

Resumen

La fiebre chikungunya es una enfermedad causada por el virus Chikungunya (CHIKV) que genera síntomas inflamatorios y debilitantes (artralgia, artritis y mialgia). Esta enfermedad es transmitida por los mosquitos *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*, y desde el brote epidémico en la isla La Reunión en 2005-2006, genera casos en áreas tropicales y subtropicales de Asia, África y las Américas, llegando al norte de Argentina. En la actualidad, no existen antivirales contra este virus, por lo que los tratamientos de la enfermedad son de apoyo y alivio de los síntomas.

En otras investigaciones se ha reportado que un grupo de compuestos químicos derivados del anillo de quinazolina funcionan como antivirales inhibidores de la polimerasa de distintos virus que, al igual que chikungunya, tienen un genoma de ARN. En base a la conservación estructural entre las polimerasas de estos virus, se hipotetiza que las 4-amino-quinazolininas presentan actividad antiviral contra CHIKV, probablemente con la polimerasa viral como blanco. Para abordar esta hipótesis se propone realizar un screening de actividad de ocho 4-amino-quinazolininas para identificar moléculas activas frente a CHIKV y caracterizar de forma preliminar su modo de acción antiviral.

Se evaluó el efecto antiviral de los compuestos *in vitro* utilizando un virus recombinante derivado de un clon infeccioso de CHIKV que expresa la proteína fluorescente Zs-Green como gen reportero y permite cuantificar la infección a partir del conteo de unidades formadoras de focos fluorescentes. La toxicidad de los compuestos se evaluó mediante ensayos de tinción con Violeta Genciana y MTS/PMS. Como resultado se identificaron dos compuestos activos (QMED2 y QMED3) que presentaron una concentración efectiva del 50% (CE_{50}) en el orden de micromolar y un índice de selectividad mayor a 50. Esta actividad se confirmó contra un aislamiento de CHIKV wild type mediante ensayos de rendimiento viral.

Dada su menor citotoxicidad, se seleccionó QMED2 para estudiar su modo de acción. Como una aproximación a la validación del blanco de acción de este compuesto se realizaron ensayos de tiempo de agregado de compuesto y de replicación en trans de una ARN subgenómico. Los resultados sugieren que QMED2 actuaría luego de la entrada y traducción del genoma viral, de manera similar a Favipiravir, un inhibidor de la polimerasa viral. De acuerdo a la hipótesis planteada, los resultados preliminares del ensayo de trans-replicación sugieren que QMED2 tendría como blanco alguna de las proteínas no estructurales que conforman al complejo de replicación viral.

En conclusión, se identificaron quinazolininas como potenciales antivirales para CHIKV. La caracterización biológica preliminar de su blanco será complementada en un futuro con la selección de virus resistentes que permitan definir su mecanismo y blanco de acción con mayor certeza. Finalmente, se realizarán modificaciones químicas sobre la molécula con el objetivo de optimizar la potencia antiviral frente a CHIKV de esta familia de compuestos.

Palabras clave: Virus chikungunya, antivirales, quinazolininas, replicación de genoma, polimerasa de ARN dependiente de ARN.

Abstract

Chikungunya fever is a disease caused by the Chikungunya virus (CHIKV) that leads to inflammatory and debilitating symptoms (arthralgia, arthritis, and myalgia). This disease is transmitted by the *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes, and since the epidemic outbreak on Réunion Island in 2005-2006, it has been causing cases in tropical and subtropical areas of Asia, Africa, and the Americas, reaching northern Argentina. Currently, there are no antivirals against this virus, so treatments focus on supportive care and symptom relief.

Other studies have reported that a group of chemical compounds derived from the quinazoline ring function as polymerase-inhibiting antivirals against various viruses that, like Chikungunya, have an RNA genome. Based on the structural conservation of these viral polymerases, it is hypothesized that 4-aminoquinazolines exhibit antiviral activity against CHIKV, likely targeting the viral polymerase. To test this hypothesis, we propose screening the activity of eight 4-aminoquinazolines to identify active molecules against CHIKV and preliminarily characterize their antiviral mode of action.

The antiviral effect of the compounds was evaluated *in vitro* using a recombinant virus derived from an infectious CHIKV clone that expresses the fluorescent protein Zs-Green as a reporter gene, allowing infection quantification based on counting fluorescent focus-forming units. Compound toxicity was assessed using Gentian Violet and MTS/PMS staining assays. As a result, two active compounds (QMED2 and QMED3) were identified, showing a 50% effective concentration (EC₅₀) in the micromolar range and a selectivity index greater than 50. This activity was confirmed against a wild-type CHIKV isolate through viral yield assays.

Due to its lower cytotoxicity, QMED2 was selected for studying its mode of action. As an approach to validating this compound's target, time-of-addition assays and trans-replication assays of a subgenomic RNA were performed. The results suggest that QMED2 acts after viral genome entry and translation, similar to Favipiravir, a viral polymerase inhibitor. According to the proposed hypothesis, preliminary results from the trans-replication assay suggest that QMED2 targets one of the non-structural proteins that form the viral replication complex.

In conclusion, quinazolines were identified as potential antivirals against CHIKV. The preliminary biological characterization of their target will be further complemented by selecting resistant viruses to define their mechanism and target more precisely. Finally, chemical modifications will be made to the molecule to optimize the antiviral potency of this compound family against CHIKV.

Keywords: Chikungunya virus, antivirals, quinazolines, genome replication, RNA dependent ARN polymerase.