



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE ANÁLOGOS  
QUINOXALÍNICOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD  
QUIMIOTERÁPICA**

**Farm. Lucas Emanuel Fabian**

**Director: Prof. Dra. Albertina Moglioni  
Co-Director: Prof. Dr. Darío Estrin**

**Departamento de Farmacología  
Cátedra de Química Medicinal**

**2015**



Quisiera agradecer profundamente a todas aquellas personas que mucho me han ayudado para llegar hasta esta instancia:

A Beta por sus conocimientos, generosidad y confianza (y paciencia), que la hacen una persona excepcional, querida y excelente docente.

A Darío por introducirme al mundo de cálculo, por sus geniales clases de simulación y su capacidad para hacer que se entienda cualquier tema escabroso de los métodos computacionales.

A mis otros maestros, Graciela, Lili y Bety, “las chicas de orgánica”, que si bien no fueron directores de este trabajo, lo han sido indirectamente ayudándome a resolver muchos de los problemas que se me han presentado en el laboratorio y en la escritura de éste trabajo.

A mis queridos Nato y Matías que me han ayudado incondicionalmente en muchísimos asuntos de este trabajo de Tesis, y más que nada su amistad invaluable (y también, su paciencia de oro).

A Gabriel y Guido que han hecho importantes aportes con datos y definiciones.

A la gente de Química Medicinal, Cristina, Natalia, Carlos, Federico, Daniel, Alejandro y Gina por su compañía diaria y buena onda.

Al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por prestarme los equipos para realizar las determinaciones fisicoquímicas de los compuestos sintetizados.

A mis queridas, Beatriz, Carolina y Micaela, que siempre estuvieron cuando las necesite (y Mica por hacerme todos los espectros de infrarrojo).

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral se hallan recogidos en las siguientes publicaciones:

New Synthetic Methodologies Pointing to Improve the Classical Hinsberg Reaction. Romina Glisoni, Javier Gris, Lucas Fabian, Beatriz Fernandez and Albertina Moglioni, *Tetrahedron Letters*, 2008, 49, 6, 1053-1056.

An efficient microwave-assisted esterification reaction employing methanesulfonic acid supported on alumina as catalyst. Lucas Fabian, Matías Gómez, Juan Caturelli Kuran, Graciela Moltrasio and Albertina Moglioni, *Synthetic Communications*, 2014, 44(16), 2386-2392.

NNRTI HIV Chemotherapeutics: Docking and 3D QSAR as complementary strategies in virtual screening of quinoxaline analogues library. Lucas Fabian, Natalia Gómez, Gabriel Jasinski, Darío Estrin, Albertina Moglioni, *European Journal Pharmaceutical Sciences* 50, Supplement 1 E1-E138, 2014

*A mi familia, Beatriz, Carolina y Micaela*

# Resumen

---

Las quinoxalinas constituyen un sistema heterocíclico presente en numerosos compuestos con demostrada y variada actividad biológica. Teniendo ello en cuenta, en este trabajo de Tesis Doctoral se ha abordado el diseño y la síntesis de compuestos quinoxalínicos con potencial aplicación como agentes quimioterápicos.

Con el fin de contribuir al diseño de nuevos compuestos con potencial actividad anti-HIV y/o antichagásica, ya sea a través de su acción inhibitoria sobre la transcriptasa reversa del virus de la inmunodeficiencia humana o de su inhibición de la cruzipaína, enzima esencial para el desarrollo del ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*, en este trabajo de Tesis Doctoral se han empleado varias estrategias de diseño de fármacos asistido por computadora para diseñar posibles inhibidores de los mencionados sistemas enzimáticos con estructura quinoxalínica.

A partir de los resultados alcanzados mediante el diseño *de novo* o a través del cribado virtual se propusieron un total de veinticinco compuestos quinoxalínicos que podrían resultar inhibidores de la transcripsa reversa y diez, muchos de ellos comunes al primer grupo, posibles ligandos de la cruzipaína. Estos compuestos fueron sintetizados empleando algunas metodologías habituales para la síntesis de quinoxalinas a las cuales se les introdujeron modificaciones que permitieron su optimización, tales como el empleo de radiación microondas como fuente de energía. De esta manera se aporta una ruta sintética lineal, sencilla y eficiente para la obtención de 8 compuestos quinoxalínicos no descritos en la bibliografía previamente.

Se iniciaron los estudios de la potencial actividad antichagásica de los compuestos diseñados y sintetizados dejando planteada la posibilidad de que ensayos posteriores contribuyan a demostrar la actividad de los mismos y la utilidad de los métodos computacionales en el diseño de nuevos compuestos quinoxalínicos activos.

El Capítulo I, de la presente tesis, corresponde a la Introducción, donde se relatan las generalidades del diseño de fármacos y la contribución de la química computacional al mismo, como así también una breve descripción sobre las actividades biológicas de compuestos quinoxalínicos. Se incluye una descripción somera de los aspectos más relevantes respecto del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA) y de la enfermedad de Chagas, dado que son objetivos de esta Tesis Doctoral el diseño de inhibidores de dos posibles blancos terapéuticos implicados en la terapia de esas patologías: la transcriptasa reversa (TR) del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y la cruzipaína (CP) del *Trypanosoma cruzi*.

El Capítulo II comprende el diseño de los compuestos con potencial actividad inhibitoria de la TR y de la CP mediante el empleo de distintas herramientas computacionales, tales como cribado virtual, QSAR 3D, docking y dinámica molecular, entre otras, para el diseño de inhibidores de la TR y diseño *de novo* para ligandos de la CP. El capítulo incluye la metodología empleada.

En el Capítulo III se describe la síntesis y la caracterización de una veintena de quinoxalinas sustituidas, potencialmente activas, de acuerdo al diseño realizado en el capítulo II. Al final del capítulo se incluye la parte experimental correspondiente.

En la última parte, Conclusiones generales y perspectivas, se da cuenta de las conclusiones generales del mismo en los dos aspectos abordados en esta Tesis y se señalan las perspectivas que surgen a partir del trabajo realizado.

Al final de la Tesis se incluye la Bibliografía a la que se hace referencia en todo el manuscrito.



# Abreviaturas y Siglas

---

ADN: ácido desoxirribonucleico  
AMA: ácido metanosulfónico soportado sobre alúmina  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
ARNt: ARN de transferencia  
atQNXs: 4-acil-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-onas  
CADD: diseño de fármacos asistido por computadora  
CAT: catepsina  
CATL: catepsina L  
CATS: catepsina S  
CINB: 2-cloro-1-nitrobenceno  
COSY: espectro de correlación homonuclear H-H  
CP: cruzipaína  
CV: cribado virtual  
DM: dinámica molecular  
DMSO-d<sub>6</sub>: dimetil sulfóxido deuterado  
Dp: descriptor WHIM global pesado por polarizabilidades  
Dv: descriptor WHIM global pesado por volumen de Van der Waals  
dQNXs: dihidroquinoxalin-2-onas  
dt: time step  
E2u: descriptor WHIM eta direccional pesado por conectividad  
E3m: descriptor WHIM eta direccional pesado por masa  
EFV: efavirenz  
ES: enzima-sustrato  
F: prueba de Fisher.  
FNB: 2-flúor-1-nitrobenceno  
GAFF: general AMBER force field  
HF: método de Hartree-Fock para cálculos mecanocuánticos.  
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana  
HPLC: cromatografía líquida de alta afinidad  
HSQC: correlación heteronuclear de coherencia cuántica simple  
HTS: cribado de alto rendimiento  
INNTR: inhibidores no nucleosídicos de la TR  
INTR: inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa reversa  
INtTR: inhibidores nucleotídicos de la transcriptasa reversa  
IP: inhibidores de la proteasa  
IR: infrarrojo  
IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry  
J: constante de acoplamiento

kDa: kilodalton

Lig: ligando

MMFF94: merck molecular force Field 94

MMPBSA: mecánica molecular-área de superficie de Poisson-Boltzmann

MS: espectrometría de masas

MW: microondas

NVP: nevirapina

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONUSIDA: Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el HIV/SIDA

PDB: Protein Data Bank

PF: punto de fusión

pIC<sub>50calc</sub>: actividad biológica calculada expresada como el log 1/IC<sub>50</sub>

pIC<sub>50exp</sub>: actividad biológica hallada experimentalmente expresada como el log 1/IC<sub>50</sub>

PLS: mínimos cuadrados parciales

ppm: partes por millón

QSAR: relación estructura-actividad cuantificada

QV: quimioteca virtual

REA: relación estructura-actividad

RESP: restrained electrostatic potential

RMN: resonancia magnética nuclear

<sup>13</sup>C-RMN: resonancia magnética nuclear de carbono

<sup>1</sup>H-RMN: resonancia magnética nuclear de hidrógeno

RMSD: root-mean-square deviation

SEA: sustitución electrofílica aromática

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia humana

SMILES: simplified molecular-input line-entry system

SNA: sustitución nucleofílica aromática

SOD: síntesis orientada a la diversidad

TARGA: terapias antiretrovirales de gran actividad

TLC: cromatografía en placa delgada

TOCSY: espectro de correlación total H-H

tQNXs: 1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-onas

TR: transcriptasa reversa

TSC: tiosemicarbazona

WHIM: weighted holistic invariant molecular descriptors

$\alpha^D$ : rotación óptica específica

$\delta$ : desplazamiento químico

$\Delta G$ : diferencia de energía libre

# Índice

---

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1 Desarrollo de fármacos .....	2
1.2 Diseño de fármacos asistido por computadora .....	4
1.2.1 Métodos de aproximación directa .....	5
1.2.2 Métodos de aproximación indirecta .....	6
1.3 Quinoxalinas .....	8
1.3.1 Actividad biológica asociada a la farmacología de receptores y canales .....	9
1.3.2 Inhibidores transportadores de membrana y de la cascada de coagulación .....	10
1.3.3 Antimicrobianos.....	11
1.3.4 Anticancerígenos.....	12
1.3.5 Antichagásicos .....	14
1.3.6 Antirretrovirales .....	14
1.4 Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.....	15
1.4.1 El virus de inmunodeficiencia humana: composición y genoma .....	16
1.4.2 Ciclo vital del HIV .....	17
1.4.3 Fármacos anti-HIV .....	19
1.4.4 La terapia antirretroviral.....	22
1.5 Enfermedad de Chagas.....	23
1.5.1 Ciclo de vida del parásito .....	24
1.5.2 Agentes farmacológicos disponibles.....	26
1.5.3 Blancos biológicos presentes en <i>T. cruzi</i> para el desarrollo de nuevos fármacos.....	26
2. OBJETIVOS .....	32
 CAPITULO II. DISEÑO DE QUINOXALINAS .....	 34
1. DISEÑO MOLECULAR.....	35
1.1 Fundamentos teóricos.....	35
2. INHIBIDORES NO NUCLEOSÍDICOS DE LA TR .....	46
2.1 Aspectos estructurales .....	46
2.2 Diseño de INNTRs .....	54
2.2.1 Cribado virtual.....	54
2.2.2 Quimioteca virtual.....	55
2.2.3 Filtro de compuestos .....	58
2.2.4 Cribado de la quimioteca virtual .....	71
3. INHIBIDORES DE CP .....	74
3.1 Aspectos estructurales .....	74
3.2 Diseño de inhibidores de CP .....	77
4. CONCLUSIONES.....	84
5. METODOLOGÍA .....	85
 CAPITULO III. SÍNTESIS DE QUINOXALINAS.....	 88
1. SÍNTESIS DE QUINOXALINAS .....	89
1.1 Características químicas .....	89
1.2 Métodos generales de síntesis de quinoxalinas .....	92
1.3 Métodos de síntesis basados en tecnología de microondas.....	96
1.4 Desarrollo y resultados.....	98
1.4.1 1,2,3,4-Tetrahydroquinoxalin-2-onas (tQNXs) .....	98
1.4.2 4-Acil-1,2,3,4-tetrahydro-quinoxalin-2-onas (atQNXs) .....	111
1.4.3 1,2-Dihidro-quinoxalin-2-onas (dQNX).....	114
1.5 Estudio preliminar de la actividad biológica de algunos de los compuestos preparados.....	122
2. CONCLUSIONES.....	124
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	125
3.1 Síntesis química.....	125
3.2 Determinación de actividad biológica .....	145

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS..... 146

BIBLIOGRAFÍA ..... 150

# Introducción y Objetivos

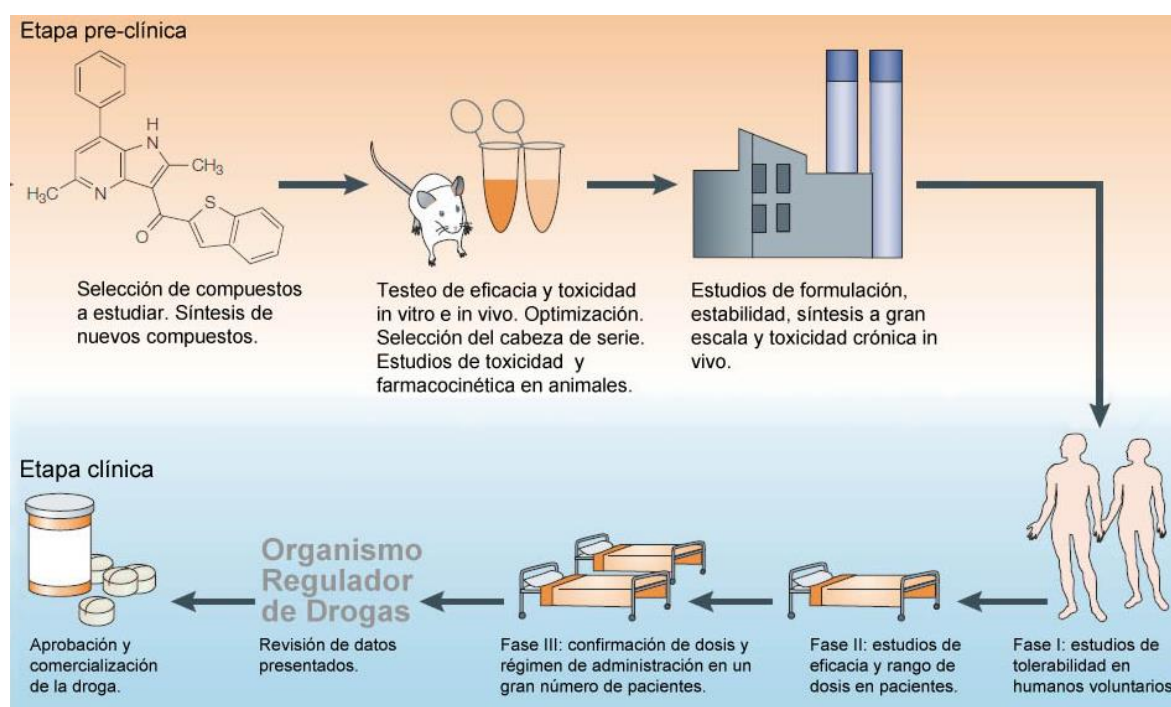
---

# 1 Introducción

## 1.1 Desarrollo de fármacos

El desarrollo de fármacos es un proceso prolongado, de alto costo y riesgo. Existe una gran probabilidad de fracaso dado que la mayoría de los candidatos a fármacos no supera las pruebas de seguridad y eficacia clínica en animales de experimentación. El costo total de este proceso, que involucra muchas etapas de investigación a largo plazo, se estima que es de alrededor de 1400 millones de dólares por droga que sale al mercado<sup>1</sup> y requiere un período de desarrollo que varía entre 10 y 15 años (figura 1.1).

La necesidad de contar con opciones terapéuticas mejoradas, o hallar nuevos blancos de acción sobre patologías que puedan ser tratadas farmacológicamente es el motor que pone en marcha la intensa investigación que se realiza en la búsqueda de moléculas bioactivas. En este sentido, el desarrollo de nuevos fármacos es un área de sumo interés ya sea en políticas de salud pública, como así también en la industria farmacéutica.



**Figura 1.1** Etapas en el desarrollo de un fármaco. Imagen adaptada de Lombardino, J.G. 2004.<sup>2</sup>

El proceso se inicia con la identificación de estructuras químicas que pudieran resultar nuevos cabezas de serie o hits en relación a una actividad biológica determinada. Estos pueden provenir de la síntesis química, de fuentes naturales o de procesos biotecnológicos y su preparación y/o aislamiento debe estar seguido de la caracterización estructural de los compuestos elegidos. Exceptuando los casos en los que se han identificado cabezas de serie fortuitamente, como el



hallazgo de la penicilina, o los resultantes de observar efectos secundarios de fármacos ya existentes, como sería el caso de las sulfas hipoglucemiantes, en la búsqueda de nuevos cabezas de serie se distinguen dos metodologías: métodos de cribado y métodos de diseño (tabla 1.1).<sup>2</sup>

Las estrategias tradicionales para la identificación del compuesto cabeza de serie están basadas en esquemas de cribado (*screening*) y resultan de ensayar una variedad de compuestos sobre una actividad biológica (aleatorio), un compuesto sobre una variedad de actividades biológicas (exhaustivo), o una variedad de compuestos sobre una variedad de actividades biológicas (combinado). Un perfeccionamiento de las estrategias de cribado deriva en los métodos de cribado de alto rendimiento (*High-Throughput Screening* o HTS) los cuales emplean kits de testeo biológico y sistemas robotizados para la automatización de los distintos ensayos, combinación que facilita el proceso de hallazgo y permite el análisis de una gran población de compuestos.

Por otra parte, las estrategias basadas en métodos de diseño se fundamentan sobre modelos teóricos de relación estructura-actividad (REA) para estimar la actividad del compuesto cabeza de serie con respecto a un blanco biológico, evitando en una primera instancia la síntesis de los candidatos. Estos modelos teóricos se construyen a partir de información experimental, que puede provenir del conocimiento:

- A) De rutas metabólicas o procesos biológicos implicados en una patología, lo que normalmente conduce al diseño de compuestos que conservan cierta analogía con los sustratos o mediadores naturales implicados en el proceso.
- B) De compuestos con actividad biológica conocida.
- C) De la estructura del blanco biológico involucrado. El procesamiento de esta información es en mayor o menor medida realizado por técnicas computacionales, resultando de este modo la química computacional una nueva área involucrada en el hallazgo de fármacos.

Resulta crucial disponer de una quimioteca para aplicar los métodos de cribado, mientras que los métodos de diseño se desarrollan en base a la síntesis química y los ensayos biológicos de unos pocos compuestos. Por esto, los métodos de diseño son, en principio, menos costosos y con menor impacto ambiental.

Tabla 1.1 Cuadro comparativo entre los métodos de hallazgo

	Métodos de Diseño	Métodos de Cribado
<b>Farmacóforo</b>	Necesita modelo	No necesita modelo
<b>Fuente</b>	Síntesis dirigida	Extractos naturales, quimiotecas comerciales, Síntesis orientada a la diversidad; química combinatoria
<b>Prototipo</b>	Estimado, requiere confirmación mediante ensayo biológico	A partir de prueba directa
<b>Costo inicial</b>	Equipamiento para cómputo	Equipamiento para laboratorio reactivos, intermediarios solventes, insumos químicos
<b>Reciclado</b>	El equipamiento se puede reutilizar para estudiar otros blancos biológicos	Los reactivos e insumos se tienen que volver a adquirir para estudiar otros blancos biológicos

Una vez que un compuesto es identificado, sintetizado y su perfil farmacológico es definido, la etapa pre-clínica continúa con ensayos sobre animales de experimentación para evaluar la eficacia y toxicidad de los mismos. A partir de los resultados hallados, el compuesto puede definirse como prototipo y queda sujeto a cambios estructurales con el fin de hallar análogos que mejoren las propiedades indeseables detectadas en las primeras etapas de evaluación biológica. Como resultado, el análogo que reúna las mejores condiciones pasará a la siguiente etapa de desarrollo como compuesto líder.

Finalmente, en la etapa clínica, tiene lugar la evaluación secuencial del principio activo en humanos voluntarios. Comúnmente esta etapa consiste en tres fases: primero se evalúa la tolerabilidad del mismo (fase I), luego la eficacia y el rango de dosis (fase II) y finalmente, en un estudio más amplio, se confirman las dosis y el régimen de administración (fase III). Una vez finalizados estos estudios, los datos son presentados ante el organismo gubernamental correspondiente para la aprobación del candidato a fármaco.<sup>2</sup>

## 1.2 Diseño de fármacos asistido por computadora

Se denomina diseño de fármacos asistido por computadora (CADD) al área de la química computacional que estudia los modelos de REA empleando herramientas de cómputo.

El proceso de diseño de compuestos activos sobre un blanco biológico comienza con la creación de modelos farmacofóricos o aproximaciones a ellos. Un farmacóforo se define como un conjunto de elementos estructurales presentes en un compuesto químico, denominado normalmente ligando, que determinan el grado de complementariedad o afinidad por un sitio de unión a un blanco biológico (macromolécula). Estos modelos son estudiados por medio de métodos computacionales o *in silico* a partir de la información aportada desde distintas disciplinas de la

química y la biología. El farmacóforo puede ser descripto de forma directa si se dispone de la estructura tridimensional del blanco biológico (aproximación directa), o bien de manera indirecta cuando se emplean modelos de correlación estructura-actividad entre propiedades fisicoquímicas o descriptores moleculares y su actividad biológica (aproximación indirecta).

Sobre estas aproximaciones se han desarrollado diversos protocolos de exploración para la identificación de un compuesto activo, que de acuerdo a cómo conducen a la identificación del mismo, se los agrupa en dos tipos: a) métodos de cribado virtual (CV) y b) métodos de diseño *de novo* (figura 1.2).<sup>3,4</sup>

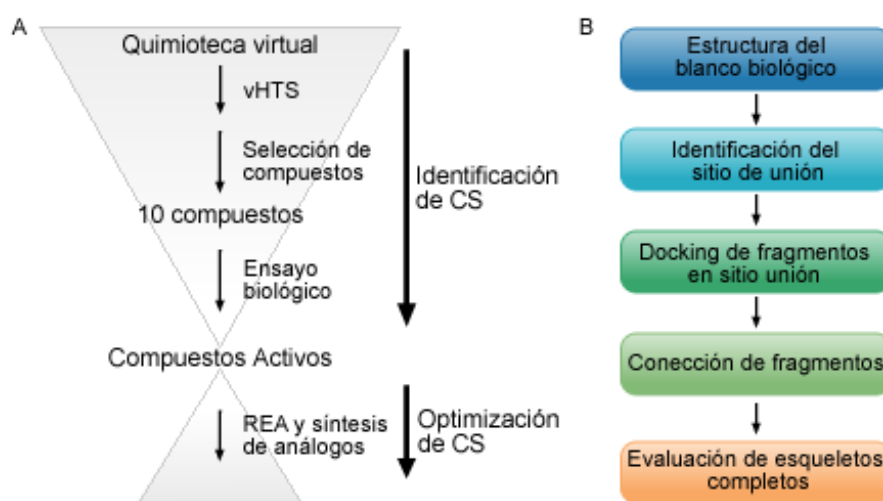
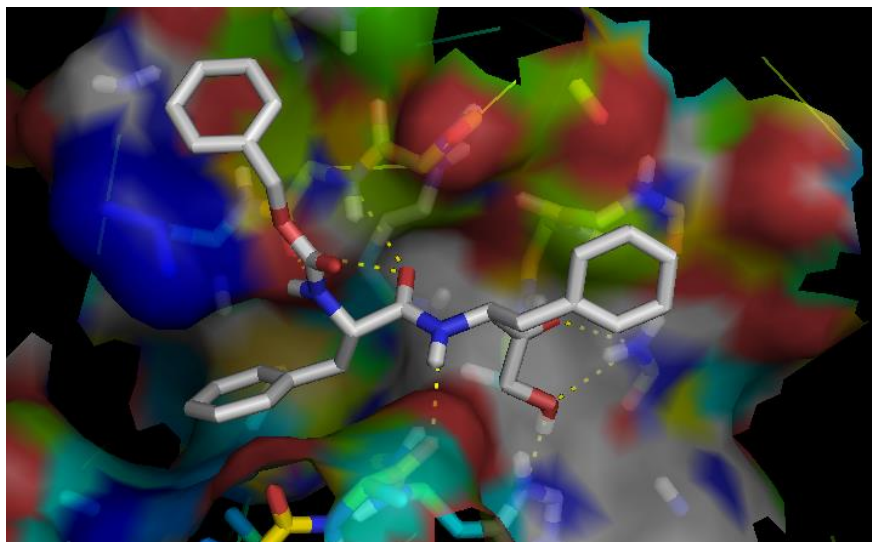


Figura 1.2 Protocolo de cribado virtual (A) y métodos *de novo* (B). CS: Cabeza de serie.<sup>3</sup>

### 1.2.1 Métodos de aproximación directa

Son métodos que necesitan del modelo tridimensional del blanco biológico, el cual puede ser obtenido por caracterización estructural empleando técnicas de difracción de rayos X (DRX), resonancia magnética nuclear (RMN) o utilizando técnicas de modelado por homología. La estructura tridimensional es utilizada para explorar el espacio químico mediante *docking*, o bien para diseñar *de novo* compuestos a partir de la complementariedad con el sitio de unión.<sup>5</sup>

Las técnicas de *docking* permiten evaluar la actividad potencial de un compuesto por generación de modelos de interacción ligando-blanco (figura 1.3). Estos constan de juegos conformacionales de ligandos confinados en una región de la molécula blanco, siendo cada conformero, junto con la orientación espacial adoptada, un modo de unión del ligando. Estos modelos de interacción son logrados por un proceso de dos etapas: 1) generar el conformero a partir de alguna técnica de generación de los mismos, y 2) estimar los descriptores termodinámicos de interacción ligando-blanco por medio de una función de *scoring*.



**Figura 1.3** Representación gráfica de los resultados de un estudio de docking: el ligando (color blanco) emplazado en su sitio de unión (contorno de color) y sus interacciones polares (puntos amarillos). La imagen se realizó a partir del complejo ligando-macromolécula PDB: 1ME4.

Para mejorar el valor predictivo de la interacción ligando-blanco existen a su vez esquemas de trabajo que incluyen estimaciones de la energía de interacción por medio de estudios de dinámica molecular, entre los que se pueden citar: LIE (*linear interaction energy*), MM-PBSA (*molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area*) y perturbación de energía libre (FEP, *free energy perturbation*).

### 1.2.2 Métodos de aproximación indirecta

Los mismos pueden dividirse de manera general de acuerdo a la siguiente clasificación:

**Relación estructura-actividad cuantificada (QSAR):** Son metodologías esencialmente estadísticas que buscan desarrollar modelos de correlación de propiedades. Descripto originalmente por Hansch<sup>6</sup> y Free,<sup>7</sup> en el caso particular de QSAR (acrónimo del inglés: *quantitative structure-activity relationship*) se busca correlacionar propiedades fisicoquímicas de una molécula (como descriptores moleculares) con la actividad biológica observada. Las expresiones más sencillas de estos modelos normalmente adoptan la forma lineal multiparamétrica, mostrada en la siguiente ecuación:

$$\log \frac{1}{[CE]} = a.\pi + b.RM + c.\sigma$$

Dónde: CE es la concentración efectiva a la cual se observa una propiedad biológica,  $\pi$  es un descriptor de lipofilicidad, RM un descriptor estérico y  $\sigma$  un descriptor electrónico. Los coeficientes a, b y c se obtienen por un método de regresión.

Los aspectos más importantes a tener en cuenta para desarrollar un modelo de QSAR son: el modelo biológico usado en la determinación de la actividad, la calidad de los descriptores y la rigurosidad estadística empleada en el análisis de correlación. Los mismos se describen brevemente a continuación:

- Ensayo biológico: la rigurosidad del ensayo permitirá llegar a conclusiones con distinto grado de certeza sobre lo estudiado. Por ejemplo, un ensayo *in vitro* directamente sobre el blanco biológico permitirá establecer descripciones más detalladas que un ensayo realizado *in vivo*.
- Calidad de los descriptores: tienen la propiedad de cuantificar alguna característica de los compuestos candidatos. Pueden tener su correlato con determinaciones experimentales de propiedades químicas o físicas, o pueden ser métricas determinadas a través de modelos teóricos.
- Rigurosidad estadística: la cantidad de observaciones, la cantidad de descriptores (variables a regresar), y el grado de independencia de las variables a regresar definen la metodología de regresión:
  - Simple o multivariante: para estos se hace de especial importancia que el número de observaciones supere al número de descriptores, y en el caso multivariante que los descriptores tengan la máxima independencia entre sí (ortogonalidad).
  - Mínimos cuadrados parciales (PLS): es especialmente apta cuando el número de variables a regresar superan al número de observaciones o cuando existe multicolinealidad entre ellas.

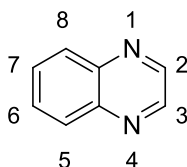
En particular, los descriptores moleculares pueden ser clasificados en: 1D, que especifican datos de tipo presencia/ausencia de restos o magnitudes fisicoquímicas; 2D, que incluyen información topológica, como la conectividad molecular y 3D, cuando contemplan la estructura tridimensional de la molécula. En lo que se refiere a la medida de similitud, se utilizan métricas como coeficientes de similitud y distancia. Muchos de estos descriptores o métricas resultan sensibles a la conformación de los ligandos, lo cual es importante tener en cuenta durante el desarrollo de los modelos y el análisis posterior de los candidatos.<sup>8</sup>

**Shape-matching:** Utilizan como plantilla el modelo de un ligando con actividad conocida y determinan la potencialidad de los compuestos candidatos en ser un compuesto activo, a través de un análisis de semejanza sobre superposición estructural de ligandos. El análisis de semejanza se puede realizar por grillas de potenciales o empleando descriptores moleculares 3D.<sup>9, 10</sup>

### 1.3 Quinoxalinas

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se buscó orientar la síntesis de compuestos quinoxalínicos con potencial actividad quimioterápica, empleando técnicas de diseño asistido por computadora. Particularmente, por cuestiones de analogía estructural con compuestos de actividad conocida, se estudiaron por un lado, quinoxalinas que puedan resultar activas en el tratamiento del SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), y por otro posibles compuestos quinoxalínicos que pudieran presentar actividad antichagásica. Sin embargo, no es de menor importancia, estudiar el espacio químico de las mismas en relación a otros usos, a fin de dar cuenta de su versatilidad y de la importancia de su síntesis.

La quinoxalina es un sistema aromático heterocíclico nitrogenado resultante de la fusión de un anillo de benceno con un anillo de pirazina, el cual recibe el nombre IUPAC de benzopirazina (figura 1.4), aunque el uso del nombre trivial “quinoxalina” también está aceptado para su nomenclatura oficial.



**Figura 1.4** Estructura de la quinoxalina

Junto a sus derivados parcialmente saturados conforman una familia de compuestos con una base estructural emparentada que, convenientemente sustituidos, ofrecen una amplia variedad de heterociclos con interesantes aplicaciones en tecnología de materiales y desarrollo de compuestos con actividad biológica.

En tecnología de materiales se pueden citar polímeros electrocrómicos (figura 1.5 A),<sup>11</sup> polímeros para celdas solares utilizados para la obtención de energía (figura 1.5 B)<sup>12</sup> y diodos orgánicos de emisión de luz (OLED, figura 1.5 C)<sup>13</sup> utilizados para la fabricación de pantallas de dispositivos como celulares, computadoras portátiles y televisores. Los materiales fabricados con estos compuestos orgánicos resultan ser “más amigables” para el medio ambiente, además de permitir la construcción de dispositivos con características mecánicas novedosas.

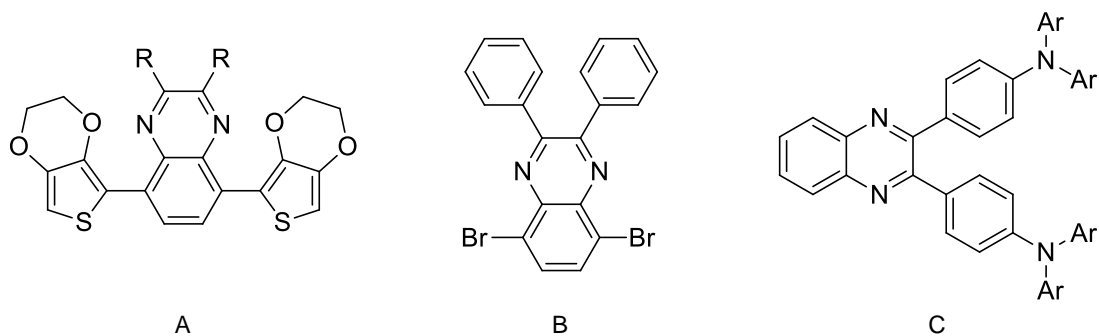


Figura 1.5 Quinoxalinas aplicadas en tecnología de materiales.

En la bibliografía se encuentran descritas, además de las quinoxalinas aromáticas, una gran variedad de núcleos quinoxalínicos con su sistema aromático parcialmente saturado tales como: las 1,2-dihidroquinoxalin-2-onas, las 1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-2-onas y las 1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-2,3-dionas (figura 1.6).

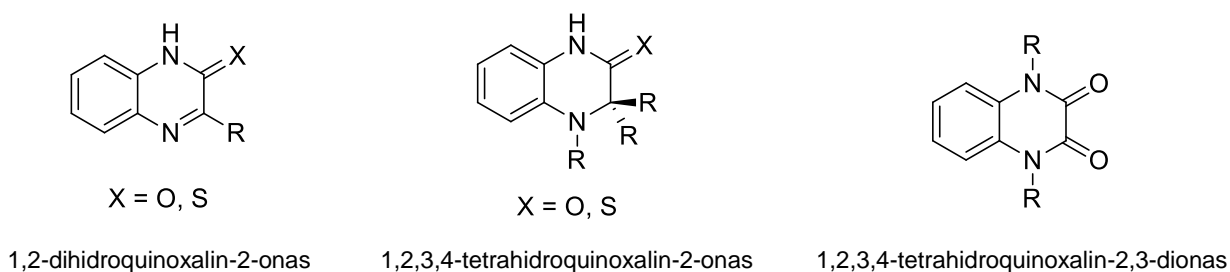


Figura 1.6 Quinoxalinas parcialmente saturadas.

Entre las múltiples actividades biológicas publicadas para compuestos quinoxalínicos se encuentran descritos sus efectos anticancerígenos, anticonvulsivantes, antiinflamatorios, antichagásicos, antimicrobianos y antirretrovirales. La variedad de actividades descritas para moléculas que contienen este núcleo heterocíclico en su estructura, hacen del mismo un atractivo motivo estructural para continuar con la búsqueda de nuevos fármacos conteniendo dicha estructura. A modo de resumen, se muestran a continuación los ejemplos más relevantes respecto de la presencia de las quinoxalinas como motivos estructurales presentes en compuestos biológicamente activos.

### 1.3.1 Actividad biológica asociada a la farmacología de receptores y canales.

**Antagonistas a receptores de adenosina A1 y A3:** Los receptores de adenosina A1, A2 y A3 tienen la capacidad de modular varios sistemas efectoros celulares como adenilato ciclasa, canales de potasio y calcio, fosfolipasa C o D y guanilato ciclasa. Diversos agonistas y antagonistas de los mismos, conteniendo un anillo de quinoxalina en su estructura, han sido propuestos para el tratamiento de un amplio rango de patologías. En particular se ha descrito

que antagonistas del receptor A1 (QNX1 en figura 1.7) podrían resultar eficaces para el tratamiento del Alzheimer, déficit cognitivos y bradiarritmias cardíacas, mientras que los antagonistas para los receptores A3 (QNX2 en figura 1.7) podrían resultar interesantes para el tratamiento del glaucoma, apoplejía, antiasmáticos y antiinflamatorios.<sup>14</sup>

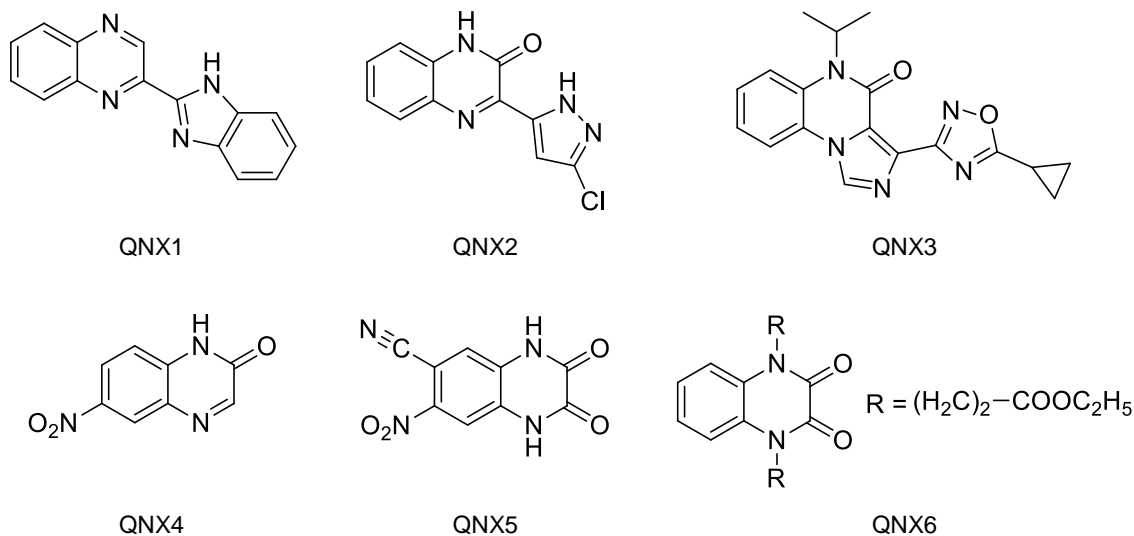


Figura 1.7 Quinoxalinas activas sobre receptores.

**Ansiolíticos de acción antagonista a benzodiazepinas:** La QNX3 resultó ser un agonista parcial de alta afinidad por los receptores  $GABA_A$  con bajos efectos sedativos y con buena capacidad para antagonizar los efectos del diazepam, respecto a la reducción de la capacidad motora, amnesia y baja respuesta al estímulo. La análoga QNX4 también presenta un perfil similar de acción.<sup>15</sup>

**Antagonistas AMPA:** Derivados de quinoxalin-2,3-dionas han demostrado ser potentes antagonistas a los receptores de AMPA, siendo eficaces como antiepilépticos y neuroprotectores en modelos de accidentes cerebrovasculares. La QNX5 es utilizada como estándar de referencia en la evaluación de nuevos compuestos antagonistas de AMPA y motivo estructural de partida para la farmacomodulación de análogos. Relacionados con esta actividad se han descrito compuestos, tales como la QNX6 mostrada en la figura 1.7.<sup>16</sup>

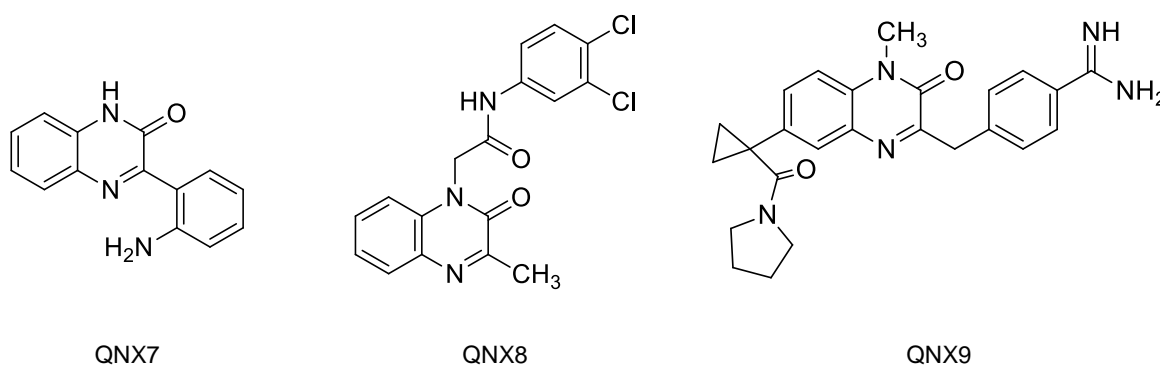
### 1.3.2 Inhibidores de transportadores de membrana y de la cascada de coagulación

**Inhibidores de glicoproteína-P y MRP1:** Uno de los mayores problemas en la quimioterapia contra el cáncer se da por la resistencia que desarrollan las células cancerosas contra los fármacos anticancerígenos. Esta resistencia suele ocurrir por la sobreexpresión de proteínas transportadoras de membrana que tienen la capacidad de transportar fármacos fuera de la célula. Sobre este fenómeno se estudian compuestos que resulten inhibidores de dichos transportadores,



con el fin de encontrar coadyuvantes de la terapia contra el cáncer. Se han propuesto derivados de quinoxalin-2-onas, tales como las QNX7 y QNX8 (figura 1.8) como potentes inhibidores de los transportadores MRP1 y glicoproteína-P.<sup>17</sup>

**Antitrombóticos:** En relación a los agentes con actividad anticoagulante se han encontrado compuestos conteniendo estructura de quinoxalin-2-ona, tales como la QNX9 (figura 1.8) que resultaron inhibidores del factor Xa de la cascada de coagulación, que han demostrado un bloqueo de la producción de trombina a partir de protrombina y en última instancia disminución de la síntesis de fibrina.<sup>18</sup>



**Figura 1.8** inhibidoras de MRP1 (QNX7 y 8) y antitrombóticas (QNX9).

### 1.3.3 Antimicrobianos

En la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos las técnicas de estudio derivan en el cribado de compuestos activos sobre el crecimiento de una población microbiana. De estos estudios se han podido identificar las siguientes estructuras quinoxalínicas (figura 1.9): la QNX10 activa frente a *aureus*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcesens*, *Proteus merabitis*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium chrysogenum*, la QNX11 activa frente a *Mycobacterium tuberculosis*, la QNX12 activa frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, y *Escherichia coli*, la QNX13 y análogos con actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Derivados de la QNX14 demostraron actividad sobre *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium* y la QNX15, resultó activa frente a *Chrysosporium keratinophilum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*.<sup>19-23</sup>

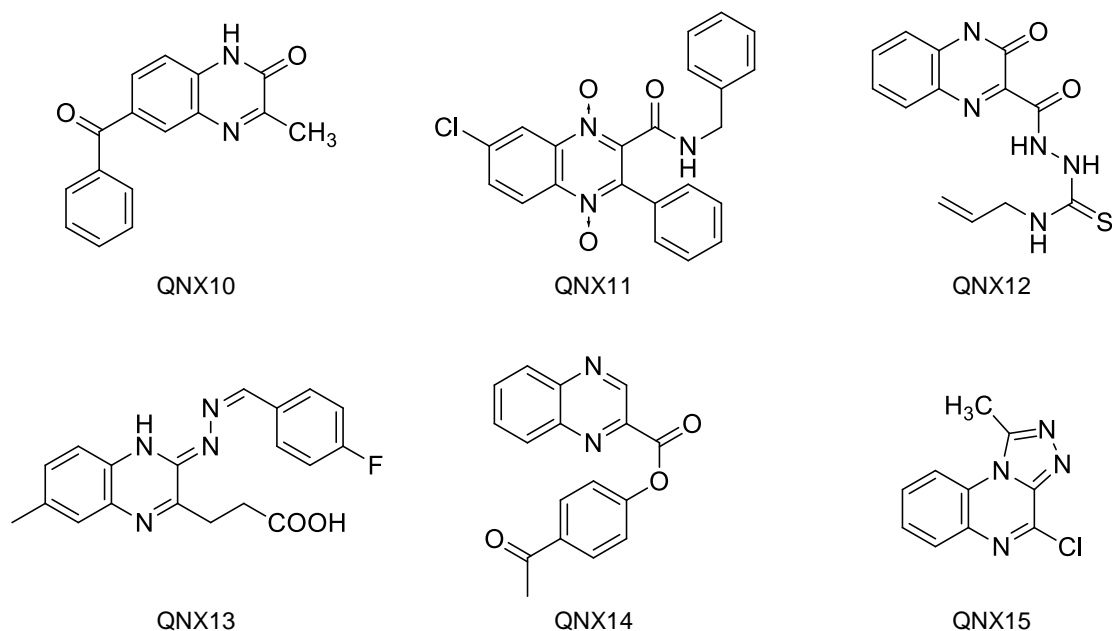


Figura 1.9 Quinoxalinas con actividad antimicrobiana.

### 1.3.4 Anticancerígenos

**Inhibidores de serin-treonin kinasa STK33:** Las serin-treonin kinasas son una serie de proteínas de membrana con capacidad de GTP-asa codificadas por el oncogén RAS y están íntimamente relacionadas con la traducción de señales de factores de crecimiento. Mutaciones sobre este oncogén otorgan a las células la capacidad de “inmortalizarse” y su incidencia es hallada en el 30% de los cánceres humanos. Específicamente, se lo ha encontrado en un 90% de los cánceres pancreáticos, en un 50% en cánceres de colon y en un 25% de los adenocarcinomas de pulmón. También se encontró que STK33 tiene una función crítica en la supervivencia de líneas células hematopoyéticas cancerosas tales como leucemia mieloide, mieloma múltiple y leucemia linfoblástica aguda. Recientemente, se han hallado compuestos inhibidores de STK33, derivados de quinoxalin-2-onas, tales como la QNX16 (figura 1.10), altamente selectivos y con actividades del orden nanomolar ( $0.014 \mu\text{M}$ ).<sup>24</sup>

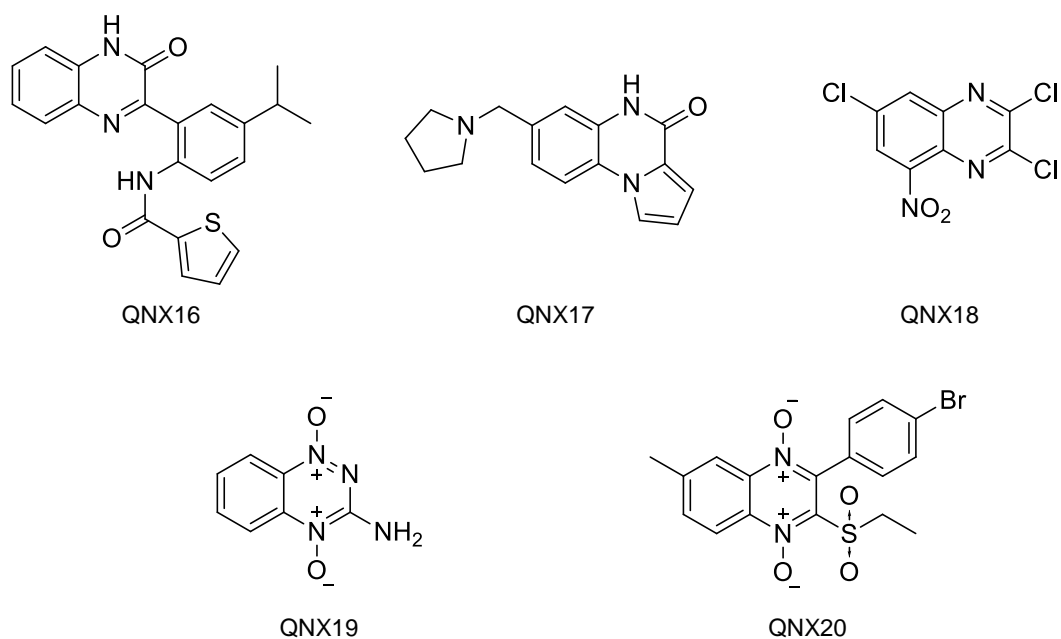


Figura 1.10 Quinoxalinas con actividad antineoplásica.

**Inhibidores de poli(ADP-ribosa)polimerasa-1 (PARP-1):** La PARP-1 corresponde a una familia de enzimas nucleares, la más abundante, relacionada con los procesos de reparación del ADN y regulación de la apoptosis. Las células tumorales tienen comprometidos sus mecanismos de reparación del ADN, siendo más dependientes de la actividad de PARP-1 para su supervivencia frente a agentes quimioterápicos que actúan dañando el ADN. Entre estos inhibidores pueden mencionarse las pirrolo[1,2-c]quinoxalin-2-onas tal como la QNX17 (figura 1.10) con capacidad de actuar como coadyuvante en terapias que involucren mecanismos de daño al ADN.<sup>25</sup>

**Quinoxalinas inhibidoras de la telomerasa:** La telomerasa es la enzima que tiene como función el mantenimiento de los telómeros, los cuales tienen un papel importante en el reloj vital de la célula. El acortamiento de los mismos significa envejecimiento celular. La actividad de la telomerasa se halla aumentada en la mayoría de las células cancerosas, haciendo que la misma sea un blanco para el desarrollo de fármacos contra su actividad. En relación a esto se encontró que la 2,3,7-tricloro-5-nitro-quinoxalina (QNX18, figura 1.10) posee una alta actividad anti-telomerasa.<sup>26</sup>

**Derivados de quinoxalinas modificadores del potencial redox:** Son N-óxidos de quinoxalinas con alta selectividad sobre tumores que mantienen ambientes hipóxicos en su interior. Se ha establecido que para análogos como la tirapazamina (QNX19, figura 1.10) cuanto más negativo es el potencial de reducción mayor es la selectividad por el tejido hipóxico. Su mecanismo de acción podría estar relacionado con la modificación del potencial de membrana mitocondrial llevando a la

célula a un proceso apoptótico. Dentro de este tipo de compuestos también se puede mencionar la QNX20 (figura 1.10).<sup>27</sup>

### 1.3.5 Antichagásicos

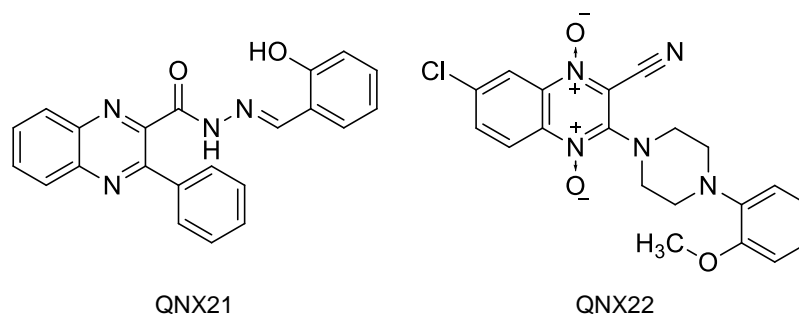


Figura 1.11 Quinoxalinas con actividad antichagásica.

A partir de estudios de cribado se han identificado quinoxalinas con actividad tripanosomicida: la QNX21 (figura 1.11)<sup>28</sup> con actividad comparable al nifurtimox (droga de actual uso en el tratamiento contra el Chagas) para la que se propone su acción por inhibición de la enzima cruzipaína, involucrada en la patogénesis de *T. cruzi* y la QNX22<sup>29</sup> con capacidad de inhibir a la tripanotiona reductasa, enzima crucial para el metabolismo redox del microorganismo.

### 1.3.6 Antirretrovirales

Se han publicado análogos de 1,2,3,4-tetrahidro-quinoxalin-2-onas (QNX23 y QNX24, figura 1.12) con potente acción inhibidora de la TR, enzima crucial para la reproducción del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV), agente etiológico del SIDA. Los mismos corresponden al grupo de los denominados inhibidores no nucleosídicos de la TR (INNTR).<sup>30, 31</sup>

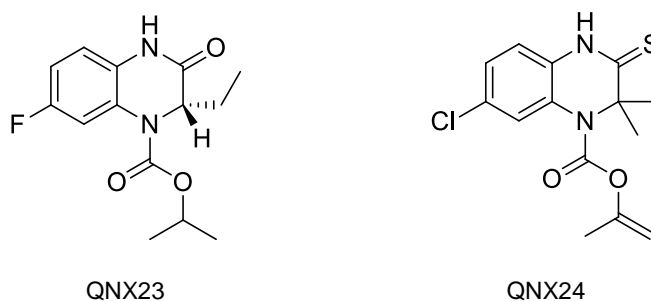


Figura 1.12 Quinoxalinas inhibidoras de la TR.

## 1.4 Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

---

Como se comentó previamente, una de las áreas de interés es el estudio de quinoxalinas como potenciales agentes antirretrovirales en el tratamiento del SIDA, dado que las mismas poseen una alta analogía estructural con compuestos con actividad antiviral conocida.

El SIDA es una enfermedad del sistema inmunitario producida por el HIV, el cual causa una severa inmunodepresión provocando que el organismo no sea capaz de ofrecer una respuesta inmune eficiente y llevando en la mayoría de los casos a la muerte. Constituye sin duda la primera pandemia de la segunda mitad del siglo XX. Detectado en 1981, sus orígenes hay que buscarlos en África Central donde, en la década de 1950, probablemente se produjo la primera infección en un ser humano. Luego desde esa zona se propagó al Caribe y posteriormente a Estados Unidos y Europa. Hoy en día, de acuerdo con el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el HIV/SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen alrededor de 34 millones de personas infectadas por HIV, entre las que se distinguen 2,2 millones de niños menores de 15 años infectados (datos de 2011). En 2011 se registraron 2,5 millones de nuevos casos y 2,1 millones de muertes causadas por el SIDA.<sup>32, 33</sup>

La inmunodepresión observada en los pacientes que desarrollan el SIDA por infección con HIV, se debe principalmente a la reducción en el número de linfocitos T *helper* (T4), los cuales son reconocidos por el virus por expresar la proteína de superficie CD4 entre otras. Este tipo de células tienen un rol fundamental en el funcionamiento del sistema inmunológico ya que intervienen en la mayoría de las respuestas en donde la generación de anticuerpos es clave. Las células T4 a su vez asisten en la maduración de células T efectoras, como son los linfocitos T citotóxicos CD8+, y pueden tener actividad citotóxica por sí mismas.

En el inicio de la infección por HIV, los linfocitos T4 virus-específicos son estimulados a proliferar por los antígenos virales, sin embargo, el virus infecta y se replica en células activadas de este tipo llevándolas a la destrucción. Al mismo tiempo, tiene lugar la expansión de linfocitos T CD8+ virus-específicos que coincide con la disminución de la viremia. Dado que la proliferación de estos últimos es dependiente de los linfocitos T4, entra en juego un fino balance entre la población de linfocitos CD4+ y CD8+ activados, en el control de la infección. La población de células T4 cae inicialmente con la infección, pero luego se recupera durante la fase no sintomática de la enfermedad. En este punto el virus infecta otros tipos celulares y comienza a multiplicarse en los órganos linfoides. A largo plazo, la población de células T4 funcionales cae a niveles en los que el sistema inmune no puede responder eficientemente. Entre las alteraciones del sistema inmune causadas por el HIV se encuentran: deficiencia de T4, niveles bajos de linfocitos, respuesta a

antígenos e inmunógenos disminuida, función reducida de otras células inmunes (macrófagos, células dendríticas, células NK) y pérdida de la estructura de los nódulos linfáticos.<sup>34-36</sup>

Estas alteraciones llevan a la pérdida de funcionalidad del sistema inmunológico, haciendo que el individuo sea susceptible a infecciones oportunistas y a desarrollar ciertos tipos de neoplasias que eventualmente llevan a la muerte del paciente.

#### 1.4.1 El virus de inmunodeficiencia humana: composición y genoma.

El virus del SIDA es un retrovirus, perteneciente a una gran familia de lentivirus de ácido ribonucleico (ARN), caracterizados por su asociación con enfermedades inmunosupresivas o del sistema nervioso central y por sus largos tiempos de incubación desde la infección hasta que se manifiesta la enfermedad.

Se conocen dos tipos de HIV, el HIV-1 y el HIV-2, de los cuales el primero es el predominante y es el que recibe el nombre genérico de HIV. El HIV-2 es el causante de infecciones principalmente en el África Occidental y se diferencia del HIV-1 por la secuencia genómica (sólo tienen un 40% de homología de secuencia), en las propiedades antigénicas en el tamaño de sus proteínas, siendo menos virulento que el HIV-1. Además, dentro del tipo HIV-1 existen tres grupos: denominados M, N y O, a su vez, el M contiene 10 subtipos que van desde la A hasta la J. El HIV es una partícula esférica (figura 1.13) con un diámetro entre 80 y 110 nanómetros que presenta tres capas concéntricas:<sup>37, 38</sup>

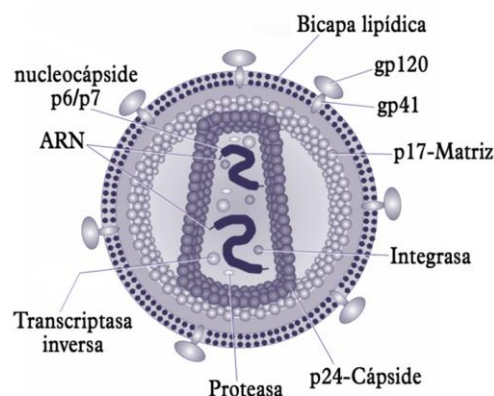


Figura 1.13 Estructura del HIV

- **Capa interna:** Está formada por la cápside (nucleoproteína p24) que contiene el genoma del virión junto con la nucleocápside formada por las proteínas p7 y p9, las enzimas transcriptasa reversa p66-p51, integrasa p32 y la aspartil-proteasa p10.
- **Capa intermedia:** Es la matriz que recubre la cápside, formada por la proteína p17.

- **Capa externa o envoltura:** Es una bicapa lipídica que procede de la membrana externa de la célula huésped acompañada de la inserción de glicoproteínas del virus (espículas), cada una de las cuales posee dos componentes: gp41, que atraviesa la membrana desde el interior del virus, y gp120, extramembrana, apilada formando un complejo con gp41. Además, estas espículas, están acompañadas por otras proteínas de reconocimiento originarias de las células infectadas entre las que destacan antígenos de histocompatibilidad de clases I y II (HLA I y II).

El genoma del HIV es diploide, consta de dos cadenas de ARN de sentido positivo con los extremos 5' y 3' poliadenilados (secuencias no codificantes que regulan la transcripción o LTR). Presenta tres genes (env, gag y pol) que codifican para los principales elementos estructurales y funcionales, los genes tat y rev que codifican para proteínas reguladoras del ciclo infeccioso y los genes accesorios vpu (facilitación del proceso infeccioso), vif (protección del genoma viral) y nef (evita re-infección viral) (figura 1.14).<sup>39</sup>

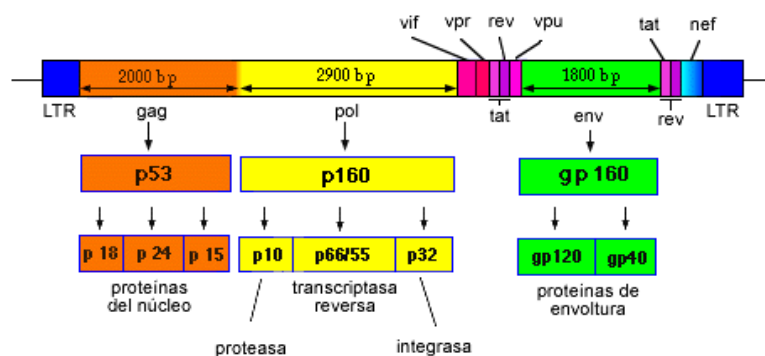


Figura 1.14 Organización del genoma del HIV 1

### 1.4.2 Ciclo vital del HIV

El mismo consta de las siguientes etapas (figura 1.15):<sup>40-42</sup>

- **Acoplamiento y fusión de membranas:** la entrada del HIV-1 en la célula se produce por la interacción del virus con al menos dos tipos de receptores. Inicialmente la proteína gp120 con CD4 y luego con receptores de quimioquinas CXCR4 y CCR5. Esto lleva a la fusión entre las membranas de la célula y del virus. El principal responsable es la gp41, la cual se inserta en la membrana celular permitiendo la internalización de la nucleocápside del virus y la desencapsidación de su genoma.

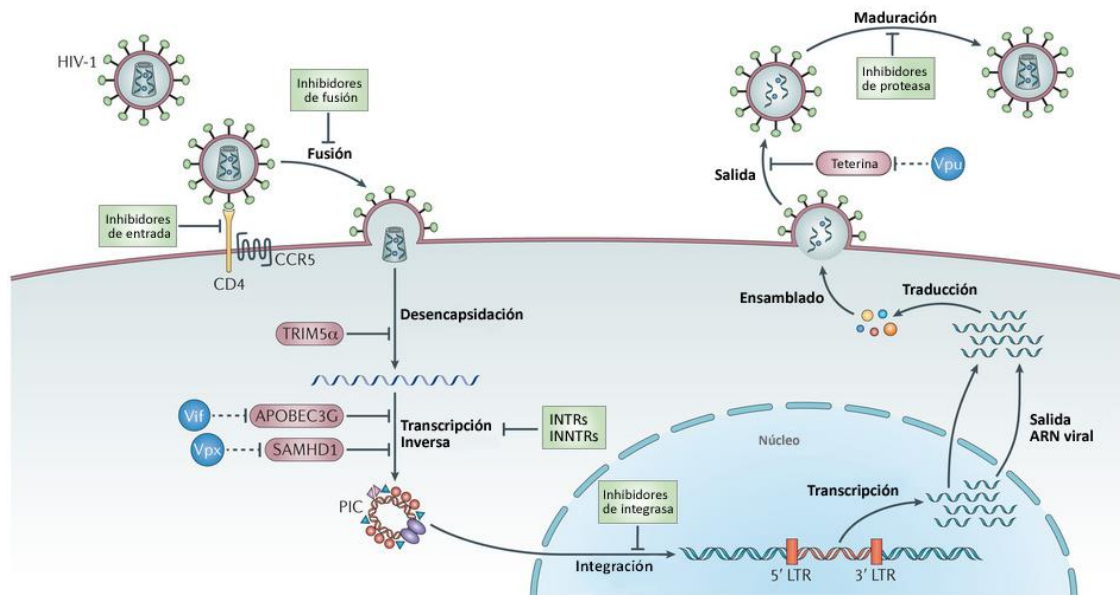


Figura 1.15 Ciclo de replicación del HIV y sus blancos terapéuticos conocidos.<sup>40</sup>

- **Transcripción inversa:** una vez incorporado el material viral en el citoplasma de la célula, comienza la retrotranscripción del ARN viral en ADN bicatenario. La enzima que cataliza esta síntesis es la TR, un heterodímero formado por las subunidades p51 y p66. Su actividad se puede resumir en la síntesis de ADN monocatenario a partir del ARN viral (templado) que comienza por la fijación del ARNt (ARN de transferencia), cebador en un sitio específico de reconocimiento del genoma viral. A partir de éste se da la elongación de la cadena de ADN. Luego el ARN viral es degradado por el dominio ARNasa H de la TR. El proceso culmina cuando la TR sintetiza la hebra complementaria a partir del ADN monocatenario.
  
- **Integración:** la doble cadena así generada, es integrada por medio de la integrasa viral (p32) en el ADN de la célula, aunque parte del ADN formado puede persistir en el citoplasma de la célula sin integrarse dentro del genoma celular. Una vez integrado en el material genético de la célula, el provirus puede permanecer latente o empezar a multiplicarse de una forma controlada o de una forma masiva, en cuyo caso ocasionará efectos citopáticos sobre la célula, mientras que en la fase de latencia no se producen alteraciones patológicas.
  
- **Transcripción:** la transcripción del ARNm (ARN mensajero) proviral se debe a la activación celular por diferentes factores: antígenos, mitógenos, citoquinas o virus heterólogos. Estos factores, entre los que destaca el NF- $\kappa$ B, conducen a una nueva transcripción en la que se lleva a cabo la síntesis de ARNm viral a partir del ADN proviral integrado en el genoma hospedador. Este ARNm se sintetiza como un único transcrito de intrones y exones, siendo los intrones removidos en el proceso de maduración para dar un ARNm maduro que puede salir al citoplasma de la célula.



- **Traducción:** a continuación se traduce el ARNm viral a las proteínas precursoras del virus. El producto de este proceso son los juegos de poliproteínas gag, gag-pol y env, que requieren el clivaje por la proteasa p10 para madurar a las proteínas funcionales del virus. En este punto una de las características que le otorga la presencia de vpu al HIV es capacidad de proteger a la gp120 en esta etapa de síntesis. La gp120 es sintetizada junto con CD4 en el retículo endoplasmático de la célula hospedadora y la misma tiene alta afinidad por CD4 pudiéndose formar un complejo proteico gp120-CD4 el cual es susceptible a degradación. La presencia de vpu promueve la proteólisis de CD4 para evitar la formación del complejo.

