de Waters. Para la medición de los compuestos se prepararon soluciones 10 mM en DMSO, las cuales fueron diluidas 1:10000 en una mezcla de acetonitrilo:metanol 50:50 de calidad HPLC. Los espectros de masa fueron adquiridos y procesados con el *software* MassLynx 4.1. Para corroborar la identidad de los compuestos se comparó la masa calculada con la señal obtenida, correspondiente al ion $[M+H]^+$ de cada compuesto. En algunos casos, también se logró observar la señal correspondiente al ion $[M+Na]^+$.

La pureza de los productos finales se evaluó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó un equipo Waters Alliance e2695 equipado con una columna Waters XBridge C18, de 150 x 4.6 mm y 3.5 μ m de tamaño de partícula. En todos los casos, la elución de los compuestos se llevó a cabo empleando gradientes de solventes de calidad HPLC. Los solventes usados fueron, en todos los casos, metanol y una solución de ácido fórmico 0.1% en agua ultrapura. En primer lugar, se determinó el programa cromatográfico óptimo para la separación de cada compuesto. Para esto, la detección se realizó con un espectrómetro de masas Waters con analizador de cuadrupolo SQD2 y fuente ESI, lo que habilitó la adquisición del cromatograma correspondiente al ion $[M+H]^+$ de cada compuesto. Se prepararon soluciones de concentración 10 mM de los compuestos, que fueron diluidas a 20 μ M en metanol:agua 50:50 de calidad HPLC. Se usó un caudal de 0.3 mL/min, una temperatura de 35 °C y un volumen de inyección de 5 μ L en todos los casos. El equipo se operó en modo positivo, con un voltaje de 3 kV aplicado al capilar de la sonda, y de 45 V en el cono. La temperatura de la fuente y del gas de desolvatación fue de 150 y 350 °C, respectivamente. El flujo del gas de desolvatación utilizado fue de 600 L/h, y el flujo del gas de desolvatación en el cono fue de 10 L/h. Se evaluaron diferentes métodos y gradientes de solventes, hasta encontrar el más adecuado para cada compuesto. De esta forma, se determinaron los tiempos de retención de cada analito según sus respectivas condiciones cromatográficas.

Una vez definidas las condiciones cromatográficas óptimas de cada analito y sus tiempos de retención, se procedió con el análisis de pureza. Se realizó una dilución 1:7 de las soluciones 10 mM en metanol:agua 50:50 de calidad HPLC, obteniendo concentraciones finales en el rango de 0.5 - 0.7 mg/mL. La detección se realizó con un espectrofotómetro de arreglo de diodos (PDA, por su nombre en inglés *Photodiode Array*) Waters 2998, con lectura de absorbancia a 254 nm. Para todos los programas cromatográficos usados se midieron blancos, que consistieron en diluciones 1:7 de DMSO en metanol:agua 50:50, que fueron tenidos en cuenta al momento del análisis y procesamiento de datos. La cuantificación se realizó por integración de las señales del compuesto de interés y de las impurezas. Para todos los compuestos, se aceptó un porcentaje de pureza mayor o igual al 90% a 254 nm. Aquellos compuestos que no cumplieron con el mínimo de pureza fueron repurificados y analizados nuevamente, hasta alcanzar el porcentaje de pureza requerido.

Síntesis y caracterización de los derivados 3 y 4



- Síntesis de *N*-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-cloro-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**10**)

En un balón se disolvieron 500 μL de 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina (3.7 mmol, 1.8 eq.) junto con 338 mg de 4-aminobifenilo (2.0 mmol, 1.0 eq.) en 3 mL de *n*-butanol. Se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se agregó 1.8 mL de DIPEA (10.3 mmol, 5.1 eq.) con una jeringa. La mezcla se calentó a 110 °C con agitación magnética por 24 h, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida, y se redisolvió en 20 mL de CH_2Cl_2 . Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de ciclohexano y acetato de etilo como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **10** puro con un rendimiento del 26.8% (187 mg). ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 7.68 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.60 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 2H), 7.47 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.42 (br d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.39 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 1.26 (s, 1H) ([Figura A15](#)).

- Síntesis de *N*⁴-([1,1'-bifenil]-4-il)-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**3**)

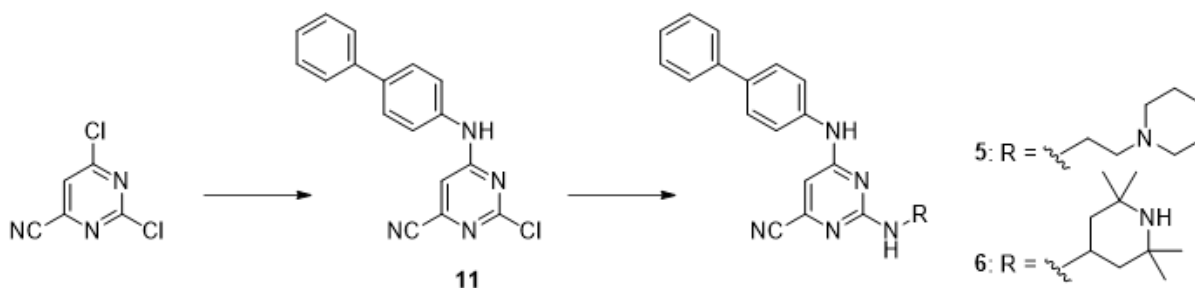
En un vial cerrado a presión se disolvieron 87 mg de **10** (0.25 mmol, 1.0 eq.) en 1 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 72 μL de 1-(2-aminoetil)piperidina (0.50 mmol, 2.0 eq.) y 130 μL de DIPEA (0.75 mmol, 3.0 eq.). La mezcla se calentó durante 1 h a 180 °C con agitación magnética, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida y se redisolvió en 15 mL de CH_2Cl_2 . Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **3** puro con un rendimiento del 29.7% (32.5 mg). ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 7.62 – 7.57 (m, 4H), 7.50 – 7.42 (m, 4H), 7.35 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.79 (s, 1H), 3.58 – 3.51 (m, 2H), 2.58 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.46 (br s, 4H), 1.62 (br s, 4H), 1.46 (br s, 2H) ([Figura A1](#)). ^{13}C -RMN (126 MHz, CDCl_3): δ 162.6, 162.3, 156.4, 140.4, 137.7, 137.5, 129.0, 128.1, 127.4,

127.0, 122.3, 119.9, 57.5, 54.6, 38.4, 25.8, 24.4 ([Figura A2](#)). HRMS (ESI) calculada para $C_{24}H_{27}F_3N_5$ $[M+H]^+$: 442.2219; encontrada: 442.2215. Grado de pureza: 99.1% (programa cromatográfico: isocrático a 60% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 60% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 9.9 min; concentración de la muestra: 0.63 mg/mL; lectura a 254 nm).

- Síntesis de N^4 -([1,1'-bifenil]-4-il)- N^2 -(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-6-(trifluorometil) pirimidin-2,4-diamina (**4**)

En un vial cerrado a presión se disolvieron 87 mg de **10** (0.25 mmol, 1.0 eq.) en 1 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 86 μ L de 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (0.50 mmol, 2.0 eq.) y 130 μ L de DIPEA (0.75 mmol, 3.0 eq.). La mezcla se calentó durante 1 h a 180 °C con agitación magnética, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida y se redisolvió en 15 mL de CH_2Cl_2 . Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **4** puro con un rendimiento del 41.9% (49.2 mg). 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.58 – 7.56 (m, 6H), 7.45 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.38 – 4.34 (m, 1H), 2.04 (dd, J = 12.5, 3.7 Hz, 2H), 1.32 (s, 6H), 1.26 (s, 1H), 1.16 (s, 6H), 1.00 (t, J = 12.2 Hz, 2H) ([Figura A3](#)). ^{13}C -RMN (126 MHz, $CDCl_3$): δ 162.1, 161.9, 155.9, 140.3, 137.5, 128.9, 127.9, 127.3, 126.8, 121.9, 121.7, 91.7, 51.3, 45.4, 44.1, 34.9, 29.7, 28.6 ([Figura A4](#)). HRMS (ESI) calculada para $C_{26}H_{31}F_3N_5$ $[M+H]^+$: 470.2532; encontrada: 470.2526. Grado de pureza: 99.6% (programa cromatográfico: isocrático a 65% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 65% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 9.3 min; concentración de la muestra: 0.67 mg/mL; lectura a 254 nm).

Síntesis y caracterización de los derivados **5** y **6**



- Síntesis de 6-([1,1'-bifenil]-4-il)amino)-2-cloropirimidin-4-carbonitrilo (**11**)

En un balón se disolvieron 100 mg de 2,6-dicloropirimidina-4-carbonitrilo (0.57 mmol, 1.1 eq.) en 2 mL de etanol. Se agregó con una jeringa 200 μ L de DIPEA (1.15 mmol, 2.3 eq.) y se agitó durante 5 minutos en baño de hielo. Luego, se agregaron 84 mg de 4-aminobifenilo (0.50 mmol, 1.0 eq.) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 2 h, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida, y se redisolvió en 15 mL de CH_2Cl_2 . Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **11** puro con un rendimiento del 90.6% (137.9 mg). ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 7.71 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.62 (dd, J = 8.3, 1.2 Hz, 2H), 7.50 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.45 – 7.37 (m, 3H), 6.95 (s, 1H), 1.28 (s, 1H) ([Figura A16](#)).

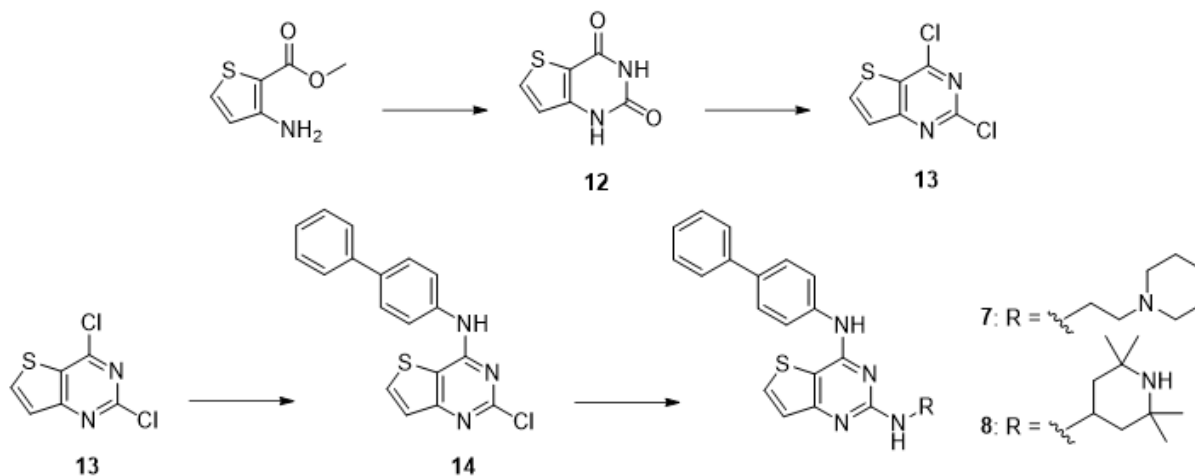
- Síntesis de 6-([1,1'-bifenil]-4-il)amino)-2-((2-(piperidin-1-il)etil)amino)pirimidin-4-carbonitrilo (**5**)

En un vial cerrado a presión se disolvieron 65 mg de **11** (0.21 mmol, 1.0 eq.) en 2 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 130 μ L de DIPEA (0.75 mmol, 3.6 eq.) y 70 μ L de 1-(2-aminoetil)piperidina (0.49 mmol, 2.3 eq.). La mezcla se calentó durante 2 h a 160 °C con agitación magnética, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida y se redisolvió en 15 mL de CH_2Cl_2 . Se lavó secuencialmente con 3 x 5 mL de agua destilada y 3 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **5** puro con un rendimiento del 18.2% (15.2 mg). ^1H -RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.86 – 9.78 (m, 1H), 7.83 (br s, 2H), 7.65 – 7.61 (m, 4H), 7.45 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.33 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 6.49 – 6.43 (m, 1H), 3.16 (s, 2H), 2.42 (m, 6H, señal superpuesta con la señal del solvente), 1.50 (s, 4H), 1.38 (s, 2H) ([Figura A5](#)). ^{13}C -RMN (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 162.3, 161.0, 159.5, 140.1, 139.3, 134.8, 129.4, 127.5, 127.3, 126.6, 120.8, 86.5, 57.8, 54.5, 49.1, 25.9, 24.3 ([Figura A6](#)). HRMS (ESI) calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 399.2297; encontrada: 399.2304. Calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 421.2117; encontrada: 421.2120. Grado de pureza: 94.9% (programa cromatográfico: isocrático a 55% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 55% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 9.6 min; concentración de la muestra: 0.57 mg/mL; lectura a 254 nm).

- Síntesis de 6-([1,1'-bifenil]-4-il)amino)-2-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)pirimidin-4-carbonitrilo (**6**)

En un vial cerrado a presión se disolvieron 67.5 mg de **11** (0.22 mmol, 1.0 eq.) en 2 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 130 μ L de DIPEA (0.75 mmol, 3.4 eq.) y 86 μ L de 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (0.50 mmol, 2.3 eq.). La mezcla se calentó durante 1 h a 180 °C con agitación magnética, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida y se redisolvió en 15 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 3 x 5 mL de agua destilada y 3 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **6** puro con un rendimiento del 18.0% (16.9 mg). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.08 – 9.98 (m, 1H), 7.97 – 7.78 (m, 2H), 7.64 – 7.55 (m, 4H), 7.46 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.59 – 6.53 (m, 1H), 4.35 – 4.23 (m, 1H), 4.14 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 1.99 – 1.90 (m, 2H), 1.51 – 1.30 (m, 12H), 1.08 – 1.04 (m, 1H) ([Figura A7](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 162.4, 161.3, 160.7, 139.7, 138.9, 134.5, 129.0, 127.1, 126.9, 126.2, 120.4, 116.9, 101.2, 79.2, 69.8, 63.1, 48.6, 41.7, 30.5 ([Figura A8](#)). HRMS (ESI) calculada para C₂₆H₃₁N₆ [M+H]⁺: 427.2610; encontrada: 427.2609. Grado de pureza: 95.3% (programa cromatográfico: isocrático a 60% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 60% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 9.6 min; concentración de la muestra: 0.61 mg/mL; lectura a 254 nm).

Síntesis y caracterización de los derivados **7** y **8**



- Síntesis de tieno[3,2-*d*]pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (**12**)

En un balón se colocó 1.0 g de 3-aminotiofen-2-carboxilato de metilo (6.4 mmol, 1.0 eq.) y 1.9 g de urea (31.2 mmol, 4.9 eq.). La mezcla se calentó a 190 °C durante 1.5 h. Ambos reactivos se fundieron a la temperatura de reacción, y el producto apareció como un sólido blanco. Tras enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió sobre 25 mL de una solución 1 M de NaOH y se filtró para eliminar el material insoluble. Se neutralizó con 15 mL de una solución 1 M de HCl, se recogió el precipitado formado por filtración y se lavó con agua destilada (3 x 10 mL). Se obtuvo el compuesto **12** con un rendimiento del 42.2% (450 mg). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,59 (s, 1H), 11,23 (s, 1H), 8,05 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 6,92 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H) ([Figura A17](#)).

- Síntesis de 2,4-diclorotieno[3,2-*d*]pirimidina (**13**)

En un balón se colocaron 400 mg de **12** (2.7 mmol) junto con 10 mL de oxiclورو de fósforo y cantidades catalíticas de DMF (0.2 mL). Se calentó a reflujo (aproximadamente 120 °C) con agitación magnética durante 24 h, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se destiló el excedente de POCl₃, y el residuo se vertió sobre agua con hielo. Se filtró el precipitado formado, y se redisolvió en 10 mL de acetato de etilo. Se añadió 10 mL de una solución 1 M de NaOH y se agitó durante 10 minutos. La fase orgánica se separó y se lavó con 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. Se obtuvo el compuesto **13** con un rendimiento del 46,0 % (225 mg). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,70 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 7,73 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H) ([Figura A18](#)).

- Síntesis de *N*-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-clorotieno[3,2-*d*]pirimidin-4-amina (**14**)

En un balón se disolvieron 200 mg de **13** (0.98 mmol, 1.2 eq.) junto con 135 mg de 4-aminobifenilo (0.80 mmol, 1.0 eq.) en 3 mL de *n*-butanol. Se agregaron 200 µL de DIPEA (1.15 mmol, 1.4 eq.) con una jeringa y se calentó a reflujo (aproximadamente 120 °C) con agitación magnética durante 24 h, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida, y se redisolvió en 15 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 3 x 5 mL de agua destilada y 3 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de ciclohexano y acetato de etilo como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **14** puro con un rendimiento del 66.2% (179 mg). ¹H-RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.25 (s, 1H), 8.31 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.74 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.48 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H) ([Figura A19](#)).

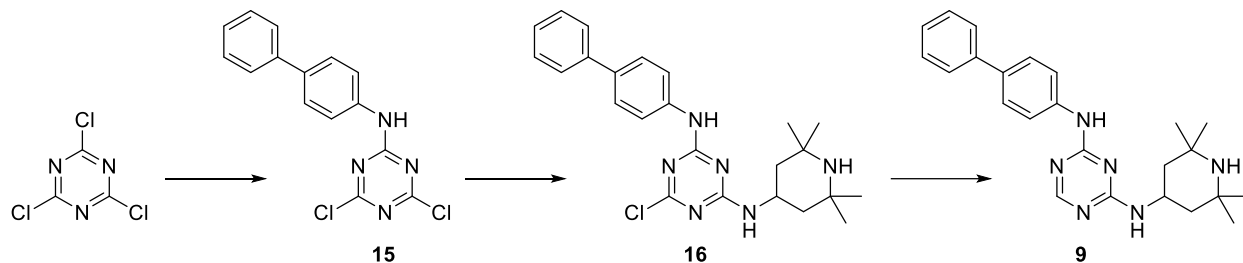
- Síntesis de *N*⁴-([1,1'-bifenil]-4-il)-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)tieno[3,2-*d*]pirimidin-2,4-diamina (**7**)

En un vial cerrado a presión se disolvieron 85 mg de **14** (0.25 mmol, 1.0 eq.) en 2 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 130 µL de DIPEA (0.75 mmol, 3.0 eq.) y 72 µL de 1-(2-aminoetil)piperidina (0.50 mmol, 2.0 eq.). La mezcla se calentó durante 24 h a 180 °C con agitación magnética, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida y se redisolvió en 15 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 3 x 5 mL de agua destilada y 3 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **7** puro con un rendimiento del 77.6% (83 mg). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.46 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.70 – 7.62 (m, 4H), 7.46 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 3.60 – 3.58 (m, 2H, señal superpuesta con la señal del solvente), 3.17 (s, 2H), 2.96 (br s, 4H), 1.65 (br s, 4H), 1.46 (br s, 2H) ([Figura A9](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 160.8, 155.6, 140.3, 139.8, 134.8, 133.9, 129.4, 127.4, 127.0, 126.6, 123.6, 122.2, 53.5, 49.1, 19.2 ([Figura A10](#)). HRMS (ESI) calculada para C₂₅H₂₈N₅S [M+H]⁺: 430.2060; encontrada: 430.2076. Grado de pureza: 94.0% (programa cromatográfico: isocrático a 40% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 40% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 7.1 min; concentración de la muestra: 0.61 mg/mL; lectura a 254 nm).

- Síntesis de *N*⁴-([1,1'-bifenil]-4-il)-*N*²-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)tieno[3,2-*d*]pirimidin-2,4-diamina (**8**)

En un vial cerrado a presión se disolvieron 85 mg de **14** (0.25 mmol, 1.0 eq.) en 2 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 130 µL de DIPEA (0.75 mmol, 3.0 eq.) y 86 µL de 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (0.50 mmol, 2.0 eq.). La mezcla se calentó durante 24 h a 180 °C con agitación magnética, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida, y se redisolvió en 15 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 3 x 5 mL de agua destilada y 3 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **8** puro con un rendimiento del 46.1% (53 mg). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.43 (br s, 2H), 8.01 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.94 (br s, 2H), 7.73 – 7.55 (m, 4H), 7.47 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.34 (dq, *J* = 12.3, 4.4 Hz, 1H), 1.98 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H), 1.53 (t, *J* = 12.6 Hz, 2H), 1.48 – 1.40 (m, 12H) ([Figura A11](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 155.2, 139.9, 139.3, 129.0, 127.0, 126.5, 126.1, 121.8, 56.6, 54.9, 41.3, 29.9, 24.4 ([Figura A12](#)). HRMS (ESI) calculada para C₂₇H₃₂N₅S [M+H]⁺: 458.2373; encontrada: 458.2386. Grado de pureza: 98.4% (programa cromatográfico: isocrático a 45% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 45% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 8.8 min; concentración de la muestra: 0.65 mg/mL; lectura a 254 nm).

Síntesis y caracterización del derivado 9



- Síntesis de *N*-([1,1'-bifenil]-4-il)-4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-amina (**15**)

Una mezcla de 185 mg de cloruro cianúrico (1.0 mmol, 1.0 eq.) y 120 mg de carbonato de sodio (1.1 mmol, 1.1 eq.) disueltos en 5 mL de acetona se colocó en un balón y se enfrió en baño de hielo. Se agregaron 170 mg de 4-aminobifenilo (1.0 mmol, 1.0 eq.) y se dejó reaccionar con agitación a 0 °C por 2 h y luego a temperatura ambiente por 48 h. Se evaporó el solvente a presión reducida, y el crudo se redisolvió en 20 mL de CH₂Cl₂. Se lavó con 4 x 5 mL de agua destilada, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de ciclohexano y acetato de etilo como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **15** puro con un rendimiento del 74.1% (235 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.66 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.59 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 2H), 7.47 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.41 – 7.34 (m, 3H), 7.27 (br s, 1H) ([Figura A20](#)).

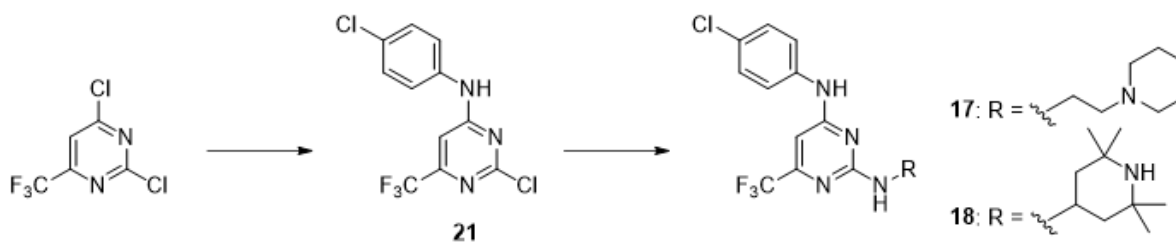
- Síntesis de *N*²-([1,1'-bifenil]-4-il)-6-cloro-*N*⁴-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-1,3,5-triazin-2,4-diamina (**16**)

Una mezcla de 135 mg de **15** (0.43 mmol, 1.0 eq.), 88 mg de carbonato de potasio (0.64 mmol, 1.5 eq.) y 110 µL de 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (0.64 mmol, 1.5 eq.) disueltos en 5 mL de acetona se colocó en un balón y se calentó durante 48 h a 80 °C con agitación magnética. Pasado ese tiempo, se evaporó el solvente a presión reducida y el crudo se redisolvió en 15 mL de CH₂Cl₂. Se lavó con 4 x 5 mL de agua destilada, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **16** puro con un rendimiento del 82.2% (154 mg). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.21 (s, 1H), 8.22 (br d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.69 - 7.50 (m, 4H), 7.45 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.30 (dq, *J* = 12.4, 4.4 Hz, 1H), 1.80 (dd, *J* = 12.4, 3.6 Hz, 2H), 1.37 - 0.97 (m, 15H) ([Figura A21](#)).

- Síntesis de *N*²-([1,1'-bifenil]-4-il)-*N*⁴-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-1,3,5-triazin-2,4-diamina (**9**)

Se preparó una suspensión de 20 mg de **16** (0.05 mmol, 1.0 eq.) y 3 mg de Pd/C (10% m/m) en 0.5 mL de metanol. Se agregaron 9 mg de formiato de amonio (0.15 mmol, 3.0 eq.) y se calentó a reflujo por 2 h, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se filtró la mezcla a través de un lecho de celite y se evaporó el solvente a presión reducida. El crudo se particionó en 5 mL de agua destilada y 5 mL de acetato de etilo. Se separó la fase orgánica y se lavó con 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en capa delgada preparativa, utilizando una mezcla de diclorometano:metanol 80:20 como solvente de elución. Se obtuvo el compuesto **9** puro con un rendimiento del 48.9% (9 mg). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.28 – 9.14 (m, 1H), 8.30 – 8.20 (m, 1H), 8.07 – 7.95 (m, 1H), 7.90 – 7.78 (m, 2H), 7.63 – 7.54 (m, 4H), 7.46 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.43 – 4.29 (m, 1H), 2.07 – 1.93 (m, 2H), 1.60 – 1.39 (m, 13H), 1.29 – 1.19 (m, 2H) ([Figura A13](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.2, 165.2, 164.1, 140.2, 139.0, 135.1, 129.4, 127.5, 127.1, 126.7, 120.7, 49.1, 44.0, 43.7, 34.4, 28.7 ([Figura A14](#)). HRMS (ESI) calculada para C₂₄H₃₁N₆ [M+H]⁺: 403.2610; encontrada: 403.2616. Grado de pureza: 99.1% (programa cromatográfico: isocrático a 55% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 55% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 8.9 min; concentración de la muestra: 0.58 mg/mL; lectura a 254 nm).

Síntesis y caracterización de los derivados **17** y **18**



- Síntesis de 2-cloro-*N*-(4-clorofenil)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**21**)

En un balón se colocaron 500 µL de 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina (3.7 mmol, 1.2 eq.) junto con 383 mg de 4-cloroanilina (3.0 mmol, 1.0 eq.) y se disolvió en 3 mL de etanol. Se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, y luego se agregó 1.05 mL de DIPEA (6.0 mmol, 2.0 eq.) con una jeringa. Se calentó a reflujo con agitación magnética durante 24 h, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida, y se redisolvió en 20 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de ciclohexano y acetato de etilo como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **21** puro con un rendimiento del 28.5% (263 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.45 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.81 (s, 1H), 1.28 (s, 1H) ([Figura A30](#)).

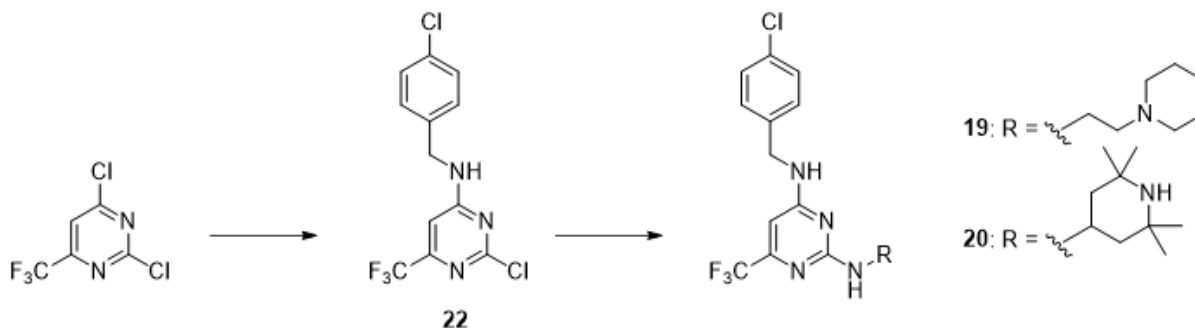
- Síntesis de *N*⁴-(4-clorofenil)-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**17**)

En un vial cerrado a presión se disolvieron 77 mg de **21** (0.25 mmol, 1.0 eq.) en 1 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 72 µL de 1-(2-aminoetil)piperidina (0.50 mmol, 2.0 eq.) y 130 µL de DIPEA (0.75 mmol, 3.0 eq.). La mezcla se calentó durante 1 h a 180 °C con agitación magnética, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida y se redisolvió en 15 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **17** puro con un rendimiento del 25.9% (25.9 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.10 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.88 (s, 1H), 3.54 (s, 2H), 2.62 (br s, 2H), 2.51 (br s, 4H), 1.64 (s, 4H), 1.47 (br t, *J* = 6.0 Hz, 2H) ([Figura A22](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 162.3, 162.0, 136.8, 129.6, 129.3, 123.1, 121.9, 119.7, 57.3, 54.3, 38.0, 29.7, 25.3, 24.0 ([Figura A23](#)). HRMS (ESI) calculada para C₁₈H₂₂ClF₃N₅ [M+H]⁺: 400.1516; encontrada: 400.1527. Grado de pureza: 97.0% (programa cromatográfico: isocrático a 55% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 55% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 8.0 min; concentración de la muestra: 0.57 mg/mL; lectura a 254 nm).

- Síntesis de *N*⁴-(4-clorofenil)-*N*²-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**18**)

En un vial cerrado a presión se disolvieron 77 mg de **21** (0.25 mmol, 1.0 eq.) en 1 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 86 µL de 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (0.50 mmol, 2.0 eq.) y 130 µL de DIPEA (0.75 mmol, 3.0 eq.). La mezcla se calentó durante 1 h a 180 °C con agitación magnética, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida, y se redisolvió en 15 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **18** puro con un rendimiento del 42.8% (45.8 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.46 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.86 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 5.07 (br s, 1H), 4.32 (br s, 1H), 2.00 (dd, *J* = 12.7, 3.7 Hz, 2H), 1.36 (s, 6H), 1.25 (br s, 7H), 1.14 (br s, 2H) ([Figura A24](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 161.9, 161.7, 156.2, 136.9, 129.2, 122.7, 119.6, 44.7, 43.8, 34.1, 29.7, 28.1 ([Figura A25](#)). HRMS (ESI) calculada para C₂₀H₂₆ClF₃N₅ [M+H]⁺: 428.1829; encontrada: 428.1837. Grado de pureza: 98.8% (programa cromatográfico: isocrático a 60% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 60% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 8.6 min; concentración de la muestra: 0.61 mg/mL; lectura a 254 nm).

Síntesis y caracterización de los derivados **19** y **20**



- Síntesis de 2-cloro-N-(4-clorobencil)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**22**)

Se preparó una solución disolviendo 500 μL de 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina (3.7 mmol, 1.0 eq.) en 10 mL de etanol en un balón. Se enfrió en baño de hielo, y se agregó secuencialmente con una jeringa 1.4 mL de DIPEA (8.0 mmol, 2.2 eq.) y 450 μL de 4-clorobencilamina (3.7 mmol, 1.0 eq.). Se dejó reaccionar con agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego a reflujo por 1 h, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida y se redisolvió en 15 mL de CH_2Cl_2 . Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de solución saturada de NaHCO_3 y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía *flash*, usando mezclas de ciclohexano y acetato de etilo como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **22** puro con un rendimiento del 52.5% (625 mg). ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3): δ 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.26 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.59 (s, 1H), 5.56 (br s, 1H), 4.82 – 4.36 (m, 2H) ([Figura A31](#)).

- Síntesis de *N*⁴-(4-clorobencil)-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**19**)

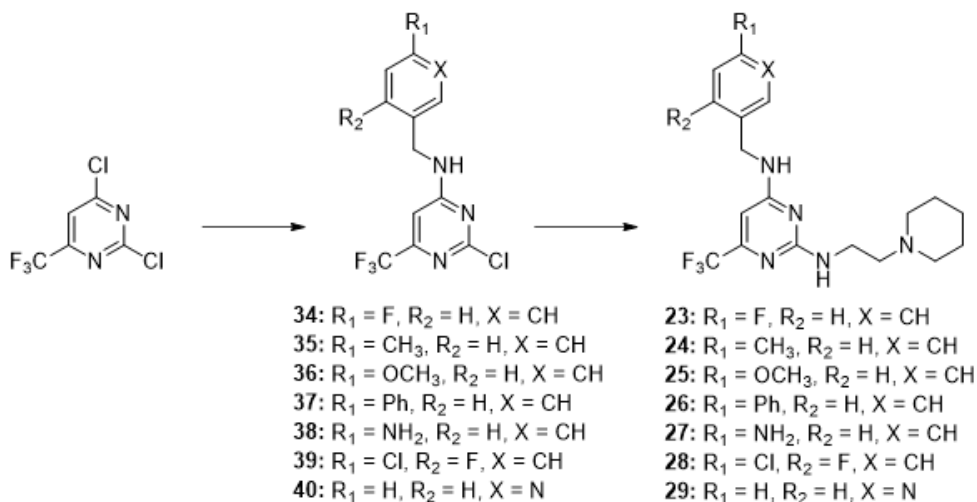
En un vial cerrado a presión se disolvieron 196 mg de **22** (0.61 mmol, 1.0 eq.) en 2 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 350 μL de DIPEA (2.01 mmol, 3.3 eq.) y 200 μL de 1-(2-aminoetil)piperidina (1.40 mmol, 2.3 eq.). La mezcla se calentó durante 3 h a 170 °C con agitación magnética, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida y se redisolvió en 15 mL de CH_2Cl_2 . Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **19** puro con un rendimiento del 50.5% (127 mg). ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3): δ 7.30 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.24 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.03 (s, 1H), 5.72 (s, 1H), 5.41 (br s, 1H), 4.55 (s, 2H), 3.53 (s, 2H), 2.53 (br s, 6H), 1.66 (s, 4H), 1.47 (s, 2H) ([Figura A26](#)). ^{13}C -RMN (151 MHz, CDCl_3): δ 163.6,

162.3, 155.2, 133.3, 129.4, 128.8, 121.9, 120.1, 57.3, 54.3, 44.3, 37.8, 25.1, 23.8 ([Figura A27](#)). HRMS (ESI) calculada para $C_{19}H_{24}ClF_3N_5$ $[M+H]^+$: 414.1672; encontrada: 414.1696. Grado de pureza: 99.2% (programa cromatográfico: isocrático a 50% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 50% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 10.8 min; concentración de la muestra: 0.59 mg/mL; lectura a 254 nm).

- Síntesis de *N*⁴-(4-clorobencil)-*N*²-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-6-(trifluorometil) pirimidin-2,4-diamina (**20**)

En un vial cerrado a presión se disolvieron 197 mg de **22** (0.61 mmol, 1.0 eq.) en 2 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 350 μ L de DIPEA (2.01 mmol, 3.3 eq.) y 225 μ L de 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (1.32 mmol, 2.2 eq.). La mezcla se calentó durante 1 h a 170 °C con agitación magnética, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida y se redisolvió en 15 mL de CH_2Cl_2 . Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **20** puro con un rendimiento del 41.5% (112 mg). ¹H-RMN (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.02 (s, 1H), 5.21 (br s, 1H), 4.93 (br s, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.23 (s, 1H), 1.96 (d, *J* = 10.8 Hz, 2H), 1.28 – 0.88 (m, 13H), 0.94 (t, *J* = 12.2 Hz, 2H) ([Figura A28](#)). ¹³C-RMN (151 MHz, $CDCl_3$): δ 163.7, 162.0, 137.0, 133.5, 129.0, 128.8, 122.0, 120.1, 51.5, 45.35, 44.18, 34.90, 28.46 ([Figura A29](#)). HRMS (ESI) calculada para $C_{21}H_{28}ClF_3N_5$ $[M+H]^+$: 442.1985; encontrada: 442.1976. Grado de pureza: 99.2% (programa cromatográfico: isocrático a 60% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 60% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 7.1 min; concentración de la muestra: 0.63 mg/mL; lectura a 254 nm).

Síntesis y caracterización de los derivados **23** a **29**



Procedimiento general de síntesis de los intermediarios **34** a **40**

En un balón se preparó una solución disolviendo 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina (1.0 eq.) en etanol, y se enfrió en baño de hielo. Se agregó TEA o DIPEA (1.5 eq.) con una jeringa y, a continuación, la bencilamina correspondiente (1.0 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente o con calentamiento hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida, y el crudo se redisolvió en 10 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de solución saturada de NaHCO₃ y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía *flash*, usando mezclas de ciclohexano y acetato de etilo como solventes de elución para los compuestos **34** a **39**, y mezclas de diclorometano y metanol para **40**.

- Síntesis de 2-cloro-N-(4-fluorobencil)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**34**)

Se llevó a cabo la reacción entre 4-fluorobencilamina (231 mg, 1.85 mmol) y 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina en 5 mL de etanol en presencia de DIPEA. La mezcla se calentó a reflujo durante 3 h, lo que habilitó la obtención del intermediario **34** con un rendimiento del 45.6% (258 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.30 (m, 2H), 7.07 (m, 2H), 6.58 (s, 1H), 5.53 (br s, 1H), 4.83 – 4.39 (m, 2H) ([Figura A56](#)).

- Síntesis de 2-cloro-N-(4-metilbencil)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**35**)

Se llevó a cabo la reacción entre 4-metilbencilamina (225 mg, 1.86 mmol) y 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina en 5 mL de etanol en presencia de DIPEA. La mezcla se calentó a reflujo durante 1 h, lo que habilitó la obtención del intermediario **35** con un rendimiento del 59.7% (335 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.25 – 7.13 (m, 4H), 6.57 (s, 1H), 5.47 (br s, 1H), 5.01 – 4.29 (m, 2H), 2.36 (s, 3H) ([Figura A57](#)).

- Síntesis de 2-cloro-N-(4-metoxibencil)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**36**)

Se llevó a cabo la reacción entre 4-metoxibencilamina (200 mg, 1.46 mmol) y 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina en 3 mL de etanol en presencia de TEA. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1.5 h, lo que habilitó la obtención del intermediario **36** con un rendimiento del 41.7% (193 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.24 (m, 2H, señal superpuesta con la señal del solvente), 6.90 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.56 (s, 1H), 5.49 (br s, 1H), 4.84 – 4.35 (m, 2H), 3.81 (s, 3H) ([Figura A58](#)).

- Síntesis de *N*-([1,1'-bifenil]-4-il)metil)-2-cloro-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**37**) y *N*-([1,1'-bifenil]-4-il)metil)-4-cloro-6-(trifluorometil)pirimidin-2-amina (**37b**)

Se llevó a cabo la reacción entre 4-fenilbencilamina (268 mg, 1.46 mmol) y 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina en 3 mL de etanol en presencia de TEA. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1.5 h, lo que habilitó la obtención del intermediario **37** con un rendimiento del 73.7% (392 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.67 – 7.55 (m, 4H), 7.45 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.42 – 7.34 (m, 3H), 6.60 (s, 1H), 5.54 (br s, 1H), 4.87 – 4.46 (m, 2H) ([Figura A59](#)). Adicionalmente, se obtuvo el subproducto **37b** con un rendimiento del 10.7% (57 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.58 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 4H), 7.47 - 7.40 (m, 4H), 7.38 – 7.32 (m, 1H), 6.90 (s, 1H), 5.87 (s, 2H), 4.70 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H) ([Figura A60](#)).

- Síntesis de *N*-(4-aminobencil)-2-cloro-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**38**)

Se llevó a cabo la reacción entre 4-aminobencilamina (183 mg, 1.50 mmol) y 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina en 3 mL de etanol en presencia de TEA. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1.5 h, lo que habilitó la obtención del intermediario **38** con un rendimiento del 41.8% (190 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.79 – 6.65 (m, 3H), 4.47 (s, 2H) ([Figura A61](#)).

- Síntesis de 2-cloro-*N*-(4-cloro-2-fluorobencil)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**39**)

Se llevó a cabo la reacción entre 4-cloro-2-fluorobencilamina (241 mg, 1.51 mmol) y 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina en 3 mL de etanol en presencia de TEA. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1.5 h, lo que habilitó la obtención del intermediario **39** con un rendimiento del 65.2% (335 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.37 (br s, 1H), 7.26 – 7.04 (m, 2H), 6.61 (s, 1H), 5.69 (br s, 1H), 4.95 – 4.35 (m, 2H) ([Figura A62](#)).

- Síntesis de 2-cloro-*N*-((piridin-3-il)metil)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**40**)

Se llevó a cabo la reacción entre 3-picolilamina (202 mg, 1.87 mmol) y 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina en 5 mL de etanol en presencia de DIPEA. La mezcla se calentó a reflujo durante 1 h, lo que habilitó la obtención del intermediario **40** con un rendimiento del 60.6% (327 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 8.62 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.77 (br s, 1H), 7.35 (dd, *J* = 7.9, 4.9 Hz, 1H), 6.67 (br s, 1H), 6.58 (br s, 1H), 4.80 – 4.52 (m, 2H) ([Figura A63](#)).

Procedimiento general de síntesis de los productos **23** a **29**

En un vial cerrado a presión se preparó una solución del intermediario correspondiente (**34** a **40**) en *n*-butanol, a la cual se le agregó secuencialmente con una jeringa TEA o DIPEA (3.0 eq.) y 1-(2-aminoetil)piperidina (2.0 eq.). La mezcla se agitó con calentamiento hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida, y el crudo se redisolvió en 10 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de solución saturada de NaHCO₃ y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de la reacción se purificó por cromatografía *flash*, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución para la obtención de los compuestos **23** a **29**.

- Síntesis de *N*⁴-(4-fluorobencil)-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**23**)

Se llevó a cabo la reacción entre el intermediario **34** (189 mg, 0.62 mmol) y 1-(2-aminoetil)piperidina en 1.5 mL de *n*-butanol, en presencia de DIPEA. La mezcla se calentó a 180 °C durante 4 h, lo que habilitó la obtención del producto **23** con un rendimiento del 54.1% (133 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.36 – 7.21 (m, 2H), 7.13 – 6.96 (m, 2H), 6.00 (s, 1H), 5.65 (s, 1H), 5.18 (br s, 1H), 4.55 (s, 2H), 3.49 (s, 2H), 2.70 – 2.23 (m, 6H), 1.61 (s, 4H), 1.45 (s, 2H) ([Figura A32](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 163.2, 162.6, 161.5, 129.4, 129.3, 122.0, 120.2, 115.8, 115.7, 57.7, 54.5, 44.5, 38.3, 25.9, 24.5 ([Figura A33](#)). HRMS (ESI) calculada para C₁₉H₂₄F₄N₅ [M+H]⁺: 398.1968; encontrada: 398.1967. Grado de pureza: 99.0% (programa cromatográfico: isocrático a 50% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 50% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 7.7 min; concentración de la muestra: 0.57 mg/mL; lectura a 254 nm).

