Estudio Teórico Preliminar de Fármacos Anti-VIH, Inhibidores No Nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa

Martín A. Dragonetti, Javier H. Gris, Albertina G. Moglioni y Beatriz M. Fernández

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Farmacología,
Junín 956, (1113) Buenos Aires-Argentina (e-mail: bmfernan@ffyb.uba.ar)

Resumen

Una serie de compuestos derivados de quinoxalina, benzoxazina y benzodiazepina fue utilizada para realizar un estudio teórico preliminar que permita plantear un potencial grupo farmacóforo que conduzca a la síntesis de posibles inhibidores no-nucleosídicos de la transcriptasa reversa del virus del SIDA. El estudio teórico se llevó a cabo utilizando modelado molecular asistido por computadora. Se analizaron las conformaciones obtenidas para los compuestos en estudio (densidad atómica de carga y del arreglo espacial de los grupos atómicos). Los resultados se compararon con la información aportada por los complejos cristalográficos (fármaco-transcriptasa reversa) extraídos de una base de datos de proteínas. Este estudio permitió establecer los requerimientos esenciales para que un compuesto se comporte como inhibidor de la transcriptasa reversa del VIH-1 y encontrar el potencial farmacóforo común a este tipo de fármacos.

Palabras clave: modelado molecular, SIDA, transcriptasa reversa, farmacóforo

Preliminary Theoretical Study on HIV-1, Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

A series of quinoxaline, benzoxazine and benzodiazepine derivatives was selected to perform a preliminary theoretical study tending to find a potential pharmacophoric group that could lead to the synthesis of non nucleoside inhibitors of the HIV-1 reverse transcriptase. The theoretical study was performed using computer-assisted molecular modeling. The achieved final conformations of the selected compounds were compared and analyzed in terms of the atomic charge density and the atomic groups arrangements. The results were compared with information extracted from the crystallographic complexes (drug-reverse transcriptase) reported in a protein data bank. This analysis enables to establish the essential requirements for a compound inhibition behavior of the HIV-1 reverse transcriptase and to find a potential pharmacophore common to this type of compounds.

Keywords: molecular modeling, AIDS, reverse transcriptase, pharmacophore

INTRODUCCIÓN

En el año 2006 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que alrededor de 40 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Actualmente, América enfrenta un radical crecimiento de individuos que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), por lo que las infecciones por el VIH requieren una efectiva terapia antiviral. Idealmente, los fármacos anti-VIH deberían ser altamente selectivos, tener una buena biodisponibilidad oral, una farmacocinética favorable (Cullen, et al., 2007) y un eficaz procedimiento de síntesis en gran escala, con costos razonables, para que puedan ser accesibles a los pacientes, en especial, de los países en vías de desarrollo.

En años recientes se han dedicado grandes esfuerzos al diseño de compuestos que actúen como inhibidores selectivos de la transcriptasa reversa (TR) de VIH, utilizando programas computacionales como herramienta fundamental (Di Santo et al., 2005; Krier et al., 2005). La TR de VIH-1 está involucrada en la copia del ARN viral a ADN viral, por ello los inhibidores de la misma son utilizados para el tratamiento del SIDA. Estos inhibidores se dividen en dos grupos: los nucleosídicos (INTR's) y los no-nucleosídicos (INNTR's) (Didierjean, et al., 2005; De Clercq, 2005). Desde sus comienzos los INNTR's despertaron gran interés en el desarrollo de nuevos inhibidores debido a su menor toxicidad en comparación con los INTR's (ej. AZT, ddI, 3TC, etc.), pero la aparición de mutaciones, que originan resistencia, fue generalmente asumida como una desventaja que comprometía la utilidad clínica de los INNTR's (De Clercq, 1996). Cuando estas mutaciones se localizan en el bolsillo de unión ("binding pocket") la actividad de los INNTR's se ve restringida conduciendo a una reducción o pérdida total de la actividad farmacológica.