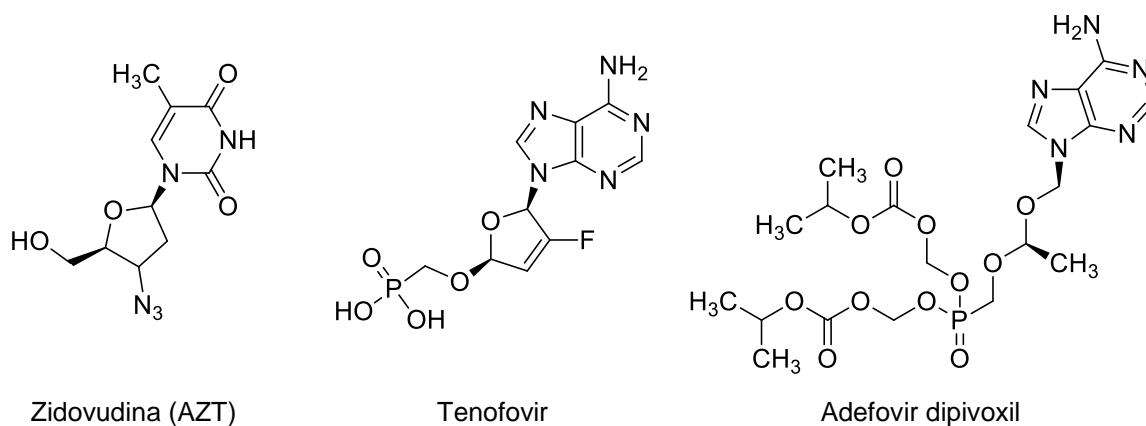
- **Ensamblaje:** el ensamblaje del virión ocurre en la membrana celular y parece comenzar con la asociación de la proteína p17 de la matriz con el dominio citoplasmático de la proteína gp41. Sobre estas proteínas se agregan las de la capa interna más las cadenas de ARN recubiertas por la nucleocápside.

- **Salida de viriones:** Una vez ensamblado el virión este se halla aún inmaduro (sin capacidad infectiva). El mismo es liberado por gemación y una vez liberado, por acción de la proteasa p10, la partícula viral madura tras el clivaje de gp160 que da el ensamble gp41-gp120 de las espículas.

### 1.4.3 Fármacos anti-HIV

Como se muestra en la figura 1.15, el ciclo vital del HIV presenta distintos blancos terapéuticos sobre los cuales se puede trabajar en el desarrollo de compuestos anti-HIV. A continuación se detallan estos blancos junto con algunos compuestos inhibidores representativos de cada uno de ellos.<sup>43, 44</sup>

**Inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa reversa (INTR):** esta categoría corresponde a una familia de compuestos que son análogos estructurales de nucleósidos. Actúan sobre el sitio activo de la TR y pueden resultar inhibidores de la misma o cortadores de cadena de ADN proviral. Los representantes más importantes que se hallan en uso clínico, son: zidovudina (AZT, figura 1.16), lamivudina (3TC), abacavir (ABC), tenofovir, adefovir y estavudina (d4T).



**Figura 1.16** Inhibidores nucleosídicos y nucleotídicos de la TR.

**Inhibidores nucleotídicos de la transcriptasa reversa (INtTR):** son análogos estructurales de nucleótidos y su mecanismo de acción es semejante al de los INTR. El hecho de que sean pseudonucleótidos hace que se reduzca el tiempo de latencia en la acción de los mismos, ya que los INTR deben ser convertidos a nucleótidos para resultar activos. Dentro de esta familia podemos citar a compuestos tales como: tenofovir (figura 1.16) y adefovir dipivoxil (figura 1.16), un profármaco de mayor lipofilidad que facilita su pasaje a través de membranas, actualmente en uso clínico.

**Inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa reversa (INNTR):** esta clase de quimioterápicos fueron descritos por primera vez en 1989 por Baba,<sup>45</sup> quien describió el HEPT y por Debyser<sup>46</sup> quien introdujo el grupo de los TIBO (figura 1.17). Los mismos actúan como moduladores alostéricos de la TR. A diferencia de los grupos anteriores, explotan una característica particular de esta enzima, con lo cual se los supone más selectivos, ya que no interferirían en los mecanismos de síntesis de ácidos nucleicos de las células eucariontes, propias del organismo hospedador. Entre los fármacos de esta familia que se encuentran en uso clínico podemos citar a la nevirapina, delavirdina y efavirenz como los más representativos (figura 1.17).

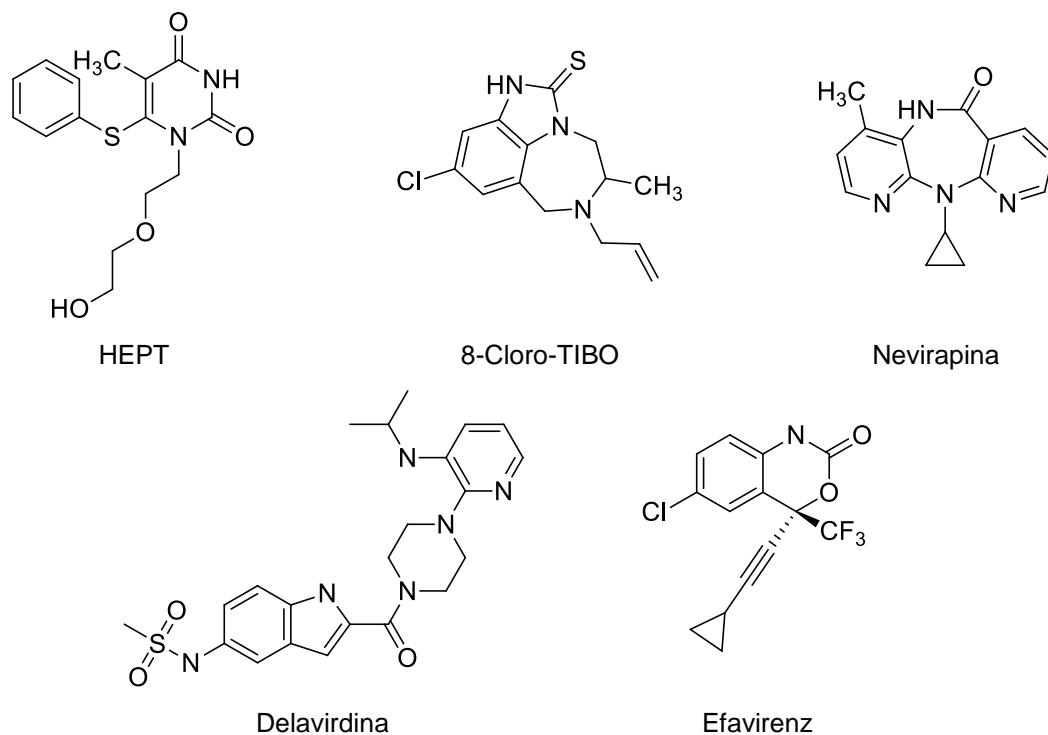


Figura 1.17 Inhibidores no nucleosídicos de la TR.

**Inhibidores de la integrasa:** son inhibidores de la actividad de la integrasa viral, con lo cual evitan la integración del ADN proviral al genoma del hospedador. Son los de introducción más reciente en la terapia antirretroviral, representados al presente por el elvitegravir (figura 1.18).

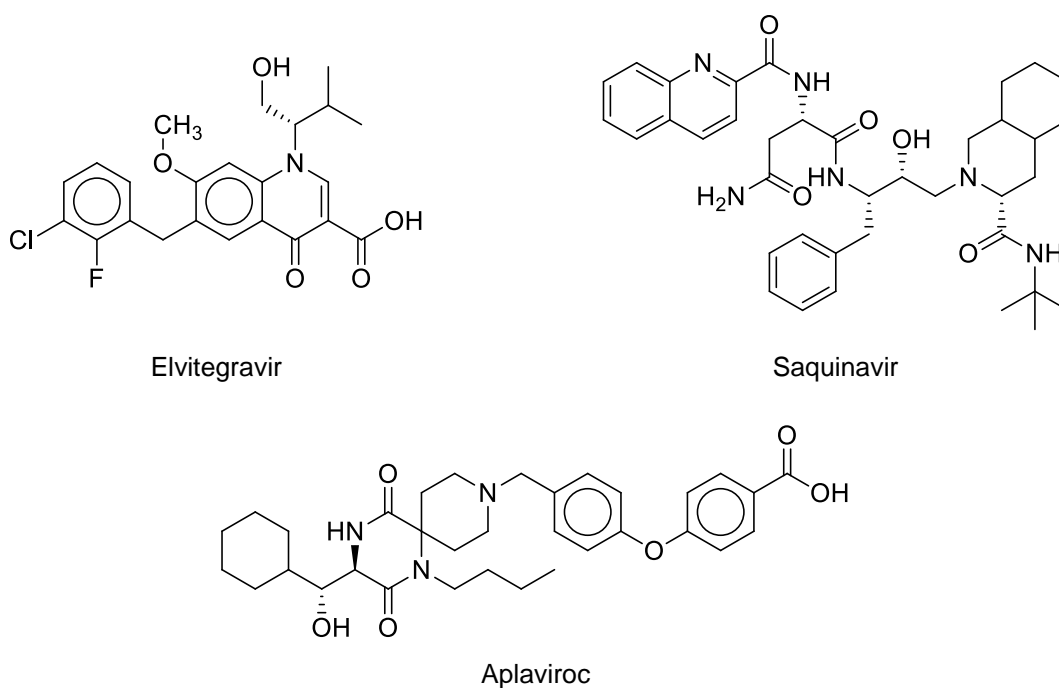


Figura 1.18 Inhibidores de la integrasa y de la proteasa del HIV.

**Inhibidores de la proteasa (IP):** el HIV tiene su propia proteasa, cuya acción le permite madurar, a partir de la producción por acción de la misma de los polipéptidos principales (gag, gag-pol y env), los elementos estructurales de la cápside y las proteínas funcionales del virus (proteasa, transcriptasa reversa e integrasa). Esta enzima es una aspartil-proteasa por estar implicada en el mecanismo de hidrólisis de un péptido a través de la presencia de grupos aspartatos, para la que se han diseñado inhibidores con estructura peptidomimética. Dentro de los compuestos pertenecientes a esta familia y en uso clínico, se pueden mencionar al saquinavir (figura 1.18), indinavir, lopinavir y atazanavir.

**Bloqueadores de la interacción de gp120 con CXCR4 / CCR5:** luego del acople gp120-CD4, gp120 necesita interaccionar con los co-receptores de quimiocinas CXCR4 o CCR5 para activar el proceso de fusión. Compuestos bloqueadores de este proceso tienen la capacidad de desestabilizar la interacción de la gp120 con estos co-receptores. Dentro de estos fármacos de reciente introducción en la terapia contra el HIV, se pueden destacar al aplaviroc (figura 1.18) y al maraviroc, que actúan como bloqueantes de la interacción gp120-CCR5.

**Inhibidores de la fusión (IF):** impiden la inserción de gp41 en la membrana celular bloqueando el proceso de fusión de la envoltura viral con la membrana celular. El fármaco en uso clínico perteneciente a esta familia es el enfuvirtide, un compuesto de naturaleza peptídica (4.5 kDa), único por el momento en uso para la terapia contra el HIV.

#### 1.4.4 La terapia antirretroviral

El desarrollo de vacunas para prevenir enfermedades producidas por distintos agentes patógenos sería, sin duda, uno de los primeros caminos a tomar para evitar el desarrollo de las mismas. Las vacunas contienen antígenos del patógeno que activan la respuesta del sistema inmune ante su presencia y generan memoria del mismo. Esta memoria impresa en el sistema inmune es lo que le permite actuar más rápido ante una exposición repetida frente al mismo antígeno con la consecuente destrucción del patógeno por acción del sistema inmune. Sin embargo, el desarrollo de vacunas efectivas contra el HIV se ve complicado por la alta capacidad de mutación del virus y el tipo celular que ataca, el linfocito T4.<sup>47</sup> En este contexto la quimioterapia antirretroviral sigue siendo por el momento la única herramienta farmacológica para el tratamiento del HIV.

Actualmente, las terapias contra el HIV están basadas en esquemas de administración múltiple que combinan fármacos con distintos mecanismos de acción, a las cuales se las denomina terapias antirretrovirales de gran actividad (TARGA) y que generalmente se componen de uno o más INTR o uno o más INtTR, junto con un INNTR o bien un IP, a veces complementados por un IF. Las TARGA han demostrado ser más efectivas para el control de la enfermedad que las

monoterapias, las cuales llevan más rápido a la selección de virus resistentes y pérdida de eficacia terapéutica.<sup>44, 48</sup>

Sin embargo, a pesar del gran número de fármacos disponible, existen diversas preocupaciones acerca del empleo de los esquemas dispuestos en las TARGA. La alta capacidad de mutación que tiene el HIV hace que se generen fácilmente mutantes tolerantes, por lo cual el compromiso del paciente en el cumplimiento del régimen de administración de estos fármacos es crucial para el éxito de la terapia, de lo contrario, la selección de mutantes resistentes conduce a la reducción de las posibilidades terapéuticas. Debe tenerse en cuenta que el apego del paciente al régimen terapéutico se puede ver amenazado por la cantidad de tomas diarias de fármacos y sus efectos secundarios.<sup>43, 49</sup> Por esto, el desarrollo de nuevos agentes para el tratamiento del SIDA, más activos, menos tóxicos y tolerantes a las mutaciones sigue siendo de interés para enfrentar terapéuticamente la infección por el HIV.

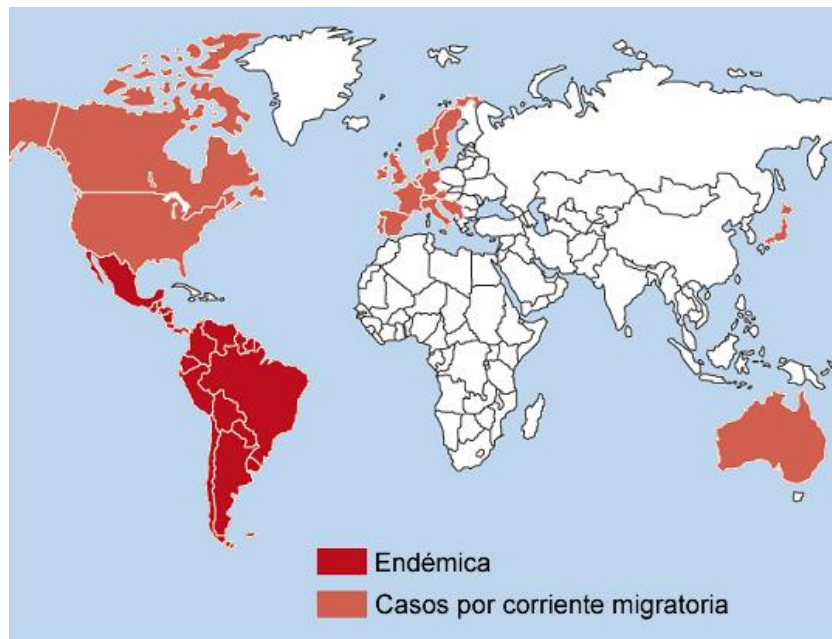
## 1.5 Enfermedad de Chagas

---

Una de las características notables de las técnicas de CADD es la adaptabilidad de sus protocolos a una variedad de casos. Por consiguiente, y conociendo quinoxalinas activas como compuestos antichagásicos, se estudiaron las mismas como posibles prototipos para el desarrollo de compuestos activos en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

El mal de Chagas es una enfermedad causada por el *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), un microorganismo eucarionte tripanosomatídeo. Esta clase de microorganismos son parásitos pertenecientes al orden *Kinetoplastida*, género *Trypanosoma*, con la capacidad de infectar mamíferos, invertebrados y plantas. A su vez, existe otra tripanosomiasis en el humano, denominada “enfermedad del sueño” endémica en África y causada por el *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*).<sup>50</sup>

La enfermedad de Chagas constituye un serio problema para la salud pública en las regiones donde es endémica (21 países en América del Sur y Central, desde el Norte de México hasta Argentina, figura 1.19) debido a que no existen métodos inmunoprolácticos o quimioterapéuticos efectivos. Por otra parte, el número de pacientes infectados ha aumentado en países desarrollados donde la enfermedad no es endémica debido al creciente movimiento de inmigrantes latinoamericanos que desconocen ser portadores del parásito.



**Figura 1.19** Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.<sup>51</sup>

El parásito *T. cruzi* es transmitido por vectores hematófagos pertenecientes a la subfamilia *Triatominae*, familia *Reduviidae*, orden *Hemiptera*, los cuales depositan sus heces infectadas sobre la piel al picar. *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus* son los vectores más importantes. Actualmente, existen 8-9 millones de personas infectadas por *T. cruzi* y otros 40 millones con riesgo de adquirir la enfermedad. Investigaciones recientes indican que cada año ocurren 14.000 muertes asociadas con esta condición ubicándose a nivel mundial en tercer lugar entre las afecciones parasitarias.<sup>50</sup>

### 1.5.1 Ciclo de vida del parásito

Al igual que otros parásitos del orden *Kinetoplastida*, *T. cruzi* presenta un ciclo de vida complejo, con estadios especializados para la supervivencia tanto en el vector como en el mamífero (figura 1-20).

Después de ser ingeridos por el insecto, los tripomastigotas sanguíneos se transforman en epimastigotas, los cuales proliferan en la luz del tracto gastrointestinal. Los epimastigotas se adhieren a la superficie epitelial en la porción terminal del tubo digestivo (recto) y se diferencian a la forma infectiva tripomastigota metacíclica. Estos son eliminados en las heces cuando el insecto pica a un mamífero e ingresan a éste a través de la piel o mucosas. Estas formas no proliferativas evaden el sistema inmune y pueden invadir diversos tipos celulares, incluyendo células musculares y nerviosas del corazón y del tracto gastrointestinal, así como también células del sistema retículo endotelial e incluso neuronas.<sup>52, 53</sup> Los procesos de evasión e invasión dependen de ciertas proteasas presentes en el parásito entre las que se destaca la cruzipaina.<sup>54, 55</sup> Después de la invasión, los parásitos abandonan los fagolisosomas y se diferencian a la forma amastigota, la cual prolifera por fisión binaria y eventualmente se re-diferencia a la forma tripomastigota

sanguínea a través de estadios intermedios, algunos de las cuales presentan una morfología epimastigota.<sup>53, 56</sup> Una vez formados, los tripomastigotas sanguíneos destruyen la célula hospedera pasando a la sangre pudiendo invadir otras células o ser ingeridos por un vector apropiado, completándose así el ciclo.<sup>52</sup>

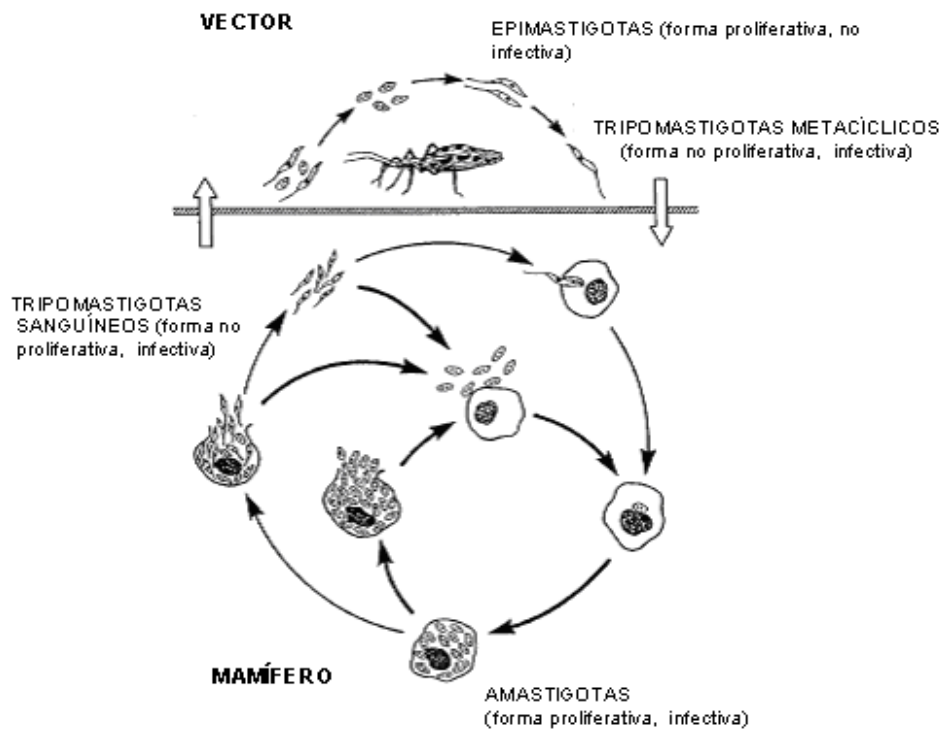


Figura 1.20 Ciclo de vida de *T. cruzi*

En humanos, *T. cruzi* induce una fase aguda inicial seguida de una fase crónica de larga duración. La infección aguda es en general asintomática, pero en algunos casos los individuos pueden presentar síntomas como fiebre o anorexia. Si en este momento se diagnóstica la infección, el tratamiento con los fármacos comerciales puede detener el avance de la enfermedad. En ausencia de tratamiento los síntomas persisten alrededor de dos meses, con una mortalidad de 2 a 8%, principalmente en niños.<sup>57</sup> Sin embargo, cuando el sistema inmune disminuye la parasitemia la enfermedad entra en una fase crónica. Los pacientes con infección crónica presentan lesiones cardíacas o dilatación patológica del tracto digestivo (megacolon, megaesófago) y desórdenes en la conducción nerviosa en esos órganos. Las personas con enfermedad crónica severa mueren, en última instancia, por insuficiencia cardíaca.<sup>57, 58</sup>

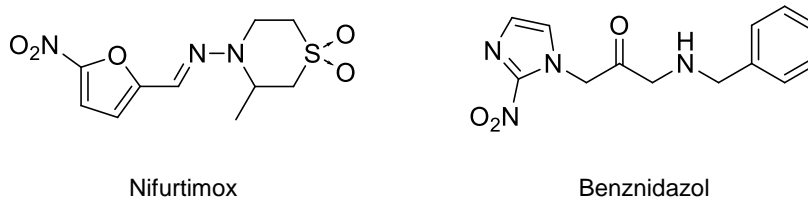
La aparición de nuevos procesos infecto-contagiosos como HIV o el aumento de enfermedades asociadas con los hábitos actuales de vida (cáncer, enfermedades cardiovasculares) han provocado que la enfermedad de Chagas se convierta, cuando está presente junto con estas patologías, en la principal causa del deterioro de la salud del individuo.<sup>59-61</sup>

La transmisión de la enfermedad ocurre, principalmente, a través del vector (80 a 90%). Sin embargo, se han descrito casos de individuos infectados por transfusión sanguínea (5 a 20%) o de forma congénita (0.5 a 8%).<sup>57</sup>

### 1.5.2 Agentes farmacológicos disponibles

La enfermedad de Chagas, una de las denominadas enfermedades desatendidas, es padecida principalmente por poblaciones de bajos recursos, que no resultan un mercado interesante para las grandes compañías farmacéuticas, por lo que el incentivo al desarrollo de nuevos fármacos o vacunas es bajo.<sup>62</sup>

Al no existir vacunas, la quimioterapia sigue siendo el único método para tratar individuos afectados o para disminuir la transmisión poblacional. Los dos fármacos que se utilizan para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son compuestos nitroheterocíclicos: un nitrofurano, nifurtimox (4-[(5-nitrofurfuriliden)amino]-3-metiltiomorfolin-1,1-dióxido), y benznidazol, un nitroimidazol (N-bencil-2-(2-nitroimidazol)acetamida, Rochagan<sup>®</sup>, Radanil<sup>®</sup>, Roche) (figura 1.21) cuya actividad antiparasitaria fue descubierta empíricamente hace más de tres décadas.<sup>63</sup>



**Figura 1.21** Fármacos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas

Si bien nifurtimox y benznidazol presentan una buena actividad durante la fase aguda de la enfermedad (se estima un índice promedio de cura parasitológica del 60%), ninguno de estos fármacos resulta eficaz durante la etapa crónica y ambos provocan serios efectos secundarios. Estos efectos adversos, que incluyen anorexia, vómitos, polineuropatía periférica, dermatitis alérgica, leucopenia, entre otros, pueden conducir en algunos casos a la interrupción del tratamiento. Además, ambos fármacos están contraindicados durante el embarazo.<sup>57</sup>

### 1.5.3 Blancos biológicos presentes en *T. cruzi* para el desarrollo de nuevos fármacos

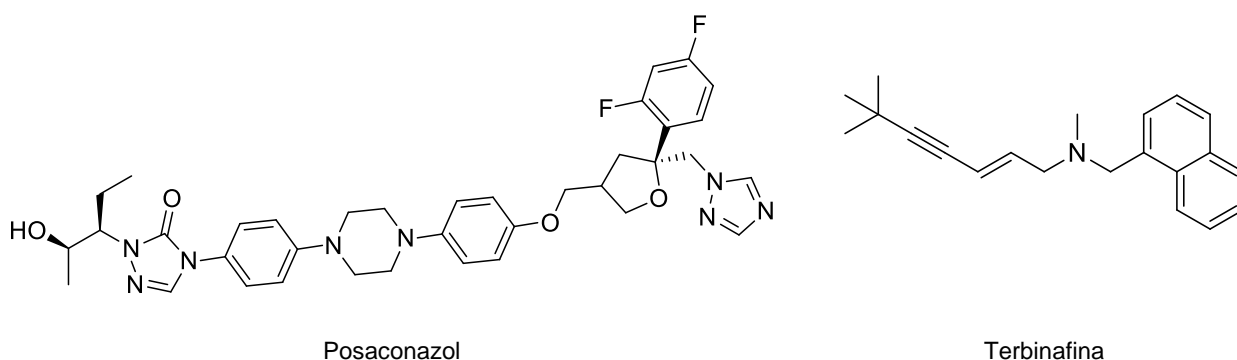
A continuación se presentan algunos procesos bioquímicos y enzimas del parásito que se están utilizando a nivel experimental como potenciales blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, junto con ejemplos de los inhibidores más relevantes hallados hasta el presente.



## Biosíntesis de esteroides de membrana

Se ha observado que *T. cruzi* es extremadamente susceptible a los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol ya que los de esteroides son de alto requerimiento en todos los estadios de su ciclo vital, tanto para la proliferación como para la viabilidad celular.<sup>64</sup>

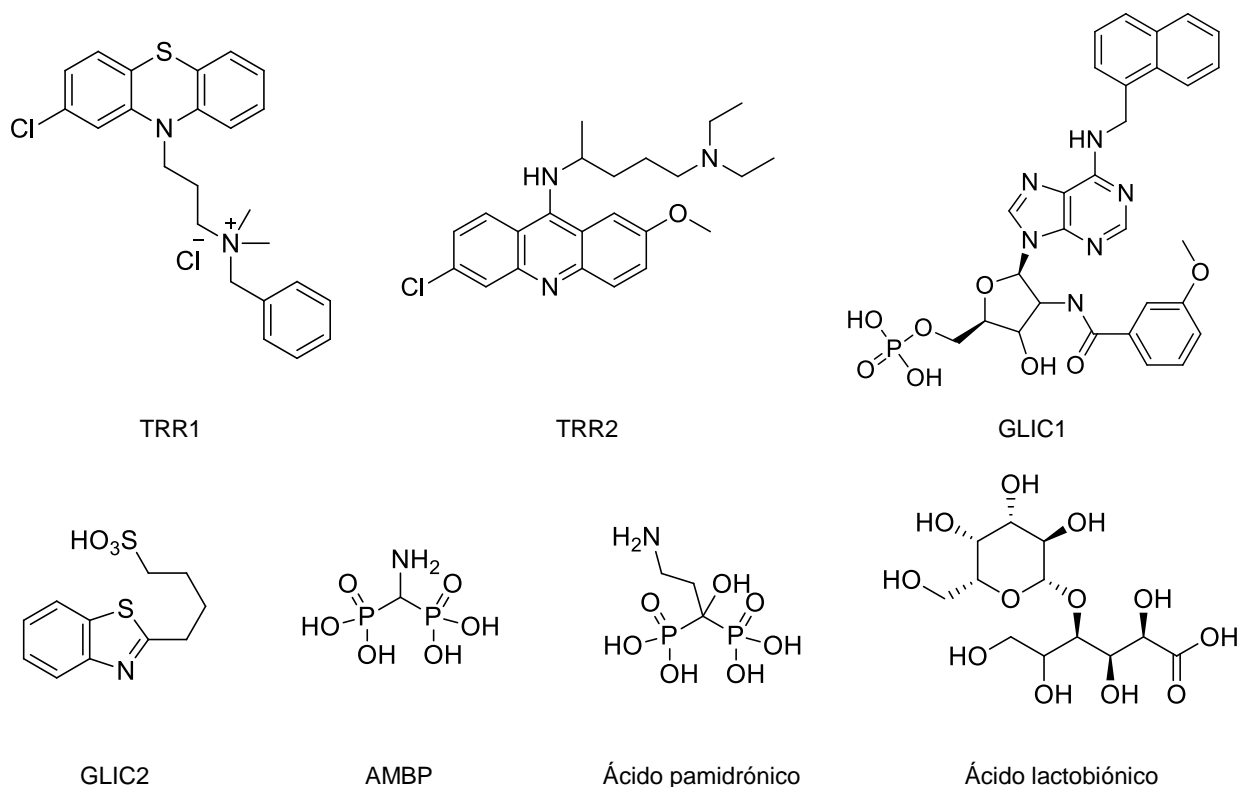
Los inhibidores de esta ruta biosintética han mostrado ser efectivos, tanto en la etapa aguda como crónica de la enfermedad. Entre ellos se distinguen: los inhibidores de la escualeno oxidasa como la terbinafina (antifúngico, figura 1.22)<sup>65</sup> y los inhibidores selectivos de la 14- $\alpha$ -lanosterol desmetilasa (CYP51) para los que se encuentran los derivados de triazoles, como el posaconazol (figura 1.22) que posee actividad antifúngica y sobre protozoarios.<sup>58</sup>



**Figura 1.22** Inhibidores de la biosíntesis de esteroides

## Tripanotona reductasa (TRR)

Los tripanosomatídeos presentan un metabolismo redox diferente al de la mayoría de los microorganismos eucariotas y procariotas. Este es regulado principalmente por el sistema tripanotona (*N1,N8*-bis(glutacionil)espermidina)/TRR, en vez del sistema glutatión/glutatión-reductasa presente en los mamíferos. La TRR es una flavoproteína dependiente de NADPH que mantiene a la tripanotona en su forma reducida, lo que favorece un ambiente intracelular reductor.<sup>66</sup> Dado que la TRR es una enzima clave en la defensa antioxidante del tripanosoma y está ausente en mamíferos, la misma ha sido considerada un blanco terapéutico atractivo para el desarrollo de fármacos tripanosomicidas.



**Figura 1.23** Compuestos activos sobre la TRR.

Se han encontrado compuestos con las siguientes actividades sobre este sistema enzimático:

- Inhibidores reversibles de TRR: son poliaminas, que resultan análogas al sustrato natural, tales como la *N1,N1,N4,N8,N12*-penta(3-fenilpropil)espermina.<sup>67</sup> También han resultado activos derivados de sistemas tricíclicos fenotiazínicos (TRR1, figura 1.23) presentes en los fármacos neurolépticos y antidepresivos,<sup>68, 69</sup> y derivados de las 9-amino-acridinas, como la mepacrina (TRR2, figura 1.23).<sup>70</sup>
- Sustratos subversivos: llamados así por el cambio que inducen en el ciclo redox de la enzima. Este tipo de inhibidores son los nitrofuranos, tales como el nifurtimox.

### Enzimas glicolíticas

La forma amastigota de *T. cruzi* utiliza glucosa como la principal fuente de ATP. Es por esto que las enzimas involucradas en la glicólisis son consideradas un blanco interesante para el desarrollo de inhibidores selectivos que afecten su función metabólica. Entre estas enzimas, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la triosafosfato isomerasa (TIM) han resultado blancos terapéuticos atractivos para el desarrollo de fármacos, ya que presentan importantes diferencias estructurales con las correspondientes enzimas humanas.<sup>71-73</sup>

La enzima GAPDH cataliza la oxidación y fosforilación de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato en presencia de  $\text{NAD}^+$  y fosfato inorgánico. Los inhibidores conocidos fueron desarrollados por estrategias *structure-based* y son análogos de adenosina, como el GLIC 1, mostrado en la figura 1.23.

La TIM cataliza la isomerización entre gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetonafofosfato en la vía glicolítica.<sup>74</sup> Las TIMs son homodímeros, siendo activas únicamente en su forma dimérica.<sup>75</sup> En función de esta característica se buscaron compuestos dirigidos a la interfase entre los monómeros con el objetivo de inducir modificaciones estructurales que alteraran la integridad del dímero provocando la inactivación de la enzima. En este sentido, se han encontrado inhibidores altamente selectivos de la TIM del parásito como los derivados de benzotiazol (GLIC 2, figura 1.23).<sup>76, 77</sup>

### Acidocalcisosmas

Los acidocalcisosmas son organelas ácidas, ricas en calcio y fosfatos que se han conservado durante la evolución desde procariotas hasta eucariotas. Estas organelas están involucradas en el almacenamiento de cationes y polifosfatos, metabolismo de pirofosfato y polifosfatos, homeostasis de calcio, mantenimiento del pH intracelular y osmoregulación.<sup>78</sup> En los parásitos, los acidocalcisosmas poseen enzimas, tales como la bomba de protones vacuolar dependiente de pirofosfato ( $\text{V-H}^+$ -PPasa) y la farnesil pirofosfato sintetasa, que están ausentes o difieren de las análogas presentes en mamíferos por lo que han sido consideradas posibles blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos.<sup>79</sup>

Inhibidores de la  $\text{V-H}^+$ -PPasa: es una enzima presente en los acidocalcisosmas de tripanosomatídeos validada como blanco para el diseño de nuevos fármacos.<sup>80, 81</sup> En 1998 Scott y colaboradores demostraron que los análogos de pirofosfato aminometilbifosfonato (AMBP, figura 1.23) eran capaces de inhibir la  $\text{V-H}^+$ -PPasa presente en acidocalcisosmas de *T. cruzi*.<sup>82</sup>

Inhibidores de la farnesil pirofosfato sintetasa: para esta enzima se han encontrado inhibidores tales como los N-alquilbifosfonatos, por ejemplo el pamidronato, (figura 1.23) con una potente actividad y selectividad frente a *T. cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>64, 79</sup>

### Trans-sialidasa

La trans-sialidasa de *T. cruzi* es una glicoproteína presente en los tripanosomatídeos expresada en la superficie de la forma tripomastigota sanguínea del parásito y liberada al medio, que constituye uno de los pocos ejemplos de glicosiltransferasas de superficie en eucariotas. Los tripanosomas no son capaces de sintetizar ácido siálico y usan esta enzima para transferirlo

desde sialoglicoconjugados presentes en la sangre y otros tejidos del hospedero hacia residuos de galactosa terminales, presentes en mucinas que cubren la superficie del parásito. Las mucinas sializadas están involucradas en aspectos clave de la interacción parásito-célula hospedadora tales como adhesión e invasión celular así como en la evasión del sistema inmune.<sup>83</sup>

Para esta enzima se conocen pocos inhibidores, entre ellos se han encontrado análogos de lactosa tales como el polialcohol lactitol y ácido lactobiónico (figura 1.23). Estos compuestos, debido a su naturaleza química, poseen una mala biodisponibilidad y en función de esto se han desarrollado derivados PEGilados (unidos a polietilenglicol) que tienen la capacidad de liberar con una cinética controlada a los análogos de lactosa, lo cual supone una mejora en dicho aspecto.<sup>84,</sup>

85

### Cisteín-proteasas

Las cisteín-proteasas son enzimas hidrolíticas en las que el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína presente en el sitio activo actúa como nucleófilo durante la catálisis. Para los parásitos del orden *Kinetoplastida* las cisteín-proteasas son importantes factores de virulencia.<sup>86</sup> Se ha comprobado que resultan esenciales para la supervivencia de estos organismos.<sup>87</sup> Estas proteasas parasitarias participan en distintos procesos relacionados con la patogénesis de la enfermedad incluyendo invasión, migración, nutrición y evasión del sistema inmune.<sup>88, 89</sup>

Las cisteín-proteasas parasitarias más ampliamente estudiadas pertenecen a la familia C1, dentro de la familia CA, en la que se encuentran la papaína, en plantas, y las catepsinas (CAT) B, C, L y S presentes en mamíferos.<sup>90</sup>

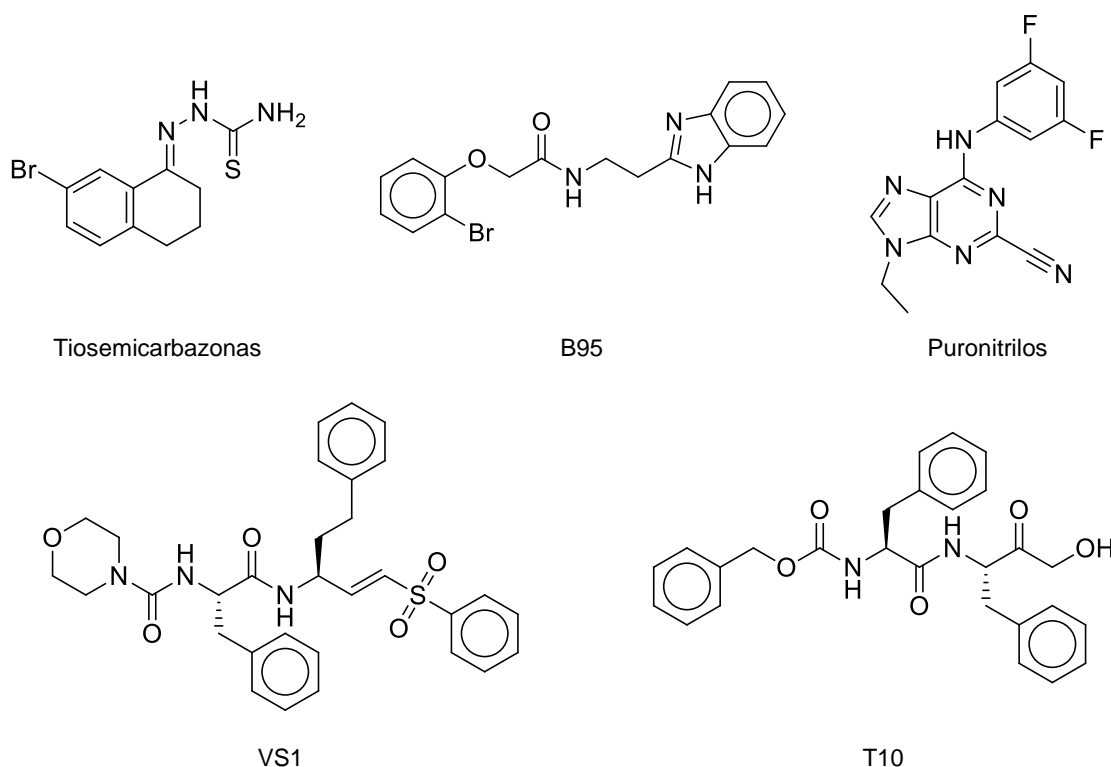
El papel fundamental que juegan las cisteín-proteasas en las infecciones parasitarias, sumado a las diferencias que presentan con respecto a las correspondientes enzimas presentes en los mamíferos, han validado esta familia de proteasas como blancos para el desarrollo de nuevos agentes quimioterápicos.<sup>91</sup>

Dentro de estas enzimas, la cruzipaína (CP) es la principal cisteín proteasa presente en *T. Cruzi*. La misma es una de las cisteín-proteasas más estudiada y caracterizada estructuralmente a partir de datos cristalográficos. Si bien hasta el momento se ha desarrollado un gran número de inhibidores, debido a que la CP comparte un alto grado de similitud de secuencia y especificidad con CAT-L y CAT-S, una de las desventajas observadas en muchos de estos compuestos es la falta de selectividad y la correspondiente toxicidad dada por interacción con proteasas del hospedador.<sup>89</sup>

Cabe destacar también que la mayoría de los compuestos desarrollados hasta el momento que presentan actividad frente a CP son peptidomiméticos, tales como VS1 y T10 (figura 1.24), que inhiben irreversiblemente a la enzima por unión covalente en el sitio activo. Sin embargo, esta clase de inhibidores son desestimados dado que el complejo unido covalentemente puede ser reconocido como un epítopo y por lo tanto provocar respuestas autoinmunes en los individuos tratados. Además, los inhibidores con estructuras peptídicas tienen el problema adicional de su inestabilidad plasmática, aunque esto se ha mejorado mediante la utilización de aminoácidos no naturales en el diseño de los péptidos.<sup>89</sup>

Por otra parte, se han encontrado inhibidores reversibles que muestran buena actividad inhibitoria sobre CP *in vitro* (TSC, T10, B95 y puronitrilos, figura 1.24), aunque presentan problemas de biodisponibilidad. Por ello, es de interés continuar con la búsqueda de compuestos que actúen por un mecanismo de acción análogo, aunque con mejor selectividad frente a la cisteína proteasa parasitaria.<sup>92-94</sup>

Algunos ejemplos de las distintas familias de inhibidores de CP que se han desarrollado hasta el momento se presentan en la figura 1.24.



**Figura 1.24** Compuestos con actividad inhibitoria de CP

## 2 Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos reseñados en la introducción de este trabajo de tesis, los objetivos del mismo se centran en el diseño y la síntesis de compuestos quinoxalínicos con potencial acción inhibitoria sobre dos posibles blancos terapéuticos:

- A) la transcriptasa reversa (TR) del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)
- B) la cruzipaína (CP) del *Trypanosoma cruzi*

### 1 Diseño de inhibidores de la TR del HIV

Se propone seleccionar a partir de una quimioteca virtual, construida en base a compuestos quinoxalínicos, prototipos útiles en el direccionamiento de la búsqueda hacia el hallazgo de nuevos INNTR.

### 2 Diseño de inhibidores de la CP

Se propone estudiar a partir de información estructural y técnicas de simulación computacional un posible sitio de unión de estructuras quinoxalínicas al mismo, con el fin de contar con prototipos para el diseño *de novo* de compuestos inhibidores.

### 3 Síntesis de compuestos quinoxalínicos con potencial actividad anti-HIV y antichagásicos

A partir de los resultados encontrados en el diseño asistido por computadora se propone desarrollar la síntesis y caracterización de los compuestos quinoxalínicos que hayan demostrado un perfil promisorio en los estudios anteriores.

El cumplimiento de los objetivos planteados se desarrolla en este trabajo de tesis, organizado de la siguiente manera:

- **Capítulo II:** Comprende el diseño de los compuestos con potencial actividad inhibitoria de la TR y de la CP mediante el empleo de distintas herramientas computacionales. Incluye la metodología empleada y conclusiones.
- **Capítulo III:** Comprende la síntesis y caracterización de quinoxalinas potencialmente activas de acuerdo al diseño realizado en el capítulo II. Incluyen la parte experimental correspondiente y conclusiones.

- **Conclusiones generales y perspectivas**
- **Bibliografía**

# Diseño de Quinoxalinas

---



## 1 Diseño Molecular

Como se mencionó en la introducción, el CADD estudia los modelos de REA empleando metodologías computacionales, lo cual es debido a la cantidad de datos a procesar para realizar predicciones de posibles compuestos líder.

Como toda técnica utilizada en investigación, las simulaciones computacionales tienen sus limitaciones. Para este tipo de técnicas, existe una que se destaca por sobre todas las demás: el costo computacional de los procesos. Si uno desea utilizar métodos rigurosos, deberá utilizar sistemas pequeños. Por el contrario, si uno desea estudiar sistemas grandes, deberá seleccionar métodos menos rigurosos. Será mérito del investigador lograr escoger el método más adecuado, realizando un balance entre la calidad de las predicciones y el costo de cálculo computacional.

### 1.1 Fundamentos teóricos

---

#### Métodos basados en la mecánica cuántica:

Cuando se desea predecir las propiedades de sistemas moleculares pequeños, donde los protagonistas son los electrones, se deben resolver las ecuaciones de la mecánica cuántica, que tiene como ecuación fundamental a la propuesta por Schrödinger:<sup>95</sup>

$$\frac{\partial \Psi(x, t)}{\partial t} = \left[ -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2}{\partial x^2} + V(x) \right] \Psi(x, t)$$

Esta es una ecuación diferencial cuya solución consiste en obtener la función de onda  $\psi$ , que da la descripción matemática de un sistema de partículas cuánticas, sujetas a un potencial  $V$ . La función de onda contiene toda la información necesaria para calcular las propiedades del sistema, como por ejemplo la energía potencial. Sin embargo, resulta imposible resolver de forma exacta esta ecuación para un sistema molecular, y se deben buscar soluciones aproximadas: suponer que el potencial es independiente del tiempo (ecuación de Schrödinger independiente del tiempo); asumir que los electrones se mueven en un potencial de cargas positivas estáticas (dadas por las posiciones nucleares, aproximación de Born-Oppenheimer); y finalmente aproximar la solución por el principio variacional.<sup>95</sup>

En la práctica, e incorporando otras aproximaciones, los paquetes de software disponibles ofrecen 3 tipos de métodos para el cálculo de energía del sistema empleando los métodos de mecánica cuántica: los métodos semiempíricos (como CNDO, AM1, PM3), que tienen parametrizaciones

basadas en la incorporación de datos experimentales, los métodos ab-initio o de primeros principios, que no incorporan información adicional, y de los cuales el método básico es el de Hartree-Fock, y finalmente los métodos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT). La diferencia radica en la calidad de las predicciones alcanzadas y fundamentalmente en la velocidad de cálculo, siendo los semiempíricos los más rápidos, pero más pobres en cuanto a la caracterización del sistema atómico mientras que los basados en DFT ofrecen una buena relación costo-beneficio para sistemas de tamaño medio, por lo que su empleo en biomoléculas es muy común.<sup>96</sup>

### Métodos basados en la mecánica clásica

Un tipo de aproximación muy útil al trabajar con sistemas constituidos por miles de átomos como las proteínas, son los métodos basados en la mecánica clásica. En la misma se representa a la macromolécula como un sistema mecánico en el cual las partículas que lo componen, átomos o grupos de átomos, interactúan entre sí a través de potenciales analíticos sencillos. En nuestro caso, consideraremos potenciales atomísticos, en los cuales consideramos como partículas los átomos, a diferencia de los esquemas de grano grueso, que agrupan los mismos en unidades mayores. Es decir, las interacciones entre los átomos se describen a partir de ecuaciones matemáticas simples donde se incluyen por ejemplo: la distancia entre ellos, los ángulos, la carga de cada uno, el radio de los mismos, etc. Al conjunto de ecuaciones y parámetros necesarios para evaluar la energía potencial, se lo denomina campo de fuerza y generalmente se encuentran disponibles para el público dentro de paquetes de programas tales como CHARMM,<sup>97</sup> GROMOS,<sup>98</sup> Amber,<sup>99</sup> etc. En el campo de fuerzas AMBER la energía potencial es función de la posición de los N átomos del sistema y su forma funcional para cada par de átomos i-j es como se muestra en la siguiente ecuación:

$$V_{\text{total}} = V_u + V_{nu}$$

Donde  $V_u$  describe la energía potencial de la molécula a través de sus uniones y  $V_{nu}$  la energía potencial de interacción a través del espacio:

$$V_u = \sum_{\text{enlaces}} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{\text{angulos}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{\text{diedros}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)]$$

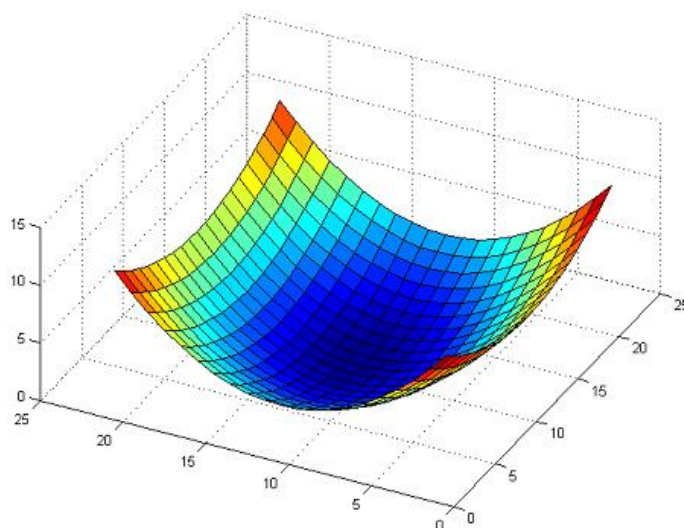
$$V_{nu} = \sum_{\text{vdW}} \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] + \sum_{\text{HX}} \left[ \frac{C_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{R_{ij}^{10}} \right]$$

Descripción de los términos de la ecuación:

- Enlaces: corresponde al potencial de Hooke, el cual describe los enlaces covalentes, siendo  $r_{eq}$  la distancia de equilibrio,  $r$  la distancia en un momento determinado, y  $k_r$  la constante de fuerza para ese par de átomos.
- Angulos: corresponde al ángulo formado entre 3 átomos consecutivos, siendo  $\theta_0$  su ángulo en el equilibrio,  $\theta$  el ángulo formado en un momento determinado, y  $k_\theta$  la constante de fuerza para esa triada de átomos.
- Diedros: describe a partir de cuatro átomos unidos consecutivamente, el ángulo diedro formado entre ellos, donde  $\gamma$  es la fase del diedro,  $\Phi$  el ángulo formado en un momento determinado,  $n$  la multiplicidad y  $V_n$  la constante de fuerza.
- VdW: describe las interacciones de no-uni3n. El marco azul corresponde al t3rmino de Lennard-Jones el cual describe interacciones del tipo dispersivas o de Van der Waals y de repulsi3n de corto alcance, siendo  $A = (4 \cdot \epsilon_{L-J} \cdot r_{ij-min})^{12}$  (repulsi3n) y  $B = (4 \cdot \epsilon_{L-J} \cdot r_{ij-min})^6$  (atracci3n), para los cuales,  $\epsilon_{L-J}$  es la constante de fuerza o profundidad del potencial, y  $r_{ij-min}$  es la distancia del par  $i-j$  donde el potencial es el m3nimo, mientras que  $R_{ij}$  es la distancia en un momento determinado. El marco verde corresponde al t3rmino de Coulomb que describe la interacci3n electrost3tica entre el par  $i-j$ , donde respectivamente  $q_i$  y  $q_j$  son carga del 3tomo,  $R_{ij}$  la distancia del par y  $\epsilon = 4 \cdot \pi \cdot D$ , siendo  $D$  la constante diel3ctrica.
- HX: Es un t3rmino semejante al de Lennard-Jones y caracteriza la interacci3n a trav3s de puentes de hidr3geno. Este t3rmino se emplea solo en algunas parametrizaciones.

### Optimizaci3n conformacional: M3todos de minimizaci3n

Para calcular propiedades descriptivas de una mol3cula es habitual determinar la conformaci3n de m3nima energ3a. Para eso, se cuenta con m3todos de optimizaci3n de su geometr3a, los cuales consisten en minimizar las variables de la funci3n de energ3a potencial ( $V$ ) de forma iterativa, con el fin de encontrar el valor de energ3a m3s bajo sobre la superficie de energ3a potencial, de modo que se tendr3n que reorientar las posiciones at3micas hasta encontrarla. Esto implica que la derivada primera de la funci3n en el m3nimo de la SEP sea igual a cero y que las derivadas segundas sean todas mayores a cero (figura 2.1). Los algoritmos de minimizaci3n se agrupan en 2 categor3as: los no derivativos (por ejemplo el Simplex) y los derivativos (Gradiente y Derivada Segunda).<sup>96</sup>



**Figura 2.1** SEP: representación gráfica de la superficie de energía potencial. A modo de ejemplo: El eje Z corresponde a V, y los ejes X e Y a posiciones determinadas. En el centro azul el gradiente tiende a ser cero.

Los métodos derivativos son ampliamente utilizados en el modelado molecular, el uso de la derivada primera (gradiente) de la función permite conocer la dirección dónde se ubica el mínimo y su valor cuán lejos está del mínimo:

$$\vec{g}(\vec{x}) = \frac{\partial V(\vec{x})}{\partial \mathbf{x}_n} \quad \mathbf{g}(\mathbf{x}) = \begin{bmatrix} \frac{\partial V(\mathbf{x})}{\partial x_1} \\ \frac{\partial V(\mathbf{x})}{\partial x_2} \\ \dots \\ \frac{\partial V(\mathbf{x})}{\partial x_n} \end{bmatrix}$$

De modo que los algoritmos de gradientes conjugados iteran la ecuación:

$$\mathbf{x}_{i+1} = \mathbf{x}_i - \alpha \cdot \mathbf{S}_i$$

Donde  $\mathbf{x}_{i+1}$  es la nueva posición del átomo en el paso  $i+1$ ,  $\mathbf{x}_i$  es la posición del átomo previo al incremento de  $i$ ,  $\alpha$  es el tamaño del paso y  $\mathbf{S}_i$  es la dirección del paso. En el caso de gradientes conjugados  $\mathbf{S}_i$  se calcula como:

$$\mathbf{S}_i = -\mathbf{g}_i + \beta \cdot \mathbf{S}_{i-1}$$

Donde  $\mathbf{g}_i$  es el gradiente en el paso  $i$  para el átomo  $\mathbf{x}$ ,  $\mathbf{S}_{i-1}$  es la dirección en el paso anterior y  $\beta_i$  es una relación de gradientes (entre el nuevo paso y el paso anterior), por ejemplo, la forma de cálculo Polak-Ribiere es:

$$\beta_i = \frac{|\mathbf{g}_i - \mathbf{g}_{i-1} \cdot \mathbf{g}_i^{-1}|}{\mathbf{g}_{i-1} \cdot \mathbf{g}_{i-1}}$$

### Muestreo conformacional: Dinámica molecular

La metodología más extendida en el campo de la simulación de biomoléculas para explorar el espacio conformacional es la técnica de dinámica molecular, que consiste en determinar trayectorias a partir de una conformación inicial.<sup>96</sup> Con la energía potencial calculada tanto de forma clásica, cuántica o híbrida cuántico/clásica, es posible encontrar la fuerza que experimenta cada átomo. Conociendo esta fuerza y la masa del átomo, e integrando las ecuaciones de movimiento de Newton es posible calcular la nueva posición que tomará el sistema al cabo de un cierto tiempo denominado *time step* (dt). Existen diferentes algoritmos para integrar las ecuaciones de movimiento. Es importante notar que el dt debe ser lo suficientemente pequeño como para poder describir de manera adecuada el movimiento natural del sistema como si la integración de las ecuaciones de Newton fuera exacta. Sin embargo, cuanto menor sea el mismo, deberá realizarse un mayor número de cálculos para simular un tiempo total dado. En general, una solución de compromiso, es utilizar un dt que sea un décimo del tiempo característico del modo más rápido del sistema. En proteínas, cuando se mantienen los enlaces covalentes que involucran los átomos de hidrógeno fijos, el tiempo característico de la vibración de enlaces covalentes ocurre en decenas de fs, por lo tanto el dt utilizado en estos casos es de 1-2 fs.

Para la integración de las ecuaciones de movimiento existen diferentes algoritmos. En todos los casos, se asume que las posiciones y las propiedades dinámicas (velocidad, aceleración, etc) pueden ser aproximadas como una expansión de Taylor:

$$r(t+dt) = r(t) + dt v(t) + \frac{1}{2} dt^2 a(t) + \frac{1}{6} dt^3 b(t) + \dots$$

$$v(t+dt) = v(t) + dt a(t) + \frac{1}{2} dt^2 b(t) + \frac{1}{6} dt^3 c(t) + \dots$$

El algoritmo de Verlet<sup>96</sup> utiliza una excelente aproximación, para realizar la integración, a partir de la posición anterior que tomó la partícula  $r(t - dt)$ , donde:

$$r(t+dt) = r(t) + dt v(t) + \frac{1}{2} dt^2 a(t) \dots$$

$$r(t - dt) = r(t) - dt v(t) + \frac{1}{2} dt^2 a(t) \dots$$

Sumando ambas ecuaciones, tenemos:

$$r(t+dt) = 2 r(t) - r(t - dt) + dt^2 a(t)$$

Donde las velocidades no se encuentran de forma explícita, sino que la posición de la partícula luego de un tiempo dt puede encontrarse, a partir de la posición y aceleración actual, junto con la posición previa. Por su parte, existen numerosas formas de encontrar las velocidades. Una de

ellas es a partir de las diferencias de las posiciones que tomó la partícula en un lapso de tiempo  $2 dt$ :

$$v(t) = [r(t+dt) - r(t - dt)] / 2dt$$

En cuanto al tratamiento de la temperatura, debe tenerse en cuenta que como las velocidades de los átomos de un sistema determinan la temperatura del mismo, al asignar velocidades iniciales a los átomos, estaremos asignando una temperatura al sistema según la siguiente ecuación:

$$\Sigma \frac{1}{2} (m \cdot v^2) = \frac{1}{2} (3 N k T)$$

El término de la izquierda corresponde a la energía cinética de todos los átomos del sistema, donde  $m$  corresponde a la masa y  $v$  a la velocidad de los átomos. En el término de la derecha se encuentra la constante de Boltzmann  $k$ , la cantidad total de átomos del sistema ( $N$ ) y la temperatura del mismo  $T$ . Por lo tanto podemos seleccionar una temperatura a la cual deseamos realizar la simulación, y a partir de esta, asignar velocidades a los átomos de forma tal que respeten la temperatura indicada mediante la ecuación que las relaciona.

En este trabajo de Tesis se ha utilizado el termostato de Langevin<sup>100</sup> para el control de la energía cinética. El mismo actúa sobre los átomos del sistema como un baño termostatzado escalando la velocidad de los mismos según la ecuación:

$$m \cdot a = m \cdot (dv/dt) = F(x) - \beta v + \eta(t)$$

Donde,  $F(x)$  es la fuerza que siente el átomo  $x$  por el sistema, (por ejemplo calculado desde el campo de fuerzas),  $\beta \cdot v$  es la fuerza de fricción proporcional a la velocidad, y  $\eta(t)$  es una función de fuerza estocástica (o de ruido gaussiano).

### **Muestreo Conformacional: Docking**

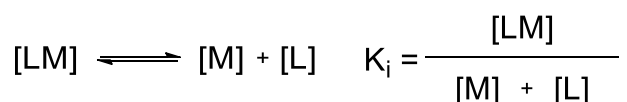
Los métodos de docking buscan predecir la orientación y conformación (pose) de un ligando en torno a su sitio de unión en un blanco biológico, lo que resulta necesario por ejemplo para obtener la conformación inicial requerida en la técnica de dinámica molecular. Para esto, los programas de docking requieren en principio, las coordenadas atómicas de la estructura del blanco biológico (macromolécula) y del ligando a analizar. A partir de estructura del ligando el programa busca juegos conformacionales de los mismos en torno al sitio de unión en la macromolécula y su "aceptación" en relación a dicho entorno se calcula por medio de una función de *scoring*. Los métodos de búsqueda conformacional y la función de *scoring* son el corazón de estos programas.<sup>101-103</sup>

Dentro de los métodos de búsqueda conformacional de ligandos sobre el blanco biológico podemos citar:<sup>104-108</sup>

- Métodos sistemáticos: A partir de una estructura inicial del ligando realizan cambios incrementales de ángulos o construcción del ligando por sustitución incremental.
- Métodos estocásticos: Se seleccionan conformaciones de ligandos a partir de poblaciones conformacionales generadas aleatoriamente, como los métodos por algoritmos evolutivos o Monte Carlo.
- Métodos de simulación: Se obtienen las conformaciones por dinámica molecular o minimización de geometría *in-situ*.

Por otro lado, el “buen” muestreo del espacio conformacional de un ligando no sólo depende de él, sino también del entorno macromolecular en el que se generan las conformaciones. Para eso, la mayoría de los programas de docking tienen la capacidad de otorgar cierta flexibilidad a las cadenas laterales de la macromolécula, pero la consideración de las cadenas laterales móviles puede prolongar demasiado el tiempo de búsqueda. Por eso, la selección de los residuos móviles debe hacerse previo al estudio de la flexibilidad de los mismos, a través de datos cristalográficos o por dinámica molecular.<sup>109, 110</sup>

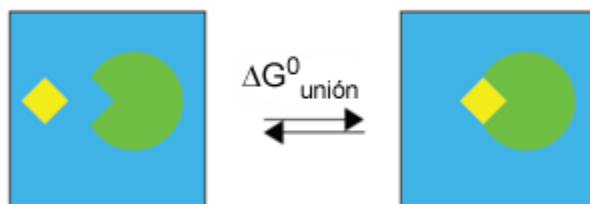
Con respecto a la función de scoring, debe previamente hacerse la consideración de que el proceso de docking se da bajo condiciones de equilibrio entre la forma unida ligando-macromolécula [LM] y la forma libre [L] + [M] en medio acuoso, de tal manera que el mismo puede ser caracterizado por su constante de equilibrio  $K_i$ :



Y la energía libre de del proceso de unión queda expresada en función de la  $K_i$  de la forma:

$$\Delta G^0_{\text{unión}} = -R T \ln (K_i)$$

Donde R es la constante de los gases ideales y T la temperatura en Kelvin.



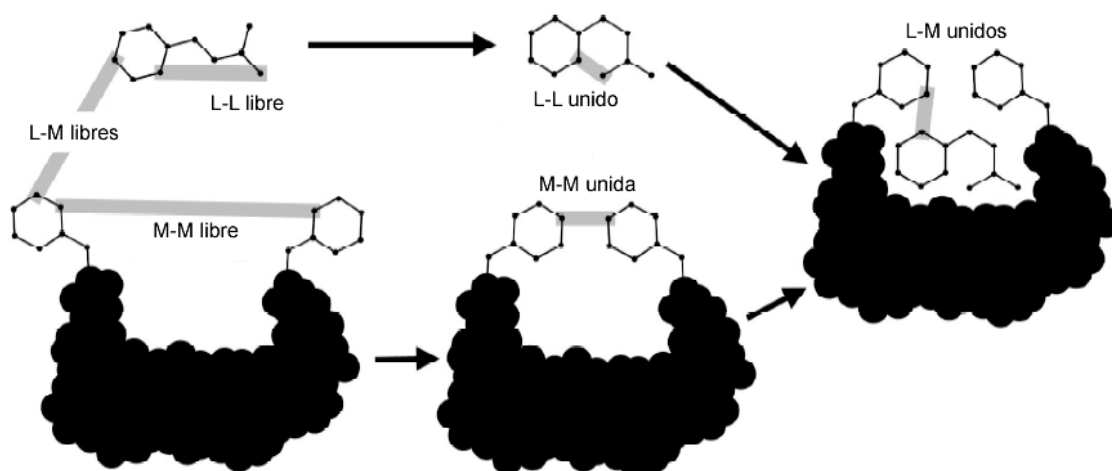
**Figura 2.2** Representación del equilibrio L (amarillo) - M (verde).

Normalmente las funciones de scoring son ecuaciones viriales cuyos términos buscan predecir  $K_i$  y  $\Delta G$ . Las más comúnmente utilizadas están basadas en términos de campos de fuerza, pero hay ecuaciones que incluyen factores experimentales (obtenidos por ajuste con datos de actividad) y términos que estiman la energía de desolvatación y el cambio de entropía conformacional.

Particularmente en este trabajo se ha elegido para realizar los experimentos de docking, el programa Autodock ya que ha sido previamente utilizado en hallazgo de INNTR,<sup>111-113</sup> además es de distribución libre, con manuales y ejemplos accesibles online. Este programa utiliza un método estocástico (algoritmo genético) para la búsqueda conformacional, y su función de scoring tiene la expresión:<sup>114, 115</sup>

$$\Delta G = (V^{L-L}_{unido} - V^{L-L}_{libre}) + (V^{M-M}_{unida} - V^{M-M}_{libre}) + (V^{L-M}_{unidos} - V^{L-M}_{libres}) + \Delta S_{conf}$$

Donde  $V$  es la energía potencial evaluada para los pares unido-libre de la macromolécula y ligando respectivamente, y  $\Delta S_{conf}$ , es un término estimado por la pérdida de libertad conformacional debido a la unión ligando-macromolécula, como se ilustra en la figura 2.3:



**Figura 2.3** Representación gráfica del proceso de docking.



La evaluación de cada par de V está basada en el campo de fuerzas AMBER a partir de los términos de energía para las interacciones de Van der Waals (vdw), puente de hidrógeno (hbond), electrostáticas (elec), y solvatación (sol), quedando ésta definida como:

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2)}$$

### Estimación de propiedades termodinámicas: MM-PBSA

Es un método para estimar la energía libre de unión<sup>116, 117</sup> entre dos moléculas evaluando la energía de interacción ligando-macromolécula a través de una simulación de dinámica molecular, siempre y cuando el fenómeno de interacción se dé en condiciones de equilibrio, como el indicado anteriormente en la figura 2.2.