- Síntesis de *N*⁴-(4-metilbencil)-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**24**)

Se llevó a cabo la reacción entre el intermediario **35** (200 mg, 0.66 mmol) y 1-(2-aminoetil)piperidina en 1.5 mL de *n*-butanol, en presencia de DIPEA. La mezcla se calentó a 180 °C durante 24 h, lo que habilitó la obtención del producto **24** con un rendimiento del 64.4% (168 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.19 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.01 (s, 1H), 5.65 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 5.29 (br s, 1H), 4.52 (s, 2H), 3.51 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.69 – 2.39 (m, 6H), 2.34 (s, 3H), 1.67 – 1.55 (m, 4H), 1.44 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H) ([Figura A34](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 162.4, 137.3, 129.6, 129.4, 127.5, 122.1, 119.9, 114.5, 57.5, 54.4, 38.0, 25.5, 24.1, 21.1 ([Figura A35](#)). HRMS (ESI) calculada para C₂₀H₂₇F₃N₅ [M+H]⁺: 394.2218; encontrada: 394.2227. Grado de pureza: 96.0% (programa cromatográfico: isocrático a 55% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 55% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 7.1 min; concentración de la muestra: 0.56 mg/mL; lectura a 254 nm).

- Síntesis de *N*⁴-(4-metoxibencil)-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**25**)

Se llevó a cabo la reacción entre el intermediario **36** (180 mg, 0.57 mmol) y 1-(2-aminoetil)piperidina en 1.5 mL de *n*-butanol, en presencia de TEA. La mezcla se calentó a 170 °C durante 20 h, lo que habilitó la obtención del producto **25** con un rendimiento del 49.1% (118 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.01 (s, 1H), 5.67 (s, 1H), 5.18 (br s, 1H), 4.49 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.56 (s, 2H), 2.77 – 2.37 (m, 6H), 1.66 (s, 4H), 1.47 (s, 2H) ([Figura A36](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 162.3, 159.1, 128.9, 124.3, 122.1, 119.9, 114.1, 111.9, 57.3, 55.3, 54.3, 37.7, 34.9, 24.9, 23.4 ([Figura A37](#)). HRMS (ESI) calculada para C₂₀H₂₇F₃N₅O [M+H]⁺: 410.2167; encontrada: 410.2169. Calculada para C₂₀H₂₆F₃N₅ONa [M+Na]⁺: 432.1987; encontrada: 432.1991. Grado de pureza: 99.1% (programa cromatográfico: isocrático a 50% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 50% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 7.3 min; concentración de la muestra: 0.59 mg/mL; lectura a 254 nm).

- Síntesis de *N*⁴-([1,1'-bifenil]-4-il)metil)-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**26**)

Se llevó a cabo la reacción entre el intermediario **37** (109 mg, 0.30 mmol) y 1-(2-aminoetil)piperidina en 1 mL de *n*-butanol, en presencia de TEA. La mezcla se calentó a 165 °C durante 24 h, lo que habilitó la obtención del producto **26** con un rendimiento del 73.2% (100 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.57 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H), 7.44 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.41 – 7.32 (m, 3H), 6.06 (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.33 (br s, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.56 (s, 2H), 2.99 – 2.29 (m, 6H), 1.65 (s, 4H), 1.45 (s, 2H) ([Figura A38](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 163.5, 162.4, 140.6, 137.2, 128.8, 127.9, 127.5, 127.4, 127.0, 122.1, 119.9, 91.6, 57.4, 54.4, 44.8, 37.9, 29.7, 25.2, 23.9 ([Figura A39](#)). HRMS (ESI) calculada para C₂₅H₂₉F₃N₅ [M+H]⁺: 456.2375; encontrada: 456.2369. Calculada para C₂₅H₂₈F₃N₅Na [M+Na]⁺: 478.2195; encontrada: 478.2183. Grado de pureza: 99.1% (programa cromatográfico: isocrático a 60% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 60% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 8.3 min; concentración de la muestra: 0.65 mg/mL; lectura a 254 nm).

- Síntesis de *N*²-([1,1'-bifenil]-4-il)metil)-*N*⁴-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**26b**)

Se llevó a cabo la reacción entre el intermediario **37b** (30 mg, 0.08 mmol) y 1-(2-aminoetil)piperidina en 0.5 mL de *n*-butanol, en presencia de TEA. La mezcla se calentó a 165 °C durante 24 h, lo que habilitó la obtención del producto **26b** con un rendimiento del 79.3% (30 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.61 – 7.52 (m, 4H), 7.48 – 7.38 (m, 4H), 7.38 – 7.30 (m, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.94 (br s, 1H), 5.47 (br s, 1H), 4.65 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.81 – 3.23 (m, 2H), 2.63 – 2.33 (m, 6H), 1.63 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 1.48 – 1.40 (m, 2H) ([Figura A40](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 162.45, 140.80, 140.01, 138.62, 128.78, 127.91, 127.26, 127.19, 127.00, 122.17,

119.99, 92.84, 56.94, 54.31, 45.14, 37.03, 29.71, 25.30, 23.92 ([Figura A41](#)). HRMS (ESI) calculada para $C_{25}H_{29}F_3N_5$ $[M+H]^+$: 456.2375; encontrada: 456.2367. Grado de pureza: 99.2% (programa cromatográfico: isocrático a 60% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 60% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 9.7 min; concentración de la muestra: 0.65 mg/mL; lectura a 254 nm).

- Síntesis de *N*⁴-(4-aminobencil)-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**27**)

Se llevó a cabo la reacción entre el intermediario **38** (127 mg, 0.42 mmol) y 1-(2-aminoetil)piperidina en 1.5 mL de *n*-butanol, en presencia de TEA. La mezcla se calentó a 165 °C durante 24 h, lo que habilitó la obtención del producto **27** con un rendimiento del 34.9% (58 mg). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.83 (m, 1H), 7.16 – 6.74 (m, 3H), 6.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.13 (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 3.36 (br s, 2H, señal superpuesta con la señal del agua del solvente), 2.62 (br s, 6H, señal superpuesta con la señal del solvente), 1.63 – 1.46 (m, 4H), 1.41 (s, 2H) ([Figura A42](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.0, 162.2, 147.6, 128.4, 126.0, 122.2, 120.4, 113.7, 91.1, 56.9, 53.5, 43.1, 37.2, 24.5, 23.1 ([Figura A43](#)). HRMS (ESI) calculada para $C_{19}H_{26}F_3N_6$ $[M+H]^+$: 395.2171; encontrada: 395.2165. Grado de pureza: 97.5% (programa cromatográfico: isocrático a 23% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 23% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 8.5 min; concentración de la muestra: 0.56 mg/mL; lectura a 254 nm).

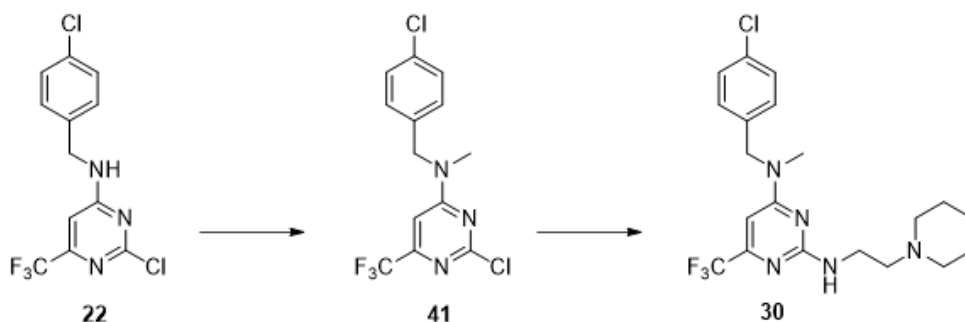
- Síntesis de *N*⁴-(4-cloro-2-fluorobencil)-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**28**)

Se llevó a cabo la reacción entre el intermediario **39** (160 mg, 0.47 mmol) y 1-(2-aminoetil)piperidina en 1.5 mL de *n*-butanol, en presencia de TEA. La mezcla se calentó a 165 °C durante 24 h, lo que habilitó la obtención del producto **28** con un rendimiento del 71.6% (145 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.30 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.01 – 7.16 (m, 2H), 6.02 (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.61 (s, 2H), 3.50 (s, 2H), 2.82 – 2.26 (m, 6H), 1.63 (s, 4H), 1.46 (s, 2H) ([Figura A44](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 162.3, 161.6, 159.7, 134.2, 130.6, 124.6, 124.6, 122.0, 119.8, 116.4, 116.2, 57.4, 54.4, 38.0, 29.7, 25.4, 24.1 ([Figura A45](#)). HRMS (ESI) calculada para $C_{19}H_{23}ClF_4N_5$ $[M+H]^+$: 432.1578; encontrada: 432.1571. Grado de pureza: 99.3% (programa cromatográfico: isocrático a 55% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 55% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 8.2 min; concentración de la muestra: 0.62 mg/mL; lectura a 254 nm).

- Síntesis de *N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-*N*⁴-((piridin-3-il)metil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**29**)

Se llevó a cabo la reacción entre el intermediario **40** (200 mg, 0.69 mmol) y 1-(2-aminoetil)piperidina en 1.5 mL de *n*-butanol, en presencia de DIPEA. La mezcla se calentó a 180 °C durante 24 h, lo que habilitó la obtención del producto **29** con un rendimiento del 16.7% (44 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 8.62 – 8.56 (m, 1H), 8.52 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 7.67 (dt, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 7.30 – 7.26 (m, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.83 (br s, 1H), 5.50 (br s, 1H), 4.62 (s, 2H), 3.62 (br s, 2H), 2.67 (br s, 6H), 1.75 (br s, 4H), 1.51 (s, 2H) (Figura A46). ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 162.4, 149.3, 149.1, 135.5, 123.7, 120.2, 57.4, 54.5, 42.7, 37.5, 29.8, 24.5 (Figura A47). HRMS (ESI) calculada para C₁₈H₂₄F₃N₆ [M+H]⁺: 381.2014; encontrada: 381.2026. Grado de pureza: 92.2% (programa cromatográfico: isocrático a 23% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 23% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 6.7 min; concentración de la muestra: 0.54 mg/mL; lectura a 254 nm).

Síntesis y caracterización del derivado **30**



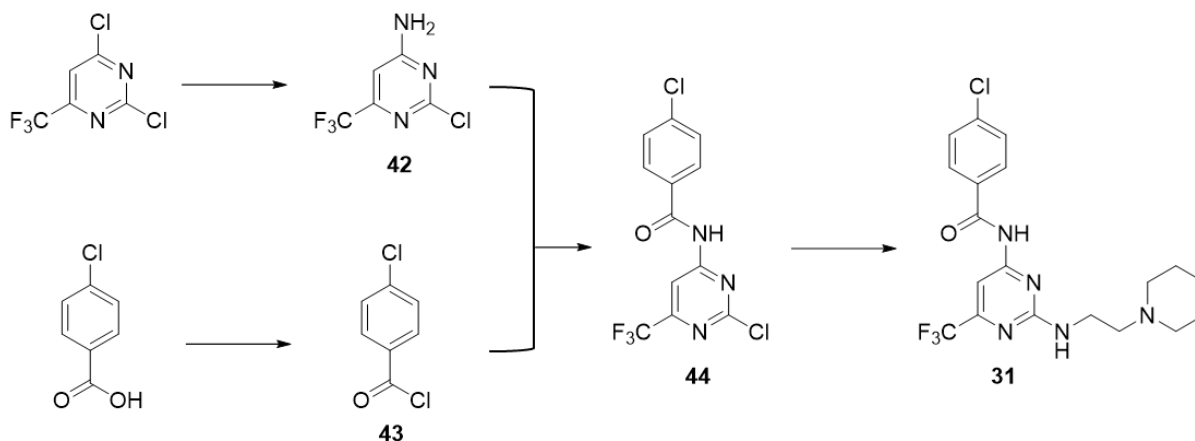
- Síntesis de 2-cloro-*N*-(4-clorobencil)-*N*-metil-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**41**)

En un balón se disolvieron 50 mg del intermediario **22** (0.16 mmol, 1.0 eq.) y 105 mg de carbonato de cesio (0.32 mmol, 2.0 eq.) en 1 mL de DMF seca, y se enfrió en baño de hielo a 0 °C. Bajo atmósfera de nitrógeno, se agregó lentamente 10 µL de CH₃I (0.16 mmol, 1.0 eq.) con una jeringa. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 72 h, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Pasado ese tiempo, se agregaron 10 mL de CH₂Cl₂ y la fase orgánica se lavó con 3 x 5 mL de agua destilada. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de ciclohexano y acetato de etilo como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **41** puro con un rendimiento del 86.4% (45 mg). ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 7.33 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.24 – 7.04 (m, 2H), 6.67 (s, 1H), 5.04 – 4.51 (m, 2H), 3.39 – 2.89 (m, 3H) (Figura A64).

- Síntesis de *N*⁴-(4-clorobencil)-*N*⁴-metil-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**30**)

El compuesto **30** se sintetizó según el procedimiento general usado para la síntesis de los compuestos **23** a **29**. Se llevó a cabo la reacción entre el intermediario **41** (35 mg, 0.10 mmol) y 1-(2-aminoetil)piperidina en 0.5 mL de *n*-butanol, en presencia de DIPEA. La mezcla se calentó a 170 °C durante 3 h, lo que habilitó la obtención del producto **30** con un rendimiento del 47.1% (21 mg). ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.15 (s, 1H), 5.66 (s, 1H), 4.80 (br s, 2H), 3.54 (br s, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.53 (br s, 6H), 1.65 (br s, 4H), 1.47 (s, 2H) (Figura A48). ¹³C-RMN (151 MHz, CDCl₃): δ 163.5, 162.0, 133.2, 129.6, 128.9, 128.6, 122.1, 120.2, 114.6, 57.3, 54.4, 37.9, 35.4, 26.9, 25.1 (Figura A49). HRMS (ESI) calculada para C₂₀H₂₆ClF₃N₅ [M+H]⁺: 428.1829; encontrada: 428.1824. Grado de pureza: 95.6% (programa cromatográfico: isocrático a 60% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 60% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 7.5 min; concentración de la muestra: 0.61 mg/mL; lectura a 254 nm).

Síntesis y caracterización del derivado **31**



- Síntesis de 2-cloro-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**42**)

En un balón se preparó una solución de 1.55 mmol de hidróxido de amonio en 0.5 mL de agua destilada. Se agregaron 335 mg de 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina (1.54 mmol, 1.0 eq.) y se agitó la mezcla durante 3 h a 80 °C, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Luego de enfriar a temperatura ambiente, se extrajo con 3 x 5 mL de acetato de etilo. Se lavó con 3 x 5 mL de agua destilada, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. Se obtuvieron 196 mg de producto, el cual fue usado en el siguiente paso de reacción sin purificación adicional. La identificación del producto se realizó por CCD, en donde se observó un valor de R_f de 0.8 para el reactivo y de 0.4 para el producto, presentando este último una señal con arrastre. Ninguno de los dos compuestos reveló al ser tratado con ninhidrina.

- Síntesis de cloruro de 4-clorobenzoilo (**43**)

En un balón se disolvieron 333 mg de ácido 4-clorobenzoico (2.12 mmol, 1.0 eq.) en 2 mL de CH₂Cl₂ seco, y se enfrió en un baño de hielo a 0 °C. Bajo atmósfera de nitrógeno, se agregó secuencialmente con una jeringa 3 gotas de DMF seca (cantidades catalíticas) y 250 µL de cloruro de oxalilo (2.90 mmol, 1.4 eq.). Se dejó reaccionar con agitación por 1 h a 0 °C, y luego 1 h más a temperatura ambiente, hasta evidenciar reacción completa por CCD (la alícuota tomada del crudo de reacción se disolvió en metanol, lo que permitió observar el metil éster correspondiente). Se evaporó el solvente de reacción a presión reducida, y el producto formado fue usado inmediatamente en el siguiente paso de reacción.

- Síntesis de 4-cloro-*N*-(2-cloro-6-(trifluorometil)pirimidin-4-il)benzamida (**44**)

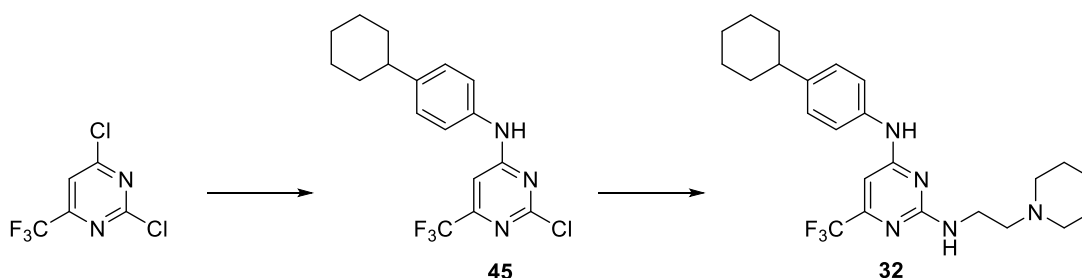
En un balón se disolvieron 190 mg del intermediario **42** (0.96 mmol, 1.0 eq.) en 1 mL de DMF anhidra, y se enfrió en un baño de hielo a 0 °C. En paralelo, se lavaron 48 mg de NaH (2.0 mmol, 2.0 eq.) con éter de petróleo y se suspendieron en 1 mL de DMF anhidra. Bajo atmósfera de nitrógeno, se agregó lentamente esta suspensión en el balón de reacción. Se agitó durante 15 min y luego se agregó cuidadosamente una solución de 175 mg del intermediario **43** (1.0 mmol, 1.0 eq.) en 1 mL de DMF anhidra. La mezcla se agitó bajo atmósfera de nitrógeno durante 1 h a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción volcando el crudo sobre agua/hielo, y el precipitado se redisolvió en 15 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía *flash*, usando mezclas de ciclohexano y acetato de etilo como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **44** puro con un rendimiento del 15.5% (50 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 8.82 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H) ([Figura A65](#)).

- Síntesis de *N*⁴-(4-clorobencil)-*N*⁴-metil-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**31**)

El compuesto **30** se sintetizó según el procedimiento general usado para la síntesis de los compuestos **23** a **29**. Se llevó a cabo la reacción entre el intermediario **41** (45 mg, 0.13 mmol) y 1-(2-aminoetil)piperidina en 0.5 mL de *n*-butanol, en presencia de TEA. La mezcla se calentó a 150 °C durante 24 h. El producto se purificó por cromatografía en capa delgada preparativa, utilizando una mezcla de diclorometano:metanol 90:10 como solvente de elución. Se obtuvo el producto **31** con un rendimiento del 20.4% (13 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 8.20 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 3.73 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.92 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.83 (s, 4H), 1.85 (p, *J* = 5.7 Hz, 4H), 1.58 (s, 2H) ([Figura A50](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 164.8, 160.8, 159.5, 140.4, 130.4, 129.7, 128.9, 120.8, 118.6, 105.1, 56.9, 54.3, 45.1, 29.7, 25.3 ([Figura A51](#)). HRMS (ESI) calculada para C₁₉H₂₂ClF₃N₅O [M+H]⁺: 428.1465; encontrada: 428.1468. Grado de pureza: 96.3% (programa cromatográfico: isocrático a 60% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 60% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de

metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 9.2 min; concentración de la muestra: 0.61 mg/mL; lectura a 254 nm).

Síntesis y caracterización del derivado **32**



- Síntesis de 2-cloro-N-(4-ciclohexilfenil)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-amina (**45**)

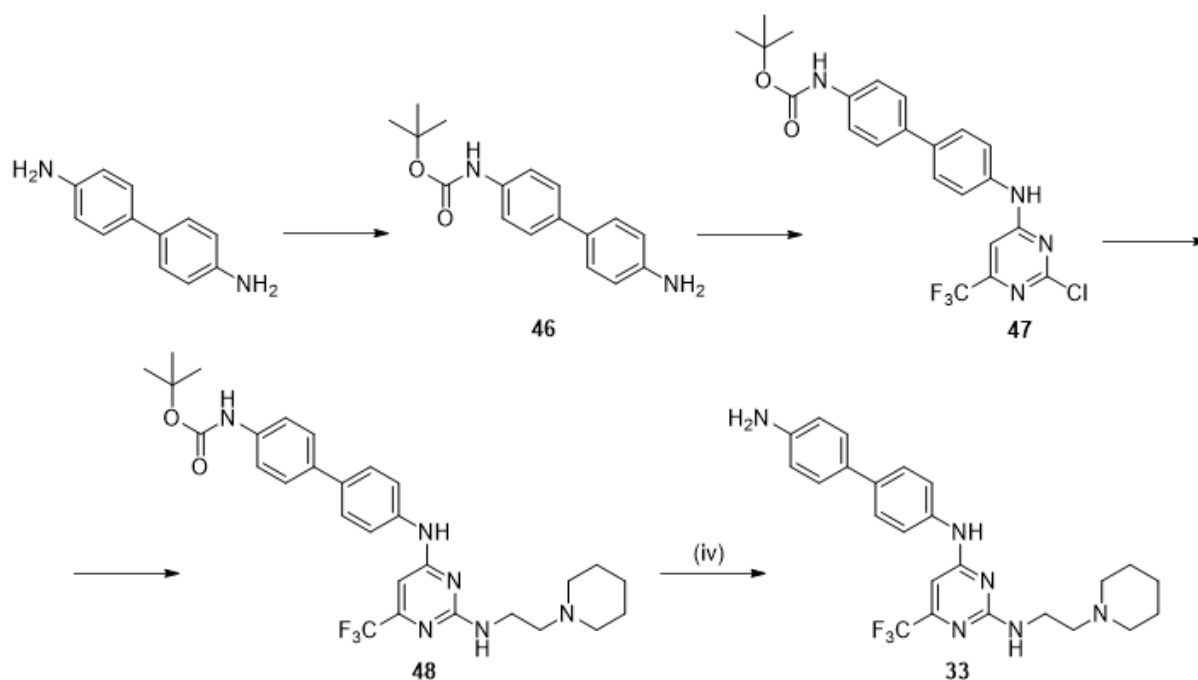
En un balón se disolvieron 175 mg de 4-ciclohexilanilina (1.0 mmol, 1.0 eq.) en 1.5 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 200 µL de TEA (1.4 mmol, 1.4 eq.) y 140 µL de 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina (1.0 mmol, 1.0 eq.). La mezcla se calentó a 90 °C con agitación magnética por 24 h, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida, y se redisolvió en 15 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía *flash*, usando mezclas de ciclohexano y acetato de etilo como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **45** puro con un rendimiento del 76.9% (273 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (s, 1H), 7.29 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.81 (s, 1H), 2.60 – 2.50 (m, 1H), 1.95 – 1.84 (m, 4H), 1.80 – 1.73 (m, 1H), 1.48 – 1.37 (m, 4H), 1.32 – 1.21 (m, 1H) ([Figura A66](#)).

- Síntesis de N⁴-(4-ciclohexilfenil)-N²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil)pirimidin-2,4-diamina (**32**)

En un vial cerrado a presión se disolvieron 176 mg de **45** (0.50 mmol, 1.0 eq.) en 2 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 300 µL de TEA (2.15 mmol, 4.3 eq.) y 80 µL de 1-(2-aminoetil)piperidina (0.56 mmol, 1.1 eq.). La mezcla se calentó durante 24 h a 120 °C con agitación magnética, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida y se redisolvió en 15 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía *flash*, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **32** puro con un rendimiento del 33.9% (75 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.27 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H),

7.20 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.86 (br s, 1H), 6.27 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 3.54 (br s, 2H), 2.63 – 2.43 (m, 7H), 1.90 – 1.83 (m, 4H), 1.75 (m, 1H), 1.64 (br s, 4H), 1.47 (br s, 2H), 1.40 (m, 4H), 1.25 (m, 1H) ([Figura A52](#)). ^{13}C -RMN (126 MHz, CDCl_3): δ 162.6, 162.4, 145.1, 135.5, 127.7, 122.6, 122.0, 119.8, 90.5, 57.4, 54.4, 44.0, 38.0, 34.5, 26.9, 26.1, 25.5, 24.1 ([Figura A53](#)). HRMS (ESI) calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{N}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 448.2688; encontrada: 448.2684. Calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{N}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 470.2508; encontrada: 470.2506. Grado de pureza: 97.2% (programa cromatográfico: isocrático a 70% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 70% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 7.5 min; concentración de la muestra: 0.64 mg/mL; lectura a 254 nm).

Síntesis y caracterización del derivado 33



- Síntesis de *tert*-butil (4'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)carbamato (**46**)

En un balón se colocaron 187 mg de bencidina (1.0 mmol, 1.0 eq.) y 108 mg de carbonato de sodio (1.0 mmol, 1.0 eq.). El balón se purgó con N_2 gaseoso y, en baño de hielo, se agregó lentamente una solución previamente enfriada de 220 mg de dicarbonato de di-*tert*-butilo (1.0 mmol, 1.0 eq.) con una jeringa. La mezcla se agitó durante 30 minutos en baño de hielo y luego 24 h a temperatura ambiente, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida, y el crudo se redisolvió en 15 mL de acetato de etilo. Se lavó con 2 x 5 mL de salmuera, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna, usando mezclas de

ciclohexano y acetato de etilo como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **46** con un rendimiento del 45.7% (130 mg). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.29 (s, 1H), 7.51 (s, 2H), 7.42 – 7.39 (m, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.61 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 1.48 (s, 9H) ([Figura A67](#)).

- Síntesis de *terc*-butil (4'-((2-cloro-6-(trifluorometil)pirimidin-4-il)amino)-[1,1'-bifenil]-4-il) carbamato (**47**)

En un balón se colocaron 120 mg de **46** (0.42 mmol, 1.0 eq.) suspendidos en 1.5 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 140 µL de TEA (1.00 mmol, 2.4 eq.) y 60 µL de 6-(trifluorometil)-2,4-dicloropirimidina (0.44 mmol, 1.0 eq.). La mezcla se calentó a 90 °C con agitación magnética por 24 h, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se evaporó el solvente a presión reducida, y se redisolvió en 15 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía *flash*, usando mezclas de ciclohexano y acetato de etilo como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **47** puro con un rendimiento del 44.3% (87 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.54 – 7.42 (m, 5H), 7.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.88 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 1.54 (s, 9H) ([Figura A68](#)).

- Síntesis de *terc*-butil (4'-((2-((2-(piperidin-1-il)etil)amino)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-il)amino)-[1,1'-bifenil]-4-il)carbamato (**48**)

En un vial cerrado a presión se disolvieron 75 mg de **47** (0.16 mmol, 1.0 eq.) en 1 mL de *n*-butanol. Se agregó secuencialmente con una jeringa 80 µL de TEA (0.57 mmol, 3.6 eq.) y 27 µL de 1-(2-aminoetil)piperidina (0.19 mmol, 1.2 eq.). La mezcla se calentó durante 24 h a 110 °C con agitación magnética, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se trasvasó a un balón, se evaporó el solvente a presión reducida, y se redisolvió en 15 mL de CH₂Cl₂. Se lavó secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía *flash*, usando mezclas de diclorometano y metanol como solventes de elución. Se obtuvo el compuesto **48** con un rendimiento del 53.5% (48 mg), el cual fue sometido a la reacción de desprotección sin caracterización adicional.

- Síntesis de *N*⁴-(4'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)-*N*²-(2-(piperidin-1-il)etil)-6-(trifluorometil) pirimidin-2,4-diamina (**33**)

En un balón se disolvieron 48 mg de **48** (0.09 mmol, 1.0 eq.) en 0.5 mL de CH₂Cl₂ seco y se enfrió en un baño de hielo. Se agregó lentamente 0.5 mL de ácido trifluoroacético previamente enfriado. La mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, hasta evidenciar reacción completa por CCD. Se detiene la agitación y se agregan 5 mL de solución saturada de NaHCO₃. El precipitado formado se extrajo con 3 x 5 mL de CH₂Cl₂. Las fases orgánicas combinadas se lavaron secuencialmente con 2 x 5 mL de solución saturada de NaHCO₃ y 2 x 5 mL de salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en capa delgada preparativa, utilizando una mezcla de diclorometano:metanol 85:15 como solvente de elución. Se obtuvo el compuesto **33** con un rendimiento del 27.9% (11 mg). ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 7.66 (br s, 2H), 7.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.38 (s, 1H), 3.71 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.02 (br s, 6H), 1.71 (s, 4H), 1.55 (s, 2H) ([Figura A54](#)). ¹³C-RMN (126 MHz, CD₃OD): δ 178.5, 162.6, 146.8, 130.2, 126.8, 125.9, 121.1, 115.5, 57.1, 53.6, 36.4, 29.3, 23.5, 22.2 ([Figura A55](#)). HRMS (ESI) calculada para C₂₄H₂₈F₃N₆ [M+H]⁺: 457.2327; encontrada: 457.2319. Grado de pureza: 91.1% (programa cromatográfico: isocrático a 45% de metanol de 0 a 5 min, gradiente de 45% a 95% de metanol de 5 a 7 min, isocrático a 95% de metanol de 7 a 15 min; tiempo de retención: 7.1 min; concentración de la muestra: 0.65 mg/mL; lectura a 254 nm).

7.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS

Células y virus

Los experimentos celulares se llevaron a cabo en células Vero (riñón de mono verde africano CCL-81; ATCC). Para promover su crecimiento, las células se cultivaron a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂, en medio esencial mínimo de Eagle (MEM; Gibco) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor y 50 µg/ml de gentamicina. Después de las infecciones y tratamientos, las células se mantuvieron con MEM suplementado con un menor porcentaje de SFB (1.5%). Para los experimentos, se emplearon *stocks* de DENV-2 (cepa Tailandia/16681/1984), ZIKV (cepa argentina INEVH116141) y YFV (cepa vacunal 17D).

Ensayo de citotoxicidad por el método del MTT

Células Vero crecidas en placas de 96 pocillos (10000 células por pocillo) se incubaron durante 72 h con diluciones de los compuestos evaluados en MEM 1.5% SFB. Tras ese tiempo, se retiró el medio por volcado, se realizó un lavado con PBS y se agregaron 100 µL por pocillo de una dilución 1:40 de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difeníl tetrazolio) en MEM 1.5% SFB. Se incubó durante 40 minutos en oscuridad. Luego, se retiró el medio por volcado y se solubilizó con 100 µL de etanol por pocillo. Se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro lector de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH).

Ensayo de citotoxicidad por el método del MTS/PMS

Células Vero crecidas en placas de 96 pocillos (10000 células por pocillo) se incubaron durante 48 h con diluciones del compuesto **19** en MEM 2% SFB. Tras ese tiempo, se retiró el medio por volcado, se realizó un lavado con PBS y se agregaron 100 µL de MEM 2% SFB por pocillo. Se preparó una solución mezclando 50 µL de PMS (metosulfato de fenazina) con 1 mL de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio). 20 µL de esta mezcla fueron agregados en cada pocillo, y se incubó durante 2 h a 37 °C. Se leyó la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro lector de microplacas Spark (TECAN).

Ensayo de inhibición del rendimiento viral

Células Vero crecidas en placas de 96 pocillos (10000 células por pocillo) se infectaron con DENV-2 o ZIKV (M.O.I. = 0.1) durante 1 h. Tras ese tiempo, se retiró el inóculo viral y se agregaron las diluciones de los compuestos evaluados en MEM 1.5% SFB. Se incubó durante 48 h a 37 °C. Luego, se cosecharon los sobrenadantes de los tratamientos y se cuantificaron los títulos virales por recuento de placas.

Titulación de virus por recuento de placas

Se prepararon diluciones seriadas 1:10 en PBS de las suspensiones virales a titular. Monocapas de células Vero crecidas en placas de 24 pocillos (120000 células por pocillo) se infectaron con 100 μ L por pocillo de las diluciones realizadas. Se incubó con agitación orbital durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se retiró el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de medio semisólido (MEM 1.5% SFB con 1% de metilcelulosa). Se incubó durante 3 días para ZIKV, y durante 7 días en el caso de DENV-2. Por último, las células se fijaron con formaldehído al 10% y se tiñeron con cristal violeta al 1% en etanol 10%. Se contaron las placas presentes en cada pocillo, y el título viral se expresó en unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL).

Ensayo de tiempo de adición

Monocapas de células Vero crecidas en placas de 24 pocillos (120000 células por pocillo) se infectaron con DENV-2 o ZIKV (M.O.I. = 0.5) y fueron tratadas con compuesto **19** en concentración 10 μ M a 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas post-infección (hpi). Se incluyeron controles virales de células infectadas sin compuesto. Para evaluar el tiempo $t = 0$, la infección con DENV-2 o ZIKV se realizó en presencia del compuesto **19**; para el resto de los tiempos, la infección se realizó en ausencia de antiviral. Tras 2 h de incubación a 4 °C, se lavaron las células con PBS para retirar el inóculo viral y se agregó medio fresco. En los casos de $t = 0$ y $t = 2$ h, se agregó medio con antiviral; para el resto de los tiempos se agregó medio sin antiviral. En estos casos, el antiviral fue agregado tras 4, 6, 8, 10 y 12 hpi respectivamente. Los sobrenadantes de los tratamientos se cosecharon a las 24 hpi y se obtuvieron los títulos virales por recuento de placas. Los resultados se informaron como porcentaje de inhibición, relativizados a los controles virales.

Ensayo de actividad virucida

Se incubaron alícuotas de los *stocks* virales de DENV-2 y ZIKV en presencia de compuesto **19** en concentraciones de 2.5, 5 y 10 μ M durante 1.5 h a 37 °C. En paralelo, se incubaron *stocks* sin antiviral bajo las mismas condiciones. Después de la incubación, los *stocks* fueron diluidos y titulados por recuento de placas.

Ensayo de pretratamiento celular

Monocapas de células Vero se trataron durante 2 y 4 h con compuesto **19** en concentración 10 μ M, diluido en MEM 1.5% SFB. Tras esos tiempos, se lavaron las células con PBS y se infectaron con DENV-2 o ZIKV (M.O.I. = 0.1) durante 1 h a 37 °C. Luego, se lavaron nuevamente las células y se agregó medio libre de antiviral. Los sobrenadantes se cosecharon a las 48 hpi y se obtuvieron los títulos virales por recuento de placas.

Ensayo de actividad antiviral en las etapas de adsorción e internalización

Monocapas de células Vero crecidas en placas de 24 pocillos (120000 células por pocillo) se infectaron con DENV-2 o ZIKV (M.O.I. = 0.1) durante 1 h a 4 °C. Para estudiar la adsorción, el compuesto **19** (10 µM) fue agregado junto con el inóculo viral solamente durante la primer hora de infección. Luego, se lavó con PBS y se agregó medio libre de antiviral para iniciar la internalización. Para evaluar el efecto del compuesto **19** en las etapas de internalización y post-internalización, el compuesto se agregó a 1 hpi y se mantuvo durante 1 h, y a 2 hpi con tratamiento durante 3 h, respectivamente. Se incluyeron controles virales de células infectadas sin compuesto. Luego de cada tratamiento, se lavó con PBS y se agregó medio libre de antiviral para continuar con las infecciones. Los sobrenadantes se cosecharon a las 24 y 48 hpi y se obtuvieron los títulos virales por recuento de placas. Los resultados se informaron como porcentaje de inhibición, relativizados a los controles virales.

Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa con transcripción reversa (RT-qPCR)

Monocapas de células Vero se infectaron con DENV-2 o ZIKV y se trataron con compuesto **19** en concentración 10 µM durante 48 h. En paralelo, se incluyeron controles virales de células infectadas sin antiviral. Tras ese tiempo, se extrajo el ARN total utilizando el reactivo TRI (TRI Reagent, Molecular Research Center). Se sintetizó el ADN complementario con la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). La reacción de PCR cuantitativa se llevó a cabo con la mezcla de reacción FastStart Universal SYBR Green Mastermix (con Rox) en un equipo termociclador Bio-Rad iCycler con sistema de detección MyiQ2 de dos colores. La expresión génica se normalizó utilizando el gen actina como control endógeno. Los datos se analizaron mediante el método del ciclo umbral ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Se utilizaron los siguientes cebadores: 5'-TTA GTT GCG TTA CAC CCT TTC TTG-3' y 5'-TCA CCT TCA CCG TTC CAG TTT-3' para el gen actina; 5'-TTG AGT AAA CYR TGC TGC CTG TAG CTC-3' y 5'-GGG TCT CCT CTA ACC TCT AGT CCT-3' para la región 3' no codificante de DENV-2; y 5'-GCC GCC ACC AAG ATG AAC TGA TTG-3' y 5'-GCA GTC TCC CGG ATG CTC CAT C-3' para el gen de la proteína NS5 de ZIKV.

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

Se cultivaron células Vero sobre cubreobjetos colocados en los pocillos de una microplaca de 24 pocillos. Las células se infectaron con DENV-2 o ZIKV (M.O.I. = 0.1) durante 1 h. Tras ese tiempo, se retiró el inóculo y las células se trataron con compuesto **19** en concentración 10 µM. Tras 48 horas de incubación, se fijaron las células con metanol puro enfriado a -20 °C durante 10 minutos, y se agregó el anticuerpo primario correspondiente. Para DENV-2 se empleó el anticuerpo anti-cápside de sobrenadante de hibridoma 6F3-1 en dilución 1:50, mientras que para ZIKV se empleó un anticuerpo monoclonal anti-envoltura (Abcam) en dilución 1:300. Luego, las muestras se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen) en dilución 1:300. Por último, los núcleos

de las células se tiñeron con la sonda DAPI (Sigma-Aldrich) en dilución 1:1000 durante 10 minutos. Se adquirieron imágenes de campos microscópicos aleatorios para determinar el porcentaje de células infectadas, usando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71. La número de células infectadas se adquirió con el software Fiji, contando 30 células por muestra.

Preparación de liposomas fluorescentes

En primer lugar, se prepararon soluciones de colesterol, esfingomieline, dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), dioleoil fosfatidilcolina (DOPC), nitrobenzoxadiazol conjugado a fosfatidiletanolamina (NBD-PE), y rodamina B conjugado a fosfatidiletanolamina (Rho-PE) en cloroformo seco. Se preparó una solución mezcla de concentración lipídica total de 2 mM y proporción molar de 3:1:1:1:0.1:0.1 de colesterol, esfingomieline, DOPE, DOPC, NBD-PE y Rho-PE, respectivamente. Se evaporó el cloroformo por secado con corriente de nitrógeno gaseoso y posterior secado en estufa de vacío. Los lípidos se resuspendieron en 500 µL de una solución reguladora de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 20 mM y cloruro de sodio 50 mM de pH 6.7. La mezcla se agitó en vórtex durante 5 minutos para garantizar la resuspensión total. El sistema se mantuvo en oscuridad en todo momento para evitar la fotodegradación de las sondas fluorescentes. La mezcla fue sometida a 10 ciclos de congelado-descongelado con nitrógeno líquido y agua a 50 °C para inducir el autoensamblaje de los lípidos. Las vesículas formadas se filtraron a través de una extrusora de 100 nm de diámetro de poro (AVANTI Polar Lipids). Se llevaron a cabo 21 ciclos de extrusión hasta que la suspensión se observó translúcida. Los liposomas obtenidos se conservaron en oscuridad a 4 °C. Se caracterizaron las propiedades de fluorescencia de los liposomas obtenidos en un espectrofluorímetro PTI QuantaMaster 40. Para ello, se realizó una dilución 1:100 de la suspensión de liposomas en PBS. Se midió la emisión de fluorescencia en el rango 480 - 600 nm, con una longitud de onda de excitación de 460 nm. Luego, se agregaron 10 µL de detergente y se repitió la medición. La preparación de liposomas sin sondas fluorescentes para el ensayo con virus marcado con DiO se llevó a cabo de manera idéntica, omitiendo el agregado de NBD-PE y Rho-PE.

Producción y purificación de virus para el ensayo de fusión

Células Vero crecidas en un frasco de cultivo celular T150 fueron infectadas con 500 µL de inóculo de DENV-2 o YFV diluido en PBS. Se incubó durante 1 h a 37 °C con agitación para favorecer la adsorción. Tras ese tiempo, se agregaron 35 mL de medio de mantenimiento y se incubó por 4 días a 37 °C en estufa con atmósfera controlada de CO₂. Se cosechó el sobrenadante y se clarificó por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Luego, se concentró por ultracentrifugación en vacío a 22000 rpm durante 90 minutos a 8 °C, empleando una centrífuga de rotor basculante. Los sobrenadantes se descartaron y el precipitado se resuspendió en 300 µL de PBS. Se purificó el virus obtenido por ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. Se centrifugó a 41000 rpm durante 90 minutos a 6 °C. Se colectó la banda correspondiente a la suspensión viral, se diluyó en PBS, se fraccionó en alícuotas y se almacenó a -80 °C. Se obtuvo el título viral por recuento de placas.

Ensayo de fusión con liposomas fluorescentes

Se prepararon suspensiones virales de distintas concentraciones, tomando volúmenes de 2 a 10 μL de virus purificado de 10^9 UFP/mL, y llevando a un volumen final de 50 μL con PBS de pH 7.4. Para iniciar la reacción, la suspensión viral se mezcló con 100 μL de una suspensión de liposomas 300 nM en una solución reguladora de acetato de sodio de pH 5.5. Se obtuvieron 150 μL de mezcla de incubación de pH 6.0, preparados en una microplaca de 96 pocillos de color negro, apta para experimentos de fluorescencia. En paralelo, se preparó un control mezclando 50 μL de la suspensión viral con 100 μL de una suspensión de liposomas 300 nM en PBS de pH 7.4. Se monitoreó el avance de la reacción de dilución lipídica con un lector de microplacas PHERAstar FS (BMG LABTECH). Luego de 15 - 20 minutos de reacción, se adicionaron 10 μL de detergente y se registró la emisión durante 5 - 10 minutos más.

Preparación de DENV-2 marcado con DiO

A 50 μL de una suspensión de DENV-2 de 10^8 UFP/mL se le agregó 1 μL de una solución de perclorato de 3,3'-dilinoiloxacarbocianina (DiO) 2 mM en DMSO. La mezcla se agitó en vórtex durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se filtró la suspensión por cromatografía de exclusión empleando una columna Sephadex G-50 preparada en pipeta Pasteur. Se fraccionó en alícuotas y se evaluó la infectividad del virus marcado por el ensayo de recuento de placas, comparando con la capacidad infectiva del virus sin marcar. Se estudiaron las propiedades de fluorescencia con y sin detergente en un lector de microplacas Spark (TECAN).

Ensayo de fusión con DENV-2 marcado con DiO

Se llevó a cabo un procedimiento similar al del ensayo de fusión con liposomas fluorescentes, con algunas modificaciones. La suspensión de liposomas se diluyó a 300 nM en soluciones reguladoras de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) de pH 5.0, 5.2, 5.5 y 5.8, con el fin de evaluar distintas condiciones de acidez. Los experimentos se realizaron en placas de 96 pocillos aptas para experimentos de fluorescencia, empleando un lector de microplacas Spark (TECAN).

