

Tesi doctoral presentada per En/Na

Eulàlia PIÑOL OLLÉ

amb el títol

**" Disseny, síntesi i avaluació d'inhibidors de
dimerització de la proteasa del VIH-1"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

FARMÀCIA

Barcelona, 20 de juny del 2007.

Facultat de Farmàcia
Departament de Farmacologia i Química Terapèutica



UNIVERSITAT DE BARCELONA



1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1.1 SÍNDROME DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA ADQUIRIDA (SIDA)

L'abast de l'epidèmia provocada pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) és molt més ampli del que es podia haver previst ara fa 25 anys, quan es va descobrir per primera vegada l'existència d'aquesta malaltia. Aquesta malaltia és coneguda actualment sota el nom de síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA) i es caracteritza per una deficiència en el sistema immunològic i una elevada susceptibilitat a patir qualsevol tipus d'infecció. Havent estat la causant de la mort de més de 25 milions de persones i amb un valor estimat d'aproximadament 40 milions de persones actualment infectades (Fig. 1),¹ la SIDA es pot classificar com una de les pitjors malalties infeccioses conegudes. Ha esdevingut la principal causa de mort a l'Àfrica sub-sahariana i la quarta a nivell mundial, per darrere dels atacs de cor, els vessaments cerebrals i les infeccions respiratòries agudes.

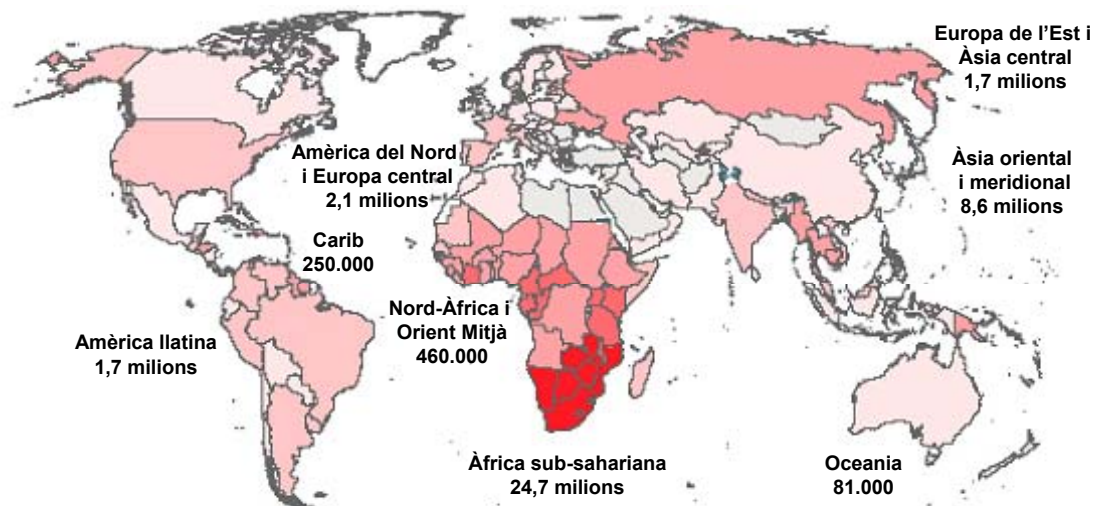


Figura 1: Mapa mundial del nombre estimat d'infectats pel VIH l'any 2006

Aquesta epidèmia devastadora ha provocat una intensa recerca sense precedents per part de la comunitat científica, que ha resultat en la identificació de l'agent causant de la malaltia i en el desenvolupament d'una teràpia combinada coneguda sota el nom de HAART (*Highly Active Anti Retroviral Therapy*). Tot i que la introducció d'aquesta combinació de fàrmacs ha reduït dràsticament les morts provocades per la SIDA en el món desenvolupat, el seu elevat cost impedeix l'accessibilitat d'aquesta teràpia a la majoria dels infectats, ja que més del 95% habiten en països en vies de desenvolupament. Aquest fet desemboca en un greu problema social i econòmic a nivell mundial, al qual cal respondre amb una política d'educació i prevenció i amb una intensa recerca envers el desenvolupament d'una possible vacuna i de nous fàrmacs més potents.