Tratando de profundizar en el tema, se estudió, sobre seis compuestos pertenecientes a diferentes familias de INNTR's, reportados en la literatura (De Corte, 2005), el posible modo de interacción con la TR, en un intento de acceder al conocimiento de los potenciales requerimientos químico-estructurales de los mismos (Fig.1)

Fig. 1: Compuestos seleccionados como modelo para el estudio de las posibles interacciones con la transcriptasa reversa del VIH-1.

Características farmacológicas de los compuestos seleccionados

Para realizar la selección de los compuestos del presente estudio, se tuvo en cuenta la CE_{50} *in vitro* (50% concentración efectiva o concentración requerida para inhibir en un 50% la citotoxicidad inducida por VIH-1) y su índice de selectividad (IS) el cual indica la relación entre la concentración citotóxica (CC_{50}) (concentración requerida para reducir la viabilidad de la célula huésped en un 50%) y la CE_{50} . Asimismo se tuvo en cuenta el espectro de actividad de los inhibidores frente a los mutantes más comunes de VIH-1 TR, ej. Tyr-188Leu, Tyr-188Cys, etc.

Se eligió el HBY-097 (1) que, de acuerdo a los datos obtenidos *in vitro* tiene muy buen perfil tanto frente a la enzima conocida como ("wild-type") con un IS: 200.000, CE_{50} : 0.08 μ M, (Kleim et al., 1995) como así también frente a mutaciones típicas. En particular la mutación Tyr-188Leu en VIH-1TR confiere un alto nivel de resistencia a un buen número de INNTR's, incluyendo α -APA, 9-CI-TIBO tanto in vivo como *in vitro* (Schinatz et al., 1997). El HBY-097 es más efectivo contra el mutante Tyr-188Leu VIH-1 TR que muchos otros INNTR's, por ej. Nevirapina (6), (con valores de CI_{50} de 2.86 μ M y >100 respectivamente). También se debe destacar que el HBY-097 fue elegido para realizar ensayos clínicos (Hsiou et al., 1998).

El S-2720 (2), al igual que (1) es un derivado de quinoxalina. Muestra marcadas diferencias con otros inhibidores específicos en términos de resistencia al VIH-1. La CE_{50} de este compuesto es 0.014 μ M sobre el VIH-1 en células CEM y también sobre una gran cantidad de virus mutantes (Kleim et al., 1995).

La Tivirapina (3), así como la Nevirapina (6) (Fig. 1) presentan valores aceptables de actividades frente a la TR "wild-type" (IS: 30000, CE_{50} : 0.05 μ M (Pauwels et al., 1994).

El derivado de una tiocarboxanilida, UC-781 (4) muestra los siguientes parámetros de actividad inhibitoria, una IS > 5.000, CE_{50} de 0.02 μ M (Balzarini et al., 1995; Buckheit et al., 1997). Asimismo tiene un buen espectro de acción y es marcadamente activo frente a las principales mutantes responsables de generar resistencia a la mayoría de los INNTR's.

El Efavirenz (5) presenta las siguientes características inhibitorias: IS: 80.000 y CE_{50} : 0.003 μ M y como en los casos anteriores es activo frente a enzimas mutantes (Young et al., 1995).

Por último se seleccionó la Nevirapina(6), uno de los primeros compuestos en que se detectó actividad frente a la TR VIH-1. Si bien posee una actividad inhibitoria comparable a la de los demás compuestos (Merluzzi et al., 1990; De Clerq, 1996) su IS es más bajo, IS >1000, CE_{50} : 0.084 μ M, lo que indica que su toxicidad es un poco más elevada que la del resto de los compuestos. Por otro lado, este compuesto presenta resistencia a la mayoría de las mutantes de la TR. Pero este fármaco ha sido elegido debido a que está formado por un sistema tricíclico de anillos fusionados dipiridodiazepínico que le permite adoptar en el espacio la conformación tipo "mariposa" típica de la mayoría de los INNTR's, pero que no poseen los otros cinco compuestos seleccionados.