Análisis estadístico

Los tratamientos estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism 8. Para asegurar la validez estadística de las diferencias encontradas se empleó la prueba *t* de Student para comparaciones de dos grupos de datos, y el análisis de varianza ANOVA de un solo factor seguido por la prueba *post-hoc* de Dunnett para comparaciones múltiples.

7.4. ENSAYOS FISICOQUÍMICOS Y FARMACOCINÉTICOS

Preparación de medios químicos

- Preparación de 100 mL de medio PBS de pH 7.4

En un vaso de precipitados se colocaron 800 mg de NaCl, 20 mg de KCl, 140 mg de Na_2HPO_4 y 24 mg de KH_2PO_4 . Se disolvió en 90 mL de agua ultrapura y se midió el pH de la solución. De ser necesario, se ajustó el pH con una solución 0.2 N de HCl o NaOH, según corresponda, hasta obtener el valor de pH requerido. Se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL y se llevó a volumen con agua ultrapura. Se conservó en un frasco de vidrio a 4 °C.

- Preparación de 100 mL de medio SIF de pH 6.8

En un vaso de precipitados se colocaron 680 mg de KH_2PO_4 y se disolvió en 50 mL de agua ultrapura. Se agregaron 7.7 mL de una solución de NaOH y luego 30 mL de agua ultrapura. Se midió el pH de la solución y, de ser necesario, se ajustó el pH con una solución 0.2 N de HCl o NaOH, según corresponda, hasta obtener el valor de pH requerido. Se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL y se llevó a volumen con agua ultrapura. Se conservó en un frasco de vidrio a 4 °C.

- Preparación de 100 mL de medio SGF de pH 1.2

En un vaso de precipitados se colocaron 200 mg de NaCl y se disolvió en 90 mL de agua ultrapura. Se agregó 0.2 mL de HCl concentrado (35 - 37%) y se midió el pH de la solución. De ser necesario, se ajustó el pH con una solución 0.2 N de HCl o NaOH, según corresponda, hasta obtener el valor de pH requerido. Se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL y se llevó a volumen con agua ultrapura. Se conservó en un frasco de vidrio a 4 °C.

Ensayo de solubilidad por el método *shake-flask*

Se evaluó la solubilidad de los compuestos mediante el método *shake-flask*, con detección por espectroscopía de absorbancia en microplaca de 96 pocillos, utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas PHERAstar FS (BMG LABTECH). Para ello, se pesó entre 1 y 3 mg de compuesto y se colocó en un tubo *Eppendorf*. Este procedimiento se realizó tres veces. Se agregó 0.5 - 1 mL del medio correspondiente (PBS, SIF y SGF) y se incubó a 37 °C en un agitador orbital a 320 rpm durante 24 h. Luego de ese tiempo, se incubó durante 24 h a 37 °C sin agitación. Se corroboró que las soluciones siguiesen saturadas tras la incubación, con exceso de sólido sin disolver. Se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 10 minutos a 37 °C. Se colectaron 200 μL de cada sobrenadante y se diluyeron al medio con 200 μL de DMSO en una placa de cuarzo de 96 pocillos. Se realizaron tres diluciones seriadas al medio en una mezcla DMSO:buffer 50:50, para los casos en los que la absorbancia de la dilución al medio

inicial excediese el ámbito dinámico lineal de la curva de calibrado. En paralelo, se prepararon dos curvas de calibrado por cada medio. Se preparó una solución madre del compuesto en DMSO de concentración 1 mg/mL. Se realizó una dilución al medio en *buffer*, y luego sucesivas diluciones seriadas al medio en mezclas DMSO:*buffer* 50:50, hasta obtener 10 soluciones que abarcaron el rango de concentraciones desde 500 µg/mL hasta 0.98 µg/mL. Una mezcla de DMSO:*buffer* 50:50 sin compuesto se usó como blanco. Se obtuvieron los espectros de absorción en el rango de 254 a 400 nm para encontrar la longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia ($\lambda_{\max}$) de cada compuesto. Luego, se midió la absorbancia a $\lambda_{\max}$ de las soluciones incógnita y de los puntos de las curvas de calibrado. Para algunos compuestos, se cuantificó la absorbancia a dos longitudes de onda debido a que se encontraron variaciones de $\lambda_{\max}$ en función del pH. Se midió la absorbancia a 278 nm y 286 nm para el diclofenac, a 280 nm y 300 nm para la loratadina, a 280 nm para el verapamilo, a 266 nm para el ibuprofeno, a 312 nm y 324 nm para el compuesto **1**, a 314 nm y 322 nm para el compuesto **2**, a 330 nm para el compuesto **3**, y a 302 nm para el compuesto **19**. Se graficaron las curvas de calibrado como la absorbancia medida en función de la concentración, dentro del ámbito dinámico lineal. Se determinó la solubilidad como la concentración de la solución saturada obtenida por extrapolación con la curva de calibración, teniendo en cuenta el factor de dilución correspondiente. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada compuesto. Para el análisis de resultados se usó el programa OriginPro 9.0.

Ensayo de permeabilidad por el método PAMPA

Se evaluó la permeabilidad gastrointestinal de los compuestos mediante el ensayo PAMPA, usando el *kit* PAMPA-096 (BioAssay Systems). Para realizar la incubación se empleó una placa de 96 pocillos de doble compartimiento, separados por una superficie porosa, provista en el *kit*. Sobre la superficie porosa de los pocillos a utilizar se colocaron 5 µL de una solución de lecitina al 4% en dodecano, para simular las características de la membrana gastrointestinal. Se preparó una solución madre 10 mM de compuesto en DMSO, la cual se diluyó a 500 µM en PBS para obtener la solución donador. Se colocaron 200 µL de esta solución en el compartimiento donador, mientras que en el compartimiento aceptor se colocaron 300 µL de PBS. El sistema se incubó durante 18 h a 37 °C, permitiendo que los compuestos atravesasen la membrana artificial desde la solución donador hacia la solución aceptor. En paralelo, se preparó una solución de referencia mezclando 80 µL de la solución madre con 120 µL de PBS, resultando en una concentración de 200 µM. Esta solución de referencia representa la concentración de la solución aceptor si se alcanzara el 100% de permeabilidad. La solución de referencia también se incubó durante 18 h a 37 °C. Luego, se colocaron las soluciones aceptor y de referencia en una microplaca de cuarzo de 96 pocillos, junto con blancos de DMSO en PBS en la proporción correspondiente. La detección se realizó por espectroscopía de absorción, usando un espectrofotómetro lector de microplacas PHERAstar FS (BMG LABTECH). Se midió la absorbancia a $\lambda_{\max}$ de las soluciones incógnita y de referencia. Las longitudes de onda de medición fueron 274 nm para la teofilina, 280 nm para el diclofenac y el cloranfenicol, 310 nm para la warfarina, 318 nm para los compuestos **1** y **2**, 320 nm para el compuesto **3** y 298 nm para el compuesto **19**. Se calculó la permeabilidad aparente (P_{app}) de cada compuesto usando la siguiente ecuación:

$$P_{app} = \frac{V_D \cdot V_A}{(V_D + V_A) \cdot S \cdot t} \cdot -\ln\left(1 - \frac{OD_A}{OD_R}\right) \text{ cm/s} \quad (1)$$

En donde V_D y V_A son los volúmenes de las soluciones donador y aceptor, S es el área de la membrana, t es el tiempo de incubación, y OD_A y OD_R representan las absorbancias de la solución aceptor y solución de referencia respectivamente. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada compuesto, y por duplicado para cada control de permeabilidad. Para el análisis de resultados se usó el programa OriginPro 9.0.

Ensayos de estabilidad química, plasmática y microsomal

Se evaluó la estabilidad química del compuesto **19** en medios PBS, SIF y SGF. Se partió de una solución madre de compuesto **19** 10 mM en DMSO, la cual se diluyó a 1 mM en acetonitrilo. Para iniciar las reacciones se mezclaron 50 µL de esta solución con 950 µL del medio correspondiente, resultando en una concentración de 50 µM. Se incubó a 37 °C en un agitador orbital a 320 rpm. Se tomaron alícuotas de 100 µL tras 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 1440 minutos de reacción, las cuales se mezclaron con 400 µL de una solución 12.5 µM del estándar interno warfarina en acetonitrilo frío para detener la reacción. Se realizó una nueva dilución tomando 100 µL y llevando a 1000 µL con una mezcla metanol:agua 50:50. Las muestras se homogeneizaron en vórtex durante 1 minuto. Cada una de las muestras se analizó por cromatografía líquida de alta resolución con detección por espectrometría de masas (HPLC-MS). Para la cuantificación se consideró la relación entre el área de la señal del compuesto **19** y el área de la señal del estándar interno warfarina, para evitar errores producto de la variabilidad en la inyección del equipo. Los experimentos se realizaron por triplicado, usando metanol y acetonitrilo de calidad HPLC.

Las mediciones por HPLC-MS se realizaron en un equipo Waters Alliance e2695 equipado con una columna Phenomenex Kinetex XB-C18, de 250 x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula, acoplado a un espectrómetro de masas Waters con analizador de cuadrupolo SQD2 y fuente de ionización por *electrospray* (ESI). La elución de los compuestos se realizó empleando gradientes de solventes de calidad HPLC. Los solventes usados fueron metanol y una solución de ácido fórmico 0.1% en agua ultrapura. En primer lugar, se determinó el programa cromatográfico óptimo para la separación y detección conjunta del compuesto **19** y la warfarina, el cual consistió en una elución isocrática a 70% de metanol de 0 a 3 min, luego un gradiente de 70% a 95% de metanol de 3 a 5 min, y finalmente una elución isocrática a 95% de metanol de 5 a 15 min. Luego de cada inyección de muestra, se realizó una inyección de solvente en un programa cromatográfico de 12 minutos para volver a las condiciones iniciales del programa óptimo para el compuesto **19**. Se usó un volumen de inyección de 5 µL, un caudal de 0.35 mL/min y una temperatura de 35 °C. El equipo se operó en modo positivo, con un voltaje de 3 kV aplicado al capilar de la sonda, y de 45 V en el cono. La temperatura de la fuente y del gas de desolvatación fue de 150 y 350 °C, respectivamente. El flujo del gas de desolvatación utilizado fue de 600 L/h, y el flujo del gas de desolvatación en el cono fue de 10 L/h. Bajo estas condiciones, el tiempo de retención del compuesto **19** fue de 6.16 minutos, y el de la warfarina

fue de 13.37 minutos. La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron con el software MassLynx 4.1.

Para evaluar la estabilidad del compuesto **19** en plasma humano y de ratón, se partió de una solución madre 2.5 mM en DMSO. Previo a la incubación, tanto el plasma humano como el plasma de ratón fueron diluidos a un 80% con PBS y precalentados a 37 °C durante 15 minutos. 6 µL de la solución madre del compuesto **19** se mezclaron con 294 µL de plasma de ratón pretratado, de manera de alcanzar una concentración de 50 µM con menor porcentaje de solvente orgánico presente. Se incubó a 37 °C en un agitador orbital a 320 rpm. Se tomaron alícuotas de 25 µL tras 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 1440 minutos de reacción, las cuales se mezclaron con 100 µL de una solución 12.5 µM del estándar interno warfarina en acetonitrilo frío para detener la reacción. En el caso del plasma humano, 2 µL de la solución madre de compuesto **19** se mezclaron con 98 µL de plasma humano pretratado. Se incubó a 37 °C en un agitador orbital a 320 rpm y se tomaron alícuotas de 10 µL a los mismos tiempos, las cuales se mezclaron con 200 µL de una solución 10.5 µM del estándar interno warfarina en acetonitrilo frío. Se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se colectaron los sobrenadantes, se diluyeron en metanol:agua 50:50, y las mezclas obtenidas se homogeneizaron en vórtex durante 1 minuto. Las muestras se analizaron por HPLC-MS bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Para la cuantificación se consideró la relación entre el área de la señal del compuesto **19** y el área de la señal del estándar interno warfarina, para evitar errores en relación a la variabilidad en la inyección del equipo. Los experimentos se realizaron por triplicado, usando metanol y acetonitrilo de calidad HPLC. Se usó enalapril como control positivo de plasma murino, y procaína como control positivo de plasma humano.

La estabilidad metabólica *in vitro* del compuesto **19** fue estudiada usando microsomas de hígado de ratón (M9566, [Sigma-Aldrich](#)). En primer lugar, se preparó un *buffer* fosfato de potasio (PPB) 0.1 M de pH 7.4 disolviendo 477 mg de K₃PO₄ y 1414 mg de KH₂PO₄ en 100 mL de agua ultrapura, ajustando el pH con H₃PO₄ concentrado. Se prepararon 270 µL de una mezcla de microsomas 0.5 mg/mL y compuesto **19** 3.33 µM en PPB, y se preincubó a 37 °C durante 15 minutos. La reacción se inició con el agregado de 30 µL de una solución de NADPH 10 mM en PPB, resultando entonces en una concentración final de 0.45 mg/mL de microsomas, 3 µM de compuesto **19** y 1 mM de NADPH en 300 µL de volumen final. En paralelo, se realizó un control sin NADPH, en donde se agregaron 30 µL de PPB. Se incubó a 37 °C en un agitador orbital a 320 rpm. Se tomaron alícuotas de 50 µL a los 0, 5, 15, 30 y 45 minutos de iniciada la reacción, las cuales se mezclaron con 100 µL de una solución 1.5 µM del estándar interno warfarina en acetonitrilo frío para detener la reacción. Se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se colectaron los sobrenadantes, se diluyeron en metanol:agua 50:50 y las mezclas obtenidas se homogeneizaron en vórtex durante 1 minuto. Las muestras se analizaron por HPLC-MS bajo las condiciones descritas anteriormente. Para la cuantificación se consideró la relación entre el área de la señal del compuesto **19** y el área de la señal del estándar interno warfarina, para evitar errores producto de la variabilidad en la inyección del equipo. El decaimiento logarítmico se linealizó y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) se calculó a partir de la regresión lineal. El aclaramiento intrínseco microsomal ($Cl_{int,micr}$) se calculó con la ecuación:

$$Cl_{int,micr} = \frac{V \cdot \ln(2)}{P \cdot t_{1/2}} \quad (2)$$

En donde V es el volumen de incubación (300 μ L) y P es la cantidad de proteína microsomal en la incubación (0.135 mg). El aclaramiento hepático (Cl_{int}) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$Cl_{int} = Cl_{int,micr} \cdot SF \cdot \frac{M_H}{M_C} \quad (3)$$

En donde SF es el factor de escalado que representa la cantidad de proteína microsomal por gramo de hígado (45 mg/g), y M_H/M_C representa la relación entre la masa de hígado y la masa corporal de la especie (87.5 g/kg). La búsqueda de posibles metabolitos se realizó inyectando las muestras obtenidas durante el experimento bajo las mismas condiciones cromatográficas, detectando con el modo SIR del espectrómetro de masas con resolución unitaria. Se buscaron específicamente las masas de los iones $[M+H]^+$ de los posibles metabolitos, cuyos valores son 430.16, 345.07, 290.16 y 303.06 para los metabolitos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. El metabolito 2 se detectó a un tiempo de retención de 6.05 minutos, mientras que el 4 posee un tiempo de retención de 12.52 minutos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, usando metanol y acetonitrilo de calidad HPLC. Se usó el fármaco comercial verapamilo como control positivo. En los controles negativos sin NADPH, tanto la concentración del compuesto **19** como la del verapamilo se mantuvieron constantes durante todo el tiempo de incubación.

REFERENCIAS

- [1] Lichtenberg, F. R. (2014). Pharmaceutical innovation and longevity growth in 30 developing and high-income countries, 2000–2009. *Health Policy and Technology*, 3(1), 36-58. <https://doi.org/10.1016/j.hlpt.2013.09.005>
- [2] Bennett, J. W., & Chung, K. (2001). Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Advances in Applied Microbiology*, 163-184. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(01\)49013-7](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(01)49013-7)
- [3] Kardos, N., & Demain, A. L. (2011). Penicillin: The medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(4), 677-687. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3587-6>
- [4] Campbell, S. F. (2023). Foreword to the first edition. En S. E. Ward & A. M. Davis (Eds.), *The handbook of medicinal chemistry: Principles and practice* (2nd ed., pp. xix-xxxi). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788018982-fp019>
- [5] Gavernet, L., Bellera, C. L., & Di Ianni, M. E. (2018). Introducción - Química Medicinal, la importancia en la formación del profesional farmacéutico. En L. Gavernet (Coord.), *Introducción a la Química Medicinal* (pp. 7-10). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. [ISBN 978-950-34-1623-8](https://doi.org/10.1007/978-950-34-1623-8)
- [6] Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- [7] Kesik-Brodacka, M. (2018). Progress in biopharmaceutical development. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(3), 306-322. <https://doi.org/10.1002/bab.1617>
- [8] Berdigaliyev, N., & Aljofan, M. (2020). An Overview of Drug Discovery and Development. *Future Medicinal Chemistry*, 12(10), 939-947. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0307>
- [9] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. El artículo fue publicado originalmente en *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3-25. 1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
- [10] Maier, M. E. (2015). Design and synthesis of analogues of natural products. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(19), 5302-5343. <https://doi.org/10.1039/C5OB00169B>
- [11] Ondetti, M. A., Rubin, B., & Cushman, D. W. (1977). Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: New Class of Orally Active Antihypertensive Agents. *Science*, 196(4288), 441-444. <https://doi.org/10.1126/science.191908>
- [12] Ondetti, M. A., & Cushman, D. W. (1980). Compounds for alleviating hypertension (U.S. Patent No. US4199512A). U.S. Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US4199512A>

- [13] Long, A. A. W., Nayler, J. H. C., Smith, H., Taylor, T., & Ward, N. (1971). Derivatives of 6-aminopenicillanic acid. Part XI. α -Amino-p-hydroxy-benzylpenicillin. *J. Chem. Soc. C*, 0(0), 1920-1922. <https://doi.org/10.1039/J39710001920>
- [14] Sutherland, R., Croydon, E. A. P., & Rolinson, G. N. (1972). Amoxycillin: A new Semi-synthetic Penicillin. *BMJ*, 3(5817), 13-16. <https://doi.org/10.1136/bmj.3.5817.13>
- [15] Raynor, B. D. (1997). Penicillin and ampicillin. *Primary Care Update for OB/GYNS*, 4(4), 147-152. [https://doi.org/10.1016/S1068-607X\(97\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S1068-607X(97)00012-7)
- [16] Gallo, F. N., Enderle, A. G., Pardo, L. A., Leal, E. S., & Bollini, M. (2022). Challenges and Perspectives in the Discovery of Dengue Virus Entry Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 29(4), 719-740. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210521213118>
- [17] DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., & Hansen, R. W. (2016). Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics*, 47, 20-33. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>
- [18] Mullard, A. (2019). Low-cost non-profit drug repurposing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(1), 7-7. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.228>
- [19] Wouters, O. J., McKee, M., & Luyten, J. (2020). Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA*, 323(9), 844. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1166>
- [20] Schuster, D., Laggner, C., & Langer, T. (2005). Why Drugs Fail - A study on side effects in new chemical entities. *Current Pharmaceutical Design*, 11(27), 3545-3559. <https://doi.org/10.2174/138161205774414510>
- [21] Bhutani, P., Joshi, G., Raja, N., Bachhav, N., Rajanna, P. K., Bhutani, H., Paul, A. T., & Kumar, R. (2021). U.S. FDA Approved Drugs from 2015 – June 2020: A Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(5), 2339-2381. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01786>
- [22] Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., & Schacht, A. L. (2010). How to improve R&D productivity: The pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), 203-214. <https://doi.org/10.1038/nrd3078>
- [23] Hughes, J., Rees, S., Kalindjian, S., & Philpott, K. (2011). Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1239-1249. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>
- [24] Katsuno, K., Burrows, J. N., Duncan, K., Van Huijsduijnen, R. H., Kaneko, T., Kita, K., Mowbray, C. E., Schmatz, D., Warner, P., & Slingsby, B. T. (2015). Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(11), 751-758. <https://doi.org/10.1038/nrd4683>
- [25] Bellera, C. L., & Di Ianni, M. E. (2018). Descubrimiento y desarrollo de fármacos. En L. Gavernet (Coord.), *Introducción a la Química Medicinal* (pp. 11-21). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. [ISBN 978-950-34-1623-8](https://doi.org/10.1016/j.chem.2018.01.001).

- [26] Di Ianni, M. E., & Bellera, C. L. (2018). Origen de los fármacos. En L. Gavernet (Coord.), *Introducción a la Química Medicinal* (pp. 22-33). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. [ISBN 978-950-34-1623-8](#).
- [27] Sinha, S., & Vohora, D. (2018). Drug Discovery and Development. En *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research* (pp. 19-32). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802103-3.00002-X>
- [28] Lombardino, J. G., & Lowe, J. A. (2004). The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(10), 853-862. <https://doi.org/10.1038/nrd1523>
- [29] Campbell, I. B., Macdonald, S. J. F., & Procopiou, P. A. (2018). Medicinal chemistry in drug discovery in big pharma: Past, present and future. *Drug Discovery Today*, 23(2), 219-234. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.10.007>
- [30] Lavecchia, A., & Giovanni, C. (2013). Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. *Current Medicinal Chemistry*, 20(23), 2839-2860. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990001>
- [31] Macalino, S. J. Y., Gosu, V., Hong, S., & Choi, S. (2015). Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of Pharmacal Research*, 38(9), 1686-1701. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0640-5>
- [32] Burley, S. K., Bhatt, R., Bhikadiya, C., Bi, C., Biester, A., Biswas, P., Bittrich, S., Blaumann, S., Brown, R., Chao, H., Chithari, V. R., Craig, P. A., Crichlow, G. V., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Flatt, J. W., Ghosh, S., Goodsell, D. S., ... Zardecki, C. (2025). Updated resources for exploring experimentally-determined PDB structures and Computed Structure Models at the RCSB Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D564-D574. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1091>
- [33] Okimoto, N., Futatsugi, N., Fuji, H., Suenaga, A., Morimoto, G., Yanai, R., Ohno, Y., Narumi, T., & Taiji, M. (2009). High-Performance Drug Discovery: Computational Screening by Combining Docking and Molecular Dynamics Simulations. *PLoS Computational Biology*, 5(10), e1000528. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000528>
- [34] Liu, J., & Wang, R. (2015). Classification of Current Scoring Functions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(3), 475-482. <https://doi.org/10.1021/ci500731a>
- [35] Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., & Lowe, E. W. (2014). Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, 66(1), 334-395. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007336>
- [36] Hung, C., & Chen, C. (2014). Computational Approaches for Drug Discovery. *Drug Development Research*, 75(6), 412-418. <https://doi.org/10.1002/ddr.21222>
- [37] De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., & Cavalli, A. (2016). Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(9), 4035-4061. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01684>
- [38] Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology*, 9(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-71>

- [39] Zhang, K., Yang, X., Wang, Y., Yu, Y., Huang, N., Li, G., Li, X., Wu, J. C., & Yang, S. (2025). Artificial intelligence in drug development. *Nature Medicine*, 31(1), 45-59. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03434-4>
- [40] Ocana, A., Pandiella, A., Privat, C., Bravo, I., Luengo-Oroz, M., Amir, E., & Gyorffy, B. (2025). Integrating artificial intelligence in drug discovery and early drug development: A transformative approach. *Biomarker Research*, 13(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s40364-025-00758-2>
- [41] Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- [42] Varadi, M., Bertoni, D., Magana, P., Paramval, U., Pidruchna, I., Radhakrishnan, M., Tsenkov, M., Nair, S., Mirdita, M., Yeo, J., Kovalevskiy, O., Tunyasuvunakool, K., Laydon, A., Židek, A., Tomlinson, H., Hariharan, D., Abrahamson, J., Green, T., Jumper, J., ... Velankar, S. (2024). AlphaFold Protein Structure Database in 2024: Providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D368-D375. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011>
- [43] Niazi, S. K., & Mariam, Z. (2025). Artificial intelligence in drug development: Reshaping the therapeutic landscape. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 16, 20420986251321704. <https://doi.org/10.1177/20420986251321704>
- [44] Cann, A. J. (2016). Particles. En *Principles of Molecular Virology* (6th ed., pp. 27-57). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801946-7.00002-X>
- [45] Whitaker-Dowling, P., & Youngner, J. S. (1999). VIRUS-HOST CELL INTERACTIONS. En Elsevier eBooks (pp. 1957-1961). <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0343>
- [46] Enquist, L. W., & Racaniello, V. R. (2013). Virology: From Contagium Fluidum to Virome. En D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, V. R. Racaniello, & B. Roizman (Eds.), *Fields' Virology* (6th ed., Vol. 1, pp. 1-20). Lippincott Williams & Wilkins. [ISBN 978-1-4511-0563-6](https://doi.org/10.1016/B978-1-4511-0563-6)
- [47] Varanda, C., Félix, M. D. R., Campos, M. D., & Materatski, P. (2021). An Overview of the Application of Viruses to Biotechnology. *Viruses*, 13(10), 2073. <https://doi.org/10.3390/v13102073>
- [48] <https://ictv.global/taxonomy>. Acceso al sitio el día 16 de octubre de 2025.
- [49] Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35(3), 235-241. <https://doi.org/10.1128/br.35.3.235-241.1971>
- [50] Boehmer, P., & Nimmonkar, A. (2003). Herpes Virus Replication. *IUBMB Life*, 55(1), 13-22. <https://doi.org/10.1080/1521654031000070645>
- [51] Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 32, 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.006>

- [52] Buller, R. M., & Palumbo, G. J. (1991). Poxvirus pathogenesis. *Microbiological Reviews*, 55(1), 80-122. <https://doi.org/10.1128/mr.55.1.80-122.1991>
- [53] Berns, K. I. (1990). Parvovirus replication. *Microbiological Reviews*, 54(3), 316-329. <https://doi.org/10.1128/mr.54.3.316-329.1990>
- [54] Estes, M. K., & Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews*, 53(4), 410-449. <https://doi.org/10.1128/mr.53.4.410-449.1989>
- [55] Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K.-C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.-C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O. M., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical Reviews*, 118(8), 4448-4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>
- [56] Morrison, T. E. (2014). Reemergence of Chikungunya Virus. *Journal of Virology*, 88(20), 11644-11647. <https://doi.org/10.1128/JVI.01432-14>
- [57] Weiss, S. R., & Leibowitz, J. L. (2011). Coronavirus Pathogenesis. En *Advances in Virus Research* (Vol. 81, pp. 85-164). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>
- [58] Tordo, N., & Kouknetzoff, A. (1993). The rabies virus genome: an overview. *PubMed*, 60(4), 263-269. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7777310>
- [59] Ghosh, S., Saha, A., Samanta, S., & Saha, R. P. (2021). Genome structure and genetic diversity in the Ebola virus. *Current Opinion in Pharmacology*, 60, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.06.010>
- [60] Li, Y., Huo, S., Yin, Z., Tian, Z., Huang, F., Liu, P., Liu, Y., & Yu, F. (2024). Retracted and republished from: "The current state of research on influenza antiviral drug development: drugs in clinical trial and licensed drugs". *mBio*, 15(5), e00175-24. <https://doi.org/10.1128/mbio.00175-24>
- [61] Bekker, L.-G., Beyrer, C., Mgodi, N., Lewin, S. R., Delany-Moretlwe, S., Taiwo, B., Masters, M. C., & Lazarus, J. V. (2023). HIV infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 9(1), 42. <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00452-3>
- [62] Koonin, E. V., Krupovic, M., & Agol, V. I. (2021). The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(3), e00053-21. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00053-21>
- [63] Norkin, L. C. (2010). Hepadnaviruses and Hepatitis Delta Virus. En *Virology: Molecular Biology and Pathogenesis* (1st ed., pp. 641-657). ASM Press. [ISBN 978-1-55581-453-3](https://doi.org/10.1007/978-1-55581-453-3)
- [64] Bhadoria, P., Gupta, G., & Agarwal, A. (2021). Viral Pandemics in the Past Two Decades: An Overview. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 10(8), 2745-2750. https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_2071_20

- [65] C.R., V., Sharma, R., Jayashree, M., Nallasamy, K., Bansal, A., Angurana, S. K., L. Mathew, J., Sankhyan, N., Dutta, S., Verma, S., Kumar, R., Devnanai, M., Vaidya, P. C., Samujh, R., Singh, M. P., Goyal, K., Lakshmi, P. V. M., & Saxena, A. K. (2023). Epidemiology, Clinical Profile, Intensive Care Needs and Outcome in Children with SARS-CoV-2 Infection Admitted to a Tertiary Hospital During the First and Second Waves of the COVID-19 Pandemic in India. *Indian Journal of Pediatrics*, 90(2), 131-138. <https://doi.org/10.1007/s12098-022-04283-0>
- [66] Zur, M., Peselev, T., Yanko, S., Rotshild, V., & Matok, I. (2023). Efficacy and safety of antiviral treatments for symptomatic COVID-19 outpatients: Systematic review and network meta-analysis. *Antiviral Research*, 221, 105768. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105768>
- [67] World Health Organization. (2023). Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. <https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-%282005%29-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-%28covid-19%29-pandemic>. Acceso al sitio el día 18 de octubre de 2025
- [68] World Health Organization. (2025). HIV and AIDS. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>. Acceso al sitio el día 18 de octubre de 2025.
- [69] Hsieh, Y.-C., Wu, T.-Z., Liu, D.-P., Shao, P.-L., Chang, L.-Y., Lu, C.-Y., Lee, C.-Y., Huang, F.-Y., & Huang, L.-M. (2006). Influenza Pandemics: Past, Present and Future. *Journal of the Formosan Medical Association*, 105(1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(09\)60102-9](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(09)60102-9)
- [70] Henderson, D. A. (2011). The eradication of smallpox - An overview of the past, present, and future. *Vaccine*, 29, D7-D9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.080>
- [71] World Health Organization. (2024). Ebola disease. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ebola-disease>. Acceso al sitio el día 18 de octubre de 2025.
- [72] Oldstone, M. B. A. (2020). *Viruses, plagues, and history: Past, Present, and Future*. Oxford University Press. [ISBN 9780190056780](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.080)
- [73] Chaudhuri, S., Symons, J. A., & Deval, J. (2018). Innovation and trends in the development and approval of antiviral medicines: 1987–2017 and beyond. *Antiviral Research*, 155, 76-88. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.05.005>
- [74] Hangyu, W., Panpan, L., Jie, S., Hongyan, W., Linmiao, W., Kangning, H., Yichen, S., Shuai, W., & Cheng, W. (2024). Advancements in Antiviral Drug Development: Comprehensive Insights into Design Strategies and Mechanisms Targeting Key Viral Proteins. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(7), 1376-1384. <https://doi.org/10.4014/jmb.2403.03008>
- [75] Prusoff, W. H. (1959). Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 32, 295-296. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(59\)90597-9](https://doi.org/10.1016/0006-3002(59)90597-9)
- [76] De Clercq, E., & Li, G. (2016). Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 695-747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>

- [77] Nizi, M. G., Massari, S., Tabarrini, O., & Manfroni, G. (2025). A medicinal chemistry overview of direct-acting antivirals approved in 2013-2024 by US FDA. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 300, 118105. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.118105>
- [78] UNAIDS. HIV treatment. <https://www.unaids.org/en/topic/treatment>. Acceso al sitio el día 20 de octubre de 2025.
- [79] Silva, N. M., Santos, N. C., & Martins, I. C. (2020). Dengue and Zika Viruses: Epidemiological History, Potential Therapies, and Promising Vaccines. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 5(4), 150. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5040150>
- [80] Hotez, P. J., Aksoy, S., Brindley, P. J., & Kamhawi, S. (2020). What constitutes a neglected tropical disease? *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(1), e0008001. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008001>
- [81] Sharma, A., & Lal, S. K. (2017). Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00110>
- [82] Saiz, J.-C., Vázquez-Calvo, Á., Blázquez, A. B., Merino-Ramos, T., Escribano-Romero, E., & Martín-Acebes, M. A. (2016). Zika Virus: The Latest Newcomer. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00496>
- [83] Bifani, A. M., Siriphanitchakorn, T., & Choy, M. M. (2022). Intra-Host Diversity of Dengue Virus in Mosquito Vectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 888804. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.888804>
- [84] Gubler, D. J. (2011). Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Tropical Medicine and Health*, 39, S3-S11. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S05>
- [85] World Health Organization. (2025). Dengue and severe dengue. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acceso al sitio el día 22 de octubre de 2025.
- [86] Haider, N., Hasan, M. N., Onyango, J., Billah, M., Khan, S., Papakonstantinou, D., Paudyal, P., & Asaduzzaman, M. (2025). Global dengue epidemic worsens with record 14 million cases and 9000 deaths reported in 2024. *International Journal of Infectious Diseases*, 158, 107940. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2025.107940>
- [87] Ministerio de Salud de la República Argentina, Dirección de Epidemiología. (2025). Boletín Epidemiológico Nacional N°778, SE 41. <https://www.argentina.gob.ar/noticias/actualizacion-del-boletin-epidemiologico-nacional-de-la-se-ndeg-41>
- [88] <https://www.paho.org/en/arbo-portal/dengue-data-and-analysis/dengue-analysis-country>. Acceso al sitio el día 22 de octubre de 2025
- [89] Kantor, I. N. (2024). El dengue en Argentina y las estrategias actuales para su control. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 84(4), 787-790. [ISSN 1669-9106](https://doi.org/10.1016/j.medic.2024.07.001)

- [90] Fischer, S., De Majo, M. S., Quiroga, L., Paez, M., & Schweigmann, N. (2017). Long-term spatio-temporal dynamics of the mosquito *Aedes aegypti* in temperate Argentina. *Bulletin of Entomological Research*, 107(2), 225-233. <https://doi.org/10.1017/S0007485316000869>
- [91] Rigau-Pérez, J. G., Clark, G. G., Gubler, D. J., Reiter, P., Sanders, E. J., & Vorndam, A. V. (1998). Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet*, 352(9132), 971-977. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)12483-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)12483-7)
- [92] Rodrigo, C., Sigera, C., Fernando, D., & Rajapakse, S. (2021). Plasma leakage in dengue: A systematic review of prospective observational studies. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 1082. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06793-2>
- [93] Guzman, M. G., & Harris, E. (2015). Dengue. *The Lancet*, 385(9966), 453-465. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60572-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60572-9)
- [94] Normile, D. (2013). Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. *Science*, 342(6157), 415-415. <https://doi.org/10.1126/science.342.6157.415>
- [95] Mustafa, M. S., Rasotgi, V., Jain, S., & Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(1), 67-70. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.09.011>
- [96] OhAinle, M., Balmaseda, A., Macalalad, A. R., Tellez, Y., Zody, M. C., Saborío, S., Nuñez, A., Lennon, N. J., Birren, B. W., Gordon, A., Henn, M. R., & Harris, E. (2011). Dynamics of Dengue Disease Severity Determined by the Interplay Between Viral Genetics and Serotype-Specific Immunity. *Science Translational Medicine*, 3(114). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003084>
- [97] Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirirakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., Puttikhunt, C., Edwards, C., Duangchinda, T., Supasa, S., Chawansuntati, K., Malasit, P., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. (2010). Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans. *Science*, 328(5979), 745-748. <https://doi.org/10.1126/science.1185181>
- [98] Katzelnick, L. C., Narvaez, C., Arguello, S., Lopez Mercado, B., Collado, D., Ampie, O., Elizondo, D., Miranda, T., Bustos Carillo, F., Mercado, J. C., Latta, K., Schiller, A., Segovia-Chumbez, B., Ojeda, S., Sanchez, N., Plazaola, M., Coloma, J., Halloran, M. E., Premkumar, L., ... Harris, E. (2020). Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. *Science*, 369(6507), 1123-1128. <https://doi.org/10.1126/science.abb6143>
- [99] Paul, L. M., Carlin, E. R., Jenkins, M. M., Tan, A. L., Barcellona, C. M., Nicholson, C. O., Michael, S. F., & Isern, S. (2016). Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Clinical & Translational Immunology*, 5(12), e117. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.72>
- [100] Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509-520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- [101] Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 487-524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>

- [102] Paixão, E. S., Barreto, F., Da Glória Teixeira, M., Da Conceição N Costa, M., & Rodrigues, L. C. (2016). History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic review. *American Journal of Public Health*, 106(4), 606-612. <https://doi.org/10.2105/ajph.2016.303112>
- [103] World Health Organization. (2022). Zika virus. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>. Acceso al sitio el día 22 de octubre de 2025.
- [104] Barros, J. B. D. S., Silva, P. A. N. D., Koga, R. D. C. R., Gonzalez-Dias, P., Carmo Filho, J. R., Nagib, P. R. A., Coelho, V., Nakaya, H. I., Fonseca, S. G., & Pfrimer, I. A. H. (2018). Acute Zika Virus Infection in an Endemic Area Shows Modest Proinflammatory Systemic Immunoactivation and Cytokine-Symptom Associations. *Frontiers in Immunology*, 9, 821. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00821>
- [105] Cao-Lormeau, V.-M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., Vial, A.-L., Decam, C., Choumet, V., Halstead, S. K., Willison, H. J., Musset, L., Manuguerra, J.-C., Despres, P., Fournier, E., ... Ghawché, F. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *The Lancet*, 387(10027), 1531-1539. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)
- [106] Russo, F. B., Jungmann, P., & Beltrão-Braga, P. C. B. (2017). Zika infection and the development of neurological defects. *Cellular Microbiology*, 19(6), e12744. <https://doi.org/10.1111/cmi.12744>
- [107] França, G. V. A., Schuler-Faccini, L., Oliveira, W. K., Henriques, C. M. P., Carmo, E. H., Pedi, V. D., Nunes, M. L., Castro, M. C., Serruya, S., Silveira, M. F., Barros, F. C., & Victora, C. G. (2016). Congenital Zika virus syndrome in Brazil: A case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *The Lancet*, 388(10047), 891-897. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30902-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30902-3)
- [108] Lindenbach, B. D., Murray, C. L., Heinz-Jürgen, T., & Rice, C. M. (2013). Flaviviridae. En D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, V. R. Racaniello, & B. Roizman (Eds.), *Fields' Virology* (6th ed., Vol. 1, pp. 712-746). Lippincott Williams & Wilkins. [ISBN 978-1-4511-0563-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30902-3)
- [109] Alvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Filomatori, C. V., Fucito, S., Mondotte, J. A., & Gamarnik, A. V. (2006). Structural and functional analysis of dengue virus RNA. *Novartis Foundation Symposium*, 120-135. <https://doi.org/10.1002/0470058005.ch9>
- [110] Castilla, V., Piccini, L. E., & Damonte, E. B. (2015). Dengue Virus Entry and Trafficking: Perspectives as Antiviral Target for Prevention and Therapy. *Future Virology*, 10(5), 625-645. <https://doi.org/10.2217/fvl.15.35>
- [111] Ulgheri, F. M., Bernardes, B. G., & Lancellotti, M. (2025). Decoding Dengue: A Global Perspective, History, Role, and Challenges. *Pathogens*, 14(9), 954. <https://doi.org/10.3390/pathogens14090954>
- [112] Gebhard, L. G., Incicco, J. J., Smal, C., Gallo, M., Gamarnik, A. V., & Kaufman, S. B. (2014). Monomeric nature of dengue virus NS3 helicase and thermodynamic analysis of the interaction with single-stranded RNA. *Nucleic Acids Research*, 42(18), 11668-11686. <https://doi.org/10.1093/nar/gku812>
- [113] Ehreth, J. (2003). The value of vaccination: A global perspective. *Vaccine*, 21(27-30), 4105-4117. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00377-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00377-3)

- [114] Paz-Bailey, G., Adams, L. E., Deen, J., Anderson, K. B., & Katzelnick, L. C. (2024). Dengue. *The Lancet*, 403(10427), 667-682. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02576-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02576-X)
- [115] See, K. C. (2025). Dengue Vaccination: A Practical Guide for Clinicians. *Vaccines*, 13(2), 145. <https://doi.org/10.3390/vaccines13020145>
- [116] World Health Organization. (2017). Dengue vaccine: WHO position paper, July 2016 – recommendations. *Vaccine*, 35(9), 1200-1201. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.070>
- [117] Paz-Bailey, G., Adams, L., Wong, J. M., Poehling, K. A., Chen, W. H., McNally, V., Atmar, R. L., & Waterman, S. H. (2021). Dengue Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, United States, 2021. *MMWR. Recommendations and Reports*, 70(6), 1-16. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr7006a1>
- [118] Ministerio de Salud de la Nación. (2025). Plan estratégico de prevención y control de dengue. <https://www.argentina.gob.ar/salud/dengue/plan-estrategico-de-prevencion-y-control-de-dengue>. Acceso al sitio el día 24 de octubre de 2025.
- [119] Nogueira, M. L., Cintra, M. A. T., Moreira, J. A., Patiño, E. G., Braga, P. E., Tenório, J. C. V., De Oliveira Alves, L. B., Infante, V., Silveira, D. H. R., De Lacerda, M. V. G., Pereira, D. B., Da Fonseca, A. J., Gurgel, R. Q., Coelho, I. C.-B., Fontes, C. J. F., Marques, E. T. A., Romero, G. A. S., Teixeira, M. M., Siqueira, A. M., ... Santos, C. L. S. (2024). Efficacy and safety of Butantan-DV in participants aged 2–59 years through an extended follow-up: Results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3, multicentre trial in Brazil. *The Lancet Infectious Diseases*, 24(11), 1234-1244. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(24\)00376-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00376-1)
- [120] Anasir, M. I., Ramanathan, B., & Poh, C. L. (2020). Structure-Based Design of Antivirals against Envelope Glycoprotein of Dengue Virus. *Viruses*, 12(4), 367. <https://doi.org/10.3390/v12040367>
- [121] Almulhim, M., Ghasemian, A., Memariani, M., Karami, F., Yassen, A. S. A., Alexiou, A., Papadakis, M., & Batiha, G. E.-S. (2025). Drug repositioning as a promising approach for the eradication of emerging and re-emerging viral agents. *Molecular Diversity*. <https://doi.org/10.1007/s11030-025-11131-8>
- [122] Horga, A., Teixeira, M. M., Borthakur, S., Lynch, S., Chin, J., Ishak, L., Zhou, X., Pietropaolo, K., Belanger, B., Lei, Y., Huang, Q., & Hammond, J. (2025). Safety, Pharmacokinetics, and Activity of AT-752, a Novel Nucleotide Prodrug with Pan-Serotype Activity against Dengue Virus: A Phase 2, Randomized, Double-Blind Study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 113(3), 498-507. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.24-0696>
- [123] Wang, Y., Sun, L., Fernandes, L., Wang, Y.-H., Zou, J., Franklin, S. J., Hu, Y., Palmer, L. K., Yeung, J., Barriga, D., Russell, W. K., Moquin, S. A., Shi, P.-Y., Skepper, C., & Xie, X. (2025). Mechanistic insights into dengue virus inhibition by a clinical trial compound NITD-688. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 122(13), e2426922122. <https://doi.org/10.1073/pnas.2426922122>
- [124] Kakuda, T. N., Harasym, N., Buelens, A., Kahnt, A., Feys, C., Nilsson, A., Goeyvaerts, N., Baguet, T., Marez, T. D., Herrera-Taracena, G., & Rasschaert, F. (2025). Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Different Maintenance Dose Regimens of Mosnodenvir (JNJ-1802) in Healthy Adult Participants. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, cpdd.1574. <https://doi.org/10.1002/cpdd.1574>