Sin embargo, en la simulación de los estados solvatados de la figura 2.2, la mayor parte de la contribución en la fluctuación de energías se va a deber a la interacción solvente-solvente, de modo que se tendrían que hacer simulaciones muy prolongadas para tener buena convergencia de las energías. Por lo tanto, una forma más eficiente para estimar la energía libre es descomponiendo el proceso indicado en la figura 2.2 en el siguiente ciclo termodinámico:

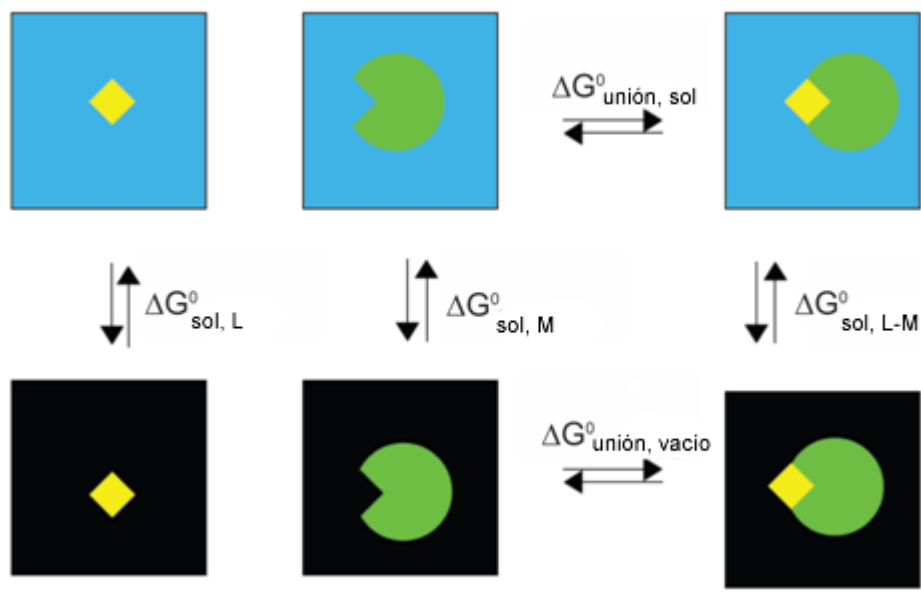


Figura 2.4 Ciclo termodinámico considerado para el cálculo de energía libre por el método de MM-PBSA.

Para el ciclo propuesto el cálculo de energía libre queda expresado como:

$$\Delta G_{bind, solv}^0 = \Delta G_{bind, vacuum}^0 + \Delta G_{solv, complex}^0 - (\Delta G_{solv, ligand}^0 + \Delta G_{solv, receptor}^0)$$

La variación de las energías libres de solvatación se calcula resolviendo un modelo de solvente continuo, basado en la ecuación linealizada de Poisson-Boltzman, para cada uno de los tres estados (esto le da la contribución electrostática a la energía libre de solvatación) más un término empírico para las contribuciones hidrofóbicas:

$$\Delta G_{solv}^0 = G_{electrostatic, \epsilon=80}^0 - G_{electrostatic, \epsilon=1}^0 + \Delta G_{hydrophobic}^0$$

La variación de energía libre en el vacío es calculada a partir de las energías de interacción entre el ligando-macromolécula ( $\Delta E_{mm}$ ) menos el cambio de entropía por la unión de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{vacuum}^0 = \Delta E_{molecular\ mechanics}^0 - T \cdot \Delta S_{normal\ mode\ analysis}^0$$

La entropía puede ser calculada mediante análisis de modos normales, aunque éste término se puede despreciar en los casos donde el  $\Delta G$  tenga valor comparativo entre ligandos con modos de unión semejantes (y el estado entrópico del complejo ligando-macromolécula sea similar entre ellos). Esto es de especial importancia, ya que el cálculo de modos normales requiere de mucho tiempo de cómputo.

### Obtención de parámetros para las simulaciones clásicas

Como ya fue señalado, los estudios basados en la mecánica clásica necesitan de una serie de parámetros para poder calcular la energía potencial del sistema. Para el caso de proteínas, ácidos nucleicos, azúcares, y la mayoría de las moléculas de interés farmacológico estos parámetros se encuentran disponibles para el público. Sin embargo, en casos donde las moléculas que se desean simular son diferentes a las convencionales, estos parámetros deben ser calculados por el usuario.

Para los casos de interés en esta Tesis Doctoral, la mayoría de los parámetros se hallan en el campo de fuerzas de AMBER (GAFF, General AMBER Force Field), a excepción de las cargas parciales sobre los ligandos, que se determinaron utilizando el método RESP.<sup>118</sup> El mismo consiste en ajustar las cargas atómicas de una molécula, de forma tal de reproducir el potencial electrostático del sistema. Por lo tanto, inicialmente se calcula el potencial electrostático de la molécula de interés, y posteriormente se evalúa el mismo en cada punto de una grilla cuyas dimensiones dependen del sistema de estudio. Las cargas de cada átomo deben reproducir de

forma óptima el potencial electrostático calculado. La suma de todas las cargas atómicas deberá ser igual a la carga total del sistema.

## Descriptores moleculares

En el desarrollo de este capítulo se harán uso de descriptores para análisis de QSAR3D, el cual consiste en explorar los posibles modelos de correlación actividad-descriptor. Dado que el mismo se hará teniendo en cuenta propiedades geométricas de las moléculas en estudio, se ha elegido una clase de descriptores 3D que caracterizaron adecuadamente a las estructuras propuestas.<sup>119,</sup>

120

Los descriptores WHIM (Weighted Holistic Invariant Molecular descriptors) son descriptores moleculares que contienen información acerca de la estructura tridimensional de la molécula en cuanto a su tamaño, forma, simetría y distribución atómica.<sup>121, 122</sup>

Los WHIM utilizan un sistema de tres ejes, semejante a los ejes cartesianos (x, y, z), definido por tres eje principales (1, 2 y 3) en donde la molécula se centra. El eje 1 es el de mayor varianza (es el eje donde la molécula se extiende mayoritariamente), el eje 3 es el de menor varianza (es el eje donde la molécula se extiende minoritariamente) y el eje 2 queda definido como el eje intermedio. Esto hace que los WHIM no varíen su valor ni por traslación ni por rotación. Para su cálculo, se utiliza el análisis de componentes principales (PCA), el cual utiliza la matriz de covarianza ponderada por distintas propiedades ( $w_i$ ) de donde se obtienen los autovalores y autovectores:<sup>121,</sup>

122

$$s_{qq'} = \frac{\sum_{i=1}^A w_i (q_i - \bar{q})(q'_i - \bar{q}')}{\sum_{i=1}^A w_i}$$

Los autovectores son los tres ejes principales definidos anteriormente.

- u (unidad) (donde  $w_i = 1$ )
- m (masa atómica)
- v (volumen de Van Der Waals)
- e (electronegatividad atómica)
- p (polarizabilidad atómica)

A su vez, los descriptores WHIM se dividen en dos clases: WHIM direccionales y WHIM no direccionales. Los WHIM direccionales se calculan a partir de los autovalores de la matriz de covarianza, obteniéndose 4 descriptores para cada uno de los ejes principales (1, 2 y 3) y para

cada una de las propiedades (u, m, v, e y p), dando un total de 55 descriptores WHIM direccionales (v3 es eliminado porque presenta multicolinealidad).

- $\lambda$  (lamda), WHIM direccional de tamaño.
- v (nu), WHIM direccional de forma.
- $\eta$  (eta), WHIM direccional de densidad.
- $\gamma$  (gamma), WHIM direccional de simetría.

Los WHIM no direccionales derivan directamente de los WHIM direccionales. En ellos desaparece la información relacionada con los ejes principales (ya que se combina la información de los tres ejes), dando únicamente una descripción global de la molécula.

Así se obtienen 5 WHIM no direccionales para cada una de las 5 propiedades (u, m, v, e y p), dando un total de 28 descriptores WHIM no direccionales.

- T: no direccional de tamaño.
- A: no direccional de tamaño.
- V: no direccional de tamaño.
- K: no direccional de forma.
- D: no direccional de densidad.

El autovalor de la matriz de covarianza es fundamental para los WHIM ya que a partir de ellos se calculan el resto de los descriptores. Cada autovalor ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$ ) representa una medida de dispersión de los átomos de la molécula a los largo de su eje principal.

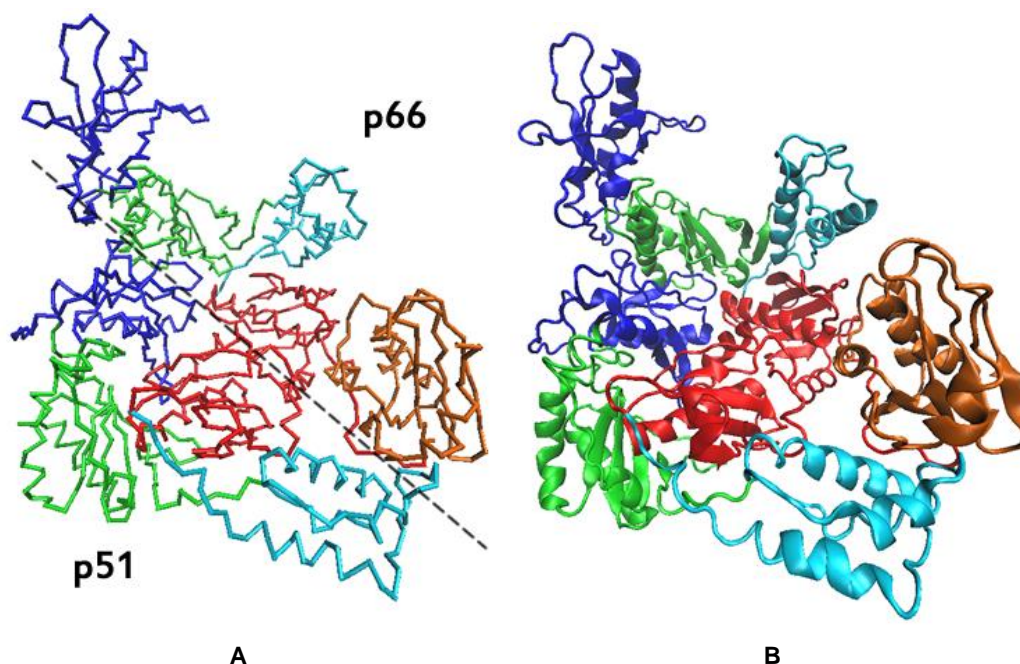
## 2 Inhibidores no nucleosídicos de la TR

### 2.1 Aspectos estructurales

---

Como se comentó en la Introducción de esta Tesis Doctoral la transcriptasa reversa es una enzima fundamental en el ciclo replicativo del HIV, ya que realiza la retrotranscripción del ARN viral a ADN viral, a partir del cual, la maquinaria sintética del organismo huésped producirá copias del virus. Este proceso biosintético comienza (1) con la unión de un ARNt cebador a una secuencia específica del templado de ARN viral (secuencia PBS: primer binding sequense), continuando con la elongación de una cadena complementaria de ADN, resultando en un complejo híbrido ADN/ARN. (2) Una vez terminada la elongación de la cadena, el dominio ARNasaH de la TR degrada el ARN viral y dispone a la enzima a (3) completar la doble hebra de ADN viral que luego es integrado al genoma de la célula huésped.<sup>123</sup>

Esta enzima es un heterodímero que consta de 2 cadenas polipeptídicas: la subunidad p66 (66 kDa, 560 residuos) y la subunidad p51 que es idéntica en secuencia a los primeros 440 residuos (51 kDa) desde la porción N-terminal de p66. Sobre la unidad p66 se describen 5 subdominios: dedos, palma, pulgar, conexión y ARNasaH (ver figura 2.5). La interfase del heterodímero se encuentra mayormente estabilizada por interacciones entre los subdominios de conexión, y en menor medida, por interacciones entre los otros subdominios: ARNasaH con el pulgar de p51, dedos de p51 con palma de p66.<sup>124</sup>



**Figura 2.5** Representación tridimensional de la TR. PDBid: 1FK9. (A) En forma de trazas, la línea punteada indica la zona donde se da la división de ambas subunidades. (B) En cintas. Códigos de color de subdominios: dedos=azul, palmas=verde, conexión=rojo, pulgares=cyan, ARNasaH=naranja.

La subunidad p51 carece del sitio ARNasaH y tiene una marcada diferencia conformacional en los dominios de la palma y conexión. El dominio de la palma de p66 contiene el sitio catalítico de la TR, que junto a los dedos y pulgar de p66 conforman la horquilla de anclaje del templado-cebador (tabla 2.1). En el sitio catalítico se hallan 4 residuos de aminoácidos: Tyr 183, Met/Val 184, Asp 185 y Asp 186, que se encuentran altamente conservados en otras retrotranscriptasas virales.<sup>123,</sup>

125

Para su estudio in-silico, se disponen en el PDB (Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org>) cerca de 220 estructuras de TR con resoluciones de entre 1.5 y 4.75 Å, en forma de proteína libre o en complejo con sustratos y/o inhibidores.

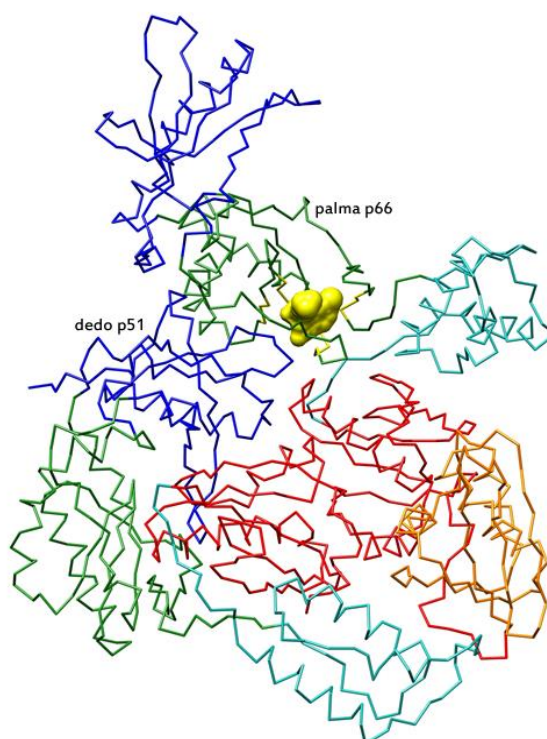
**Tabla 2.1** Subdominios de la TR

Subdominio	Rango de residuos	Funciones
Dedos	p66: 1 - 84, 120 - 150	Forman parte de la horquilla de anclaje del templado de ARN viral.
	p51: 1 - 85, 119 - 149	Forma parte de sitio activo polimerasa. Intervienen en la dimerización.
Palma	p66: 85 - 119, 151 - 243	Sitio activo polimerasa y posiciones de anclaje del ARNt cebador - ARN viral
	p51: 86 - 118, 150 - 244	Anclaje del ARNt cebador
Pulgar	p66: 244 - 322	Unión del templado-cebador y translocación del mismo.
	p51: 245 - 320	Forman el fondo de la horquilla de anclaje del templado-cebador. Intervienen en la dimerización
Conexión	p66: 323 - 437	Forman el fondo de la horquilla de anclaje del templado-cebador. Intervienen en la dimerización
	p51: 321 - 427	
ARNasaH	438 - 560	Hidroliza el templado de ARN viral del híbrido ARN/ADN. Interviene en la dimerización.

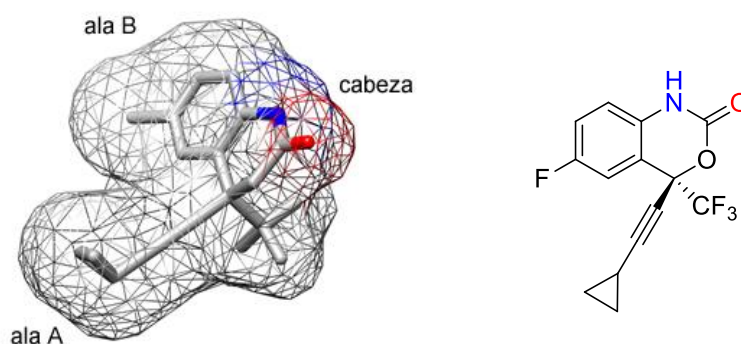
### Sitio de unión de los inhibidores no nucleosídicos (sitio INNTR) a la TR

Se trata de una cavidad flexible, próxima al sitio catalítico de la polimerasa y de la interface, entre la palma de p66 y el dedo de p51 (figura 2.6), con un volumen entre 620-720 Å<sup>3</sup>, siendo su superficie interna altamente hidrofóbica, conformada en su mayoría por residuos de p66 a excepción de Glu 138 que corresponde a p51.<sup>123, 124</sup>

Los residuos que intervienen en la interacción con los INNTR generan una cavidad del tipo “mariposa” (ala A, Ala B y cabeza), en la figura 2.7 se muestra Efavirenz, un clásico INNRT, como ejemplo de la geometría involucrada en la interacción:<sup>123, 126</sup>



**Figura 2.6** Sitio de unión INNTR marcado en amarillo.



**Figura 2.7** Representación del efavirenz en perspectiva y con superficie.

Donde:

- ALA A: queda rodeada por las cadenas laterales de los residuos Pro 95, Tyr 181, Tyr 188, Phe 227, Trp 229 y Val 234 siendo una zona ávida por formar uniones de interacción  $\pi$ - $\pi$  (ala con sistema  $\pi$ : alilos, fenilos).
- CABEZA: con afinidad por grupos formadores de puente de hidrógeno, rodeada por las cadenas laterales de Leu 100 y Glu 138 (de p51) y el *backbone* de los residuos Lys 101 y Lys 103; por debajo de ella hay espacio para un grupo alquílico, conformado entre la cadena lateral de Val 179, Lys 103 y Val 106, y con fondo sobre el *backbone* de Val 189 y Gly 190.

- ALA B: rodeada por una zona hidrofóbica dada por las cadenas laterales de los residuos Leu 100, Lys 103, Val 106 Val 179, Gly 230, Tyr 318 y con el *backbone* de Val 189, Gly 190, His 235 y Pro 236. También puede haber interacción por puentes de hidrógeno con estos últimos.

### Mecanismo de acción de los INNTR

Los inhibidores no nucleosídicos de la TR se unen al sitio INNTR, inhibiendo la actividad enzimática por regulación alostérica, de hecho se ha demostrado que algunos INNTR muestran mayor afinidad por el complejo enzima-sustrato (ES) que por la enzima libre.<sup>123</sup> En general, estos inhibidores son solamente activos sobre la TR del HIV-1, y prácticamente inactivos sobre otras retrotranscriptasas (por ejemplo HIV-2), debido a que el sitio INNTR es una característica única de la TR del HIV-1.<sup>123, 124</sup>

Los aspectos más importantes que se alteran en la funcionalidad de la TR por la ocupación del sitio INNTR son:

- La presencia de un INNTR en este sitio alostérico produce un fenómeno de *induced-fitting*, con una reducción en la superficie del sitio de entre 190-240 Å<sup>2</sup>, traduciéndose en una reducción de la flexibilidad en múltiples regiones de la TR, llevando a interferir múltiples funciones, incluso, algunos INNTR pueden alterar pasos específicos en el ciclo transcripcional.<sup>124, 127</sup>
- Si bien los INNTR no compiten con el sustrato en el sitio activo de la enzima, sí cambian enormemente la tasa de incorporación de nucleótidos durante el paso de síntesis del ADN viral dependiente de ARN viral.<sup>123</sup>
- Los INNTR presentan importantes diferencias de afinidad por el sitio de unión, de acuerdo al complejo templado-cebador formado y al nucleótido unido a ser incorporado a la cadena de ácido nucleico en proceso de síntesis. Mientras que la mayoría de los INNTR presentan este mecanismo alostérico no competitivo, una familia de éstos, los HEPT parecen presentar cierto grado de alosterismo competitivo según el nucleótido unido al sitio catalítico.<sup>123</sup>

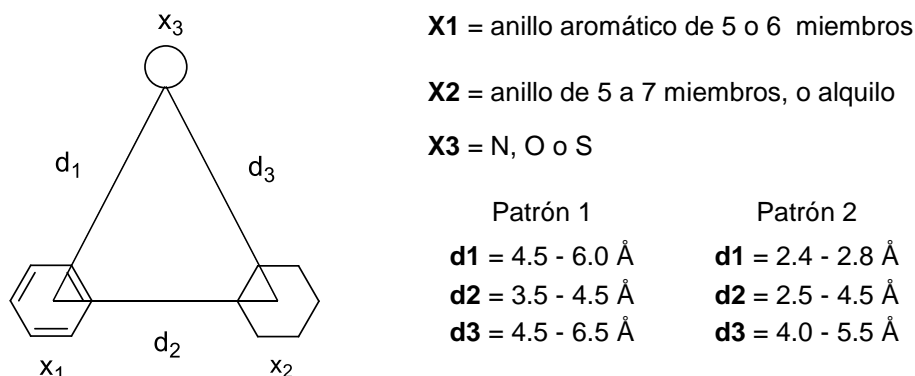
### Compuestos INNTR

Los INNTR han sido estudiados estructuralmente con diferentes técnicas de análisis y se ha llegado a la conclusión que los mismos deben tener cierta capacidad para adoptar una conformación de tipo “mariposa” (figura 2.7) poseer una alta capacidad para formar uniones



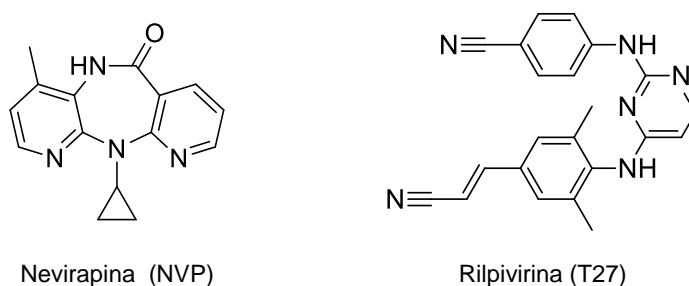
hidrofóbicas e interacciones  $\pi$ - $\pi$  stacking en las alas y presentar grupos formadores de puente de hidrogeno en la cabeza.<sup>123, 124, 128</sup>

A partir de estudios *in-silico* sobre cristalografías de complejos INNTR-TR, se estableció por superposición de ligados, que ciertos sustituyentes son clave en la definición de un farmacóforo bidimensional.<sup>129</sup> En la figura 2.8 se muestran estos requerimientos:



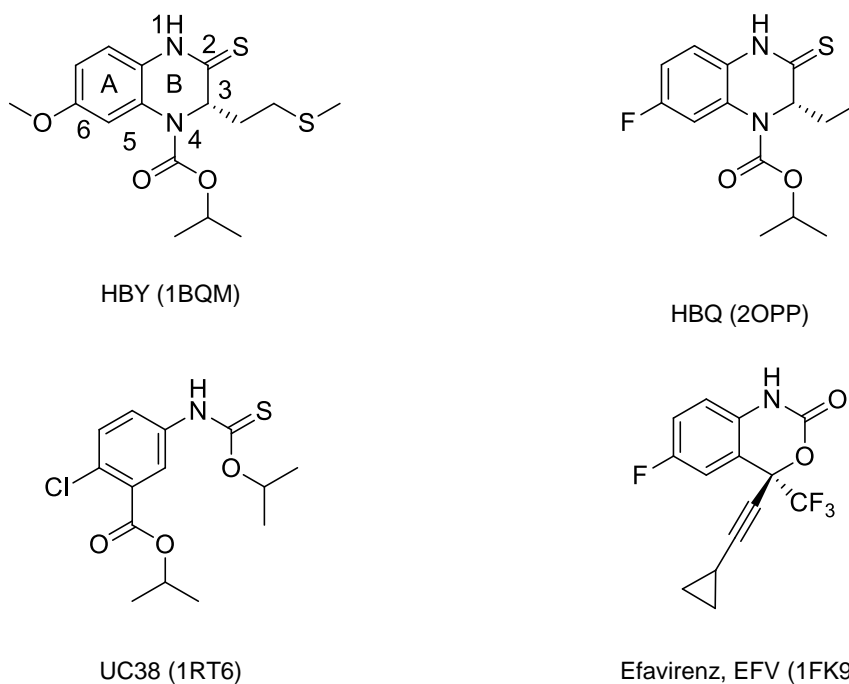
**Figura 2.8** Representación bidimensional del farmacóforo.<sup>129</sup>

También se ha descrito a través del análisis de datos cristalográficos la flexibilidad del sitio INNTR en función del ligando unido,<sup>130</sup> los modos de unión para las distintas familias de INNTR y las distancias típicas que adoptan los residuos del sitio INNTR en relación a su ligando, confirmando los modelos propuestos.<sup>126, 127</sup> A modo de ejemplo, en la figura 2.9 se toman 2 casos estructurales extremos con respecto a su flexibilidad: Nevirapina, estructuralmente rígida, pero su conformación natural adopta la forma de mariposa, y la Rilpivirina, con libertad rotacional a lo largo de sus 3 anillos, que le permite reacomodarse para ubicarse en el sitio.



**Figura 2.9** Otros compuestos que cumplen con la REA de los INNTR.

A modo de deducir *a priori* la potencialidad de las quinoxalinas propuestas en el presente trabajo de tesis como INNTR, hemos seleccionado como modelos de comparación, las estructuras de compuestos activos INNTR, obtenidas por cristalografía de rayos X de complejos ligando-TR (figura 2.10). En la figura 2.11 se muestran imágenes de los mismos con su posición y conformación adoptada en el sitio de los INNTR.



**Figura 2.10** Estructuras utilizadas a modo comparativo por su analogía con las quinoxalinas propuestas en esta tesis. Entre paréntesis se indica el código PDB de la cristalografía de donde se tomaron sus coordenadas atómicas.

A partir de estas estructuras pudimos definir los requisitos más importantes a la hora de plantear las modificaciones o sustituciones a núcleo de quinoxalina: La agrupación atómica formadora de puente de hidrógeno en las posiciones *N1*-*O2*, la presencia o ausencia de grupos alquílicos en *C3* y su estereoquímica, la naturaleza alquílica o aromática en los sustituyente de *N4*, y la presencia o ausencia de restos alquílicos pequeños en *C6*. Del análisis de las interacciones más importantes de las estructuras indicadas en la figura 2.10, se puede resumir:

- Los grupos alquílicos en posición 4 de HBY, HBQ, EFV, junto grupo 3' de UC3 ocupan el espacio del ala A, rodeada de TYR 181, TYR188 y TRP 229.
- Los anillos A de HBY, HBQ y EFV, y el fenilo de UC3 ocupan la zona del ala B, interaccionando con VAL 106, Val 179 y GLY 190.
- Los grupos de la cabeza formadores de puente de hidrógeno con LYS 101 son *N1*, *S2* de HBY y HBQ, *N1* y *O2* de EFV, *N3* y *S2* de UC38.

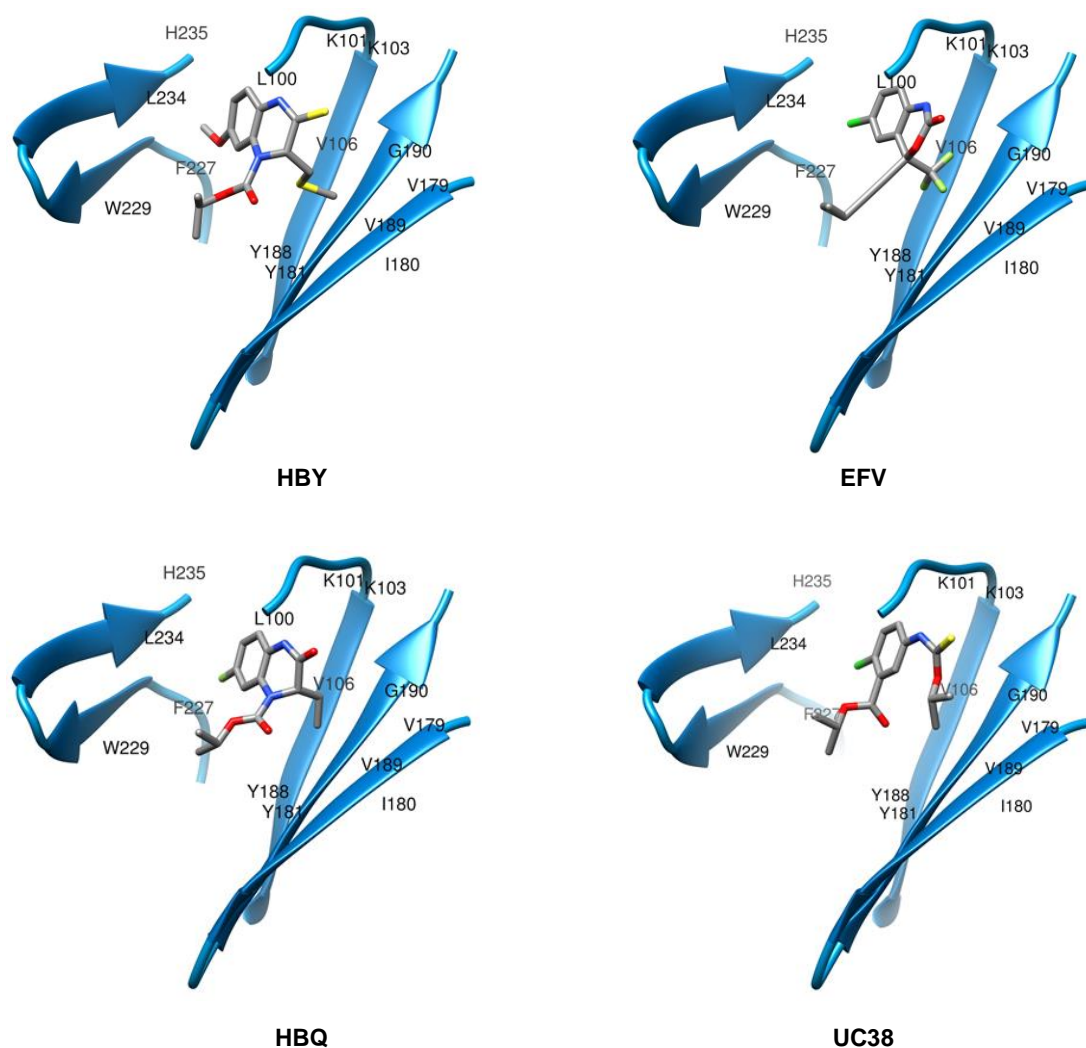


Figura 2.11 Representación de los ligandos HBY, EFV, HBQ y UC38 en sus sitio de unión.

### Mutantes resistentes a los INNTR

En los últimos años se han caracterizado varias mutantes de la TR que llevan a la aparición de resistencia a INNTR<sup>123</sup> y se ha propuesto que este fenómeno ocurre por alguna de las siguientes situaciones:

- Pérdida de interacciones favorables: Por ejemplo la mutación Tyr 181 Cys, que provoca la pérdida de interacciones  $\pi$ - $\pi$  stacking.
- Conflicto estérico: Por ejemplo mutaciones sobre Gly 190 conduce a la repulsión estérica de importantes grupos, como el ciclopropilo de la nevirapina.
- Inducción de conformaciones desfavorables: los cambios conformacionales en el sitio debido a la mutación ocurren, en general, en la mayoría de los casos.

Las mutantes Leu 100 Ile, Lys 103 Asn, Val 106 Ala, Val 108 Ile, Glu 138 Lys, Val 179 Asp, Tyr 181 Cys, Gly 190 Glu, Met 230 Ile y Pro 236 Leu son las comúnmente halladas en las cepas

resistentes a alguno de los INNTR, siendo las Tyr 181 Cys y Lys 103 Asn las que presentan resistencia para la mayoría de ellos. También es común que una mutación hacia un INNTR cruce la resistencia hacia otras familias de INNTR, aunque de forma contraria, se ha encontrado que la resistencia hacia un INNTR ha aumentado la sensibilidad hacia otro.<sup>123</sup>

En base al grado de resistencia presentado frente a alguna de las mutantes, los INNTR se clasifican en inhibidores de primera generación y de segunda generación. En el caso de los de primera, en general, la mutación vuelve refractaria a la TR frente al INNTR (por ejemplo: nevirapina frente a Tyr 181 Cys o efavirenz frente a Lys 103 Asn), mientras que los de segunda (por ejemplo: HBY, opaviralina y rilpivirina) aún resultan activos frente a mutantes sobre las que otros INNTR pierden eficacia, por ejemplo HBY es un potente inhibidor de Tyr 181 Cys y Lys 103 Asn.

Sin embargo, otra consideración que motiva el desarrollo y optimización de los INNTR, es que mientras se adquiere resistencia hacia un grupo de INNTR, hay otras familias que sobre esas mutantes mantienen la actividad (generalmente entre integrantes de INNTR de segunda generación), incluso, modificaciones químicas sobre la misma familia de INNTR puede restablecer la sensibilidad perdida por la mutación.<sup>123</sup> Esto puede replantear la terapia contra el HIV-1 mediante el empleo de juegos de INNTR que se puedan intercambiar según la cepa mutante resistente hallada en el paciente.<sup>123</sup>

## 2.2 Diseño de INNTRs

---

La búsqueda de nuevos compuestos INNTR empleando herramientas propias del CADD está bien documentada en la literatura.<sup>124, 129, 131</sup> En trabajos previos se han descrito protocolos de cribado virtual y diseño *de-novo* basados en estudios QSAR, docking y dinámica molecular que han resultado ser útiles en el direccionamiento de las búsquedas hacia el hallazgo de nuevos INNTR.<sup>113, 130, 132, 133</sup> En relación a ello, es objetivo de la presente Tesis Doctoral explorar por medio de cribado virtual una quimioteca construida en base a compuestos quinoxalínicos, como punto de partida para la síntesis posterior de los sistemas quinoxalínicos potencialmente activos.

### 2.2.1 Cribado virtual

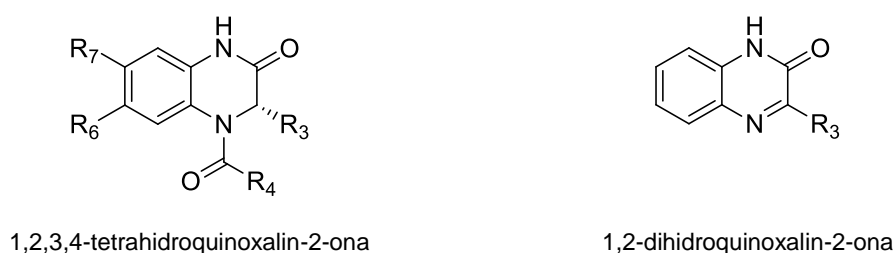
El cribado virtual es un protocolo que tiene dos aspectos fundamentales para su ejecución: la quimioteca virtual y el sistema de filtros que seleccionan los compuestos prometedores. Las quimiotecas virtuales son en esencia bases de datos desde el punto de vista computacional, que pueden contener información de los compuestos en forma de cadenas de reconocimiento (por ejemplo: SMILES), descriptores o coordenadas atómicas (llevan información conformacional). El sistema de filtros puede derivar de algunas de las aproximaciones ya comentadas: evaluar a los

candidatos a través de descriptores o desde su sitio de unión al blanco macromolecular de interés.<sup>5, 134</sup> Todos ellos, previamente a ser aplicados deben ser calibrados para las condiciones de estudio.

### 2.2.2 Quimioteca Virtual

Previamente se han descrito las características de los ligandos INNTR, prestando especial atención sobre aquellos que poseen un sistema quinoxalínico en su estructura o una alta analogía, dado que las quinoxalinas son los compuestos de interés en esta Tesis. Es de esperar que los compuestos de nuestra quimioteca virtual puedan tener el mismo modo de unión que los ligandos descritos en la figura 2.10 y por lo tanto una actividad biológica similar.

La quimioteca virtual fue construida teniendo como rasgo común las estructuras indicadas en la figura 2.12, variando de forma combinatoria los sustituyentes R3, R4, R6 y R7, contemplando además ambas posibilidades estereoisoméricas (R y S) para el C3 asimétrico.



**Figura 2.12** Estructuras base propuestas para la construcción de la QV.

La mayoría de los residuos propuestos para cada uno de los grupos R se fundamentan desde el punto de vista químico en la presencia de los mismos en compuestos INNTR análogos ya conocidos, y tratan de encuadrarse en el modelo farmacofórico propuesto por Wang *et al* (figura 2.9), aunque se han elegido algunos grupos “voluminosos” para R4 con la idea de comprobar la capacidad de los filtros en seleccionar entre tamaños adecuados de ligandos.

En las tablas 2.2 y 2.3 se muestran los sustituyentes que se utilizaron para las posiciones 3, 6 y 7; y en la tabla 2.4 los sustituyentes para la posición 4.

Tabla 2.2 Sustituyentes para C3		Tabla 2.3 Sustituyentes para C6 y C7	
R3		R6 / R7	
H	metil	H	cloro
metil-tio-etil	2-butil	flúor	metil
isopropil	Isobutil	acetilamino	amino

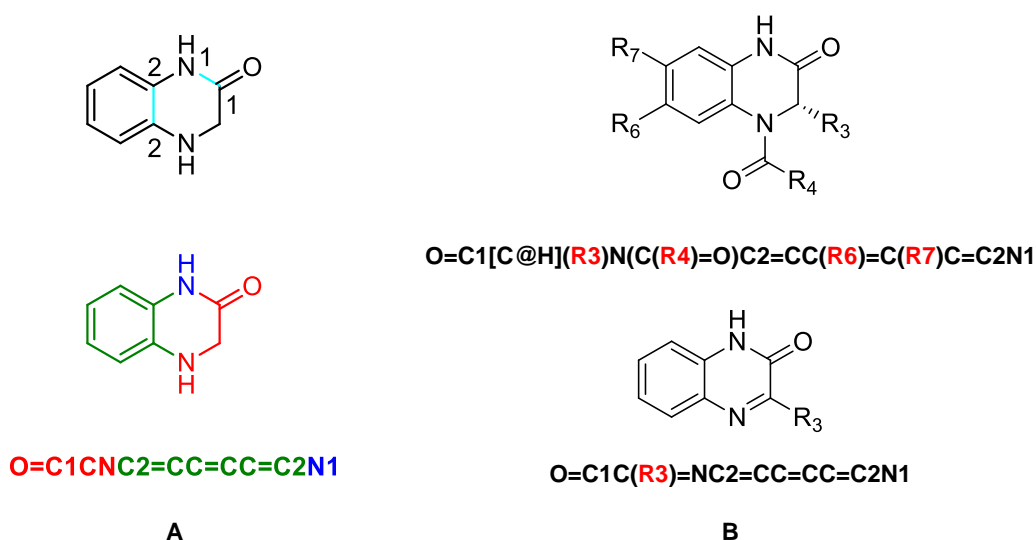
Tabla 2.4 Sustituyentes para N4

		R4	
metil	pent-3-in-1-il	3,3-dimetil-pentil	4-cloro-2-butenil
etil	pent-4-in-1-il	2,2-dimetil-pentil	4-fluor-2-butenil
propil	1-metil-2-en-	2-propen-1-il	3-fenil-propil
butil	2-ciclopropil-etil	2-buten-1-il	bencil
pentil	ciclopentil	3-buten-1-il	2-amino-1-etil
hexil	isopropil	2-metil-3-buten-1-il	2-ciano-1-etil
heptil	2-butil	(Z)-penta-2,4-dien-1-il	fenacil1-il
octil	isobutil	3-ciclopenten-1-il	4-metoxi-fenacil
nonil	terbutil	ciclobutil-metil	4-nitro-fenacil
decil	2-pentil	ciclopropil-metil	4-cloro-fenacil
ciclopropil	3-pentil	ciclohexil-metil	4-metil-fenacil
ciclobutil	isopentil	2-cloro-etil	4-bromo-fenacil
ciclopentil	neopentil	3-cloro-propil	4-hidroxi-fenacil
ciclohexil	2-hexil	2-cloro-propil	2-nitro-fenacil
2,4-dien-ciclopentil	3-hexil	4-cloro-butil	2-cloro-fenacil
2,5-dien-ciclohexil	3,3-dimetil-butil	3-cloro-butil	2-metil-fenacil
propen-2-in-1-il	2,2-dimetil-butil	2-trifluorometil-etil	2-metoxi-fenacil
buten-2-in-1-il	2,3-dimetil-butil	3-bromo-propil	benzhidril
buten-3-in-1-il	3,4-dimetil-pentil	4-bromo-butil	2-tienil
penta-2-in-1-il	4,4-dimetil-pentil	3-bromo-butil	2-tienil-metil
formil	isopropiloxicarbonil	fenilacetil	4-cloro-tiofensulfonil
acetil	difluoroacetil	4-metoxi-fenilacetil	tiofensulfonil
propionil	4-metoxybenzoil	4-nitrofenilacetil	1-naftalensulfonil
butanoil	fenilpiruvato	3-cloro-tiofen-2-carbonil	4-amino-benzoil
cloroacetil	2-nitrobenzoil	4-cloro-tiofen-2-carbonil	2-hidroxi-benzoil
3-cloro-propanoil	3-nitrobenzoil	(furan-2-il)-acetil	isonicotinohidracida-N-il
benzoil	4-nitrobenzoil	(3-cloro-furan-2-il)-acetil	3-isopropilurea-1-il
bencensulfonil	2-clorobenzoil	(E)-3-(furan-3-il)acriloil	acetamida-N-il
2-butil-oxi-carbonil	3-clorobenzoil	nicotinato	anilina-N-il
bromoacetil	4-clorobenzoil	isonicotinato	dihidrocinnamoil
2-metil-acriloil	acriloil	4-metil-bencensulfonil	3-metoxi-bencensulfonil
benciloxicarbonil	tiofen-2-carbonil	3-cloro-bencensulfonil	tiofen-3-carbonil

De la combinación de todos los residuos propuestos resultó una quimioteca virtual formada por un total de  $106(R4) \times 6(R3) \times 6(R6) \times 6(R7) \times 2(R/S) = 45.792$  compuestos quinoxalínicos a ser evaluados en la etapa de filtración.

La construcción de la QV fue llevada a cabo mediante combinación de SMILES. Los SMILES son una notación lineal que describe estructuralmente una molécula en términos de conectividad y

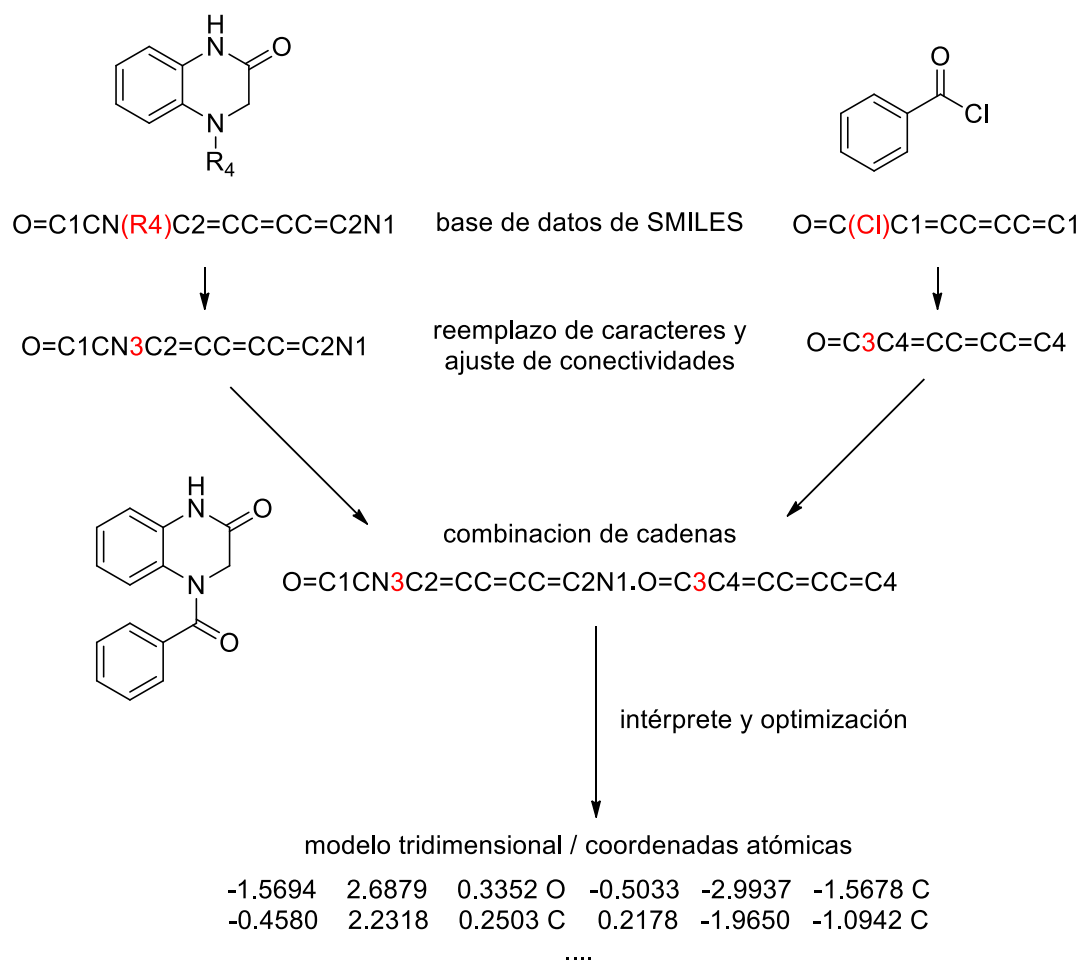
estereoquímica, pero pierde la información tridimensional de la misma. Esta elección se debe a que estas notaciones se pueden manipular como cadenas de texto y los sustituyentes a reemplazar se dan por simple reemplazo de caracteres. En la figura 2.13 se muestran los SMILES tomados como plantilla, correspondientes para las estructuras base propuestas. Nótese que entre paréntesis y corchetes se indican las posiciones R. Reemplazando esa posición por la cadena de caracteres del sustituyente se forma la nueva estructura.



**Figura 2.13** Codificación en SMILES: (A) muestra la descomposición en SIMLES de una quinoxalina y sus conectividades. (B) SMILES de las estructuras base. La letra arroba se utiliza para indicar la estereoquímica del carbono que le antecede.

De este modo se armaron base de datos conteniendo los SMILES de los sustituyentes indicados en la tablas anteriores y con un script se realizó el reemplazo de las posiciones indicadas con la cadena de texto del sustituyente (ejemplo figura 2.14), dando así los SMILE de los compuestos nuevos. Estos fueron procesados por un intérprete de SMILE para generar estructuras tridimensionales, y estas fueron optimizadas por mecánica molecular empleando el campo de fuerzas MMFF94. Al final de éste proceso se obtuvieron los archivos de coordenadas atómicas de los compuestos a cribar.

Como intérprete del script se utilizó el lenguaje PHP ya que este lenguaje de programación tiene muchas herramientas para el procesamiento de texto. Como intérprete de los SMILE se utilizó el programa OpenBabel para generar las coordenadas atómicas de las quinoxalinas. A estas se les optimizó su geometría, quedando disponibles para los experimentos de docking y cálculo de descriptores para el análisis de QSAR3D.



**Figura 2.14** Operatoria con SMILES para generar nuevos compuestos. La cadena final se interpreta a un archivo de coordenadas atómicas y se optimiza su estructura.

### 2.2.3 Filtro de compuestos

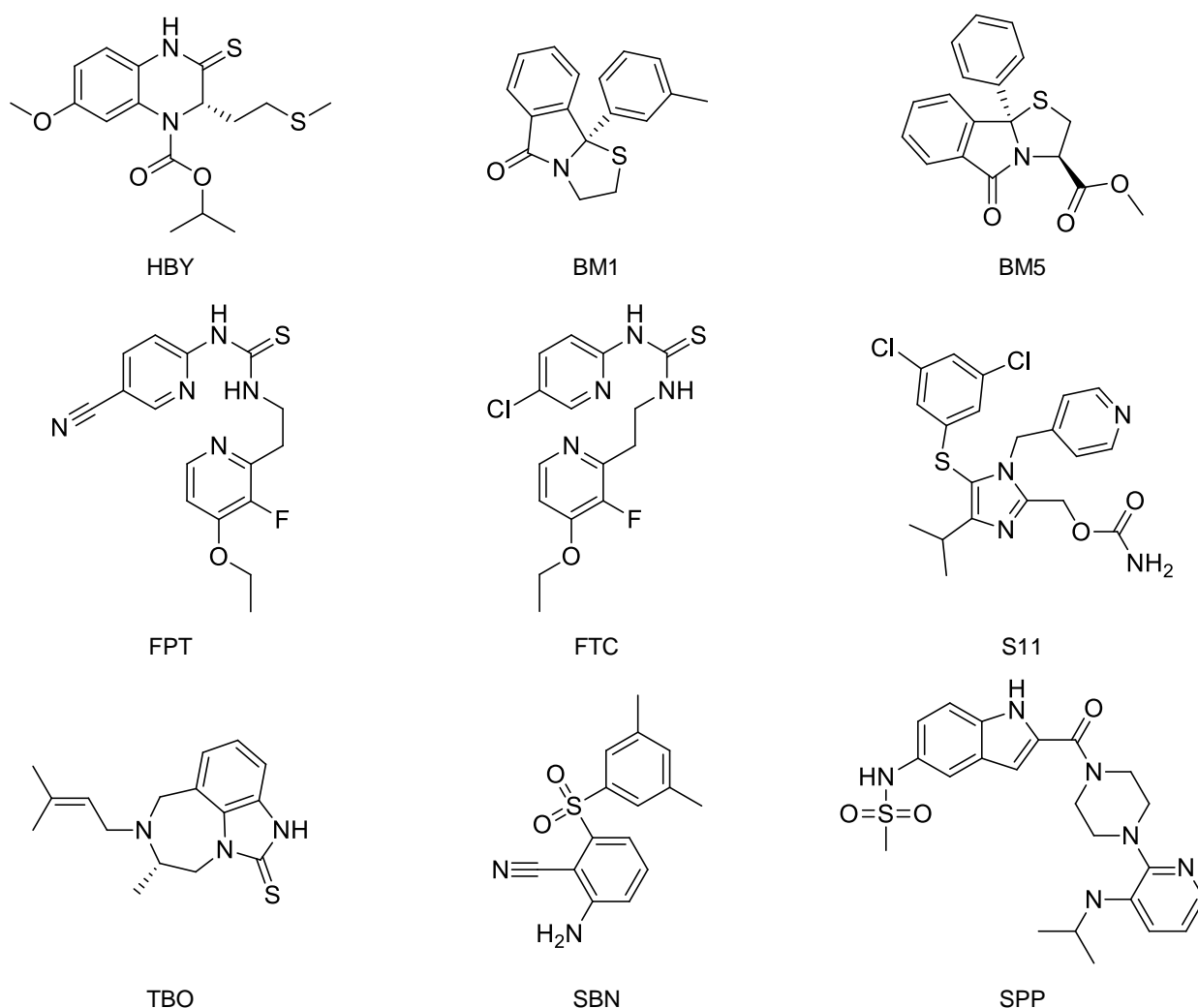
Para el cribado de la QV se planteó realizar una primera selección de estructuras quinoxalínicas a través de estudios de docking, y a partir de los conformeros seleccionados de las mismas mediante dicho estudio, realizar una selección final por cálculo de actividad a través de un modelo de QSAR3D. Estos filtros fueron calibrados y validados a partir de datos de actividad biológica disponibles en bibliografía.

El filtro de docking tiene como objetivo seleccionar aquellas estructuras que arrojen valores de scoring ( $\Delta G$ ) aceptables y generar los conformeros a ser analizados por el QSAR3D. Este último filtro tiene como objetivo predecir la actividad biológica para el conformero de mejor scoring. A partir de estos resultados se definirán los criterios a ser tenidos en cuenta en la definición de los sustituyentes que deberán estar presentes en las quinoxalinas a sintetizar.



**Filtro QSAR3D**

Para calibrar este filtro se han tomado los datos cristalográficos de 32 INNTR (figura 2.15) formando el complejo ligando-TR, de modo que la conformación adoptada por el ligando quedó caracterizada por el descriptor 3D proveniente de dicha estructura. Por otra parte, se han buscado datos bibliográficos de sus correspondientes actividades biológicas con las cuales se realizó el análisis exploratorio de correlación de datos, llegando de ese modo al modelo de QSAR que se utilizó en la predicción de las actividades. El análisis exploratorio se realizó con el programa McQSAR,<sup>135</sup> el cual emplea algoritmo genético para explorar los posibles modelos de correlación. En la tabla 2.5 se encuentran los códigos PDB de las cristalografías utilizadas y las actividades biológicas halladas en la literatura expresadas como el  $\log(1/IC_{50}) = pIC_{50exp}$ , siendo  $IC_{50}$  la concentración molar inhibitoria que produce el 50% de efecto. Dependiendo del ensayo biológico el efecto puede representar la actividad enzimática de TR libre, o referirse a algún experimento que determina la replicación viral.



**Figura 2.15** Estructura de los compuestos INNTR seleccionados de cristalografías.

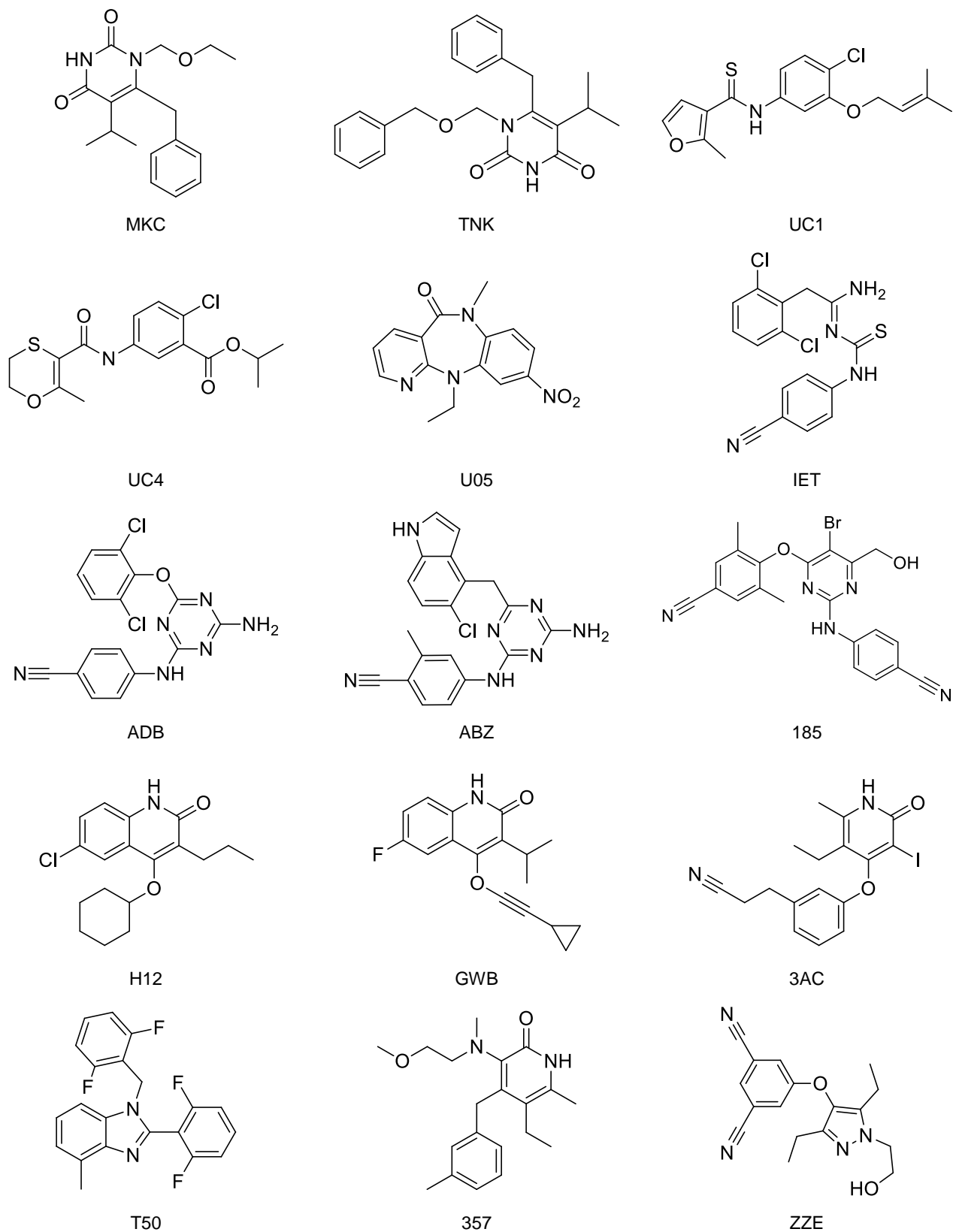
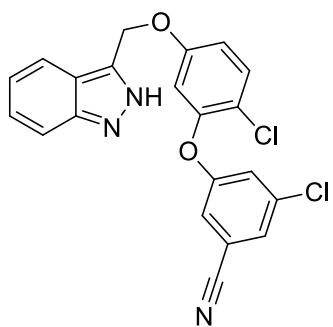
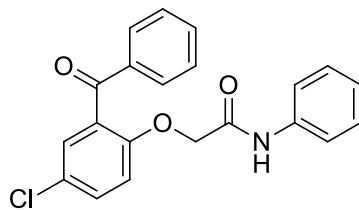


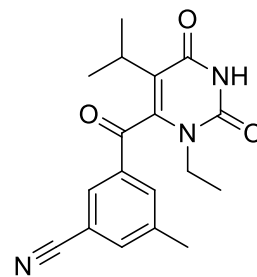
Figura 2.15 Continuación.



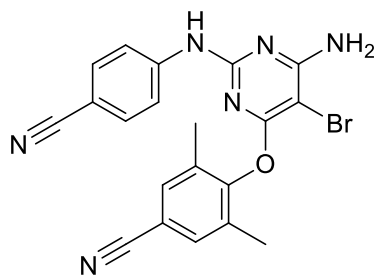
M22



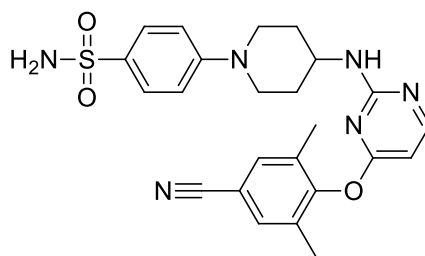
GFA



KRV



65B



JGZ

Figura 2.15 Continuación.

**Tabla 2.5** Valores de los 32 ligandos utilizados de calibración.

PDB	Ligando	pIC <sub>50exp</sub>	Ref	pIC <sub>50cal</sub>	res	Dp	E3m	Dv	E2u
1BQM	HBV	8.22	<sup>129</sup>	8.56	-0.34	1.196	0.535	1.052	0.584
1C0T	BM1	7.29	<sup>136</sup>	6.89	0.40	1.063	0.325	0.993	0.437
1C0U	BM5	6.66	<sup>136</sup>	6.40	0.26	1.027	0.251	0.952	0.422
1DTQ	FPT	8.22	<sup>137</sup>	8.39	-0.17	1.159	0.407	1.238	0.468
1DTT	FTC	8.30	<sup>137</sup>	8.37	-0.07	1.197	0.435	1.195	0.484
1EP4	S11	8.51	<sup>129</sup>	8.45	0.06	1.114	0.648	1.070	0.476
1HNV	TBO	7.85	<sup>138</sup>	7.69	0.16	1.200	0.421	1.111	0.432
1IKW	EFZ	8.15	<sup>139</sup>	8.18	0.04	1.027	0.693	1.007	0.449
1JLQ	SBN	8.16	<sup>140</sup>	8.32	-0.16	1.069	0.541	1.031	0.550
1KLM	SPP	7.67	<sup>141</sup>	8.00	0.09	1.236	0.345	1.179	0.482
1RT1	MKC	8.09	<sup>142</sup>	7.87	0.22	1.194	0.397	1.163	0.437
1RT2	TNK	7.39	<sup>143</sup>	7.31	0.08	1.100	0.356	1.060	0.443
1RT4	UC1	8.05	<sup>144</sup>	8.25	-0.20	1.150	0.751	1.069	0.371
1RT7	UC4	7.38	<sup>129</sup>	7.47	-0.10	1.270	0.242	1.190	0.434
1RTH	U05	6.40	<sup>145</sup>	6.49	-0.09	1.041	0.123	0.966	0.508
1S6P	IET	8.52	<sup>146</sup>	8.23	0.29	1.217	0.475	1.157	0.465
1S9E	ADB	8.51	<sup>147</sup>	7.87	0.66	1.059	0.462	0.987	0.549
1S9G	ABZ	8.52	<sup>148</sup>	8.27	0.25	1.068	0.582	1.030	0.516
1SUQ	185	8.40	<sup>148</sup>	8.82	-0.42	1.065	0.643	1.034	0.583
1TKT	H12	7.52	<sup>149</sup>	7.80	-0.27	1.167	0.474	1.097	0.431
1TKX	GWB	7.54	<sup>149</sup>	7.47	0.07	1.078	0.388	1.011	0.496
1VRT	NVP	7.05	<sup>150</sup>	7.36	-0.32	1.115	0.285	1.038	0.516
2B5J	3AC	9.10	<sup>151</sup>	8.73	0.37	1.336	0.554	1.177	0.497
2B6A	T50	6.30	<sup>151</sup>	6.45	-0.15	0.998	0.266	0.926	0.445
2BAN	357	9.00	<sup>152</sup>	8.54	-0.14	1.210	0.435	1.111	0.591
2OPP	HBQ	6.75	<sup>153</sup>	6.97	-0.22	1.124	0.288	1.056	0.422
2WON	ZZE	6.92	<sup>154</sup>	6.46	-0.26	1.039	0.194	1.031	0.402
3C6U	M22	8.33	<sup>155</sup>	8.39	-0.06	1.326	0.363	1.268	0.470
3DLE	GFA	8.70	<sup>155</sup>	8.49	0.21	1.246	0.462	1.170	0.513
3LAL	KRV	8.21	<sup>156</sup>	8.21	0.00	1.087	0.606	1.025	0.494
3M8P	65B	8.85	<sup>157</sup>	8.76	0.09	1.001	0.757	0.981	0.545
3NBP	JGZ	7.62	<sup>143</sup>	7.89	-0.27	1.069	0.640	1.038	0.398

PDB: Código PDB de la cristalografía del complejo ligando-TR; pIC<sub>50exp</sub>: actividad biológica como el log 1/IC<sub>50</sub> (molar) hallada experimentalmente; pIC<sub>50cal</sub>: actividad biológica como el log 1/IC<sub>50</sub> (molar) calculada con la ecuación 1 de la tabla 3.x; res: residuales experimental-predicción. Ref: Referencia a literatura de la actividad biológica.

Descriptores WHIM: E2u, eta 2 pesado por conectividad, E3m, eta 3 pesado por masa, Dv, global pesado por volumen de Van der Waals; Dp, global pesado por polarizabilidad.

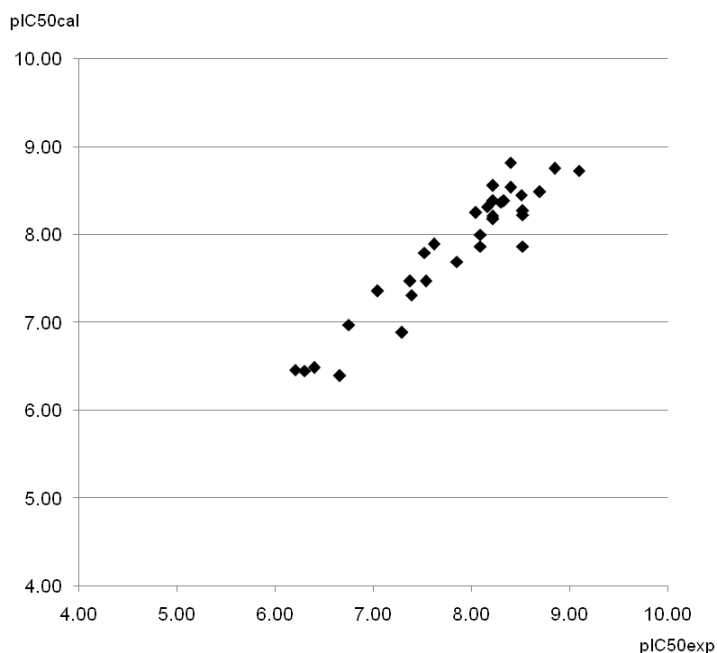
Como resultado en tabla 2.6 se muestran los coeficientes para las 8 ecuaciones lineales simples y multiparamétricas que resultaron más significativas junto a sus estadísticos de regresión, todas ellas incluyen los descriptores WHIM.

**Tabla 2.6** Coeficientes de las ecuaciones más representativas

Ec.	Descriptores				O	n	r	R <sup>2</sup> <sub>corr</sub>	SD	F
	E3m	E2u	Dv	Dp						
1	3.16	4.57	3.96			32	0.94	0.88	0.26	80.37
2	3.28	4.42		3.92		32	0.93	0.85	0.30	61.83
3	3.54		4.20		1.75	32	0.87	0.75	0.40	47.30
4	3.14	4.61			4.26	32	0.80	0.62	0.47	26.98
5	3.48				6.29	32	0.73	0.52	0.53	35.37
6		6.50			4.74	32	0.47	0.20	0.68	8.81
7			4.01		3.54	32	0.45	0.18	0.69	7.72
8				3.64	3.73	32	0.43	0.16	0.70	6.96

O: ordenada al origen; n: número de compuestos; r: coeficiente de regresión de Pearson; R<sup>2</sup><sub>corr</sub>: coeficiente de regresión corregido; SD: desvío estándar; F: prueba de Fisher.