Por lo tanto, se usará a (6) como parámetro de comparación con el resto de los compuestos en lo que a la conformación se refiere, tratando de establecer una relación teórica entre dicha estructura y la actividad inhibitoria de los INNTR's frente a la TR "wild-type" HIV-1 y las mutantes de la TR, como por ej. Tyr181-Cys, Tyr188-Hys (Dueweke et al., 1993).

Datos cristalográficos

De los archivos del Protein Data Bank del Instituto Nacional de Saludo (National Health Institute-USA) se extrajeron los datos de los complejos cristalinos ligando-TR (todas las posibles interacciones ligando-receptor) y la estructura de la enzima con los cuales se realizó un estudio de "docking". Se han usado los siguientes complejos: HBY-097-VIH-1 TR (código PDB: 1BQM), Nevirapina-VIH-1 TR (código PDB: 3HVT), Efavirenz-VIH-1 TR (código PDB: 1FK9), UC-781-VIH-1 TR (código PDB: 1JLG) y TIBO- VIH-1 TR (código PDB:1HNV). (ver web: www.rcsb.org/pdb).

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento computacional

Para estudiar los compuestos 1-6 desde un punto de vista estructural se realizó un análisis teórico en busca de los puntos o regiones en común, aplicando tanto parámetros geométricos como electrónicos. Se llevó a cabo un análisis conformacional de todas las estructuras para encontrar aquellas conformaciones más estables. La optimización de geometrías se realizó usando el método Austin Model 1 (AM1). Dado que se trabajó con estructuras tanto rígidas como flexibles se utilizaron procedimientos sistemáticos y estocásticos, respectivamente, para generar las geometrías iniciales. Las conformaciones de partida se generaron por medio de modificaciones en los ángulos diedros. Los ángulos y sus modificaciones para cada estructura se eligieron con el número mínimo y valores de pasos compatibles con una búsqueda completa del espacio conformacional. Los “pasos” variaron de 0° a 270° dependiendo de la flexibilidad de la estructura.

El procedimiento estocástico se aplicó para generar las geometrías iniciales de las quinoxalinas 1 y 2, de la benzodiazepina 3, de la tiocarboxanilida 4 y del Efavirenz 5, rindiendo los cálculos por Dinámica Molecular (T = 800 K, tiempo de calentamiento= 0.1 ps, tamaño de paso = 0.0005 ps, tiempos de corrida= 10 ps, tiempo de enfriamiento= 3 ps) varias estructuras estables diferentes.

El método sistemático fue usado para la Nevirapina 6. Sobre cada una de estas conformaciones, ya sea generadas por el procedimiento estocástico o el sistemático, se aplicó una completa optimización de la geometría por AM1 para lograr identificar los mínimos globales. Luego se utilizó un análisis similar, basado en técnicas de superposición gráfica, orientado a identificar los grupos atómicos comunes a todos los miembros de la serie considerada. De acuerdo a esto pudieron identificarse dos “porciones” diferentes en tales estructuras, sobre la base de su distinta hidrofilia: una porción A polar y otra B, principalmente hidrofóbica (Fig.2).

Fig. 2: Superposición 3D de los compuestos seleccionados.

Estas dos porciones están conformacionalmente restringidas a un único arreglo espacial que se repite a lo largo de todos los compuestos estudiados, el cual podría ser considerado, como un potencial grupo farmacofórico. Teniendo en cuenta que existe una porción polar pudo hacerse una descripción electrónica mediante la comparación de las densidades de carga locales de los centros atómicos, derivados de potenciales electrostáticos calculados.

El procedimiento del “punto único” efectuado sobre cada estructura fue utilizado usando los cálculos de la teoría de la densidad funcional (DFT) con la función híbrida triparamétrica de Becke con

correlación funcional LYP (B3LYP) y base 6-31G**. Las características electrónicas han sido derivadas de una correlación existente con los potenciales electrostáticos (CHELPG) usando el mismo nivel teórico. El programa usado para estos cálculos fue el Gaussian 98 (G98).