- [125] Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 6986-6991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832193100>
- [126] De Wispelaere, M., Lian, W., Potisopon, S., Li, P.-C., Jang, J., Ficarro, S. B., Clark, M. J., Zhu, X., Kaplan, J. B., Pitts, J. D., Wales, T. E., Wang, J., Engen, J. R., Marto, J. A., Gray, N. S., & Yang, P. L. (2018). Inhibition of Flaviviruses by Targeting a Conserved Pocket on the Viral Envelope Protein. *Cell Chemical Biology*, 25(8), 1006-1016.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.05.011>
- [127] Leal, E. S., Adler, N. S., Fernández, G. A., Gebhard, L. G., Battini, L., Aucar, M. G., Videla, M., Monge, M. E., Hernández De Los Ríos, A., Acosta Dávila, J. A., Morell, M. L., Córdo, S. M., García, C. C., Gamarnik, A. V., Cavasotto, C. N., & Bollini, M. (2019). De novo design approaches targeting an envelope protein pocket to identify small molecules against dengue virus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 182, 111628. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111628>
- [128] Behnam, M. A. M., Nitsche, C., Boldescu, V., & Klein, C. D. (2016). The Medicinal Chemistry of Dengue Virus. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(12), 5622-5649. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01653>
- [129] Kumar, P. K. R. (2017). Systematic screening of viral entry inhibitors using surface plasmon resonance. *Reviews in Medical Virology*, 27(6), e1952. <https://doi.org/10.1002/rmv.1952>
- [130] Roy, A., Liu, Q., Yang, Y., Debnath, A. K., & Du, L. (2024). Envelope Protein-Targeting Zika Virus Entry Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(17), 9424. <https://doi.org/10.3390/ijms25179424>
- [131] <https://www.swissbioisostere.ch/>
- [132] Wirth, M., Zoete, V., Michielin, O., & Sauer, W. H. B. (2013). SwissBioisostere: A database of molecular replacements for ligand design. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D1137-D1143. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1059>
- [133] <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>
- [134] Cuzzo, A., Daina, A., Perez, M. A. S., Michielin, O., & Zoete, V. (2022). SwissBioisostere 2021: Updated structural, bioactivity and physicochemical data delivered by a reshaped web interface. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D1382-D1390. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1047>
- [135] Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- [136] Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8), 3891-3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>
- [137] Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

- [138] Joule, J. A., & Mills, K. (2010). The Diazines: Pyridazine, Pyrimidine, and Pyrazine: Reactions and Synthesis. En *Heterocyclic chemistry* (5th ed., pp. 253-288). Wiley. ISBN: 978-1-405-13300-5
- [139] Zhu, W., Liu, Y., Zhai, X., Wang, X., Zhu, Y., Wu, D., Zhou, H., Gong, P., & Zhao, Y. (2012). Design, synthesis and 3D-QSAR analysis of novel 2-hydrazinyl-4-morpholinothieno[3,2-d]pyrimidine derivatives as potential antitumor agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 162-175. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.09.002>
- [140] Zheng, M., Xu, C., Ma, J., Sun, Y., Du, F., Liu, H., Lin, L., Li, C., Ding, J., Chen, K., & Jiang, H. (2007). Synthesis and antitumor evaluation of a novel series of triaminotriazine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(4), 1815-1827. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.11.028>
- [141] Kadam, K. S., Gandhi, T., Reddy, M. M., Gupte, A., & Sharma, R. (2015). Synthesis, Characterization, and DGAT1 Inhibition of New 5-Piperazinethiazole and 5-Piperidinethiazole Analogs. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 52(3), 802-814. <https://doi.org/10.1002/jhet.2194>
- [142] Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 120(3), 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
- [143] Sakano, T., Mahamood, Md. I., Yamashita, T., & Fujitani, H. (2016). Molecular dynamics analysis to evaluate docking pose prediction. *Biophysics and Physicobiology*, 13(0), 181-194. https://doi.org/10.2142/biophysico.13.0_181
- [144] Guterres, H., & Im, W. (2020). Improving Protein-Ligand Docking Results with High-Throughput Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(4), 2189-2198. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00057>
- [145] Tan, K. P., Singh, K., Hazra, A., & Madhusudhan, M. S. (2021). Peptide bond planarity constrains hydrogen bond geometry and influences secondary structure conformations. *Current Research in Structural Biology*, 3, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2020.11.002>
- [146] Martinez, C. R., & Iverson, B. L. (2012). Rethinking the term “pi-stacking”. *Chemical Science*, 3(7), 2191. <https://doi.org/10.1039/c2sc20045g>
- [147] Burley, S. K., & Petsko, G. A. (1985). Aromatic-Aromatic Interaction: A Mechanism of Protein Structure Stabilization. *Science*, 229(4708), 23-28. <https://doi.org/10.1126/science.3892686>
- [148] Gohlke, H., & Case, D. A. (2004). Converging free energy estimates: MM-PB(GB)SA studies on the protein-protein complex Ras-Raf. *Journal of Computational Chemistry*, 25(2), 238-250. <https://doi.org/10.1002/jcc.10379>
- [149] Arnott, J. A., & Planey, S. L. (2012). The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(10), 863-875. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.714363>
- [150] Tarcsay, Á., & Keserű, G. M. (2013). Contributions of Molecular Properties to Drug Promiscuity: Miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(5), 1789-1795. <https://doi.org/10.1021/jm301514n>

- [151] Hughes, J. D., Blagg, J., Price, D. A., Bailey, S., DeCrescenzo, G. A., Devraj, R. V., Ellsworth, E., Fobian, Y. M., Gibbs, M. E., Gilles, R. W., Greene, N., Huang, E., Krieger-Burke, T., Loesel, J., Wager, T., Whiteley, L., & Zhang, Y. (2008). Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(17), 4872-4875. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.071>
- [152] Chen, C., Wu, Y., Wang, S.-T., Berisha, N., Manzari, M. T., Vogt, K., Gang, O., & Heller, D. A. (2023). Fragment-based drug nanoaggregation reveals drivers of self-assembly. *Nature Communications*, 14(1), 8340. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43560-0>
- [153] Ishikawa, M., & Hashimoto, Y. (2011). Improvement in Aqueous Solubility in Small Molecule Drug Discovery Programs by Disruption of Molecular Planarity and Symmetry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(6), 1539-1554. <https://doi.org/10.1021/jm101356p>
- [154] Hammons, G. (1997). Metabolism of carcinogenic heterocyclic and aromatic amines by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Carcinogenesis*, 18(4), 851-854. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.4.851>
- [155] Siraki, A. G., Chan, T. S., Galati, G., Teng, S., & O'Brien, P. J. (2002). N-oxidation of aromatic amines by intracellular oxidases. *Drug Metabolism Reviews*, 34(3), 549-564. <https://doi.org/10.1081/dmr-120005657>
- [156] Kim, D., & Guengerich, F. P. (2005). Cytochrome p450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 27-49. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.100010>
- [157] Chiodi, D., & Ishihara, Y. (2023). "Magic Chloro": Profound Effects of the Chlorine Atom in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(8), 5305-5331. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c02015>
- [158] Lin, F.-Y., & MacKerell, A. D. (2017). Do Halogen–Hydrogen Bond Donor Interactions Dominate the Favorable Contribution of Halogens to Ligand–Protein Binding? *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(28), 6813-6821. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b04198>
- [159] Chugunova, E., Frenna, V., Consiglio, G., Micheletti, G., Boga, C., Akyzbekov, N., Burilov, A., & Spinelli, D. (2020). On the Nucleophilic Reactivity of 4,6-Dichloro-5-nitrobenzofuroxan with Some Aliphatic and Aromatic Amines: Selective Nucleophilic Substitution. *The Journal of Organic Chemistry*, 85(21), 13472-13480. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c01502>
- [160] Shinada, N. K., De Brevern, A. G., & Schmidtke, P. (2019). Halogens in Protein–Ligand Binding Mechanism: A Structural Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(21), 9341-9356. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01453>
- [161] Lin, F.-Y., & MacKerell, A. D. (2017). Do Halogen–Hydrogen Bond Donor Interactions Dominate the Favorable Contribution of Halogens to Ligand–Protein Binding? *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(28), 6813-6821. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b04198>

- [162] Lu, Y., Wang, Y., & Zhu, W. (2010). Nonbonding interactions of organic halogens in biological systems: Implications for drug discovery and biomolecular design. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(18), 4543. <https://doi.org/10.1039/b926326h>
- [163] Srinivasan, J., Cheatham, T. E., Cieplak, P., Kollman, P. A., & Case, D. A. (1998). Continuum Solvent Studies of the Stability of DNA, RNA, and Phosphoramidate–DNA Helices. *Journal of the American Chemical Society*, 120(37), 9401-9409. <https://doi.org/10.1021/ja981844+>
- [164] Wang, E., Sun, H., Wang, J., Wang, Z., Liu, H., Zhang, J. Z. H., & Hou, T. (2019). End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. *Chemical Reviews*, 119(16), 9478-9508. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00055>
- [165] Kim, M. O., Blachly, P. G., Kaus, J. W., & McCammon, J. A. (2015). Protocols Utilizing Constant pH Molecular Dynamics to Compute pH-Dependent Binding Free Energies. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(3), 861-872. <https://doi.org/10.1021/jp505777n>
- [166] Novartis AG. (2015). 3,4-dihydro-1H-pyrido[4,3-b]indole derivatives and their use as pharmaceuticals (Patente internacional No. WO2015172203A1). World Intellectual Property Organization. <https://patents.google.com/patent/WO2015172203A1>
- [167] Warren, S. G., & Clayden, J. (2001). *Organic Chemistry*. In Oxford University Press eBooks. pp. 284–286. [ISBN 0-19-850346-6](https://doi.org/10.1017/9780198503466)
- [168] Chen, L., Chi, F., Wang, T., Wang, N., Li, W., Liu, K., Shu, X., Ma, X., & Xu, Y. (2018). The synthesis of 4-arylamido-2-arylamino-primidines as potent EGFR T790M/L858R inhibitors for NSCLC. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(23-24), 6087-6095. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.11.009>
- [169] Fischer-Durand, N., Rejeb, S. B., & Le Goffic, F. (1998). Synthesis of 4-Benzidinyloxy Butyric Acid: A Key Intermediate for Antibodies Production Against Benzidine. *Synthetic Communications*, 28(6), 963-970. <https://doi.org/10.1080/00397919808003065>
- [170] Freeman, W. M., Walker, S. J., & Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. *BioTechniques*, 26(1), 112-125. <https://doi.org/10.2144/99261rv01>
- [171] Rychlik, W., Spencer, W., & Rhoads, R. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*; *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6409-6412. <https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6409>
- [172] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- [173] Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., & Rasmussen, R. P. (1997). Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *BioTechniques*, 22(1), 130-138. <https://doi.org/10.2144/97221bi01>
- [174] Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., & Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-131>

- [175] Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., & Stewart, C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>
- [176] Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. En W. H. Yong (Ed.), *Biobanking* (Vol. 1897, pp. 299-311). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- [177] Sepúlveda, C. S., García, C. C., & Damonte, E. B. (2018). Determining the Virus Life-Cycle Stage Blocked by an Antiviral. En M. S. Salvato (Ed.), *Hemorrhagic Fever Viruses* (Vol. 1604, pp. 371-392). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6981-4_28
- [178] Kapuscinski, J. (1995). DAPI: A DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry*, 70(5), 220-233. <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>
- [179] Davis, R. L. (2020). Mechanism of Action and Target Identification: A Matter of Timing in Drug Discovery. *iScience*, 23(9), 101487. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101487>
- [180] Marquez, A. B., Vicente, J., Castro, E., Vota, D., Rodríguez-Varela, M. S., Castronuovo, P. a. L., Fuentes, G. M., Parise, A. R., Romorini, L., Alvarez, D. E., Bueno, C. A., Ramirez, C. L., Alaimo, A., & García, C. C. (2023). Broad-Spectrum antiviral effect of cannabidiol against enveloped and nonenveloped viruses. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 9(3), 751-765. <https://doi.org/10.1089/can.2023.0103>
- [181] Stryer, L. (1978). Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler. *Annual Review of Biochemistry*, 47(1), 819-846. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.47.070178.004131>
- [182] Sforzi, J., Palagi, L., & Aime, S. (2020). Liposome-Based Bioassays. *Biology*, 9(8), 202. <https://doi.org/10.3390/biology9080202>
- [183] Urade, R., Hayashi, Y., & Kito, M. (1988). Endosomes differ from plasma membranes in the phospholipid molecular species composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 946(1), 151-163. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(88\)90468-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(88)90468-3)
- [184] Struck, D. K., Hoekstra, D., & Pagano, R. E. (1981). Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry*, 20(14), 4093-4099. <https://doi.org/10.1021/bi00517a023>
- [185] Crampon, E., Covernton, E., Vaney, M. C., Dellarole, M., Sommer, S., Sharma, A., Haouz, A., England, P., Lepault, J., Duquerroy, S., Rey, F. A., & Barba-Spaeth, G. (2023). New insight into flavivirus maturation from structure/function studies of the yellow fever virus envelope protein complex. *mBio*, 14(5), e00706-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.00706-23>
- [186] <https://avantiresearch.com/product/810145>. Acceso al sitio el día 25 de septiembre de 2025.
- [187] <https://avantiresearch.com/product/810150>. Acceso al sitio el día 25 de septiembre de 2025.
- [188] Le Maire, M., Kwee, S., Andersen, J. P., & Møller, J. V. (1983). Mode of Interaction of Polyoxyethyleneglycol Detergents with Membrane Proteins. *European Journal of Biochemistry*, 129(3), 525-532. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07080.x>

- [189] Zhang, L.-J., Wang, S., Xia, L., Lv, C., Tang, H.-W., Liang, Z., Xiao, G., & Pang, D.-W. (2020). Lipid-Specific Labeling of Enveloped Viruses with Quantum Dots for Single-Virus Tracking. *mBio*, 11(3), e00135-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00135-20>
- [190] Ayala-Núñez, N. V., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2011). Monitoring virus entry into living cells using DiD-labeled dengue virus particles. *Methods*, 55(2), 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.07.009>
- [191] Fang, W.-Y., Ravindar, L., Rakesh, K. P., Manukumar, H. M., Shantharam, C. S., Alharbi, N. S., & Qin, H.-L. (2019). Synthetic approaches and pharmaceutical applications of chloro-containing molecules for drug discovery: A critical review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 173, 117-153. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.063>
- [192] Smith, B. R., Eastman, C. M., & Njardarson, J. T. (2014). Beyond C, H, O, and N! Analysis of the Elemental Composition of U.S. FDA Approved Drug Architectures: Miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(23), 9764-9773. <https://doi.org/10.1021/jm501105n>
- [193] Petukh, M., Stefl, S., & Alexov, E. (2013). The Role of Protonation States in Ligand-Receptor Recognition and Binding. *Current Pharmaceutical Design*, 19(23), 4182-4190. <https://doi.org/10.2174/1381612811319230004>
- [194] Chao, L. H., Jang, J., Johnson, A., Nguyen, A., Gray, N. S., Yang, P. L., & Harrison, S. C. (2018). How small-molecule inhibitors of dengue-virus infection interfere with viral membrane fusion. *eLife*, 7:e36461. <https://doi.org/10.7554/elife.36461>
- [195] Tai, C.-J., Li, C.-L., Tai, C.-J., Wang, C.-K., & Lin, L.-T. (2015). Early Viral Entry Assays for the Identification and Evaluation of Antiviral Compounds. *Journal of Visualized Experiments*, 104, 53124. <https://doi.org/10.3791/53124>
- [196] Prueksaritanont, T., & Tang, C. (2012). ADME of Biologics—What Have We Learned from Small Molecules? *The AAPS Journal*, 14(3), 410-419. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9353-6>
- [197] Von Delft, A., Hall, M. D., Kwong, A. D., Purcell, L. A., Saikatendu, K. S., Schmitz, U., Tallarico, J. A., & Lee, A. A. (2023). Accelerating antiviral drug discovery: Lessons from COVID-19. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(7), 585-603. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00692-8>
- [198] Chaira, T., Subramani, C., & Barman, T. K. (2023). ADME, Pharmacokinetic Scaling, Pharmacodynamic and Prediction of Human Dose and Regimen of Novel Antiviral Drugs. *Pharmaceutics*, 15(4), 1212. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041212>
- [199] Di, L., & Kerns, E. H. (2009). Stability Challenges in Drug Discovery. *Chemistry & Biodiversity*, 6(11), 1875-1886. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900061>
- [200] Talevi, A., Quiroga, P., & Ruiz, M. E. (2016). Procesos biofarmacéuticos: Su relación con el diseño de formas farmacéuticas y el éxito de la farmacoterapia. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/51907>
- [201] Ruiz-García, A., Bermejo, M., Moss, A., & Casabo, V. G. (2008). Pharmacokinetics in Drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(2), 654-690. <https://doi.org/10.1002/jps.21009>

- [202] Jang, G. R., Harris, R. Z., & Lau, D. T. (2001). Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery research. *Medicinal Research Reviews*, 21(5), 382-396. <https://doi.org/10.1002/med.1015>
- [203] Nordberg, M., Duffus, J., & Templeton, D. M. (2004). Glossary of terms used in toxicokinetics (IUPAC Recommendations 2003). *Pure and Applied Chemistry*, 76(5), 1033-1082. <https://doi.org/10.1351/pac200476051033>
- [204] Słoczyńska, K., Gunia-Krzyżak, A., Koczurkiewicz, P., Wójcik-Pszczola, K., Żelaszczyk, D., Popiół, J., & Pękala, E. (2019). Metabolic stability and its role in the discovery of new chemical entities. *Acta Pharmaceutica*, 69(3), 345-361. <https://doi.org/10.2478/acph-2019-0024>
- [205] Laine, R. (2008). Metabolic Stability: Main Enzymes Involved and Best Tools To Assess It. *Current Drug Metabolism*, 9(9), 921-927. <https://doi.org/10.2174/138920008786485146>
- [206] Jia, L., & Liu, X. (2007). The Conduct of Drug Metabolism Studies Considered Good Practice (II): In Vitro Experiments. *Current Drug Metabolism*, 8(8), 822-829. <https://doi.org/10.2174/138920007782798207>
- [207] Walker, M. A. (2017). Improvement in aqueous solubility achieved via small molecular changes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(23), 5100-5108. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.041>
- [208] T. Garcia-Sosa, A., Maran, U., & Hetenyi, C. (2012). Molecular Property Filters Describing Pharmacokinetics and Drug Binding. *Current Medicinal Chemistry*, 19(11), 1646-1662. <https://doi.org/10.2174/092986712799945021>
- [209] Alsenz, J., & Kansy, M. (2007). High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7), 546-567. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.007>
- [210] Elder, D., & Holm, R. (2013). Aqueous solubility: Simple predictive methods (in silico, in vitro and bio-relevant approaches). *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.041>
- [211] Stuart, M., & Box, K. (2005). Chasing Equilibrium: Measuring the Intrinsic Solubility of Weak Acids and Bases. *Analytical Chemistry*, 77(4), 983-990. <https://doi.org/10.1021/ac048767n>
- [212] Veseli, A., Žakelj, S., & Kristl, A. (2019). A review of methods for solubility determination in biopharmaceutical drug characterisation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(11), 1717-1724. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1665062>
- [213] World Health Organization. (2018). Protocol to conduct equilibrium solubility experiments for the purpose of biopharmaceutics classification system-based classification of active pharmaceutical ingredients for biowaiver (Working document QAS/17.699/Rev.2). https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/guidelines/en/. Acceso al sitio el día 9 de septiembre de 2025.
- [214] Potthast, H., Dressman, J. B., Junginger, H. E., Midha, K. K., Oeser, H., Shah, V. P., Vogelpoel, H., & Barends, D. M. (2005). Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Ibuprofen. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(10), 2121-2131. <https://doi.org/10.1002/jps.20444>

- [215] Kincl, M., Meleh, M., Veber, M., & Vrečer, F. (2004). Study of physicochemical parameters affecting the release of diclofenac sodium from lipophilic matrix tablets. *Acta Chimica Slovenica*, 51(3), 409-425. Recuperado de <https://acta.chem-soc.si/>
- [216] Khan, M. Z. I., Raušl, D., Zanoški, R., Zidar, S., Mikulčić, J. H., Krizmanić, L., Eškinja, M., Mildner, B., & Knežević, Z. (2004). Classification of Loratadine Based on the Biopharmaceutics Drug Classification Concept and Possible in Vitro-in Vivo Correlation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(10), 1630-1635. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1630>
- [217] Streubel, A., Siepmann, J., Dashevsky, A., & Bodmeier, R. (2000). pH-independent release of a weakly basic drug from water-insoluble and -soluble matrix tablets. *Journal of Controlled Release*, 67(1), 101-110. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00200-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00200-5)
- [218] European Pharmacopoeia: Free access to supportive pharmacopoeial texts in the field of vaccines for human use during the coronavirus disease (COVID-19) pandemic (Updated package – October 2020). Council of Europe. Acceso al sitio [European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare](https://www.edqm.eu/en/european-directorate-for-the-quality-of-medicines-healthcare) el día 25 de agosto de 2025
- [219] Vrbanac, J., & Slauter, R. (2017). ADME in Drug Discovery. En *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development* (pp. 39-67). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803620-4.00003-7>
- [220] Sugano, K., Hamada, H., Machida, M., & Ushio, H. (2001). High Throughput Prediction of Oral Absorption: Improvement of the Composition of the Lipid Solution Used in Parallel Artificial Membrane Permeation Assay. *SLAS Discovery*, 6(3), 189-196. <https://doi.org/10.1177/108705710100600309>
- [221] Kansy, M., Senner, F., & Gubernator, K. (1998). Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(7), 1007-1010. <https://doi.org/10.1021/jm970530e>
- [222] Wohnsland, F., & Faller, B. (2001). High-Throughput Permeability pH Profile and High-Throughput Alkane/Water log P with Artificial Membranes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(6), 923-930. <https://doi.org/10.1021/jm001020e>
- [223] Bermejo, M., Avdeef, A., Ruiz, A., Nalda, R., Ruell, J. A., Tsinman, O., González, I., Fernández, C., Sánchez, G., Garrigues, T. M., & Merino, V. (2004). PAMPA — A drug absorption in vitro model: 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(4), 429-441. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2003.10.009>
- [224] Di, L., Kerns, E. H., Fan, K., McConnell, O. J., & Carter, G. T. (2003). High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38(3), 223-232. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(03)00012-6)
- [225] [Parallel Artificial Membrane Permeability Assay Kit \(PAMPA-096\)](#) [Documento técnico]. Acceso al sitio el día 28 de agosto de 2025.

- [226] Liu, H., Sabus, C., Carter, G. T., Du, C., Avdeef, A., & Tischler, M. (2003). In Vitro Permeability of Poorly Aqueous Soluble Compounds Using Different Solubilizers in the PAMPA Assay with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Detection. *Pharmaceutical Research*, 20(11), 1820-1826. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000003380.44755.5a>
- [227] [Membrane Permeability Services](#) [Documento técnico]. Acceso al sitio el día 28 de agosto de 2025.
- [228] Fujikawa, M., Ano, R., Nakao, K., Shimizu, R., & Akamatsu, M. (2005). Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: Application to prediction of Caco-2 cell permeability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(15), 4721-4732. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.076>
- [229] Hartman, D. A. (2002). Determination of the stability of drugs in plasma. *Current Protocols in Pharmacology*, 19(1). <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0706s19>
- [230] Asafu-Adjaye, E. B., Faustino, P. J., Tawakkul, M. A., Anderson, L. W., Yu, L. X., Kwon, H., & Volpe, D. A. (2007). Validation and application of a stability-indicating HPLC method for the in vitro determination of gastric and intestinal stability of venlafaxine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(5), 1854-1859. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.12.035>
- [231] Xiang, D., Wang, C., Wang, W., Shi, C., Xiong, W., Wang, M., & Fang, J. (2017). Gastrointestinal stability of dihydromyricetin, myricetin, and myricitrin: An in vitro investigation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(6), 704-711. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1276518>
- [232] Kerns, E. (2003). Pharmaceutical profiling in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 8(7), 316-323. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02649-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02649-7)
- [233] Di, L., & Obach, R. S. (2015). Addressing the Challenges of Low Clearance in Drug Research. *The AAPS Journal*, 17(2), 352-357. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9691-7>
- [234] Projean, D., Baune, B., Farinotti, R., Flinois, J.-P., Beaune, P., Taburet, A.-M., & Ducharme, J. (2003). In vitro metabolism of chloroquine: identification of CYP2c8, CYP3a4, and CYP2d6 as the main isoforms catalyzing n-desethylchloroquine formation. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(6), 748-754. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.6.748>
- [235] Wishart, D. S., Tian, S., Allen, D., Oler, E., Peters, H., Lui, V. W., Gautam, V., Djoumbou-Feunang, Y., Greiner, R., & Metz, T. O. (2022). BioTransformer 3.0 - A web server for accurately predicting metabolic transformation products. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W115-W123. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac313>
- [236] Matlock, M. K., Hughes, T. B., & Swamidass, S. J. (2015). XenoSite server: A web-available site of metabolism prediction tool. *Bioinformatics*, 31(7), 1136-1137. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu761>
- [237] Kerns, E., & Di, L. (2002). Multivariate Pharmaceutical Profiling for Drug Discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(1), 87-98. <https://doi.org/10.2174/1568026023394470>
- [238] Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3), 413-420. <https://doi.org/10.1023/a:1016212804288>

- [239] U.S. Food and Drug Administration. (2017). Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system: Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). <https://collections.nlm.nih.gov/catalog/nlm:nlmuid-101720038-pdf>
- [240] Varma, M. V., Gardner, I., Steyn, S. J., Nkansah, P., Rotter, C. J., Whitney-Pickett, C., Zhang, H., Di, L., Cram, M., Fenner, K. S., & El-Kattan, A. F. (2012). pH-Dependent Solubility and Permeability Criteria for Provisional Biopharmaceutics Classification (BCS and BDDCS) in Early Drug Discovery. *Molecular Pharmaceutics*, 9(5), 1199-1212. <https://doi.org/10.1021/mp2004912>
- [241] Baranczewski, P., Stańczyk, A., Sundberg, K., Svensson, R., Wallin, A., Jansson, J., Garberg, P., & Postlind, H. (2006). Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. *PubMed*, 58(4), 453-472. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16963792>
- [242] Davies, B., & Morris, T. (1993). Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharmaceutical Research*, 10(7), 1093-1095. <https://doi.org/10.1023/a:1018943613122>
- [243] McNaney, C. A., Drexler, D. M., Hnatyshyn, S. Y., Zvyaga, T. A., Knipe, J. O., Belcastro, J. V., & Sanders, M. (2008). An Automated Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Process to Determine Metabolic Stability Half-Life and Intrinsic Clearance of Drug Candidates by Substrate Depletion. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 6(1), 121-129. <https://doi.org/10.1089/adt.2007.103>
- [244] Bardiot, D., Koukni, M., Smets, W., Carlens, G., McNaughton, M., Kaptein, S., Dallmeier, K., Chaltin, P., Neyts, J., & Marchand, A. (2018). Discovery of Indole Derivatives as Novel and Potent Dengue Virus Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(18), 8390-8401. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00913>
- [245] Zhang, Z., & Tang, W. (2018). Drug metabolism in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(5), 721-732. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.04.003>
- [246] Zhou, Z., Khaliq, M., Suk, J.-E., Patkar, C., Li, L., Kuhn, R. J., & Post, C. B. (2008). Antiviral Compounds Discovered by Virtual Screening of Small-Molecule Libraries against Dengue Virus E Protein. *ACS Chemical Biology*, 3(12), 765-775. <https://doi.org/10.1021/cb800176t>
- [247] Antanasijevic, A., Kingsley, C., Basu, A., Bowlin, T. L., Rong, L., & Caffrey, M. (2016). Application of virus-like particles (VLP) to NMR characterization of viral membrane protein interactions. *Journal of Biomolecular NMR*, 64(3), 255-265. <https://doi.org/10.1007/s10858-016-0025-1>
- [248] Liu, H.-Y., & Yang, P. L. (2021). Small-Molecule Inhibition of Viral Fusion Glycoproteins. *Annual Review of Virology*, 8(1), 459-489. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-022221-063725>

ANEXO

- Anexo I

Listado de reemplazos estructurales propuestos por la plataforma SwissBioisostere. Se muestran únicamente los reemplazos con frecuencia mayor a 1.

Query fragment: [*:1]Nc1ccnc(N[*:2])n1

Candidate Fragments	Frequency	# Better	# Similar	# Worse	$\Delta \log P$	ΔtPSA	ΔMW
<chem>Fc1cnc(N[*:2])nc1N[*:1]</chem>	55 (#1)	35	20	0	1.51	0.00	17.99
<chem>[*:1]Nc1ncnc(N[*:2])n1</chem>	45 (#2)	2	14	29	-0.11	12.89	0.99
<chem>Clc1cnc(N[*:2])nc1N[*:1]</chem>	43 (#3)	26	17	0	0.61	0.00	34.45
<chem>[*:1]Nc1cccc(N[*:2])n1</chem>	38 (#4)	9	20	9	0.00	0.00	0.00
<chem>Brc1cnc(N[*:2])nc1N[*:1]</chem>	33 (#5)	16	15	2	1.75	0.00	78.90
<chem>[*:1]Nc1cc(N[*:2])ncn1</chem>	31 (#6)	2	5	24	-0.09	0.00	0.00
<chem>Cc1cnc(N[*:2])nc1N[*:1]</chem>	29 (#7)	8	16	5	0.51	0.00	14.02
<chem>lc1cnc(N[*:2])nc1N[*:1]</chem>	27 (#8)	12	15	0	0.93	0.00	125.89
<chem>Fc1cnc(N[*:1])nc1N[*:2]</chem>	19 (#9)	9	10	0	0.14	0.00	17.99
<chem>CN([*:1])c1ccnc(N[*:2])n1</chem>	14 (#10)	9	2	3	0.29	-8.79	14.03
<chem>Cc1cc(N[*:1])nc(N[*:2])n1</chem>	14 (#11)	6	8	0	0.13	0.00	14.03
<chem>[*:1]Nc1cc(N[*:2])ccn1</chem>	9 (#12)	4	3	2	0.02	-12.89	-0.98
<chem>[*:1]Nc1ccnc(NC[*:2])n1</chem>	9 (#13)	3	2	4	-0.43	0.00	14.03
<chem>[*:1]Nc1ccnc(N[*:2])c1</chem>	9 (#14)	2	6	1	0.03	-12.89	-0.99
<chem>FC(F)(F)c1cnc(N[*:2])nc1N[*:1]</chem>	7 (#15)	6	1	0	0.88	0.00	68.00
<chem>[*:1]Nc1cncc(N[*:2])c1</chem>	7 (#16)	0	3	4	-0.57	-12.89	-0.98
<chem>Brc1cnc(N[*:1])nc1N[*:2]</chem>	5 (#17)	4	1	0	0.77	0.00	78.89
<chem>CN([*:2])c1cccc(N[*:1])n1</chem>	5 (#18)	2	3	0	0.63	-8.79	14.02
<chem>[*:1]Nc1nc(N[*:2])ncc1C#N</chem>	5 (#19)	2	1	2	-0.14	23.79	25.01
<chem>Cc1cnc(N[*:1])nc1N[*:2]</chem>	5 (#20)	1	4	0	0.51	0.00	14.03
<chem>[*:1]Nc1ccnc(O[*:2])n1</chem>	5 (#21)	0	3	2	0.83	-2.80	0.99
<chem>FC(F)(F)c1cnc(N[*:1])nc1N[*:2]</chem>	4 (#22)	3	1	0	0.87	0.00	68.00
<chem>Nc1cnc(N[*:2])nc1N[*:1]</chem>	4 (#23)	1	1	2	-1.02	26.02	15.02
<chem>[*:1]N(CC#N)c1ccnc(N[*:2])n1</chem>	4 (#24)	1	2	1	-0.24	15.00	39.04
<chem>[*:1]Nc1nc(N[*:2])nc2ccccc12</chem>	4 (#25)	0	4	0	1.45	0.00	50.06
<chem>[*:1]c1ccccc1Nc1ccnc(N[*:2])n1</chem>	4 (#26)	0	0	4	1.66	0.00	76.09
<chem>Clc1cnc(N[*:1])nc1N[*:2]</chem>	3 (#27)	3	0	0	0.60	0.00	34.45
<chem>CCN([*:2])c1cccc(N[*:1])n1</chem>	3 (#28)	1	2	0	0.99	-8.79	28.06
<chem>COc1cnc(N[*:2])nc1N[*:1]</chem>	3 (#29)	1	2	0	-0.16	9.23	30.02

[*:1]Oc1ccnc(N[*:2])n1	3 (#30)	1	0	2	0.37	-2.80	0.99
[O-][N+](=O)c1cnc(N[*:2])nc1N[*:1]	3 (#31)	1	2	0	1.24	43.14	45.00
BrC1cnc(NC[*:2])nc1N[*:1]	3 (#32)	0	3	0	0.52	0.00	92.92
CN(C)CCOc1cc(N[*:1])nc(N[*:2])n1	2 (#33)	2	0	0	0.45	12.47	87.12
CN1CCN(CC1)c1cc(N[*:1])nc(N[*:2])n1	2 (#34)	2	0	0	0.54	6.48	98.15
Nc1n[nH]c2nnc([*:1])c([*:2])c12	2 (#35)	2	0	0	-1.29	30.64	25.01
[*:1]Nc1cc(nc(N[*:2])n1)N1CCOCC1	2 (#36)	2	0	0	0.48	12.47	85.11
[*:1]Nc1ccnc(Nc2ccc([*:2])cc2)n1	2 (#37)	2	0	0	1.65	0.00	76.10
[*:1]c1c(nnn1C[*:2])c1ccc2[nH]ncc2c1	2 (#38)	2	0	0	0.47	9.55	89.09
[*:1]c1n[nH]c2ccc(cc12)-c1cn(C[*:2])nn1	2 (#39)	2	0	0	0.93	9.55	89.09
FC(F)(F)CCCN([*:1])c1ccnc(N[*:2])n1	2 (#40)	1	0	1	1.74	-8.79	110.08
[*:1]N(CC#C)c1ccnc(N[*:2])n1	2 (#41)	1	1	0	0.45	-8.79	38.05
[*:1]Nc1nc(N[*:2])nc2[nH]cnc12	2 (#42)	1	1	0	-0.34	28.68	40.03
CCN([*:1])c1ccnc(N[*:2])n1	2 (#43)	0	0	2	0.66	-8.79	28.05
CCOC(=O)c1cnc(N[*:2])nc1N[*:1]	2 (#44)	0	2	0	1.66	26.30	72.06
COCCN([*:1])c1ccnc(N[*:2])n1	2 (#45)	0	1	1	0.18	0.44	58.08
Clc1nc(N[*:2])nc(N[*:1])c1Cl	2 (#46)	0	0	2	2.93	0.00	68.89
Nc1nc(N[*:1])cc(N[*:2])n1	2 (#47)	0	1	1	-0.23	26.02	15.02
OCCN([*:1])c1ccnc(N[*:2])n1	2 (#48)	0	1	1	-0.47	11.44	44.06
[*:1]N(CCC#N)c1ccnc(N[*:2])n1	2 (#49)	0	2	0	0.00	15.00	53.07
[*:1]Nc1cc(nc(N[*:2])n1)-c1ccccc1	2 (#50)	0	0	2	2.03	0.00	76.10
[*:1]Nc1ccnc(Nc2cc([*:2])[nH]n2)c1	2 (#51)	0	2	0	1.09	15.79	65.08

These data have been generated by SwissBioisostere version 2021, 06.10.2023.

SwissBioisostere is available under the CC-BY 4.0 Creative Commons 4.0 International License.

- Anexo II

Listado de propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas predichas por la plataforma SwissADME para moléculas seleccionadas.

Molecule	Canonical SMILES	Formula	MW	#Heavy atoms	Fraction Csp3	#Rotatable bonds	#H-bond acceptors
Molecule 1	<chem>C1CCN(CC1)CCNc1cccc(n1)Nc1ccc(cc1)c1ccccc1</chem>	C23H27N5	37349	28	30	7	3
Molecule 2	<chem>CC1(C)CC(Nc2cccc(n2)Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)CC(N1)(C)C</chem>	C25H31N5	40155	30	36	5	3
Molecule 3	<chem>Cc1cc(Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)nc(n1)NCCN1CCCCC1</chem>	C24H29N5	38752	29	33	7	3
Molecule 4	<chem>Cc1cc(Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)nc(n1)NC1CC(C)(C)NC(C1)(C)C</chem>	C26H33N5	41557	31	38	5	3
Molecule 5	<chem>FC(c1cc(Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)nc(n1)NCCN1CCCCC1)(F)F</chem>	C24H26F3N5	44149	32	33	8	6
Molecule 6	<chem>CC1(C)CC(Nc2nc(Nc3ccc(cc3)c3ccccc3)cc(n2)C(F)(F)F)CC(N1)(C)C</chem>	C26H30F3N5	46955	34	38	6	6
Molecule 7	<chem>C1CCN(CC1)CCNc1nc(Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)cc(n1)C1CC1</chem>	C26H31N5	41356	31	38	8	3
Molecule 8	<chem>CC1(C)CC(Nc2nc(Nc3ccc(cc3)c3ccccc3)cc(n2)C2CC2)CC(N1)(C)C</chem>	C28H35N5	44161	33	43	6	3
Molecule 9	<chem>N#Cc1cc(Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)nc(n1)NCCN1CCCCC1</chem>	C24H26N6	39850	30	29	7	4
Molecule 10	<chem>N#Cc1cc(Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)nc(n1)NC1CC(C)(C)NC(C1)(C)C</chem>	C26H30N6	42656	32	35	5	4
Molecule 11	<chem>Clc1cc(Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)nc(n1)NCCN1CCCCC1</chem>	C23H26ClN5	40794	29	30	7	3
Molecule 12	<chem>Clc1cc(Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)nc(n1)NC1CC(C)(C)NC(C1)(C)C</chem>	C25H30ClN5	43599	31	36	5	3
Molecule 13	<chem>C1CCN(CC1)CCNc1nc(Nc1ccc(cc1)c1ccccc1</chem>	C22H26N6	37448	28	32	7	4
Molecule 14	<chem>CC1(C)CC(Nc2nnc(n2)Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)CC(N1)(C)C</chem>	C24H30N6	40254	30	38	5	4
Molecule 15	<chem>C1CCN(CC1)CCNc1cccc(n1)Nc1ccc(cc1)c1ccccc1</chem>	C24H28N4	37251	28	29	7	2
Molecule 16	<chem>CC1(C)CC(Nc2ccc(cc2)Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)CC(N1)(C)C</chem>	C26H32N4	40056	30	35	5	2
Molecule 17	<chem>CNc1cc(Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)nc(n1)NCCN1CCCCC1</chem>	C24H30N6	40254	30	33	8	3
Molecule 18	<chem>CNc1cc(Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)nc(n1)NC1CC(C)(C)NC(C1)(C)C</chem>	C26H34N6	43059	32	38	6	3
Molecule 19	<chem>C1CCN(CC1)CCNc1nc(Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)cc(n1)NC1CC1</chem>	C26H32N6	42857	32	38	9	3
Molecule 20	<chem>CC1(C)CC(Nc2nc(Nc3ccc(cc3)c3ccccc3)cc(n2)NC2CC2)CC(N1)(C)C</chem>	C28H36N6	45663	34	43	7	3
Molecule 21	<chem>C1CCN(CC1)CCNc1nc(Nc2ccc(cc2)c2ccccc2)c2c(n1)ccs2</chem>	C25H27N5S	42958	31	28	7	3
Molecule 22	<chem>CC1(C)CC(Nc2nc(Nc3ccc(cc3)c3ccccc3)c3c(n2)ccs3)CC(N1)(C)C</chem>	C27H31N5S	45763	33	33	5	3
Molecule 23	<chem>O=C(Cn1nnc(c1)Nc1ccc(cc1)c1ccccc1)NCCN1CCCCC1</chem>	C23H28N6O	40451	30	35	9	4
Molecule 24	<chem>O=C(Cn1nnc(c1)Nc1ccc(cc1)c1ccccc1)NC1CC(C)(C)NC(C1)(C)C</chem>	C25H32N6O	43256	32	40	7	4

#H-bond donors	MR	TPSA	Log P	Solubility (mg/ml)	Class	GI absorption	Lipinski #violations	PAINS #alerts	Synthetic Accessibility
2	11986	5308	386	0,207	Moderately soluble	High	0	0	314
3	12945	6187	446	0,059	Moderately soluble	High	0	0	341
2	12482	5308	431	0,102	Moderately soluble	High	0	0	334
3	13442	6187	481	0,0289	Poorly soluble	High	0	0	361
2	12486	5308	499	0,0326	Poorly soluble	High	0	0	351
3	13445	6187	545	0,00903	Poorly soluble	Low	1	0	378
2	13232	5308	465	0,0722	Moderately soluble	High	0	0	364
3	14192	6187	518	0,0202	Poorly soluble	High	1	0	390
2	12457	7687	385	0,152	Moderately soluble	High	0	0	342
3	13417	8566	429	0,0435	Moderately soluble	High	0	0	368
2	12487	5308	458	0,0352	Poorly soluble	High	0	0	326
3	13446	6187	497	0,0101	Poorly soluble	High	1	0	352
2	11765	6597	353	0,282	Moderately soluble	High	0	0	283
3	12725	7476	412	0,0814	Moderately soluble	High	0	0	310
2	12206	4019	443	0,0815	Moderately soluble	High	0	0	316
3	13166	4898	493	0,0232	Poorly soluble	High	1	0	343
3	12916	6511	399	0,116	Moderately soluble	High	0	0	346
4	13876	7390	438	0,0326	Poorly soluble	High	0	0	373
3	13666	6511	439	0,0469	Moderately soluble	High	0	0	364
4	14626	7390	478	0,0132	Poorly soluble	High	0	0	390
2	13524	8132	497	0,0201	Poorly soluble	High	1	0	375
3	14484	9011	556	0,00567	Poorly soluble	Low	1	0	401
2	12242	7508	290	1,64	Moderately soluble	High	0	0	353
3	13201	8387	348	0,46	Moderately soluble	High	0	0	377

- Anexo III

Espectros de RMN obtenidos para las moléculas sintetizadas. Los espectros se muestran en orden numérico creciente: del compuesto **3** al compuesto **47**.