¹ Joint United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS) i World Health Organization (WHO) 2006. AIDS epidemic update: December 2006 (www.unaids.org)

1.1.1 El virus de la immunodeficiència humana (VIH)

Amb l'aïllament d'un nou retrovirus l'any 1983 per part dels grups de Gallo i Montagnier,² i la posterior associació d'aquest amb la SIDA, es va començar a clarificar l'agent causant d'aquesta infecció. Aquest virus, que des del seu descobriment ha rebut diferents noms com HTLV-III (*Human T-cell Leukemia Virus Type 3*) o ARV (*AIDS related virus*), es coneix actualment com a virus de la immunodeficiència humana (VIH).

Actualment està àmpliament acceptat el fet que el VIH prové del virus de la immunodeficiència del simi (VIS) i que la transmissió als humans va tenir lloc per zoonosi d'una subespècie de ximpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*).³ En quin lloc, quan i de quina manera són algunes de les qüestions que encara romanen sense resposta, tot i l'existència d'una gran varietat d'hipòtesis.

El VIH és un virus altament variable, que muta amb molta facilitat. S'han detectat dues soques genèticament diferents del virus: el VIH-1 i el VIH-2, els quals es transmeten de la mateixa manera i donen lloc a la SIDA de manera indistingible.⁴ Tanmateix, sembla que el VIH-2 es transmet menys fàcilment i que el període entre la infecció inicial i la malaltia és més llarg. Arreu del món, la forma predominant del virus és la del VIH-1, mentre que el VIH-2 es troba concentrat bàsicament a l'oest d'Àfrica. A la vegada, el VIH-1 es pot classificar en tres grups: el M (de l'anglès *major*), l'O (*outlier*) i N (*new*).

La principal diana del VIH són els limfòcits T CD4⁺, que formen part de la maquinària del sistema immunològic.⁵ Juntament amb els limfòcits T, altres cèl·lules que expressen els receptors CD4 a la seva superfície, com són els macròfags, els monòcits i les cèl·lules limfoides, atrauen també el VIH i actuen com a dipòsits virals, incrementant d'aquesta manera el període de latència associat amb la infecció.⁶ La primera fase de la infecció del VIH progressa ràpidament i exhibeix símptomes semblants als de la mononucleosi, en un període de poques setmanes. Durant aquesta fase, l'extensió de la infecció és elevada i la concentració de virió (la partícula viral) supera el milió de còpies per mil·lilitre de sang. La resposta immunològica del pacient contraataca al cap de poques setmanes, i com a conseqüència té lloc una disminució del nivell del virus en la sang, d'aquesta manera s'entra en la segona fase de la infecció. Aquest llarg període asimptomàtic fa que el VIH es pugui caracteritzar com un lentivirus. Durant aquest període, la replicació viral continua sent activa i les cèl·lules són infectades i eliminades ràpidament. Es produeix una disminució gradual del nombre de cèl·lules T. En la tercera i última fase de la infecció, el nombre de cèl·lules T CD4⁺ disminueix més ràpidament i la càrrega viral augmenta fins a produir una immunodeficiència clínica.

² a) Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J.-C.; Rey, F.; Nugeyre, M.T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L.; *Science*, **1983**, 220, 868-871. b) Popovic, M.; Sarngadharan, M.G.; Read, E.; Gallo, R.C.; *Science*, **1984**, 224, 497-500. c) Gallo, R.C.; Salahuddin, S.Z.; Popovic, M.; Shearer, G.M.; Kaplan, M.; Haynes, B.F.; Palker, T.J.; Redfield, R.; Oleske, J.; Safai, B.; White, G.; Foster, P.; Markham, P.D.; *Science*, **1984**, 224, 500-503.

³ a) Gao, F.; Bailes, E.; Robertson, D.L.; Chen, Y.; Rodenburg, C.M.; Michael, S.F.; Cummins, L.B.; Arthur, L.O.; Peeters, M.; Shaw, G.M.; Sharp, P.M.; Hahn, B.H.; *Nature*, **1999**, 397, 436-444. b) Bailes, E.; Gao, F.; Bibollet-Ruche, F.; Cournaud, V.; Peeters, M.; Marx, P.A.; Hahn, B.H.; Sharp, P.M.; *Science*, **2003**, 300, 1713.