En la tabla 2.5 junto los valores de descriptores de actividad ya mencionados, se incluyen los valores de descriptores WHIM utilizados y la actividad biológica calculada a partir de ellos con la ecuación 1 de la tabla 2.6. En el grafico 2.1 se muestra la correlación entre la actividad pIC50 experimental y pIC50 calculada:



**Grafico 2.1** Correlación entre actividad calculada (pIC50cal) y la experimental (pIC50exp).

En la tabla 2.7 se muestra el ANOVA para la ecuación 1. El fenómeno de multicolinealidad en esta clase de regresiones es indeseable dado que se llegan a ecuaciones con buenos estadísticas, pero con una pobre capacidad de predicción. Por eso, para asegurarnos de la ortogonalidad de los descriptores hemos realizado un análisis de correlación entre estos descriptores WHIM empleando los calculados para las 32 estructuras de la tabla 2.5 a los que se adicionaron otros 40 ligandos, extraídos también de cristalografías de complejos ligando-TR (tabla 2.8).

**Tabla 2.7** Análisis de la varianza

	Df	SS	MS	F	$\alpha F$
Regresión	3.00	16.49	5.50	80.37	$7.17 \times 10^{-14}$
Residual	28.00	1.91	0.07		
Total	31.00	18.40			

**Tabla 2.8** Correlación de descriptores

	wE3.m	wE2.u	wD.v	wD.p
wE3.m	1			
wE2.u	0.20822	1		
wD.v	-0.02824	-0.06773	1	
wD.p	-0.05723	0.017419	0.892076	1

A partir de estos resultados, fue seleccionada la ecuación 1 de la tabla 2.6, dado que es la que presentó los mejores estadísticos de validación y mínima multicolinealidad entre sus descriptores. Esta ecuación se utilizó luego en el análisis de los resultados de docking, para seleccionar las quinoxalinas candidatas a ser sintetizadas.

### Filtro docking

Nuestro método de docking se calibró en base a las 32 macromoléculas utilizadas en la calibración del QSAR3D. Inicialmente se planteó que el método pueda predecir correctamente la conformación de los ligandos, con lo cual se realizó un análisis de docking cruzado (cross-docking). Este tiene como objetivo estudiar empleando docking la variación conformacional de los ligandos (normalmente proveniente de una cristalografía), a lo largo de varias macromoléculas. Esto da idea de cómo se comporta estructuralmente el ligando y cuál o cuáles son aquellas macromoléculas con mejor valor predictivo para el método empleado, y las consideraciones a ser tenidas en cuenta al seleccionar los parámetros del programa (parámetros del algoritmo de búsqueda, criterios de aceptación y residuos flexibles).

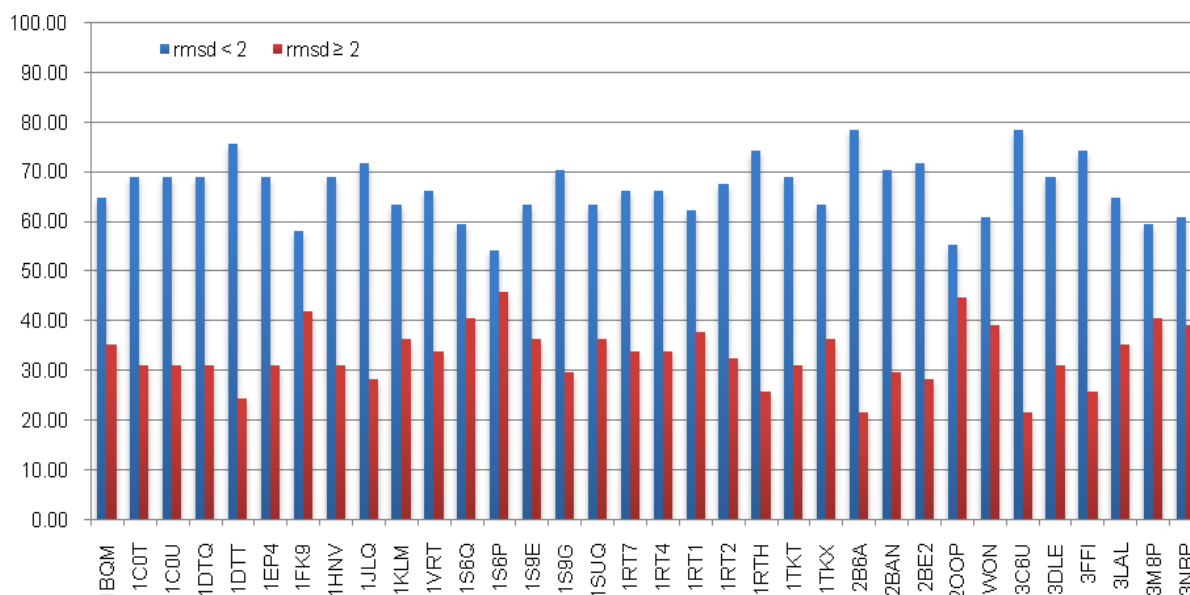
Para eso, con el fin de aumentar la variabilidad estructural enfocados en el ligando, se adicionaron 40 estructuras de ligandos de otras cristalografías de complejos INNTR-TR. Así entonces en el

experimento de cross-docking se evaluaron un total 72 estructuras de ligandos con geometría conocida, sobre las 32 macromoléculas previamente seleccionadas. La forma en que se evaluó el grado de “predicción” fue mediante el cálculo de RMSD entre la pose obtenida por docking y la natural extraída de la cristalografía. El cálculo de RMSD consiste en calcular las diferencias de las posiciones de los átomos en el espacio sobre una estructura utilizada como plantilla (en este caso las 72 poses obtenidas de las cristalografías), de modo similar al desvío estándar sobre un set de datos, su expresión es:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n ((v_{ix} - w_{ix})^2 + (v_{iy} - w_{iy})^2 + (v_{iz} - w_{iz})^2)}$$

Donde v y w son un par de átomos i, y los subíndices x, y, z indican la dirección en esos respectivos ejes.

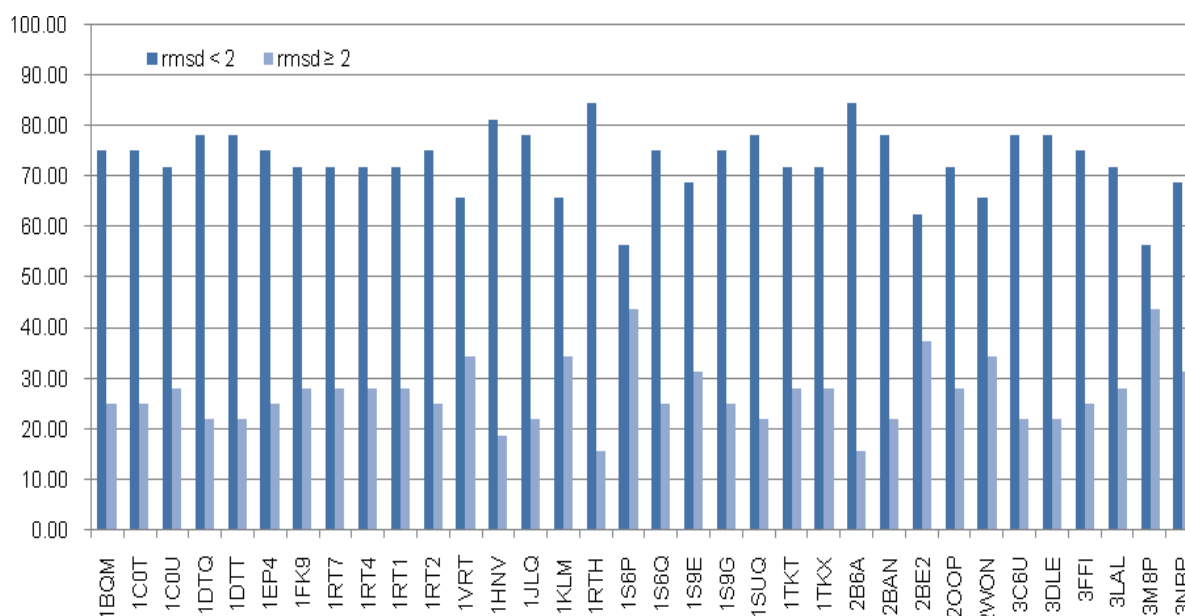
El criterio para seleccionar la pose más adecuada en el análisis de RMSD se basó en tomar aquella pose con el valor de función de scoring ( $\Delta G_{unión}$ ) más bajo. En el gráfico 2.2 se muestra un histograma donde se representan 2 grupos de datos: en azul el porcentaje de ligandos que sus poses fueron predichas con  $RMSD < 2$  y en rojo aquellos ligandos con  $RMSD \geq 2$ . Consideramos aquellos valores superiores a 2 como una mala predicción. El eje de ordenadas indica el porcentaje de ligandos (sobre 72) que cumplen los RMSD citados y en las abscisas el código PDB de la macromolécula utilizada.



**Grafico 2.2** Porcentaje de predicción de las poses de 72 ligandos agrupados por RMSD. Azul: porcentaje de poses halladas con  $RMSD < 2$ ; Rojo porcentaje de poses halladas con  $RMSD > 2$ .

De este análisis se pudo observar que para el método de docking propuesto, las estructuras 3C6U ( $RMSD < 2 = 78.4\%$  y  $RMSD \geq 2 = 21.6\%$ ) y 2B6A ( $RMSD < 2 = 78.4\%$  y  $RMSD \geq 2 = 21.6\%$ ) son las que mejor predicen la pose de los ligandos. Analizando el RMSD para el grupo de 32 ligandos usados en el QSAR, se observó que la estructura 2B6A es la que mejor predice la pose

(84% de los ligandos, grafico 2.3), y dado que la diferencia de resolución entre proteínas no es muy significativa (2.65 Å y 2.7 Å respectivamente), fue seleccionada como plantilla generadora de confórmeros y filtro de docking.



**Grafico 2.3** Porcentaje de predicción de las poses de 32 ligandos de calibración agrupados por RMSD. Azul oscuro: porcentaje de poses halladas con RMSD < 2; Azul claro: porcentaje de poses halladas con RMSD > 2.

Finalmente como criterio de primer filtrado de la QV se propuso utilizar la mediana estadística calculada a partir de los  $\Delta G_{\text{unión}}$  para las poses de menor energía, obteniéndose un valor de  $\Delta G_{\text{dock}} = -8.0$  kcal/mol. Luego estas poses serán analizadas por QSAR3D.

## Validación

Para validar el método, además de emplear los 32 compuestos usados para calibrar el QSAR3D, fueron colectados datos de otros 27 compuestos (figura 2.16) con actividad INNTR de los que no se conocen sus estructuras cristalográficas, y para las cuales se optimizó su geometría empleando métodos computacionales.



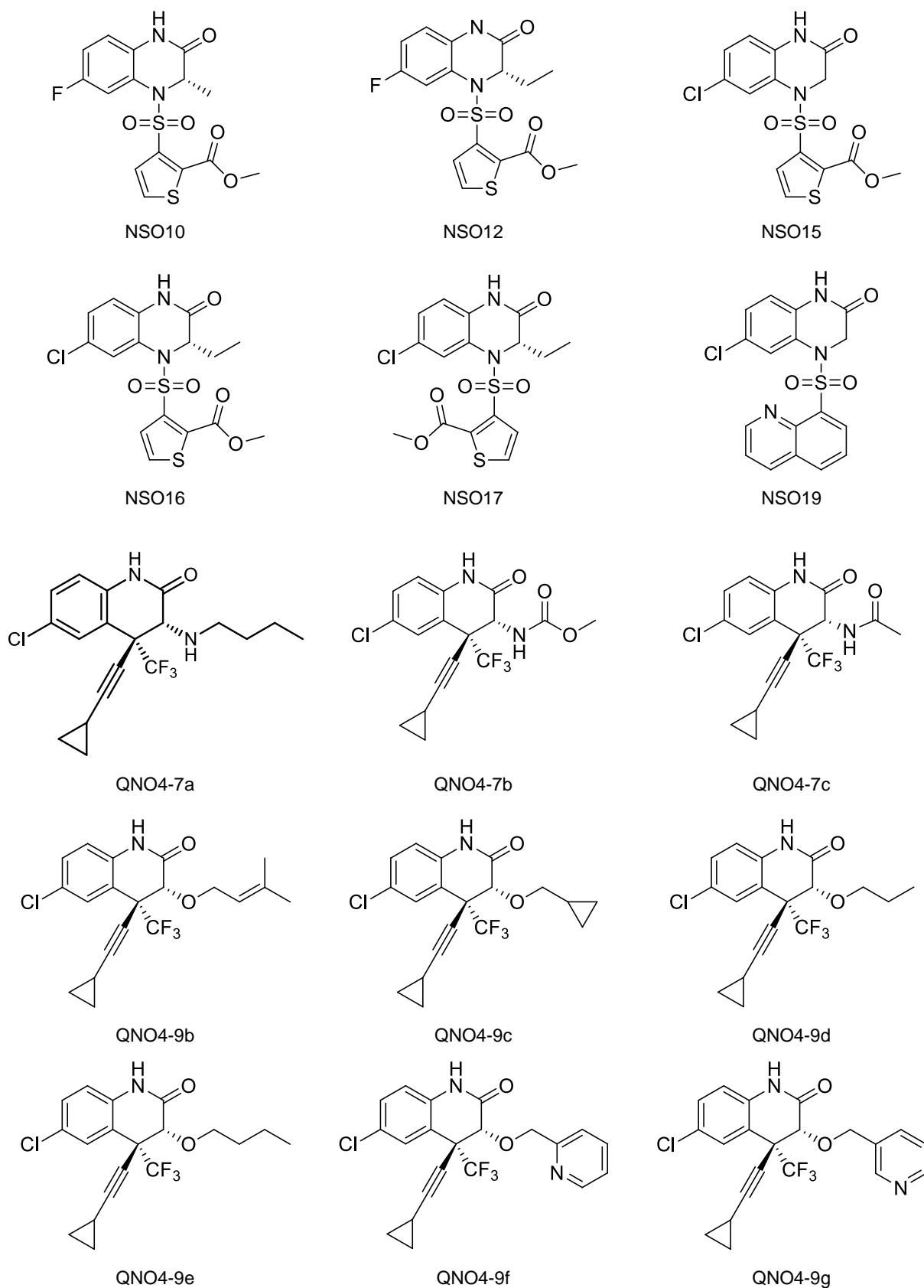


Figura 2.16 Estructura de los 28 INNTR sin estructura cristalográfica ligando-TR determinada.

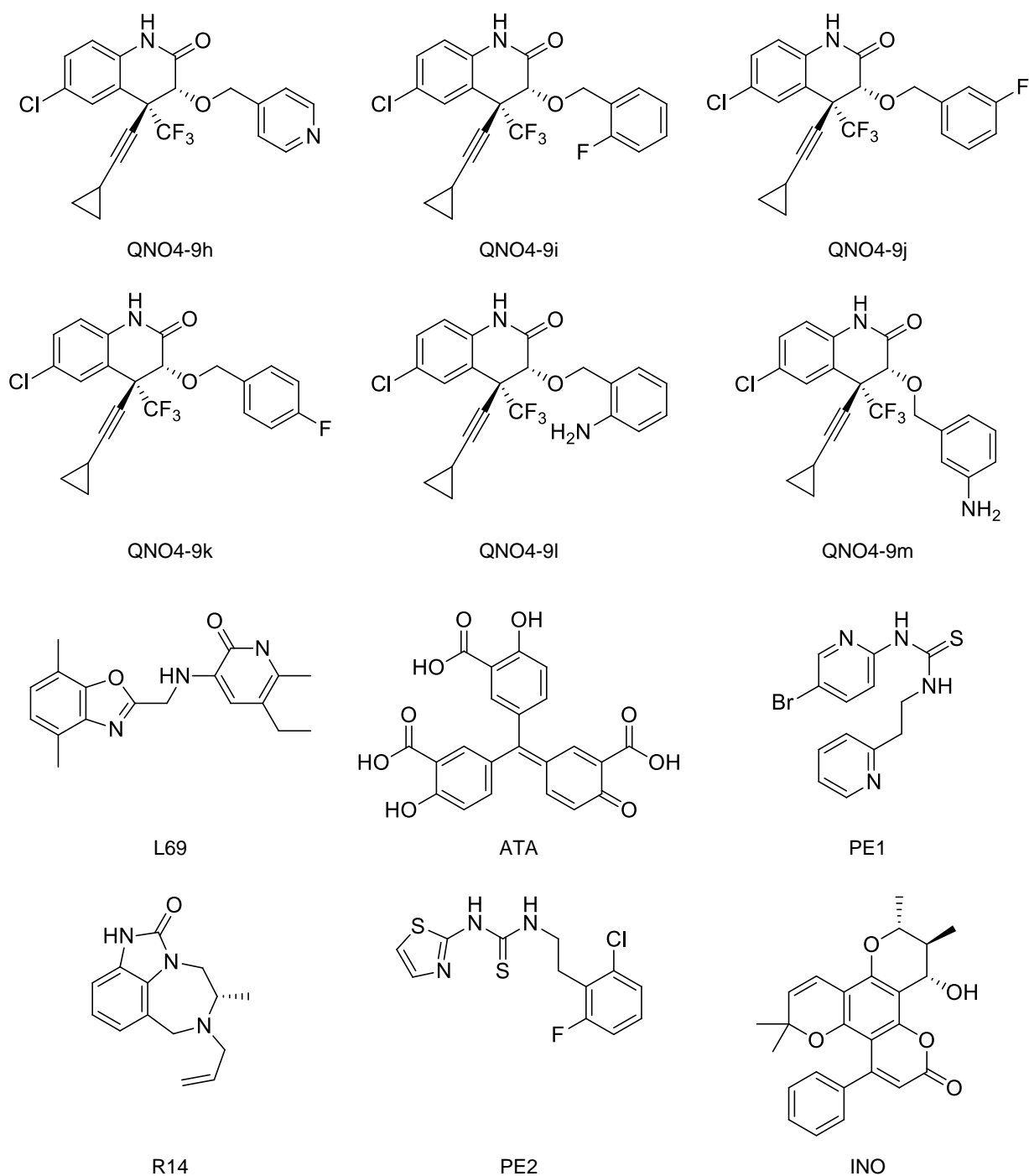


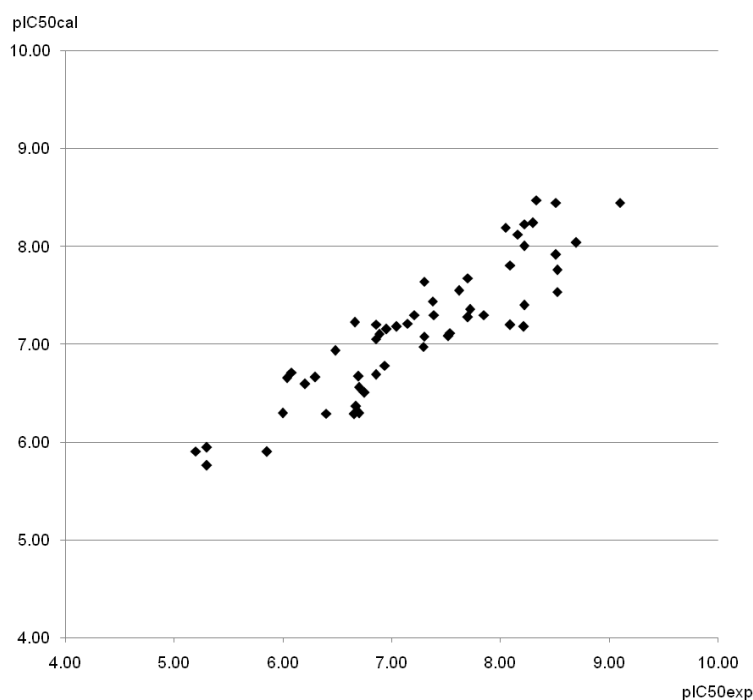
Figura 2.16 Continuación.

Por otro lado, las 32 estructuras utilizadas en la calibración fueron tratadas con el fin de perder el sesgo de la conformación inicial en el experimento de docking. Para eso a las mismas se les buscó, por el método de búsqueda conformacional sistemática del paquete Hyperchem, conformaciones que optimizadas difirieran por lo menos en un RMSD > 2.5 respecto a la estructura inicial.

Finalmente se procedió a la predicción de la actividad de un set total de 58 estructuras o ligandos de prueba, siguiendo la siguiente metodología:

1) Filtro docking: Se generaron las conformaciones de los 58 ligandos de prueba por medio de docking, empleando la macromolécula 2B6A, y se controló que el  $\Delta G_{unión}$  para la mejor pose fuera inferior a -8.0 en que unidades. Todos los ligandos cumplieron con este requisito.

2) Filtro QSAR3D: A partir de las conformaciones obtenidas en el paso anterior, se calcularon las actividades biológicas de los ligandos por medio de la ecuación 1 de la tabla 2.6. En la tabla 2.9 se resumen los valores de los resultados. En el gráfico 2.4 se muestra la correlación entre la actividad biológica experimental y la hallada con éste método.



**Grafico 2.4** Correlación entre actividad calculada ( $pIC_{50cal}$ ) y la experimental ( $pIC_{50exp}$ ).

**Tabla 2.9** Correlación de descriptores

Ligando	$\Delta G_{dock}$	$pIC_{50exp}$	Ref	$pIC_{50cal}$	res	Dp	E3m	Dv	E2u
HBY	-8.50	8.22	129	7.40	0.82	1.325	0.152	1.139	0.527
BM1	-13.00	7.29	136	6.98	0.31	1.096	0.314	0.985	0.456
BM5	-12.10	6.66	136	6.29	0.37	0.988	0.326	0.862	0.403
FPT	-8.50	8.22	137	8.23	-0.01	1.332	0.333	1.189	0.541
FTC	-8.70	8.30	137	8.24	0.06	1.450	0.180	1.267	0.581
S11	-10.60	8.51	129	8.45	0.06	1.299	0.438	1.198	0.507
TBO	-11.00	7.85	138	7.30	0.55	1.330	0.097	1.185	0.504
EFZ	-12.00	8.22	139	8.00	0.22	1.034	0.540	1.086	0.437
SBN	-11.60	8.16	140	8.12	0.04	1.087	0.476	1.037	0.549
SPP	-10.60	8.09	141	7.81	0.28	1.304	0.150	1.255	0.517
MKC	-11.00	8.09	142	7.20	0.89	1.184	0.174	1.106	0.496
TNK	-11.40	7.39	143	7.30	0.09	1.208	0.173	1.157	0.475

UC1	-10.70	8.05	144	8.20	-0.15	1.376	0.382	1.197	0.492
UC4	-9.80	7.38	129	7.44	-0.06	1.214	0.216	1.157	0.475
U05	-10.10	6.40	145	6.29	0.11	1.010	0.109	0.921	0.503
IET	-10.40	8.52	146	7.54	0.98	1.304	0.194	1.219	0.459
ABZ	-11.50	8.52	148	7.76	0.76	1.126	0.311	1.057	0.566
H12	-12.20	7.52	149	7.08	0.44	1.232	0.188	1.136	0.436
GWB	-11.50	7.54	149	7.11	0.42	1.126	0.148	1.064	0.532
NVP	-11.10	7.05	150	7.18	-0.14	1.137	0.240	1.034	0.510
3AC	-11.20	9.10	151	8.45	0.65	1.536	0.230	1.416	0.462
T50	-14.90	6.30	151	6.66	-0.36	1.011	0.328	0.905	0.447
HBQ	-10.11	6.75	153	6.51	0.24	1.149	0.119	1.051	0.431
ZZE	-8.80	6.20	154	6.59	-0.39	1.099	0.116	1.029	0.471
M22	-11.50	8.33	155	8.47	-0.14	1.338	0.366	1.280	0.493
GFA	-12.50	8.70	155	8.04	0.66	1.176	0.346	1.106	0.562
KRV	-10.60	8.21	156	7.18	1.03	1.155	0.162	1.079	0.525
JGZ	-11.00	7.62	143	7.55	0.07	1.279	0.129	1.244	0.485
L69	-11.60	7.30	129	7.64	-0.34	1.274	0.167	1.158	0.554
ATA	-11.70	5.30	129	5.76	-0.46	0.837	0.127	0.902	0.392
PE1	-8.90	7.70	129	7.68	0.02	1.336	0.083	1.272	0.521
PE2	-9.20	7.30	129	7.08	0.22	1.275	0.138	1.158	0.451
INO	-10.10	5.85	129	5.90	-0.05	1.004	0.063	0.900	0.468
NSO19	-12.10	6.48	158	6.93	-0.45	1.024	0.231	0.994	0.496
NSO17	-9.30	5.20	158	5.91	-0.71	1.027	0.173	0.935	0.362
NSO16	-9.00	6.70	158	6.56	0.14	1.131	0.116	1.043	0.451
NSO15	-8.80	6.08	158	6.71	-0.63	1.048	0.190	1.012	0.460
NSO12	-9.40	5.30	158	5.95	-0.65	0.997	0.190	0.928	0.366
NSO10	-9.00	6.70	158	6.30	0.40	0.973	0.101	0.946	0.488
QNO4-7c	-8.90	6.04	159	6.66	-0.62	0.988	0.388	0.933	0.380
QNO4-7a	-9.70	6.66	159	7.22	-0.56	1.080	0.410	0.997	0.433
QNO4-9m	-10.70	6.86	159	7.20	-0.34	1.128	0.366	1.032	0.429
QNO4-9k	-10.80	6.95	159	7.16	-0.20	1.114	0.334	1.034	0.439
QNO4-9b	-10.30	6.00	159	6.30	-0.30	1.012	0.383	0.933	0.305
QNO4-9f	-10.40	6.85	159	7.06	-0.20	1.088	0.359	1.005	0.425
QNO4-9c	-8.90	6.89	159	7.10	-0.22	1.059	0.415	0.974	0.423
QNO4-9d	-9.80	7.21	159	7.30	-0.09	1.088	0.425	1.000	0.437
QNO4-9e	-10.00	7.15	159	7.21	-0.06	1.090	0.407	1.001	0.430
QNO4-9j	-10.70	6.70	159	6.67	0.02	1.081	0.326	1.003	0.365
QNO4-9l	-10.60	6.94	159	6.78	0.15	1.122	0.348	1.019	0.361
QNO4-9i	-10.80	6.85	159	6.69	0.17	1.081	0.340	0.999	0.363
QNO4-9h	-10.30	7.72	159	7.36	0.37	1.147	0.361	1.053	0.447
QNO4-7b	-10.40	6.67	159	6.36	0.31	0.940	0.391	0.885	0.356
QNO4-9g	-8.90	7.70	159	7.28	0.42	1.111	0.365	1.032	0.446

357*	-12.30	8.40	<sup>152</sup>	6.63	1.77	1.141	0.162	1.060	0.420
185*	-10.30	8.40	<sup>148</sup>	6.63	1.77	1.049	0.039	1.000	0.557
65B*	-10.50	8.85	<sup>157</sup>	6.41	2.44	1.011	0.043	0.969	0.533
ADB*	-10.50	8.52	<sup>147</sup>	7.19	1.33	1.219	0.197	1.128	0.460

\* Estos compuestos no fueron incluidos en el gráfico 2.4 de correlación ya que fueron considerados *outliers* o casos fuera de correlación.

A partir de estos resultados pudo concluirse que el método predice de forma aceptable la potencialidad del ligando como INNTR.

#### 2.2.4 Cribado de la quimioteca virtual

Este se realizó utilizando la misma metodología que se describió en la validación del método. Inicialmente se realizó el experimento de docking, seleccionado la conformación de más bajo  $\Delta G_{\text{dock}}$ . Luego esta fue evaluada por medio de la ecuación 1, de la tabla 2.6 obteniéndose el valor de la actividad estimada para cada quinoxalina de la QV. En la tabla 2.10 se muestra los valores hallados con el criterio de filtración:

**Tabla 2.10** Quinoxalinas seleccionadas de la QV

Compuesto	$\Delta G_{\text{dock}}$	pIC50cal	E3m	Dv	E2u	Dp
1	-11.7	6.19	0.060	0.897	0.533	0.985
2	-8.5	6.21	0.136	0.952	0.439	1.042
3	-8.2	5.79	0.063	0.882	0.458	0.967
4	-9.3	8.14	0.372	1.118	0.552	1.219
5	-9.1	8.00	0.401	1.004	0.600	1.115
6	-10.6	8.57	0.400	1.220	0.540	1.180
7	-10.4	7.24	0.212	1.100	0.482	1.193
8	-10.6	6.49	0.102	1.058	0.430	1.169
9	-8.3	8.01	0.330	1.111	0.560	1.143
10	-10.5	6.27	0.071	1.041	0.420	1.195
11	-8.9	5.89	0.088	0.897	0.448	1.015
12	-8.9	6.52	0.146	1.048	0.416	1.175
13	-11.4	7.18	0.216	1.165	0.409	1.289
14	-10.0	7.02	0.245	1.048	0.458	1.150
15	-11.6	7.33	0.331	1.107	0.414	1.205
16	-9.8	7.34	0.274	1.120	0.444	1.217
17	-10.2	7.01	0.148	0.989	0.573	1.027
18	-11.2	5.10	0.002	0.694	0.512	0.781
19	-9.6	5.34	0.037	0.811	0.440	0.918
20	-9.3	5.41	0.052	0.849	0.410	0.941
21	-10.8	5.92	0.041	0.878	0.504	0.972
22	-10.2	6.60	0.230	0.934	0.475	0.954
23	-10.9	8.14	0.175	1.220	0.601	1.207
24	-10.5	7.39	0.221	1.049	0.553	1.106
25	-9.4	7.21	0.099	1.086	0.566	1.168

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el empleo de planilla de cálculo. A partir del mismo y teniendo en cuenta el objetivo de la presente Tesis, respecto a la síntesis de compuestos quinoxalínicos potencialmente inhibidores de la TR, en la figura 2.17 se muestran las estructura de aquellos seleccionados en base a su posible actividad, estimada por el QSAR3D, y la factibilidad de su síntesis.

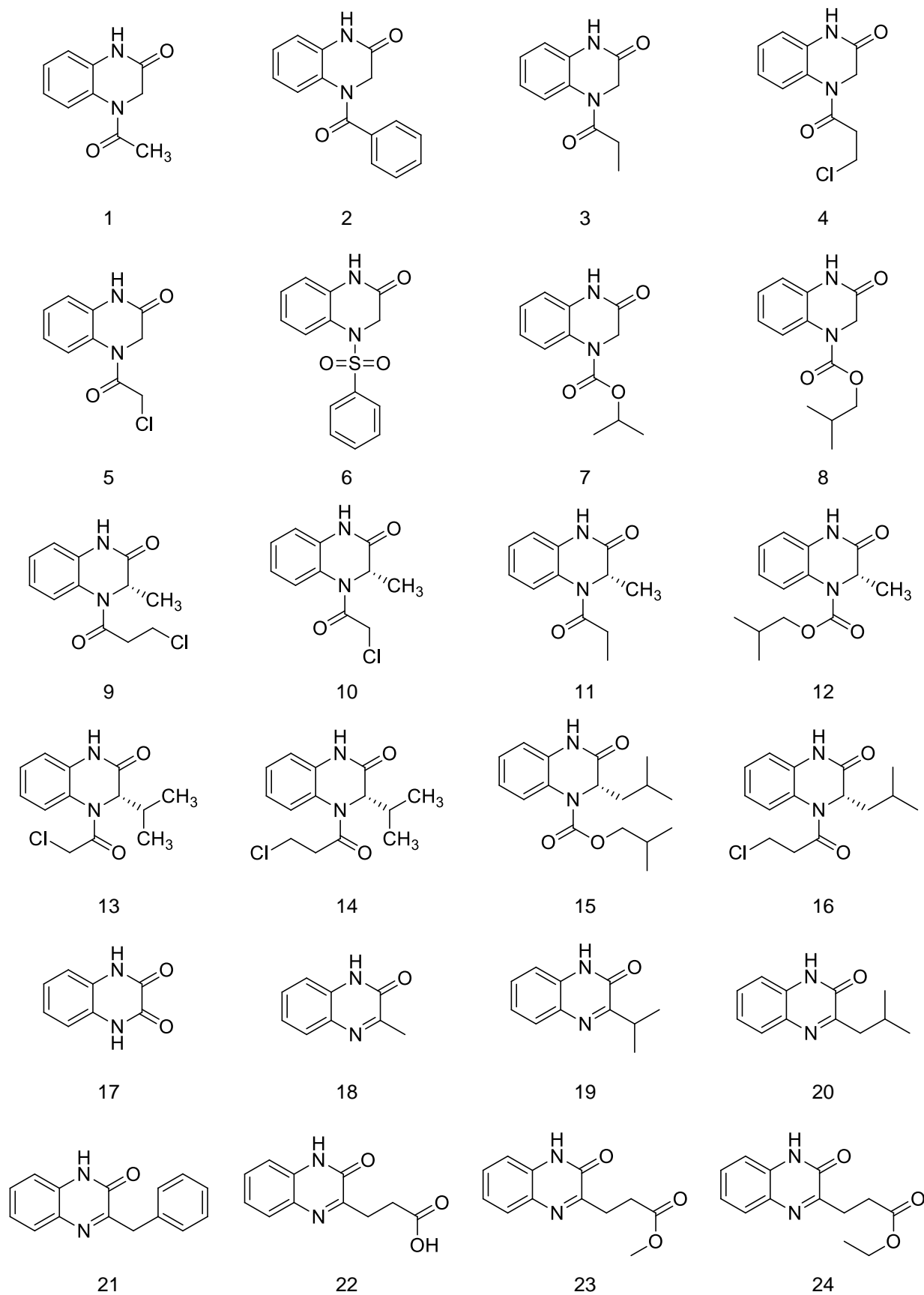


Figura 2.17 Quinoxalinas seleccionadas a partir QV como inhibidores de la TR.

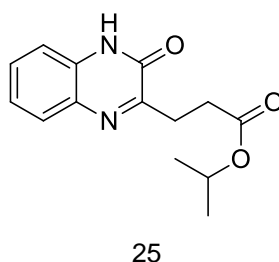


Figura 2.17 Continuación.

### 3 Inhibidores de CP

#### 3.1 Aspectos estructurales

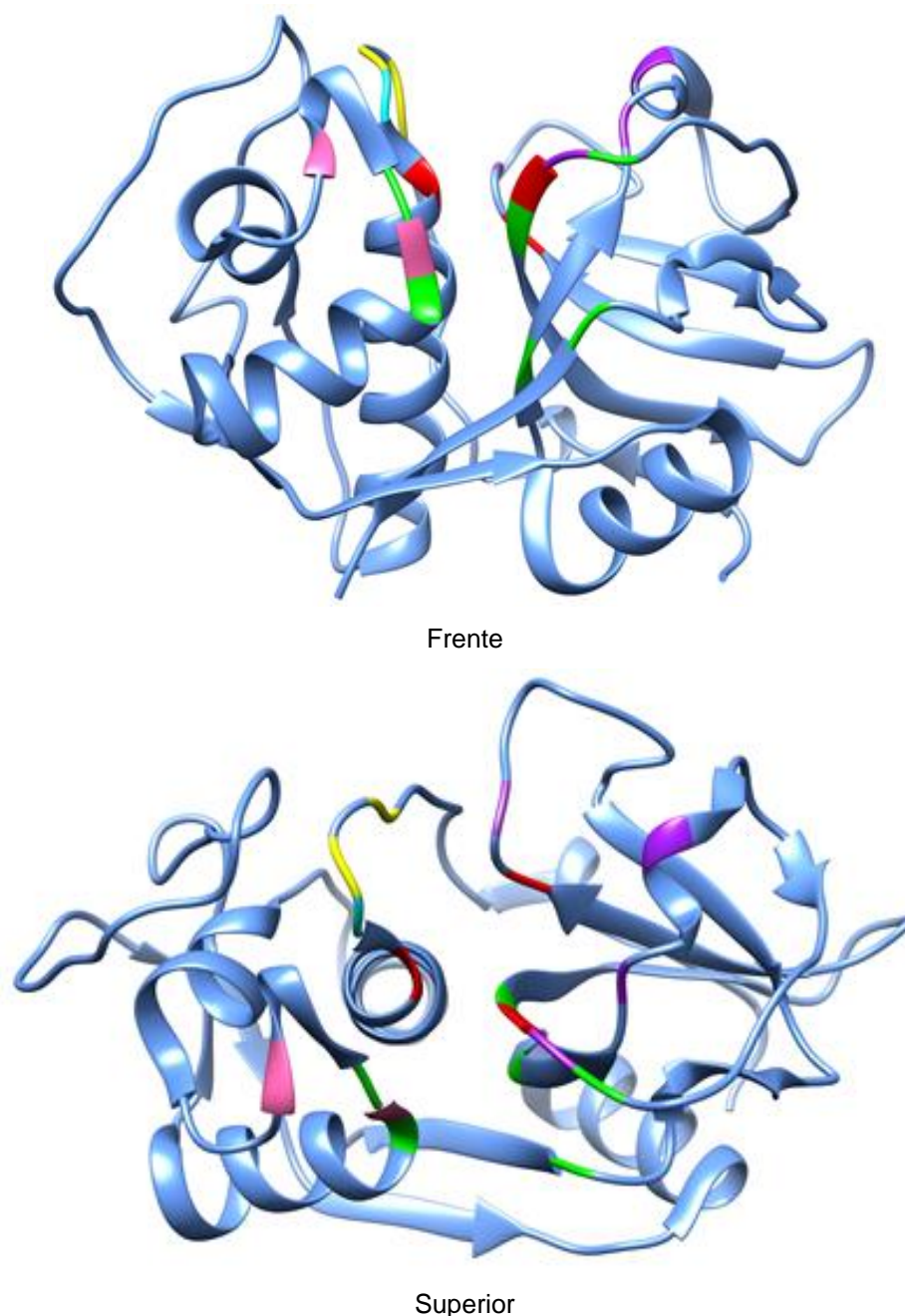
La Cruzipaína, la principal cisteín proteasa presente en todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* es una endopeptidasa que, al igual que otras enzimas de esta clase, une el sustrato en una conformación extendida ubicándose las cadenas laterales del mismo en subsitios de unión localizados en el sitio activo de la proteína. Según la convención adoptada por Scheffer y Berger<sup>160</sup> para identificar los residuos del sustrato y los subsitios de la enzima, se designa P a residuos presente en el sustrato y S refiere a los correspondiente subsitios de la enzima. Los residuos identificados como “prima” (P') están ubicados hacia el extremo C-terminal del enlace peptídico, mientras que los residuos “no prima” se ubican en el extremo N-terminal.

La enzima es estable en un rango de pH entre 4.0 y 9.0,<sup>161, 162</sup> pero su actividad frente a un sustrato es muy dependiente del pH. Por ejemplo, la hidrólisis de seroalbúmina bovina (BSA) es óptima a pH 4.0, mientras que para la azocaseína la máxima actividad se observa a pH 5.0.<sup>161</sup> CP es capaz de hidrolizar sustratos que contienen tanto residuos básicos como hidrófobicos en posición P2 mostrando preferencia por arginina y fenilalanina, un rasgo que comparte con la catepsina B (CATB) presente en mamíferos. Ha sido descrito que a pH 6.0 la preferencia de CP por fenilalanina es sólo de un 15 % mientras que a menor pH la selectividad aumenta notablemente. Este fenómeno se relaciona con el estado de protonación de un residuo de glutamato presente en el sitio S2 de la enzima y que sería el responsable de su especificidad característica.<sup>163</sup>

La Cruzipaína (CP) es sintetizada como una preproenzima de 467 aminoácidos que después de la remoción autoproteolítica del extremo N-terminal da lugar a la enzima madura: esta es una glicoproteína rica en manosa (PM 40 Kd, incluyendo dos residuos de manosa), presentando tres sitios de glicosilación sobre residuos de asparagina, dos en el dominio catalítico y uno en el extremo carboxilo terminal.<sup>164</sup> Consta de una única cadena polipeptídica que posee un dominio catalítico de 215 aminoácidos y un domino C-terminal de 130 aminoácidos que es característico de las cisteín proteasas de tripanosomatídeos. Si bien la función de este domino no ha sido



determinada, cabe destacar que el mismo es altamente inmunogénico.<sup>165, 166</sup> Ha sido descrito que después de la infección, los anticuerpos del hospedador se unen al extremo C-terminal de CP sin alterar las propiedades catalíticas de la enzima.<sup>165</sup> La remoción de éste dominio C-terminal da lugar a la Cruzaína que es sólo la unidad catalítica, y la que utilizaremos como unidad estructural de estudio. En la figura 2.18 se muestra en representación de cintas la estructura cristalográfica de la Cruzaína:



**Figura 2.18** Representación en cintas de la Cruzaína. Los subsitios S están coloreados según: sitio catalítico Rojo. S1 Celeste (G 23); S2 Verde (GLY 66, MET 68, GLU 205, ALA 131, GLY 160, LEU 157); S3 Rosa (SER 61, LEU 67); S1' Violeta (TRP 117, ASP 158, ALA 136, MET 142); S2' Amarillo (CYS 22, GLY 20, GLN 19).

La especificidad de los distintos subsitios de CP ha sido ampliamente estudiada y se ha observado que S1' presenta una notoria especificidad por agrupamientos aromáticos en P1', definida principalmente por la presencia del residuo de TRP 177.<sup>167</sup> Los sitios S1 y S3 presentan especificidad por agrupamientos básicos.

La especificidad del sitio S2' no es clara, pero el residuo de GLN 19 presente en el mismo juega un rol fundamental en la estabilización del oxianión formado durante la catálisis (figura 2.19).<sup>168</sup> Se ha visto que el sitio S2 es el principal determinante de la especificidad de esta enzima. Este subsitio es capaz de unir tanto residuos hidrofóbicos como básicos debido al comportamiento del residuo de GLU 205. Este residuo, cargado negativamente a pH fisiológico, es capaz de adoptar una conformación orientada hacia el sustrato cuando el mismo presenta agrupamientos básicos en P2, con los que establece interacciones electrostáticas. Cuando P2 sustenta agrupamientos hidrofóbicos GLU 205 adopta una conformación orientada hacia el disolvente. Este comportamiento también explica la mayor selectividad de la enzima por sustratos hidrofóbicos a pH ácido debido al estado de protonación de GLU 205.<sup>163</sup>

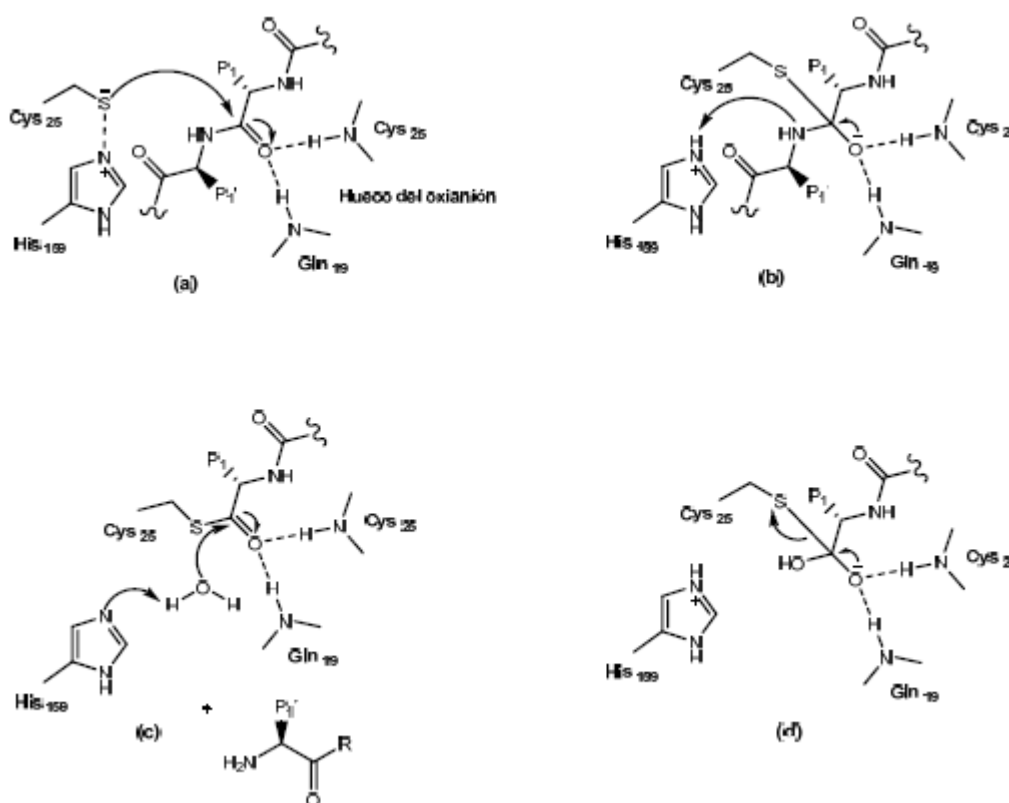


Figura 2.19 Proceso catalítico de la CP.

La flexibilidad del bolsillo S2 de CP y de otras cisteína proteasas parasitarias diferencia a estas enzimas de las homólogas humanas CATL y CATS, las cuales carecen de un residuo de GLU 205, aunque en esa posición presentan los residuos MET y PHE, respectivamente. En la homóloga humana CATB, la posición equivalente a GLU 205 es reemplazada por un residuo de

ASP (cumpliendo un rol análogo a GLU 205). Teniendo en cuenta esto, el diseño de compuestos que puedan interactuar con GLU 205 resulta fundamental a la hora de generar inhibidores específicos de las enzimas parasitarias.

El análisis del alineamiento de las secuencias del dominio catalítico de distintas enzimas homólogas a CP muestra que esta presenta un 70 % de homología con la principal cisteína proteasa de *T. brucei* y un 58 % de identidad con la proteasa análoga de *Leishmania major*. La identidad de secuencia con las catepsinas humanas es de 42 % con CATL, 37 % con CATS y 19 % con CATB.

### 3.2 Diseño de inhibidores de CP

---

A diferencia de los INNTR, para hallar inhibidores de cruzipaína no se encuentra suficiente información cristalográfica de complejos ligandos-CP que permitan seguir el mismo criterio de análisis empleado en el diseño de aquellos. Si bien la mayoría de los compuestos que han demostrado actividad inhibitoria de la CP tiene rasgos estructurales propios de peptidomiméticos, en la introducción de ésta tesis se hizo referencia a compuestos quinoxalínicos que poseen esta actividad.

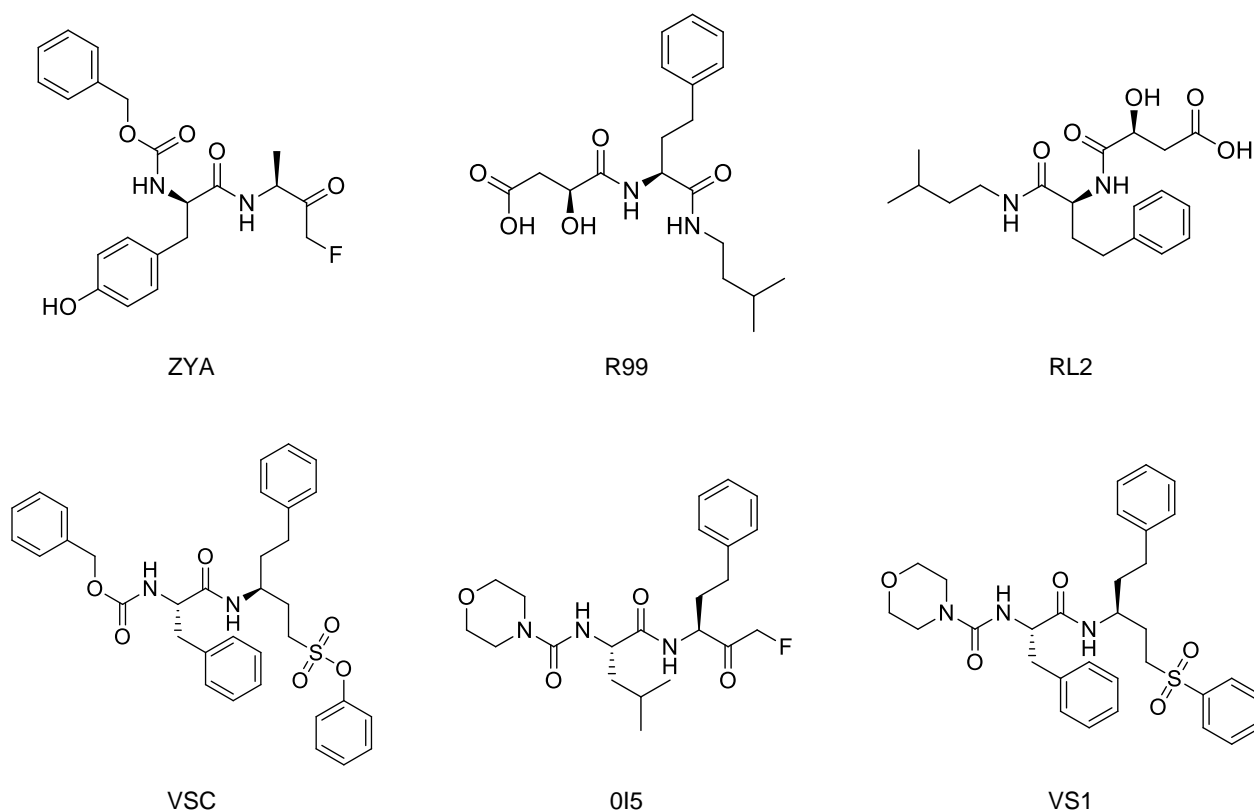
Mediante el empleo de análisis cristalográfico y dinámica molecular se ha estudiado un sitio adyacente a S2 (AS2) que ha sido propuesto como blanco para el desarrollo de nuevos compuestos inhibidores de cruzipaína.<sup>169</sup> La propuesta fue entonces estudiar estructuras quinoxalínicas en relación al sitio AS2, en la búsqueda de motivos estructurales para el diseño *de novo* de compuestos inhibidores.

AS2 se trata de una zona comprendida por los aminoácidos GLU 112, ASN 69, LEU67, GLU 205, MET 68 y SER 207, donde los juegos GLU 112 - ASN 69 y LEU 67 - GLU 205 forman una especie de “doble puerta”. El comportamiento de éste sistemas de puertas fue previamente estudiado por simulación de DM<sup>169</sup> determinado que en una trayectoria de 100 ns el 82.5% del tiempo, la proteína se encontraba en su forma cerrada, un 6.9% en su forma semi-abierta y un 3.6% totalmente abierta, quedando caracterizadas del siguiente modo: a) Puerta 1: cuando la distancia entre el átomo de carbono y de LEU 67 y el átomo de carbono  $\delta$  de GLU 205 es mayor a 6.25 Å se considera abierta (con una media de 7.6 Å, hallándose de esta forma el 70% de la simulación) y menor cerrada (con una media de 5.4 Å); b) Puerta 2: cuando la distancia entre el átomo de carbono  $\delta$  de GLU 112 y el átomo de nitrógeno del amino lateral de ASN 69 es mayor a 4.5 Å (con una media de 6.5 Å) es considerada abierta y menor (con una media de 3.7 Å) cerrada. La puerta A es sensible a la presencia de ligando en la el sitio S2, obligándola a permanecer abierta. De forma muy general se ha determinado que este sitio adyacente a S2 puede tener buena

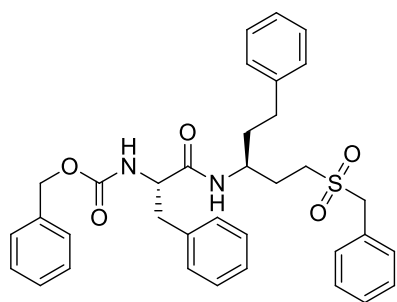
afinidad con anillos aromáticos, cadenas alquílicas y grupos oxidrilos (por puente de hidrógeno con GLU 205 y GLU 112).<sup>169</sup>

En relación a estos datos se decidió estudiar la posible interacción de quinoxalinas con AS2, empleando el método de docking para hallar los modos de unión más importantes. Luego por el método de dinámica molecular MMPBSA estimar los valores de  $\Delta G_{\text{unión}}$ .

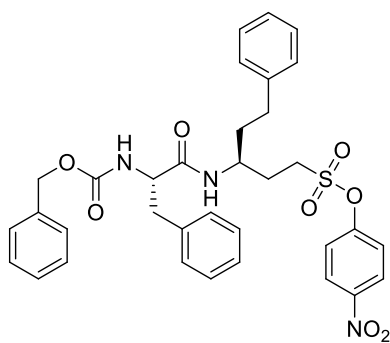
Si bien el sitio en estudio no está localizado directamente en el propio sitio catalítico, se ha probado la capacidad de predicción del Autodock realizando un cross-docking entre 19 ligandos extraídos del PDB (figura 2.20), sobre una estructura de partida obtenida por cristalografía de la cruzaina con código de PDB 1ME4. Es de destacar que como 16 de ellos se hallaban unidos de forma covalente a la cruzaina, se prepararon para el estudio de docking con mapa covalente (consiste en asignarle un potencial de la forma  $k(r-r_0)^2$  en un punto del espacio a un átomo del ligando); para el caso se utilizó el átomo de azufre de la CYS 25 unido covalentemente al ligando, como átomo parte del ligando, al cual se le aplicó el potencial citado. Esta consideración tiene el inconveniente que se sesga la búsqueda conformacional hacia un grupo posible de conformaciones. En la tabla 2.11 se muestran los RMSD de la mejor pose con respecto a su conformación de cristalografía.



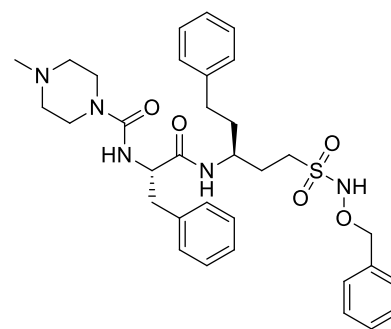
**Figura 2.20** Estructura de los 19 inhibidores de cruzaina tomados de las cristalografías indicadas en tabla 2.11



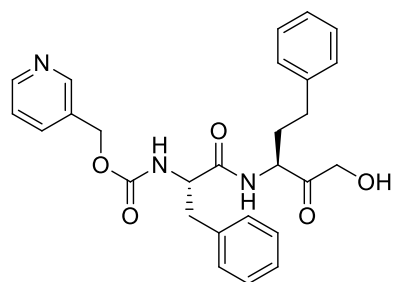
VS2



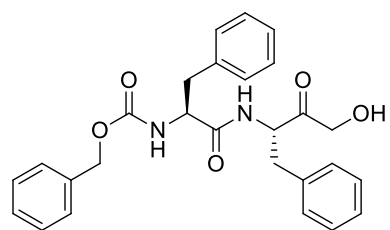
VS3



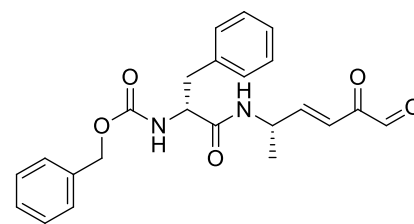
VS4



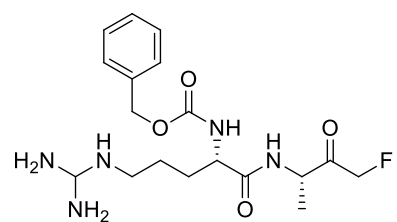
P10



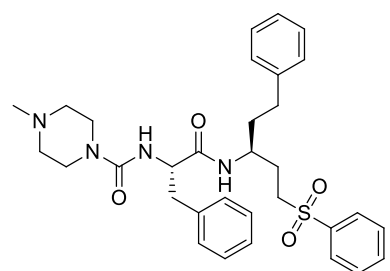
T10



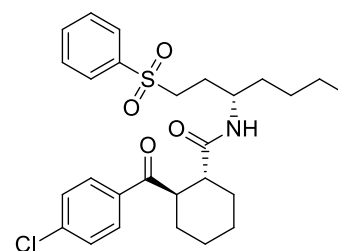
186



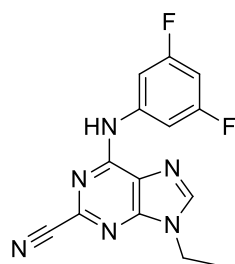
ZRA



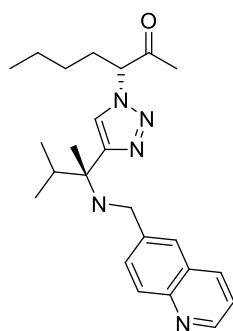
D1R



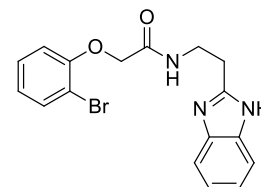
25B



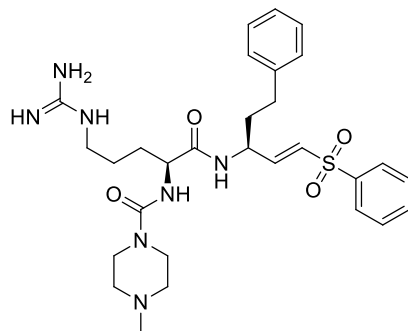
QL2



KB2



B95



4MC

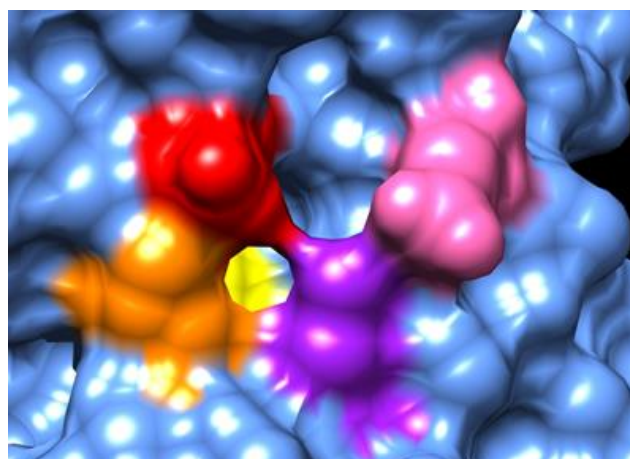
Figura 2.20 Continuación.

**Tabla 2.11** Estructuras y resultados del Cross-Docking. En gris se indican los ligandos que no forma unión covalente con CYS 25

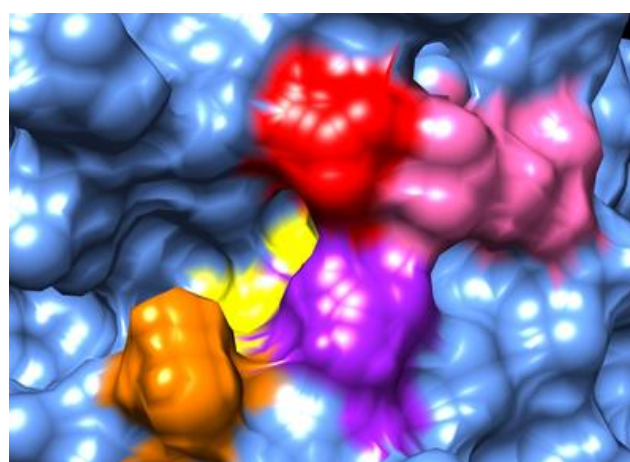
PDB	Ligando	$\Delta G_{\text{dock}}$	RMSD
1AIM	ZYA	-5.13	2.35
1EWL	R99	-3.54	1.26
1EWM	RL2	-4.23	1.87
1EWO	VSC	-5.77	1.80
1EWP	0I5	-5.34	1.12
1F29	VS1	-9.91	1.98
1F2A	VS2	-6.88	1.95
1F2B	VS3	-5.18	2.97
1F2C	VS4	-6.56	2.85
1ME3	P10	-5.43	1.96
1ME4	T10	-7.85	1.96
1U9Q	186	-6.74	1.38
2AIM	ZRA	-5.68	1.64
2OZ2	D1R	-8.43	2.66
3HD3	25B	-8.31	0.98
3I06	QL2	-6.56	4.98
3IUT	KB2	-7.55	2.80
3KKU	B95	-8.26	3.58
3LXS	4MC	-8.87	2.20

A partir de estos resultados y dado que para los ligandos no unidos covalentemente, T10 (1ME4) y P10 (1ME3) la predicción de la pose fue dentro de lo aceptable ( $\text{RMSD} < 2$ ), se prosiguió con el uso Autodock.

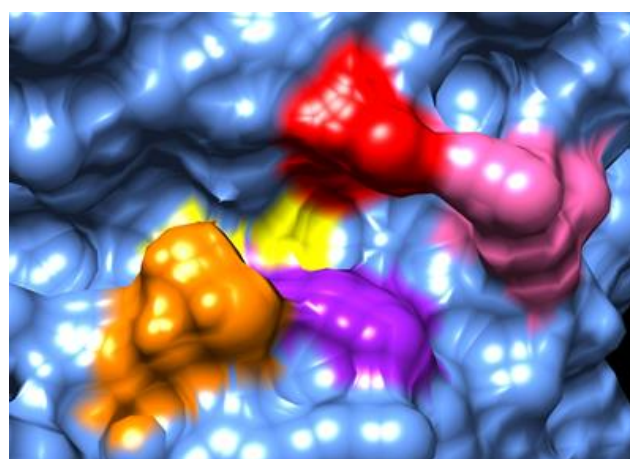
Inicialmente, para poder estudiar el sitio adyacente, fue necesario generar los confórmeros de la cruzaina con las puertas A y B abiertas. Para eso se realizó una simulación de DM de 30 ns con el fin de seleccionar un juego de conformaciones para un posterior experimento de docking y análisis de interacción por el método de dinámica molecular MM-PBSA. Se partió entonces de la estructura cristalografía 1ME4, la cual ya ha sido utilizada en esta clase de simulaciones y es una de las estructuras con mejor resolución de su tipo (1.20 Å). La misma se preparó para el campo de fuerzas AMBER, considerando su estado de protonación a pH 5.5 (y puentes disulfuro). Como resultado se tomaron 5 conformaciones con la puerta 1 abierta y 5 con 1-2 puertas abiertas para el experimento de docking. En la figura 2.21 se muestran las conformaciones cerradas y abiertas de 1-2 obtenidas por simulación de DM.



1 y 2 en forma cerrada



1 en forma abierta y 2 en forma cerrada



1 y 2 en forma abierta

**Figura 2.21** Conformaciones de las puertas 1 y 2, la clave de colores indican: MET 68, amarillo; Puerta 1: LEU 67, naranja; GLU 205, rojo; Puerta 2: ASN 69, violeta; GLU 112, rosa.

El experimento de docking se realizó con las diez estructuras quinoxalínicas indicadas en la figura 2.22, teniendo en cuenta que la mayoría de ellas serían sintetizadas como potenciales agentes INNTR y algunas, tales como los compuestos **tQNX1** y **tQNX2** son sus intermediarios sintéticos.

Como criterio para seleccionar la mejor pose de los resultados de docking, se estableció tomar aquella pose que cumpliera dos requisitos: (1) con mejor scoring a través todas las conformaciones (2) que represente al mayor grupo de conformaciones con RMSD < 2.

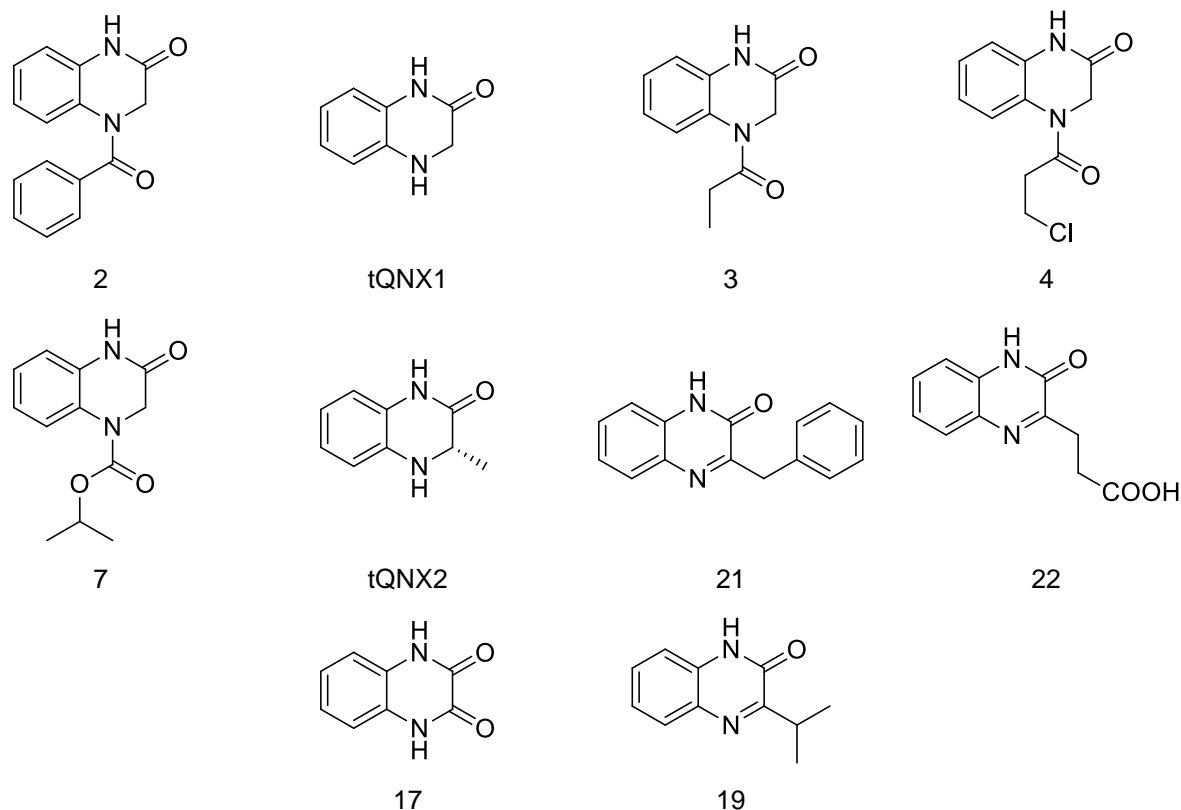


Figura 2.22 Quinoxalinas utilizadas en el análisis por MM-PBSA.