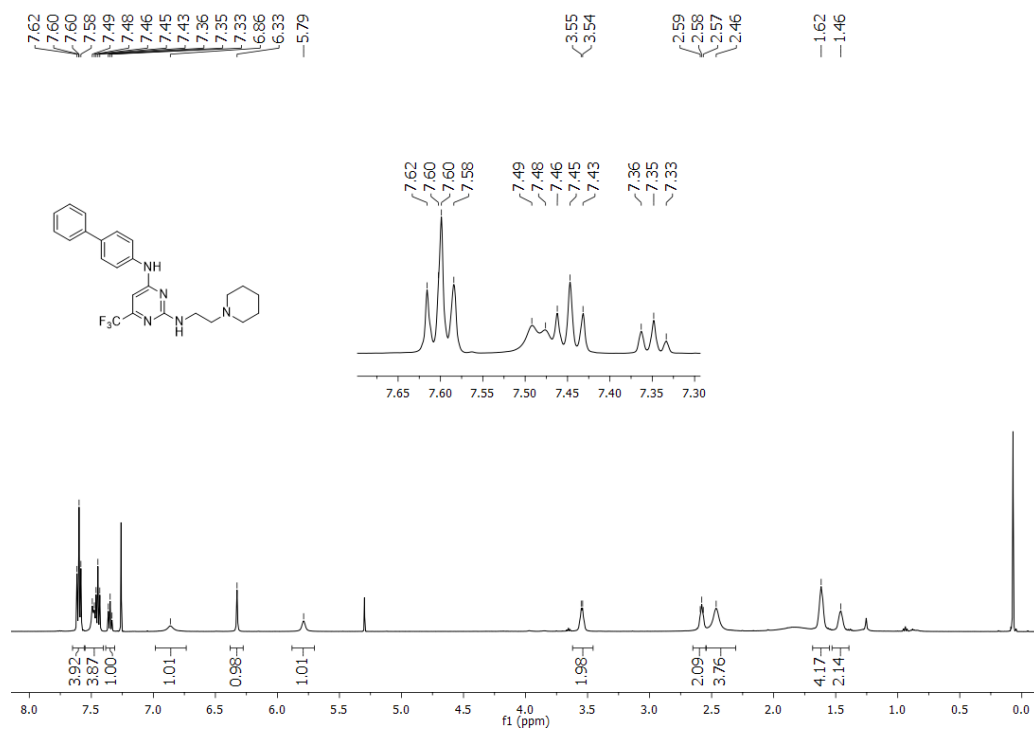


Figura A1. Espectro de ¹H-RMN del compuesto **3**.

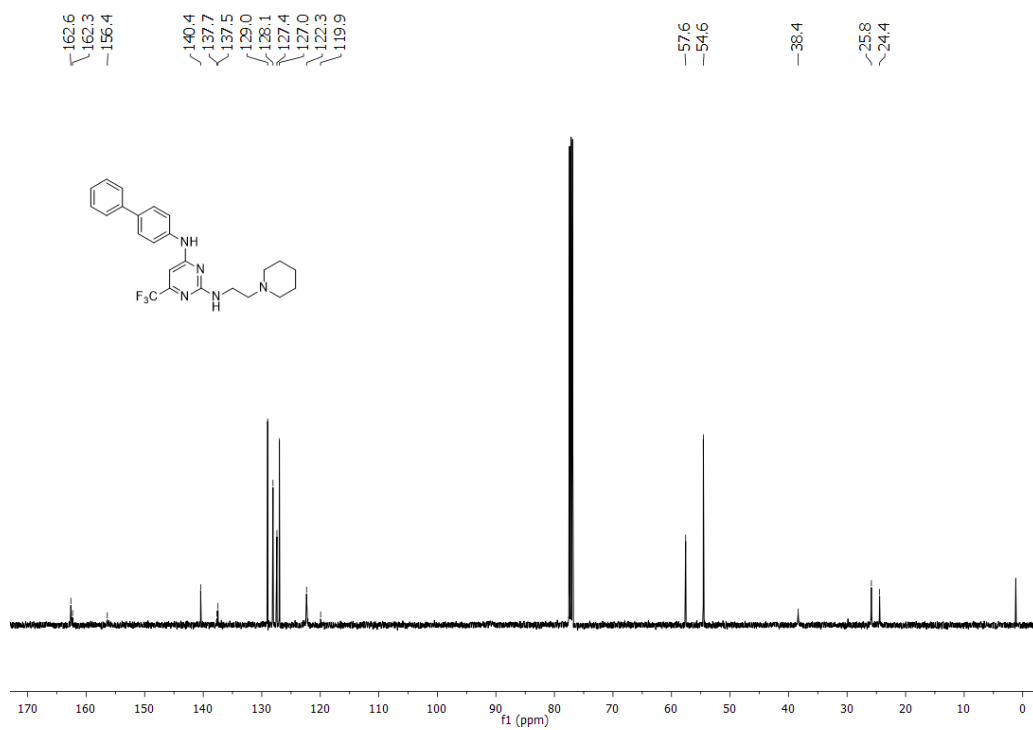


Figura A2. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 3.

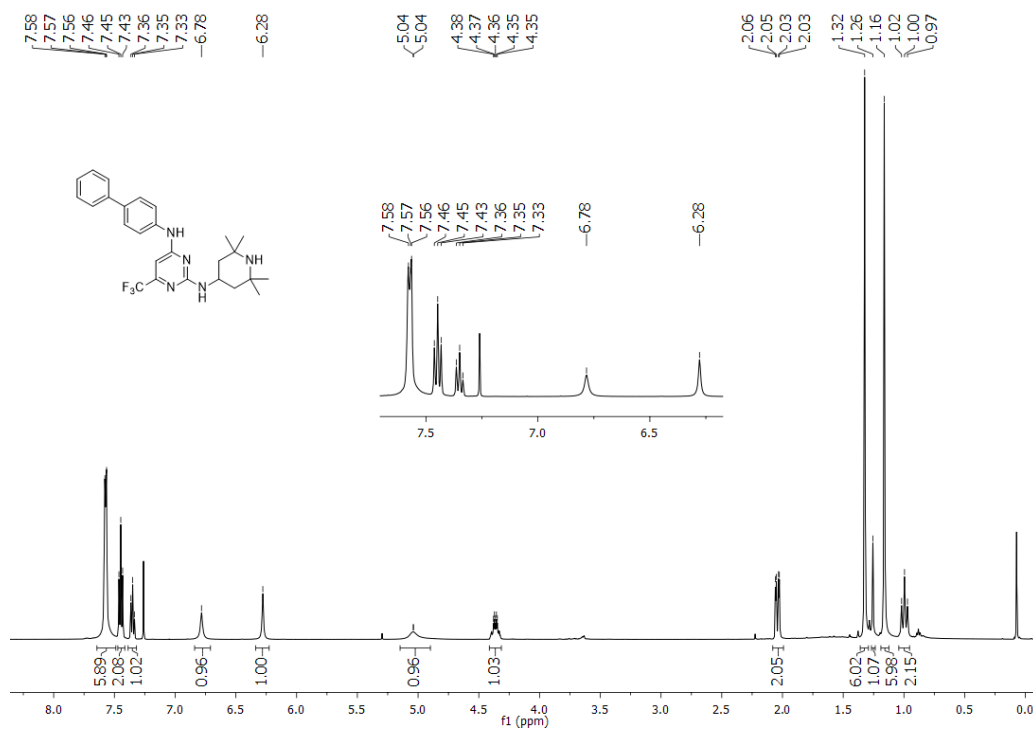


Figura A3. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 4.

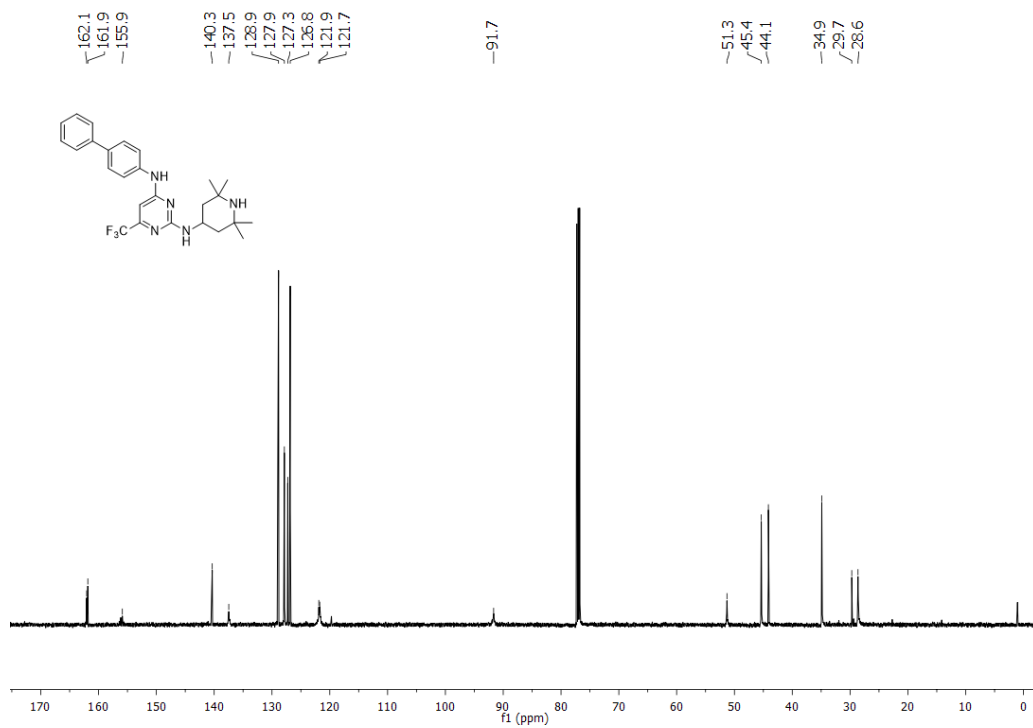


Figura A4. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 4.

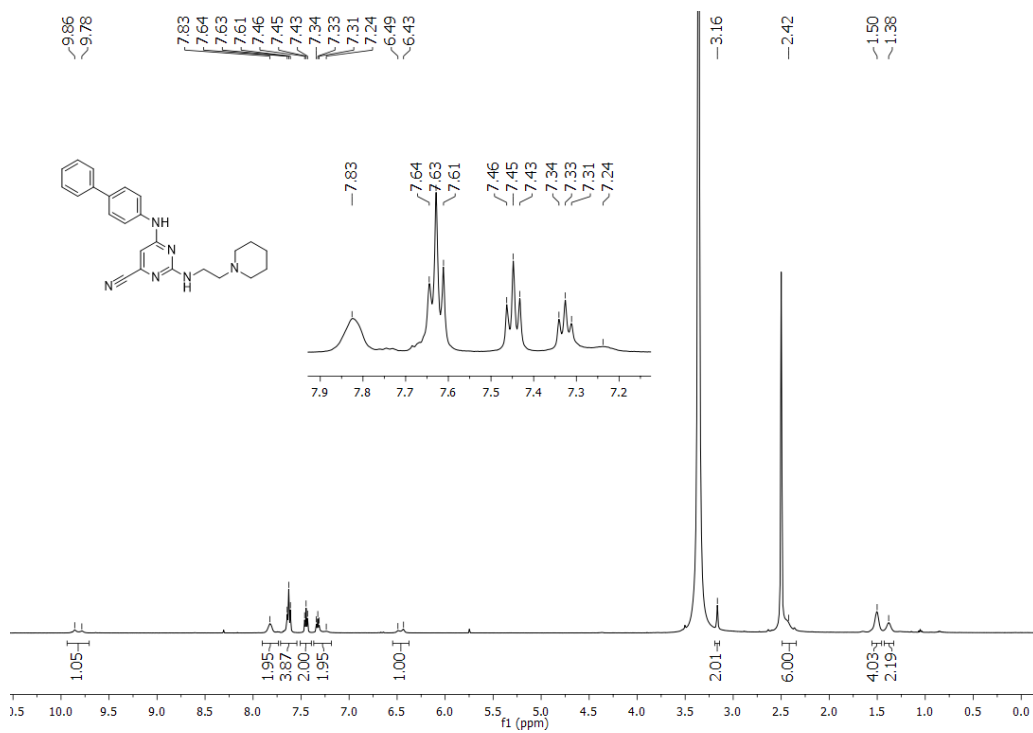


Figura A5. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 5.

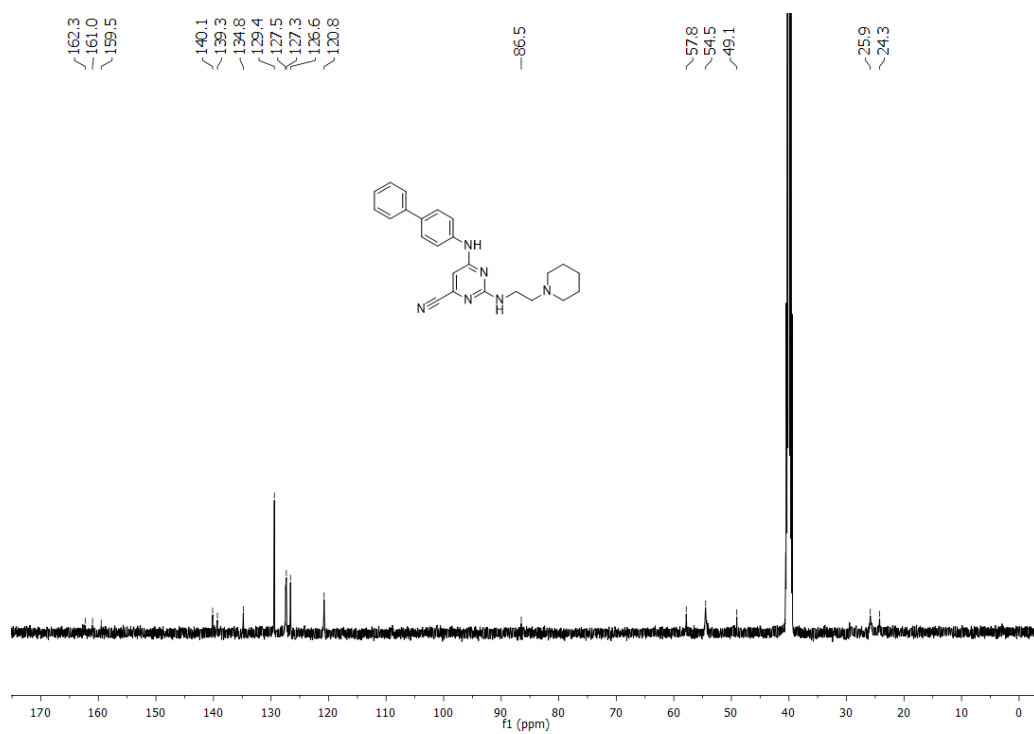


Figura A6. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 5.

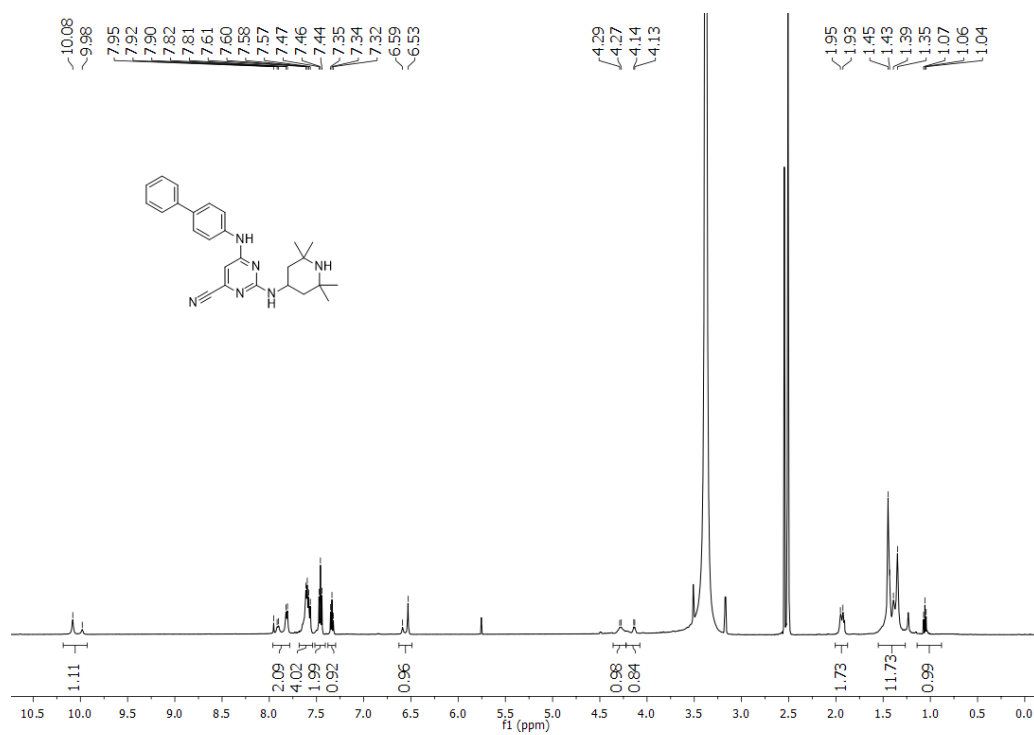


Figura A7. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 6.

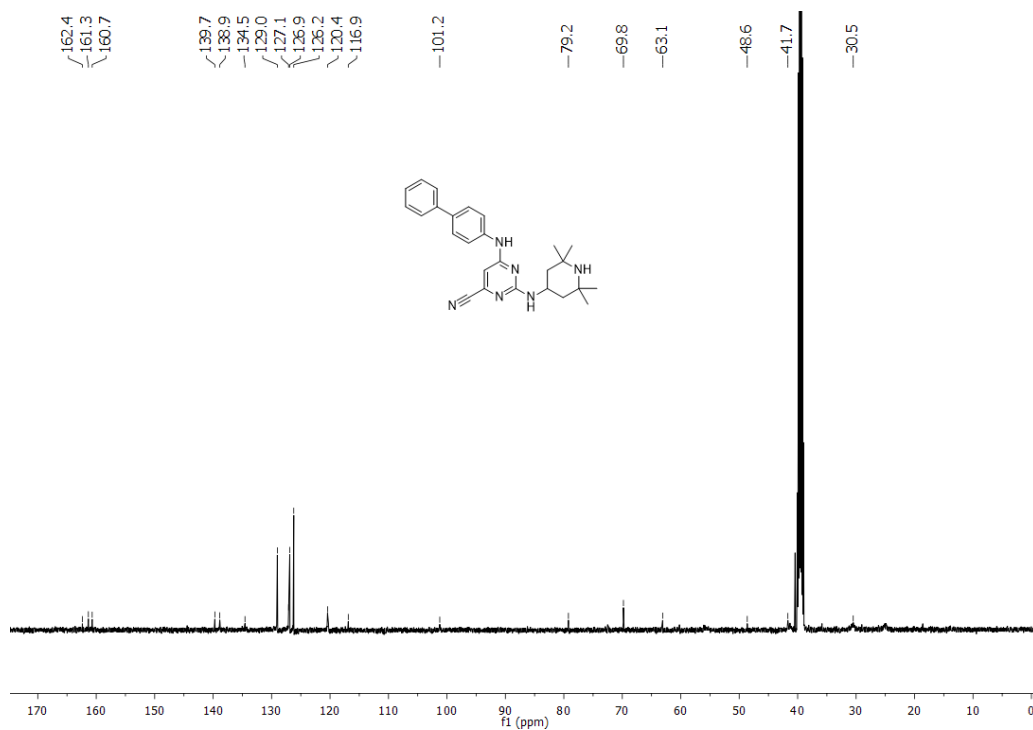


Figura A8. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 6.

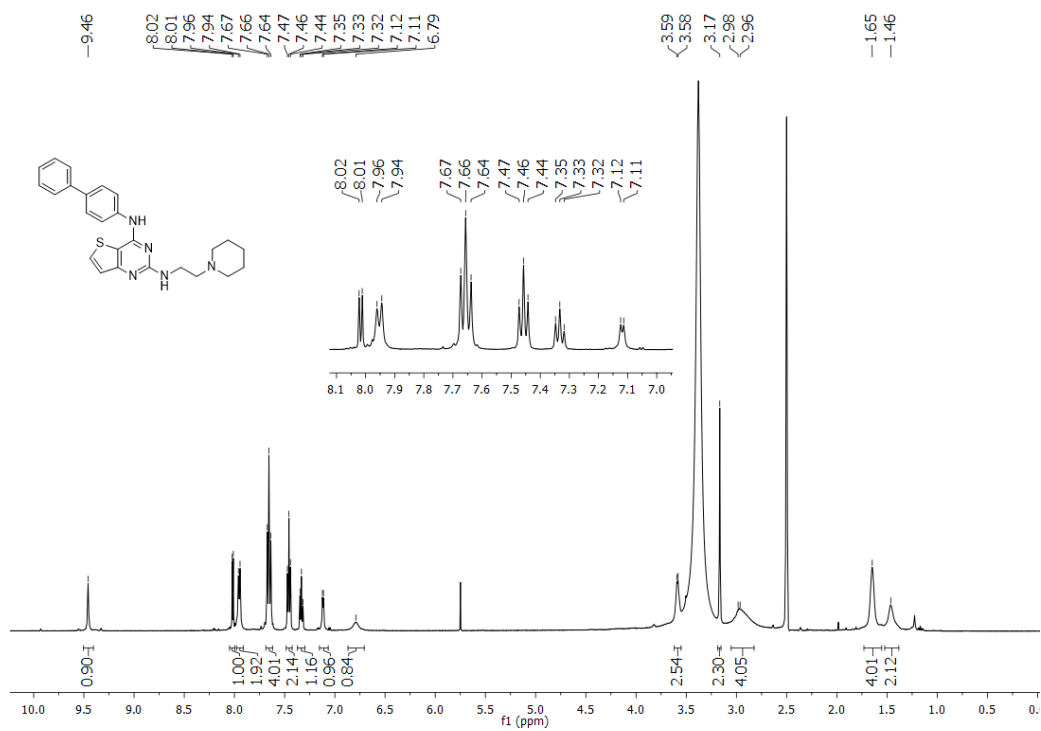


Figura A9. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 7.

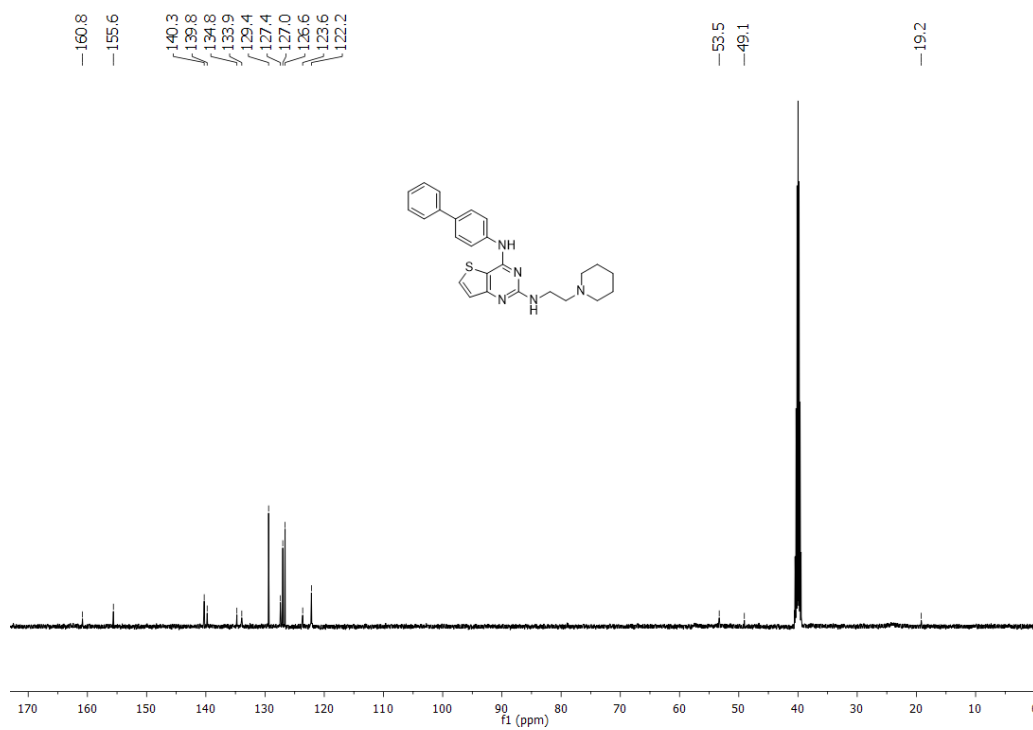


Figura A10. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 7.

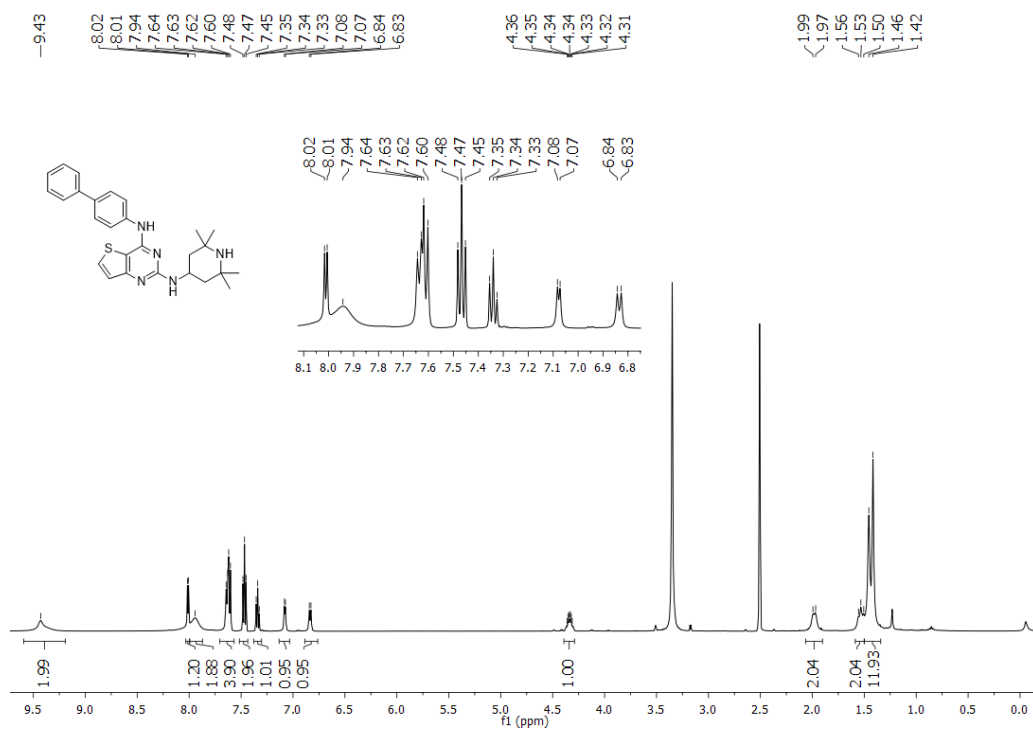


Figura A11. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 8.

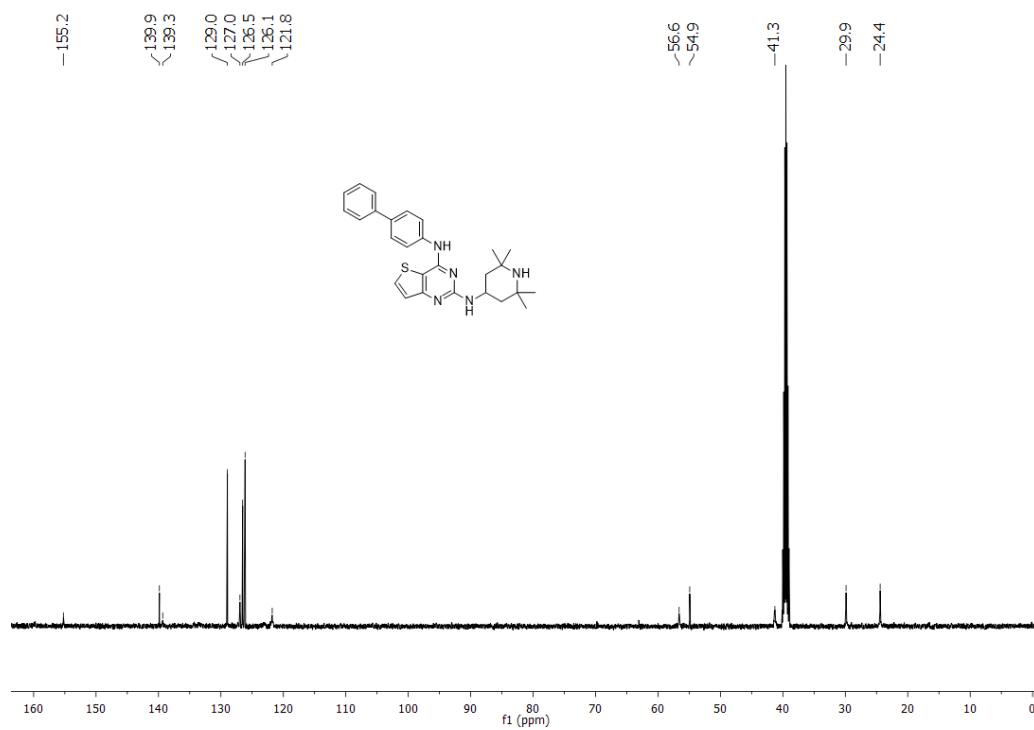


Figura A12. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 8.

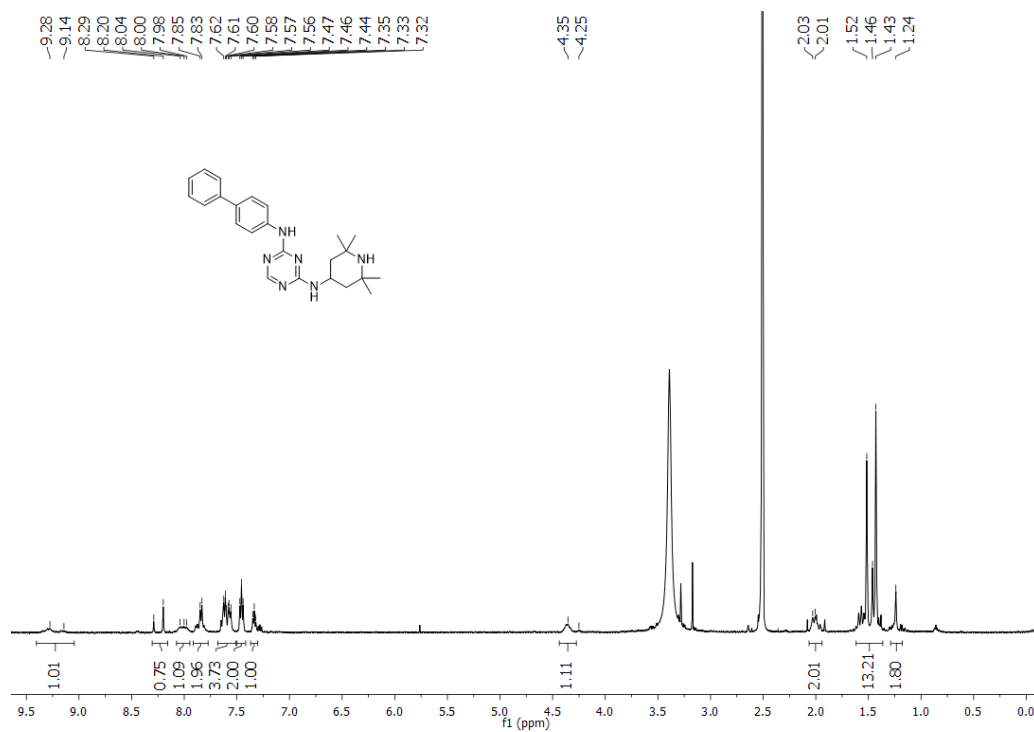


Figura A13. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 9.

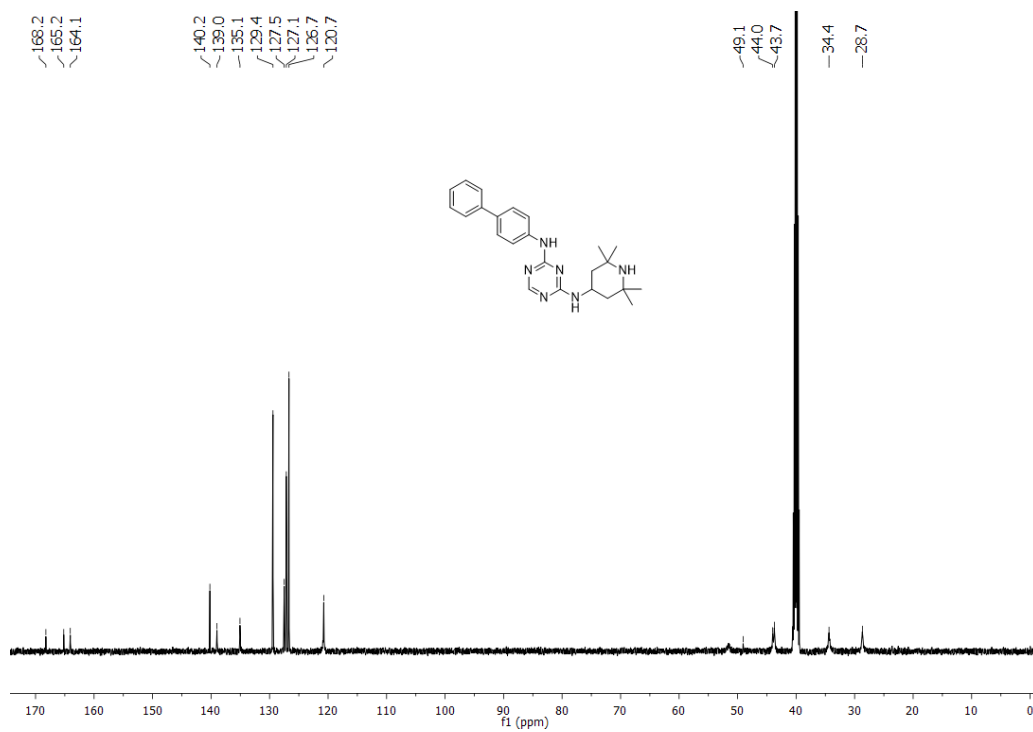


Figura A14. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 9.

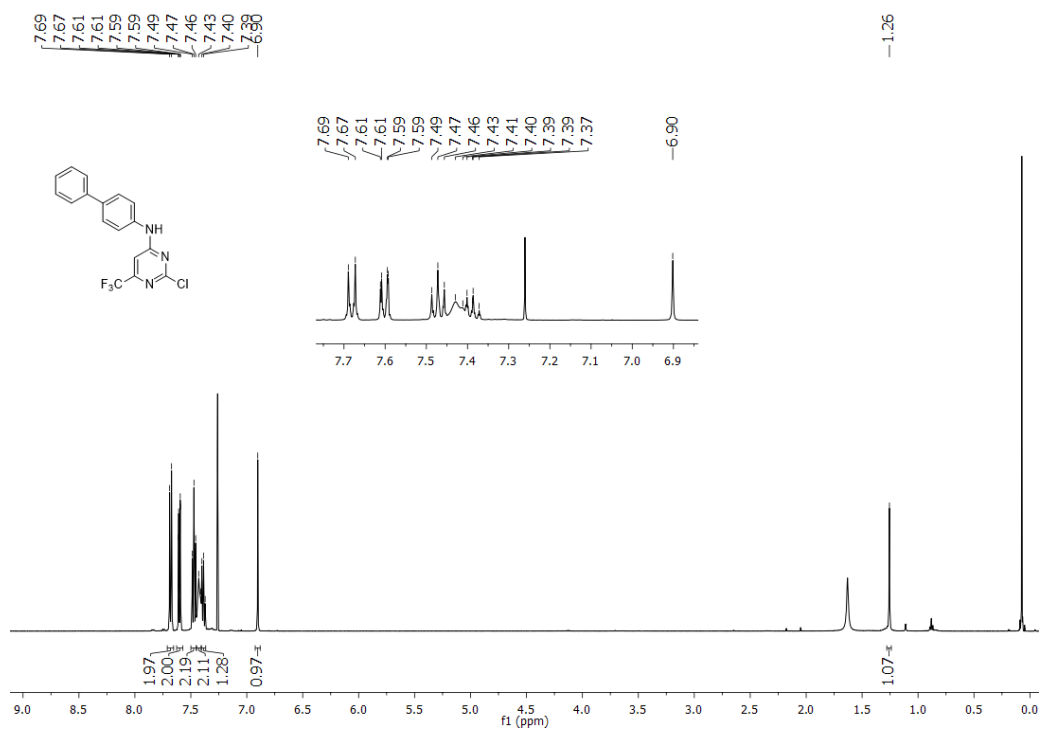


Figura A15. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 10.

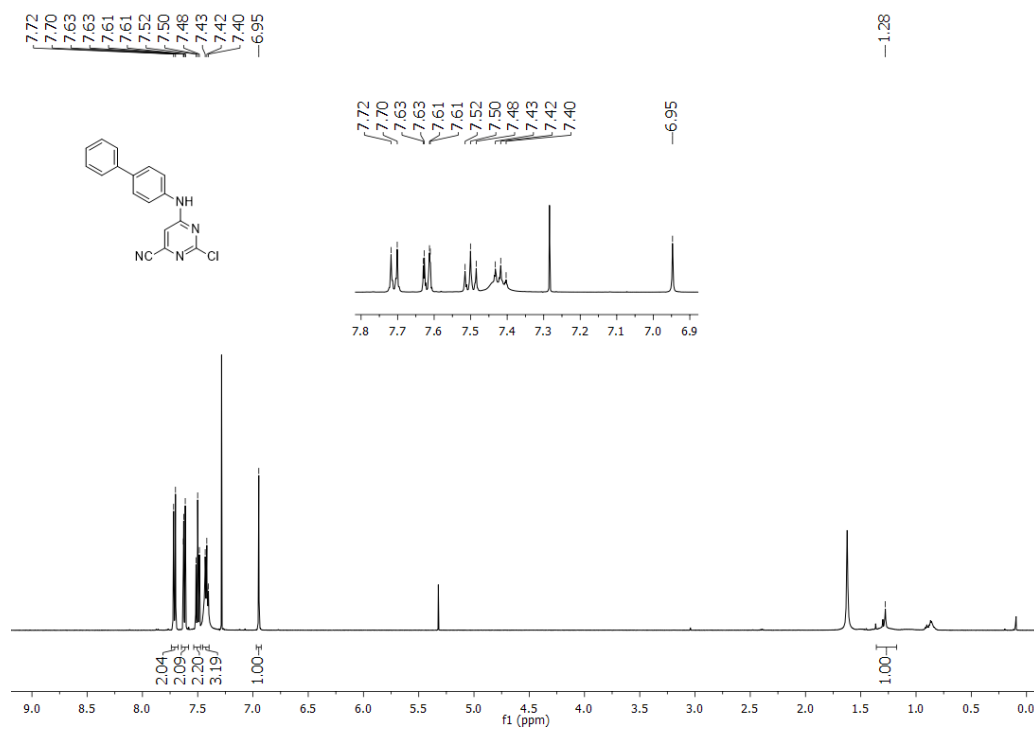


Figura A16. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 11.

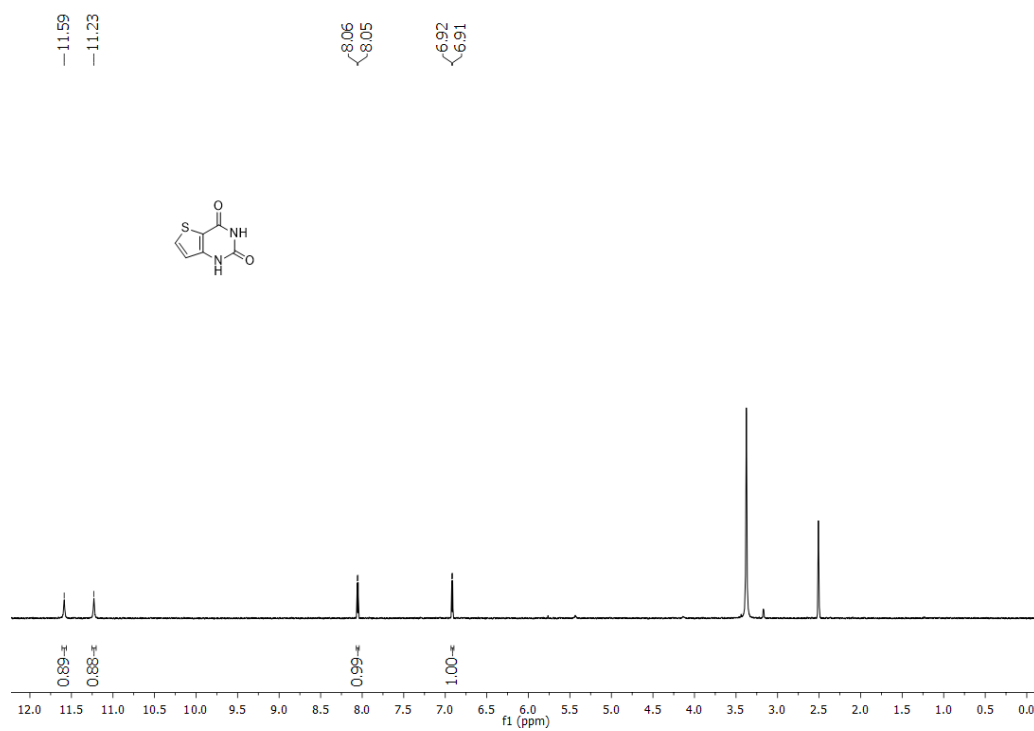


Figura A17. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 12.