⁴ a) Clavel, F.; Guyader, M.; Guetard, D.; Salle, M.; Montagnier, L.; Alizon, M.; *Nature*, **1986**, 324, 691-695. b) Guyader, M.; Emerman, M.; Sonigo, P.; Clavel, F.; Montagnier, L.; Alizon, M.; *Nature*, **1987**, 326, 662-669.

⁵ Haase, A.T.; *Annu. Rev. Immunol.*, **1999**, 17, 625-656.

⁶ Embretson, J.; Zupancic, M.; Ribas, J.L.; Racz, P.; Tenner-Racz, K.; Haase, T.; *Nature*, **1993**, 362, 359-362.

Estructura del VIH

El VIH ha estat identificat com a retrovirus, pertanyent a la família dels *Lentiviridae*,² que com el seu nom indica es caracteritzen pel llarg temps que triguen en produir efectes adversos al cos. Mitjançant microscòpia electrònica d'elevada resolució s'ha observat que el virió madur del VIH consisteix bàsicament en una partícula esfèrica embolcallada d'aproximadament 100 nm de diàmetre (Fig. 2).⁷

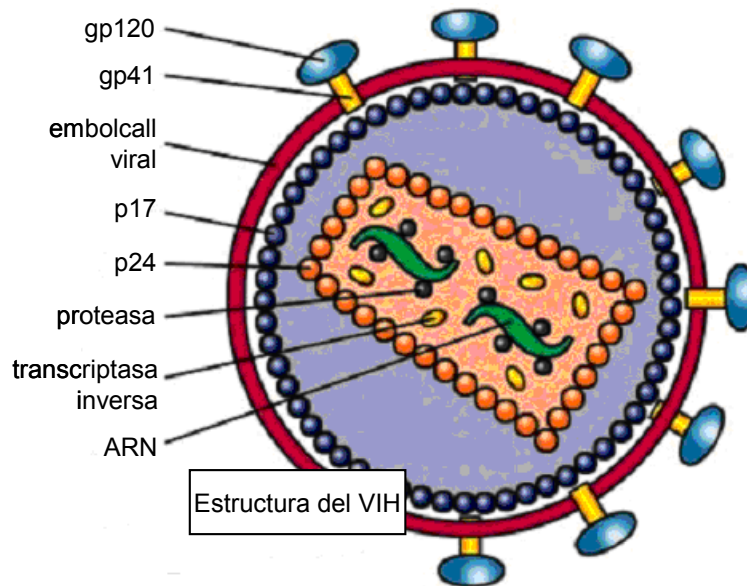


Figura 2: Esquema de l'estructura del VIH (www.avert.org/pictures/hivvirus1.htm)

El virus està envoltat d'una bicapa lipídica derivada de la cèl·lula hoste en el procés de maduració. Aquest embolcall està constituït bàsicament per dues glicoproteïnes virals: la glicoproteïna de superfície gp120 i la proteïna transmembrana gp41 ("gp" representa glicoproteïna i el número fa referència al pes molecular de la proteïna en milers de Daltons). L'interior d'aquest embolcall està recobert per la proteïna associada a membrana p17, que proporciona una matriu per l'estructura viral i resulta vital per la integritat del virió. La matriu envolta un nucleoid cilíndric i dens característic que conté la proteïna de càpside p24. Dins del nucleoid hi ha dues còpies d'ARN monocatenari, que componen el genoma viral. Acompanyant al genoma, trobem diverses còpies de la proteïna de la càpside nuclear p7, proteïnes auxiliars (Nef, Vif, i Vpr) i enzims essencials (proteasa, transcriptasa inversa i integrasa). Altres proteïnes auxiliars, com són la Vpu, Tat i Rev, es creu que són sintetitzades directament a la cèl·lula hoste.⁸

Cicle de vida del VIH

El cicle de vida del VIH es pot dividir en diferents etapes (Fig. 3):

⁷ Gallo, R.C.; *Sci. Am.*, **1987**, 256, 46-57.

⁸ Turner, B.G.; Summers, M.F.; *J. Mol. Biol.*, **1999**, 285, 1-32.