Actividad antiviral y ensayos de citotoxicidad

Una vez definidos los probables requerimientos químicos, se seleccionaron varios compuestos que contienen en su molécula la agrupación atómica común a los compuestos 1-6 con el fin de ensayarlos. Ellas fueron 4-cloroacetanilida, 4-metoxiacetanilida, 4-nitroacetanilida, 4-hidroxiacetanilida y 4-etiltioacetanilida (Fig.3).

Fig. 3: Potencial farmacóforo generado por superposición de estructuras.

Las soluciones finales con las que se realizaron los ensayos de actividad (1×10^{-6} M) fueron preparadas a partir de 100 ml de una solución inicial al 10% en etanol-agua de cada fármaco y subsiguientes diluciones en agua. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA) a 37°, suplementado con 2 mM de L-glutamina (Gibco BRL, USA), 100 U/ml de penicilina (Gibco BRL, USA), 100 mg/ml de estreptomina (Gibco BRL, USA) y 10% de suero fetal de bovino (SFB, Gibco BRL, USA). Las células PBMC fueron aisladas por centrifugación con gradiente de Ficoll-Hypaque (Amershan Pharmacia Biotech., Suecia) a partir de sangre periférica de pacientes VIH-1 seronegativos, estimulada con 0.1% de fitohemaglutinina (PHA) durante 3 días y cultivadas con el agregado de 10 U/ml de interleuquina-2 (IL-2). El stock de hebras HTLV-III_B de VIH-1 fue obtenido de células H9 crónicamente infectadas y fue usado en todos los ensayos descritos en este estudio. La células PBMC fueron infectadas a 6.45×10^5 TCID₅₀/10⁶ células (50% de dosis infectiva de cultivos de tejido), durante 2 horas a 37°. Después de la infección, las células se lavaron y dispusieron en cámaras de 96 platos en presencia de varias diluciones de los compuestos. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se utilizaron células tratadas con AZT que fueron monitoreadas como controles de la actividad antiviral. El medio de cultivo se cambió al cuarto día manteniendo la concentración original de droga. Al séptimo día los fluidos sobrenadantes fueron recolectados y la producción del antígeno gp24 fue subsecuentemente evaluado mediante el ensayo comercial ELISA (Abbot Laboratories, USA). Los ensayos de citotoxicidad se desarrollaron en paralelo sobre células PBMC no infectadas con el fin de determinar la concentración de fármaco que inhibe el 50% del crecimiento (CE₅₀). Dos diferentes métodos se utilizaron para evaluar la viabilidad de las células: con colorante Tripan Blue y con colorante Sulforrodamina B. Una vez que se obtuvieron los parámetros CE₅₀ y CC₅₀ se determinó el Índice de selectividad (IS) mediante la relación CC₅₀/ CE₅₀.

RESULTADOS Y DISCUSION

Superposición y análisis de carga

De acuerdo a las observaciones realizadas, la superposición gráfica de los compuestos seleccionados (Fig. 2) mostró que existen 2 zonas de diferente polaridad, una zona A polar y otra B hidrofóbica, respectivamente (Fig. 2).

El análisis realizado sobre la zona A muestra similitud entre las estructuras 1 y 5 (Fig. 1) sugiriendo una posible relación entre la agrupación anilida o la tioanilida y la actividad inhibitoria contra la TR para este tipo de isósteros (Fig. 4).

Fig. 4: Superposición de los INNTR's seleccionados insertos dentro del “bolsillo de unión” (binding pocket) no-nucleosídico de la TR. Los grupos que ocupan la subzona 1 están en una área de este sitio delimitada por Val179, Val189,Gly190,Val106 y Lys103.

El análisis de la distribución electrónica mostró similitud en los signos de las cargas para los sistemas N-C=O y N-C=S. Esta característica común podría ser uno de los requerimientos mínimos para poseer tal actividad inhibitoria. Los resultados se listan en la Tabla 1. De acuerdo a los resultados de esta tabla puede suponerse que la densidad de carga positiva sobre el H del N-1 daría lugar a un enlace por puente de hidrógeno con algún átomo disponible a la distancia adecuada. Además, se observa que las densidades de carga negativa sobre los átomos de O ó S podrían inducir a interacciones de Van der Waals con residuos complementarios adyacentes.