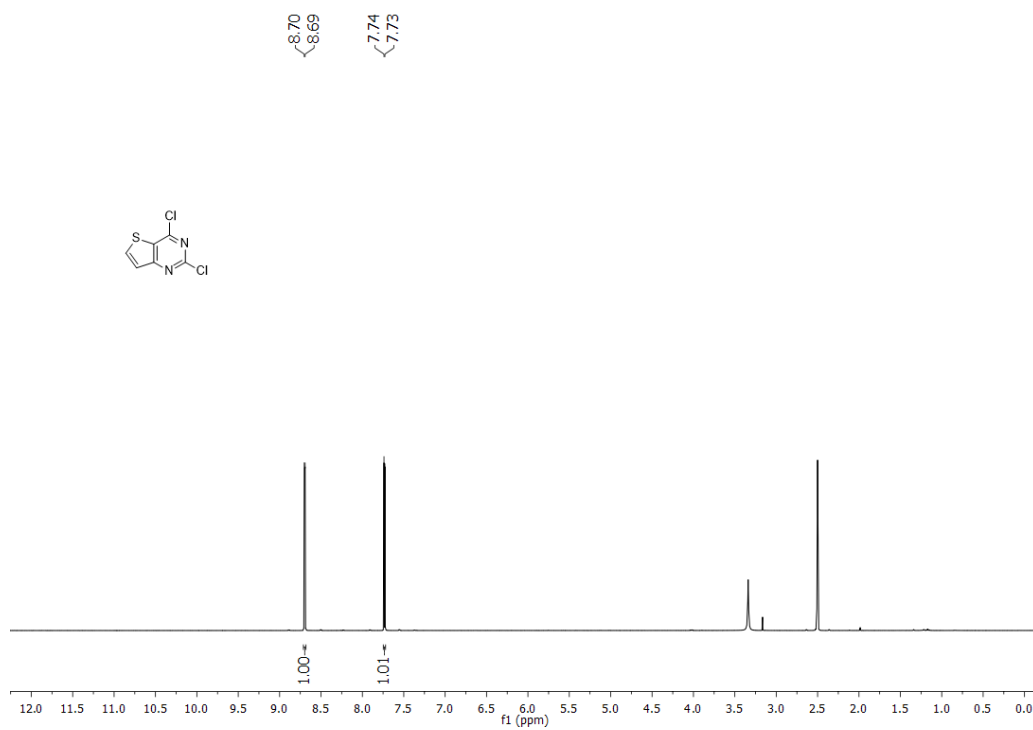


Figura A18. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 13.

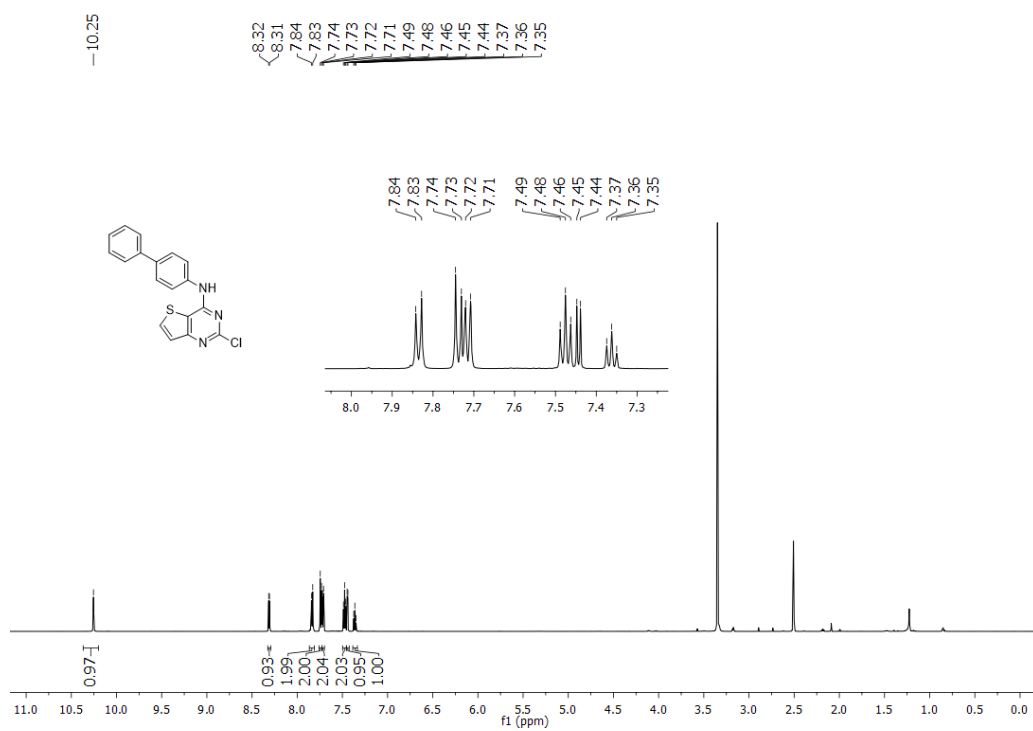


Figura A19. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 14.

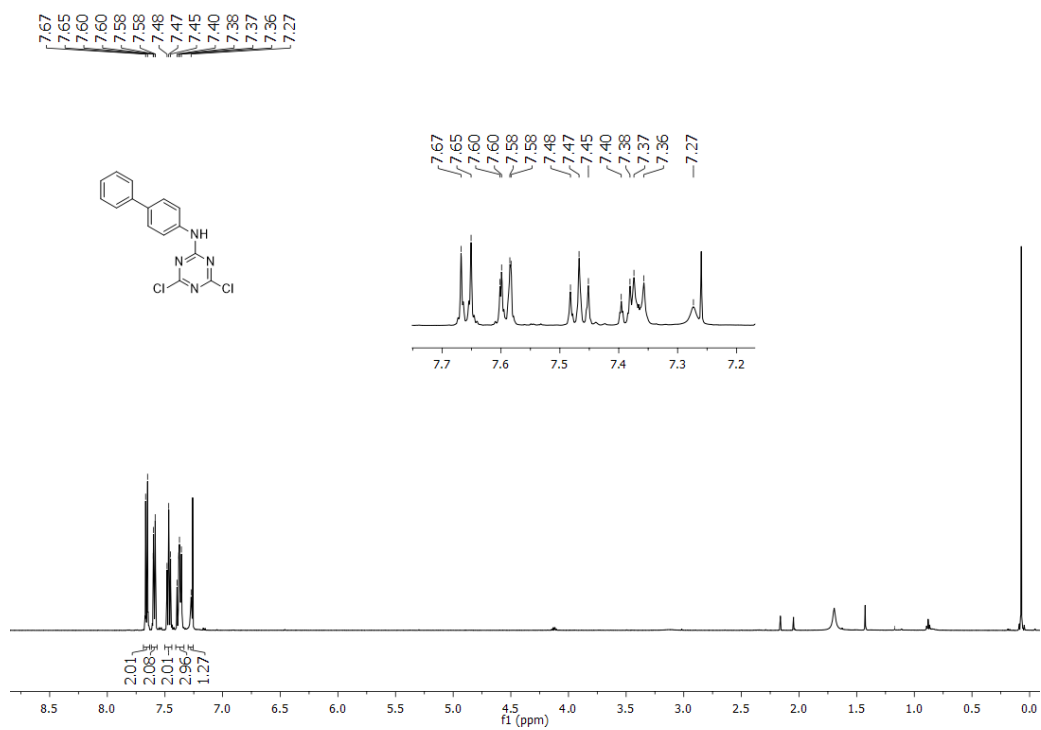


Figura A20. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 15.

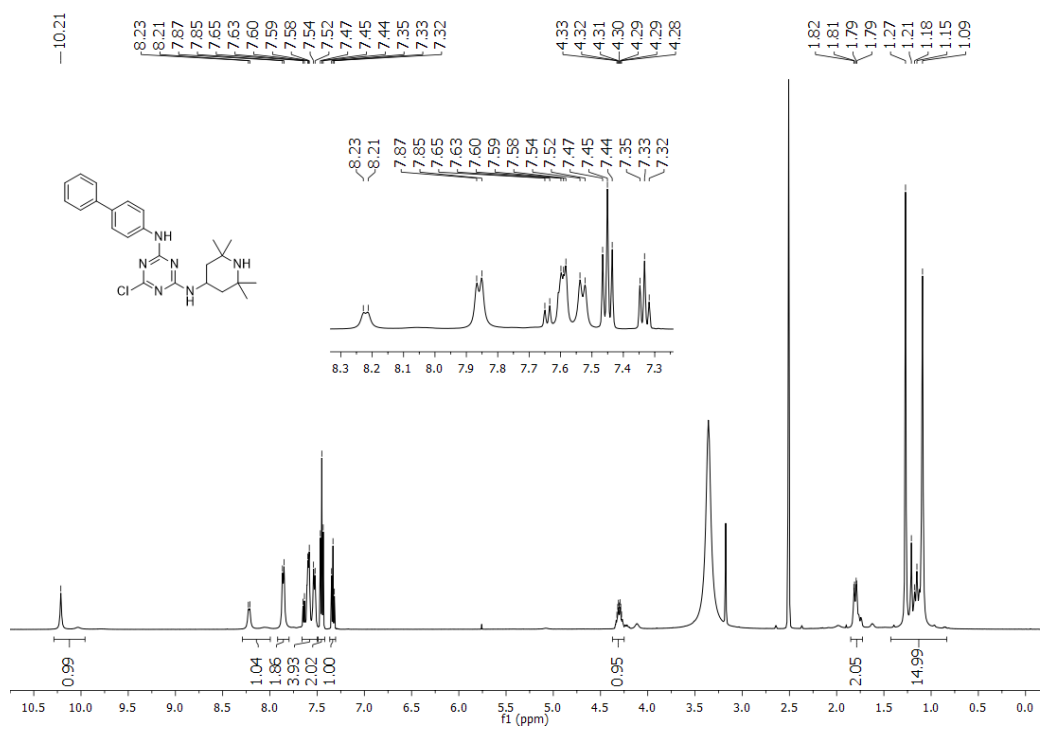


Figura A21. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 16.

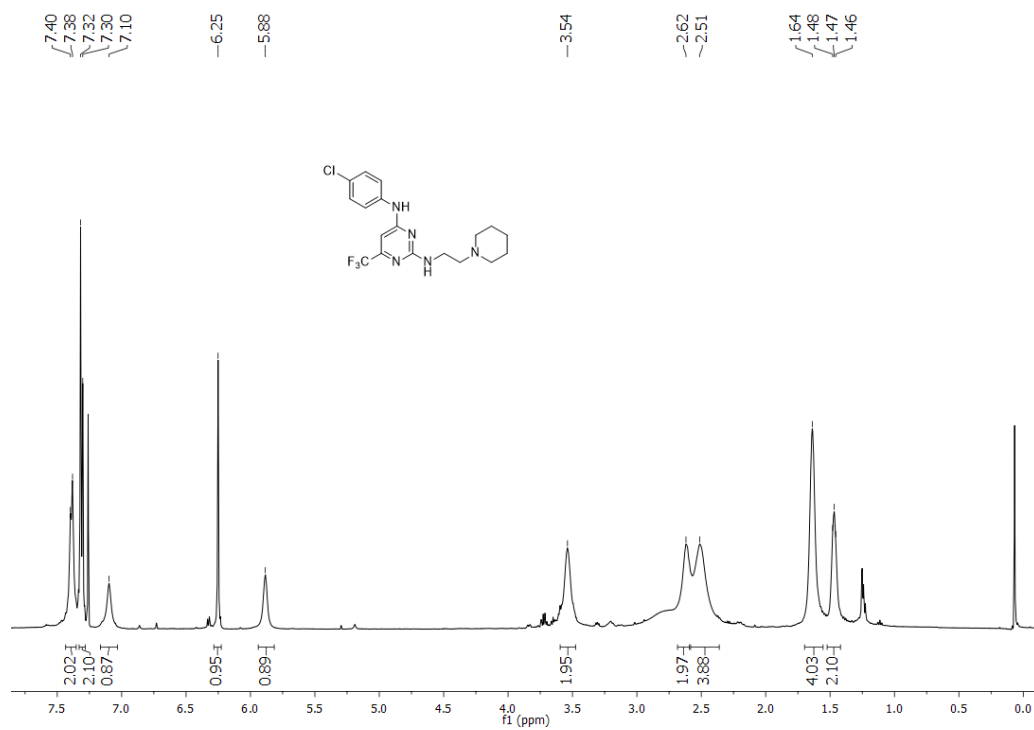


Figura A22. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 17.

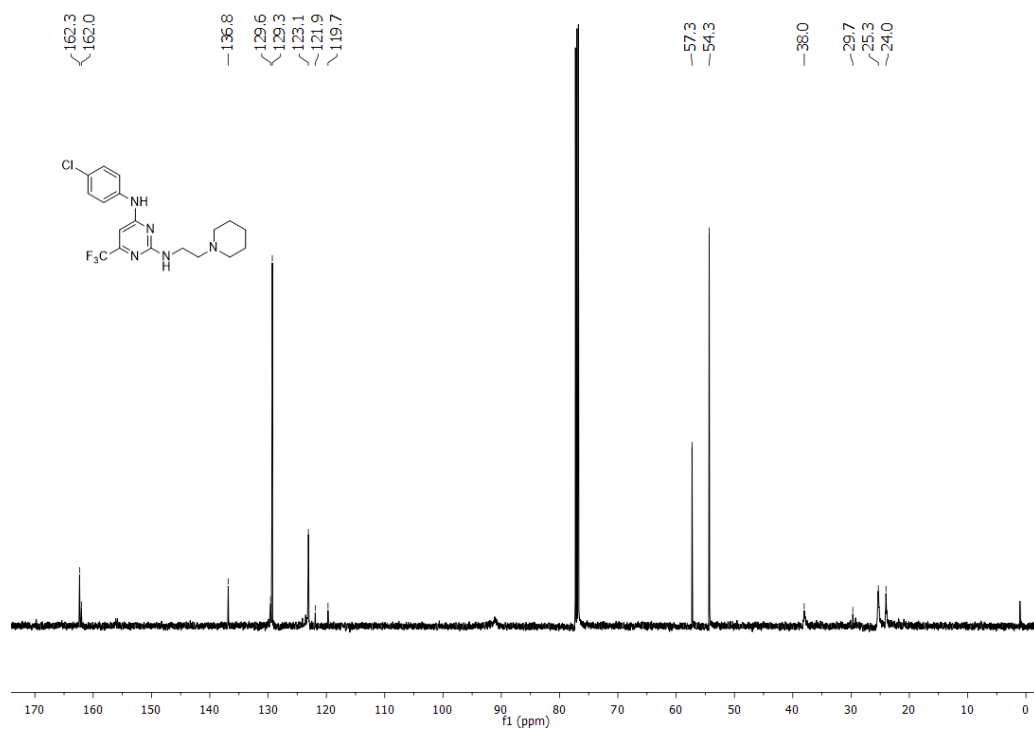


Figura A23. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 17.

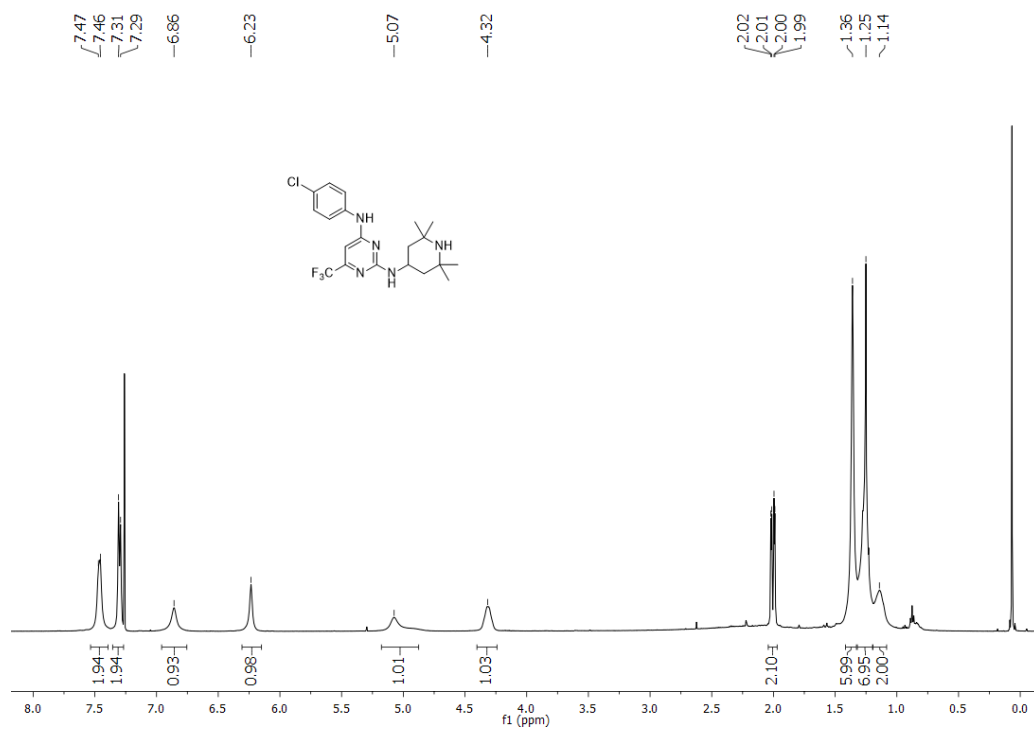


Figura A24. Espectro de ¹H-RMN del compuesto **18**.

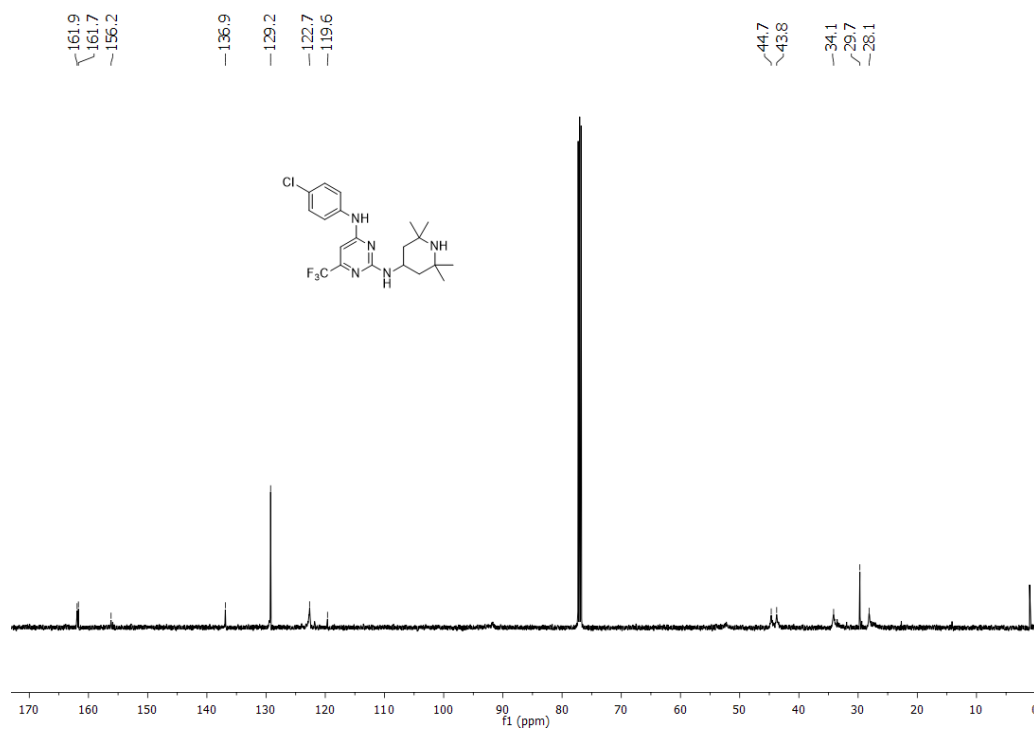


Figura A25. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto **18**.

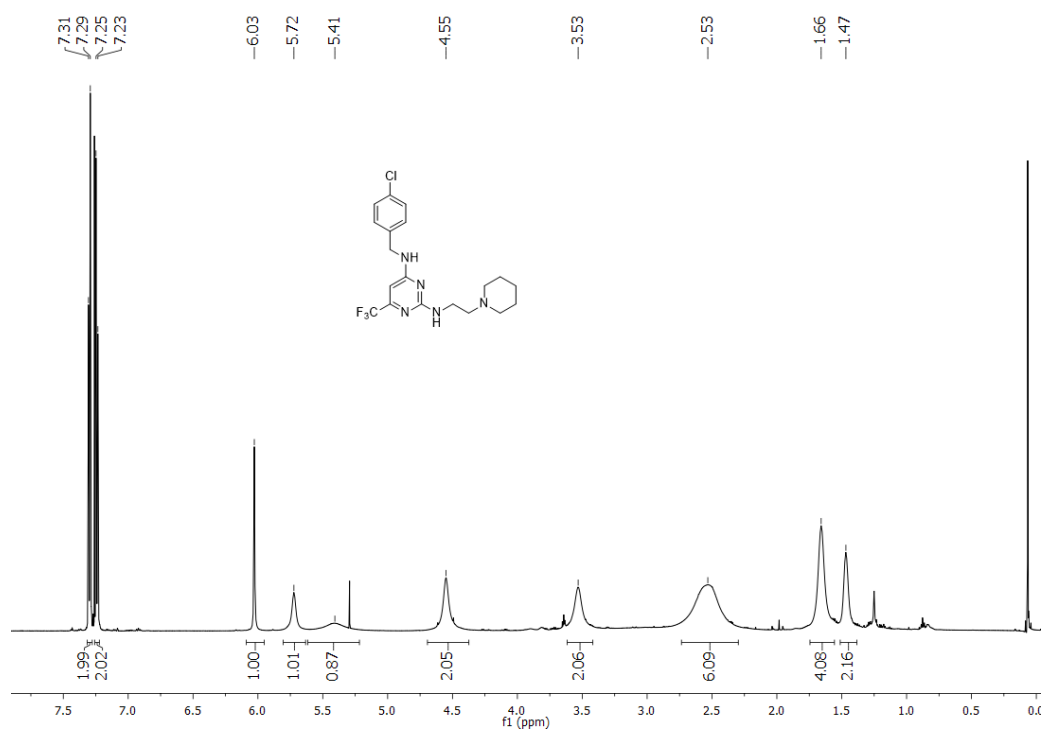


Figura A26. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 19.

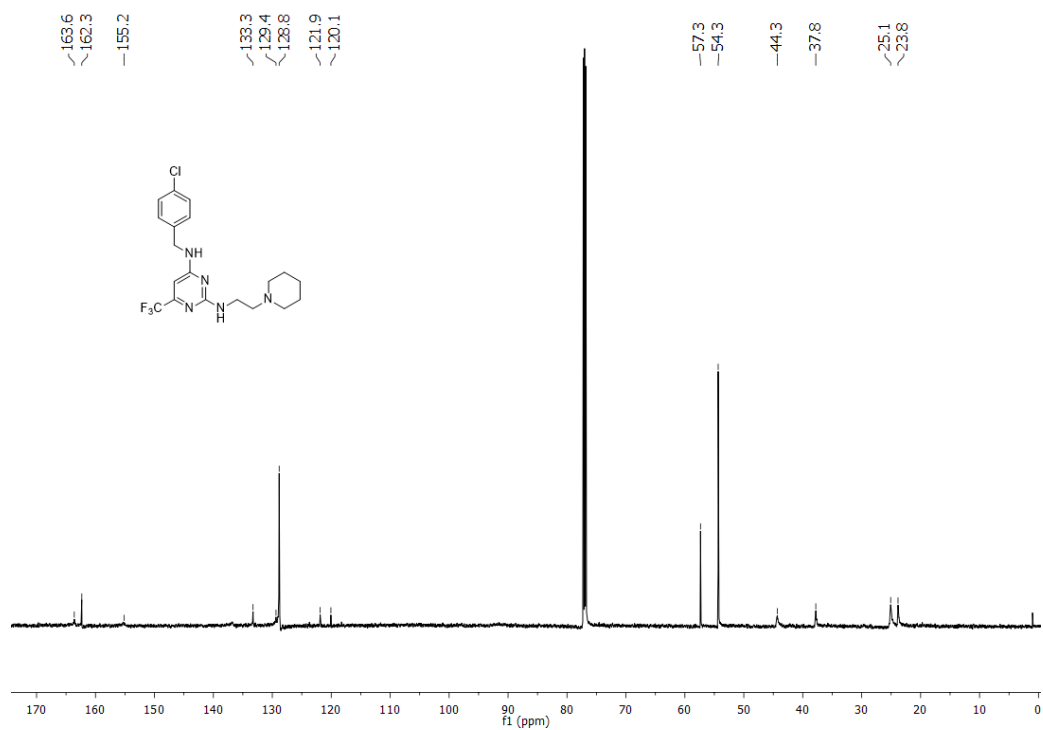


Figura A27. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 19.

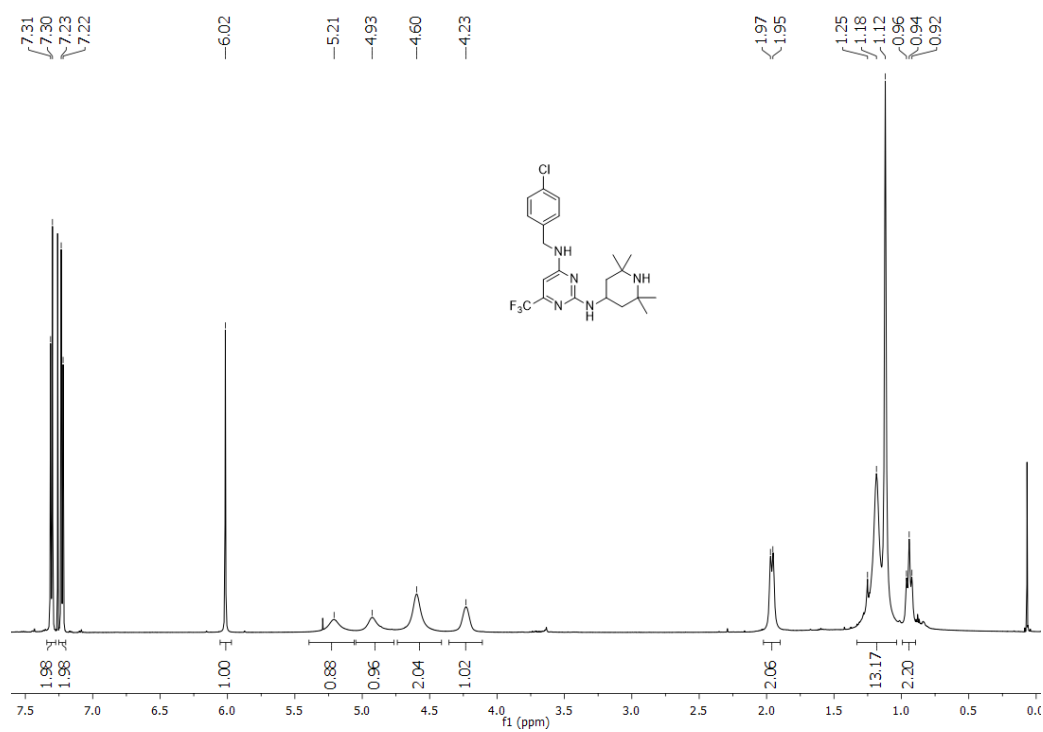


Figura A28. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 20.

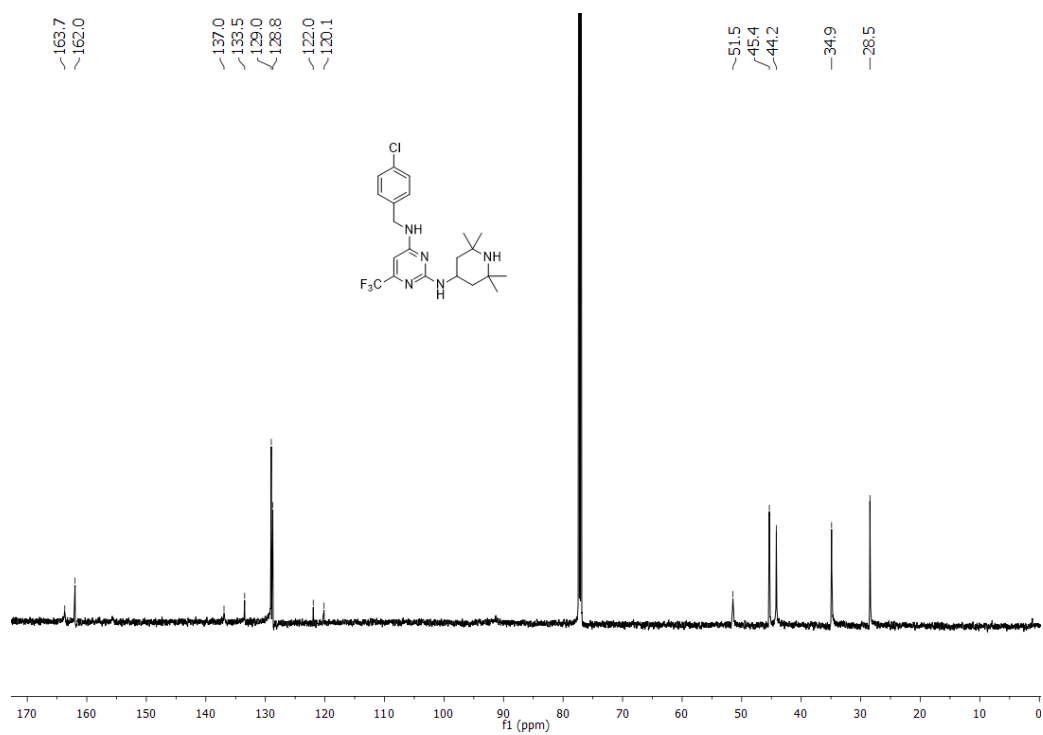


Figura A29. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 20.

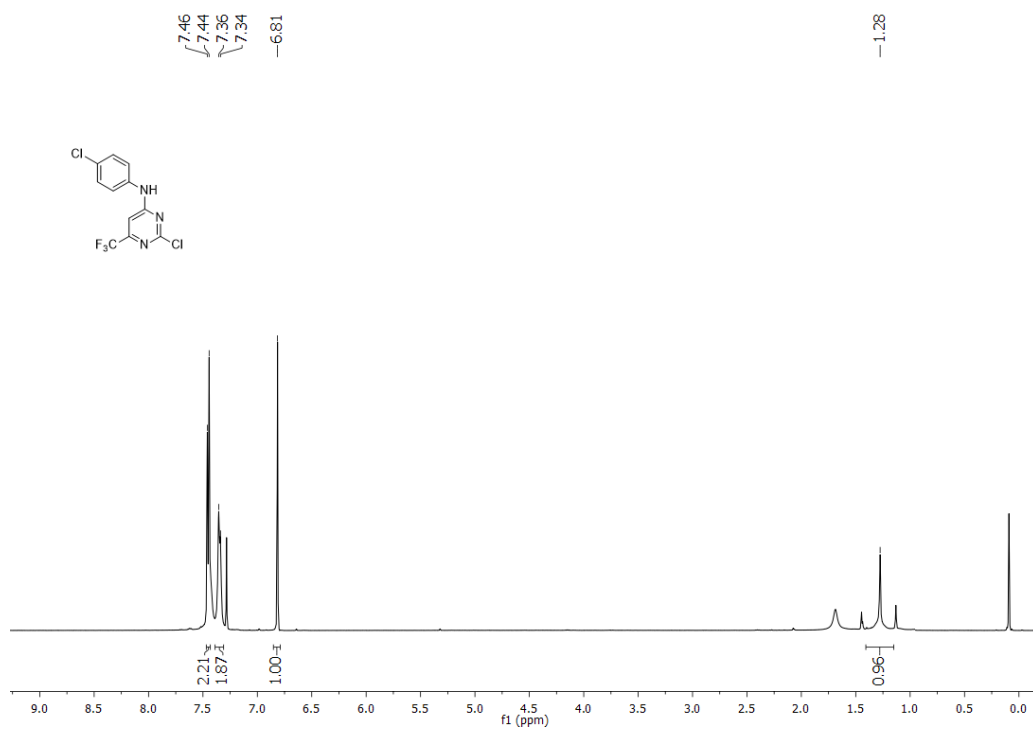


Figura A30. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 21.

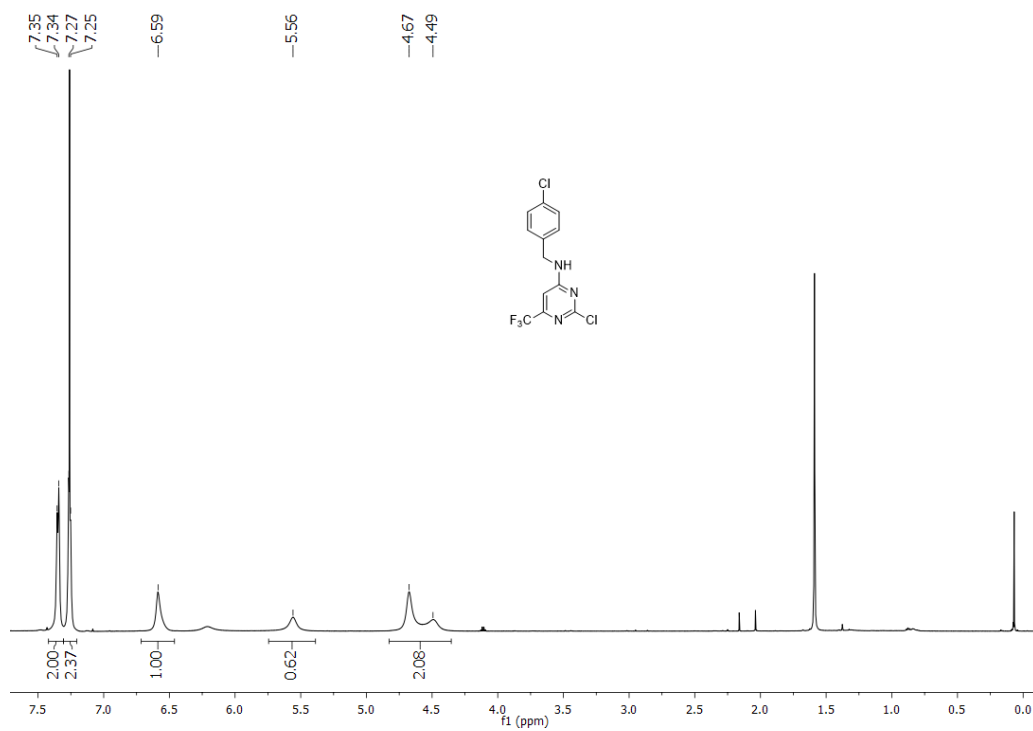


Figura A31. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 22.

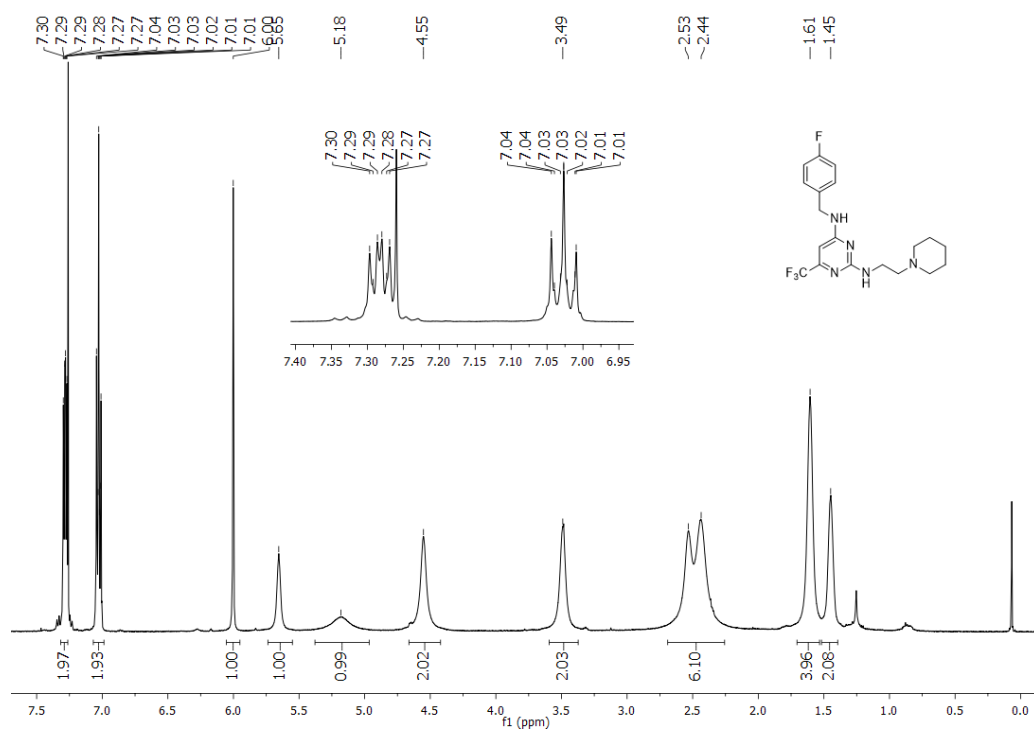


Figura A32. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 23.

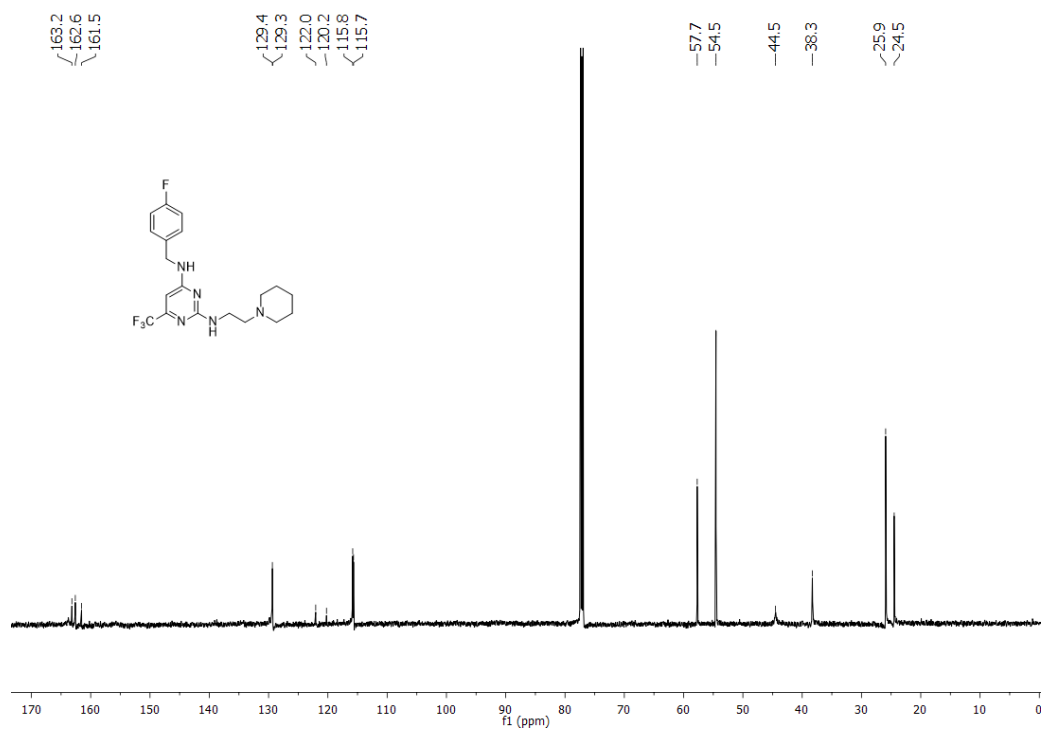


Figura A33. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 23.

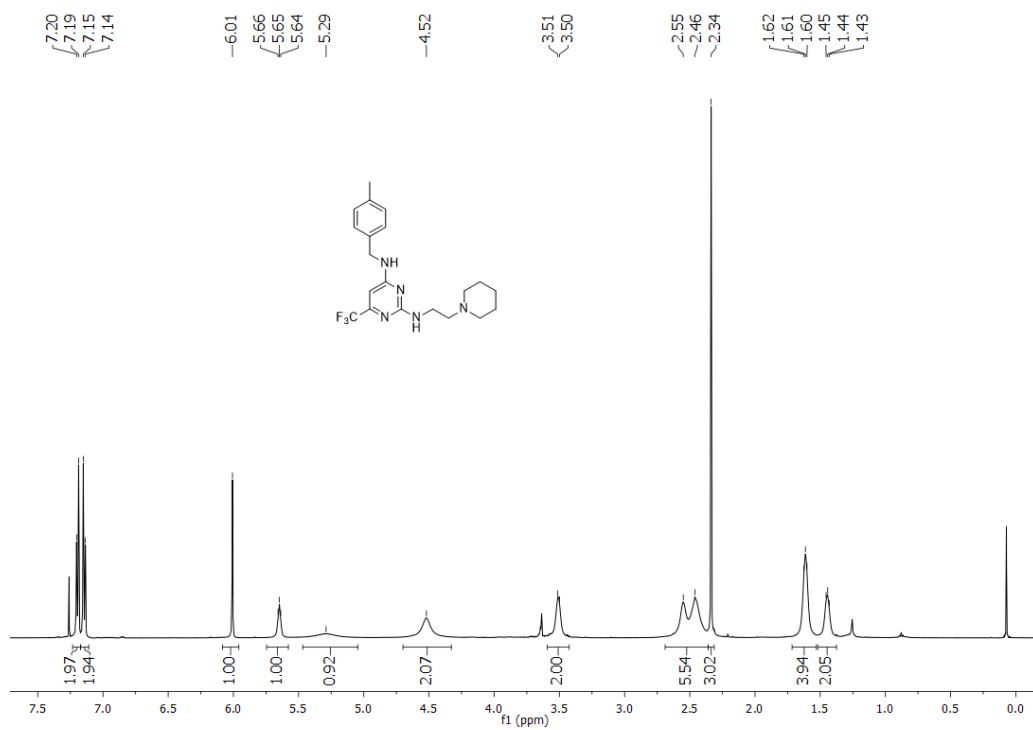


Figura A34. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 24.