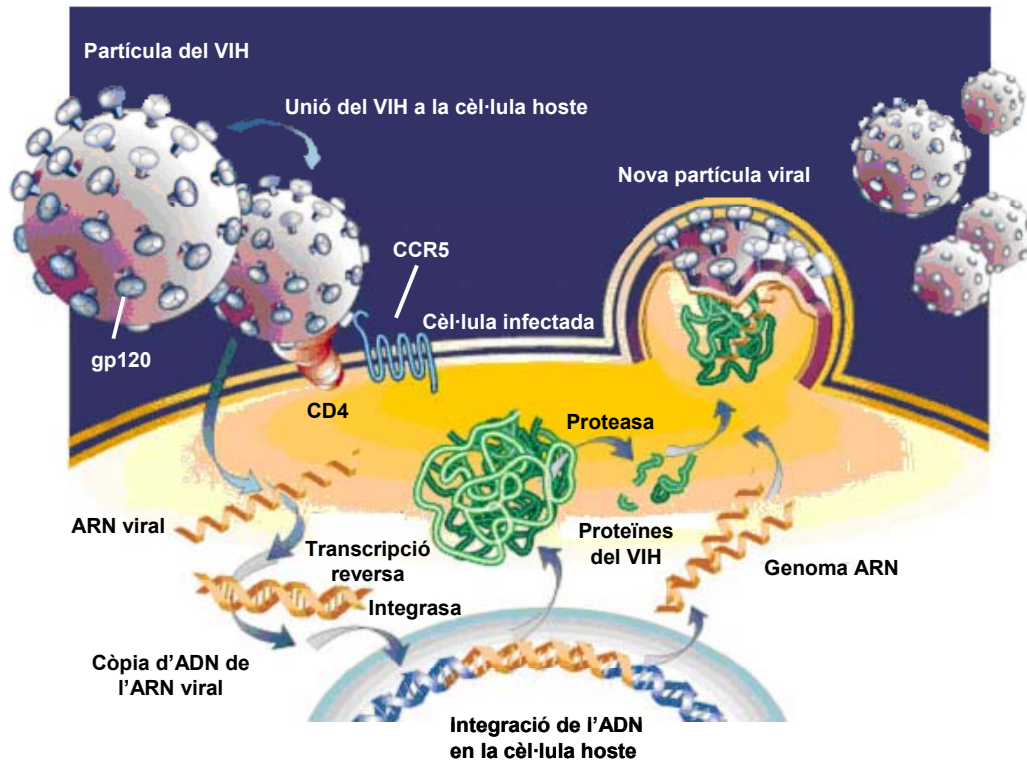


Figura 3: Representació gràfica del cicle de vida del VIH-1

- **Entrada del virus a la cèl·lula hoste:** aquesta etapa es pot subdividir a la vegada en 3 passos: adhesió, interacció amb el coreceptor i fusió. L'adhesió del VIH-1 a la superfície de la cèl·lula hoste es duu a terme per mitjà d'una interacció d'elevada afinitat entre la proteïna de l'embolcall viral gp120 i el receptor CD4 de la cèl·lula hoste.⁹ El receptor CD4 és una proteïna que es troba present predominantment a la superfície dels limfòcits T, responsables de la inducció de la resposta immunològica. Aquest complex gp120-CD4 interacciona amb un coreceptor a la superfície cel·lular, normalment la quemoquina CXCR4 o CCR5. La glicoproteïna transmembrana gp41 fa possible la fusió de la membrana, completant així l'entrada del virus a la cèl·lula hoste.
- **Desprotecció del nucli de la càpsida:** després de la fusió, la proteïna p24 del nucli de la càpsida es veu alterada i el contingut de la càpsida viral és abocat al citoplasma de la cèl·lula hoste.
- **Transcripció reversa:** a continuació té lloc la transcripció reversa de l'ARN monocatenari a una doble cadena d'ADN, mitjançant l'enzim transcriptasa inversa (TR). Aquest enzim té associat un grau d'error elevat, ja que no és capaç de realitzar la prova de lectura que duen a terme les ADN polimerases normals.
- **Transport nuclear:** l'ADN viral acabat de sintetitzar és transportat a continuació al nucli de la cèl·lula hoste.
- **Integració:** l'ADN viral és processat i transferit al genoma hoste, mitjançant l'enzim integrasa (IN). Un cop l'ADN viral ja ha estat inserit, la infecció en aquesta cèl·lula ja és permanent. El provirus

⁹ Dagleish, A.G.; Beverly, P.C.; Clapham, P.R.; Crawford, D.H.; Greaves, M.F.; Weiss, R.A.; *Nature*, **1984**, 312, 763-767.

pot romandre inactiu (latent) durant un llarg període de temps o manifestar un elevat nivell d'expressió gènica i per conseqüència una producció viral activa.