Luego, a partir de las poses así obtenidas se prepararon los complejos quinoxalina-cruzaína para estimar los valores  $\Delta G_{\text{unión}}$  por medio del método MM-PBSA. En la tabla 2.12 se muestran los resultados de los  $\Delta G_{\text{unión}}$  obtenidos.

Tabla 2.12 Resultados de docking y MM-PBSA.

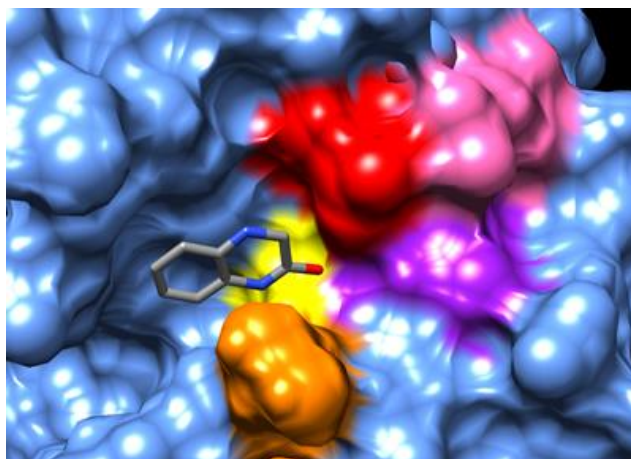
Quinoxalina	$\Delta G_{\text{dock}}^*$	$\Delta G_{\text{MM-PBSA}}$
2	-4.8	-5.83
tQNX1	-4.6	-8.33
3	-4.9	-2.31
4	-5.2	-3.57
7	-5.1	-2.98
tQNX2	-4.9	-6.31
21	-6.3	- <sup>a</sup>
22	-5.4	- <sup>a</sup>
17	-4.9	- <sup>a</sup>
19	-4.9	- <sup>a</sup>

\* El  $\Delta G_{\text{dock}}$  corresponde al valor hallado más bajo y al grupo de conformaciones más alto. <sup>a</sup> El ligando se desprendió de su sitio de unión durante el equilibrado

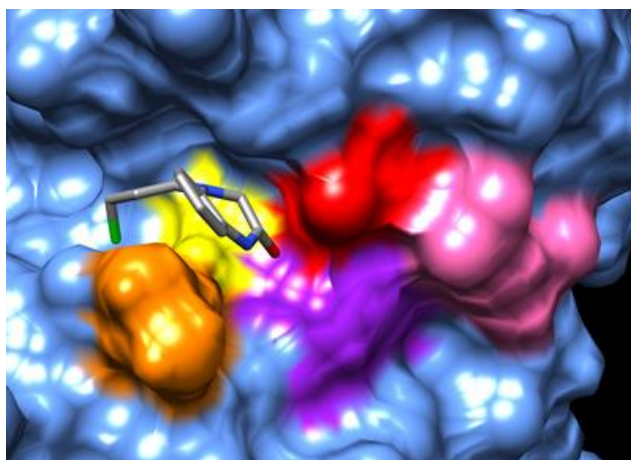


En base a estos resultados fueron inspeccionadas las conformaciones de los ligandos obtenidos a través de la dinámica, y se pudo observar que:

- Para todas las selecciones del docking, durante la etapa de minimización y equilibrado de los complejos quinoxalina-cruzaína se cierra la puerta B, quedando el ligando confinado entre S2 y la puerta 1.
- El grupo carbonilo en C2, presente en los compuestos **2**, **3**, **4**, **7**, **17**, **tQNX1** y **tQNX2** forma puente de hidrógeno con el resto GLU 205 de la enzima (ejemplo compuestos **tQNX1** y **4** de la figura 2.23), estabilizando a la quinoxalina entre la puerta y S2.
- Los compuestos **19**, **21** y **22** proyectan el residuo presente en el C3 hacia S2 y la interacción con GLU 205 (ejemplo compuesto **21** de la figura 2.23), formando solamente puentes de H con las moléculas de agua adyacentes.

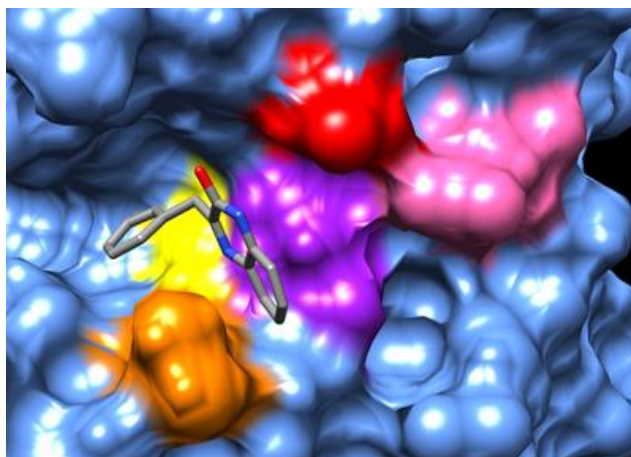


Compuesto tQNX1



Compuesto 4

**Figura 2.23** Representación gráfica de las quinoxalinas tQNX1, 4, 21 en el sitio de unión luego de 1 ns de simulación..



Compuesto 21

Figura 2.23 Continuación.

- Las quinoxalinas **tQNX1**, **tQNX2** y **17**, tienen orientaciones distintas a las *N4* sustituidas, ubicando el grupo *N4* por fuera de la proteína (el H de *N4* forma puente de H con las aguas del entorno durante la simulación) mientras que las sustituidas en *N4* proyectan el sustituyente hacia *S2*, orientando el anillo bencénico de la quinoxalina hacia afuera de la proteína (ejemplo estructuras 3 y 5 de la figura 2.23).
- En base a lo observado para el compuesto **tQNX1**, sustituciones en C7 con grupos alquílicos o fenil-alquílicos serían adecuadas para estabilizar el ligando a través de interacciones con *S2*, mientras el anillo de pirazina debería poseer grupos básicos y/o formadores de puente de hidrógeno.

## 4 Conclusiones

### Inhibidores no nucleosídicos de la TR

Se llevó a cabo la construcción de una quimioteca virtual aprovechando la facilidad que ofrece la notación SMILES de una estructura química en relación al manejo informático de la misma. Esta notación permite reducir la estructura a una cadena de caracteres que lleva información de conectividad y estereoquímica, pero no de coordenadas atómicas. Inicialmente se preparó una base de datos de sustituyentes en notación SMILES, para luego ser combinados sobre las plantillas de quinoxalinas indicadas en figura 2.12, siendo las mismas también escritas en la misma notación. El proceso se llevó a cabo con un script, como se mostró en la figura 2.14, llegando finalmente a la quimioteca virtual de quinoxalinas.

En el protocolo de filtración de la QV se emplearon dos aproximaciones para analizar los compuestos provenientes de la quimioteca virtual. Primero, por medio de docking se seleccionaron los compuestos que dieron valores de  $\Delta G < -8.0$  y se generaron las conformaciones de quinoxalinas que luego fueron analizadas por QSAR3D. Ambas metodologías son sensibles a la conformación de los compuestos y fueron previamente calibradas con estructuras de conformación conocida provenientes de cristalografías de complejos de unión ligando-TR. El QSAR3D se calibró de forma tal que permitió estimar la actividad biológica de las quinoxalinas, la cual se utilizó como criterio final de selección. Finalmente los resultados se analizaron por planilla de cálculo, seleccionando aquellas quinoxalinas de mejor actividad biológica y accesible sintéticamente.

### Diseño de inhibidores de la CP

La propuesta para estudiar compuestos que logren ser antichagásicos a través de la inhibición de la CP debió ser distinta a los protocolos estudiados anteriormente para TR, dado que no se disponen de suficientes datos de compuestos activos (con cristalografía) para realizar un análisis de QSAR3D, y solo el estudio de docking podría ser insuficiente para evaluar la potencialidad de un compuesto. Sin embargo a través de un protocolo de diseño *de novo* utilizando docking y analizando la interacción por una técnica de simulación como MMPBSA fue posible estudiar la interacción de fragmentos quinoxalínicos en un sitio adyacente al catalítico de la cruzaina, con el fin de identificar algunos requerimientos estructurales. Las quinoxalinas utilizadas para éste estudio resultaron ser parte de las seleccionadas previamente en la QV y sus síntesis ya estaba identificada durante el desarrollo del estudio teórico.

Sobre los compuestos quinoxalínicos seleccionados en este capítulo se estudiarán las vías de síntesis, y caracterizarán sus estructuras en el capítulo III.

## 5 Metodología

Las optimizaciones de geometría de los ligandos que se utilizaron en los experimentos de docking se realizaron empleando el campo de fuerzas MMFF94, por gradientes conjugados, con criterios de convergencia del gradiente inferior a  $1 \times 10^{-6}$  ó máximo 5000 iteraciones.

En los casos donde se requirió muestrear otras conformaciones de los ligandos se utilizó el método de búsqueda sistemática, incluido en el programa Hyperchem 8 (opción *Conformational Search*), y las geometrías obtenidas fueron optimizadas por AM1 con criterio de convergencia inferior a 0.001 o máximo 1000 iteraciones.

Los descriptores para el análisis de QSAR se calcularon con el programa PaDEL 2.32<sup>170</sup> a partir de las geometrías optimizadas de los ligandos.

El análisis exploratorio para el hallazgo del modelo de QSAR se llevó a cabo con el programa McQSAR (Multiconformational QSAR).<sup>135</sup> Este programa produce de forma aleatoria juegos de ecuaciones de correlación estructura-actividad, sobre las cuales, mediante un algoritmo genético, selecciona aquellas con mejor correlación por regresión lineal simple. Sobre las mejores ecuaciones seleccionadas por McQSAR se continuaron los análisis estadísticos empleando planilla de cálculo.

Para la obtención de cargas RESP utilizadas en las simulaciones clásicas de dinámica molecular, las optimizaciones de geometría y los cálculos se realizaron por el método de estructura electrónica Hartree-Fock con bases 6-31G\*, empleando el programa Gaussian 03. El resto de los parámetros de los ligandos fueron obtenidos del campo de fuerzas GAFF (General AMBER force field), empleando el programa Antechamber.

Las simulaciones clásicas de DM fueron realizadas utilizando el campo de fuerzas de AMBER ff99 y ejecutadas con el programa NAMD 2.4. Las proteínas fueron solvatadas con una caja de agua explícita descrita con el potencial TIP3P, de forma tal de que entre la superficie de la proteína y los extremos de la caja existieran aproximadamente 10 Å. Se utilizó el termostato de Langevin y condiciones periódicas de contorno en todos los casos. Los sistemas se inicializaron del siguiente modo: se comenzó con 5000 pasos para el sistema completo, continuando con un tiempo de paso (dt) de 1 fs en el que se hicieron 2 etapas de termalización (con una rampa de 0 a 300 K durante 300 ps), primero con la proteína fija durante 300 ps, para relajar las moléculas de agua, seguida por otros 300 ps donde se fijaron solamente los átomos de carbonos  $\alpha$  (CA) de la misma por último se equilibró el sistema completo, libre de restricciones, durante 3 ns. Finalmente se corrieron producciones de 30 ns para la obtención de conformaciones. Para el cálculo de energía libre por MM-PBSA se simulaban los complejos ligando-cruzaína y los términos termodinámicos se calcularon con el script MMPBSA.py del paquete AMBER.

En los casos en los que se necesitó un estado de protonación determinado para las proteínas se utilizó el predictor H<sup>+</sup>, disponible de forma on-line a través de: <http://biophysics.cs.vt.edu/>

Las imágenes y el análisis visual de los datos y resultados se realizaron con los programas UCSF-Chimera 1.9 y VMD 1.9.1.

Los scripts para el manejo de coordenadas atómicas y archivos en general fueron escritos para los intérpretes de comando BASH o PowerShell, dependiendo del sistema operativo en el que se realizó el manejo de archivos o datos.

Para el procesado de datos y acceso a base de datos se utilizaron los intérpretes de script PHP y Java, los cuales se utilizaron de acuerdo a la prestación de sus funciones *built-in* (incorporadas al lenguaje del programa).

## Síntesis de Quinoxalinas

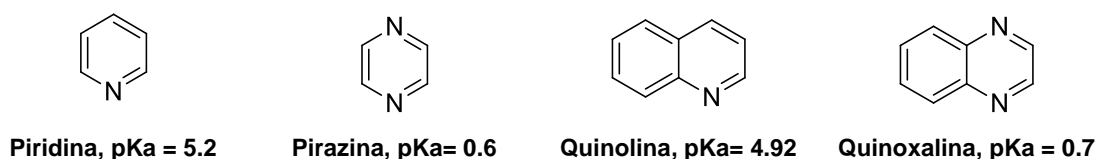
---

## 1 Síntesis de Quinoxalinas

Como fue mencionado en la Introducción las quinoxalinas representan un grupo de compuestos de gran interés en farmacología, especialmente al momento de definir prototipos para el desarrollo de nuevos fármacos. Esto es debido a la gran variabilidad estructural y versatilidad química que poseen y a la diversidad de potenciales aplicaciones terapéuticas que han demostrado. A continuación se describirá lo realizado en este trabajo de Tesis Doctoral para dar cumplimiento al objetivo planteado con respecto a la síntesis y caracterización de quinoxalinas que contengan en su estructura la sustitución estimada a través de los cálculos teóricos realizados (Capítulo II) , como óptima para acceder a compuestos con actividad antichagásica o anti-HIV.

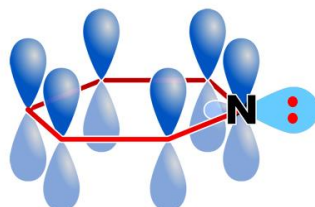
### 1.1 Características químicas

La quinoxalina en su forma aromática comparte muchas propiedades químicas con los heterocíclicos quinolina y pirazina. La presencia de dos átomos de nitrógeno con hibridación  $sp^2$  disminuye la densidad electrónica de la nube  $\pi$ , mostrando propiedades típicas de los anillos  $\pi$  deficientes (figura 3.1).<sup>171</sup>



**Figura 3.1** Anillos heterocíclicos relacionados con la quinoxalina y sus valores de pKa

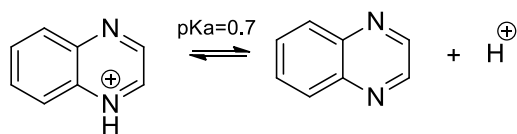
Los átomos de nitrógeno de estos heterociclos, como en la piridina, poseen hibridación  $sp^2$  pudiendo así compartir un electrón del orbital p en el plano anular, lo que confiere el carácter aromático al heterociclo (figura 3.2). Por otro lado, el orbital  $sp^2$  no compartido, con un par de electrones libres, le confiere características básicas:



**Figura 3.2** Representación de los orbitales p y  $sp^2$  de la piridina

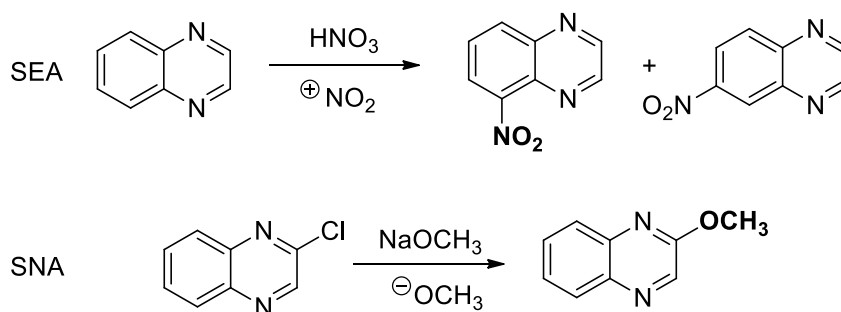
Sin embargo, la basicidad para los heterociclos con más de un átomo de nitrógeno se ve muy disminuida por la presencia de otro átomo más electronegativo que el de carbono, el cual aumenta

la deficiencia electrónica en el anillo, encontrándose en el caso de la quinoxalina un  $pK_a = 0.7$ , correspondiente al ácido conjugado (figura 3.3):



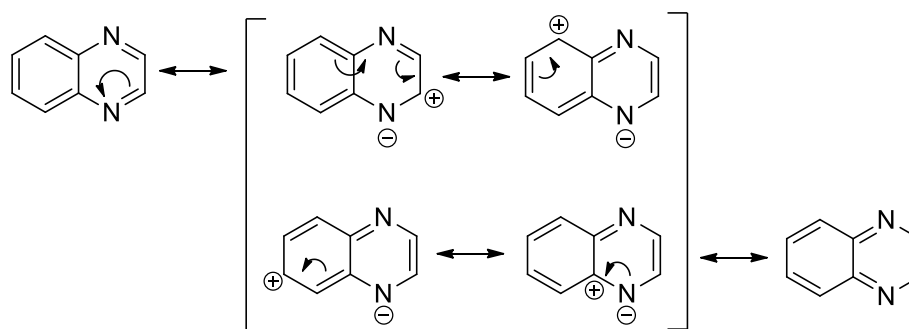
**Figura 3.3** Equilibrio ácido-base de la quinoxalina

El anillo de quinoxalina presenta baja reactividad en las reacciones de sustitución electrofílica aromática (SEA), dándose casi exclusivamente en posición 5, mientras que se ve fuertemente activado para reacciones de sustitución nucleofílica aromática (SNA) sobre el anillo heterocíclico (figura 3.4).



**Figura 3.4** Posiciones reactivas de la quinoxalina frente a las clásicas SEA y SNA.

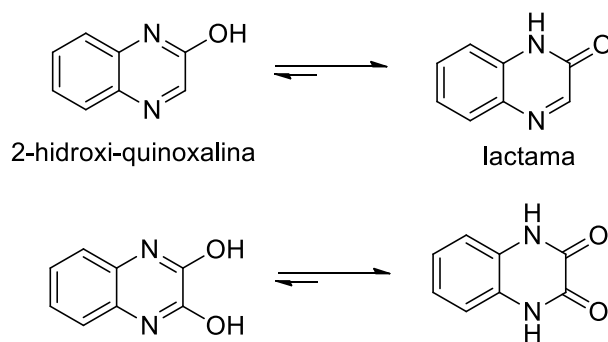
Esto se puede explicar a partir de las estructuras resonantes, en las que se puede apreciar la deslocalización de cargas (figura 3.5):



**Figura 3.5** Estructuras canónicas de la quinoxalina.

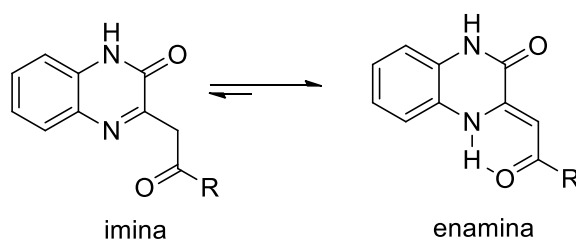
La presencia de un grupo hidroxilo en la posición 2 (y/o 3) puede llevar a las quinoxalinas a establecer un equilibrio tautomérico (figura 3.6) del tipo lactama-lactima (2-hidroxi-quinoxalina), hallándose la forma lactama como la preponderante:<sup>171, 172</sup>





**Figura 3.6** Equilibrio tautomérico de las hidroxiquinoxalinas.

Sin embargo, no se dispone de estudios exhaustivos del tautomerismo en relación a una variedad de sustituyentes en posición 3, considerando que esta posición debería tener, en primera instancia, un efecto directo sobre la estabilidad del tautómero preponderante. Los casos más estudiados son la 2-quinoxalinona<sup>173, 174</sup> y el caso particular de una tercera forma tautomérica, cuando en posición 3 hay un resto metilén-cetona que puede dar lugar al equilibrio entre las formas 3-enamino y 3-imino (figura 3.7).<sup>175-177</sup>



**Figura 3.7** Equilibrio tautomérico de las quinoxalinonas 2-metilcetona sustituidas.

Como ocurre con la piridina y la pirazina, en las quinoxalinas la presencia de grupos donadores de electrones, por efecto resonante, aumenta la disponibilidad del par de electrones del orbital  $sp^2$  con un consecuente aumento del carácter básico, encontrándose para la 2-quinoxalinona un  $pK_a=1.37$ . Esto también se evidencia en un aumento de la reactividad frente a la SEA. Lo contrario ocurre cuando los grupos son atractores de electrones, tales como halógenos o nitro.

Las quinoxalinas parcialmente saturadas, como las tetrahydroquinoxalinas I y II (figura 3.8), pierden parcialmente la contribución a la aromaticidad del sistema anular, comportándose más como anilinas N-alkil sustituidas ( $pK_a$  típicos entre 4.5 y 5.5) y mostrando que la reactividad frente a la SEA y SNA, en el anillo bencénico sea similar a sus análogos, las anilinas sustituidas.

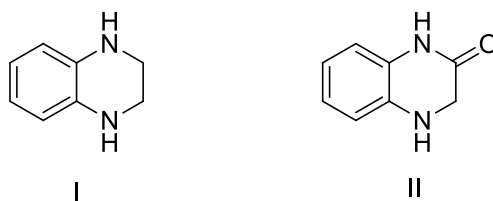


Figura 3.8 Quinoxalinas parcialmente saturadas.

De forma general, podemos resumir una serie de características electrónicas que pueden ser importantes a la hora de diseñar un potencial fármaco que contenga un anillo quinoxalínico en su estructura:

- Las quinoxalinas por su carácter electrónico  $\pi$  deficiente podrían dar buenas interacciones  $\pi$ -stacking con anillos ricos en electrones, como fenilos, fenoles e indoles, presentes en los  $\alpha$ -aminoácidos constituyentes de las proteínas.
- Los átomos de nitrógeno presentes en las quinoxalinas podrían ser aceptores o donadores de puente de hidrogeno, dependiendo del grado de saturación del sistema.
- Las formas lactama-lactima pueden tener distintas contribuciones en la formación de puentes de hidrógeno.
- Las tetrahydroquinoxalinas al perder el carácter aromático de la parte heterocíclica de la molécula dejan de ser anillos  $\pi$  deficientes, pero ofrecen otras posibilidades de incorporación de sustituyentes.

## 1.2 Métodos generales de síntesis de quinoxalinas

Entre los métodos de síntesis de quinoxalinas pueden enumerarse los siguientes:<sup>171, 172</sup>

1. Condensación de *o*-diaminas aromáticas con compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos
2. Ciclación intramolecular de *o*-diaminas aromáticas N-sustituidas
3. Reacciones de transformación de anillos

A continuación se resumen los aspectos más relevantes de cada uno de ellos:

**1 Condensación de *o*-diaminas aromáticas con compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos:** Constituye el método clásico de síntesis de quinoxalinas el cual puede ser representado de manera general a través de la siguiente reacción (figura 3.9):

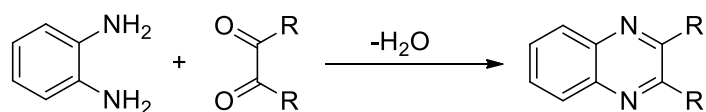


Figura 3.9 Método general de síntesis de quinoxalinas.

Esta reacción es muy sencilla y constituye la más ampliamente utilizada para la síntesis de quinoxalinas y sus derivados alquilados. La condensación de glicoxal con *o*-fenilendiamina produce la quinoxalina en forma cuantitativa.<sup>172</sup> Fenilglicoxales sustituidos son los materiales de partida para la obtención de 2-arylquinoxalinas y sus correspondientes cetoácidos lo son para la síntesis de 3-arylquinoxalinas (III y IV) (figura 3.10).

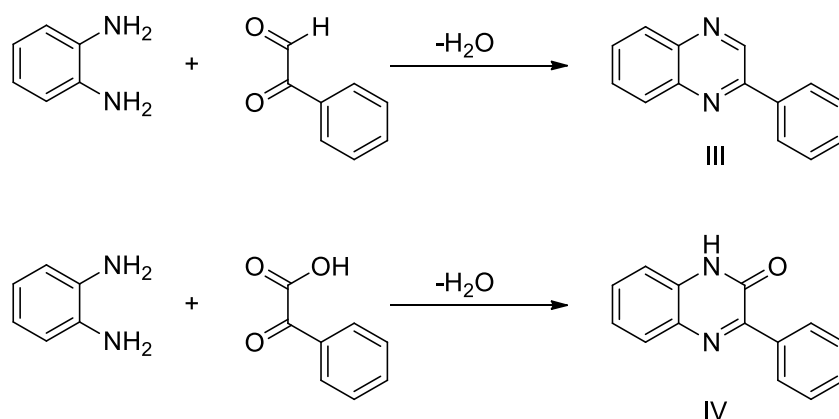


Figura 3.10 Síntesis de quinoxalinas a partir de fenil glicoxales.

La condensación de ácido mesoxálico con *o*-fenilendiamina produce la esperada 3-carboxi-2-quinoxalinona V, aunque el uso de la sal sódica correspondiente sigue un curso de reacción anómalo que lleva a la obtención del compuesto VII (figura 3.11).<sup>178</sup>

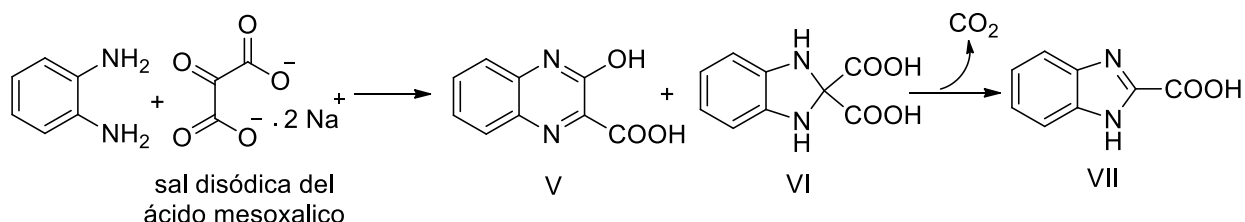
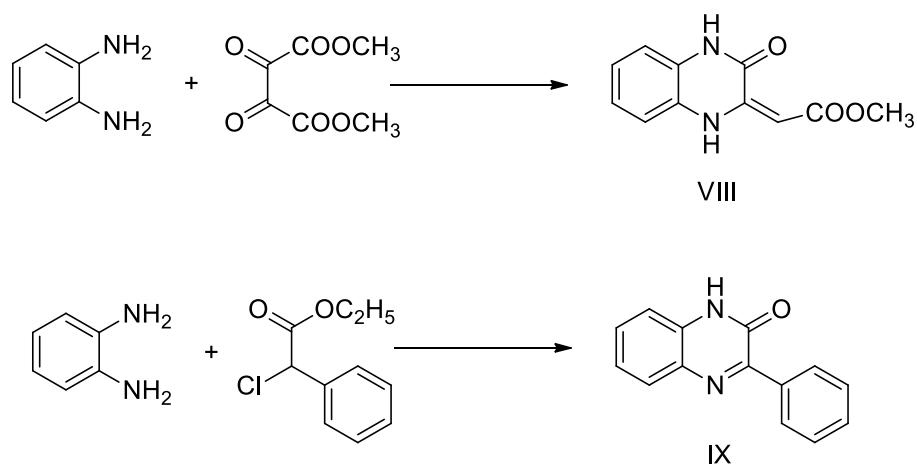


Figura 3.11 Síntesis de quinoxalinas a partir de a partir de ácido mesoxálico.

Siguiendo esta metodología, la reacción entre dimetilacetilenedicarboxilato con *o*-fenilendiamina lleva a la obtención de 3-metoxicarbonilmetilen-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalina (VIII).<sup>179</sup> Por su

parte el tratamiento de *o*-fenilendiamina con 2-clorofenilacetato de etilo produce 3-fenil-1,2,3,4-tetrahidro-2quinoxalinona que se oxida a 3-fenil-2-quinoxalinona (IX) (figura 3.12).<sup>179</sup>

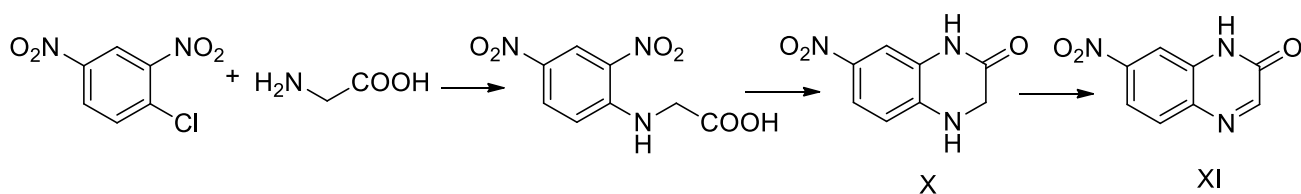


**Figura 3.12** Síntesis de quinoxalinonas a partir de acetilendicarboxilato.

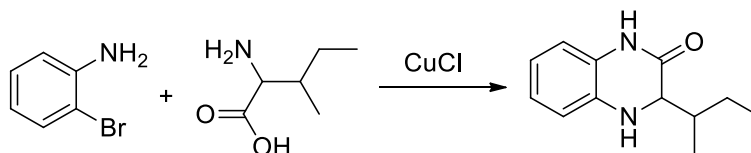
Las reacciones de condensación de *o*-fenilendiaminas con azúcares o derivados de estos, que actúan como compuestos carbonílicos, ha sido estudiada en detalle y así se han preparado derivados quinoxalínicos de osonas, osonahidrazones y ácido deshidro-L-ascórbico.<sup>180, 181</sup>

**2 Ciclación intramolecular de *o*-diaminas aromáticas *N*-sustituidas:** La reacción de ciclación de  $\alpha$ -aminoácidos *N*-arilsustituidos, intermediarios formados a partir de la reacción entre un  $\alpha$ -aminoácido y un *o*-nitrohalobenceno es muy utilizada para la síntesis de 2-quinoxalinonas. A modo de ejemplo puede señalarse la obtención de la 7-nitro-1,2,3,4-dihidroquinoxalin-2-ona (X) y la 7-nitro-1,2-dihidroquinoxalin-2-ona (XI) a partir de 2,4-dicloronitrobenceno y glicina (figura 3.13).<sup>182</sup>

Más recientemente y empleando la reacción de Ullman,<sup>183</sup> se han preparado 1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-2-onas a partir de *o*-bromoanilinas y  $\alpha$ -aminoácidos en presencia de cloruro cuproso, a través de intermediarios equivalentes a los obtenidos por reducción del grupo nitro, de acuerdo al siguiente esquema general mostrado en la figura 3.13.



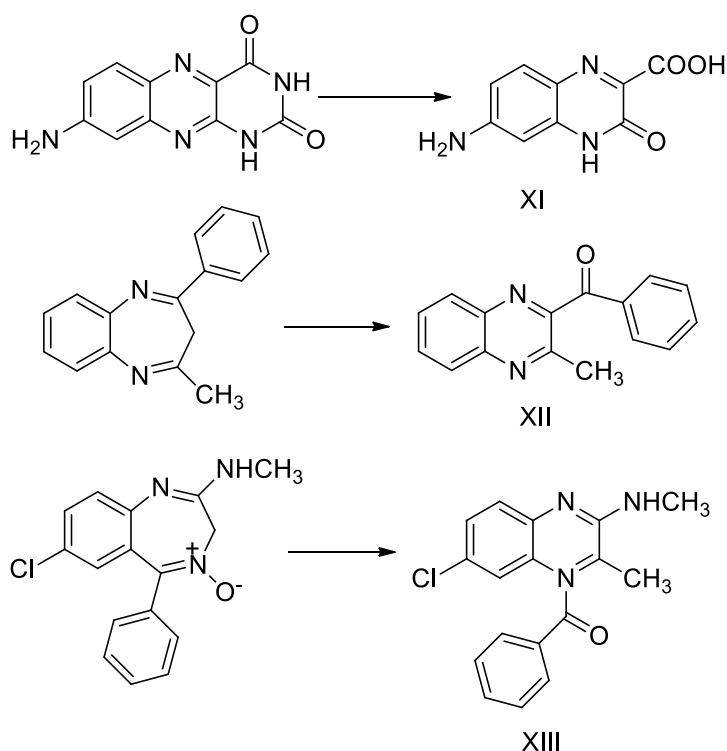
Síntesis de quinoxalinonas a partir de *o*-halonitrobenzenos y  $\alpha$ -aminoácidos



Esquema sintético empleando la reacción de Ullman

**Figura 3.13** Síntesis de quinoxalinonas a partir de ciclación intramolecular de *o*-diaminas aromáticas

**3 Reacciones de transformación de anillos:** Las quinoxalinas pueden ser sintetizadas por reacciones de degradación de sistemas de anillos de mayor tamaño (figura 3.14). Así, la 3-carboxi-1,2-dihidroquinoxalin-2-ona (XI) puede ser aislada de la hidrólisis alcalina de una alloxazina fusionada.<sup>184</sup> Cuando una solución bencénica de la 1,5-benzodiazepina es irradiada en presencia de oxígeno produce la contracción oxidativa del anillo que conduce a la 2-benzoil-3-metilquinoxalina (XII).<sup>185</sup> De manera similar la fotólisis de la 7-cloro-2-metilamino-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepina-4-óxido en benceno produce la N-benzoilquinoxalina (XIII). Otras contracciones de anillos de diazepinas a quinoxalinas han sido observadas.<sup>186-188</sup>



**Figura 3.14** Síntesis de quinoxalinas a partir de anillos de mayor tamaño.

### 1.3 Métodos de síntesis basados en tecnología de microondas

Desde mediados de los años '80 la tecnología de microondas viene siendo usada como fuente de energía en la síntesis orgánica. Sin embargo, su popularidad como técnica usual en las áreas de investigación y desarrollo de la química orgánica sintética se alcanzó en los años '90, con la introducción comercial de equipos que pudiesen controlar variables críticas del proceso de síntesis (temperatura, presión y potencia de la MW) y la forma de irradiación empleada, las cuales tienen impacto en la calidad y reproducibilidad de los resultados. El modo de irradiación afecta principalmente a la homogeneidad de la radiación de MW. Los equipos domésticos debido a que la cavidad del horno es mayor a la longitud de onda empleada, favorecen que las mismas reboten en las paredes de la cavidad, generando una distribución no homogénea del campo (genera zonas más calientes que otras). A esta forma de operación se la llama *multi-modo*. Por otro lado, los equipos diseñados para síntesis (*mono-modo*) enfocan de forma eficiente el campo sobre el tubo de reacción, haciendo más homogénea la radiación de MW en el medio de reacción. Los sistemas *mono-modo* se caracterizan por una alta reproducibilidad de sus resultados.<sup>189, 190</sup>

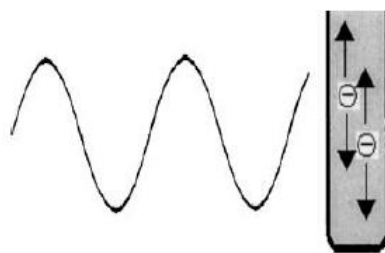
Esencialmente estas técnicas utilizan la radiación de MW como fuente de energía o calor. El fenómeno de calentamiento se puede dar por dos mecanismos:<sup>190</sup>

**1. Polarización dipolar:** el calentamiento dieléctrico resulta cuando una molécula con momento dipolar es sometida a un campo eléctrico oscilante. A la frecuencia de MW, los dipolos eléctricos responden a la radiación provocando la rotación rápida de la molécula en el espacio para realinearse con el campo oscilante (figura 3.15). En los líquidos, este cambio rotacional produce calor por los fenómenos de rozamiento y colisión entre las moléculas vecinas.



Figura 3.15 Mecanismo de polarización dipolar

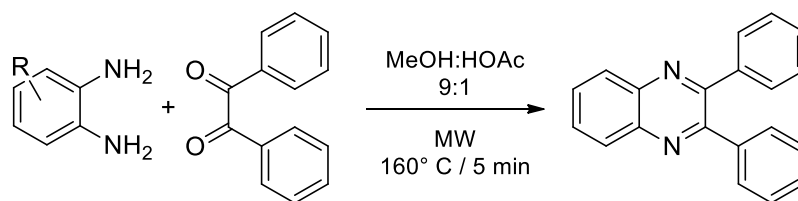
**2. Mecanismo de conducción:** si hay iones disueltos en el solvente dipolar, estos se acoplan fuertemente al campo eléctrico oscilante, aumentando la tasa de colisión entre las moléculas, por migración de los iones en el campo oscilante, con un aumento mayor de la temperatura, respecto del observado en el mecanismo de polarización dipolar (figura 3.16).



**Figura 3.16** Mecanismo de conducción

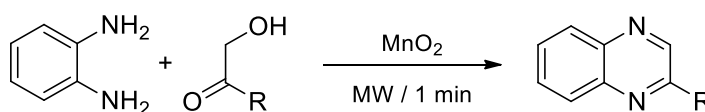
Se pueden encontrar en la bibliografía numerosas reacciones sintéticas optimizadas mediante el empleo de MW. Las características que habitualmente se ven mejoradas son: disminución de los tiempos de reacción y uso de solventes de reacción menos tóxicos, aunque también han sido reportados cambios radicales en los productos de reacción obtenidos o la desaparición de productos laterales. Esto último quizás sea porque el calentamiento en el seno del medio de reacción es prácticamente instantáneo y homogéneo, favoreciendo alguno de los caminos del control cinético/termodinámico de la reacción.<sup>190</sup>

En lo referido a la síntesis de quinoxalinas, el empleo de MW ha dado buenos resultados en la optimización de muchas de las reacciones clásicas de síntesis. A modo de ejemplo, se puede señalar la utilización de MW en reacciones de condensación entre *o*-fenilendiaminas sustituidas y compuestos dicarbonílicos, por ejemplo el dibenzoílo, que empleando calentamiento convencional suelen completarse con tiempos de reacción que van entre las 2 y 12 hs, con rendimientos que oscilan entre el 30 y 80%. El calentamiento por MW ha llevado a que los tiempos de reacción se reduzcan a 5 minutos, con rendimientos que oscilan entre el 85 y 99% (figura 3.17).<sup>191</sup>



**Figura 3.17** Síntesis de quinoxalinas derivadas de dibenzoílo empleando MW.

Se han descrito reacciones de deshidratación entre *o*-fenilendiamina y  $\alpha$ -hidroxicetonas, en condiciones libres de solvente, empleando  $\text{MnO}_2$  como catalizador, con tiempos de reacción de alrededor del minuto y rendimientos entre el 48 y 85% (figura 3.18).



**Figura 3.18** Síntesis de quinoxalinas derivadas de  $\alpha$ -hidroxicetonas empleando MW.

De manera eficiente, también se ha descrito la síntesis de quinoxalin-2-onas quirales por ciclación intramolecular entre nitrohalobencenos soportados en polietilenglicol con  $\alpha$ -aminoácidos naturales (figura 3.19).<sup>192</sup>

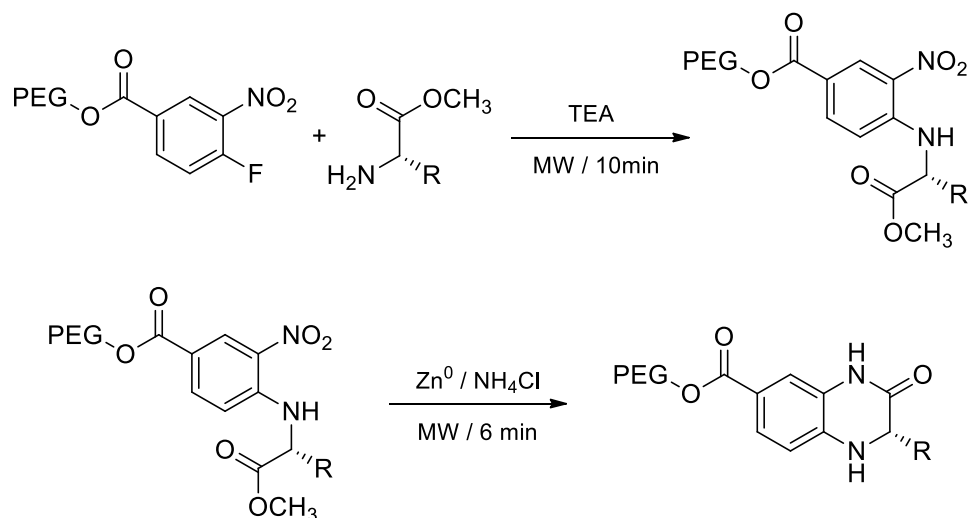


Figura 3.19 Síntesis de quinoxalin-2-onas quirales empleando MW.

## 1.4 Desarrollo y resultados

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el capítulo II, respecto de la potencialidad de las quinoxalinas como agentes anti-HIV y antichagásicos, en el presente trabajo de tesis se ensayaron distintas rutas sintéticas que permitieran obtener esta clase de compuestos. Concretamente, los resultados obtenidos en los cálculos orientaron la síntesis de una serie de 1,2-dihidroquinoxalin-2-onas (dQNXs) y 1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-2-onas (tQNXs) con diferentes sustituyentes en posiciones 3 y 4 (figura 3.20).



1,2-dihidroquinoxalin-2-ona (dQNX)    1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-2-ona (tQNX)

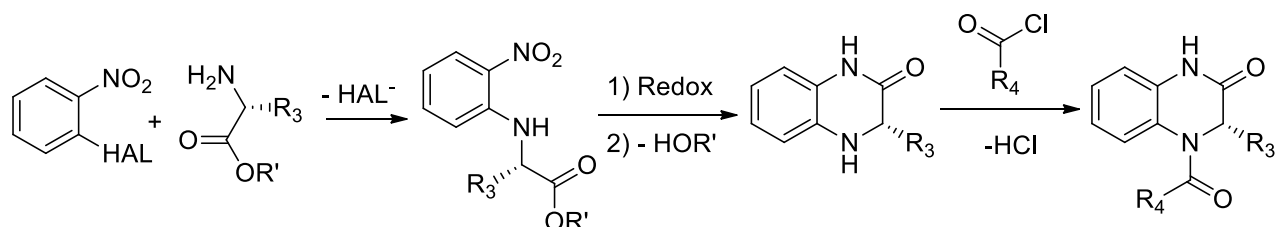
Figura 3.20 Estructuras base de las quinoxalin-2-onas diseñadas.

### 1.4.1 1,2,3,4-Tetrahidroquinoxalin-2-onas (tQNXs)

De acuerdo con los resultados obtenidos en la etapa de diseño empleando herramientas computacionales, resultaba fundamental obtener derivados de tQNXs sustituidos en posiciones 3 y 4, prestando especial atención a la quiralidad del C3 de acuerdo a los requerimientos estereoquímicos de los blancos proteicos estudiados en el capítulo II. Por ello es que a partir de



los datos presentes en la literatura respecto de posibles metodologías para la obtención de dichos derivados resultó particularmente atractiva la secuencia que emplea un *o*-halonitrobenzoceno, al que se hace reaccionar con un  $\alpha$ -aminoácido homoquiral en una reacción de sustitución nucleofílica aromática, para dar un intermediario abierto que por reducción del grupo nitro y posterior ciclación produce las tQNXs sustituidas de acuerdo al esquema general mostrado en la figura 3.21.



**Figura 3.21** Esquema sintético general de las tQNXs *N*4 aciladas

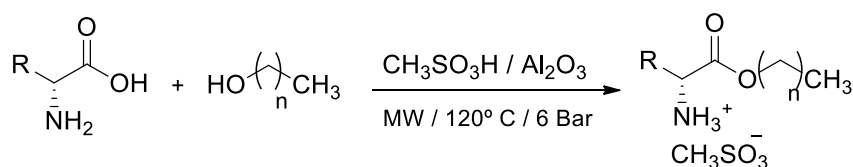
Como puede verse, en principio los  $\alpha$ -aminoácidos, deberían estar en forma de ésteres para evitar que la forma zwitteriónica correspondiente disminuyera la nucleofilia del grupo amino. Por ello, en primer lugar se buscaron condiciones de esterificación de dichos precursores. Si bien la literatura al respecto es abundante, las condiciones experimentales descritas no resultaban óptimas teniendo en cuenta que estos aminoácidos resultan los precursores tempranos de toda la secuencia sintética propuesta. En la búsqueda de una metodología para la síntesis de los ésteres de  $\alpha$ -aminoácidos la reacción se estudió primero en la preparación de ésteres derivados de varios ácidos carboxílicos de muy diferente reactividad. La esterificación entre un alcohol y un ácido, catalizada por ácidos minerales es una reacción muy importante en la síntesis orgánica y un gran número de condiciones experimentales se han desarrollado para esta reacción. Las esterificaciones catalizadas son un área activa de investigación en la actualidad. Reacciones estequiométricas entre un alcohol y un ácido han sido descritas por Yamamoto<sup>2</sup> y Tanabe<sup>3</sup> y están entre las mejores, sobre todo desde el punto de vista de la economía de átomos. La síntesis de ésteres a partir de ácidos carboxílicos y alcoholes utilizando ácido metanosulfónico ( $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ ) soportado sobre alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) como catalizador (AMA) en condiciones de reacción clásicas está bien documentada, sobre todo para la síntesis selectiva de monoésteres obtenidos a partir de dioles.<sup>193</sup> Estas síntesis emplean cantidades muy grandes de AMA (15 mmol de  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$  / 3 mmol de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ /1 mmol de ácido carboxílico) por lo que resulta muy difícil separar el catalizador del producto de reacción. Por otra parte, varios autores han descrito recientemente ejemplos de síntesis asistida por microondas que emplean reactivos soportados con excelente resultados.<sup>194</sup> Teniendo en cuenta estos aportes en el marco del desarrollo de esta Tesis Doctoral propusimos el uso de AMA como catalizador en reacciones de esterificación inducidas por microondas. Estas condiciones fueron evaluadas y optimizadas en primer lugar en la esterificación de ácidos carboxílicos y con ello ha sido posible reducir la proporción de AMA / ácido carboxílico (1 mol/1,6 mol), obtener productos de reacción más limpios, con altos rendimientos y tiempos de reacción

reducidos. El uso de una mezcla ternaria de alcohol (metanol, etanol o isopropanol), un ácido carboxílico aromático o alifático y AMA, preparado previamente a partir de  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$  (2 mol) y  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (3 mol), llevó a la obtención de una gran familia de ésteres, empleando tecnología de microondas.<sup>195</sup> En el punto 1.4.2. de este capítulo se muestran los resultados obtenidos en la obtención de algunos de esos ésteres, objetivo de esta Tesis Doctoral.

Ésteres de  $\alpha$ -aminoácidos son intermediarios importantes en la síntesis orgánica, ya que se han utilizado en diversas áreas, tales como la síntesis de péptidos,<sup>188</sup> de química médica,<sup>196, 197</sup> como materias primas para la síntesis de polímeros quirales.<sup>198-203</sup> Una variedad de reactivos se han reportado para el transformación de aminoácidos en ésteres de aminoácidos, que incluyen ácidos próticos (ácido clorhídrico gaseoso, ácido sulfúrico y ácido *p*-toluenosulfónico),<sup>203</sup> cloruro de tionilo,<sup>204</sup> 2,2-dimetoxipropano<sup>205</sup> y resinas de intercambio iónico.<sup>206</sup> Hay otros métodos que requieren múltiples pasos de reacción para obtener los productos, tales como la secuencia de N-protección, esterificación y desprotección. Aunque algunos de ellos son ampliamente utilizados, tienen varias desventajas, incluyendo procedimientos tediosos, problemas de seguridad, de eliminación de residuos y condiciones de reacción severas.

El uso de AMA, empleando irradiación de microondas como fuente de energía, mostró la aplicabilidad de esta metodología para la preparación de ésteres de metilo, etilo, propilo e isopropilo de algunos  $\alpha$ -aminoácidos con excelentes rendimientos y tiempos de reacción cortos (figura 3.22).

En la Tabla 3.1 se recogen algunos ejemplos de las condiciones empleadas para la obtención de diez de los ésteres de  $\alpha$ -aminoácidos a través de la metodología optimizada como parte del trabajo de la presente Tesis Doctoral. Algunos de estos compuestos se aislaron como base y otros como el metansulfonato de amonio correspondiente. En ambos casos la caracterización se realizó basándose en la comparación con en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN reportados en la literatura.



**Figura 3.22** Reacción de esterificación empleando AMA

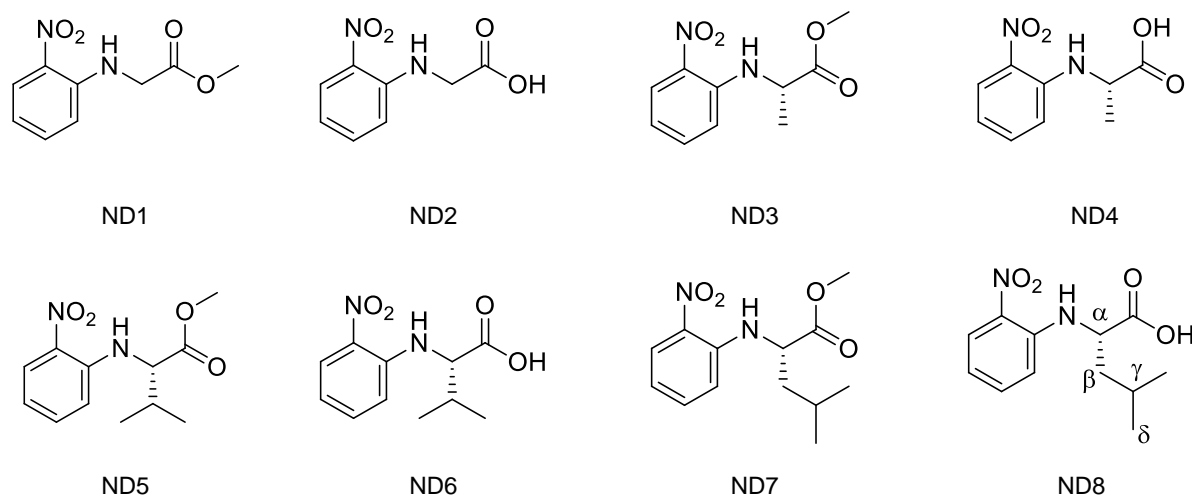
**Tabla 3.1** Rendimientos y tiempos de reacción en la esterificación de los aminoácidos utilizados en la síntesis de quinoxalinas.

Aminoácido	Metanol		Etanol		1-Propanol		2-Propanol	
	Tpo (min)	Ren (%)	Tpo (min)	Ren (%)	Tpo (min)	Ren (%)	Tpo (min)	Ren (%)
Glicina	20	90	-	-	-	-	-	-
Valina	20	88	20	88	20	88	20	88
Leucina	20	80	-	-	-	-	-	-
Alanina	20	95	20	95	20	95	20	95

Donde: Tpo es tiempo de reacción y Ren rendimiento.

Los correspondientes metil ésteres de  $\alpha$ -aminoácidos se utilizaron como nucleófilos en la reacción de SNA sobre 2-flúor-1-nitrobenceno (FNB) y 2-cloro-1-nitrobenceno (CINB). Esta reacción de desplazamiento nucleofílico se realizó utilizando un reactor de microondas, dando tiempos más cortos de reacción sobre el flúor que sobre el cloro derivado. Otros autores habían descrito la obtención de estos derivados mediante condiciones modificadas de la reacción de Sanger, en todos los casos utilizando directamente el aminoácido sin esterificar,<sup>207</sup> dado que el empleo de los ésteres conduce a obtener el producto secundario de autocondensación del metil éster del aminoácido utilizado. Teniendo en cuenta estos resultados, aún cuando el empleo de microondas no llevaba a un porcentaje importante en la obtención de las dicetopiperazinas,<sup>208</sup> se decidió ensayar las reacciones de desplazamiento nucleofílico con las sales potásicas de los  $\alpha$ -aminoácidos. Los resultados obtenidos fueron comparables a los obtenidos con los ésteres, independientemente del *o*-halonitrobenceno utilizado como reactivo.

Por ello se decidió continuar con la preparación de los intermediarios *N*-arilsustituídos empleando directamente la sal potásica del  $\alpha$ -aminoácido, encontrando rendimientos en promedio del 60%. Recientemente, se ha descrito el uso de grafeno en la optimización de rutas sintéticas desarrolladas empleando MW.<sup>209-212</sup> Por ello, se decidió ensayar la incorporación de grafeno a la reacción de SNA, empleando como reactivos FNB o CINB y el  $\alpha$ -aminoácido, en solución acuosa de carbonato de potasio. Esta metodología permitió obtener los compuestos **ND1** a **ND8** (figura 3.23) en un único paso de síntesis, a partir de los reactivos comerciales (Tabla 3.2). De esta forma se obtuvieron los compuestos derivados de glicina, (*S*)-alanina, (*S*)-leucina y (*S*)-valina y de sus respectivos metilésteres.



**Figura 3.23** *N*-nitrofenil derivados obtenidos a partir de los aminoácidos y sus metil ésteres.

**Tabla 3.2** Rendimientos y tiempos de reacción de los derivados de aminoácidos con los *o*-halonitrobenzeno.

Derivado del $\alpha$ -aminoácido	2-cloro-1-nitrobenzeno		2-flúor-1-nitrobenzeno		2-FNB + grafeno	
	Tpo (min)	Ren (%)	Tpo (min)	Ren (%)	Tpo (min)	Ren (%)
Glicina sal potásica	40	45	30	75	15	90
Glicina metil éster	40	50	30	80	15	90
Leucina sal potásica	40	40	30	70	20	90
Leucina metil éster	40	55	30	80	20	90

Donde: Tpo es tiempo de reacción y Ren rendimiento.

La caracterización de los nitrofenilaminoácidos mediante espectroscopía de RMN permite destacar las siguientes señales características: Los desplazamientos de los átomos de hidrógeno unidos al  $C_{\alpha}$  proveniente del aminoácido se observan entre 4.00 y 5.00 ppm, el NH característico del resto amino desplazado entre 8.16 y 8.35 ppm y las señales características del fenilo, observándose el particular doblete entre 8.10 y 8.19 ppm correspondiente al H en posición orto con respecto al nitro, demostrando el efecto atractor de electrones del mismo. A modo de ejemplo se muestran en la figura 3.24 los espectros de RMN correspondientes al compuesto **ND8**:

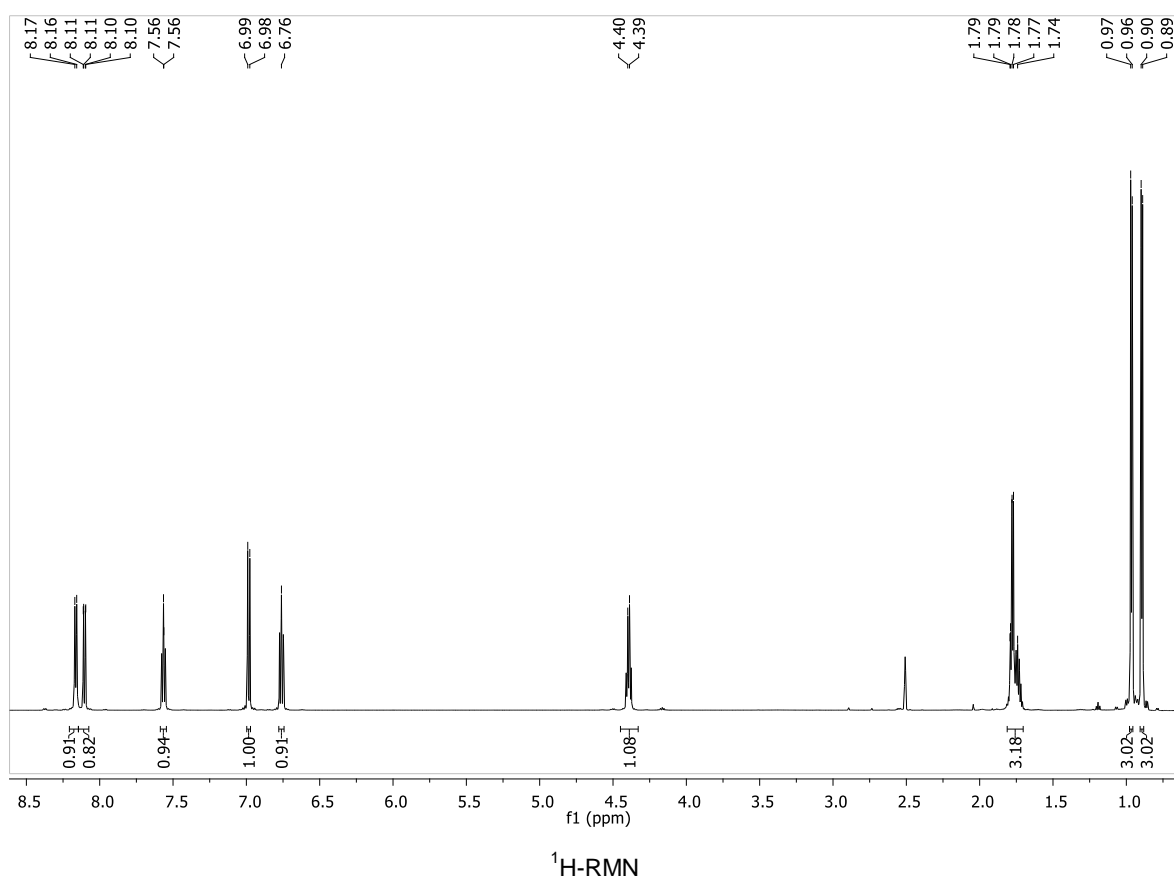
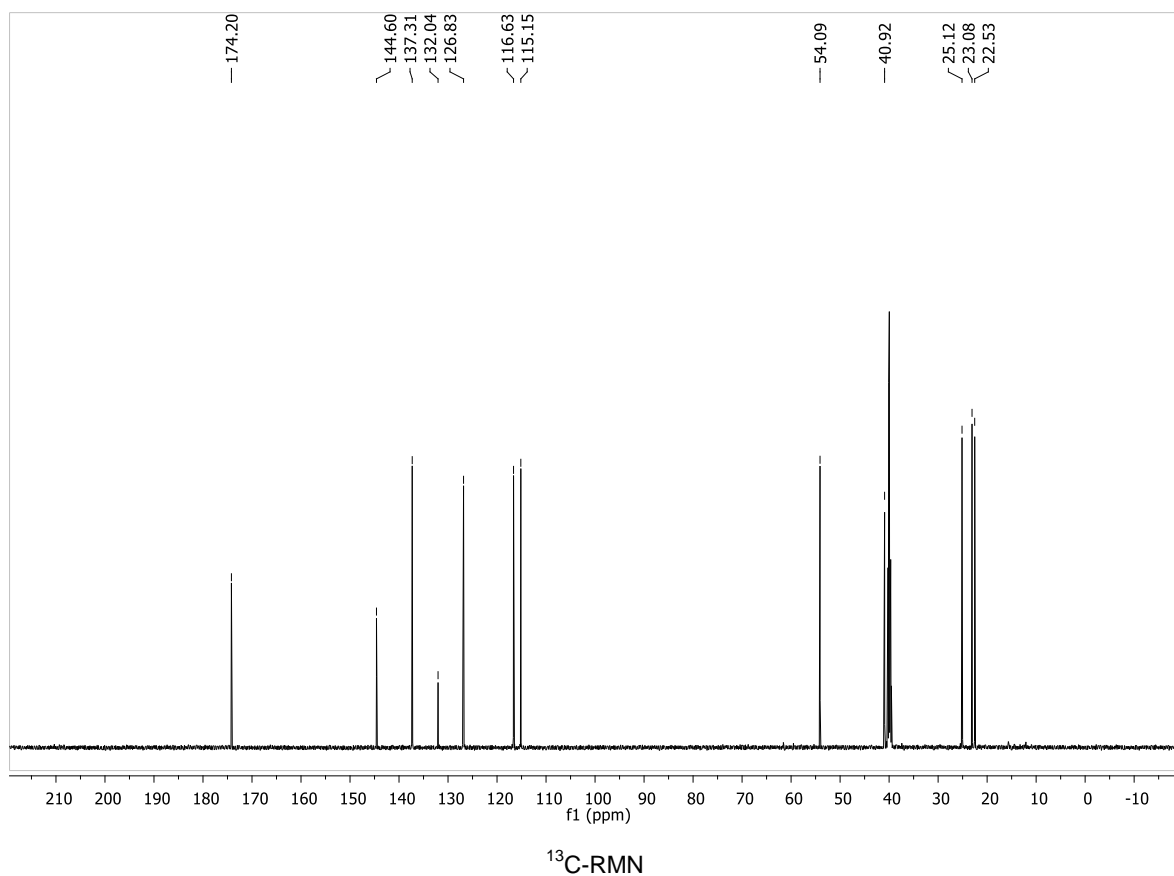


Figura 3.24 Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  del compuesto ND8

En el espectro de correlación total H-H (TOCSY, figura 3.25), el cual permite estudiar la correlación entre protones vecinos directos, se puede observar el doblete a 8.16 ppm correspondiente al NH, para el cual se observa correlación con los protones alquílicos  $\alpha$  (4.40 ppm),  $\beta$  (1.79 ppm),  $\gamma$  (1.74 ppm) y  $\delta$  (0.96 y 0.89). Por otro lado se observa la correlación entre el protón desplazado a 8.10 ppm con los H del núcleo aromático, dando cuenta que es parte del mismo.

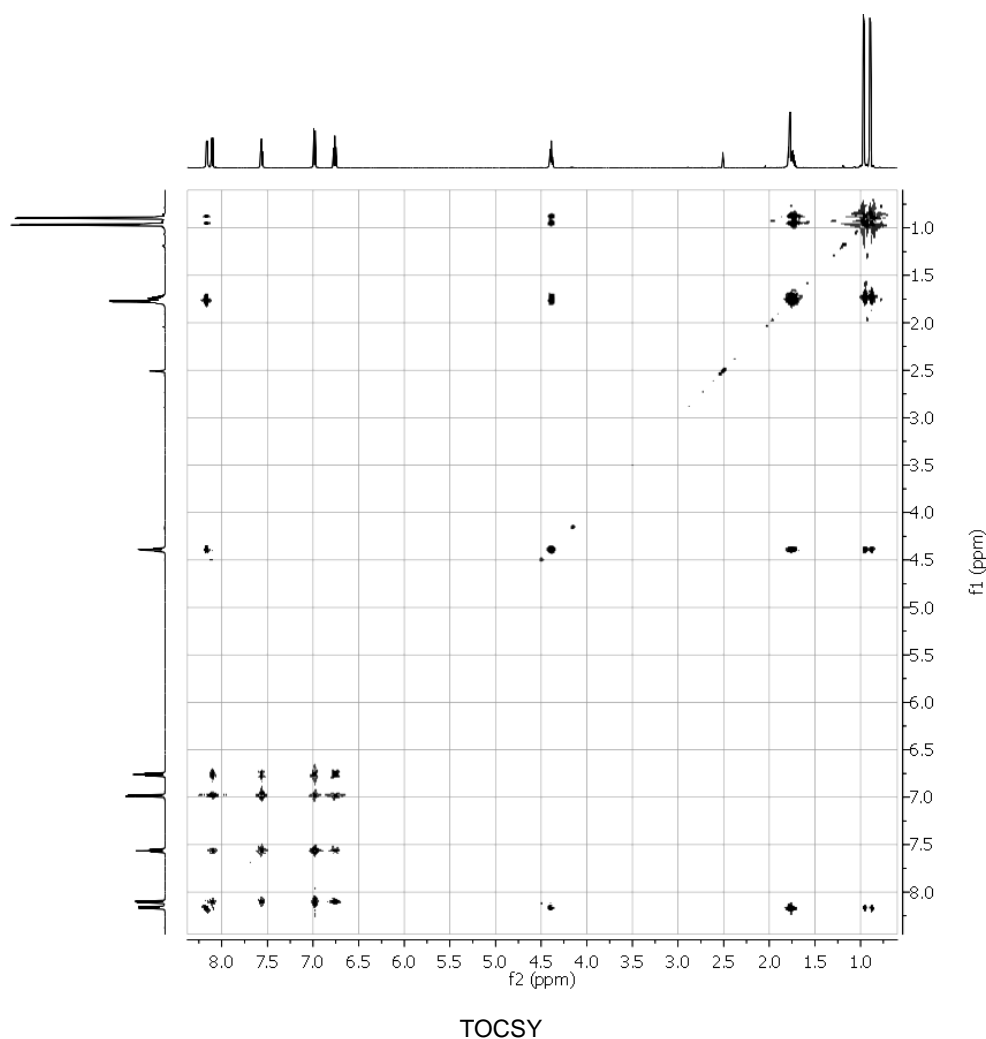


Figura 3.25 TOCSY del compuesto ND8

Una vez obtenidos estos derivados, tanto los ácidos como los ésteres fueron utilizados en la obtención de las correspondientes tQNXs. Condiciones experimentales para la obtención de las mismas ya habían sido descritas en la literatura.<sup>183, 208, 213, 214</sup> En ellas se describe el empleo de distintos agentes reductores del grupo nitro, tales como formiato de amonio/Pd-C;  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$ ;  $\text{SnCl}_2/\text{HCl}$  o  $\text{Zn}^0/\text{HCl}$  para obtener las correspondientes anilinas sustituidas. Durante el proceso de reducción del grupo nitro ya se observa parte de la ciclación de la anilina intermediaria,<sup>208</sup> reacción que puede completarse mediante calentamiento. La ciclación intramolecular se produce cuando el grupo nitro es reducido al amino correspondiente, el cual por ataque al carboxilo/carboxilato

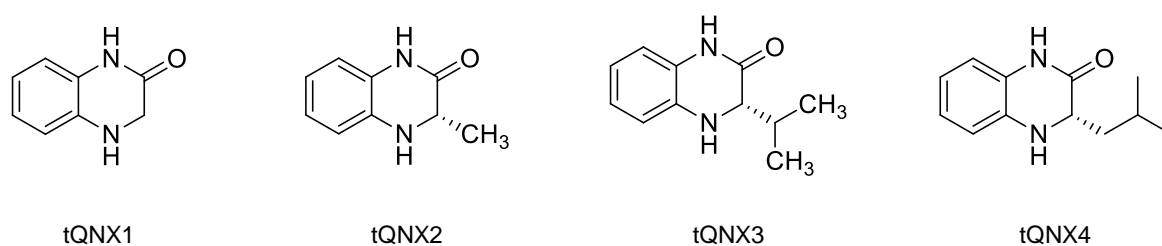
produce la lactama, con pérdida de agua o el alcohol correspondiente si el reactivo de partida es un éster del nitroderivado.