Tabla 1: Densidad de carga (Potencial electrostático)

Compuesto	C2	N1	O3	S4
Tivirapina	0.25	-0.45		-0.41
UC-781	0.31	-0.40	-0.39	
S-2720	0.16	-0.41		-0.31
HBV-097	0.17	-0.46		-0.26
Efavirenz	1.04	-0.85		-0.59

Si se considera la zona hidrofóbica B (Fig.2) el arreglo entre las estructuras que fue resaltado conduce a definir tres subzonas o dominios para realizar un mejor análisis conformacional: una subzona 1 que involucra aquellos sustituyentes en posición-3; una subzona 2 que involucra a los sustituyentes en posición-4 y una subzona 3 constituida por gran parte del anillo aromático de los compuestos 1 a 5. Comenzando con la subzona 1 (B1) (Fig. 4) se observa que los sustituyentes presentan cadenas alifáticas y, en algunos casos, heteroátomos. Hay que destacar que estos sustituyentes están localizados en la “cola de la mariposa” de igual manera que la parte carboxílica del α-APA en su complejación con la TR (Hsiou et al., 1998). El sitio de unión en la TR (subzona 1) debe interaccionar, a través de los sustituyentes alifáticos, con la cadena alifática en posición-3 de los compuestos analizados. Considerando la subzona 2 (B2) (Fig.5), ésta está dispuesta en forma perpendicular respecto de aquellos sustituyentes definidos para la zona 1.

Fig. 5: Superposición de los INNTR's elegidos dentro del "binding pocket" no nucleosídico de la TR.

La subzona 2 del sitio está limitado por Tyr 188, Pro95, Leu100, Leu234, Tyr181 y Trp229. En cada caso los sustituyentes en posición 4 de los compuestos estudiados que ocupan dicha zona, tienen una cadena alifática saturada o no-saturada de volumen considerable con características hidrofóbicas. Es importante notar que todos los sustituyentes que está presentes en ambas subzonas (B1, B2) poseen flexibilidad debido a la naturaleza de sus cadenas. Esta propiedad les confiere suficiente movilidad dentro del sitio de acción como para interactuar libremente con los grupos adyacentes. Eso no ocurre en el caso de los sustituyentes rígidos. Cuanto mayor sea la interacción con los residuos presentes en el sitio de acción más importante será la estabilidad del inhibidor enzimático frente a los mutantes de la TR. Finalmente, la subzona 3 (B3) queda definida por el área de interacción del anillo aromático de todos los compuestos estudiados. En todos los casos la presencia de grupos atractores de electrones (Cl) o dadores de electrones (CH₃) sobre el anillo bencénico también podrían estar involucrados en una potencial interacción con la subzona B3.

Discusión comparativa entre los datos cristalográficos y los resultados teóricos

Como se dijo inicialmente, en vista de que los datos cristalográficos se encuentran disponibles para la mayoría de los compuestos estudiados y tal como es de interés la validación del método de cálculo elegido (datos teóricos obtenidos vs. resultados experimentales), se llevó a cabo un estudio comparativo entre las geometrías halladas a nivel teórico y los obtenidos a partir de los datos cristalográficos. Esta validación permitirá recurrir a este método en futuras investigaciones, sobre compuestos que no puedan ser apropiadamente cristalizados como ligandos libres o formando complejos. Las estructuras de los complejos enzima-inhibidor extraídos del PDB fueron manualmente superpuestos con los mínimos conformacionales calculados. También se realizó un estudio de "docking" con la superposición de todos los mínimos calculados en forma teórica. En el caso del compuesto 2 como no se disponía de la estructura cristalográfica y teniendo en cuenta su similitud estructural con la del compuesto 1, el mínimo energético fue insertado dentro del binding pocket de la TR "wild type".