- **Transcripció i translació:** l'activació del provirus (expressió gènica) en estat latent té lloc per mitjà de factors de transcripció selectius i constitutius de la cèl·lula hoste i té com a conseqüència la producció seqüencial de varis ARN missatgers (*m*-ARN). Aquests *m*-ARN són traduïts a les proteïnes reguladores Tat, Rev i Nef.
- **Producció d'un nou virió:** la formació d'un nou nucli viral comença amb l'ensamblatge d'aquestes proteïnes reguladores, enzims i ARN a la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste. La gemmació del nou virió té lloc a la membrana cel·lular, on finalment adquireix el seu embolcall extern.
- **Maduració del virió:** en aquest procés és imprescindible la presència de la proteasa del VIH (PR), per tal que les poliproteïnes precursors gag i gag-pol esdevinguin les corresponents proteïnes estructurals (p17, p24, p7, p6, p2, p1) i funcionals (PR, TR, IN).

1.1.2 Agents i dianes actuals en la teràpia contra el VIH

Com s'ha vist en l'apartat anterior, el cicle de replicació del VIH presenta diferents dianes terapèutiques viables que poden ser explotades pel desenvolupament d'una quimioteràpia anti-VIH (Fig. 4).

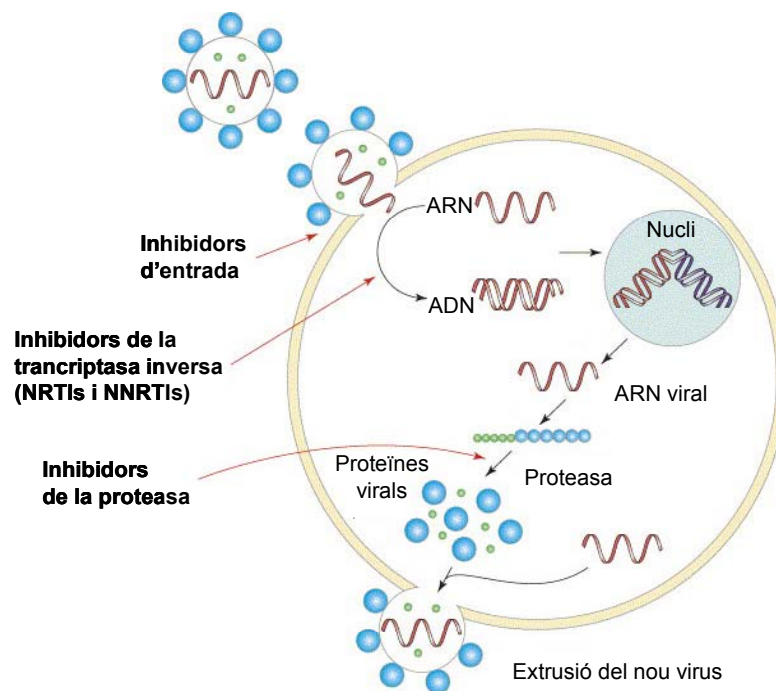


Figura 4: Dianes terapèutiques dels antiretrovirals en les diferents etapes del cicle de vida del VIH

Inicialment, el tractament pels individus infectats consistia en l'administració d'un sol fàrmac, però l'aparició de noves soques víriques resistents ha obligat a substituir la monoteràpia per la combinació

de 3 o més fàrmacs coneguda com a HAART (*Highly Active AntiRetroviral Therapy*). Com a resultat d'aquesta implantació, s'ha pogut observar un descens dràstic en la mortalitat dels pacients.¹⁰

En l'actualitat es disposa de 5 classes diferents de fàrmacs aprovats per la FDA (*Food and Drug Administration*) per combatre la infecció del VIH:

- 13 inhibidors nucleosídics de la transcriptasa inversa (*nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs*)
- 3 inhibidors no nucleosídics de la transcriptasa inversa (*non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs*)
- 11 inhibidors de la proteasa (*protease inhibitors, PI*)
- 1 inhibidor de fusió
- 1 inhibidor multiclasse, format per la combinació de 3 dels inhibidors anteriors

Inhibidors de la transcriptasa inversa

La transcriptasa inversa és l'enzim responsable per la conversió de la monocadena d'ARN viral en una doble cadena d'ADN. Degut a la importància d'aquesta transformació i al fet que no hi participin enzims endògens, la transcriptasa inversa ha estat una de les principals dianes en el desenvolupament de fàrmacs contra el VIH. Els compostos que inhibeixen aquest enzim estan dividits en 2 classes diferents: els inhibidors nucleosídics (NRTIs) i els no nucleosídics (NNRTIs) (Fig. 5).

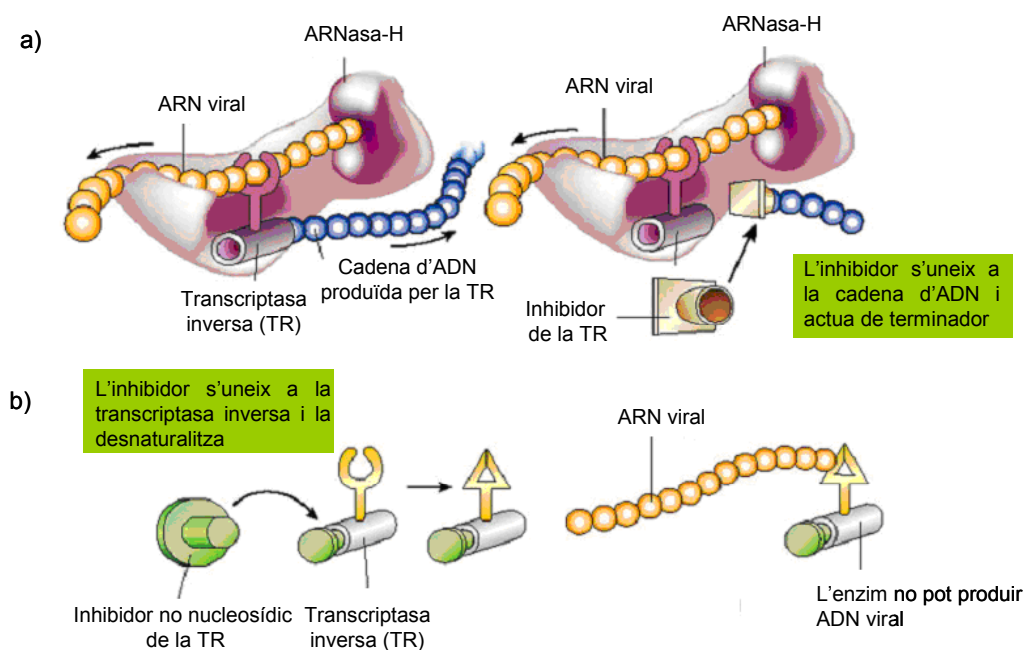


Figura 5: Mecanisme d'acció dels inhibidors nucleosídics (a) i no nucleosídics (b)

Els inhibidors nucleosídics van ser els primers agents desenvolupats pel tractament de la infecció del VIH i actualment es disposa de 13 fàrmacs d'aquest tipus aprovats per la FDA (Taula 1).

¹⁰ a) Palella, F.J.; Delaney, K.M.; Moorman, A.C.; Loveless, M.O.; Fuhrer, J.; Satten, D.A.; Aschman, D.J.; Holmberg, S.D.; *N. Engl. J. Med.*, **1998**, 338, 853-860. b) Mocroft, A.; Vella, S.; Benfield, T.; Chiesi, A.; Miller, V.; Gargalianos, P.; D'Arminio Monforte, A.; Yust, I.; Bruñí, J.; *Lancet*, **1998**, 352, 1725-1730.