A partir de lo descrito en la literatura, en la presente Tesis Doctoral se buscaron condiciones experimentales optimizadas para la obtención en un único paso de las tQNXs a partir de los ésteres o los ácidos derivados de los nitrobenenos. En tal sentido, para la reducción del grupo nitro al correspondiente grupo amino, fueron ensayados dos tipos de agentes reductores:

A) El empleo de formiato de amonio en presencia de Pd-C conduce a una mezcla de productos, entre los que se incluyen los compuestos ciclados, con distinto grado de oxidación. En el caso de la reducción de **ND1** o **ND2** se obtiene una mezcla de tQNX y dQNX en una proporción 60:40 determinada por HPLC.

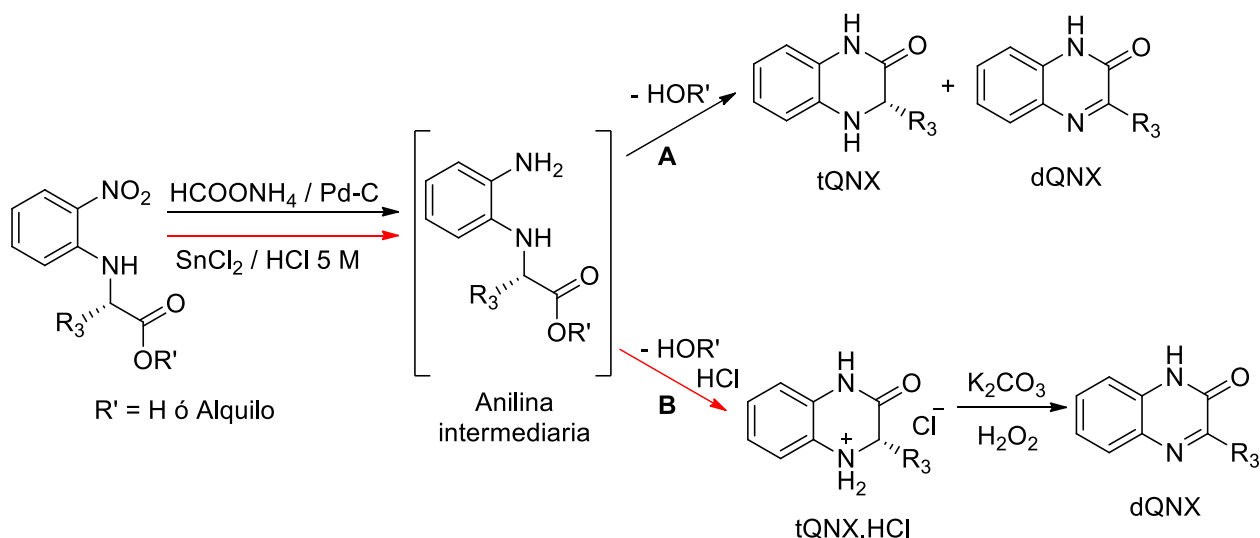
B) Buscando condiciones de reducción que permitieran la obtención de tQNXs sin la concomitante obtención de las dQNXs, se ensayó la reducción del grupo nitro utilizando como agente reductor  $\text{SnCl}_2$  en medio ácido y calentamiento convencional, obteniéndose las tQNXs como clorhidratos. De esta forma, si bien la presencia del producto de oxidación (dQNX) no pudo ser evitada de manera completa, la relación tQNX / dQNX fue de 95:5, determinada por HPLC.

Las tQNXs obtenidas empleando estas últimas condiciones experimentales son los compuestos **tQNX1**, **tQNX2**, **tQNX3** y **tQNX4** (figura 3.26)



**Figura 3.26** tQNX sintetizadas

Por otro lado la obtención de las dQNX **19** y **20**, a las que se hará referencia en el apartado 1.4.2 (figura 3.26), se puede conseguir prolongando el tiempo de reacción en la oxidación de las tQNX3 y tQNX4 respectivamente, cuando la ruta utilizada es la del formiato de amonio en presencia de Pd-C; o por otro lado, tratando a reflujo los clorhidratos de las tQNXs, en una solución de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En la figura 3.27 se muestra un esquema de los caminos sintéticos empleados.



**Figura 3.27** Esquema sintético de tQNXs.

En la tabla 3.3 se resumen los resultados obtenidos para las quinoxalinas sintetizadas a partir de los nitroderivados a través de las dos rutas ensayadas:

**Tabla 3.3** Rendimientos y tiempos de reacción en la reducción y ciclación de los nitroderivados

Nitroderivado	HCOONH <sub>4</sub> / Pd-C		SnCl <sub>2</sub> / HCl	
	Tpo (hs)	Ren (%)	Tpo (hs)	Ren (%)
N-(2-nitrofenil)-				
glicina	25	60	25	90
valina	25	30	25	75
leucina	25	40	25	80
alanina	25	45	25	90

Donde: Tpo es tiempo de reacción y Ren rendimiento.

Por otro lado, en el caso particular de la 1,2,3,4-tetrahidro-2-quinoxalinona (**tQNX1**) también se estudió su obtención a través de la reacción entre el ácido cloroacético con *o*-fenilendiamina (figura 3.28, a). Para la misma, con el empleo de microondas se consiguió obtener la **tQNX1** con rendimientos del 85%, trabajando a potencia constante: irradiando 1 minuto a 30 W y 10 minutos a 15 W.

En la figura 3.28 b) se resumen las condiciones experimentales optimizadas para la obtención de las tQNXs, conteniendo un centro asimétrico en C3, en dos pasos partiendo de FNB y un  $\alpha$ -aminoácido y la posterior ciclación del intermediario, producto de la reducción del grupo nitro.



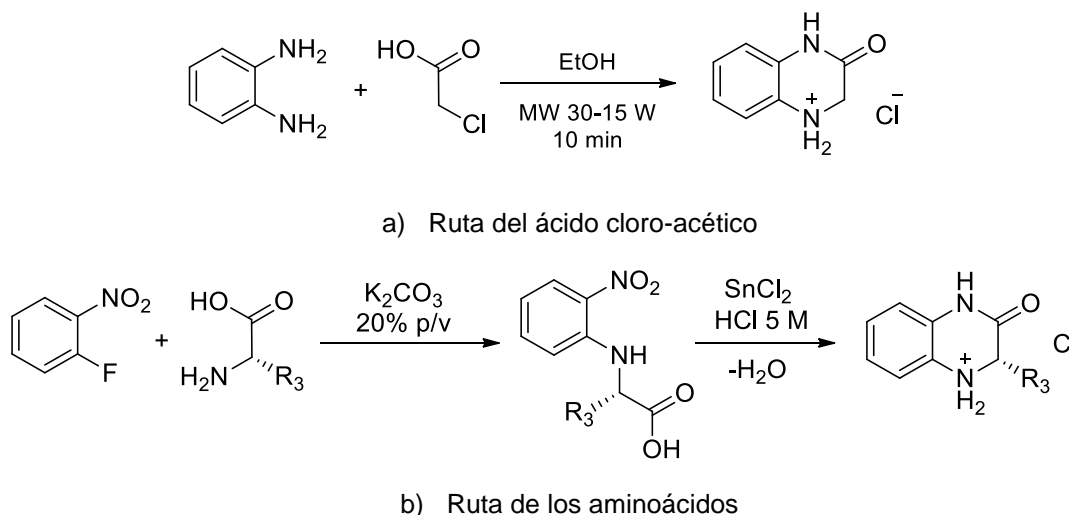
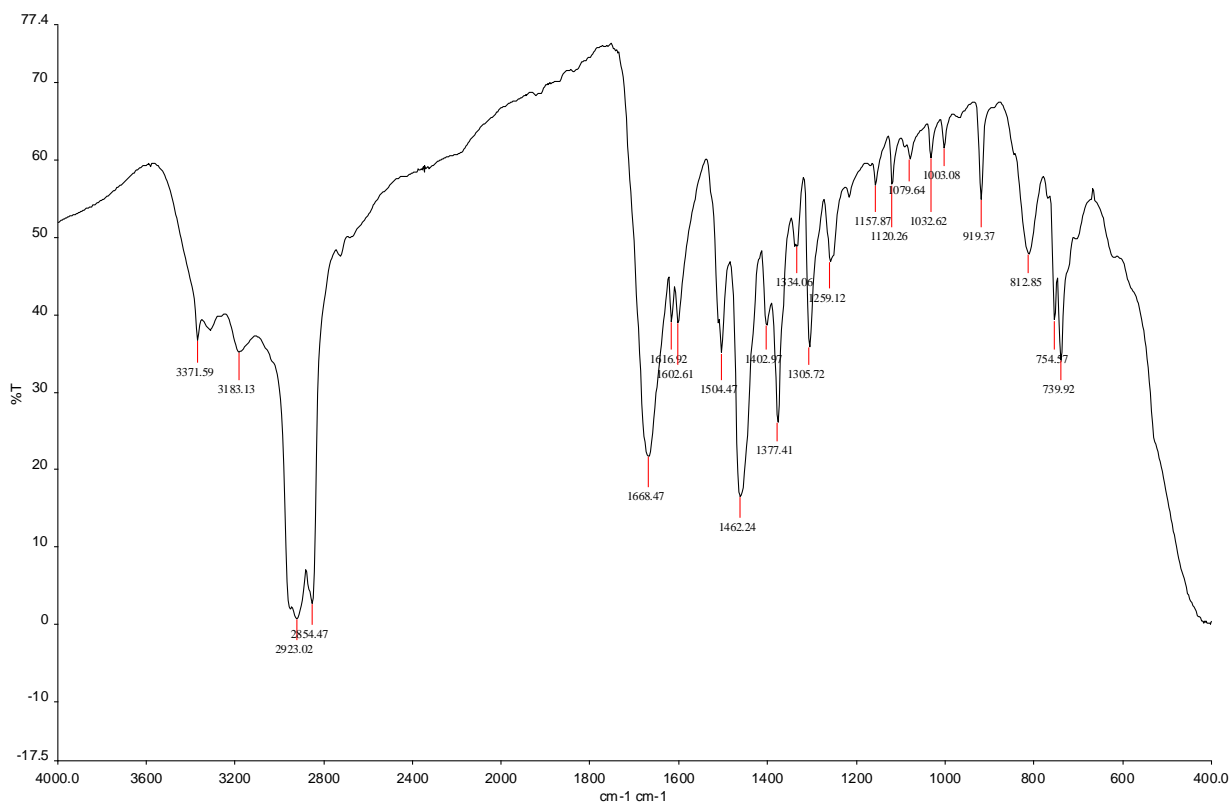


Figura 3.28 Esquema sintético de tQNXs

### Caracterización espectroscópica de las tQNXs

**Espectroscopía de infrarrojo:** En los espectros de IR de estos compuestos se observan bandas características de los estiramientos para el grupo carboxamido ( $\text{HNC}=\text{O}$ ) entre  $1660$  y  $1690\text{ cm}^{-1}$ ; el doblado de la unión N-H de los grupos amino y amido, con señales en  $1616\text{ cm}^{-1}$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$ ; y se aprecia la sustitución 1,2 del anillo bencénico con una señal alrededor de  $755\text{ cm}^{-1}$ . La figura 3.29 muestra un espectro típico, tomando como ejemplo al compuesto **tQNX4**. También es característica para este grupo de compuestos la aparición de las señales alrededor de  $1500\text{ cm}^{-1}$  y  $1377\text{ cm}^{-1}$  (figura 3.29).



**Figura 3.29** Espectro de infrarrojo del compuesto tQNX4.

**Espectrometría de masa:** Empleando como fuente de ionización el impacto electrónico (70 eV) se observó el ión molecular para todas las tQNXs sintetizadas y en aquellas sustituidas con un resto alquilo en posición 3 se observó la presencia del ión  $m/z$  147 por pérdida de dicho fragmento, en la figura 3.30 se muestra como ejemplo a la tQNX4, para la cual se observa su ión molecular con  $m/z$  204.

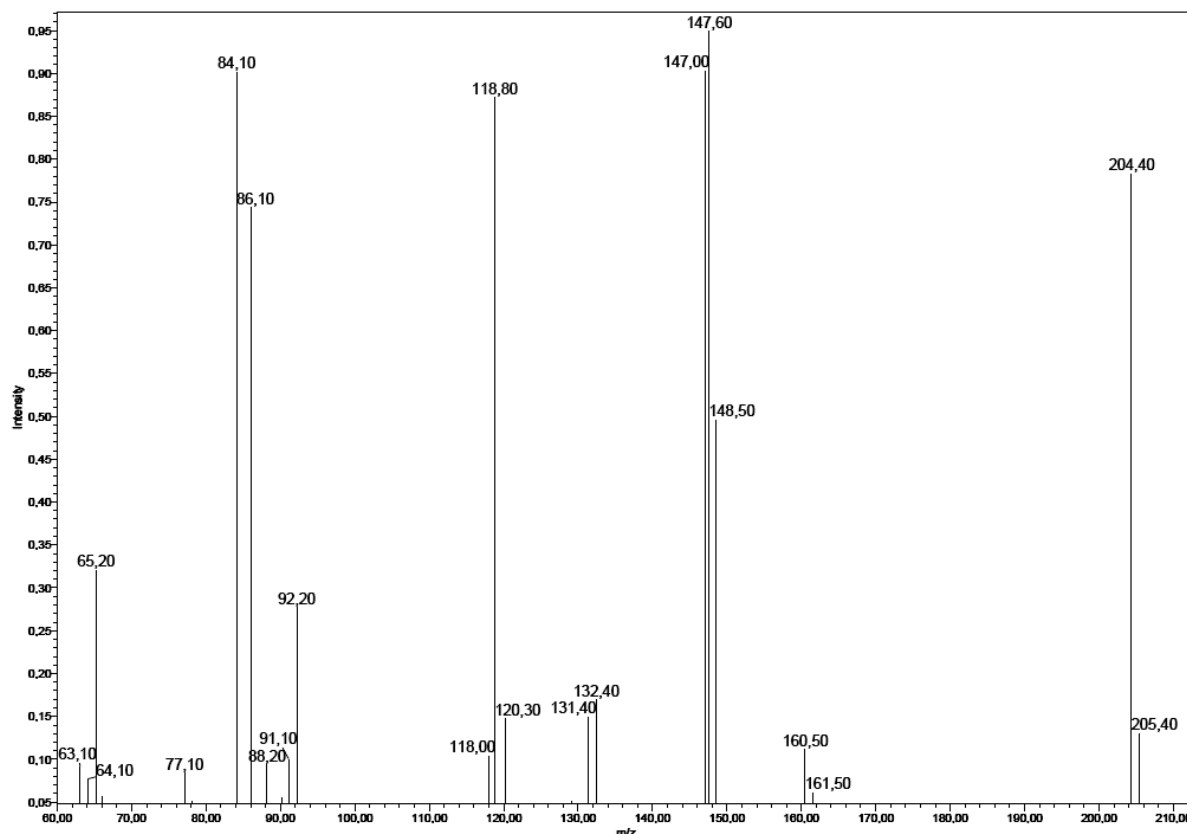
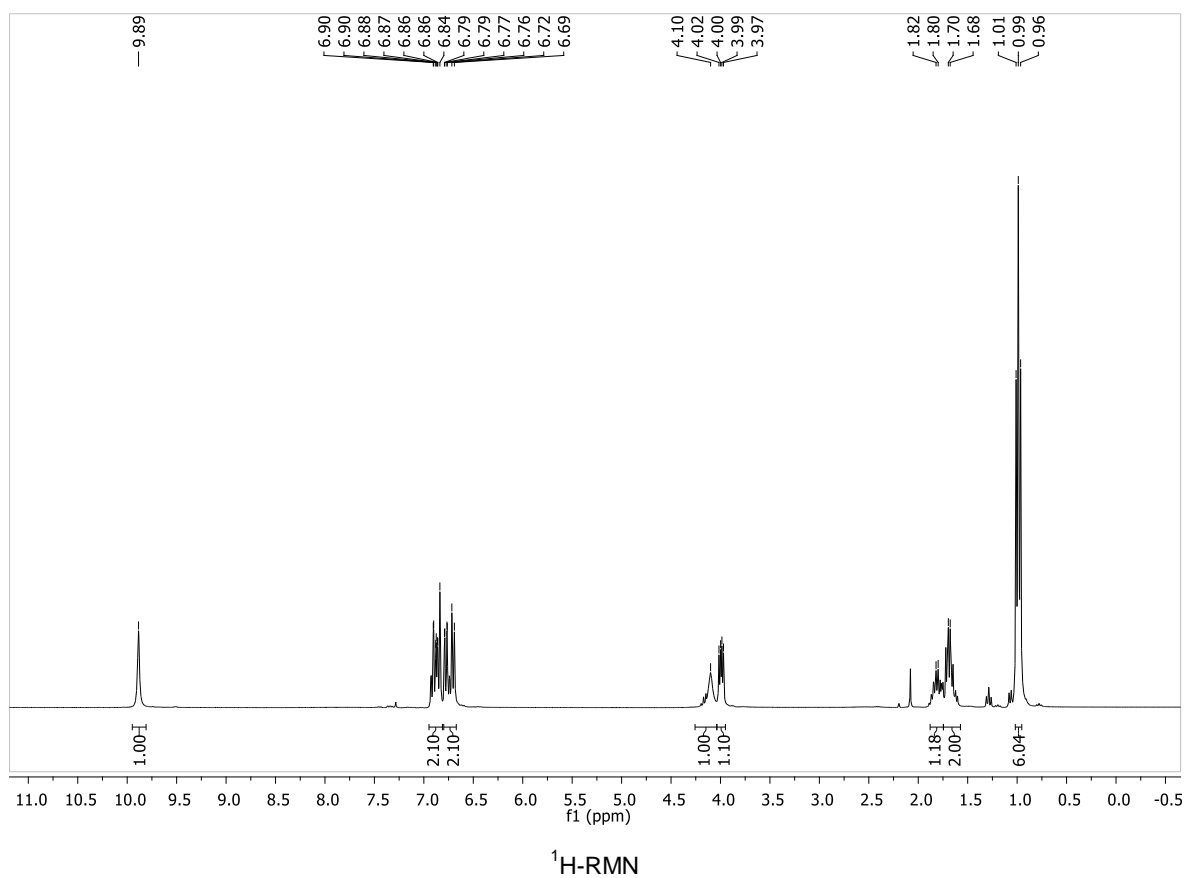
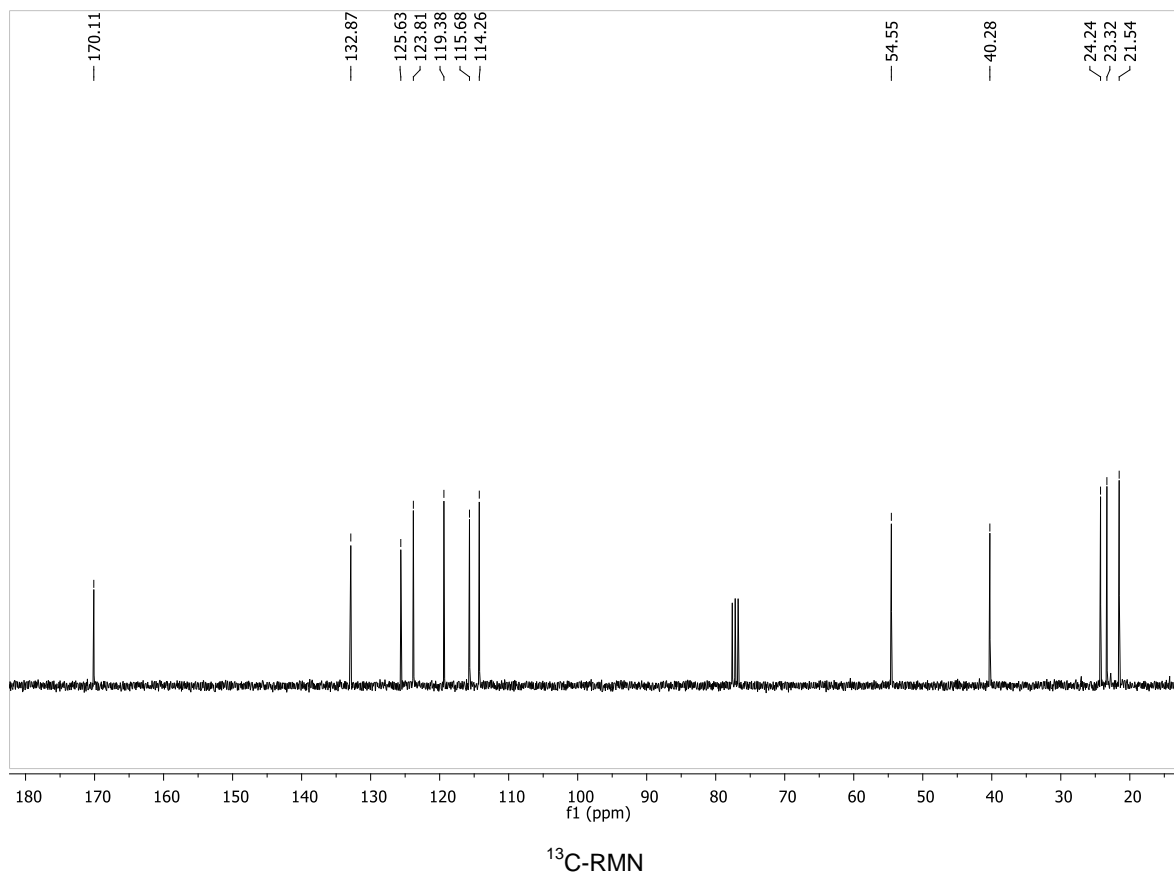
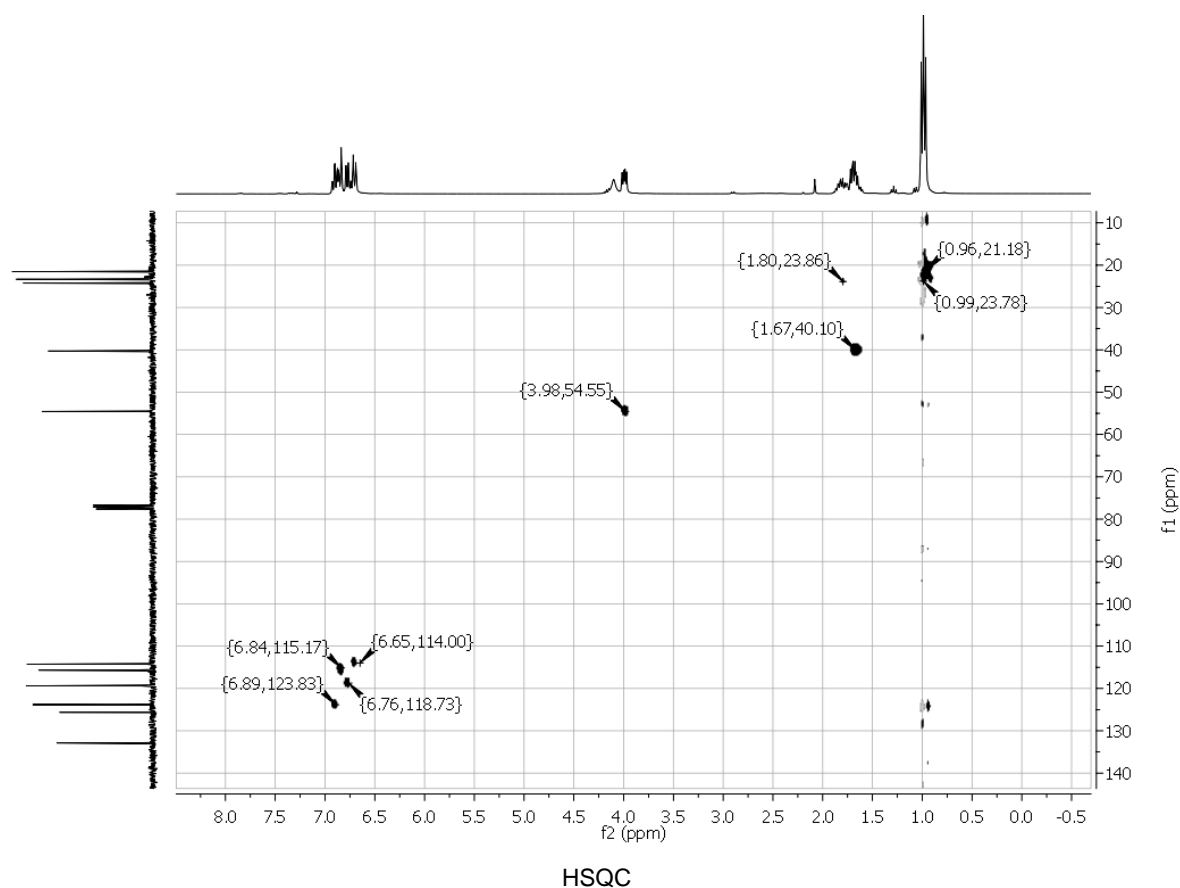


Figura 3.30 Espectro de masa del compuesto tQNX4.

**Espectroscopía de RMN:** Las señales características, observadas en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de esta familia de tQNXs (figura 3.31), tomando como ejemplo el compuesto **tQNX4** son un singlete ancho a  $\delta$  4.10 ppm que se corresponde al átomo de hidrógeno unido al átomo de nitrógeno  $N_4$  de tipo anilina, mientras que a  $\delta$  9.89 ppm se encuentra al átomo de hidrógeno unido al átomo de nitrógeno ( $N_1$ ) de tipo aril-lactama. Es de destacar, que para este compuesto, el átomo de hidrógeno que aparece como un doblete a  $\delta$  3.98 ppm se corresponde con el átomo de C3, de acuerdo a lo observado en el experimento de HSQC y que es común, en el rango de  $\delta$  3.70 a 4.00 ppm, en toda esta serie. Con respecto a los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN, la señal a  $\delta$  170.1 ppm hace evidente la presencia del carbonilo lactámico y la señal correspondiente al C3 del aparece en toda la familia de tQNXs en el rango comprendido entre  $\delta$  46.00 ppm y 62.00 ppm.





**Figura 3.31** Espectros de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  del compuesto tQNX4 y el gráfico de correlación H-C a un enlace de distancia obtenido por un experimento HSQC.

#### 1.4.2 4-Acil-1,2,3,4-tetrahydro-quinoxalin-2-onas (atQNXs)

Teniendo en cuenta el objetivo de este trabajo respecto de sintetizar quinoxalinas conteniendo la sustitución predicha en la etapa de diseño, la incorporación de sustituyentes en la posición 4 del anillo es fundamental para favorecer la interacción de los mismos con las enzimas TR y CP. Por ello se estudió la acilación de los compuestos **tQNX1**, **tQNX2**, **tQNX3** y **tQNX4**, con el fin de obtener los derivados que a nivel de los cálculos serían activos.

La derivatización del compuesto **tQNX1** con distintos agentes acilantes, tales como: cloruro de acetilo, clorocloruro de acetilo, cloruro de propionilo,  $\beta$ -cloro cloruro de propanoilo, cloruro de sulfonilo, cloroformiato de propilo y cloroformiato de isobutilo, llevó a obtener los derivados que se muestran en la figura 3.32 con muy buenos rendimientos. Las condiciones generales de reacción involucran el empleo del correspondiente cloruro de ácido en un ligero exceso estequiométrico (10%), utilizando como solvente acetato de etilo ó acetonitrilo y empleando hexametilentetramina ó trietilamina como base aceptora del cloruro de hidrógeno liberado.

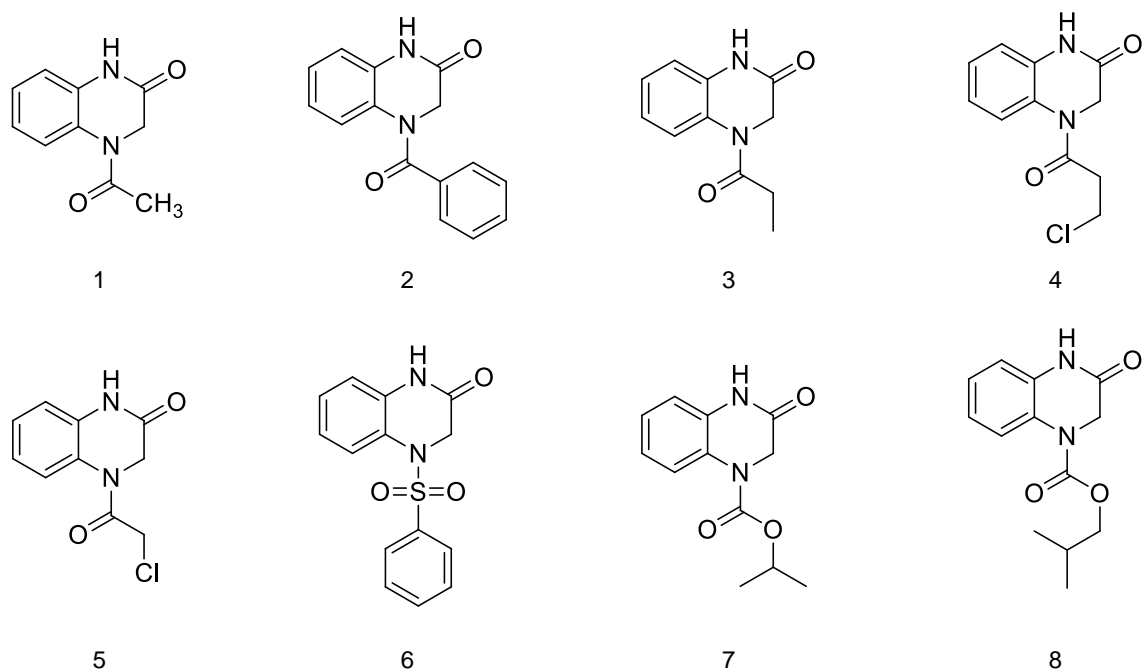


Figura 3.32 Quinoxalinas N4 aciladas derivadas de tQNX1

Empleando las mismas condiciones de síntesis, a partir de las tQNXs precursoras **tQNX2**, **tQNX3** y **tQNX4**, que ya contenían un sustituyente hidrofóbico en posición 3, se prepararon los compuestos **9**, **14** y **16** empleando cloruro de 3-cloropropanoilo como agente acilante; los compuestos **10** y **13** acilando con clorocloruro de acetilo; **12** y **15** empleando como reactivo el cloroformiato de isobutilo y **11** acilando con cloruro de propanoilo (figura 3.33).

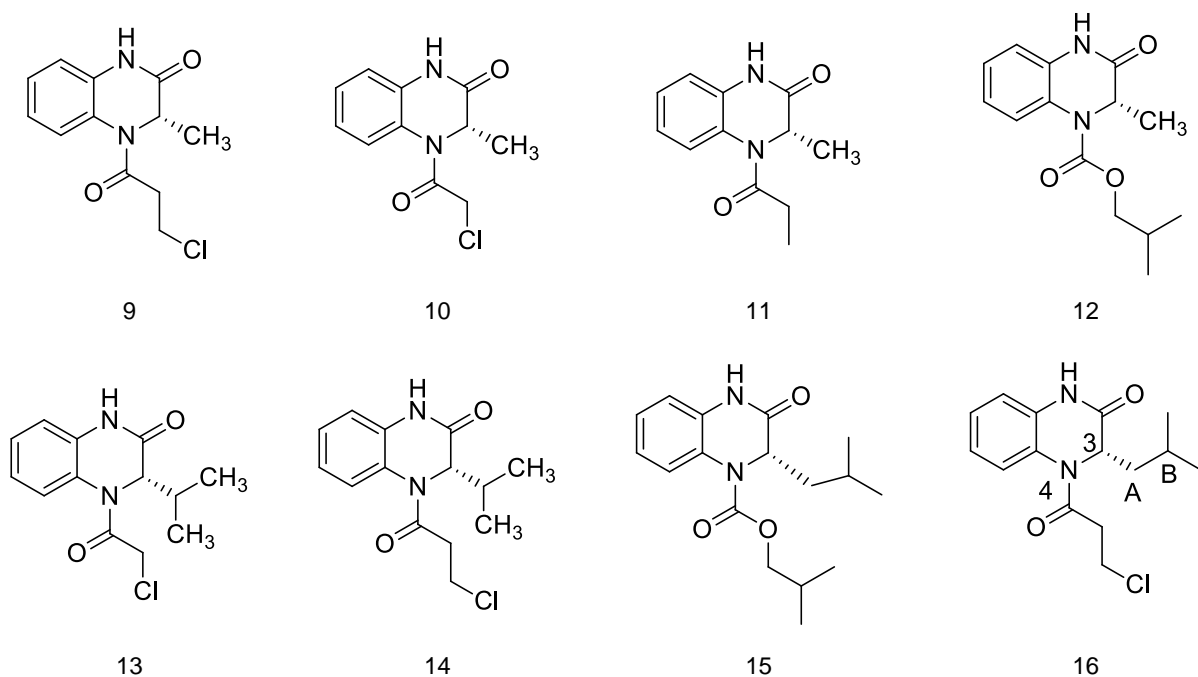


Figura 3.33 Quinoxalinas N4-aciladas derivadas de tQNX2, tQNX3 y tQNX4

### Caracterización espectroscópica de las atQNXs

**Espectroscopía de infrarrojo:** El patrón de bandas características observado para estos compuestos resultó muy similar al de sus precursores (tQNXs). Dado los sustituyentes incorporados, sólo bandas de estiramientos C-H y una banda extra debida a la incorporación del grupo acilo en *N4* se adicionan al patrón previamente indicado para las tQNXs. Se observaron dos bandas definidas para los grupos carboxamido (HNC=O) en  $1640\text{ cm}^{-1}$  y  $1690\text{ cm}^{-1}$ , salvo en los derivados de carbamatos, como **12** y **15** donde la segunda banda se observa entre  $1704$  y  $1715\text{ cm}^{-1}$ ; el doblado del grupo N-H amido a  $1600\text{ cm}^{-1}$  y el estiramiento entre  $3100$  y  $3300\text{ cm}^{-1}$ . La figura 3.34 muestra, a modo de ejemplo, el espectro correspondiente al compuesto **16**.

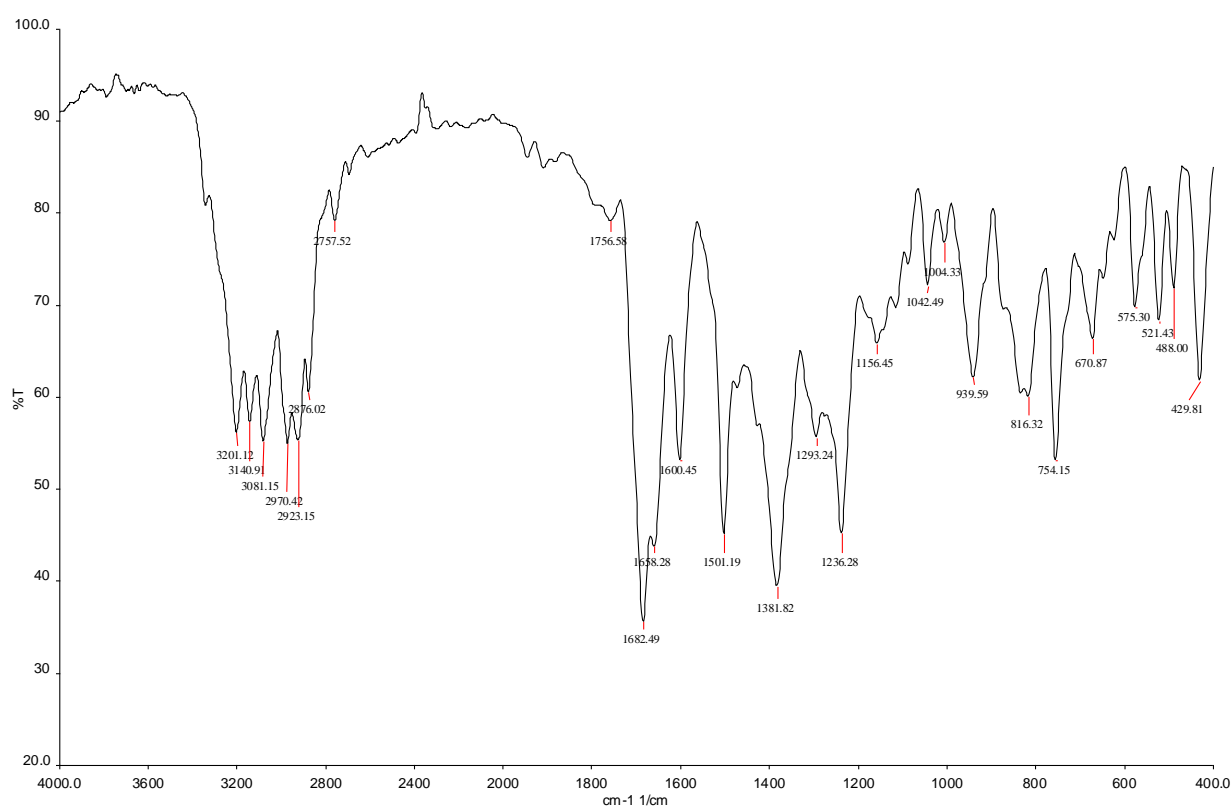


Figura 3.34 Espectro infrarrojo del compuesto **16**.

**Espectrometría de masa:** Empleando como fuente de ionización impacto electrónico (70 eV) fue posible observar el ión molecular y la pérdida del sustituyente en *N4* para todas las atQNXs estudiadas. A modo de ejemplo en la figura 3.35, tomando como ejemplo el compuesto **16**, se observa la aparición del ión molecular a  $m/z$  294. El ión  $m/z$  91 que corresponde al fragmento de  $\beta$ -cloropropionilo y el ión  $m/z$  204 que corresponde a la tQNX de partida por la pérdida del resto presente en *N4* y migración de un protón. Al igual que en sus precursoras, las tQNXs, se pudo observar la pérdida conjunta de los sustituyentes presentes en los átomos C3, adicionalmente a la pérdida del sustituyente en *N4* con la aparición del ión de  $m/z$  147.

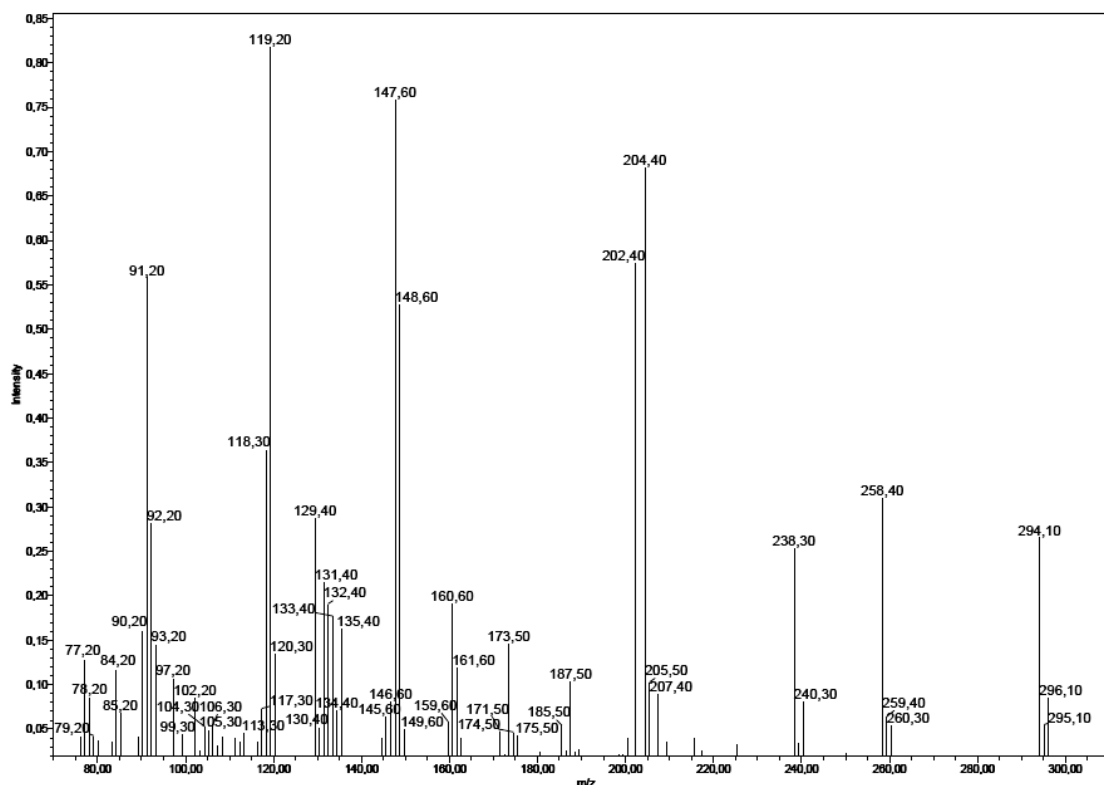
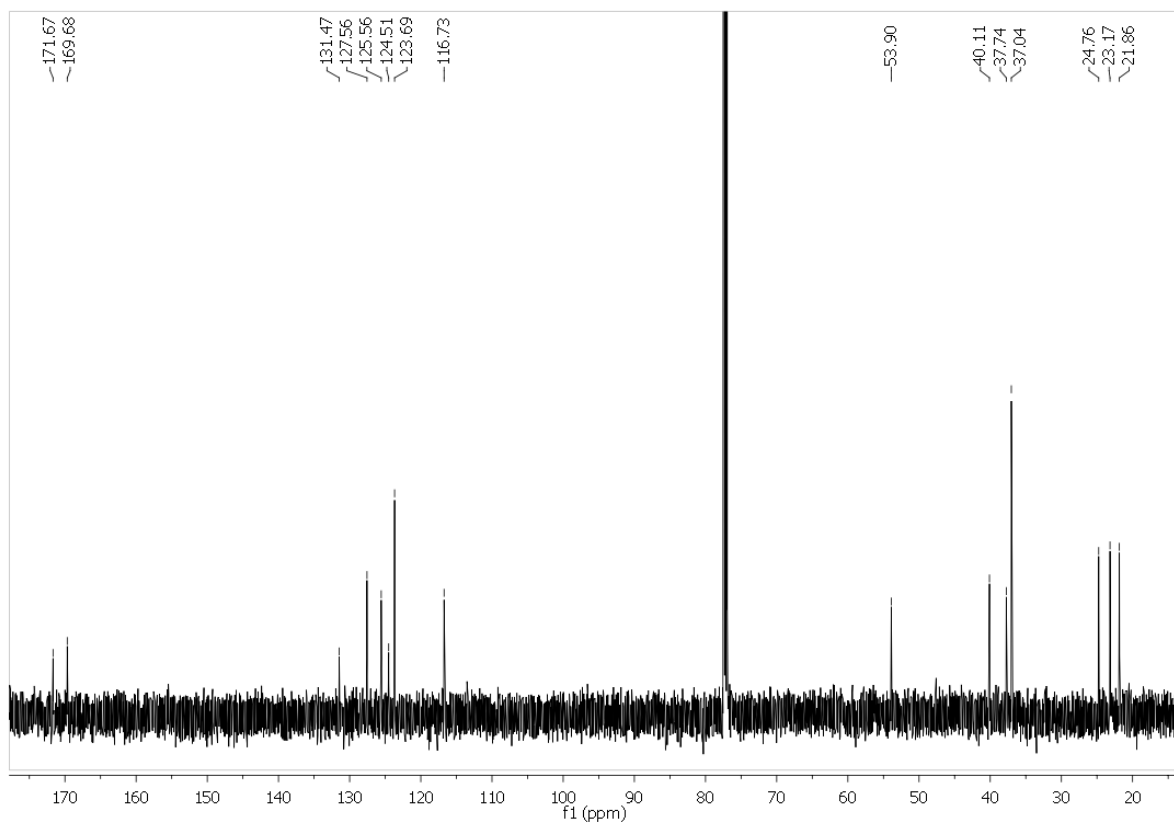


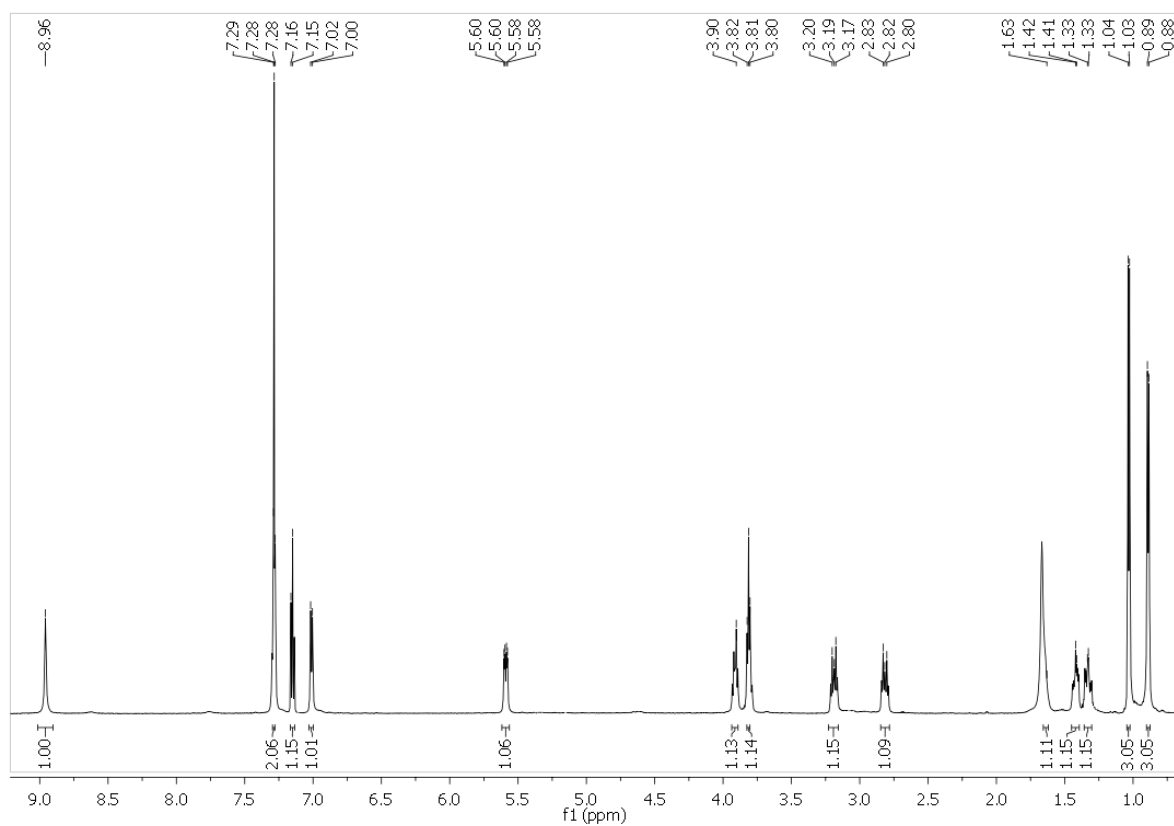
Figura 3.35 Espectro de masa del compuesto 16.

**Espectroscopía de RMN:** En los espectros de las atQNXs resultan característicos los desplazamientos del átomo de hidrógeno unido al C3 del heterocíclico, perteneciente al C $\alpha$  del aminoácido precursor. Mientras que en las tQNXs dicho átomo aparece aproximadamente a 4.00 ppm, en las atQNXs se desplaza a menores campos, apareciendo a más de 1.50 ppm por encima del valor inicial ( $\delta$  5.57 ppm para el compuesto **16**). Es de destacar la diastereotopicidad de los hidrógenos metilénicos ante la presencia del centro quiral. A modo de ejemplo se muestran en la figura 3.36 los espectros de RMN del compuesto **16**. En el HSQC se observa la correlación entre el átomo de C3 a  $\delta$  53.9 ppm con el protón desplazado a 5.57 ppm, mientras que en el COSY se observa correlación del mismo protón con los protones diastereotópicos del grupo metileno 3A vecino, desplazados a  $\delta$  1.35 ppm. También es de señalar la presencia del átomo de hidrógeno metínico 3B, portador de los dos restos metilos, el cual presenta correlación con los protones de 3A y los metilos. Este protón, 3B, se ve solapado por la señal de solvente en el  $^1\text{H}$ -RMN.

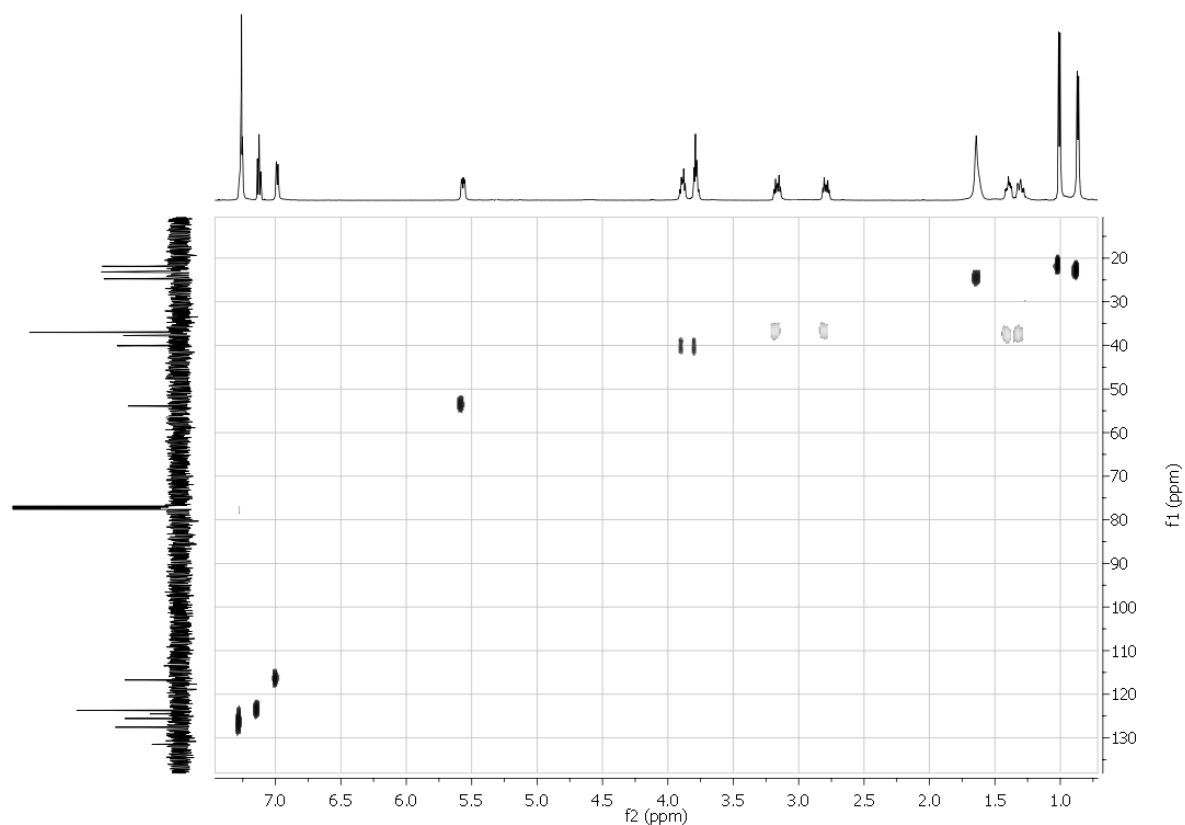




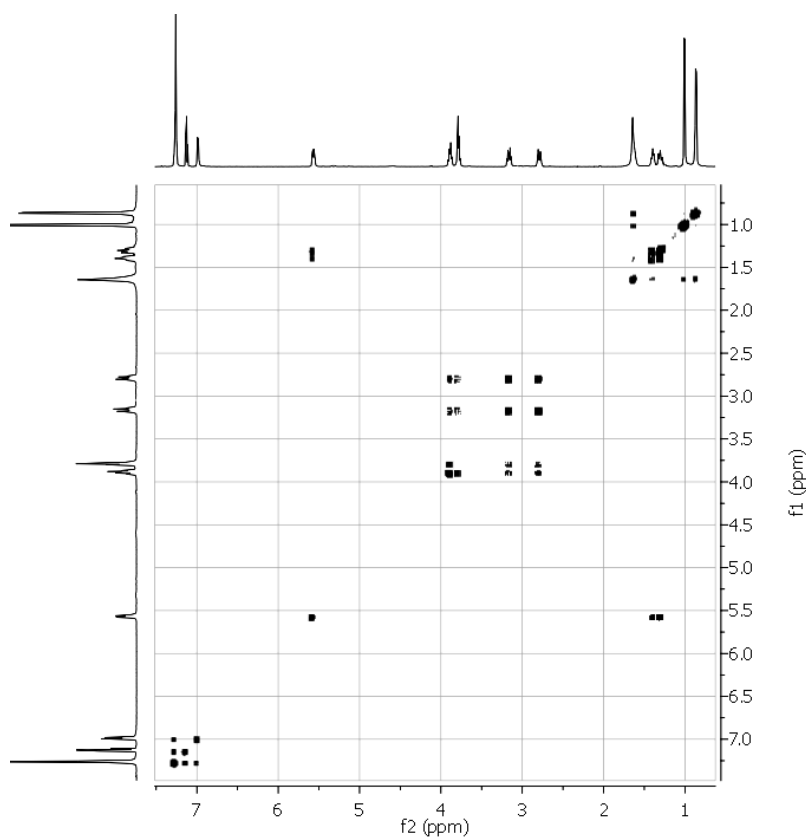
<sup>13</sup>C-RMN



<sup>1</sup>H-RMN



HSQC sensible a fase: Las marcas grises indican el carbono CH<sub>2</sub>

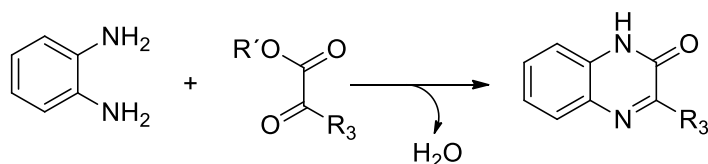


COSY

**Figura 3.36** Espectros de <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H del compuesto 16 y los gráficos de correlación H-C a un enlace de distancia obtenido por un experimento HSQC, y de correlación H-H por medio de un experimento COSY.

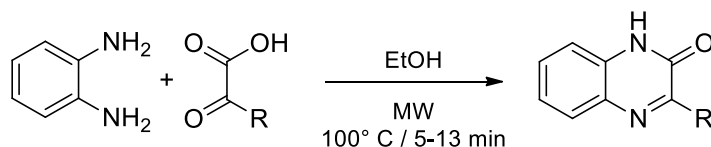
### 1.4.3 1,2-Dihidro-quinoxalin-2-onas (dQNXs)

Para la obtención de las dQNXs, conteniendo distintos sustituyentes en la posición 3 del heterociclo, se empleó la reacción de condensación de *o*-fenilendiamina con compuestos  $\alpha$ -cetocarbonílicos de acuerdo al esquema mostrado en la figura 3.37.



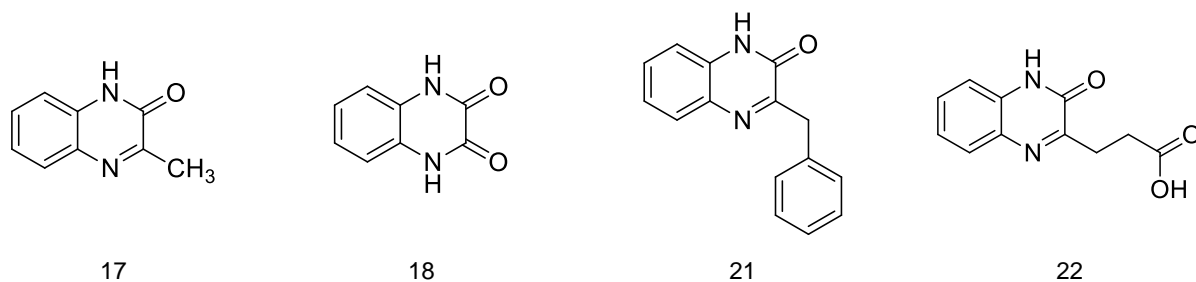
**Figura 3.37** Reacción general de síntesis de dQNXs.

Esta es una ruta de síntesis muy difundida para la preparación de dQNX, y en los inicios de este trabajo de tesis la misma fue optimizada mediante el empleo de MW. El desarrollo de las reacciones de condensación entre *o*-fenilendiamina con  $\alpha$ -cetoácidos por medio de calentamiento con MW, llevó a reducir los tiempos de reacción requeridos, cuando se emplea calentamiento convencional, a períodos que van de 5 a 13 min (figura 3.38). Los rendimientos obtenidos resultaron superiores al 90%.



**Figura 3.38** Reacción general de síntesis de quinoxalin-2-onas empleando MW

Utilizando la reacción señalada y los compuestos dicarbonílicos que tuvieran en su estructura los grupos R requeridos en la posición 3 del heterociclo, de acuerdo al diseño previo (Capítulo II), se preparó una familia de cuatro dQNXs (figura 3.39), los compuestos **17**, **18**, **21** y **22**. La reacción se desarrolló empleando calentamiento por microondas, primero en un microondas doméstico y luego en un equipo de síntesis. En todos los casos empleando cantidades equimoleculares de los reactantes y una mínima cantidad de solvente (etanol), los productos fueron obtenidos como sólidos blancos y cristalinos.



**Figura 3.39** Quinoxalin-2-onas sintetizadas empleando MW

Inicialmente, utilizando un microondas doméstico se obtenían rendimientos que oscilaban entre el 80% y 90%, observándose además, por cromatografía en placa delgada (TLC) y revelado al UV, tres componentes minoritarios que eran removidos en la etapa de purificación por recrystalización con carbón activado. Recientemente, empleando un equipo de microondas de síntesis *mono-modo* se alcanzaron rendimientos que oscilan entre el 90% y 98%, con un componente minoritario revelado por TLC, que se elimina en la etapa de purificación.

Otro grupo de dQNXs que surgieron del diseño fueron los compuestos **23**, **24** y **25** (figura 3.40), en los que se modifica la relación polaridad / tamaño del sustituyente en posición 3, respecto de la quinoxalina **22**. Para ello se obtuvo una serie de derivados, por esterificación del grupo carboxilo presente en dicha molécula, con un rendimiento promedio mayor al 90%. Para la obtención de estos derivados se empleó tecnología de microondas y la reacción fue catalizada mediante el empleo de ácido metanosulfónico soportado sobre alúmina (reactivo AMA). Estas condiciones de reacción fueron establecidas y optimizadas en el marco de la presente Tesis Doctoral, como fue descrito en el punto 1.4.1. de este mismo capítulo.

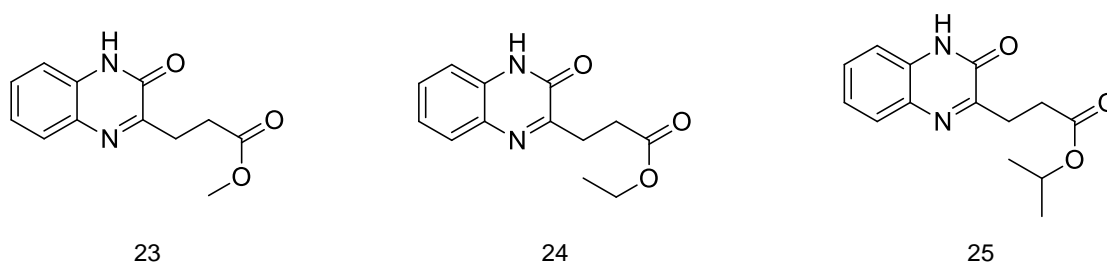


Figura 3.40 Ésteres derivados del compuesto 22

Finalmente, por oxidación de las correspondientes tQNXs, tal como fue descrito previamente en este capítulo (punto 1.4.1, figura 3.27), se completó la serie de dQNXs, sustituidas por restos alquílicos en la posición 3, con la obtención de los compuestos **19** y **20** (figura 3.41)

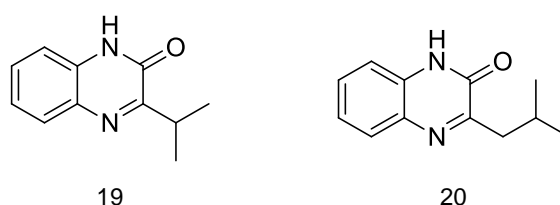


Figura 3.41 Quinoxalinas 19 y 20 obtenidas por oxidación de las tQNXs.

### Caracterización espectroscópica de las dQNXs

**Espectroscopía de infrarrojo:** En los espectros de IR de estos compuestos se observan bandas características de los estiramientos para los grupos: carboxamido (HNC=O) entre 1660 y 1690

$\text{cm}^{-1}$ , carboxilo ( $\text{HOC}=\text{O}$ )  $1730 \text{ cm}^{-1}$  (para el compuesto **22**), éster ( $\text{ROC}=\text{O}$ ) para los derivados del compuesto **22**, alrededor de  $1725 \text{ cm}^{-1}$  y estiramientos O-H (para el compuesto **22**) y N-H entre  $3100\text{-}3300 \text{ cm}^{-1}$ . La figura 3.42 muestra un espectro típico, tomado como ejemplo al compuesto **23**.

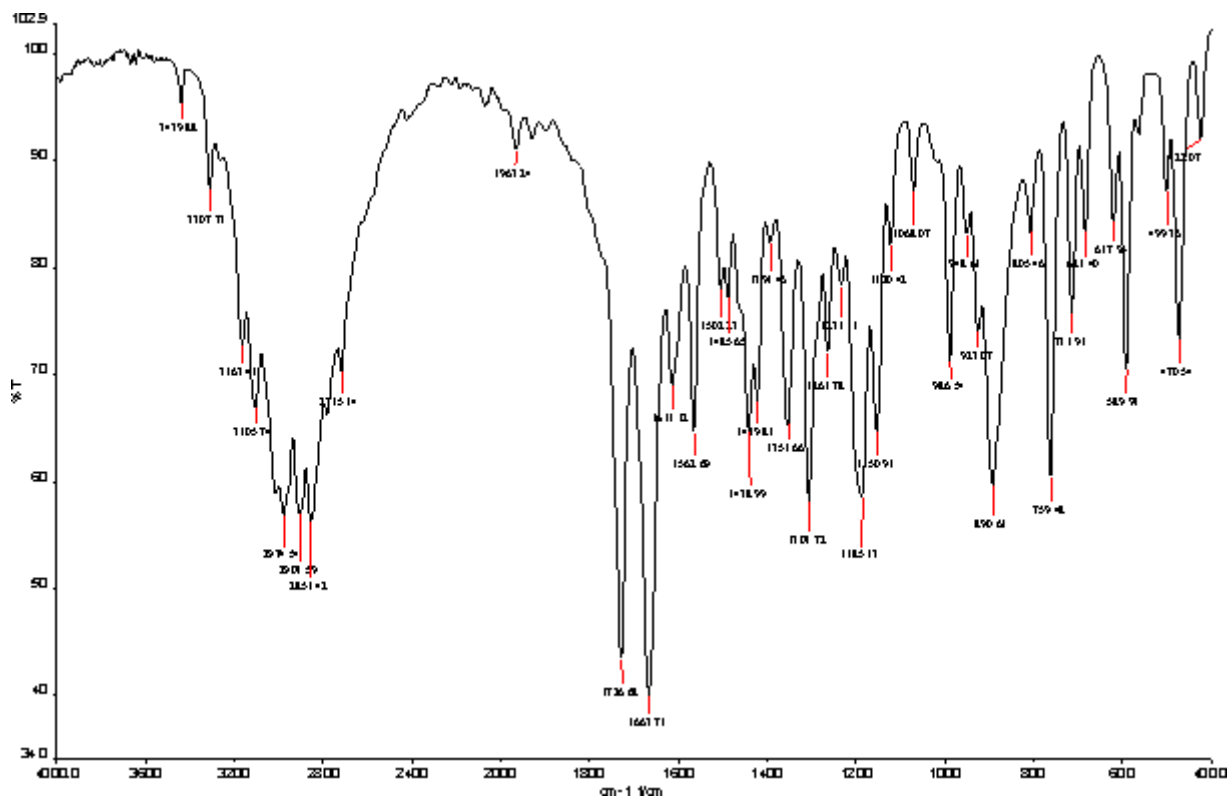


Figura 3.42 Espectro de infrarrojo del compuesto 23.