De la misma forma las estructuras optimizadas de los inhibidores se superpusieron y se insertaron en ese bolsillo de la TR. La potencial interacción entre los inhibidores y los residuos de aminoácidos del "binding pocket" fueron estudiados y permitieron realizar las siguientes observaciones generales. Así, midieron las distancias entre el H^{N1} de cada compuesto y el O de la Lys101, encontrándose una distancia promedio de 1.86 Å. Los valores cercanos de unión hidrógeno observados para todos los compuestos elegidos llevan a considerar que este tipo de interacción puede ser uno de los factores principales que contribuyen a la estabilización de la molécula en el sitio de acción. No se

encontraron diferencias en estas distancias para los complejos con la enzima mutante y los compuestos 1 al 5. Los valores de las distancias de interacción fueron cercanos a los de los compuestos seleccionados y se listan en la Tabla 2.

Tabla 2: Distancias entre H^{N4} y O^{C=O} de Lys-101 para cada compuesto

Compuesto	Distancia ($\text{\AA}$)
Tivirapina	2.00
UC-781	1.90
S-2720	1.84
HBY-097	1.89
Efavirenz	1.68

De acuerdo al análisis de la distribución de cargas (Tabla 1) pueden verse densidades de carga negativas sobre los átomos de O y S. Si se tienen en cuenta las distancias de interacción (4.16 Å) entre el N-ω protonado de la Lys101 también es posible proponer que existen interacciones de Van der Waals entre estos grupos. En el caso de la subzona 1, se observa buena superposición entre los mínimos calculados y los datos cristalográficos de los compuestos estudiados. Puede encontrarse que todos los sustituyentes interaccionan con Val179, Val106, Lys103, Val 189 y Gly190 (Fig. 5). De acuerdo a las características de los átomos o grupos atómicos de los sustituyentes y la naturaleza química de los residuos proteicos, se pueden postular interacciones hidrofóbicas entre ellos. Las distancias sustituyente-residuo se listan en la Tabla 3.

Tabla 3: Distancias interatómicas (Å) entre los diferentes residuos de la subzona TR VIH-1 y los átomos sustituyentes de los INNTR's elegidos.

Compuesto	Val179	Val 106	Lys103	Gly90	Val189
Tivirapina	4.6	3.7	3.6	5.5	4.3
UC-781	3.4	3.9	4.3	4.3	4.5
S-2720	4.9	4.6	4.6	4.9	6.0
HBY-097	4.3	4.0	5.0	3.0	3.0
Efavirenz	4.1	4.0	3.8	3.3	3.8

Respecto de la subzona 2 (Fig. 5) definida por el sitio de interacción de aquellos sustituyentes presentes en la posición 4 del esqueleto principal de los inhibidores estudiados, la misma se delimita por Trp229, Tyr181, Tyr188, Leu234, Pro95 y Leu100. Los compuestos elegidos portan en dicha posición sustituyentes alquílicos saturados y no-saturados que pueden interaccionar principalmente por interacción hidrofóbica con los residuos de la cavidad. Las distancias medidas en Å se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4: Distancias interatómicas (Å) entre los diferentes residuos de la subzona 2 de la TR VIH-1 y los átomos sustituyentes de los INNTR's seleccionados.

Compuesto	Trp 229	Tyr 188	Pro 95	Leu 100	Leu 234	Tyr 181
Tivirapina	3.5	3.2	5.3	4.3	3.1	3.5
UC-781	4.0	3.5	4.4	4.0	3.8	3.9
S-2720	2.9	3.1	3.4	3.1	3.8	3.9
HBY-097	3.0	3.1	3.8	3.2	4.3	3.9
Efavirenz	4.0	3.5	4.0	3.4	4.3	3.4

Ensayos antivirales

La CE₅₀ de los compuestos con la función anilida o tioanilida, se determinó por ensayos *in vitro* sobre células PBMC. Los resultados hallados mostraron ausencia de actividad en el rango 1 x 10⁻⁴ –

10 μ M. Esto indica que el grupo atómico considerado es insuficiente para obtener una actividad inhibitoria aceptable. Se deduce entonces que es necesario ampliar la agrupación farmacofórica con el objeto de generar más interacciones entre el inhibidor y el sitio de interacción.