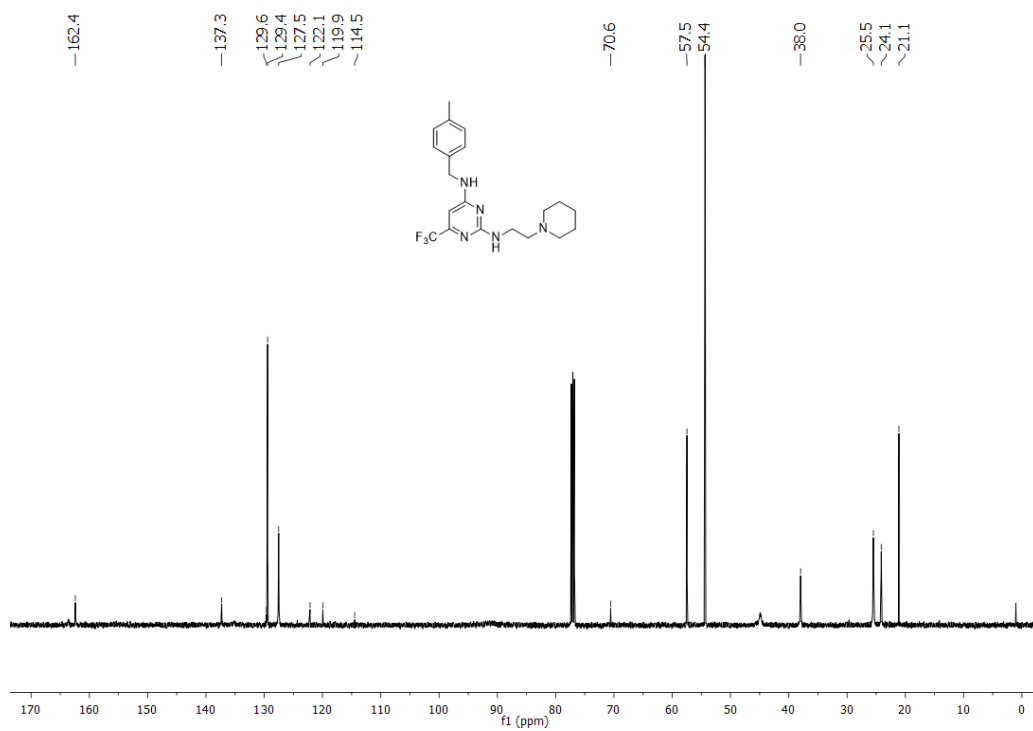


Figura A35. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 24.

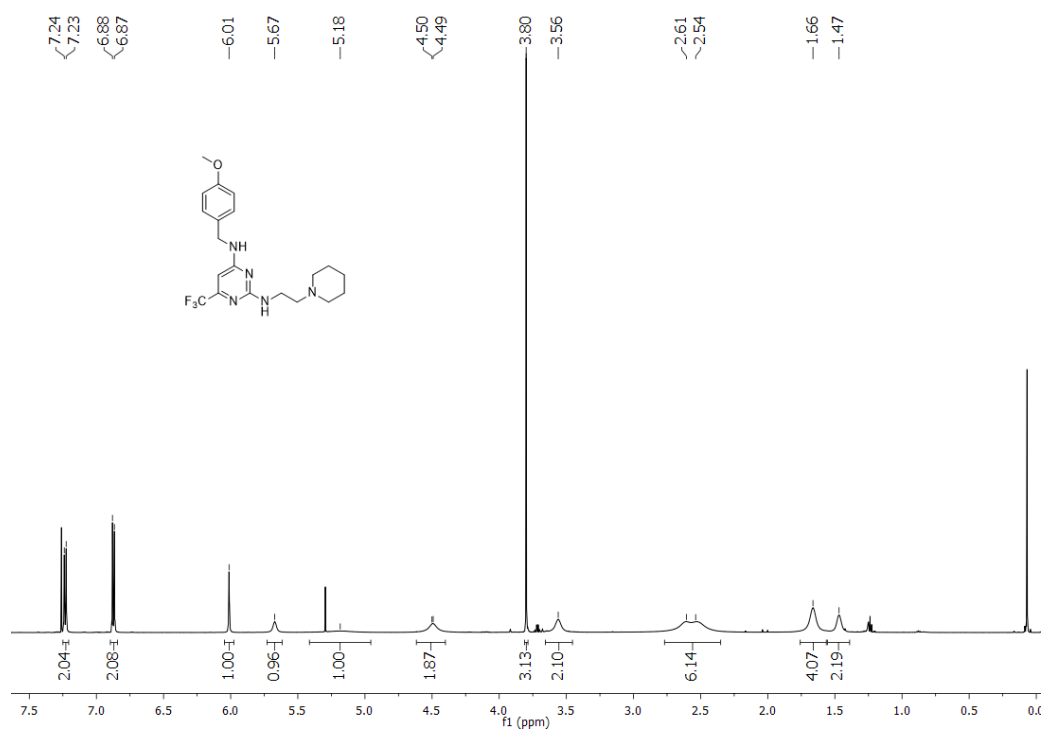


Figura A36. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 25.

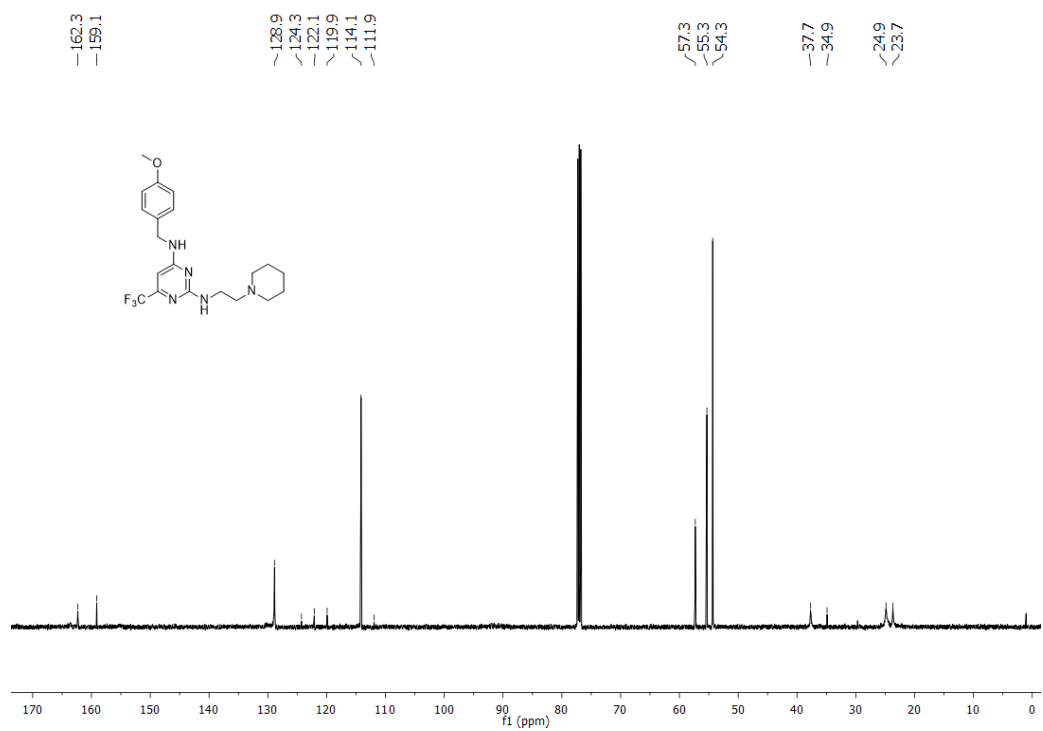


Figura A37. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 25.

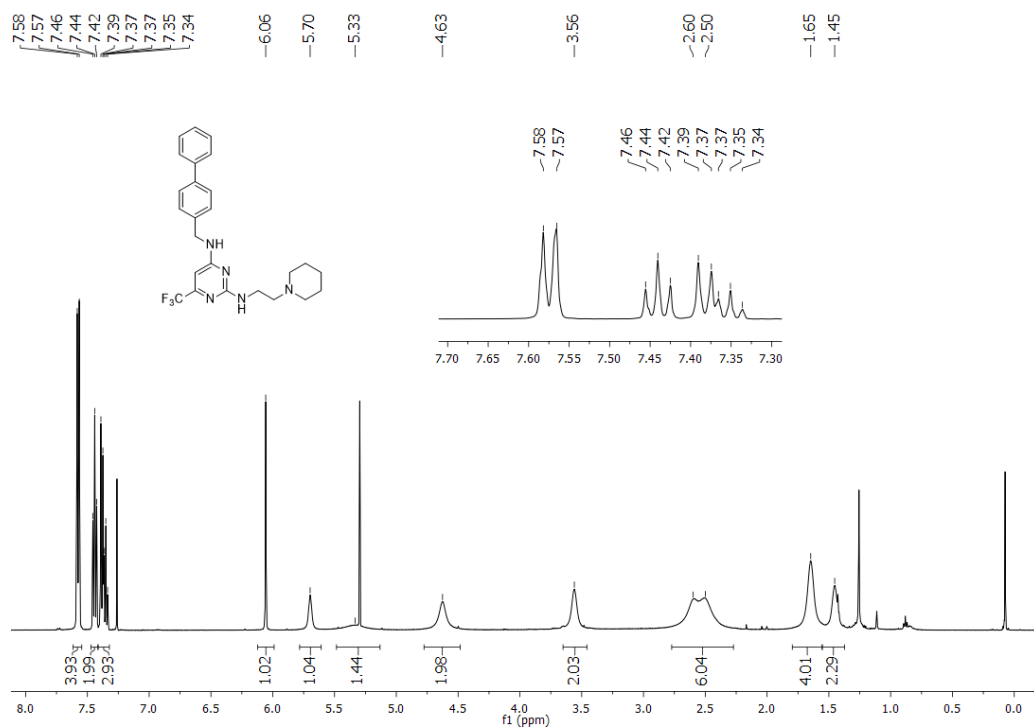


Figura A38. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 26.

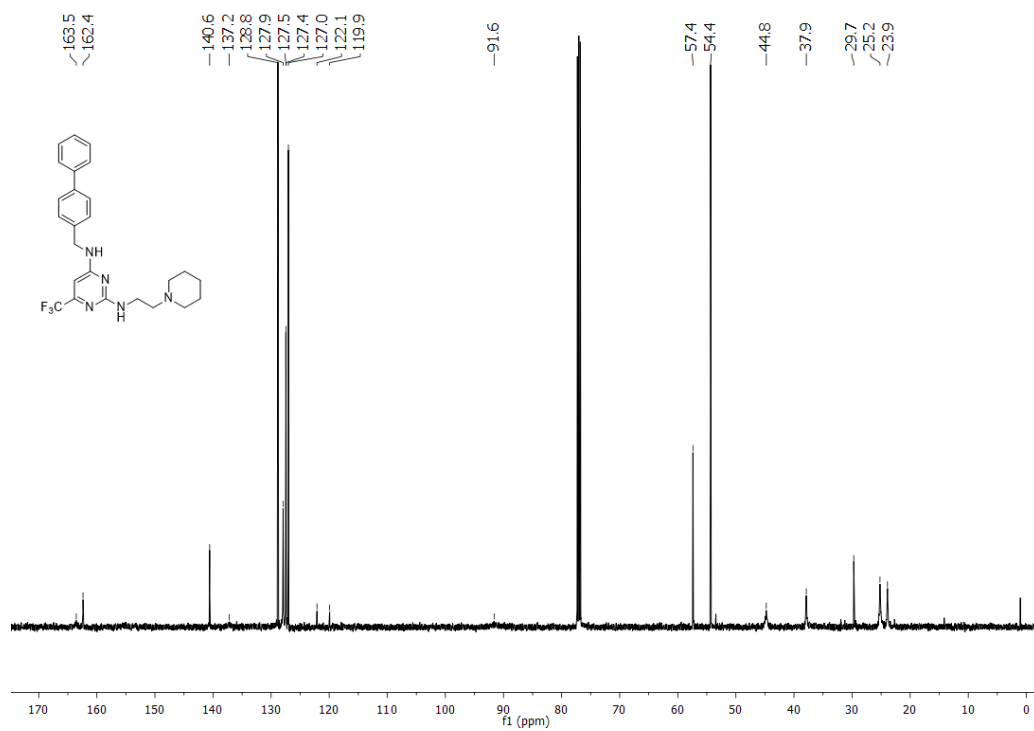


Figura A39. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 26.

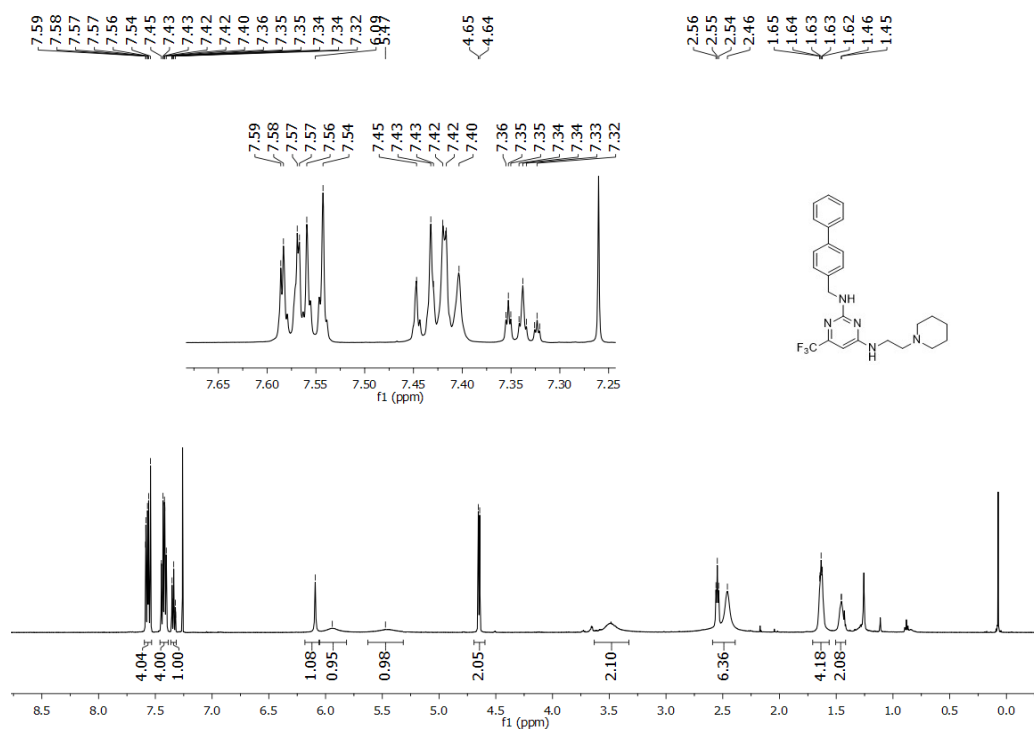


Figura A40. Espectro de ¹H-RMN del compuesto **26b**.

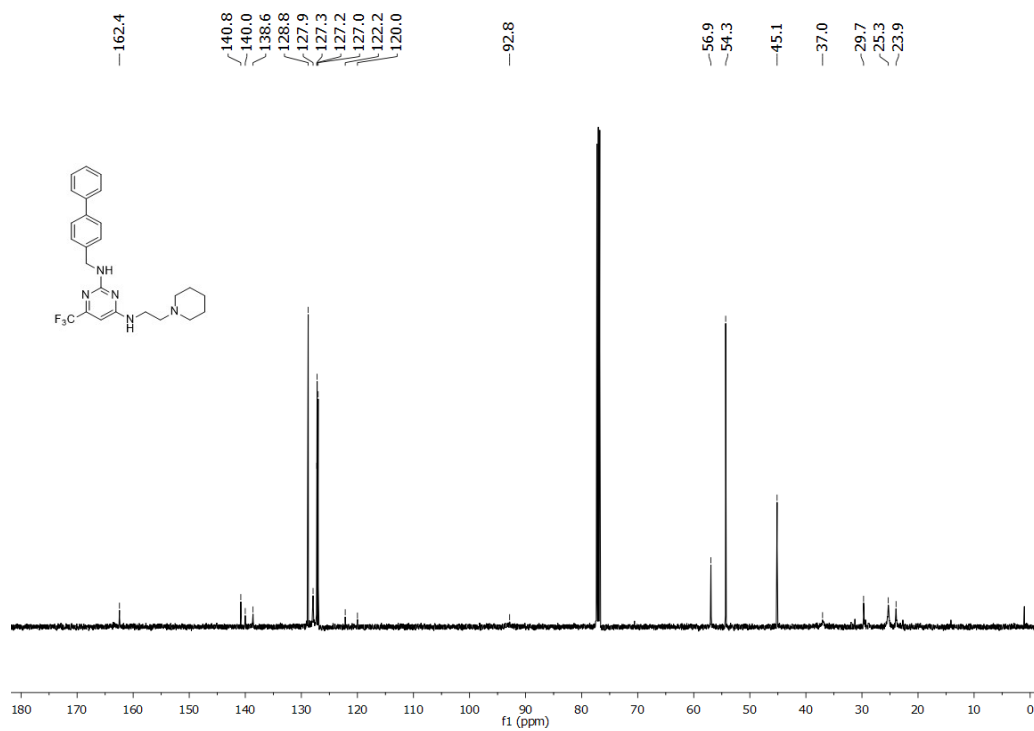


Figura A41. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto **26b**.

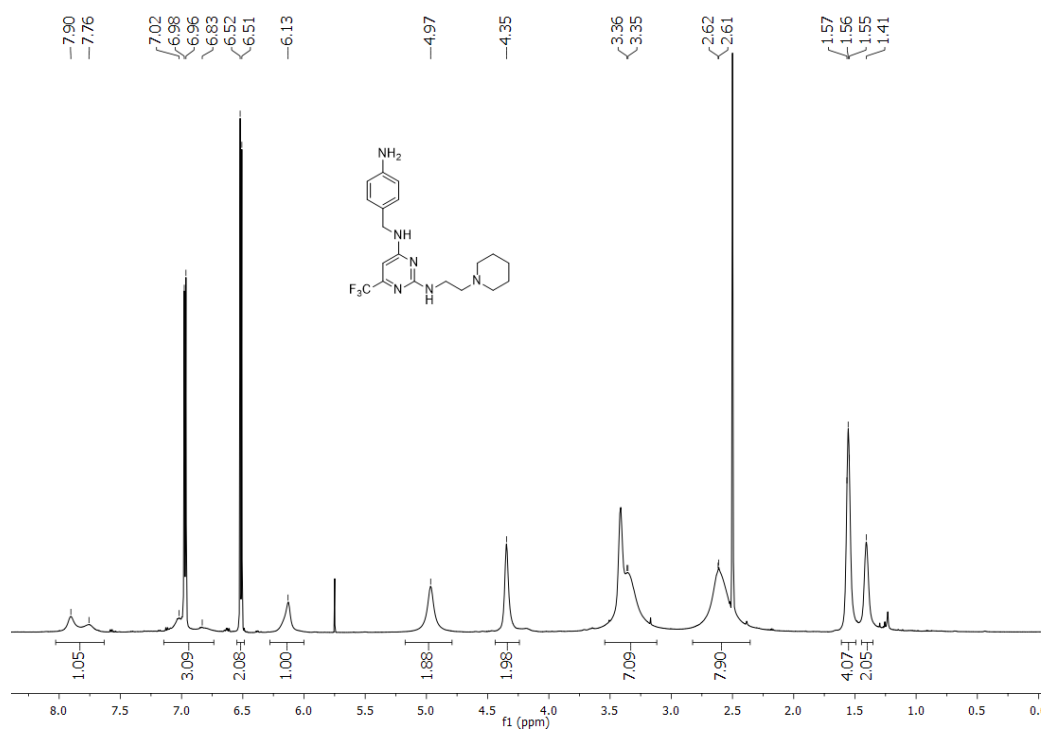


Figura A42. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 27.

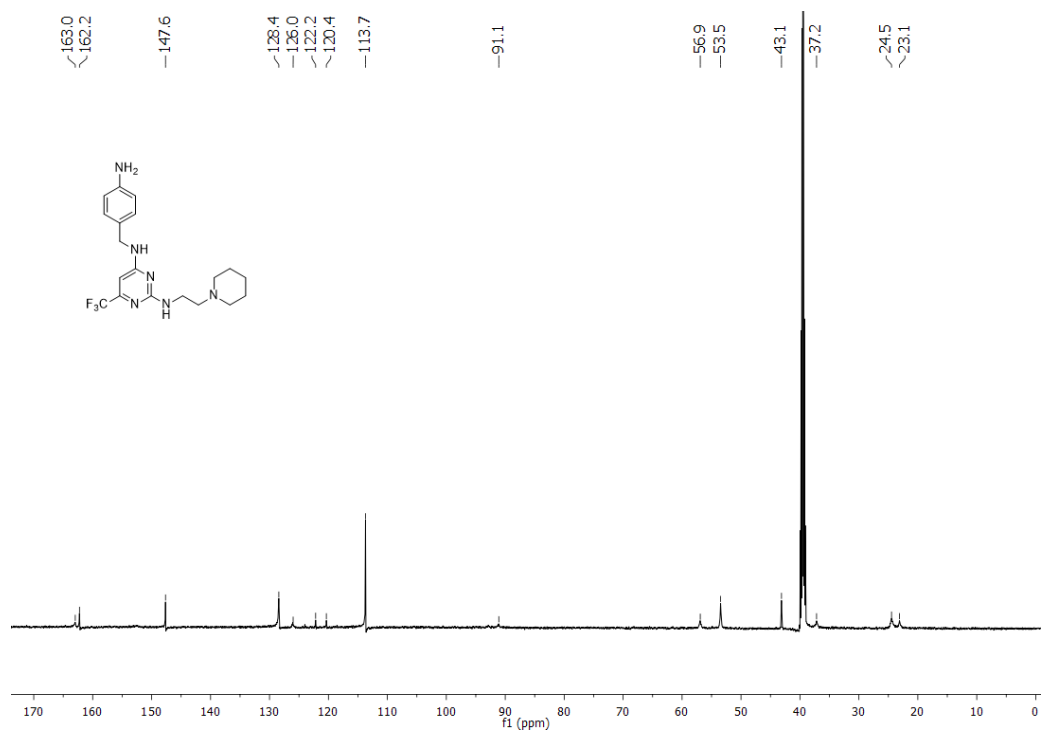


Figura A43. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 27.

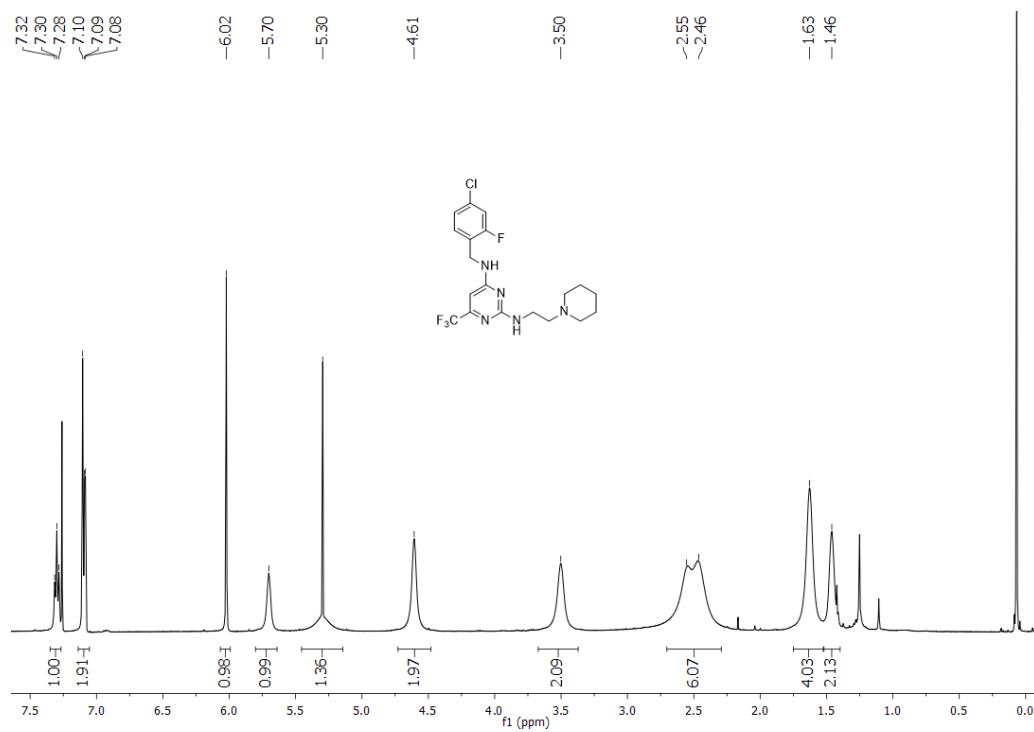


Figura A44. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 28.

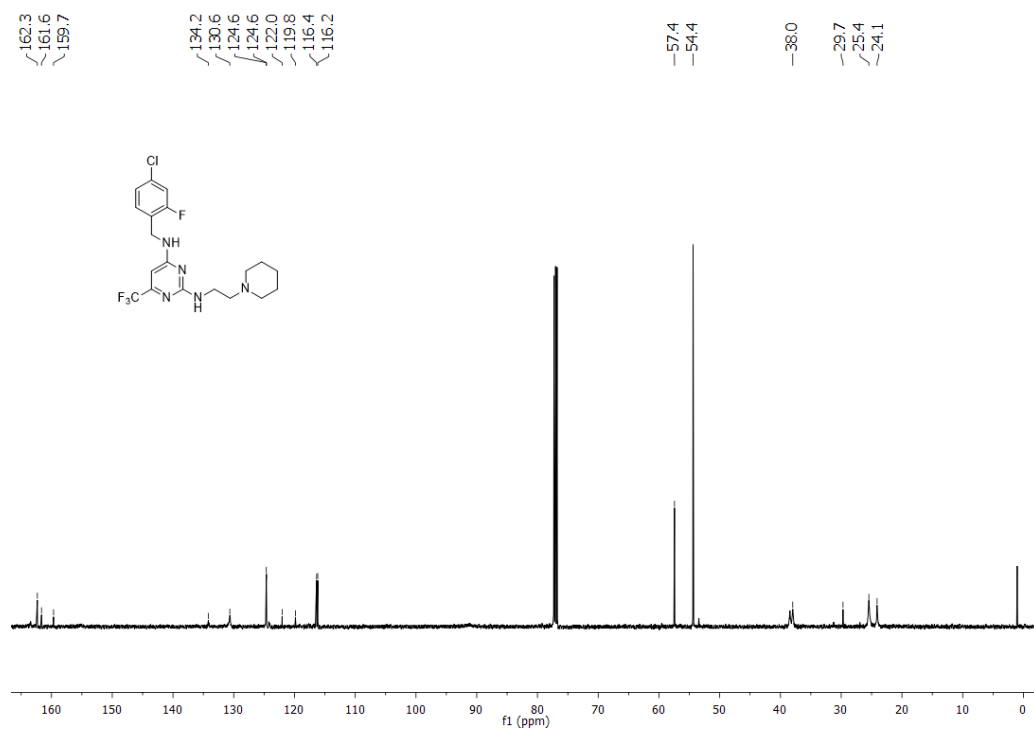


Figura A45. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 28.

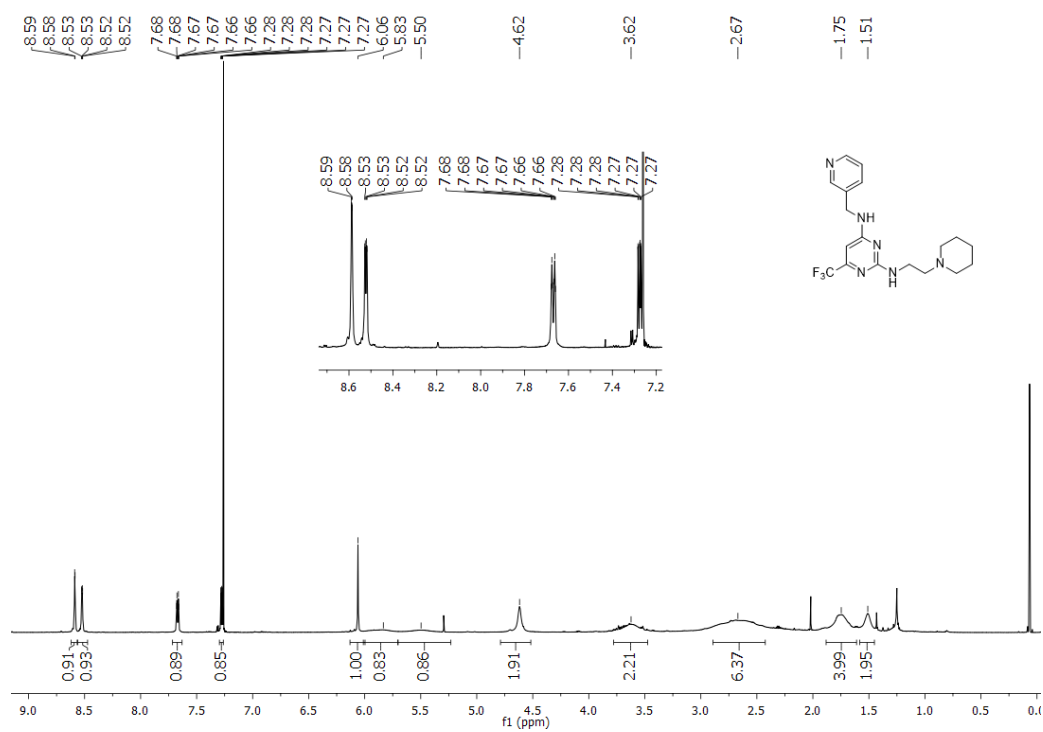


Figura A46. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 29.

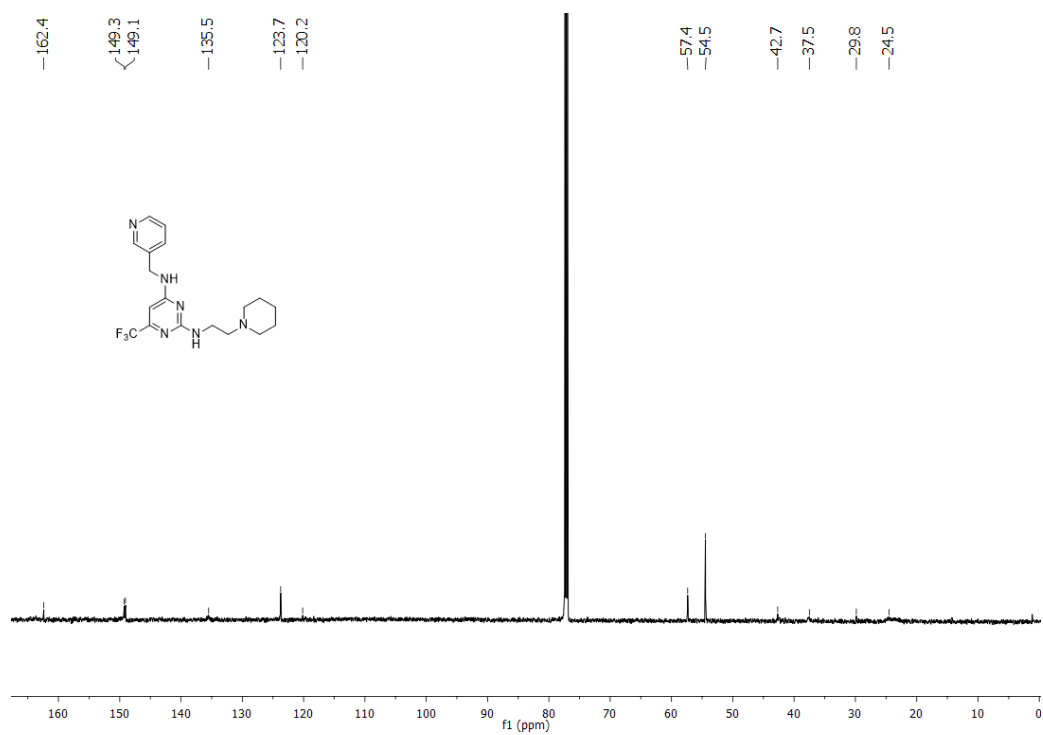


Figura A47. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 29.

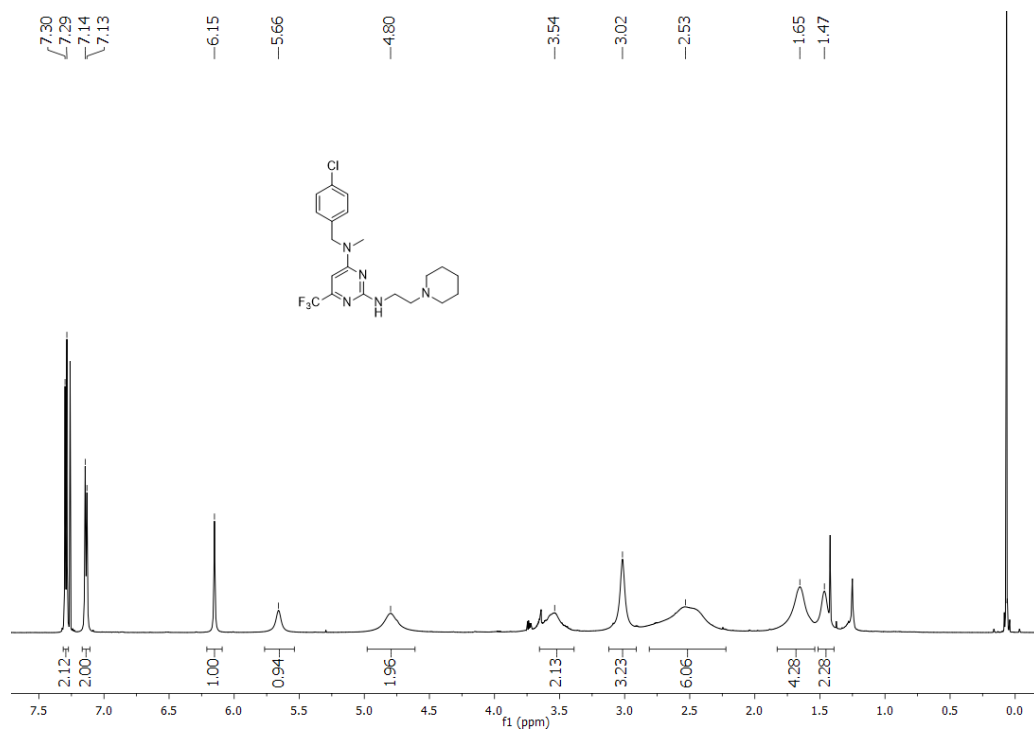


Figura A48. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 30.

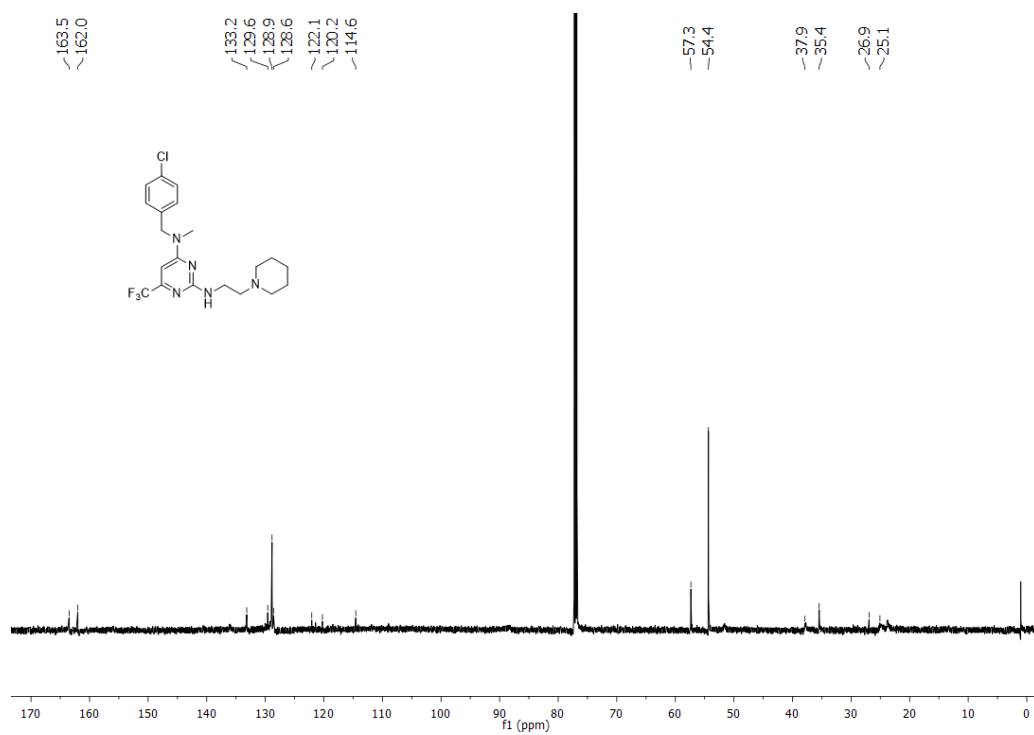


Figura A49. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 30.

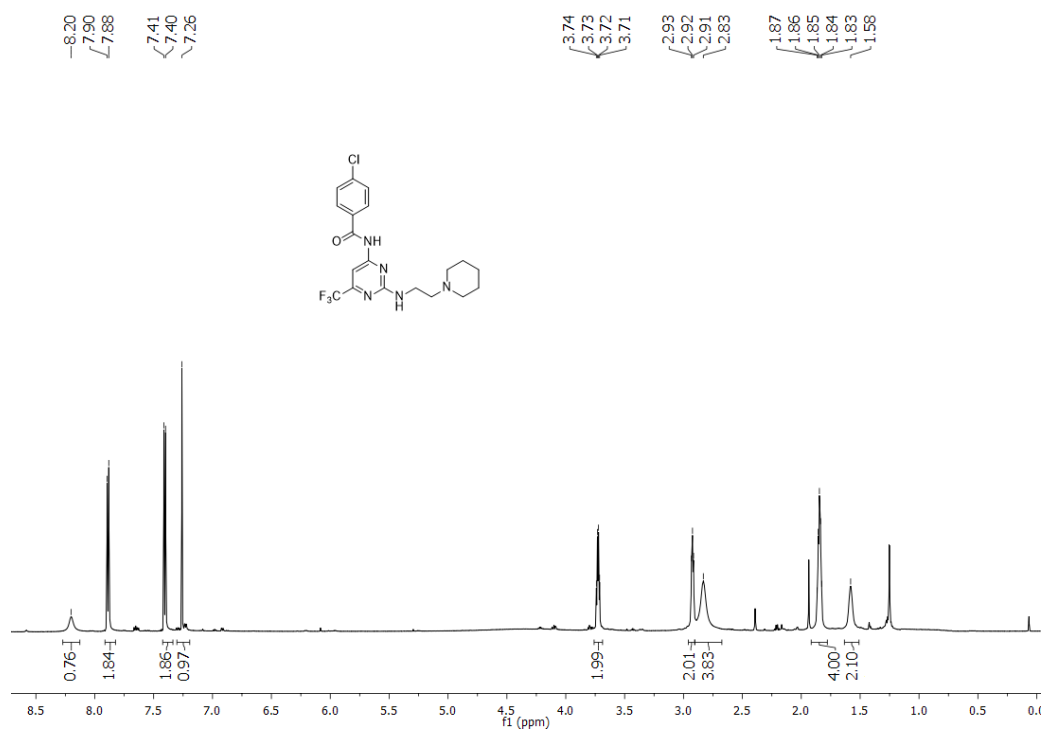


Figura A50. Espectro de ¹H-RMN del compuesto **31**.

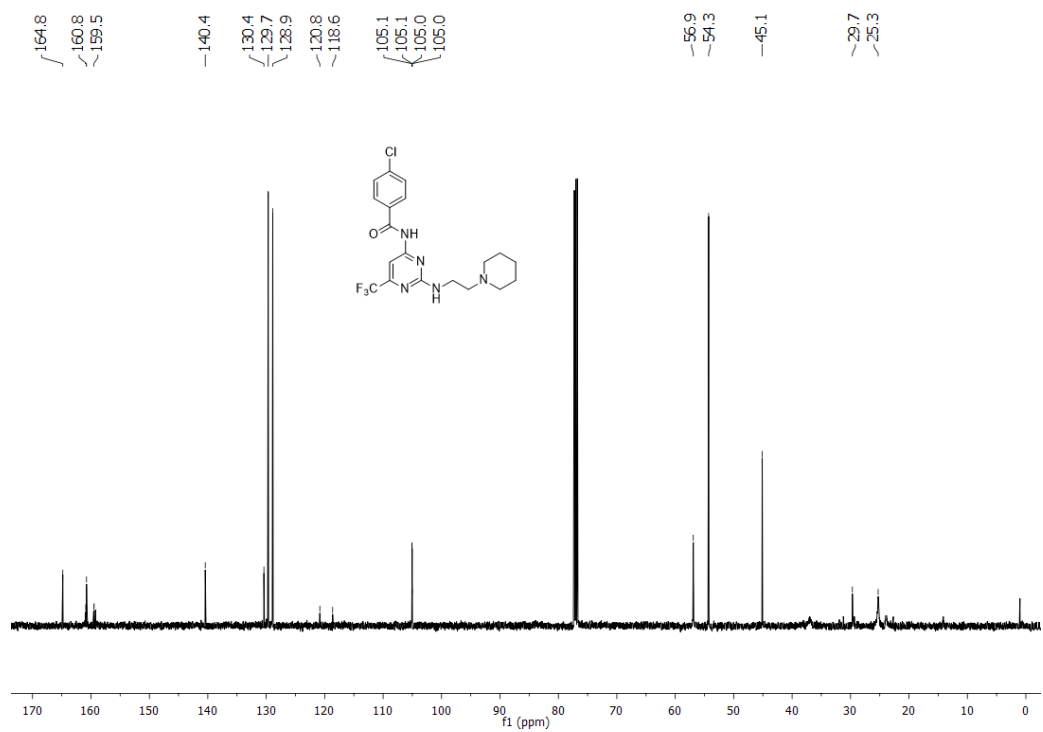


Figura A51. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto **31**.

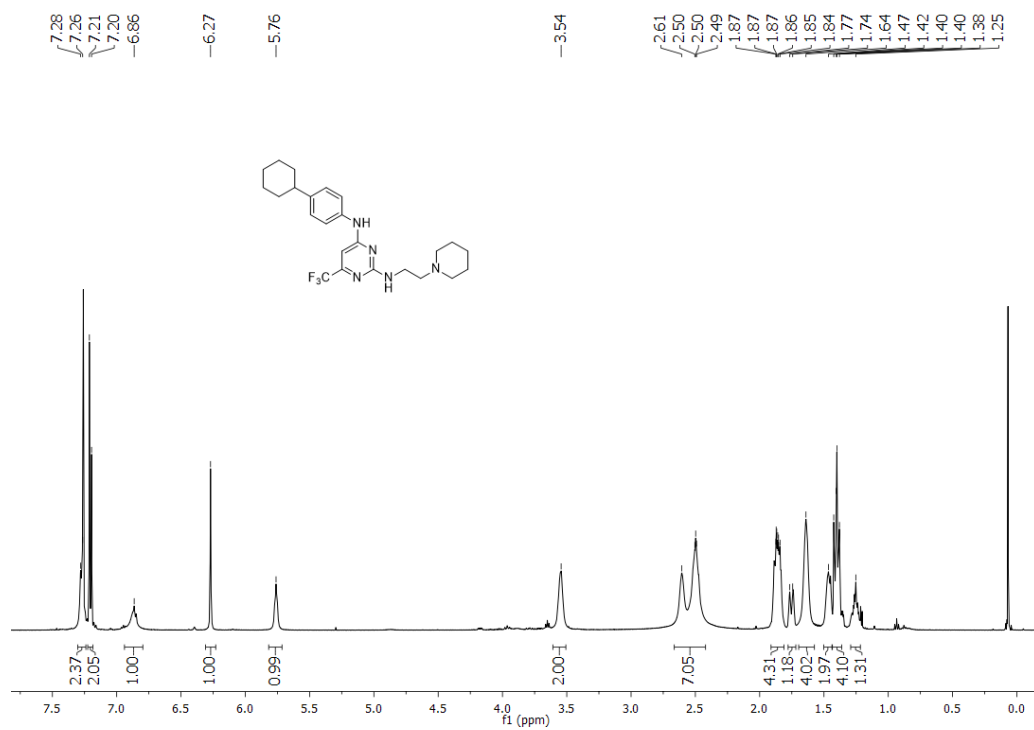


Figura A52. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 32.