**Espectrometría de masa:** Mediante el empleo de espectrometría de masa empleando impacto electrónico (70 eV) como fuente de ionización, se evidencian para todas las dQNXs su ión molecular y el ión  $m/z$  145 debido a la pérdida del resto presente en posición 3 del sistema heterocíclico (se hace más notable cuando  $R3 > 1$  átomo de carbono). Tomando como ejemplo al compuesto **23**, espectro en figura 3.43, se observa su ión molecular con  $m/z$  232, la presencia del ión de  $m/z$  145 (pérdida de R3), y particularmente los iones  $m/z$  173 por pérdida del carboxilato, el fragmento  $m/z$  201 por pérdida del grupo alcoxi, y el ión  $m/z$  200, por reordenamiento intramolecular del ión molecular (figura 3.44), el cual es propuesto a partir de fragmentaciones conocidas para esta clase de derivados.<sup>215</sup>

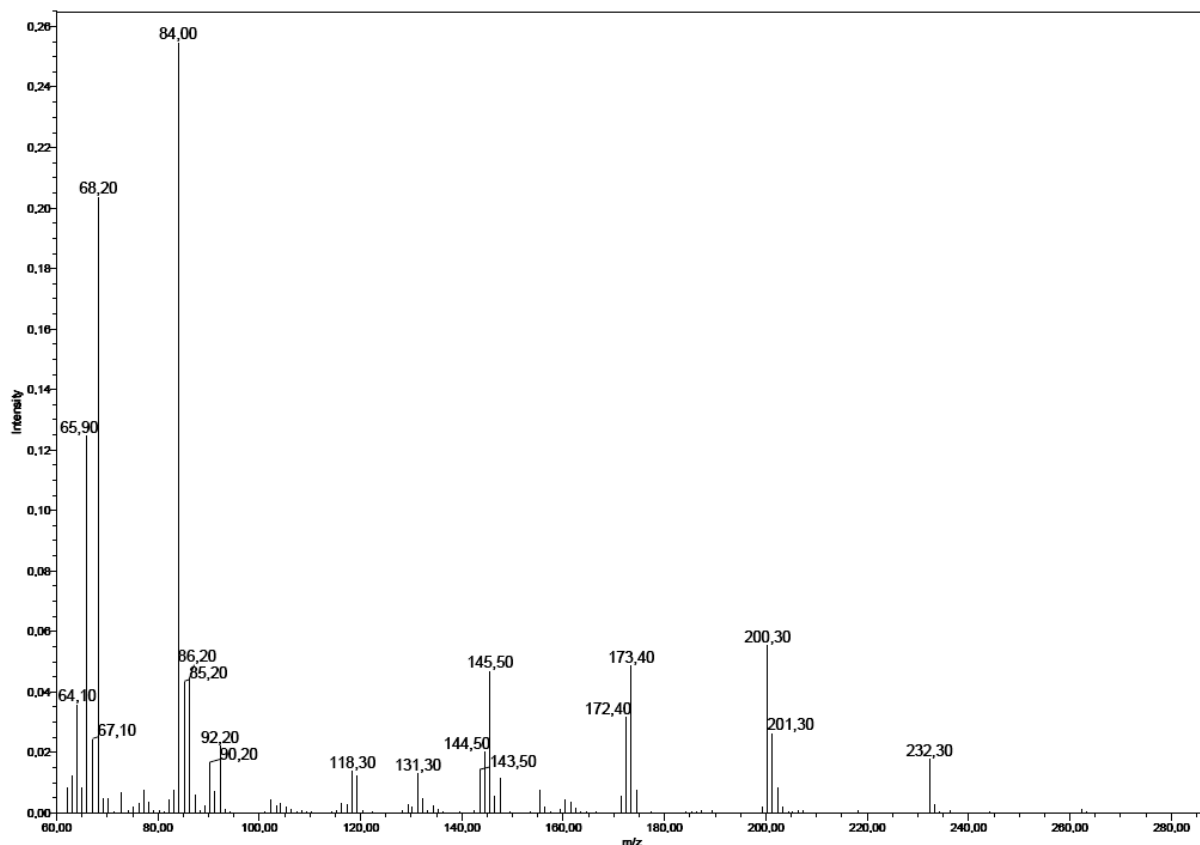


Figura 3.43 Espectro de masa del compuesto 23.

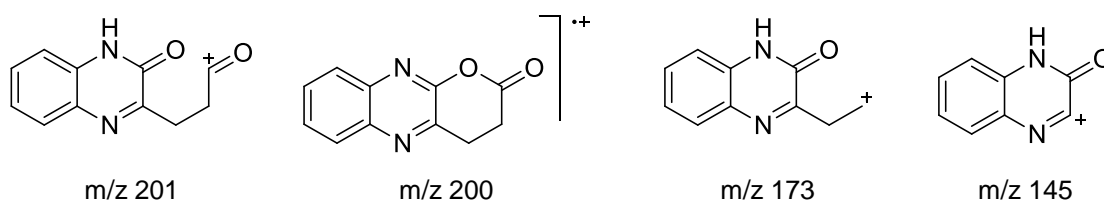
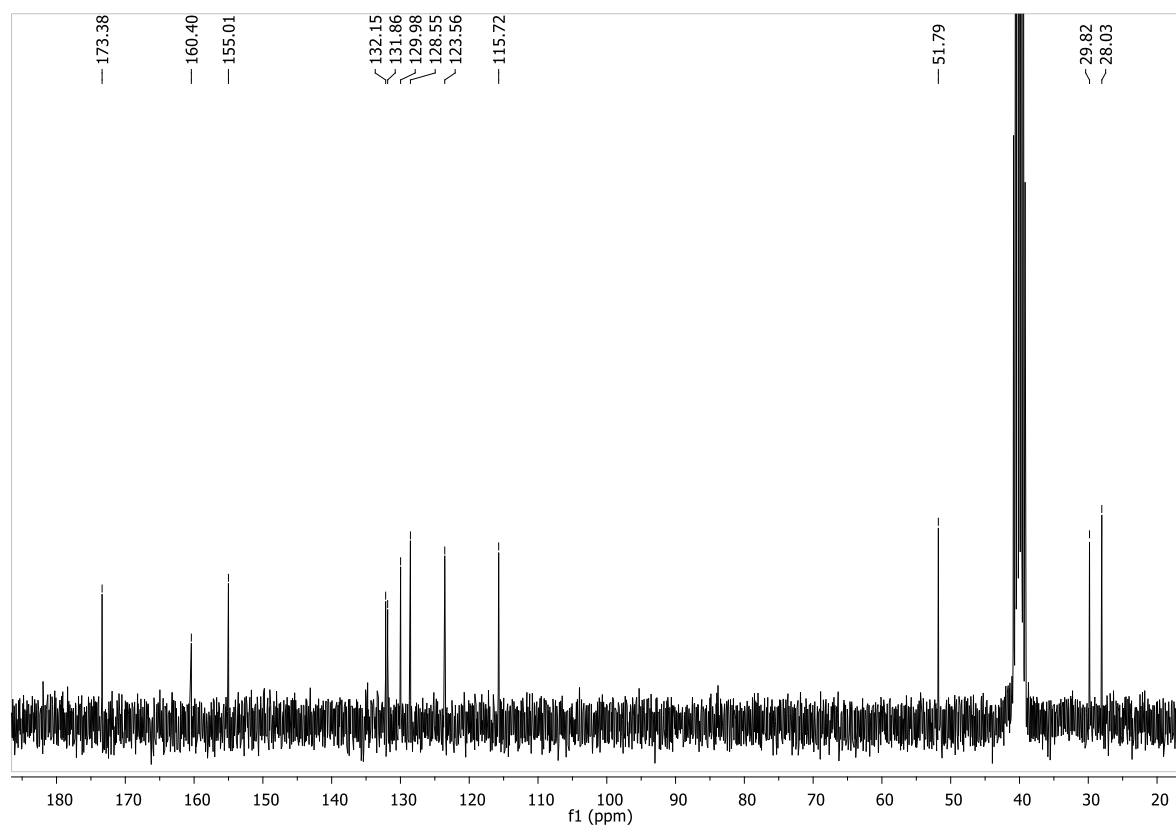


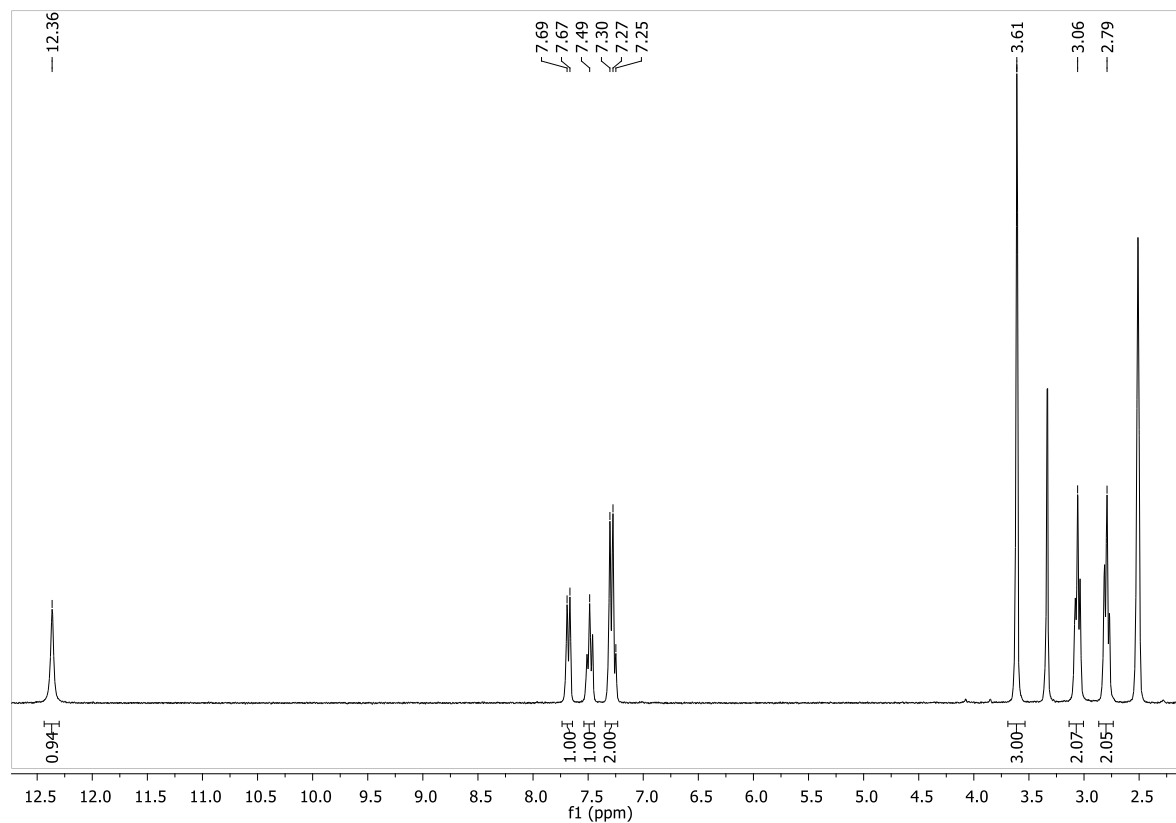
Figura 3.44 Algunos fragmentos del compuesto 23.

**Espectroscopía de RMN:** En esta familia es de destacar en el espectro de  $^{13}\text{C}$  las señales comprendidas entre  $\delta 155$  y  $160$  ppm para el átomo de C2, y las señales comprendidas entre  $\delta 160$  y  $165$  ppm para el átomo de C3. Como es de esperar, en el caso del compuesto dicarbonílico **18** se observa una única señal a  $\delta 155.6$  ppm. En la figura 3.45 se muestra el espectro de compuesto **23**, en éste además se puede apreciar la señal a  $\delta 173.8$  ppm debido al grupo C=O del éster metílico. En el espectro de  $^1\text{H}$  es de destacar la presencia de un átomo de hidrógeno unido a heteroátomo (N u O) a muy bajos campos (por encima de  $10$  ppm). En la región aromática de este espectro ( $\delta 7.7$ - $7.2$  ppm) se aprecian los dobletes para los protones en unidos a C5 y C8, y el juego de tripletes (uno parcialmente solapado) para los protones unidos a C6 y C7. En la región alquílica se observa el singlete para el grupo  $\text{OCH}_3$  a  $\delta 3.61$  ppm y el juego de tripletes típicos para grupo etilo 1,2 disustituido ( $\delta 3.09$  ppm y  $2.79$  ppm). En el espectro de correlación H-C a un

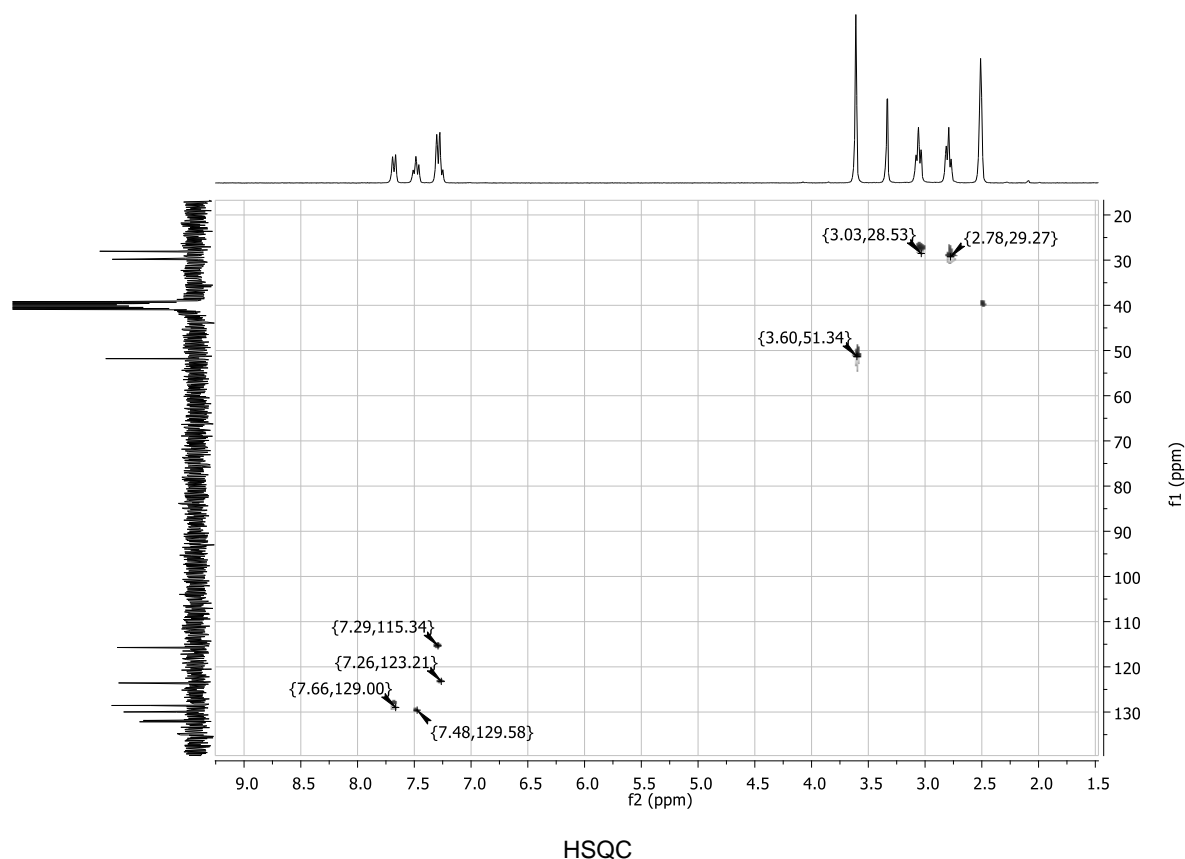
enlace de distancia se pueden observar las correspondencias entre los átomos de hidrógeno con sus respectivos átomos de carbono.



$^{13}\text{C}$ -RMN



$^1\text{H}$ -RMN



**Figura 3.45** Espectros de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  del compuesto 23 y el gráfico de correlación H-C a un enlace de distancia obtenido por un experimento HSQC.

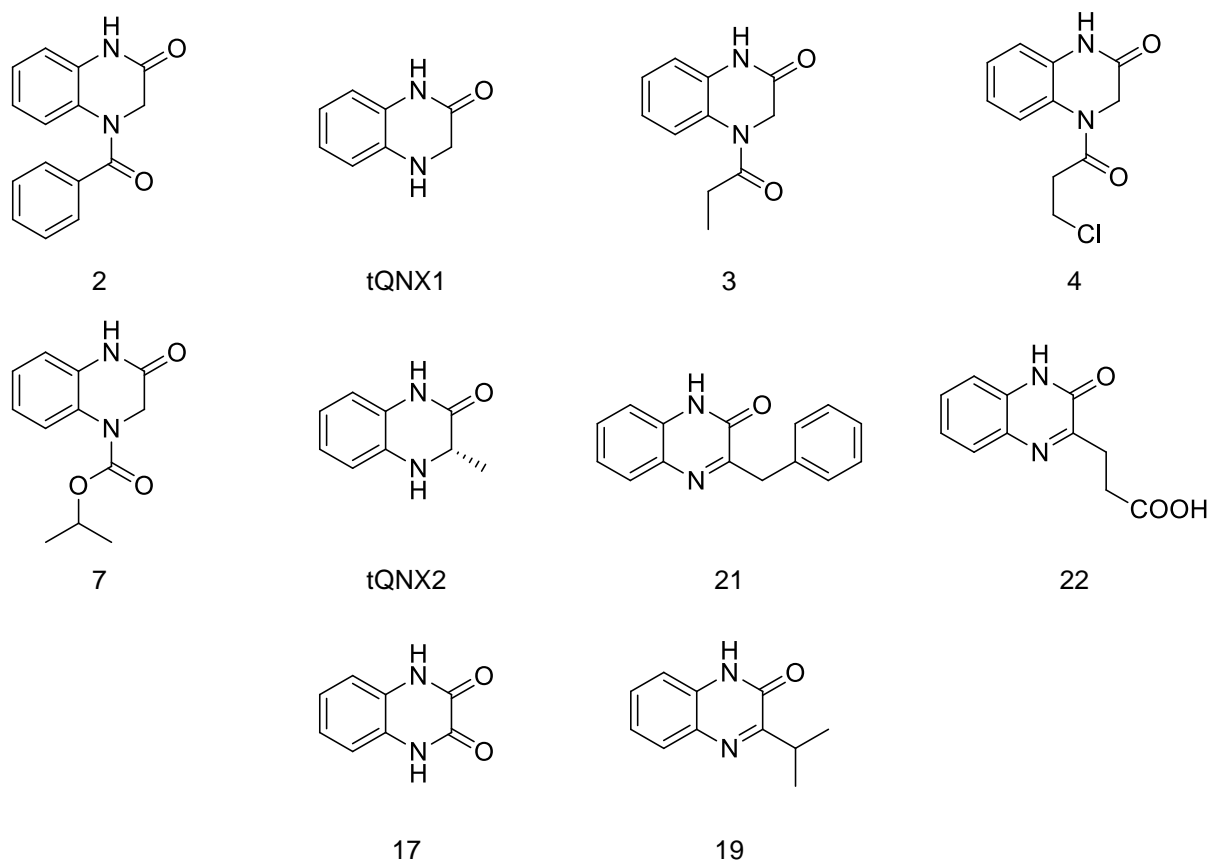
## 1.5 Estudio preliminar de la actividad biológica de algunos de los compuestos preparados

A partir de los resultados teóricos obtenidos y descritos en el Capítulo II, los compuestos quinoxalínicos podrían ser potenciales inhibidores de la cruzipaina. Las estructuras quinoxalínicas que se usaron en el cálculo, para estimar su actividad inhibitoria de la CP, surgieron en función de la disponibilidad sintética de las mismas.

De este modo, una vez sintetizados los compuestos mostrados en la figura 3.46 se incluyeron en un programa de screening de drogas antichagásicas a cargo del Dr. Hugo Cerecetto llevado a cabo por la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay) con el fin de evaluar la potencialidad de las quinoxalinas como agentes activos frente al *Trypanosoma cruzi*. Algunos de los compuestos seleccionados mostraban valores de  $\Delta G$  que alentaron a realizar este estudio.

El ensayo realizado se basa en medir, a una concentración única del compuesto (25  $\mu\text{m}$ ), el porcentaje de inhibición de crecimiento de la forma epimastigote del *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2, el cual es crecido en medio BHT (Brain Heart Infusion + Triptosa) complementado con suero fetal bovino (SFB). En la tabla 3.4 se muestran los porcentajes de inhibición para las quinoxalinas testeadas, así como los valores de  $\Delta G$  calculados en la etapa de diseño.





**Figura 3.46** Quinoxalinas estudiadas por MM-PBSA como posibles prototipos para el desarrollo de antichagásicos.

**Tabla 3.4** Resultados de actividad biológica a 25  $\mu\text{M}$  de concentración de la quinoxalina. El nifurtimox se utilizó como control positivo a 5  $\mu\text{M}$ .

Quinoxalina	$\Delta G_{\text{dock}}$	$\Delta G_{\text{MM-PBSA}}$	% inhibición
<b>tQNX1</b>	-4.6	-8.33	13.7
<b>3</b>	-4.9	-2.31	9.7
<b>4</b>	-5.2	-3.57	9.7
<b>2</b>	-4.8	-5.83	9.5
<b>7</b>	-5.1	-2.98	7.3
<b>tQNX2</b>	-4.9	-6.31	7.0
<b>17</b>	-4.9	- <sup>a</sup>	5.0
<b>21</b>	-6.3	- <sup>a</sup>	inactivo
<b>22</b>	-5.4	- <sup>a</sup>	inactivo
<b>19</b>	-4.9	- <sup>a</sup>	inactivo
Nifurtimox	-	-	28.1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> El ligando se desprendió de su sitio de unión durante el equilibrado de la DM.

<sup>b</sup> porcentaje obtenido a concentración 5  $\mu\text{M}$ .

Como puede observarse en la tabla, si bien los porcentajes de inhibición no son elevados, muestran buena correlación con lo predicho a través de los cálculos, a menor valor de  $\Delta G_{\text{MM-PBSA}}$ , mayor porcentaje de inhibición.

## 2 Conclusiones

- Para todas las familias de quinoxalinas sintetizadas, se han optimizado las rutas convencionales de síntesis descritas en la literatura, utilizando microondas como fuente de energía en una o más de las etapas sintéticas desarrolladas.
- Las síntesis de las tQNXs, intermediarios sintéticos de las 4-acil-tQNXs, se planteó a partir de nitrofenil derivados de  $\alpha$ -aminoácidos homoquirales. A raíz de esto, y considerando que la forma zwitteriónica de los aminoácidos disminuye la nucleofilia del grupo amino, se consideró la preparación de los ésteres correspondientes. Para ello se optimizó una técnica de preparación de ésteres por medio de MW con el empleo de un catalizador soportado (AMA). La robustez de la técnica se probó con otros ácidos carboxílicos, hallándose aplicabilidad en un amplio espectro de casos con altos rendimientos.
- También se estudió la síntesis de los nitrofenil derivados a través del empleo de la sal potásica de los  $\alpha$ -aminoácidos, pero no se alcanzaron rendimientos superiores que con sus análogos esterificados. Sin embargo, teniendo en cuenta publicaciones recientes que incluyen grafeno en sus técnicas de calentamiento por MW, se comprobó que con el agregado de grafeno al medio de reacción en que se desarrolla la SNA, se obtienen rendimientos superiores y equivalentes empleando los  $\alpha$ -aminoácidos en cualquiera de sus formas (éster o sal). Dada la simpleza de su preparación, se empleó la sal potásica en la preparación de los nitrofenil derivados.
- En la reducción de los nitrofenil derivados se ensayaron dos condiciones de reacción. La reacción de reducción con formiato de amonio en presencia de paladio adsorbido sobre carbón activado conduce a la reducción total del nitrofenil derivado, pero produce como productos finales una mezcla tQNX/dQNX en proporciones de 60:40. El calentamiento posterior a reflujo, conduce a la formación total de dQNX. En cambio, la reacción de reducción con  $\text{SnCl}_2$  en medio ácido produce una mínima cantidad de dQNX, menor o igual al 10%.
- Las acilaciones de tQNX fueron realizadas de forma convencional, en un medio de acetato de etilo/acetonitrilo y el cloruro de ácido o el cloroformiato correspondiente; en presencia de hexametilentetramina o trietilamina, como aceptores del cloruro de hidrógeno producido durante la reacción.

- Las dQNXs se prepararon mediante la reacción de condensación entre *o*-fenilendiamina y un  $\alpha$ -cetoácido; la misma se dio con alto rendimiento y en un corto tiempo con el empleo de MW.
- Si bien sería adecuado realizar un ensayo sobre la cruzipaína aislada, como para poder cotejar los resultados obtenidos en los estudios computacionales sobre CP, los ensayos preliminares sobre *T. cruzi* fueron alentadores para continuar el estudio de actividad de compuestos sintetizados. Los compuestos **tQNX1**, **2**, **3** y **4** mostraron aceptable actividad, de acuerdo a lo previsto por el cálculo y serían prototipos para continuar el desarrollo de antichagásicos con estructura quinoxalínica.

### 3 Metodología experimental

#### 3.1 Síntesis química

---

Los reactivos comerciales fueron usados sin purificación. Las síntesis fueron llevadas a cabo en un microondas doméstico marca BGH o Zenith con una potencia de 650W. Para las reacciones realizadas con el microondas de síntesis se utilizó un equipo Anton Parr Monowave 300, de potencia regulable entre 1 y 600 W, equipado con sensor de presión y temperatura.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Thomas Hoover. Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN fueron realizados en  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{DMSO-}d_6$ , según se indica en cada caso, un equipo Bruker Avance II de 500 Mhz o en un Buker Avance II de 300 Mhz. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm, usando como referencia el pico residual del solvente. Las constantes de acoplamiento están dadas en Hz y las multiplicidades de las señales en los espectros de RMN están abreviadas de la siguiente manera: s: singlete; sa: singlete ancho; d: doblete; dd: doble doblete; t: triplete; dt: doble triplete; td: triple doblete; m: multiplete y ac: absorción compleja. Los espectros de infrarrojo se realizaron en un equipo FT-IR Shimadzu IRAffinity, y los espectros de masa en un equipo Waters ThermaBeam con fuente de ionización por impacto electrónico (70 eV), equipado con un analizador de cuadrupolo. Las rotaciones ópticas fueron determinadas en un polarímetro Perkin–Elmer 141 a temperatura ambiente y en la línea D de la lámpara de sodio. Los análisis elementales fueron realizados en un Carlo Erba Elemental Analyzer 1106. Las cromatografías en capa delgada preparativa (TLC-p) y las cromatografías en capa delgada (TLC) se realizaron sobre sílica gel GF<sub>254</sub> (Merck). Las columnas cromatográficas fueron realizadas a presión atmosférica sobre sílica gel Merck 60, 230-400 mesh.

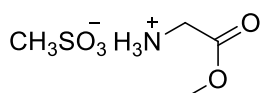
**Procedimiento general de síntesis de los ésteres derivados de  $\alpha$ -aminoácidos en un equipo de microondas de síntesis.**

El catalizador AMA 2:3 fue preparado mezclando en un mortero  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (3 mol), previamente activado por calentamiento en estufa a  $150\text{ }^\circ\text{C}$  durante 72 h, con ácido metanosulfónico (2 mol) hasta homogeneidad.

En una reacción típica de esterificación de aminoácidos se mezclaron 5 g de AMA 3:2, 10 mmoles del ácido carboxílico y 2 ml del alcohol en un tubo de reacción, cerrado herméticamente y provisto de un agitador magnético. La temperatura se fijó en  $120\text{ }^\circ\text{C}$  y la mezcla se irradió por 25 min. Luego de enfriada, la mezcla de reacción fue diluida con éter (50 ml), filtrada por gravedad y lavada con éter. Para los ésteres obtenidos como sales del ácido metanosulfónico la fase orgánica fue secada sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrada y concentrada al vacío. Para obtener la base libre, previo al secado sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , la fase orgánica fue lavada con 3 porciones de 30 ml solución de NaOH al 1%.

### Metanosulfonato de la glicina metil éster<sup>216</sup>

Alcohol utilizado: metanol. Rendimiento: 1.7 g, 90%.

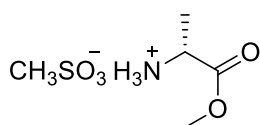


Aceite amarillo.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 2.77 (s; 3H;  $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ ), 3.85 (s; 3H;  $\text{OCH}_3$ ), 3.96 (m; 2H;  $\text{CH}_2$ ;  $\text{NCH}_2$ ), 7.70 (sa; 3H;  $\text{NH}_3^+$ ).

### Metanosulfonato de la (S)-alanina metil éster<sup>217</sup>

Alcohol utilizado: metanol. Rendimiento: 1.9 g, 95%.

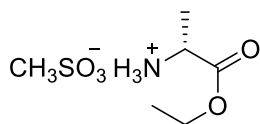


Aceite amarillo.

$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 1.61 (d;  $J=7.30$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 2.75 (s; 3H;  $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ ), 3.80 (s; 3H;  $\text{OCH}_3$ ), 4.17 (m; 1H;  $\text{NCH}$ ), 8.09 (sa; 3H;  $\text{NH}_3^+$ ).

### Metanosulfonato de la (S)-alanina etil éster<sup>218</sup>

Alcohol utilizado: etanol. Rendimiento: 2.0 g; 95%.

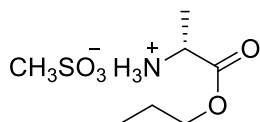


Aceite amarillo.

$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 1.29 (t;  $J=7.10$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 1.61 (d;  $J=7.30$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 2.75 (s; 3H;  $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ ), 4.14 (m; 1H;  $\text{CH}$ ), 4.24 (m; 2H;  $\text{CH}_2$ ); 8.00 (sa; 3H;  $\text{NH}_3^+$ ).

### Metanosulfonato de la (S)-alanina propil éster<sup>219</sup>

Alcohol utilizado: propanol. Rendimiento: 2.1 g; 95%.

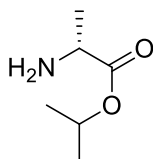


Aceite amarillo.

$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 0.91 (m; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 1.61 (m; 5H), 2.74 (s; 3H;  $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ ), 3.55 (t;  $J=6.70$  Hz; 1H), 4.12 (m; 2H), 7.86 (sa; 3H;  $\text{NH}_3^+$ ).

### (S)-Alanina isopropil éster<sup>219</sup>

Alcohol utilizado: isopropanol. Rendimiento: 1.2 g, 95%.

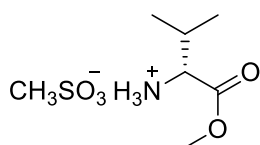


Aceite amarillo.

$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 1.24 (d;  $J=6.20$  Hz; 6H; 2 x  $\text{CH}_3$ ), 1.31 (d;  $J=7.00$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 2.05 (sa; 2H;  $\text{NH}_2$ ), 3.50 (m; 1H), 5.01 (m; 1H).

### Metanosulfonato de (S)-valina metil éster<sup>217</sup>

Alcohol utilizado: metanol. Rendimiento: 2.0 g, 88%.

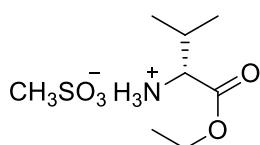


Aceite amarillo.

$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 1.07 (d;  $J=7.10$  Hz; 6H; 2 x  $\text{CH}_3$ ), 2.34 (m; 1H), 2.75 (s; 3H;  $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ ), 3.80 (s; 3H;  $\text{OCH}_3$ ), 4.00 (m; 1H;  $\text{NCH}$ ); 7.75-7.93 (sa; 3H;  $\text{NH}_3^+$ ).

### Metanosulfonato de (S)-valina etil éster<sup>216</sup>

Alcohol utilizado: etanol. Rendimiento: 2.1 g, 88%.

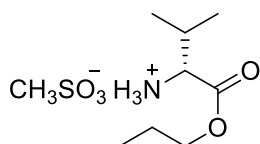


Aceite amarillo.

$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 1.06 (d;  $J=7.10$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 1.08 (d;  $J=6.90$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 1.29 (t;  $J=7.1$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 2.35 (m; 1H), 2.75 (s; 3H;  $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ ), 3.97 (m; 1H), 4.26 (ac; 2H), 7.75-7.91 (sa; 3H  $\text{NH}_3^+$ ).

### Metanosulfonato de (S)-valina propil éster

Alcohol utilizado: propanol. Rendimiento: 2.2 g, 88%.



Aceite amarillo.

$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 0.97 (t; 3H;  $J=7.50$  Hz;  $\text{CH}_3$ ), 1.08 (d; 3H;  $J=8.10$  Hz;  $\text{CH}_3$ ), 1.11 (d; 3H;  $J=8.10$  Hz;  $\text{CH}_3$ ), 1.71 (m; 2H), 2.37 (m; 1H), 2.77 (s; 3H;  $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ ), 4.01 (m; 1H), 4.16 (m; 2H), 7.75-7.91 (sa; 3H;  $\text{NH}_3^+$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 10.3 ( $\text{CH}_3$ ), 17.5 ( $\text{CH}_3$ ), 18.3 ( $\text{CH}_3$ ),

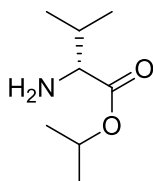
21.7, 29.3, 58.4 (OCH<sub>2</sub>), 67.7 (NCH), 169.0 (C=O).

Anal. calc. para C<sub>9</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>S: C, 42.34; H, 8.29; N, 5.49; S, 12.56.  
Encontrado: C, 42.10; H, 8.40; N, 5.30; S, 12.52.

### (S)-Valina isopropil éster

Alcohol utilizado: isopropanol. Rendimiento: 1.4 g, 88%.

Aceite amarillo.



<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 0.88 (d; J=6.90 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>), 0.96 (d; J=6.90 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>), 1.24 (dd; J=6.40 Hz, J'=6.20 Hz; 6H; 2 x CH<sub>3</sub>), 2.00 (dd; J=6.90 Hz, J'=5.00 Hz; 1H), 3.22 (d; J=5.00 Hz; 1H), 5.00 (m; 1H).

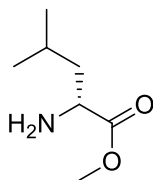
<sup>13</sup>C-RMN (125 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 17.3, 22.1, 32.4, 60.2 (OCH), 68.3 (NCH), 175.3 (C=O).

Anal. calc. para C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>: C, 60.35; H, 10.76; N, 8.80. Encontrado: C, 60.20; H, 10.90.; N, 8.71.

### (S)-Leucina metil éster

Acohol utilizado: metanol. Rendimiento: 1.2 g, 80%.

Aceite amarillo.



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 0.91 (sa; 6H; 2 x CH<sub>3</sub>), 1.67 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 1.74 (m; 1H; CH), 3.76 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>), 3.96 (m; 1H; NCH), 7.90-8.60 (sa; 2H; NH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 22.4, 22.6, 24.2, 40.0, 51.2 (NCH), 53.4 (OCH<sub>3</sub>), 170.8 (C=O).

Anal. calc. para C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>: C, 57.90; H, 10.41; N, 9.65. Encontrado: C, 57.80; H, 10.70.; N, 9.60.

## Procedimiento general para la preparación de N-(2-nitrofenil)-aminoácidos.

- A. *A partir de ésteres de aminoácidos:* En 10 ml de acetonitrilo se agregaron 10 mmoles del éster, 10 mmoles de FNB (ó 2-nitroclorobenceno), 22 mmoles de diisopropilamina o hexametilentetramina y 10 mg de grafeno. La mezcla se calentó empleando MW, en un tubo reactor cerrado herméticamente, a 100° C entre 30 y 40 minutos. Al finalizar, el volumen de solvente se redujo a la mitad utilizando presión reducida y la solución resultante se dispuso para su purificación por columna cromatográfica, utilizando como solvente de elución Hexano/Cloroformo 50:50. Los derivados obtenidos por esta vía resultaron líquidos de color naranja.

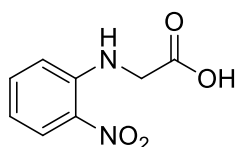
B. *A partir de aminoácidos libres:* A 20 ml de una solución de  $K_2CO_3$  al 20% se agregaron 10 mmoles del aminoácido, 10 mmoles de FNB y 10 mg de grafeno. La mezcla se calentó empleando MW, en un tubo reactor cerrado herméticamente, a  $120^\circ C$  entre 15 y 20 minutos, dependiendo del aminoácido utilizado. Al finalizar este proceso se agregaron 30 ml de agua y se lavó con 3 porciones de 30 ml éter cada una. Luego se acidificó y se extrajo con 5 porciones de 30 ml de acetato de etilo cada una. La fase orgánica se secó sobre  $Na_2SO_4$  y el solvente se removió a presión reducida. Los derivados obtenidos por esta vía resultaron sólidos cristalinos de color naranja o amarillo.

### Ácido 2-(2-nitrofenilamino)etanoico ND1

Aminoácido empleado: glicina. Tiempo de reacción: 16 min. Rendimiento: 1.8 g (sólido amarillo), 90%.

PF:  $192 - 194^\circ C$  (lit.  $193^\circ C$ ).<sup>220</sup>

MS (m/z): 196.0



$^1H$ -RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) (DMSO- $d_6$ ): 4.17 (sa; 2H;  $NCH_2$ ), 6.73 (t; J= 7.47 Hz; 1H; ArH), 6.91 (d; J= 8.50 Hz; 1H; ArH), 7.54 (t; J= 6.88 Hz; 1H; ArH), 8.09 (d; J= 8.60 Hz; 1H; ArH), 8.37 (sa; 1H; NH).

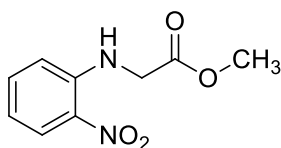
$^{13}C$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) (DMSO- $d_6$ ): 44.6 ( $CH_2$ ), 115.4, 116.2, 126.6, 131.8, 137.0, 144.9, 171.5 (C=O).

### 2-(2-Nitrofenilamino)acetato de metilo ND2<sup>221</sup>

Éster empleado: glicina metil éster. Tiempo de reacción: 35 min. Rendimiento: 1.9 g, 90%.

Aceite amarillo

MS (m/z): 210.0

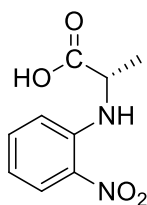


$^1H$ -RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $DCCl_3$ ): 3.83 (s; 3H;  $OCH_3$ ), 4.11 (d; J=4.40; 2H;  $NCH_2$ ), 6.73 (t; J= 8.07 Hz; 1H; ArH), 6.73 (d; J=8.10 Hz; 1H; ArH), 7.48 (t; J= 8.10 Hz; 1H; ArH), 7.48 (d; J= 8.80 Hz; 1H; ArH), 8.41 (sa; 1H; NH).

$^{13}C$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $DCCl_3$ ): 44.7 ( $CH_2$ ), 52.6 ( $OCH_3$ ), 113.6, 116.3, 127.0, 132.8, 136.3, 144.1, 169.8 (C=O).

### Ácido (2S)-2-(2-nitrofenilamino)propanoico ND3

Aminoácido empleado: (S)-alanina. Tiempo de reacción: 15 min. Rendimiento: 1.9 g (sólido amarillo), 92%.



PF:  $144^\circ C$  (lit.  $144^\circ C$ ).<sup>207</sup>

MS (m/z): 210.0

$^1H$ -RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $DCCl_3$ ): 1.66 (d; J= 7.16 Hz; 3H;  $CH_3$ ), 4.28 (m; 1H; NCH); 6.73 (m; 2H; ArH), 7.45 (t; J= 7.60 Hz; 1H; ArH), 8.19 (d;

$J=7.90$  Hz; 1H; ArH), 8.32 (sa; 1H; NH).

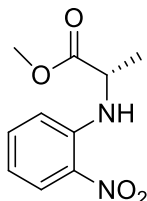
$^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 18.5 ( $\text{CH}_3$ ), 51.2 (CH), 113.8, 116.2, 126.9, 132.4, 136.5, 143.8, 177.5 (C=O).

### (2S)-2-(2-nitrofenilamino)propanoato de metilo ND4<sup>214</sup>

Éster empleado: (S)-alanina metil éster. Tiempo de reacción: 35 min. Rendimiento: 2.0 g, 89%.

Aceite amarillo

MS (m/z): 224.0



$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 1.67 (d;  $J=6.70$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 3.79 (s; 3H;  $\text{OCH}_3$ ), 4.28-4.36 (m; 1H; NCH), 6.27 (sa; 1H; NH); 6.70-6.76 (m; 2H; ArH), 7.42-7.48 (m; 1H; ArH), 8.22 (dd;  $J=8.80$  Hz,  $J'=2.00$  Hz; 1H; ArH), 8.32 (sa; 1H; NH).

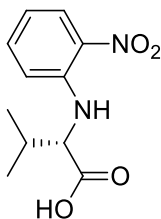
$^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 18.5 ( $\text{CH}_3$ ), 51.1, 52.5, 113.7, 116.1, 126.9, 132.4, 136.2, 146.8, 173.0 (C=O).

### Ácido (2S)-3-metil-2-(2-nitrofenilamino)butanoico ND5

Aminoácido empleado: (S)-valina. Tiempo de reacción: 18 min. Rendimiento: 2.1 g (sólido amarillo), 88%.

PF: 83° C (lit. 85° C).<sup>222</sup>

MS (m/z): 238.0



$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 1.14 (d;  $J=7.34$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 1.17 (d;  $J=6.25$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 2.34-2.45 (m; 1H; CH), 4.12 (t;  $J=8.27$  Hz; 1H; NCH), 6.75 (m; 2H; ArH), 7.45 (t;  $J=7.70$  Hz; 1H; ArH), 8.22 (dd;  $J=8.53$  Hz,  $J'=1.10$  Hz; 1H; ArH), 8.41 (d;  $J=7.54$  Hz; 1H; NH), 9.10-10.10 (1H; sa; OH).

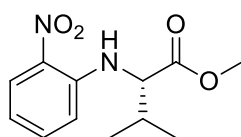
$^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 18.2 ( $\text{CH}_3$ ), 19.2 ( $\text{CH}_3$ ), 31.2 (CH), 61.2 (CH), 113.7, 116.4, 127.1, 132.8, 136.4, 144.4, 177.8 (C=O).

### (2S)-3-metil-2-(2-nitrofenilamino)butanoato de metilo ND6<sup>214</sup>

Éster empleado: (S)-valina metil éster. Tiempo de reacción: 38 min. Rendimiento: 2.2 g, 91%.

Aceite naranja

MS (m/z): 252.0



$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 1.08 (d;  $J=6.70$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 1.13 (d;  $J=7.10$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 2.26-2.49 (m; 1H; CH), 3.77 (s; 3H;  $\text{OCH}_3$ ), 4.07 (t;  $J=8.27$  Hz; 1H; NCH), 6.72 (m; 2H; ArH); 7.44 (t;  $J=7.54$  Hz; 1H; ArH), 8.21 (d;  $J=8.55$  Hz; 1H; ArH), 8.40 (d;  $J=7.00$  Hz; 1H; NH).

$^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 18.5 ( $\text{CH}_3$ ), 19.3 ( $\text{CH}_3$ ), 31.4 (CH), 52.3 ( $\text{OCH}_3$ ), 61.7 (CH), 113.7, 116.2, 127.1, 136.3, 136.4, 144.6, 172.2

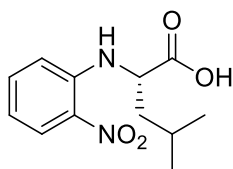


(C=O).

**Ácido (2S)-4-metil-2-(2-nitrofenilamino)pentanoico ND 7<sup>223</sup>**

Aminoácido empleado: (S)-leucina. Tiempo de reacción: 20 min. Rendimiento: 2.0 g (sólido naranja que descompone al intentar determinar su PF), 90%.

MS (m/z): 252.1



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 0.89 (d; J= 6.56 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>), 0.97 (d; J= 6.56 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>), 1.70-1.82 (m, 3H, CHCH<sub>2</sub>), 4.40 (m; 1H; NCH), 6.76 (m, 1H; ArH), 6.98 (d; J= 8.25 Hz; 1H; ArH), 7.57 (m; 1H; ArH), 8.10 (dd; J= 8.55 Hz, J= 1.56 Hz; 1H; ArH), 8.17 (d; J= 7.70 Hz; 1H; NH).

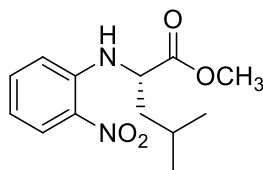
<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 22.5 (CH<sub>3</sub>); 23.1 (CH<sub>3</sub>), 25.1 (CH<sub>2</sub>), 40.9 (CH), 54.1 (CH), 115.2, 116.6, 126.8, 132.0, 137.3, 144.6, 174.2 (C=O).

**(2S)-4-metil-2-(2-nitrofenilamino)pentanoato de metilo ND8<sup>214</sup>**

Éster empleado: (S)-leucina metil éster. Tiempo de reacción: 40 min. Rendimiento: 2.3 g, 90%.

Aceite naranja

MS (m/z): 266.1



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 0.96 (d; J=5.90 Hz; 3H, CH<sub>3</sub>), 1.03 (d; J=5.90 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>), 1.78-1.88 (m; 3H; CHCH<sub>2</sub>), 3.76 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>), 4.25 (m; 1H; NCH), 6.68-6.78 (m; 2H; ArH), 7.44 (t; J= 7.90 Hz; 1H; ArH), 8.20 (dd; J= 8.42 Hz, J'= 1.35 Hz; 1H; ArH), 8.20 (d; J=8.42 Hz; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 21.9 (CH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>3</sub>), 25.0 (CH<sub>2</sub>), 41.7 (CH), 52.5 (OCH<sub>3</sub>), 54.5 (CH), 113.6, 116.3, 127.0, 132.7, 136.4, 144.3, 173.2 (C=O).

**Procedimiento general para la preparación de las tQNX a partir de nitrofenil-derivados.**

- A. *Empleando formiato de amonio*: Se disolvieron 10 mmoles del nitroderivado (ácido o éster), 150 mmoles de formiato de amonio (9.45 g) y 4.3 g de Pd-C en 200 ml de etanol. La mezcla se dejó con agitación durante 12 hs. Luego fue filtrada y se removió el etanol a presión reducida. Al residuo se lo purificó por columna cromatográfica empleando como fase móvil: hexano/cloroformo/isopropanol 50:30:20, para dar un compuesto sólido.
- B. *Empleando cloruro de estaño (II)*: Se disolvieron 10 mmoles del nitroderivado (ácido o éster), en 30 ml de etanol. La mezcla se llevó a la temperatura de reflujo del solvente con agitación magnética. Sobre esta solución se agregó por goteo, durante un lapso de 60 min, una mezcla de 36 mmoles de SnCl<sub>2</sub> en 26 ml de HCl 5 M. Luego de completado el agregado el calentamiento se continuó por 60 min adicionales. Finalmente, se redujo el volumen de etanol a presión reducida y se dejó la solución resultante a 5° C durante 12 hs.

para obtener el clorhidrato de la quinoxalina, que por filtración, empleando vacío, se aisló como un sólido rojizo. El mismo se secó al vacío y se conservó como tal sin más purificación hasta el momento de su utilización. Una muestra analítica (100 mg) fue disuelta en  $K_2CO_3$  al 10 % y extraída en acetato de etilo. Se seco sobre  $Na_2CO_3$  y el solvente se removió a presión reducida. El residuo en forma de base libre se utilizó en la caracterización de las tQNXs.

### Procedimiento general para la preparación de tQNX1 a partir de ácido cloroacético.

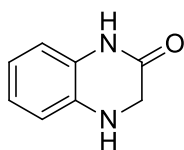
En el tubo reactor del microondas de síntesis se dispersó 1.1 g de o-fenilendiamina (10 mmoles) con 1.0 g de ácido cloroacético en 20 ml de etanol. La mezcla se irradió, manteniendo agitación magnética, durante 1 minuto a 30 W y 10 minutos a 15 W. Finalmente, el producto se recrystalizó de etanol, para dar 1.25 g de la tQNX1 (rendimiento: 85%).

#### 1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ona tQNX1

Rendimiento: 1.3 g, 90%, como base libre.

PF: 138-140° C (lit. 136-138° C).<sup>208</sup>

IR ( $cm^{-1}$ ): 3371, 3183, 1668, 1602, 1504.



MS (m/z): 148.2

$^1H$ -RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) (DMSO- $d_6$ ): 2.49 (sa; 1H; NH), 3.75 (sa; 2H; NCH<sub>2</sub>), 6.68-6.71 (m; 1H; ArH), 6.75-6.81 (m; 3H; ArH), 10.33 (sa; 1H; NH).

$^{13}C$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) (DMSO- $d_6$ ): 46.7 (CH<sub>2</sub>), 115.1, 115.4, 119.9, 123.0, 127.5, 132.6, 166.6 (C=O).

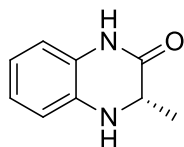
#### (3S)-3-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ona tQNX2

Rendimiento: 1.5 g, 90%, como base libre.

PF: 110° C (lit. 112° C).<sup>183</sup>

$[\alpha]$ : +8.30 (c 0.6, CHCl<sub>3</sub>)

IR ( $cm^{-1}$ ): 3370, 3180, 1680, 1600, 1500



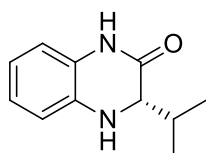
MS (m/z): 162.1

$^1H$ -RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 1.49 (d; J= 6.71 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>); 2.64 (sa; 1H; NH); 4.05 (c; J= 6.80 Hz; 1H; NCH); 6.71 (d; J= 7.83 Hz; 1H; ArH), 6.76-6.82 (m; 2H; ArH), 6.86-6.96 (m; 1H; ArH), 8.89 (sa; 1H; NH).

$^{13}C$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 17.9 (CH<sub>3</sub>), 52.0 (CH), 114.1, 115.5, 119.6, 123.8, 125.5, 133.4, 169.6 (C=O).

**(3S)- 3-(2-metiletil)- 1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ona tQNX3**

Rendimiento: 1.4 g, 75%, como base libre.

PF: 98-99° C (lit. 100° C).<sup>183</sup>[α]: +21.0 (c 0.6, CHCl<sub>3</sub>)IR (cm<sup>-1</sup>): 3369, 3188, 1688, 1600, 1501.

MS (m/z): 190.1

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 1.00 (d; J= 6.67 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>), 1.07 (d; J= 6.90 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>), 2.20-2.37 (m; 1H; CH), 3.80 (d; J= 5.65 Hz; 1H; NCH), 4.09 (sa; 1H; NH), 6.65-6.80 (m; 3H; ArH), 6.89 (td; J= 7.55 Hz, J'=1.10 Hz; 1H; ArH), 9.52 (sa; 1H; NH).

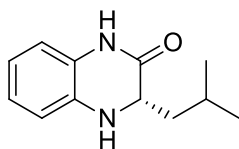
<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 17.5 (CH<sub>3</sub>), 19.0 (CH<sub>3</sub>), 30.9 (CH), 61.8 (CH), 113.4, 115.5, 118.8, 123.9, 124.9, 133.3, 168.7 (C=O).

**(3S) 3-(2-metilpropil)- 1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ona tQNX4<sup>183</sup>**

Rendimiento: 1.6 g (sólido que descompone al intentar determinar su PF), 80%, como base libre.

[α]: +32.0 (c 0.3, CHCl<sub>3</sub>)IR (cm<sup>-1</sup>): 3300, 3100, 1670, 1601, 1501

MS (m/z): 204.4



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 0.97 (d; J= 6.67 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>), 1.00 (d; J= 6.67 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>), 1.60-1.73 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 1.75-1.87 (m; 1H; CH), 3.96-4.03 (dd; J=8.70 Hz, J'=5.07; 1H; NCH), 4.10 (sa; 1H; NH), 6.66-6.80 (m; 2H; ArH), 6.82-6.94 (m; 2H; ArH), 9.89 (sa; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 21.5 (CH<sub>3</sub>), 23.2 (CH<sub>3</sub>), 24.2 (CH), 40.3 (CH<sub>2</sub>), 54.6 (CH), 114.3, 115.7, 119.4, 123.8, 125.6, 132.9, 170.1 (C=O).

**Síntesis de 4-Acil-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-onas (atQNXs).**

Las **tQNX1-4** almacenadas como clorhidratos fueron liberadas a la base libre antes de proceder a su acilación. Para ellos, se disolvió una cantidad del clorhidrato de tQNX, equivalente a 1 mmol de tQNX base libre, en 50 ml de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% y se extrajo con 3 porciones de 20 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se seco con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y su volumen se redujo a la mitad por evaporación a presión reducida. A esta solución se agregó 1.2 mmol del agente acilante, 1.2 mmol de trietilamina o hexametilentetramina y se la calentó a la temperatura de reflujo del solvente

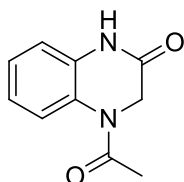
durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se la llevó a 50 ml por agregado acetato de etilo. Finalmente se agregaron 50 ml de  $K_2CO_3$  al 10% y la mezcla resultante se mantuvo con agitación durante 15 min. Transcurrido este tiempo las fases se separaron en una ampolla de decantación. La fase orgánica se lavó secuencialmente con tres porciones de 30 ml de HCl 0.5 M cada una, una porción de 50 ml de  $K_2CO_3$  al 10% y finalmente con 30 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre  $Na_2CO_3$  y el solvente se removió por evaporación a presión reducida. Los productos así obtenidos se caracterizaron sin purificación adicional.

#### 4-Acetil-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ona 1

Reactivo: tQNX1, agente acilante: cloruro de acetilo. Rendimiento: 0.16 g, 90%.

PF: 162-163° C (lit. 164-165° C).<sup>208</sup>

IR ( $cm^{-1}$ ): 3190, 1702, 1666, 1503.



MS (m/z): 190.0

$^1H$ -RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $DCCl_3$ ): 2.25 (sa; 4H;  $CH_3$ , NH), 4.52 (s; 2H;  $NCH_2$ ), 7.04-7.05 (d;  $J=7.80$  Hz; 1H; ArH), 7.12 (td;  $J=7.80$  Hz,  $J'=1.20$  Hz; 1H; ArH), 7.18-7.28 (m; 2H; ArH), 9.74 (sa; 1H; NH).

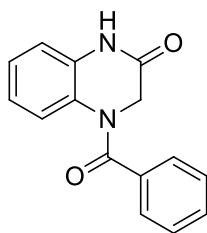
$^{13}C$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $DCCl_3$ ): 22.2 ( $CH_3$ ), 45.5 ( $CH_2$ ), 116.9, 123.3, 124.0, 127.0, 127.3, 131.2, 167.7 (C=O), 169.8 (C=O).

#### 4-Benzoil-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ona 2

Reactivo: tQNX1, agente acilante: cloruro de benzoilo. Rendimiento: 0.22 g, 90%.

PF: 207° C (lit. 208° C).<sup>208</sup>

IR ( $cm^{-1}$ ): 3266, 1708, 1666, 1500



MS (m/z): 252.0

$^1H$ -RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $DCCl_3$ ): 4.63 (s; 2H;  $NCH_2$ ); 6.70 (sa, 1H, ArH); 6.80 (t;  $J=7.80$  Hz; 1H; ArH); 7.00 (dd;  $J=7.80$  Hz,  $J'=1.40$  Hz; 1H; ArH); 7.11 (td;  $J=8.40$  Hz;  $J'=1.50$  Hz; 1H; ArH); 7.30-7.40 (m; 2H; ArH); 7.40-7.50 (m; 3H; ArH); 9.34 (sa; 1H; NH).

$^{13}C$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $DCCl_3$ ): 47.7 ( $CH_2$ ), 116.5; 123.0; 124.7; 126.2; 128.4; 128.9; 131.2; 134.1; 141.1; 141.4; 168.6 (C=O); 169.3 (C=O).

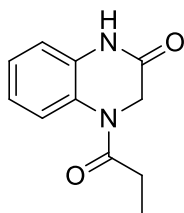
#### 4-Propionil-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ona 3<sup>224</sup>

Reactivo: tQNX1, agente acilante: cloruro de propanoilo. Rendimiento: 0.18 g, 90%.

PF: 162° C

IR (cm<sup>-1</sup>): 3084, 1698, 1650, 1497

MS (m/z): 204.2



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 1.19 (t; J=7.32 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>), 2.57 (c J=7.32 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>), 4.53 (s; 2H; NCH<sub>2</sub>), 7.02 (d; J= 7.80 Hz; 1H; ArH), 7.11 (m; 1H; ArH), 7.20-7.30 (m; 2H; ArH), 9.46 (sa; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 9.70 (CH<sub>3</sub>), 27.2 (CH<sub>2</sub>), 46.2 (NCH<sub>2</sub>); 116.8 (para 2 C); 123.3; 124.2; 126.8; 127.1, 169.4 (C=O), 173.3 (C=O).

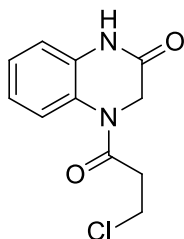
#### 4-(3-Cloropropionil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-2-ona <sup>4</sup><sup>225</sup>

Reactivo: tQNX1, agente acilante: cloruro de 3-cloropropanoilo. Rendimiento: 0.23 g, 95%.

PF: 143-144° C

IR (cm<sup>-1</sup>): 3084, 1698, 1651, 1496, 747.

MS (m/z): 238.7



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 3.04 (t; J= 6.60 Hz; 2H, CH<sub>2</sub>), 3.87 (t J=6,60 Hz; 2H; ClCH<sub>2</sub>), 4.57 (s; 2H; NCH<sub>2</sub>), 7.05 (d; J= 7.60 Hz; 1H; ArH), 7.15 (t; J=7.80; 1H; ArH), 7.20-7.40 (m; 2H; ArH), 9.59 (sa; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 36.6 (CH<sub>2</sub>); 39.8 (ClCH<sub>2</sub>); 45.9 (NCH<sub>2</sub>); 116.9; 123.3; 124.0; 127.0; 127.3; 131.2; 169.3 (C=O); 169.5 (C=O).

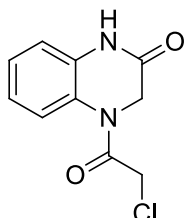
#### 4-(2-Cloroacetil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-2-ona <sup>5</sup><sup>226</sup>

Reactivo: tQNX1, agente acilante: cloruro de cloroacetilo. Rendimiento: 0.19 g, 85%.

PF: 168-170° C

IR (cm<sup>-1</sup>): 3140, 1702, 1656, 1497, 759

MS (m/z): 224.6

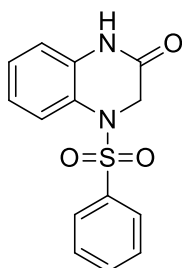


<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 4.27 (s; 2H; CH<sub>2</sub>), 4.56 (sa; 2H, NCH<sub>2</sub>); 7.02 (d; J= 7.80 Hz; 1H; ArH); 7.15 (t; J= 7.80 Hz; 1H; ArH); 7.25-7.48 (m; 2H; ArH); 8,90 (sa; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 40.6 (ClCH<sub>2</sub>); 46.6 (CH<sub>2</sub>); 116,9; 117.0; 123.8; 126.1; 127.8; 131.2; 165.9 (C=O); 166.6(C=O).

**4-(Bencenosulfonil)-1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-2-ona 6**

Reactivo: tQNX1, agente acilante: cloruro de bencenosulfonilo. Rendimiento: 0.20 g, 70%.



PF: 183-185° C (lit. 183-185° C).<sup>227</sup>

IR (cm<sup>-1</sup>): 3218, 1702, 1693, 1604, 1492.

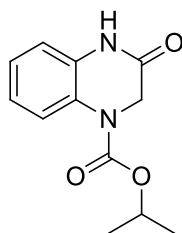
MS (m/z): 288.1

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 4.35 (sa; 2H; NCH<sub>2</sub>); 6.71 (dd; J= 7,80 Hz, J'=1,10 Hz; 1H; ArH); 7.18 (td; J= 1.30, J'= 7.80; 1H; ArH); 7.22-7.37 (m; 3H; ArH); 7.42-7.55 (m; 3H; ArH); 7.75 (d; J= 7.80 Hz ; 1H; ArH); 8.56 (sa; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 49.2 (CH<sub>2</sub>); 116.2; 124.0; 124.4; 127.0; 127.7; 128.4; 129.0; 132.1; 133.5; 136.8; 166.3 (C=O).

**4-(Metiletiloxicarbonil)-1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-2-ona 7<sup>228</sup>**

Reactivo: tQNX1, agente acilante: cloroformiato de isopropilo. Rendimiento: 0.19 g, 80%.



PF: 160-161° C

IR (cm<sup>-1</sup>): 3200, 1712, 1682, 1504.

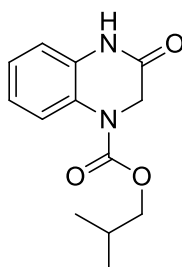
MS (m/z): 234.3

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 1,34 (d; J= 6.03Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.36 (d; J=6.03Hz; 3H; CH<sub>3</sub>); 4.46 (sa; 2H; NCH<sub>2</sub>); 5.09 (m; 1H; CH); 6.93 (m; 1H; ArH); 7.11 (m; 2H; ArH); 7.69 (sa; 1H; ArH); 9,05 (sa; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 22.0 (2 x CH<sub>3</sub>); 47.4 (CH<sub>2</sub>); 70.8 (CH); 116.2; 123.4; 123.9; 125.4; 126.6; 129.8; 153.1 (NC(=O)O); 168.2 (C=O).

**4-(2-Metilpropiloxicarbonil)-1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-2-ona 8<sup>229</sup>**

Reactivo: tQNX1, agente acilante: cloroformiato de isobutilo. Rendimiento: 0.24 g, 95%.



PF: 142-144° C

IR (cm<sup>-1</sup>): 3199, 1720, 1692, 1600, 1503.

MS (m/z): 248.3

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 0.99 (d; J=6,90Hz; 6H; CH<sub>3</sub>); 2,03 (m; 1H; CH); 4,03 (d; J=6,60 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>); 4.48 (sa; 2H; NCH<sub>2</sub>); 6,94 (d; J=7.50 Hz; 1H; ArH); 7.12 (m; 2H; ArH); 7,67 (sa; 1H; ArH); 9,19 (sa; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 19.1 (2 x CH<sub>3</sub>); 27.9 (CH); 47.5 (N-CH<sub>2</sub>); 72.9 (O-CH<sub>2</sub>); 116.3; 123.4; 124.0; 125.6; 126.5; 129.8; 153.7 (N-C(O)-O); 168.2 (C=O).

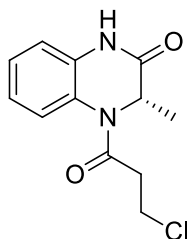
**(3S)-4-(3-Cloropropionil)-3-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ona 9**

Reactivo: tQNX2, agente acilante: cloruro de 3-cloropropanoilo. Rendimiento: 0.24 g, 95%.

PF: 155-156° C

IR (cm<sup>-1</sup>): 3200, 1681, 1657, 1503.