CONCLUSIONES

De manera preliminar se puede concluir que el presente estudio ha permitido postular algunos requerimientos que, sin excepción, deben ser tenidos en cuenta para obtener actividad inhibitoria contra la TR "wild type" del VIH-1. Si la agrupación anilida o tioanilida no son suficientes para producir actividad inhibitoria, deben estar presentes para una mayor interacción entre la enzima y el inhibidor en las zonas definidas como B1, B2 y B3. Siendo que estas zonas son altamente lipofílicas los sustituyentes deben ser capaces de interactuar hidrofóbicamente con residuos vecinos de características similares. Por otra parte, este estudio permitió validar el uso de los métodos teóricos AM1 y Gaussian sobre derivados de quinoxalinas activas sobre la TR del VIH aún no cristalizadas con ella.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires por el financiamiento de este trabajo (Proyecto UBACyT B-087) y al Sr. Juan Trincherio (Centro de Referencia para el SIDA, Buenos Aires, Argentina) por su valiosa colaboración en la determinación de la actividad biológica de los compuestos en estudio.

REFERENCIAS

Balzarini, J., M. Baba, E. De Clercq y A. Karlsson; *Differential activities of 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6- (phenylthio)thymine derivatives against different human immunodeficiency virus type-1 mutant strains*. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 998-1002 (1995).

Buckheit, R.W. Jr, y otros siete autores; *Highly potent oxathin carboxanilide derivatives with efficacy against nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus isolates*. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 831-837 (1997).

Cullen, M.D. y otros siete autores; *Synthesis and biological evaluation of alkenyldiarylmethane HIV-non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors that possess increased hydrolytic stability*. J. Med. Chem. C, 4854-4867 (2007).

De Clercq, E.; *What can be expected from NNRTI's in the treatment of HIV-1 infections*. Rev. Med. Virol. 6, 97-117 (1996).

De Clercq, E.; *New approaches toward anti-HIV chemotherapy*. J. Med. Chem. 48 1297-1313 (2005).

De Corte, B.L; *From 4,5,6,7-Tetrahydro-5-methylimidazo[4,5,1-jk](1,4)benzodiazepin-2(1H)-one (TIBO) to Etravirine (TMC125): Fifteen years of research on non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase*. J. Med. Chem. 48, 1689-1696 (2005).

Didierjean, J. y otros siete autores; *Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 4884-4894 (2005).

Di Santo, R. y otros diez autores; *Design, synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of TIBO-like cyclic sulfones as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors* Chem MedChem 1, 82-96 (2006).

Dueweke, T.J. y otros siete autores; *A mutation in reverse transcriptase of bis(heteroaryl)piperazine-resistant human immunodeficiency virus type-1 that confers increased sensitivity to other non-nucleoside inhibitors*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90, 4713-4717 (1993).

Hsiou, Y. y otros nueve autores; *Structures of Tyr 188 Leu mutant and wild-type reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBY-097: inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance*. J. Mol. Biol. 284, 313-323 (1998).

Kleim, J.P. y otros once autores; *Evaluation of HBY-097, a new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor of human immunodeficiency virus type-1 replication*. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 2253-2257 (1995).

Krier, M. y otros siete autores; *Design of small-sized libraries by combinatorial assembly of linkers and functional groups to given scaffold*. J. Med. Chem. 48, 3816-3822 (2005).

Merluzzi, V.J. y otros catorce autores; *Inhibition of HIV-1 replication by a NNRTI*. Science 250, 1411-1413 (1990).

Pauwels, R. y otros siete autores; *New tetrahydroimidazo[4.5.1-jk][1.4]-benzodiazepin-2(1H)-one and thione derivatives are potent inhibitors of human HIV-1 replication and are synergic with 2',3'-dideoxynucleoside analogs*. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 2863- 2870 (1994).

Schinazi, R.F., B.A. Larder y J.W. Mellors; *Mutations in retroviral genes associated with drug Resistance*. Int. Antiviral News 5, 129-142 (1997).

Young, S.D., y otros veinte autores; *DMP 266: a novel potent HIV-1 NNRTI*. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 2602-2605 (1995).