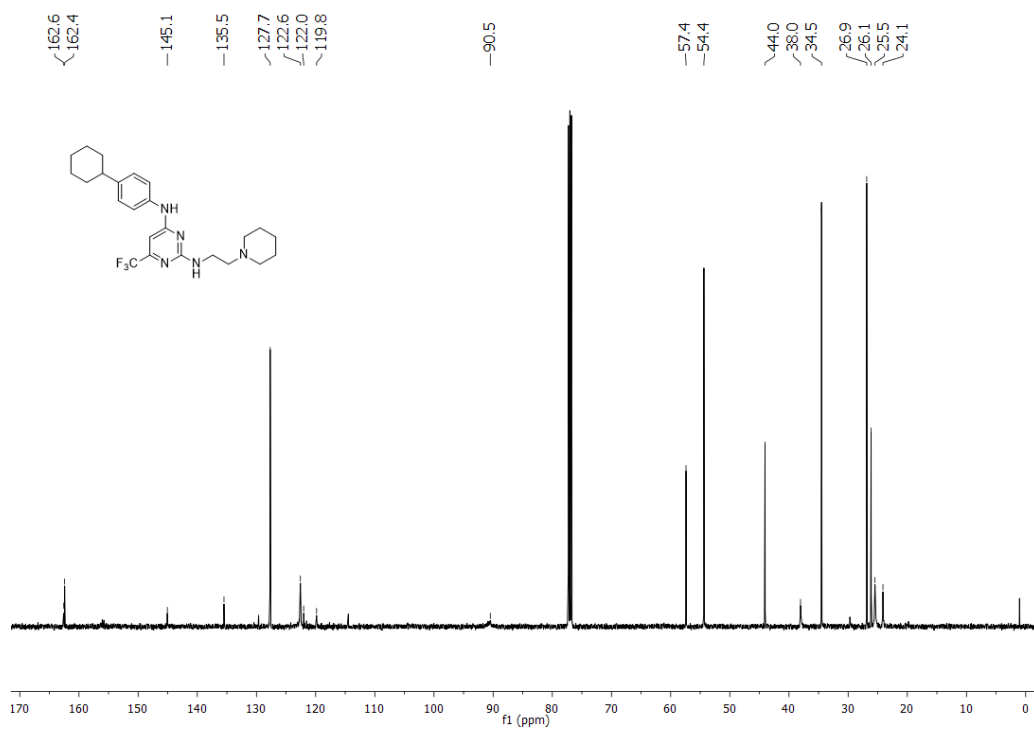


Figura A53. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 32.

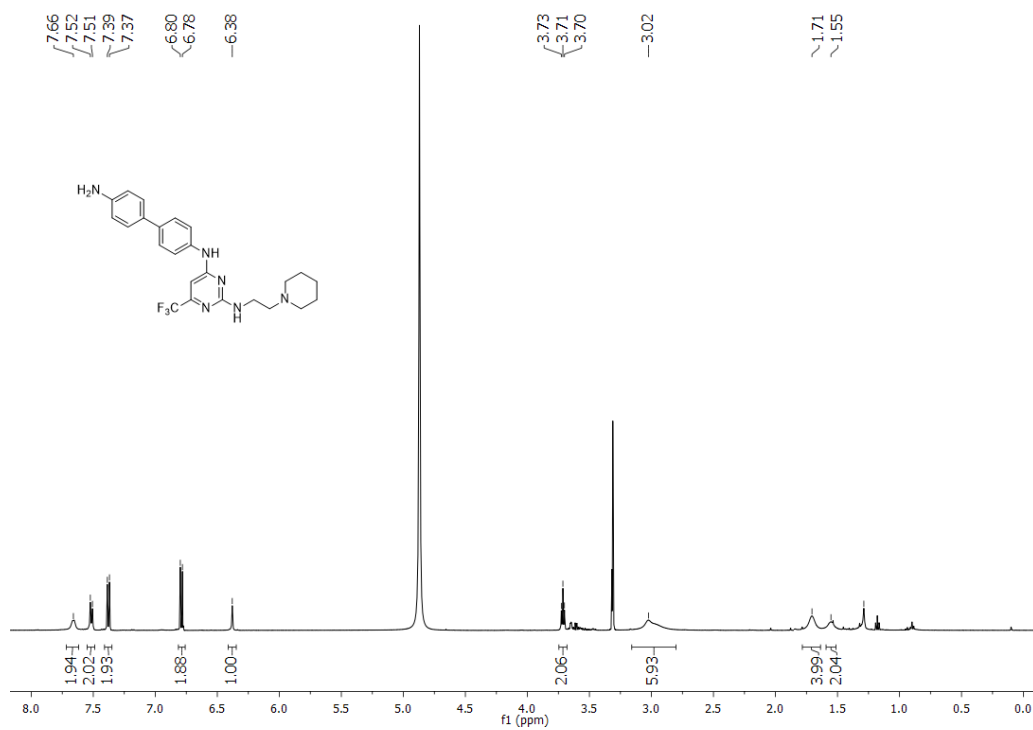


Figura A54. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 33.

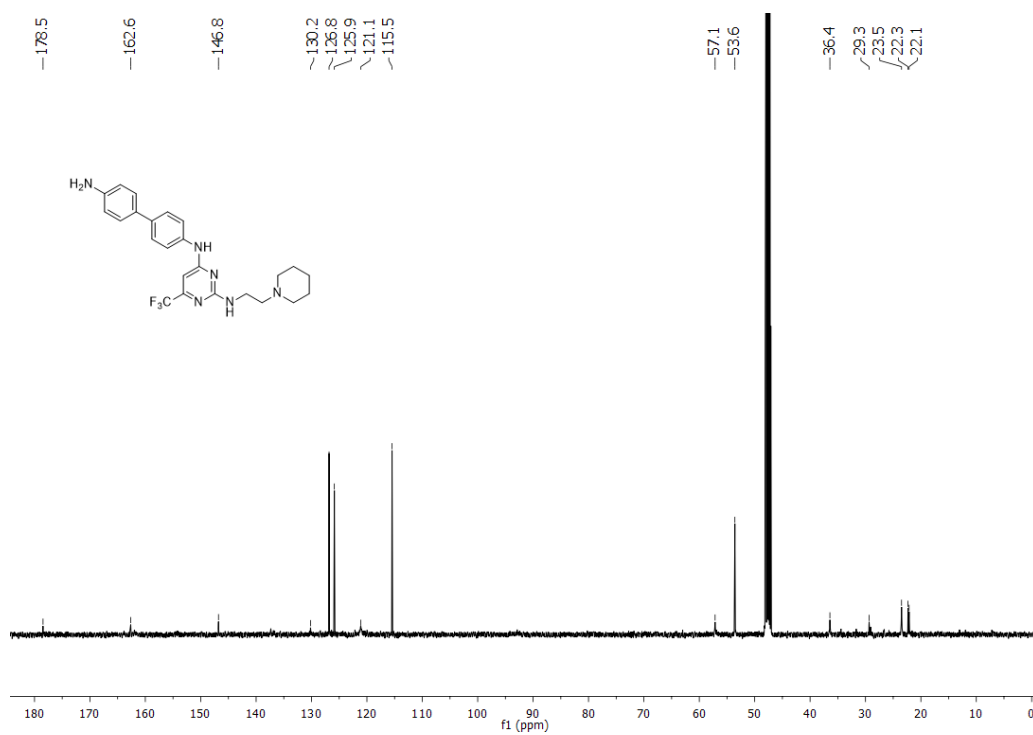


Figura A55. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 33.

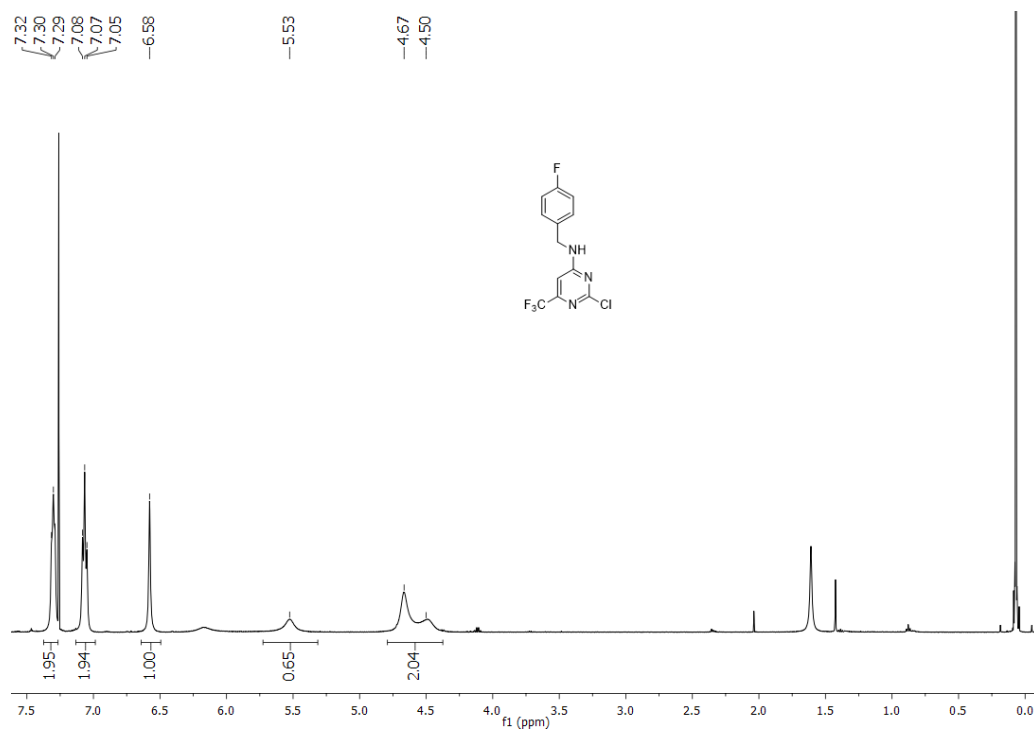


Figura A56. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 34.

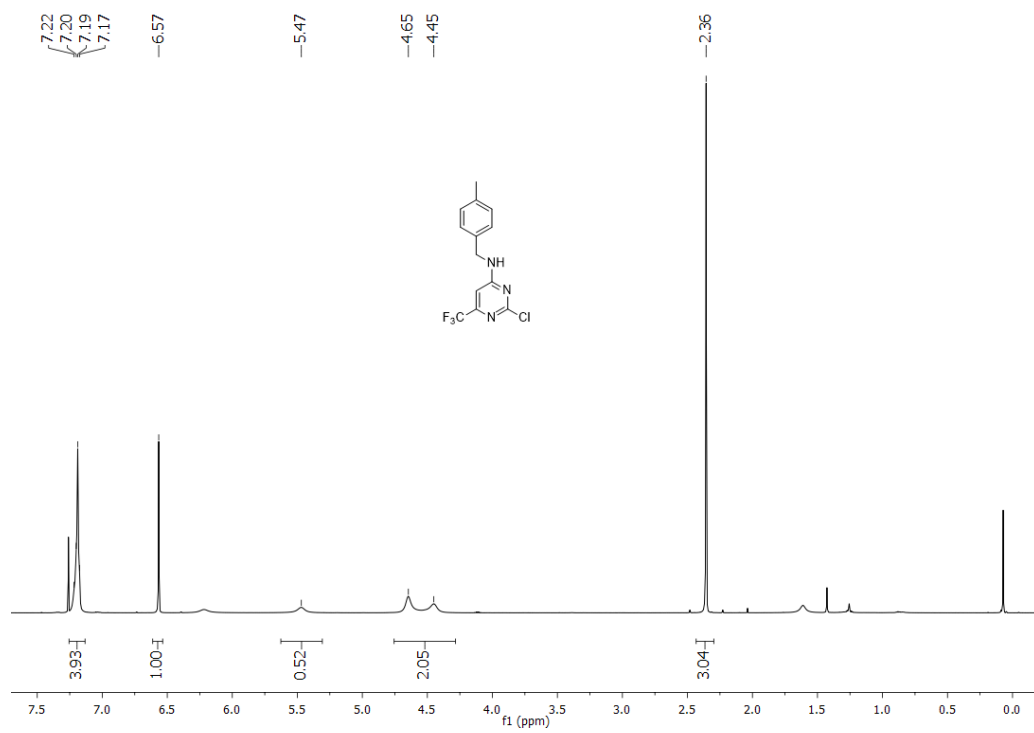


Figura A57. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 35.

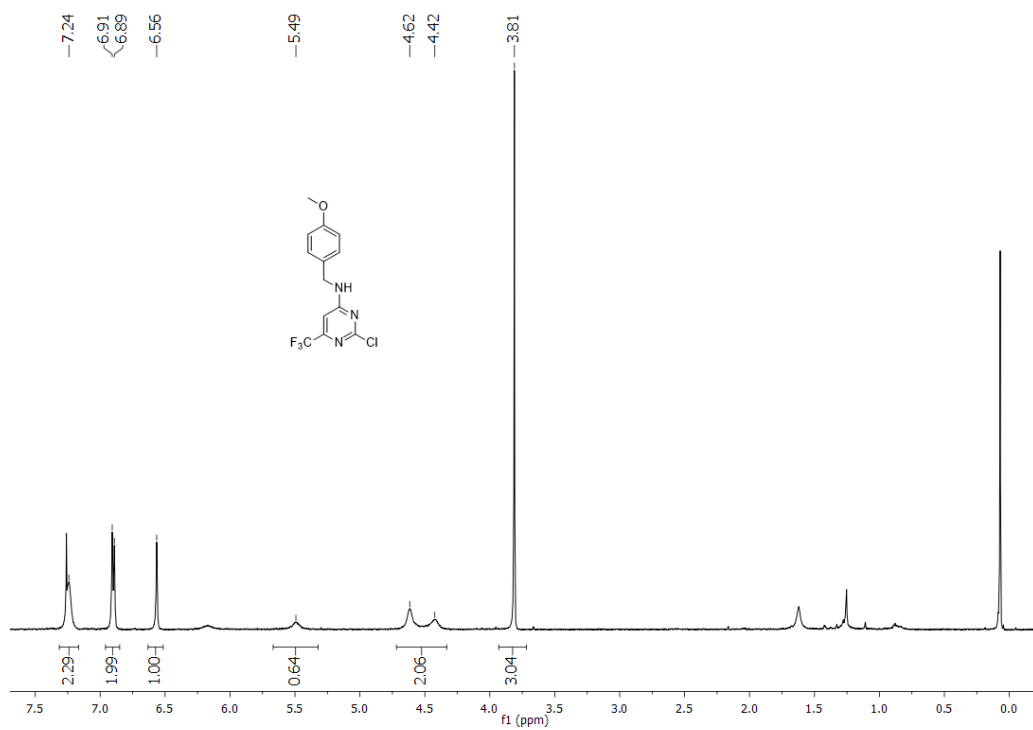


Figura A58. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 36.

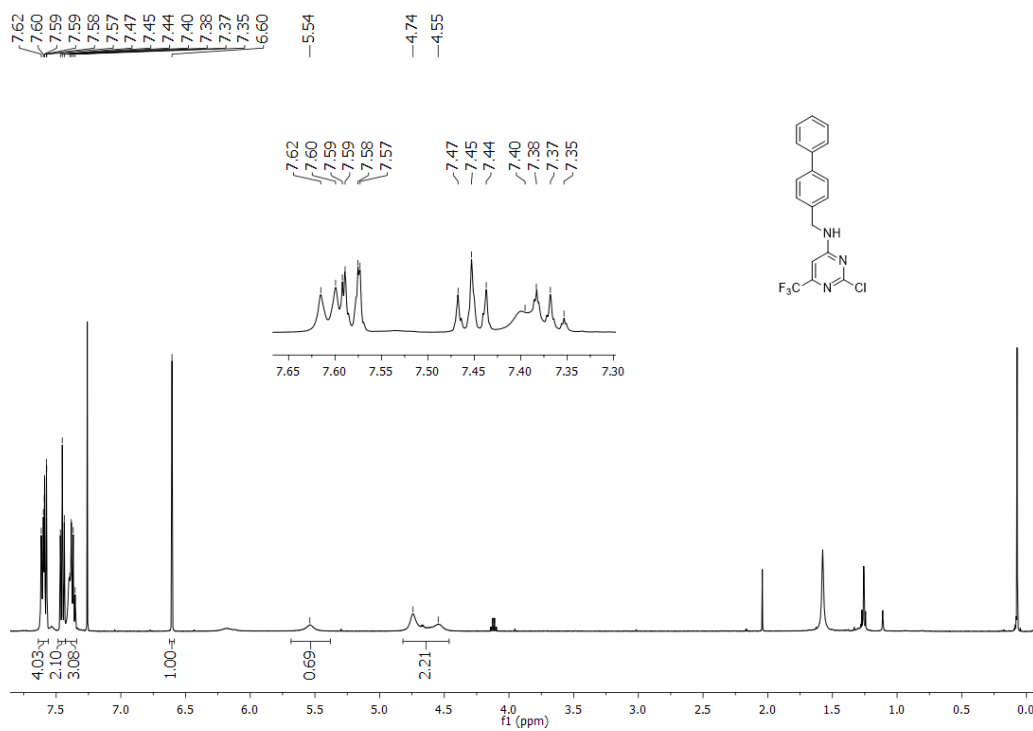


Figura A59. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 37.

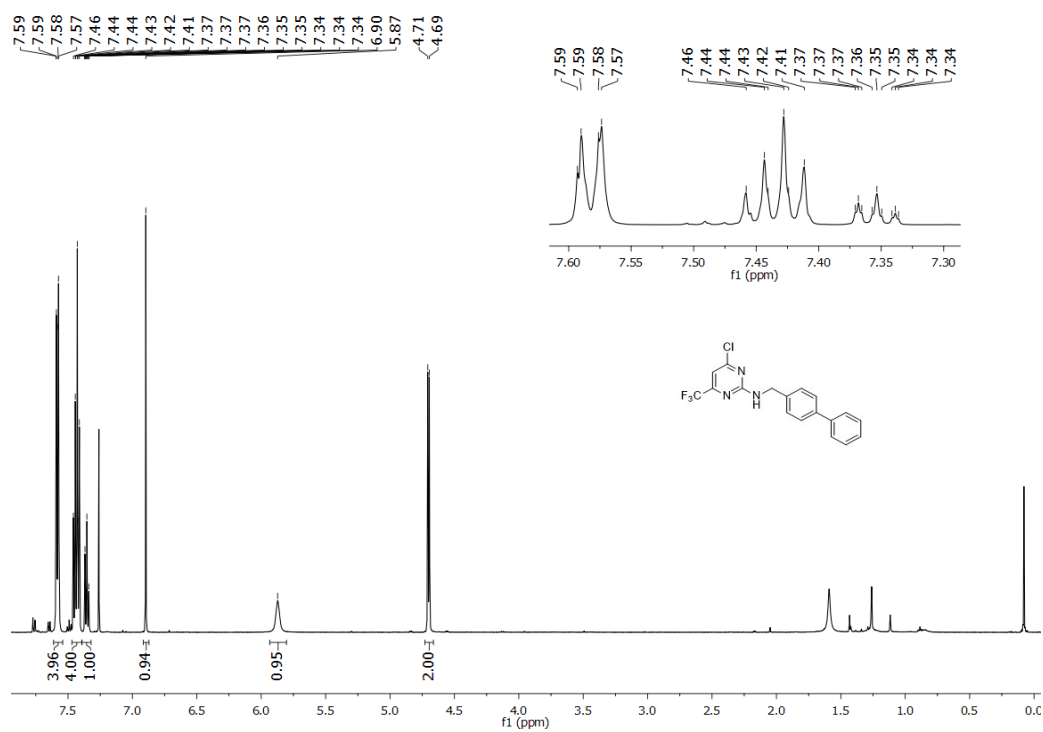


Figura A60. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 37b.

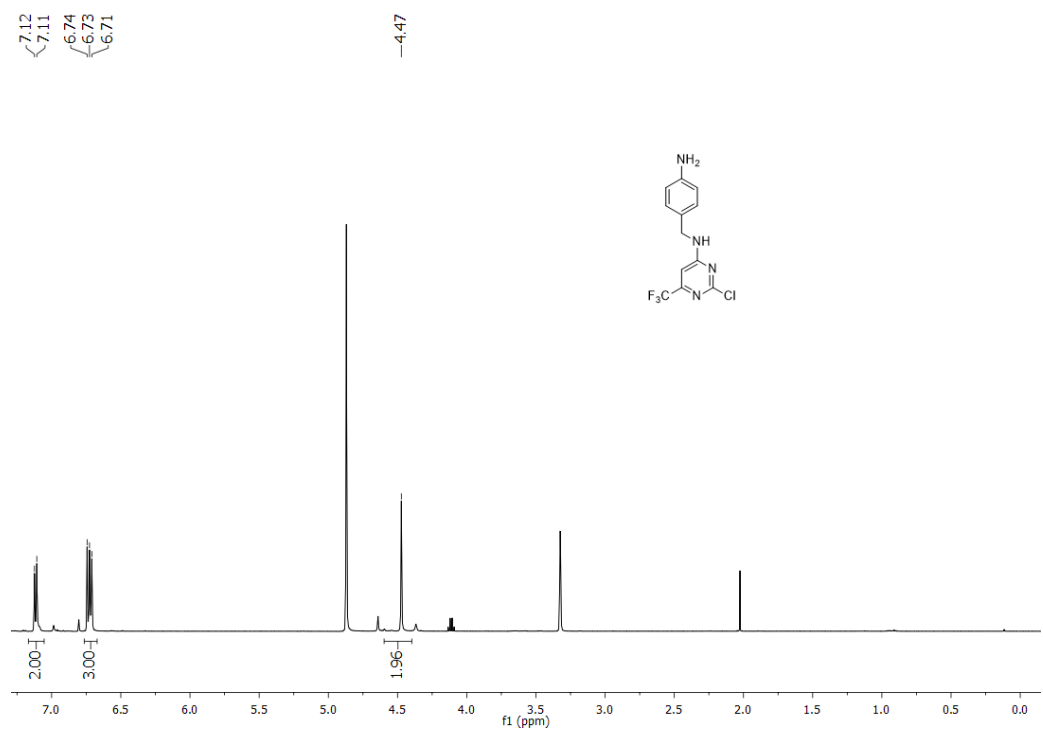


Figura A61. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 38.

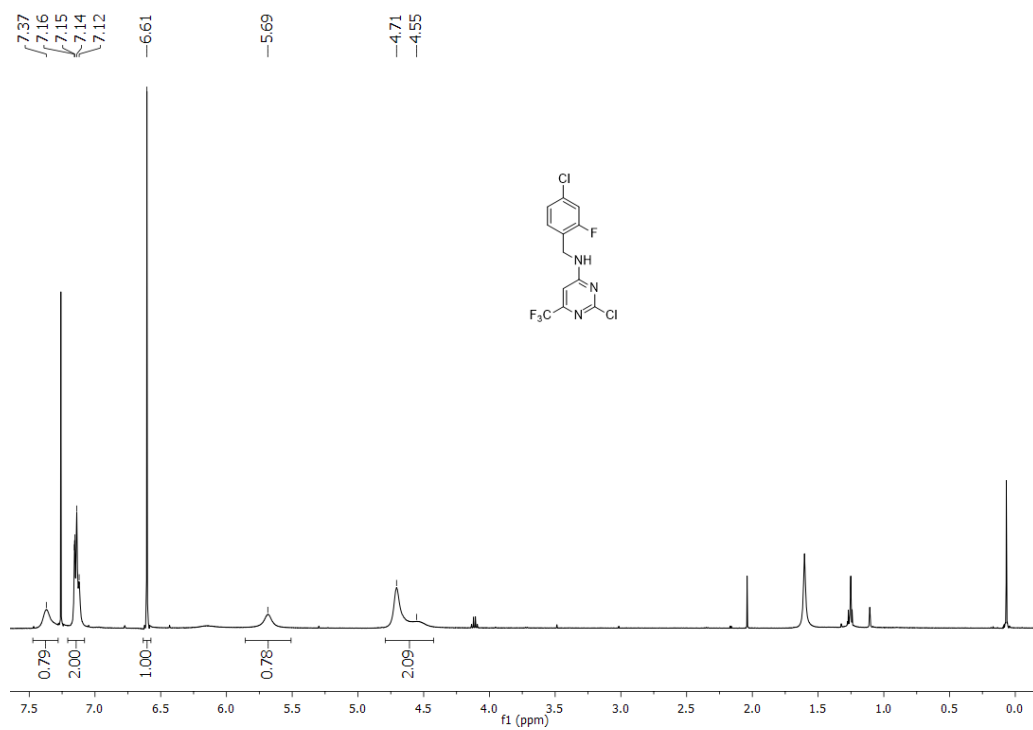


Figura A62. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 39.

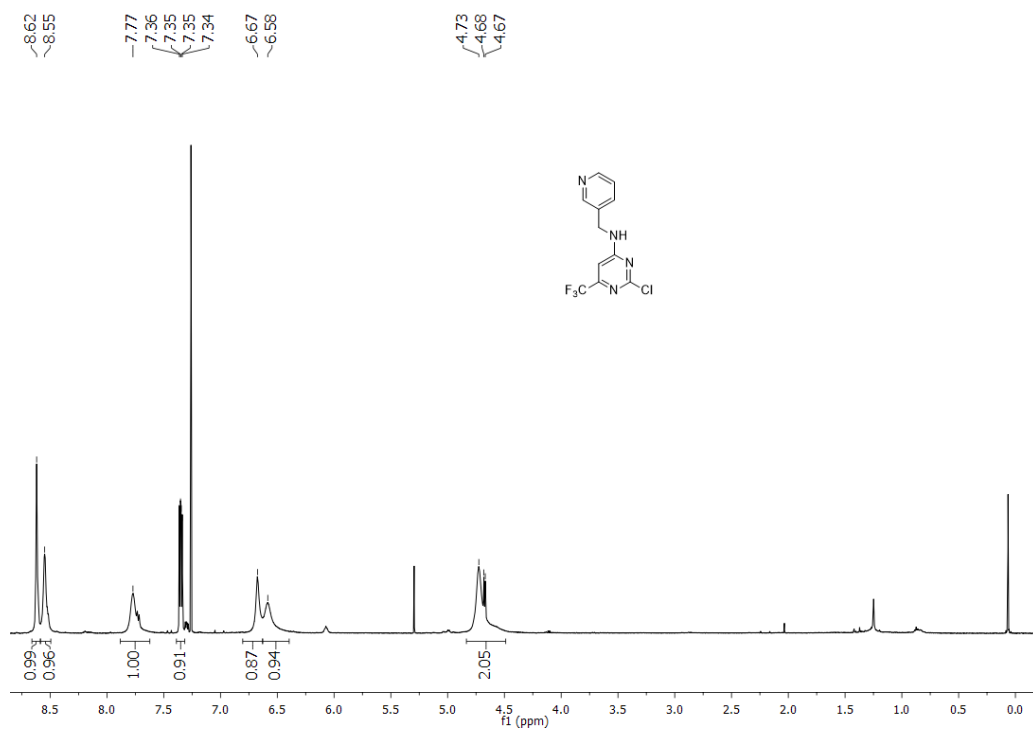


Figura A63. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 40.

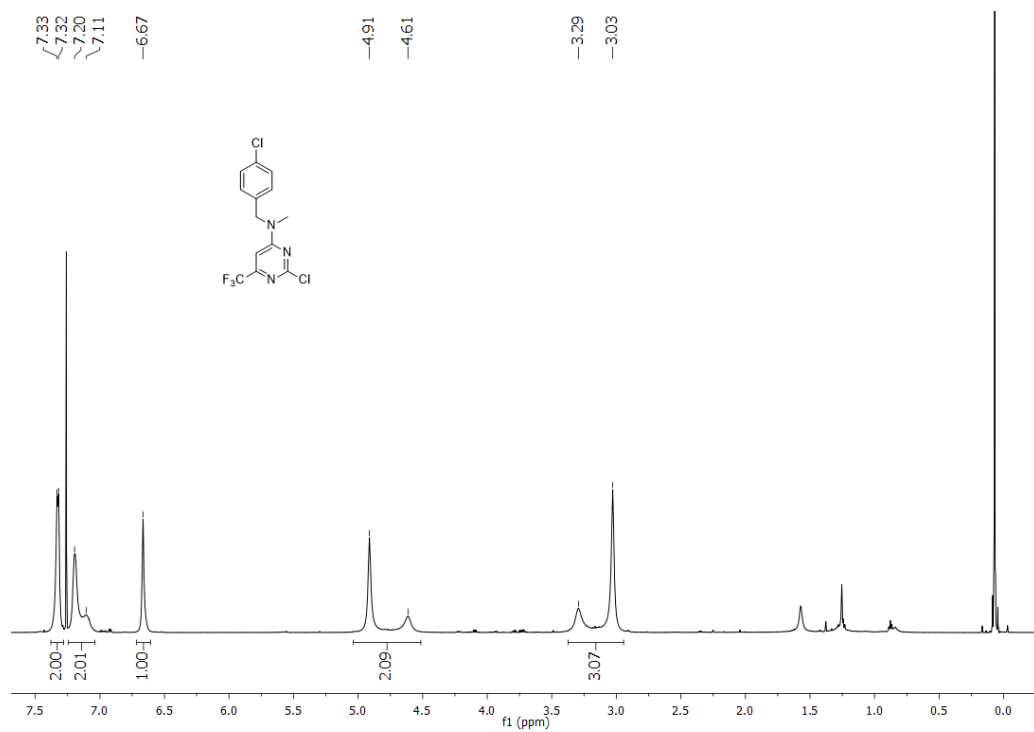


Figura A64. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 41.

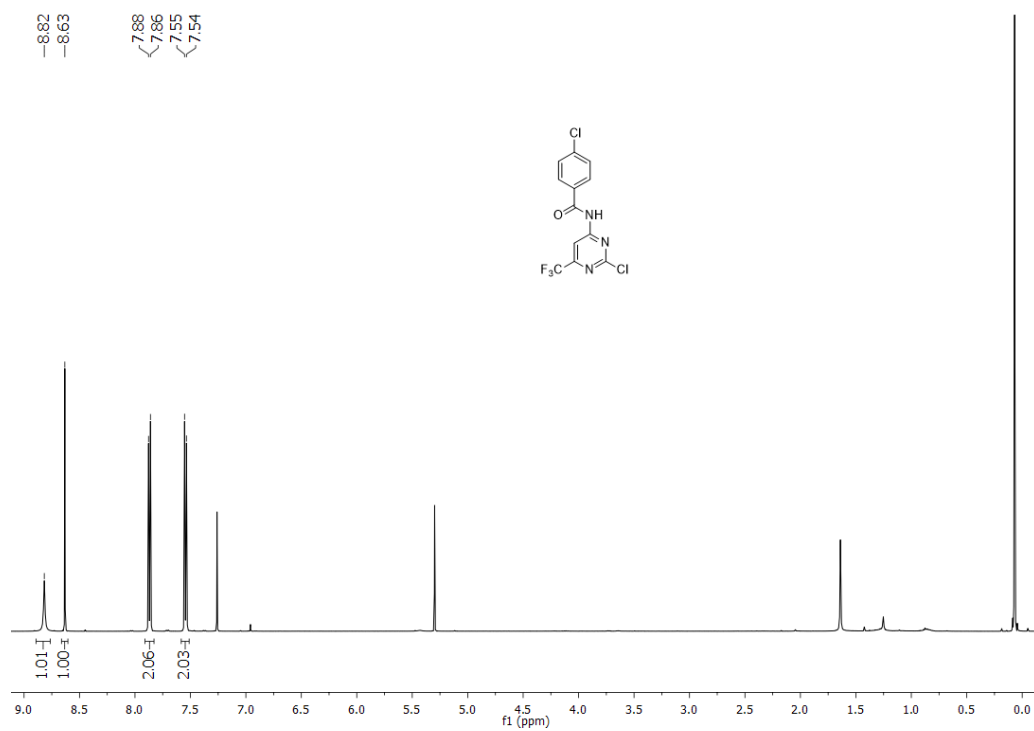


Figura A65. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 44.

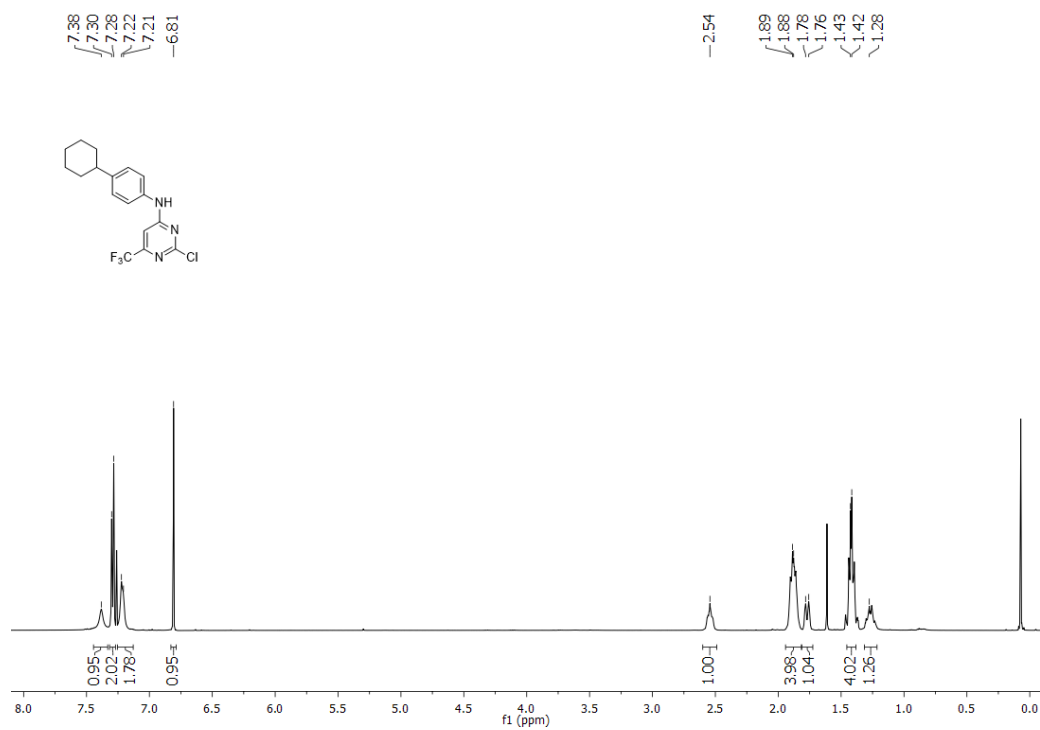


Figura A66. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 45.

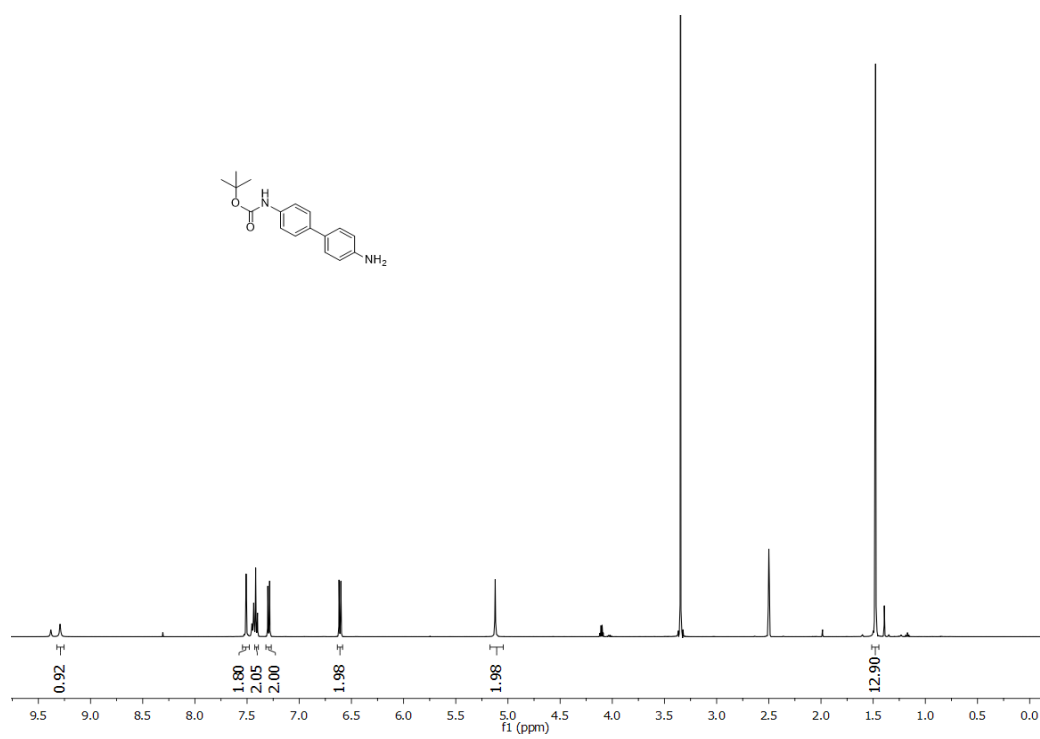


Figura A67. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 46.

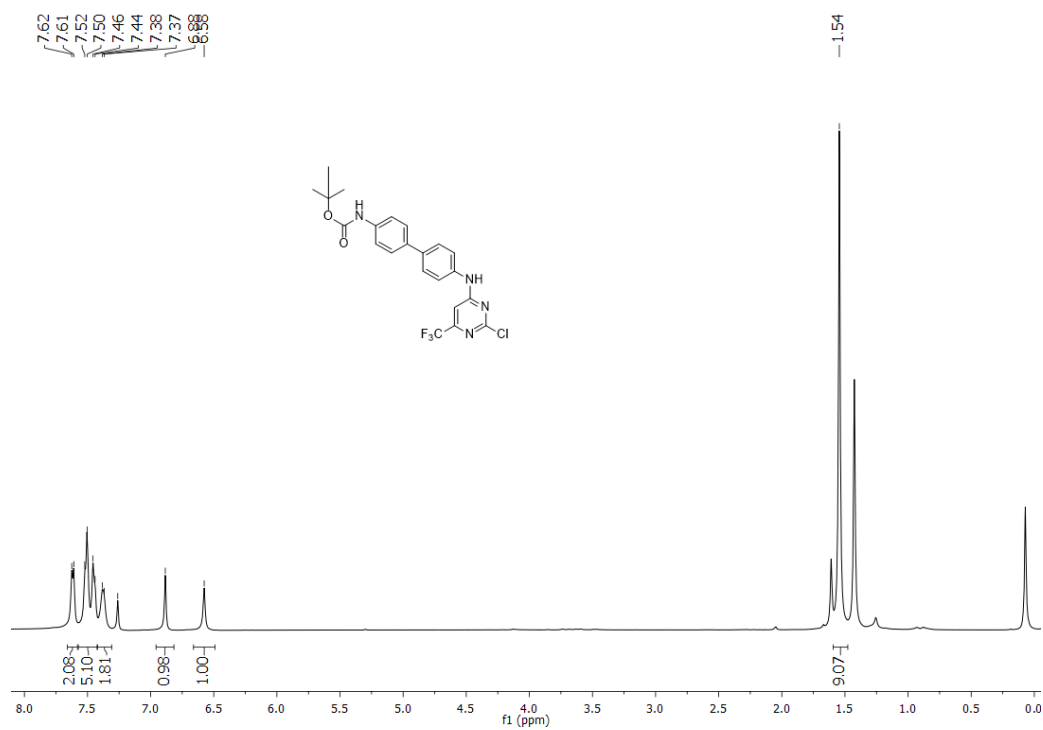
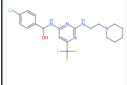
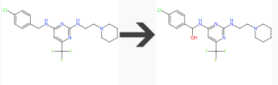
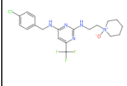
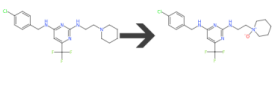
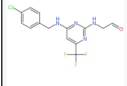
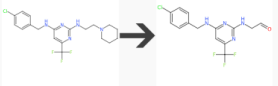
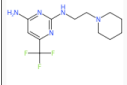
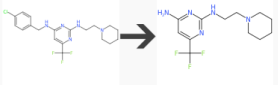
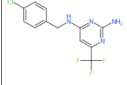


Figura A68. Espectro de ¹H-RMN del compuesto **47**.

- Anexo IV

Listado de posibles productos de metabolismo de fase I predichos por el servidor en línea BioTransformer.

Predicted Result	SMILES	Chemical Formula	Major Isotope Mass (Da)	Reaction Type	Reaction Info	Biotransformation Reaction
	<chem>C1C=CC(=CC1)C(NC2=NC(NCCN3CCCCC3)=NC(C(F)(F)F)=C2)O</chem>	C19H23ClF3N5O	429.1543	Hydroxylation of non-terminal aliphatic carbon adjacent to aromatic ring	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
	<chem>C1C=CC(=CC1)CNC2=NC(NCC[N+](=O)[O-])=NC(C(F)(F)F)=C2</chem>	C19H23ClF3N5O	429.1543	N-Oxidation of alicyclic tertiary amine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
	<chem>C1C=CC(=CC1)CNC2=NC(NCC=O)=NC(C(F)(F)F)=C2</chem>	C14H12ClF3N4O	344.0651	N-Dealkylation of alicyclic tertiary amine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
	<chem>NC1=NC(NCCN2CCCCC2)=NC(C(F)(F)F)=C1</chem>	C12H18F3N5	289.1514	N-Dealkylation of secondary arylalkylamine AndFromCyProduct	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
	<chem>C1C=CC(=CC1)CNC2=NC(N)=NC(C(F)(F)F)=C2</chem>	C12H10ClF3N4	302.0546	N-Dealkylation of secondary arylalkylamine AndFromCyProduct	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	