MS (m/z): 252.7



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 1.27 (d J=6.57; 3H; CH<sub>3</sub>); 2.77-2.97 (m, 1H, ClCH<sub>2</sub>CHH); 3.09-3.26 (m; 1H; ClCH<sub>2</sub>CHH); 3.73-3.96 (m; 2H; ClCH<sub>2</sub>); 5.60 (ac; 1H; NCH); 7.04 (d; J=7.42; 1H; ArH); 7.14 (td; J= 7.50 Hz, J'=1.10 Hz; 1H; ArH); 7.20-7.35 (m; 2H; ArH); 9.51 (sa; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 15.3 (CH<sub>3</sub>); 37.0 (CH<sub>2</sub>); 39.8 (ClCH<sub>2</sub>); 51.1 (NCH); 116.7; 123.5; 124.1; 125.1; 127.2; 130.9; 169.0 (C=O); 171.9 (C=O).

Anal. calc. para C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 57.04; H, 5.19; N, 11.09. Encontrado: C, 57.00; H, 5.25; N, 11.00.

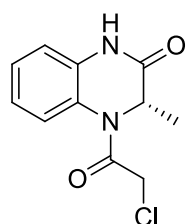
**(3S)-4-(Cloroacetil)-3-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ona 10**

Reactivo: tQNX2, agente acilante: cloruro de cloroacetilo. Rendimiento: 0.19 g, 80%.

PF: 198-200° C

IR (cm<sup>-1</sup>): 3183, 1692, 1650, 1502, 757.

MS (m/z): 238.7



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 1.31 (d; J= 7.32 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>); 4.19 (d J= 14.30 Hz; 1H; ClCHH); 4.33 (d; J= 14.30 Hz; 1H; ClCHH); 5.52 (ac; 1H; NCH); 7.05 (d; J=7.14; 1H; ArH); 7.17 (t; J= 7.40 Hz; 1H; ArH); 7.22-7.35 (m; 1H; ArH); 7.35-7.47 (m; 1H; ArH); 9.41 (sa; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 15.2 (CH<sub>3</sub>); 41.4 (ClCH<sub>2</sub>); 52.0 (NCHCO); 116,8; 123.8; 123.9; 127.7; 130.7; 130.9; 165.8 (C=O); 171.3 (C=O).

Anal. calc. para C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 55.36; H, 4.65; N, 11.74. Encontrado: C, 55.30; H, 4.68; N, 11.70.

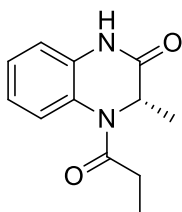
**(3S)-4-(Propionil)-3-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ona 11**

Reactivo: tQNX2, agente acilante: cloruro de propanoilo. Rendimiento: 0.19 g, 90%.

PF: 176-177° C

IR (cm<sup>-1</sup>): 3183, 1702, 1650, 1500.

MS (m/z): 218.3



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 1.20 (t; J= 7.13 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>); 1.26 (d J= 7.22 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>); 2.38-2.56 (m; 1H; CHH); 2.57-2.75 (m; 1H; CHH); 5.59 (ac; 1H; NCH); 6.98 (d; J=7.23; 1H; ArH); 7.12 (t; J= 7.61 Hz; 1H; ArH); 7.23 (t J=7.61; 1H; ArH); 7.27-7.34 (m; 1H; ArH); 8.98 (sa; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 15.2 (CH<sub>3</sub>); 27.5 (CH<sub>2</sub>); 52.0 (NCH); 116.3; 123.3; 124.8; 125.2; 126.6; 130.5; 168.0 (C=O); 173.0 (C=O).

Anal. calc. para C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 66.04; H, 6.47; N, 12.84. Encontrado: C, 66.00; H, 6.49; N, 12.70.

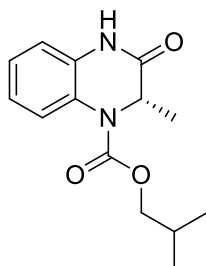
### (3S)-4-(2-metilpropiloxycarbonil)-3-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-2-ona 12

Reactivo: tQNX2, agente acilante: cloroformiato de isobutilo. Rendimiento: 0.24 g, 90%.

PF: 165-167° C

IR (cm<sup>-1</sup>): 3193, 1720, 1681, 1600, 1503.

MS (m/z): 262.2



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 0.99 (d; J=6.25Hz; 6H; 2 x CH<sub>3</sub>); 1.31 (d; J= 7.22 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.92-2.14 (m; 1H; CH); 4.05 (ac; 2H; CH<sub>2</sub>); 5.23 (ac; 1H; NCH); 6.89-6.99 (m; 1H; ArH); 7.03-7.20 (m; 2H; ArH); 7.69 (sa; 1H; ArH); 9.12 (sa; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 16.0 (CH<sub>3</sub>), 19.1 (2 x CH<sub>3</sub>); 27.9 (CH); 53.2 (NCH); 72.7 (OCH<sub>2</sub>); 115.9; 123.5; 124.3; 124.8; 125.4; 129.1; 153.5 (NC(=O)O); 170.7 (C=O).

Anal. calc. para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 64.10; H, 6.92; N, 10.68. Encontrado: C, 64.00; H, 6.98; N, 10.62.

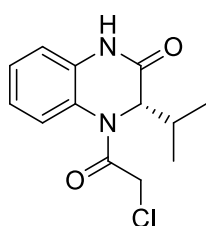
### (3S)- 3-(metiletil)-4-(cloroacetil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-2-ona 13

Reactivo: tQNX3, agente acilante: cloruro de cloroacetilo. Rendimiento: 0.20 g, 75%.

PF: 215-216° C

IR (cm<sup>-1</sup>): 3190, 1674, 1603, 1503

MS (m/z): 266.7



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 0.91 (sa; 3H; CH<sub>3</sub>); 1.09 (d; J= 6.81 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>); 1.65-1.75 (m; 1H; CH); 4.16 (d; J= 12.32 Hz; 1H; ClCHH); 4.34 (d; J= 12.32 Hz; 1H; ClCHH); 5.09 (ac; 1H; NCH); 7.00 (d; J=7.42; 1H; ArH); 6.89 (td; J= 7.80 Hz, J= 1.35 Hz; 1H; ArH); 7.22-7.32 (m; 1H; ArH);



7.35-7.45 (m; 1H; ArH); 8.81 (sa; 1H; NH).

$^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 19.1 (2 x  $\text{CH}_3$ ); 28.5 (CH); 40.4 ( $\text{ClCH}_2$ ); 61.1 (NCH); 116,7; 123.6; 123.8; 127.7; 131.0; 131.1; 166.3 (C=O); 169.3 (C=O).

Anal. calc. para  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$ : C, 58.54; H, 5.67; N, 10.50. Encontrado: C, 58.50; H, 5.70; N, 10.48.

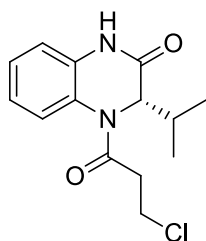
### (3S)-3-(2-Metiletil)-4-(3-cloropropionil)-1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-2-ona 14

Reactivo: tQNX3, agente acilante: cloruro de 3-cloropropanoilo. Rendimiento: 0.22 g, 80%.

PF: 179-180° C

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3200, 1687, 1657, 1600, 1503, 748.

MS (m/z): 280.8



$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 0.90 (d;  $J=6.51$ ; 3H;  $\text{CH}_3$ ); 1.08 (d;  $J=6.51$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ); 1.69 (m; 1H; CH); 2.77-2.86 (m; 1H;  $\text{ClCH}_2\text{CHH}$ ); 3.19-3.28 (m; 1H;  $\text{ClCH}_2\text{CHH}$ ); 3.76-3.84 (m; 1H;  $\text{ClCHH}$ ); 3.88-3.97 (m; 1H;  $\text{ClCHH}$ ); 5.14 (d;  $J=8.05$ ; 1H; NCH); 7.00 (d;  $J=7.42$ ; 1H; ArH); 6.89 (td  $J=1.35$  Hz,  $J'=7.80$  Hz; 1H; ArH); 7.22-7.32 (m; 1H; ArH); 7.35-7.45 (m; 1H; ArH); 8.81 (sa; 1H; NH).

$^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 18.9 (2 x  $\text{CH}_3$ ); 28.3 (CH); 36.7 ( $\text{CH}_2$ ); 40.1 ( $\text{ClCH}_2$ ); 60.7 (NCH); 116,5; 123.4; 124.9; 125.2; 127.2; 131.2; 169.5 (C=O); 171.7 (C=O).

Anal. calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_2$ : C, 59.89; H, 6.10; N, 9.98; Encontrado: C, 59.80; H, 6.15; N, 9.95.

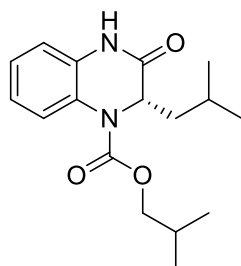
### (3S)-3-(2-Metilpropil)-1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-2-ona 15

Reactivo: tQNX4, agente acilante: cloroformiato de isobutilo. Rendimiento: 0.26 g, 85%.

PF: 149-151° C

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3185, 1704, 1685, 1603, 1503

MS (m/z): 304.4



$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 0.92 (d;  $J=6.73$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ); 0.94-1.01 (sa; 6H; 2x $\text{CH}_3$ ); 1.02(d;  $J=6.73$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ); 1.36-1.46 (m; 2H;  $\text{CH}_2$ ); 1.65-1.77 (m; 1H; CH); 2.02 (sa; 1H; CH); 3.90-4.20 (sa; 2H;  $\text{OCH}_2$ ); 5.19 (ac; 1H; NCH); 6.92 (d;  $J=7.41$  Hz; 1H; ArH); 7.11 (t;  $J=7.16$  Hz; 1H; ArH); 7.16 (t;  $J=7.41$  Hz; 1H; ArH); 7.60 (sa; 1H; ArH); 8.80 (sa; 1H; NH).

$^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) ( $\text{DCCl}_3$ ): 19.1 ( $\text{CH}_3$ ); 19.2 ( $\text{CH}_3$ ); 21.9 ( $\text{CH}_3$ ); 22.9 ( $\text{CH}_3$ ); 24.4 (CH); 27.9 (CH); 38.5 ( $\text{CH}_2$ ); 55.7 (NCH); 72.9 ( $\text{OCH}_2$ ); 115.8; 123.8, 125.7; 126.1; 129.8; 154.1 (C=O), 171.5 (C=O).

Anal. calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ : C, 67.08; H, 7.95; N, 9.20. Encontrado: C, 67.00; H, 7.99; N, 9.18.

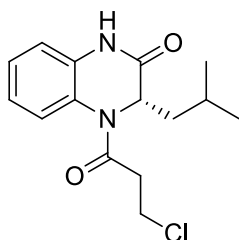
**(3S)-3-(2-Metilpropil)-4-(3-cloropropionil)-1,2,3,4-tetrahidroquinoxalin-2-ona 16**

Reactivo: tQNX4, agente acilante: cloruro de 3-cloropropanoilo. Rendimiento: 0.25 g, 85%.

PF: 150-151° C

IR (cm<sup>-1</sup>): 3203, 1681, 1651, 1502, 746

MS (m/z): 294.7



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 0.89 (d; J= 6.19 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>); 1.03 (d; J= 6.19 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>); 1.29-1.37 (m; 1H; CHH); 1.38-1.46 (m; 1H; CHH); 1.57 (m; 1H; CH); 2.81 (dt; J=16.1 Hz, J'=6.59 Hz; 1H; CHH); 3.19 (dt; J=15.9 Hz, J'=6.60 Hz; 1H; CHH); 3.77-3.85 (m; 1H; ClCHH); 3.87-3.94 (m; 1H; ClCHH); 5.57 (dd; J=11.3 Hz, J'=4.23 Hz; 1H; NCH); 7.01 (d; J=7.29 Hz; 1H; ArH); 7.15 (td; J=7.60 Hz, J'=1.02 Hz; 1H; ArH); 7.25-7.30 (m; 2H; ArH); 8.99 (sa; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DCCl<sub>3</sub>): 21.7 (CH<sub>3</sub>); 23.0 (CH<sub>3</sub>); 24.6 (CH); 36.9 (CH<sub>2</sub>); 37.6 (CH<sub>2</sub>); 39.9 (CH<sub>2</sub>); 53.9 (NCH); 116.6; 123.5; 124.4; 125.4; 127.5; 131.3; 169.5 (C=O), 171.5 (C=O).

Anal. calc. para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 61.12; H, 6.50; N, 9.50;. Encontrado: C, 61.10; H, 6.52; N, 9.48.

### Procedimiento general de síntesis de 1,2-dihidroquinoxalin-2-onas (dQNX) por irradiación en horno de microondas doméstico.

En todos los casos se emplearon cantidades equimoleculares de *o*-fenilendiamina y el correspondiente compuesto dicarbonílico. En un balón se preparó una mezcla de 10 mmoles de cada uno de los reactivos en 5 ml de etanol y se la irradió entre 5 y 13 minutos, según el compuesto, en un horno de microondas doméstico al que se ha adaptado un refrigerante. El avance de la reacción fue monitoreado por TLC. Finalmente se le agregó a la mezcla 10 ml de etanol y el compuesto obtenido se recristalizó empleando carbón activado, obteniéndose como sólido blanco cristalino en todos los casos.

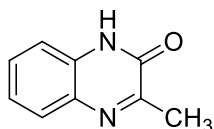
Cuando esta reacción fue realizada en el MW de síntesis se obtuvieron rendimientos algo mayores (> 90%) que en el MW doméstico, para tiempos de reacción equivalentes. En estos casos, la mezcla de reacción indicada se cargó en un tubo reactor con cierre hermético y se irradió a 30 W durante el minuto inicial, y el resto del tiempo a 15 W, con agitación continua. La purificación se realizó del modo ya indicado.

### 3-Metil-1,2-dihidroquinoxalin-2-ona 17

Compuesto dicarbonílico utilizado: ácido pirúvico. Tiempo de reacción: 8.5 min. Rendimiento: 1.6 g, 98% (MW de síntesis, 88% en el doméstico).

PF: 243-245° C (lit. 244 - 245° C)<sup>230</sup>

IR (cm<sup>-1</sup>): 3045, 1670, 1640



MS (m/z): 160.2

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 2,39 (s; 3H; CH<sub>3</sub>); 7.22-7.35 (sa; 2H; ArH); 7.41-7.54 (sa; 1H; ArH); 7.64-7.74 (sa; 1H; ArH); 12,33 (sa; 1H; NH).

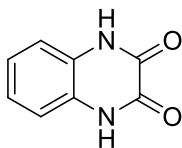
<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>): 21.0 (CH<sub>3</sub>); 115.7; 123.5; 128.3; 129.8; 132.1; 132,3; 155.4 (C=N); 159.9 (C=N).

### 1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2,3-diona 18

Compuesto dicarbonílico utilizado: ácido oxálico. Tiempo de reacción: 6 min. Rendimiento: 1.5 g, 90 % (MW de síntesis, 90% en el doméstico).

PF: > 320° C (lit. 410° C)<sup>231</sup>

IR (cm<sup>-1</sup>): 3043, 1681, 1613, 1500



MS (m/z): 162.1

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 7.02-7.20 (m; 4H; ArH); 11.93 (s.a.; 2H; NH).

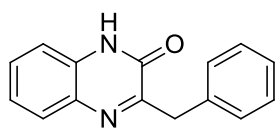
<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 115.6; 123.5; 126.0; 155.7 (C=N).

### 3-Bencil-1,2-dihidroquinoxalin-2-ona 21

Compuesto dicarbonílico utilizado: ácido fenilpirúvico. Tiempo de reacción: 13 min. Rendimiento: 2.2 g, 95 % (MW de síntesis, 86 % en el doméstico).

PF: 198 - 200° C (lit. 199 - 200° C)<sup>232</sup>

IR (cm<sup>-1</sup>): 3061, 1655, 1597, 1500



MS (m/z): 236.2

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 4.13 (s; 2H; CH<sub>2</sub>); 7.16-7.38 (m; 7H; ArH); 7.49 (t; J=7.24 Hz; 1H; ArH); 7.73 (d; J= 8.11 Hz; 1H; ArH); 12,39 (s.a.; 1H; NH).

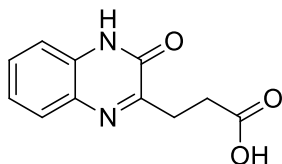
<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 39.9 (CH<sub>2</sub>); 115.7; 123.6; 126.7; 128.7; 128.8; 129.6; 130.2; 132.1; 132.4; 137.9; 155.5 (C=N); 160.8 (C=N).

**Ácido 3-(1,2-dihidroquinoxalin-2-ona-3-il)propanoico 22**

Compuesto dicarbonílico utilizado: ácido  $\alpha$ -ceto-glutárico. Tiempo de reacción: 5 min  
 Rendimiento: 2.1 g, 98 % (MW de síntesis, 91 % en el doméstico).

PF: 256 - 258° C (lit. 257 - 258° C)<sup>231</sup>

IR (cm<sup>-1</sup>): 3435, 3102, 1730, 1666, 1608, 1502.



MS (m/z): 218.1

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 2.72 (t; J=6.30 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>); 3.02 (t; J=6.30 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>); 7.21-7.35 (m; 2H; ArH); 7.46 (t; J= 7.65 Hz; 1H; ArH), 7.69 (d; J= 8.06, 1H, ArH), 12.10 (s.a.; 1H; OH); 12.30 (s.a.; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 28.1; 30.4; 115.7; 123.5; 128.5; 129.9; 131.9, 132.1; 155.0 (C=N); 160.7 (C=O); 174.4 (COOH).

**Síntesis de dQNX a partir de la deshidratación de tQNX**

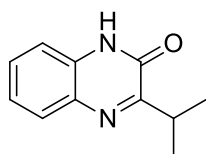
La síntesis de dQNX también se puede llevar a cabo por deshidratación de las tQNX. Esta reacción se puede dar espontáneamente durante el mismo proceso de reducción de los nitroderivados como ocurre al reducir con formiato de amonio en presencia de paladio soportado en carbón, aunque este método da mezcla tQNX/dQNX y no es del todo reproducibles las proporciones. Una forma optimizada para obtener estos compuestos resultó de calentar a reflujo durante 1 hora 10 mmoles del clorhidrato de la tQNX y 0.5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 vol) en 50 ml de una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10%. Luego de enfriada, la mezcla de reacción se extrajo con 5 porciones de 30 ml de acetato de etilo cada una. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el solvente se removió a presión reducida, rindiendo para los casos estudiados un sólido blanco cristalino, que se purificó por recristalización de etanol.

**3-(metiletil)-1,2-dihidroquinoxalin-2-ona 19<sup>231</sup>**

Rendimiento: 1.3 g, 70%.

PF: 190° C.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3120, 1660, 1490.



MS (m/z): 188.1

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz)  $\delta$  (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.39 (d; J= 6.83 Hz; 6H, 2 x CH<sub>3</sub>); 3.60-3.75 (m, 1H, CH); 7.30-7.40 (m; 2H; ArH); 7.50 (t; J= 7.94 Hz; 1H; ArH); 7.87 (d; J= 7.94 Hz; 1H; ArH); 11.78 (s.a.; 1H; NH).

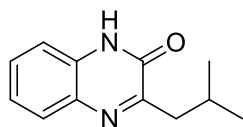
<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz)  $\delta$  (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 23.2 (2 x CH<sub>3</sub>); 30.7 (CH); 115.3; 124.0; 128.9; 129.5; 130.8; 132.9; 156.0 (C=N); 165.6 (C=O).

**3-(2-metilpropil)-1,2-dihidroquinoxalin-2-ona 20**

Rendimiento: 1.4 g, 70%.

PF: 184-185° C (lit. 186-187° C)<sup>223</sup>IR (cm<sup>-1</sup>): 3308, 1661, 1600, 1556.

MS (m/z): 202.3



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 0.94 (d; J= 6.79 Hz; 6H; 2 x CH<sub>3</sub>); 2.19-2.31 (m; 1H; CH); 2.67 (d; J= 6.40 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>); 7.23-7.33 (m; 2H; ArH); 7.48 (t; J= 7.56 Hz; 1H; ArH); 7.73 (d; J= 8.31 Hz; 1H; ArH); 12,32 (s.a.; 1H; NH)

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 23.0 (2 x CH<sub>3</sub>); 26.6 (CH); 42.0 (CH<sub>2</sub>); 115.7; 123.5; 128.6; 129.9; 132.1; 132.2; 155.3 (C=N); 161.7 (C=O).

**Procedimiento general de síntesis de ésteres derivados del compuesto 22 empleando microondas.**

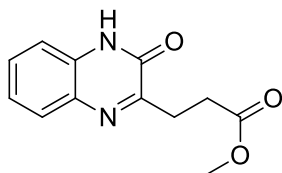
En una reacción de esterificación típica, se mezclan 3,4 g de AMA 3:2 (preparado como se indicó en la obtención de los ésteres de los α-aminoácidos) con 10 mmoles del ácido carboxílico y 2 ml del alcohol. Luego la mezcla se irradió con agitación en el tubo de reacción, el cual se cerró herméticamente. La temperatura se fijó a 120° C y el tiempo de reacción se ajustó para obtener los mejores rendimientos. Luego de enfriada, la mezcla de reacción fue diluida con diclorometano (41 ml), filtrada por gravedad y lavada con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ss). La fase orgánica fue secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada y concentrada bajo presión reducida para dar el correspondiente éster.

**Metil éster del ácido 3-[1,2-dihidroquinoxalin-2-ona-3-il]propanoico 23**

Alcohol utilizado: metanol. Tiempo de reacción: 10 min. Rendimiento: 2.2 g, 95%.

PF: 208-209° C (lit. 208 - 209° C)<sup>233</sup>IR (cm<sup>-1</sup>): 1730, 1655, 1615, 1510, 1490, 1565.

MS (m/z): 232.3



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 2.79 (t; J=7.01 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>); 3.06 (t; J=6.83 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>); 3.60 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>); 7.23-7.33 (m; 2H; ArH); 7.48 (t; J= 7.99 Hz; 1H; ArH); 7.68 (d; J= 8.40; 1H; ArH); 12,36 (s.a.; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 28.0 (CH<sub>2</sub>); 29.8 (CH<sub>2</sub>); 51.8 (OCH<sub>3</sub>); 115.7; 123.6; 128.6; 130.0; 131.9; 132.2; 155.0 (C=N); 160.4 (C=O); 173.4 (CO).

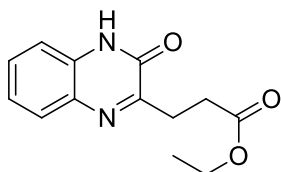
**Etil éster del ácido 3-[1,2-dihidroquinoxalin-2-ona-3-il]propanoico 24**

Alcohol utilizado: etanol. Tiempo de reacción: 20 min. Rendimiento: 2.3 g, 95%.

PF: 186-188° C (lit. 186 - 187° C)<sup>233</sup>

IR (cm<sup>-1</sup>): 1727, 1677, 1668, 1617, 1510, 1490, 1572.

MS (m/z): 246.3



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.17 (t; J=7.01 Hz; 2H; CH<sub>3</sub>); 2.77 (t; J=6.95 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>); 3.05 (t; J=6.95 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>); 4.06 (c; J= 7.25 Hz; 2H, OCH<sub>2</sub>); 7.23-7.33 (m; 2H; ArH); 7.43-7.51 (t; J= 7.74 Hz; 1H; ArH), 7.67 (d; J= 7.55 Hz; 1H; ArH), 12.36 (s.a.; 1H; NH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 14.6 (CH<sub>3</sub>); 28.1 (CH<sub>2</sub>); 30.1 (CH<sub>2</sub>); 60.2 (OCH<sub>2</sub>); 115.7; 123.6; 128.5; 130.0; 131.9; 132.2; 155.0 (C=N); 160.4 (C=O); 172.8 (CO).

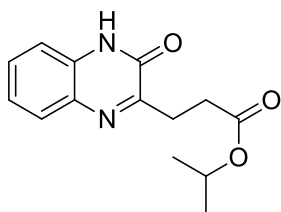
**Metiletil éster del ácido 3-[1,2-dihidroquinoxalin-2-ona-3-il]propanoico 25<sup>234</sup>**

Alcohol utilizado: isopropanol. Tiempo de reacción: 25 min. Rendimiento: 2.3 g, 90%.

PF: 178 - 179° C

IR (cm<sup>-1</sup>): 1719, 1666, 1651, 1562, 1427, 1186.

MS (m/z): 260.2



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.17 (d; J=7.01 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>); 1.18 (d; J=7.01 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>); 2.73 (t; J=6.80 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>); 3.04 (t; J=6.80 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>); 4.88 (m; 1H; CH); 7.23-7.33 (m; 2H; ArH); 7.48 (t; J= 7.74 Hz; 1H; ArH), 7.65 (d; J= 7.14 Hz; 1H, ArH), 12.35 (s.a.; 1H; NH)

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz) δ (ppm) (DMSO-d<sub>6</sub>): 22.1 (2 x CH<sub>3</sub>); 28.2 (CH<sub>2</sub>); 30.4 (CH<sub>2</sub>); 67.4 (OCH); 115.7; 123.6; 128.4; 129.9; 131.9, 132.1; 155.0 (C=N); 160.5 (C=O); 172.3 (CO).

**3.2 Determinación de actividad biológica**

Se trabajó sobre la forma epimastigote del T. Cruzi, cepa Tulahuen 2, permitiendo su crecimiento en un medio BHT (Brain Heart Infusion + Triptosa) complementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB).

Los compuestos a evaluar se disolvieron en DMSO y se realizaron soluciones 24 mM a partir de las cuales se prepararon soluciones intermedias de 3 mM que por dilución con DMSO se logra una concentración 25 µM en el pocillo de la placa de lectura.

Se realizaron las determinaciones por duplicado y se incluyó un blanco (agregando DMSO a los pocillos correspondientes) contra el cual se evalúa la capacidad de los compuestos de inhibir el crecimiento de los parásitos. También se realizó un control positivo a partir de una solución de Nifurtimox de 0.6 mM.

El crecimiento de los parásitos se observó determinado el aumento de absorbancia con un lector ELISA a 610 nm, considerando que es la lectura es proporcional al número de células presentes. Se midió la absorbancia en el día 0, tomando 200 ul de cada pocillo y posteriormente se volvió a medir al día 5, mediante el mismo procedimiento.

Los datos obtenidos fueron procesados en una planilla de cálculo y el porcentaje de inhibición fue calculado empelando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inibición} = [1 - (\text{Abs p5} - \text{Abs p0} / \text{Abs b5} - \text{Abs b0})] * 100$$

Donde:

Abs p0 = Absorbancia problema día 0

Abs p5 = Absorbancia problema día 5

Abs b0 = Absorbancia blanco día 0

Abs b5 = Absorbancia blanco día 5

# Conclusiones Generales y Perspectivas

---



Teniendo en cuenta los antecedentes respecto de la actividad quimioterápica de compuestos quinoxalínicos, los objetivos planteados en el Capítulo I de este Trabajo de Tesis Doctoral y los resultados obtenidos y mostrados en los Capítulos II y III, se puede arribar a las siguientes conclusiones generales, en los distintos aspectos abordados:

### 1 Diseño de inhibidores de la TR del HIV

- Se construyó una QV haciendo uso de la facilidad que ofrece la notación SMILES de una estructura química en relación al manejo informático de la misma. Para ello se preparó una base de datos de sustituyentes en notación SMILES, que luego fueron combinados sobre las plantillas de quinoxalinas, también escritas empleando notación SMILES. El proceso se llevó a cabo mediante el uso de un script, llegando finalmente a la QV de quinoxalinas. La misma quedó conformada como una base de datos de coordenadas atómicas optimizadas, sobre las que se aplicaron los protocolos de filtración (cribado), para identificar aquellas que podrían ser potenciales agentes anti-HIV.
- En el protocolo de filtración de la QV se emplearon dos aproximaciones para analizar los compuestos provenientes de la misma. Primero, por medio de docking se seleccionaron los compuestos que dieron valores de  $\Delta G < -8.0$  y posteriormente se generaron las conformaciones de quinoxalinas que luego fueron analizadas por QSAR3D. Ambas metodologías fueron calibradas con estructuras de conformación conocida provenientes de cristalografías de complejos de unión ligando-TR. El QSAR3D se calibró de forma tal que permitió estimar la actividad biológica de las quinoxalinas, la cual se utilizó como criterio final de selección. Finalmente los resultados se analizaron por planilla de cálculo, seleccionando 25 quinoxalinas con potencial actividad biológica y sintéticamente accesible.

### 2 Diseño de inhibidores de la CP

- Dado que no se dispone de suficientes datos cristalográficos para realizar un análisis de QSAR3D y un estudio únicamente de *docking* sería insuficiente para evaluar la potencialidad de un compuesto quinoxalínico como ligando de la CP, a través de un protocolo de diseño de novo utilizando docking y analizando la interacción por una técnica de simulación como MMPBSA, fue posible estudiar la interacción de fragmentos quinoxalínicos en un sitio adyacente al catalítico de la cruzaína, con el fin de identificar algunos requerimientos estructurales.

- Las quinoxalinas utilizadas para este estudio resultaron ser parte de las seleccionadas previamente en la QV, o alguno de sus intermediarios sintéticos y surgieron en función de la accesibilidad sintética de las mismas.

### 3 Síntesis de compuestos quinoxalínicos con potencial actividad anti-HIV y antichagásicos

- Para todas las familias de quinoxalinas sintetizadas (dQNXs, tQNXs, atQNXs), se han optimizado las rutas convencionales de síntesis descritas en la literatura, utilizando microondas como fuente de energía en una o más de las etapas sintéticas desarrolladas.
- Las síntesis de las tQNXs, se planteó a partir de nitrofenil derivados de  $\alpha$ -aminoácidos homocirales. Se optimizó una técnica de preparación de ésteres de dichos  $\alpha$ -aminoácidos para poder usarlos como mejores nucleófilos en dicha síntesis, utilizando como fuente de energía MW y un catalizador soportado (AMA). La robustez de la técnica se probó con otros ácidos carboxílicos, hallándose aplicabilidad en un amplio espectro de casos con altos rendimientos.
- Teniendo en cuenta publicaciones recientes que incluyen grafeno en sus técnicas de calentamiento por MW, se comprobó que con el agregado de grafeno al medio de reacción en que se desarrolla la SNA, se obtienen rendimientos superiores y equivalentes empleando los  $\alpha$ -aminoácidos en forma de éster o sal potásica.
- La reacción de reducción de los nitrofenil derivados con  $\text{HCOONH}_4$  en presencia de paladio adsorbido sobre carbón activado conduce a la reducción total del nitrofenil derivado, pero produce como productos finales una mezcla tQNX/dQNX en proporciones de 3:2. El calentamiento posterior a reflujo, conduce a la formación total de dQNX.
- La reacción de reducción de los nitrofenil derivados con  $\text{SnCl}_2$  en medio ácido produce las tQNX como producto de reacción prácticamente único.
- Las acilaciones de tQNXs fueron realizadas de forma convencional, utilizando como agente acilante el cloruro de ácido o el cloroformiato correspondiente; en presencia de hexametilentetramina o trietilamina, como aceptores del cloruro de hidrógeno producido durante la reacción.

- Las dQNXs se prepararon mediante la reacción de condensación entre o-fenilendiamina y un  $\alpha$ -cetoácido; con alto rendimiento y un corto tiempo de reacción con el empleo de MW.
- Si bien sería adecuado realizar un ensayo sobre la cruzipaína aislada, como para poder cotejar los resultados obtenidos en los estudios computacionales sobre CP, los ensayos preliminares sobre *T. cruzi* mostraron aceptable actividad, concordante con lo previsto a partir del cálculo.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral se abre la posibilidad de contar con una vasta familia de compuestos quinoxalínicos sustituidos, que podrán ser usados para evaluar su posible acción inhibitoria sobre la TR y la CP. De encontrarse acción inhibitoria para alguno/s de ellos podrá/n constituirse/s en líderes para el diseño de agentes optimizados a través del empleo de estrategias de farmacomodulación. Los resultados de los estudios de actividad también serán muy valiosos en cuanto a convalidar el rol del diseño de fármacos asistido por computadoras.

## **Bibliografía**

---

- 1 Seddon G., Lounnas V., McGuire R., van den Bergh T., Bywater R. P., Oliveira L. and Vriend G., *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26 (2012), 137-50.
- 2 Lombardino J. G. and Lowe J. A., *Nature Reviews Drug Discovery*, 3 (2004), 853-62.
- 3 Simmons K. J., Chopra I. and Fishwick C. W., *Nature Reviews Microbiology*, 8 (2010), 501-10.
- 4 Cosconati S., Forli S., Perryman A. L., Harris R., Goodsell D. S. and Olson A. J., *Expert Opinion On Drug Discovery*, 5 (2010), 597-607.
- 5 Zoete V., Grosdidier A. and Michielin O., *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13 (2009), 238-48.
- 6 Hansch C. and Helmer F., *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry*, 6 (1968), 3295-302.
- 7 Kubinyi H., *Comprehensive Medicinal Chemistry*, 4 (1990), 589-643.
- 8 Todeschini R. and Consonni V., *Handbook of molecular descriptors*. Vol. 11 (John Wiley & Sons, 2008).
- 9 Vainio M. J., Puranen J. S. and Johnson M. S., *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49 (2009), 492-502.
- 10 Ritchie D. W. and Kemp G. J., *Journal of Computational Chemistry*, 20 (1999), 383-95.
- 11 Durmus A., Gunbas G. E. and Toppare L., *Chemistry of Materials*, 19 (2007), 6247-51.
- 12 Wang E., Hou L., Wang Z., Ma Z., Hellstrom S., Zhuang W., Zhang F., Inganäs O. and Andersson M. R., *Macromolecules*, 44 (2011), 2067-73.
- 13 Justin Thomas K., Lin J. T., Tao Y.-T. and Chuen C.-H., *Chemistry of Materials*, 14 (2002), 2796-802.
- 14 Novellino E., Cosimelli B., Ehlaro M., Greco G., Iadanza M., Lavecchia A., Rimoli M. G., Sala A., Da Settimo A. and Primofiore G., *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 (2005), 8253-60.
- 15 Sethy V. H. and Oien T. T., *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 39 (1991), 379-82.
- 16 Bigge C. F. and Nikam S. S., *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 7 (1997), 1099-114.
- 17 Lawrence D. S., Copper J. E. and Smith C. D., *Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (2001), 594-601.
- 18 Ries U. J., Pripke H. W., Huel N. H., Handschuh S., Mihm G., Stassen J. M., Wienen W. and Nar H., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13 (2003), 2297-302.
- 19 Ramalingam P., Ganapaty S. and Rao C. B., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20 (2010), 406-08.
- 20 Carta A., Loriga M., Zanetti S. and Sechi L. A., *Il Farmaco*, 58 (2003), 1251-55.
- 21 Ali M., Ismail M., El-Gaby M., Zahran M. and Ammar Y., *Molecules*, 5 (2000), 864-73.
- 22 Zarranz B., Jaso A., Aldana I. and Monge A., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11 (2003), 2149-56.
- 23 Seitz L. E., Suling W. J. and Reynolds R. C., *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (2002), 5604-06.
- 24 Weïwer M., Spoonamore J., Wei J., Guichard B., Ross N. T., Masson K., Silkworth W., Dandapani S., Palmer M. and Scherer C. A., *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3 (2012), 1034-38.
- 25 Miyashiro J., Woods K. W., Park C. H., Liu X., Shi Y., Johnson E. F., Bouska J. J., Olson A. M., Luo Y. and Fry E. H., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19 (2009), 4050-54.
- 26 Kim J., Lee G., Kim S. and Chung I., *Biochemical Journal*, 373 (2003), 523-29.
- 27 Zeman E. M., Brown J. M., Lemmon M. J., Hirst V. K. and Lee W. W., *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 12 (1986), 1239-42.
- 28 Romeiro N. C., Aguirre G., Hernández P., González M., Cerecetto H., Aldana I., Pérez-Silanes S., Monge A., Barreiro E. J. and Lima L. M., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17 (2009), 641-52.
- 29 Aguirre G., Cerecetto H., Di Maio R., González M., Alfaro M. a. E. M., Jaso A., Zarranz B., Ortega M. Á., Aldana I. and Monge-Vega A., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14 (2004), 3835-39.
- 30 Kleim J.-P., Bender R., Kirsch R., Meichsner C., Paessens A., Rösner M., Rübsamen-Waigmann H., Kaiser R., Wichers M. and Schneeweis K. E., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (1995), 2253-57.
- 31 Ren J., Nichols C. E., Chamberlain P. P., Weaver K. L., Short S. A., Chan J. H., Kleim J.-P. and Stammers D. K., *Journal of Medicinal Chemistry*, 50 (2007), 2301-09.

- 32 WHO, UNAIDS and UNICEF, GLOBAL HIV/AIDS RESPONSE-EPIDEMIC UPDATE AND HEALTH SECTOR PROGRESS TOWARDS UNIVERSAL ACCESS. 2011, (2011).
- 33 Johnson V. A., Calvez V., Gunthard H. F., Paredes R., Pillay D., Shafer R. W., Wensing A. M. and Richman D. D., *Topics in Antiviral Medicine*, 21 (2013), 6-14.
- 34 Anderson S. L., *Cardiopulmonary Physical Therapy Journal*, 17 (2006), 103-09.
- 35 Sattentau Q. J. and Weiss R. A., *Cell*, 52 (1988), 631-33.
- 36 Kugelberg E., *Nature Reviews Immunology* (2014).
- 37 Gelderblom H., Özel M. and Pauli G., *Archives of Virology*, 106 (1989), 1-13.
- 38 Gait M. J. and Karn J., *Trends in Biotechnology*, 13 (1995), 430-38.
- 39 Watts J. M., Dang K. K., Gorelick R. J., Leonard C. W., Bess Jr J. W., Swanstrom R., Burch C. L. and Weeks K. M., *Nature*, 460 (2009), 711-16.
- 40 Alfano M. and Poli G., *Drug Design Reviews-Online*, 1 (2004), 83-92.
- 41 Ratner L., *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 1 (1993), 3-22.
- 42 Campbell E. M. and Hope T. J., *Trends in Microbiology*, 16 (2008), 580-87.
- 43 Fernández-Montero J. V., Vispo E. and Soriano V., *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 15 (2014), 211-19.
- 44 Clercq E. D., *Medicinal Research Reviews*, 22 (2002), 531-65.
- 45 Baba M., Tanaka H., De Clercq E., Pauwels R., Balzarini J., Schols D., Nakashima H., Perno C.-F., Walker R. and Miyasaka T., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 165 (1989), 1375-81.
- 46 Debyser Z., Pauwels R., Andries K., Desmyter J., Kukla M., Janssen P. and De Clercq E., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88 (1991), 1451-55.
- 47 Girard M. P., Osmanov S., Assossou O. M. and Kieny M.-P., *Vaccine*, 29 (2011), 6191-218.
- 48 Zhan P., Chen X., Li D., Fang Z., Clercq E. and Liu X., *Medicinal Research Reviews*, 33 (2013), E1-E72.
- 49 Brenner B. G., Wainberg M. A. and Turner D., *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2 (2002), 751-61.
- 50 Barrett M. P. and Gilbert I. H., *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2 (2002), 471-82.
- 51 <<http://www.dndi.org/diseases/chagas.html>>.
- 52 Urbina J. A., *Journal of Molecular Medicine*, 77 (1999), 332-38.
- 53 Tyler K. and Engman D., *International Journal for Parasitology*, 31 (2001), 472-81.
- 54 Burleigh B. A. and Woolsey A. M., *Cellular Microbiology*, 4 (2002), 701-11.
- 55 Scharfstein J., *Immunobiology*, 211 (2006), 117-25.
- 56 Almeida-de-Faria M., Freymüller E., Colli W. and Alves M., *Experimental Parasitology*, 92 (1999), 263-74.
- 57 Coura J. R. and De Castro S. L., *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (2002), 3-24.
- 58 Urbina J. A. and Docampo R., *Trends in Parasitology*, 19 (2003), 495-501.
- 59 Cohen J. E., Tsai E. C., Ginsberg H. J. and Godes J., *Surgical Neurology*, 3 (1998), 324-27.
- 60 Carneiro-Proietti A., Lima-Martins M., Passos V., Carmo R., Pinheiro S., Rocha P., Proietti F., Ferreira P. and Rocha V., *Haemophilia*, 4 (1998), 47-50.
- 61 Concetti H., Retegui M., Pérez G. and Pérez H., *Human Pathology*, 31 (2000), 120-22.
- 62 '[Http://www1.Paho.Org/english/ad/dpc/cd/psit-nd-poster.Htm](http://www1.Paho.Org/english/ad/dpc/cd/psit-nd-poster.Htm)', <<http://www1.paho.org/English/AD/DPC/CD/psit-nd-poster.htm>>.
- 63 Cerecetto H. and González M., *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2 (2002), 1187-213.
- 64 Urbina J. A., *Acta Tropica*, 115 (2010), 55-68.
- 65 Gerpe A., Odreman-Nuñez I., Draper P., Urbina J. A., González M. and Cerecetto H., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16 (2008), 569-77.
- 66 Krauth-Siegel R. L., Bauer H. and Schirmer R. H., *Angewandte Chemie International Edition*, 44 (2005), 690-715.
- 67 Li Z., Fennie M. W., Ganem B., Hancock M. T., Kobašlija M., Rattendi D., Bacchi C. J. and O'Sullivan M. C., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11 (2001), 251-54.
- 68 Khan M. O. F., Austin S. E., Chan C., Yin H., Marks D., Vaghjani S. N., Kendrick H., Yardley V., Croft S. L. and Douglas K. T., *Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (2000), 3148-56.
- 69 Iribarne F., Paulino M., Aguilera S. and Tapia O., *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 28 (2009), 371-81.

- 70 Bonse S., Santelli-Rouvier C., Barbe J. and Krauth-Siegel R. L., *Journal of Medicinal Chemistry*, 42 (1999), 5448-54.
- 71 Souza D., Garratt R., Araújo A., Guimaraes B., Jesus W., Michels P., Hannaert V. and Oliva G., *FEBS Letters*, 424 (1998), 131-35.
- 72 Cortés-Figueroa A., Pérez-Torres A., Salaiza N., Cabrera N., Escalona-Montaño A., Rondán A., Aguirre-García M., Gómez-Puyou A., Pérez-Montfort R. and Becker I., *Parasitology Research*, 102 (2008), 635-43.
- 73 Mande S. C., Hol W. G., Mainfroid V., Goraj K., Martial J. A. and Kalk K. H., *Protein Science*, 3 (1994), 810-21.
- 74 Rieder S. V. and Rose I. A., *Journal of Biological Chemistry*, 234 (1959), 1007-10.
- 75 Waley S. G., *Biochemical Journal*, 135 (1973), 165-72.
- 76 Téllez-Valencia A., Ávila-Ríos S., Pérez-Montfort R., Rodríguez-Romero A., de Gómez-Puyou M. T., López-Calahorra F. and Gómez-Puyou A., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295 (2002), 958-63.
- 77 Téllez-Valencia A., Olivares-Illana V., Hernández-Santoyo A., Pérez-Montfort R., Costas M., Rodríguez-Romero A., López-Calahorra F., de Gómez-Puyou M. T. and Gómez-Puyou A., *Journal of Molecular Biology*, 341 (2004), 1355-65.
- 78 Docampo R., de Souza W., Miranda K., Rohloff P. and Moreno S. N., *Nature Reviews Microbiology*, 3 (2005), 251-61.
- 79 Docampo R. and Moreno S. N., *Current Pharmaceutical Design*, 14 (2008), 882.
- 80 Lemercier G., Dutoya S., Luo S., Ruiz F. A., Rodrigues C. O., Baltz T., Docampo R. and Bakalara N., *Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002), 37369-76.
- 81 Lemercier G., Espiau B., Ruiz F. A., Vieira M., Luo S., Baltz T., Docampo R. and Bakalara N., *Journal of Biological Chemistry*, 279 (2004), 3420-25.
- 82 Scott D. A., de Souza W., Benchimol M., Zhong L., Lu H.-G., Moreno S. N. and Docampo R., *Journal of Biological Chemistry*, 273 (1998), 22151-58.
- 83 Buscaglia C. A., Campo V. A., Frasch A. C. and Di Noia J. M., *Nature Reviews Microbiology*, 4 (2006), 229-36.
- 84 Agustí R., París G., Ratier L., Frasch A. C. and de Lederkremer R. M., *Glycobiology*, 14 (2004), 659-70.
- 85 Giorgi M. E., Ratier L., Agusti R., Frasch A. C. and de Lederkremer R. M., *Glycoconjugate Journal*, 27 (2010), 549-59.
- 86 Mottram J. C., Brooks D. R. and Coombs G. H., *Current Opinion in Microbiology*, 1 (1998), 455-60.
- 87 McKerrow J. H., Engel J. C. and Caffrey C. R., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7 (1999), 639-44.
- 88 Lecaille F., Kaleta J. and Brömme D., *Chemical Reviews*, 102 (2002), 4459-88.
- 89 McKerrow J. H., Caffrey C., Kelly B., Loke P. n. and Sajid M., *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1 (2006), 497-536.
- 90 Caffrey C. R. and Steverding D., *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167 (2009), 12-19.
- 91 McKerrow J. H., *International Journal for Parasitology*, 29 (1999), 833-37.
- 92 Du X., Guo C., Hansell E., Doyle P. S., Caffrey C. R., Holler T. P., McKerrow J. H. and Cohen F. E., *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (2002), 2695-707.
- 93 Huang L., Brinen L. S. and Ellman J. A., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11 (2003), 21-29.
- 94 Brak K., Doyle P. S., McKerrow J. H. and Ellman J. A., *Journal of the American Chemical Society*, 130 (2008), 6404-10.
- 95 Szabo A. and Ostlund N. S., *Modern quantum chemistry: Introduction to advanced electronic structure theory* (Courier Corporation, 2012).
- 96 Leach A. R., *Molecular modelling: Principles and applications* (Pearson Education, 2001).
- 97 Brooks B. R., Bruccoleri R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S. and Karplus M., *Journal of Computational Chemistry*, 4 (1983), 187-217.
- 98 Oostenbrink C., Soares T. A., Van der Vegt N. F. and Van Gunsteren W. F., *European Biophysics Journal*, 34 (2005), 273-84.
- 99 Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., Gould I. R., Merz K. M., Ferguson D. M., Spellmeyer D. C., Fox T., Caldwell J. W. and Kollman P. A., *Journal of the American Chemical Society*, 117 (1995), 5179-97.

- 100 Hünenberger P. H., 'Thermostat algorithms for molecular dynamics simulations', in *Advanced computer simulation* (Springer, 2005), pp. 105-49.
- 101 Warren G. L., Andrews C. W., Capelli A.-M., Clarke B., LaLonde J., Lambert M. H., Lindvall M., Nevins N., Semus S. F. and Senger S., *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (2006), 5912-31.
- 102 Leach A. R., Shoichet B. K. and Peishoff C. E., *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (2006), 5851-55.
- 103 Kontoyianni M., McClellan L. M. and Sokol G. S., *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (2004), 558-65.
- 104 Bello M., Martínez-Archundia M. and Correa-Basurto J., *Expert Opinion On Drug Discovery*, 8 (2013), 821-34.
- 105 Vries S. and Zacharias M., *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81 (2013), 2167-74.
- 106 Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K. and Olson A. J., *Journal of Computational Chemistry*, 19 (1998), 1639-62.
- 107 Liu M. and Wang S., *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 13 (1999), 435-51.
- 108 Meng X.-Y., Zhang H.-X., Mezei M. and Cui M., *Current Computer-Aided Drug Design*, 7 (2011), 146.
- 109 Huang S.-Y. and Zou X., *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (2010), 3016-34.
- 110 Fuhrmann J., Rurainki A., Lenhof H. P. and Neumann D., *Journal of Computational Chemistry*, 31 (2010), 1911-18.
- 111 Barreca M. L., Rao A., De Luca L., Zappalà M., Monforte A.-M., Maga G., Pannecouque C., Balzarini J., De Clercq E. and Chimirri A., *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 (2005), 3433-37.
- 112 Medina-Franco J. L., Rodríguez-Morales S., Juárez-Gordiano C., Hernández-Campos A. and Castillo R., *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 18 (2004), 345-60.
- 113 Carta A., Pricl S., Piras S., Fermeglia M., La Colla P. and Loddo R., *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (2009), 5117-22.
- 114 Österberg F., Morris G. M., Sanner M. F., Olson A. J. and Goodsell D. S., *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 46 (2002), 34-40.
- 115 Morris G. M., Huey R. and Olson A. J., *Current Protocols in Bioinformatics* (2008), 24:8.14.1-8.14.40.
- 116 Rastelli G., Rio A. D., Degliesposti G. and Sgobba M., *Journal of Computational Chemistry*, 31 (2010), 797-810.
- 117 Miller III B. R., McGee Jr T. D., Swails J. M., Homeyer N., Gohlke H. and Roitberg A. E., *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8 (2012), 3314-21.
- 118 Besler B. H., Merz K. M. and Kollman P. A., *Journal of Computational Chemistry*, 11 (1990), 431-39.
- 119 Kubinyi H., *3d qsar in drug design: Volume 1: Theory methods and applications*. Vol. 1 (Springer Science & Business Media, 1993).
- 120 Kubinyi H., *Drug Discovery Today*, 2 (1997), 457-67.
- 121 Todeschini R. and Gramatica P., 'New 3d molecular descriptors: The whim theory and qsar applications', in *3d qsar in drug design* (Springer, 1998), pp. 355-80.
- 122 Todeschini R., Lasagni M. and Marengo E., *Journal of Chemometrics*, 8 (1994), 263-72.
- 123 De Clercq E., *Medicinal Research Reviews*, 16 (1996), 125-57.
- 124 Nanni R. G., Ding J., Jacobo-Molina A., Hughes S. H. and Arnold E., *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 1 (1993), 129-50.
- 125 Ren J., Esnouf R., Garman E., Somers D., Ross C., Kirby I., Keeling J., Darby G., Jones Y. and Stuart D., *Nature Structural & Molecular Biology*, 2 (1995), 293-302.
- 126 Das K., Lewi P. J., Hughes S. H. and Arnold E., *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88 (2005), 209-31.
- 127 Bahar I., Eрман B., Jernigan R. L., Atilgan A. R. and Covell D. G., *Journal of Molecular Biology*, 285 (1999), 1023-37.
- 128 Minkara M. S., Davis P. H. and Radhakrishnan M. L., *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 80 (2012), 573-90.
- 129 Wang J., Kang X., Kuntz I. D. and Kollman P. A., *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 (2005), 2432-44.



- 130 Ragno R., Frasca S., Manetti F., Brizzi A. and Massa S., *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 (2005), 200-12.
- 131 Jorgensen W. L., Ruiz-Caro J., Tirado-Rives J., Basavapathruni A., Anderson K. S. and Hamilton A. D., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16 (2006), 663-67.
- 132 Weinzinger P., Hannongbua S. and Wolschann P., *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20 (2005), 129-34.
- 133 Parreira R. L., Abrahão O. r. and Galembeck S. E., *Tetrahedron*, 57 (2001), 3243-53.
- 134 Van de Waterbeemd H. and Gifford E., *Nature Reviews Drug Discovery*, 2 (2003), 192-204.
- 135 Vainio M. J. and Johnson M. S., *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45 (2005), 1953-61.
- 136 Mertens A., Zilch H., Koenig B., Schaefer W., Poll T., Kampe W., Seidel H., Leser U. and Leinert H., *Journal of Medicinal Chemistry*, 36 (1993), 2526-35.
- 137 Ren J., Diprose J., Warren J., Esnouf R. M., Bird L. E., Ikemizu S., Slater M., Milton J., Balzarini J. and Stuart D. I., *Journal of Biological Chemistry*, 275 (2000), 5633-39.
- 138 Piao D., Basavapathruni A., Iyidogan P., Dai G., Hinz W., Ray A. S., Murakami E., Feng J. Y., You F. and Dutschman G. E., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23 (2013), 1511-18.
- 139 Nawrozkij M. B., Rotili D., Tarantino D., Botta G., Eremiychuk A. S., Musmuca I., Ragno R., Samuele A., Zanolli S. and Armand-Ugón M., *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (2008), 4641-52.
- 140 Sciabola S., Carosati E., Baroni M. and Mannhold R., *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 (2005), 3756-67.
- 141 Chan J. H., Freeman G. A., Tidwell J. H., Romines K. R., Schaller L. T., Cowan J. R., Gonzales S. S., Lowell G. S., Andrews C. and Reynolds D. J., *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (2004), 1175-82.
- 142 Benjahad A., Guillemont J., Andries K., Nguyen C. H. and Grierson D. S., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13 (2003), 4309-12.
- 143 Tang J., Maddali K., Dreis C. D., Sham Y. Y., Vince R., Pommier Y. and Wang Z., *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2 (2010), 63-67.
- 144 Wang D.-P., Rizzo R. C., Tirado-Rives J. and Jorgensen W. L., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11 (2001), 2799-802.
- 145 Hargrave K. D., Proudfoot J. R., Grozinger K. G., Cullen E., Kapadia S. R., Patel U. R., Fuchs V. U., Mauldin S. C. and Vitous J., *Journal of Medicinal Chemistry*, 34 (1991), 2231-41.
- 146 Ludovici D. W., Kukla M. J., Grous P. G., Krishnan S., Andries K., de Bethune M.-P., Azijn H., Pauwels R., De Clercq E. and Arnold E., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11 (2001), 2225-28.
- 147 Ludovici D. W., Kavash R. W., Kukla M. J., Ho C. Y., Ye H., De Corte B. L., Andries K., de Béthune M.-P., Azijn H. and Pauwels R., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11 (2001), 2229-34.
- 148 Das K., Clark A. D., Lewi P. J., Heeres J., De Jonge M. R., Koymans L. M., Vinkers H. M., Daeyaert F., Ludovici D. W. and Kukla M. J., *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (2004), 2550-60.
- 149 Freeman G. A., Andrews C. W., Hopkins A. L., Lowell G. S., Schaller L. T., Cowan J. R., Gonzales S. S., Koszalka G. W., Hazen R. J. and Boone L. R., *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (2004), 5923-36.
- 150 Benjahad A., Croisy M., Monneret C., Bisagni E., Mabire D., Coupa S., Poncelet A., Csoka I., Guillemont J. and Meyer C., *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 (2005), 1948-64.
- 151 Himmel D. M., Das K., Clark A. D., Hughes S. H., Benjahad A., Oumouch S., Guillemont J., Coupa S., Poncelet A. and Csoka I., *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 (2005), 7582-91.
- 152 Nervall M., Hanspers P., Carlsson J., Boukharta L. and Åqvist J., *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (2008), 2657-67.
- 153 Patel M., McHugh R. J., Cordova B. C., Klabe R. M., Erickson-Viitanen S., Trainor G. L. and Rodgers J. D., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10 (2000), 1729-31.
- 154 Corbau R., Mori J., Phillips C., Fishburn L., Martin A., Mowbray C., Panton W., Smith-Burchnell C., Thornberry A. and Ringrose H., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (2010), 4451-63.

- 155 Tucker T. J., Saggari S., Sisko J. T., Tynebor R. M., Williams T. M., Felock P. J., Flynn J. A., Lai M.-T., Liang Y. and McGaughey G., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18 (2008), 2959-66.
- 156 Mitchell M. L., Son J. C., Guo H., Im Y.-A., Cho E. J., Wang J., Hayes J., Wang M., Paul A. and Lansdon E. B., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20 (2010), 1589-92.
- 157 Ludovici D. W., De Corte B. L., Kukla M. J., Ye H., Ho C. Y., Lichtenstein M. A., Kavash R. W., Andries K., de Béthune M.-P. and Azijn H., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11 (2001), 2235-39.
- 158 Xu B., Sun Y., Guo Y., Cao Y. and Yu T., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17 (2009), 2767-74.
- 159 Patel M., McHugh R. J., Cordova B. C., Klabe R. M., Bacheler L. T., Erickson-Viitanen S. and Rodgers J. D., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11 (2001), 1943-45.
- 160 Schechte I. and Berger A., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27 (1967), 157-8.
- 161 Duschak V. G., Barboza M. and Couto A. S., *Experimental Parasitology*, 104 (2003), 122-30.
- 162 Cazzulo J. J., Franke M. C. C., Martínez J. and de Cazzulo B. M. F., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1037 (1990), 186-91.
- 163 Gillmor S. A., Craik C. S. and Fletterick R. J., *Protein Science*, 6 (1997), 1603-11.
- 164 Campetella O., Henriksson J., Åslund U., Fräsch A., Pettersson U. and Cazzulo J., *Molecular and Biochemical Parasitology*, 50 (1992), 225-34.
- 165 Rudenskaya G. and Pupov D., *Biochemistry (Moscow)*, 73 (2008), 1-13.
- 166 Klemba M. and Goldberg D. E., *Annual Review of Biochemistry*, 71 (2002), 275-305.
- 167 Brinen L. S., Hansell E., Cheng J., Roush W. R., McKerrow J. H. and Fletterick R. J., *Structure*, 8 (2000), 831-40.
- 168 Leung D., Abbenante G. and Fairlie D. P., *Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (2000), 305-41.
- 169 Durrant J. D., Keränen H., Wilson B. A. and McCammon J. A., *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4 (2010), e676.
- 170 Yap C. W., *Journal of Computational Chemistry*, 32 (2011), 1466-74.
- 171 Katritzky A. R., Ramsden C. A., Joule J. A. and Zhdankin V. V., *Handbook of heterocyclic chemistry* (Elsevier, 2010).
- 172 Chessemann G. and Cookson R. F., *The chemistry of heterocyclic compounds, condensed pyrazines*. Vol. 25 (John Wiley & Sons, 2009).
- 173 Fernandes A. A., Kalhan S. C., Njoroge F. G. and Matousek G. S., *Biological Mass Spectrometry*, 13 (1986), 569-81.
- 174 Galstyan G. and Knapp E.-W., *The Journal of Physical Chemistry A*, 116 (2012), 6885-93.
- 175 Mainagashev I. Y., Lapachev V., Fedotov M. and Mamaev V., *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 23 (1987), 1339-42.
- 176 Seki T., Iwanami Y., Kuwatani Y. and Iyoda M., *ChemInform*, 28 (1997).
- 177 Iwanami Y., Seki T. and Inagaki T., *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 44 (1971), 1316-21.
- 178 Taylor E. C. and Thompson M. J., *The Journal of Organic Chemistry*, 26 (1961), 5224-26.
- 179 Suschitzky H., Wakefield B. J. and Whittaker R. A., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* (1975), 401-03.
- 180 Ohle H. and Hielscher M., *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 74 (1941), 13-17.
- 181 Henseke G. and Lemke W., *Chemische Berichte*, 91 (1958), 101-12.
- 182 Horner L., Schwenk U. and Junghanns E., *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 579 (1953), 212-34.
- 183 Tanimori S., Kashiwagi H., Nishimura T. and Kirihata M., *Advanced Synthesis & Catalysis*, 352 (2010), 2531-37.
- 184 Berezovskii V., Polyakova N. and Tyl'chinskaya L., *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 3 (1967), 580-84.
- 185 Matsumoto M., Matsumura Y., Iio A. and Yonezawa T., *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 43 (1970), 1496-500.
- 186 Yonezawa T., Matsumoto M. and Kato H., *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 41 (1968), 2543-43.

- 187 Ning R. Y., Douvan I. and Sternbach L. H., *The Journal of Organic Chemistry*, 35 (1970), 2243-45.
- 188 Walser A., Silverman G., Fryer R. I. and Sternbach L. H., *The Journal of Organic Chemistry*, 36 (1971), 1248-51.
- 189 Perreux L. and Loupy A., *Tetrahedron*, 57 (2001), 9199-223.
- 190 Lidström P., Tierney J., Wathey B. and Westman J., *Tetrahedron*, 57 (2001), 9225-83.
- 191 Zhao Z., Wisnoski D. D., Wolkenberg S. E., Leister W. H., Wang Y. and Lindsley C. W., *Tetrahedron Letters*, 45 (2004), 4873-76.
- 192 Lv M. and Xu H., *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 13 (2010), 293-301.
- 193 Sharghi H. and Sarvari M. H., *Tetrahedron*, 59 (2003), 3627-33.
- 194 Radi M., Saletti S. and Botta M., *Tetrahedron Letters*, 49 (2008), 4464-66.
- 195 Fabian L., Gómez M., Caturelli Kuran J. A., Moltrasio G. and Moglioni A., *Synthetic Communications*, 44 (2014), 2386-92.
- 196 Lall M. S., Ramtohul Y. K., James M. N. and Vederas J. C., *The Journal of Organic Chemistry*, 67 (2002), 1536-47.
- 197 Li J. and Sha Y., *Molecules*, 13 (2008), 1111-19.
- 198 Zieliński T., Achmatowicz M. and Jurczak J., *Tetrahedron: Asymmetry*, 13 (2002), 2053-59.
- 199 Kim J.-K., Kim J., Song S., Jung O.-S. and Suh H., *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 58 (2007), 187-92.
- 200 Somlai C., Péter A., Forgó P. and Penke B., *Synthetic Communications*, 33 (2003), 1815-20.
- 201 Pollini G. P., Baricordi N., Benetti S., De Risi C. and Zanirato V., *Tetrahedron Letters*, 46 (2005), 3699-701.
- 202 Nagai A., Miyagawa T., Kudo H. and Endo T., *Macromolecules*, 36 (2003), 9335-39.
- 203 Andersson P. G., Guijarro D. and Tanner D., *The Journal of Organic Chemistry*, 62 (1997), 7364-75.
- 204 Rachele J. R., *The Journal of Organic Chemistry*, 28 (1963), 2898-98.
- 205 Jones S. M., Urch J. E., Kaiser M., Brun R., Harwood J. L., Berry C. and Gilbert I. H., *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 (2005), 5932-41.
- 206 Anand R. C. and Vimal, *Synthetic Communications*, 28 (1998), 1963-65.
- 207 Goudie R. and Preston P., *J. Chem. Soc. C* (1971), 1718-21.
- 208 TenBrink R. E., Im W. B., Sethy V. H., Tang A. H. and Carter D. B., *Journal of Medicinal Chemistry*, 37 (1994), 758-68.
- 209 Garg B., Bisht T. and Ling Y.-C., *Molecules*, 19 (2014), 14582-614.
- 210 Li Y.-F., Guo M.-Q., Yin S.-F., Chen L., Zhou Y.-B., Qiu R.-H. and Au C.-T., *Carbon*, 55 (2013), 269-75.
- 211 Sharghi H. and Sarvari M. H., *Synthesis* (2003), 243-46.
- 212 Hosseini Sarvari M. and Sharghi H., *Synthesis* (2004), 2165-68.
- 213 Samanta K., Srivastava N., Saha S. and Panda G., *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10 (2012), 1553-64.
- 214 Bera S., Samanta K. and Panda G., *Tetrahedron Letters*, 52 (2011), 3234-36.
- 215 Inagaki T. and Iwanami Y., *Organic Mass Spectrometry*, 12 (1977), 222-25.
- 216 'Spectral database for organic compounds, national institute of advanced industrial science and technology (aist), japan', <<http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/>>.
- 217 Omata K., Aoyagi S. and Kabuto K., *Tetrahedron: Asymmetry*, 15 (2004), 2351-56.
- 218 Li G., Liang Y. and Antilla J. C., *Journal of the American Chemical Society*, 129 (2007), 5830-31.
- 219 Mazur R. H., Reuter J. A., Swiatek K. A. and Schlatter J. M., *Journal of Medicinal Chemistry*, 16 (1973), 1284-87.
- 220 Passeron S. and Brieux G., *Bulletin de la Societe Chimique de France* (1963), 35-&.
- 221 Hu C., Chen Z. and Yang G., *Synthetic Communications*, 34 (2004), 219-24.
- 222 Klebe J. F. and Finkbeiner H., *Journal of the American Chemical Society*, 90 (1968), 7255-61.
- 223 曾庆乐 and 涂兴钊, METHOD FOR SYNTHESIZING N-O-NITROPHENYL AMINO ACID FROM O-CHLORONITROBENZENE, (Google Patents, 2012).
- 224 CAS 923692-64-2.
- 225 CAS 1042811-72-2.

- 226 Nasir W., Munawar M. A., Ahmed E., Sharif A., Ahmed S., Ayub A., Khan M. A. and Nasim F. H., *Archives of Pharmacal Research*, 34 (2011), 1605-14.
- 227 Sarges R. and Lyga J., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 25 (1988), 1475-79.
- 228 CAS 1481644-99-8.
- 229 CAS 1021278-57-8.
- 230 Nishio T., *The Journal of Organic Chemistry*, 49 (1984), 827-32.
- 231 Gris J., Glisoni R., Fabian L., Fernández B. and Moglioni A. G., *Tetrahedron Letters*, 49 (2008), 1053-56.
- 232 Rodrigo G., Robinshon A., Hedrera M., Kogan M., Sicardi S. and Fernandez B., *Trends in Heterocyclic Chemistry*, 8 (2002), 137.
- 233 Kumashiro I., *Nippon Kagaku Zasshi*, 82 (1961), 1068-&.
- 234 Goldfarb D. S., METHOD FOR ALTERING THE LIFESPAN OF EUKARYOTIC ORGANISMS, (Google Patents, 2009).