| Nom comercial Nom genèric | Fórmula | Empresa Data d'aprovació | Nom comercial Nom genèric | Fórmula | Empresa Data d'aprovació |
|--|---------|--|--|---------|---------------------------------|
| Emtriva® emtricitabine (FTC) | | Gilead Sciences Jul. 03 | Zerit® stavudine (d4T) | | Bristol Myers-Squibb Juny 94 |
| Epivir® lamivudine (3TC) | | GlaxoSmithKline Nov. 95 | Ziagen® abacavir (ABC) | | GlaxoSmithKline Des. 98 |
| Hivid® zalcitabine (ddC) | | Hoffmann-La Roche Juny 92 | Combivir® lamivudine + zidovudine | | GlaxoSmithKline Sep. 97 |
| Retrovir® zidovudine (AZT o ZDV) | | GlaxoSmithKline Març 87 | Epzicom™ abacavir + lamivudine | | GlaxoSmithKline Ag. 04 |
| Videx® EC didanosine (ddl) 2 formulacions diferents | | Bristol Myers-Squibb Oct 91 i Oct. 00 | Trizivir® abacavir + zidovudine + lamivudine | | GlaxoSmithKline Nov. 00 |
| Viread® tenofovir disoproxil fumarate (DF) | | Gilead Sciences Oct. 01 | Truvada® tenofovir DF + emtricitabine | | Gilead Sciences Ag. 04 |

Taula 1: Inhibidors nucleosídics de la transcriptasa inversa aprovats per la FDA

Aquests compostos són anàlegs de nucleòsids i es caracteritzen per la manca del grup hidroxil en la posició 3', de manera que un cop convertits a la forma activa trifosfat i incorporats a la cadena d'ADN, aturen el procés de polimerització. S'han utilitzat diferents grups funcionals per reemplaçar el grup hidroxil 3' de l'anell de ribosa: el grup azida en el cas de l'AZT, un doble enllaç C2'-C3' en l'estaduvina o la substitució de l'àtom C3' per un tioèter en el cas de la lamivudina, entre d'altres.

Tot i que els NRTIs són capaços de disminuir els nivells d'ARN viral del plasma fins a quantitats gairebé negligibles, la toxicitat a nivell mitocondrial i l'emergència de soques de virus resistents són alguns dels inconvenients associats a aquests tipus de fàrmacs. El gran repte pel disseny de nous NRTIs consisteix en la identificació de fàrmacs de toxicitat limitada i que no representin resistència creuada amb altres fàrmacs. Actualment s'estan investigant nous compostos que compleixin aquests requisits, com és el cas de fàrmacs com reverset, SPD 754 i amdoxovir, que es troben en fase clínica (Fig. 6).

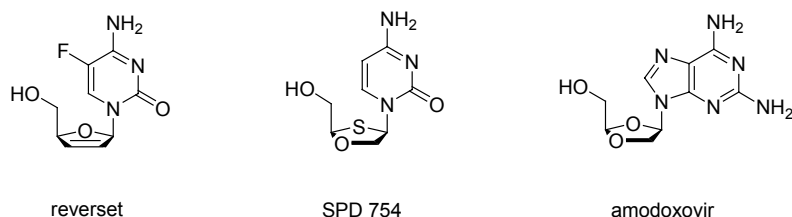


Figura 6: NRTIs en fase clínica

L'altre gran grup de fàrmacs que actuen inhibint la transcriptasa inversa està format pels derivats no nucleosídics, que basen el seu mecanisme d'inhibició en la unió al·lostèrica a una cavitat hidrofòbica i asimètrica situada a 10 Å del centre catalític.^{11,12} En l'actualitat es disposa de 3 inhibidors d'aquest tipus aprovats per la FDA (Taula 2).

| Nom comercial Nom genèric | Fórmula | Empresa Data d'aprovació |
|---|---------|------------------------------------|
| Rescriptor® delavirdine (DLV) | | Pfizer Abril 97 |
| Sustiva® efavirenz | | Bristol Myers-Squibb Set. 98 |
| Viramune® nevirapine, BI-RG-587 | | Boehringer Ingelheim Juny 96 |

Taula 2: Inhibidors no nucleosídics de la transcriptasa inversa aprovats per la FDA

Malauradament, s'ha observat que el tractament amb aquesta classe d'inhibidors condueix ràpidament a l'aparició de resistència a aquest tipus de fàrmacs. A més a més, s'ha detectat que una sola mutació en la transcriptasa inversa (Y181C o K103N) sovint comporta la resistència a un gran nombre d'inhibidors no nucleosídics.¹³

Actualment s'està desenvolupant una segona generació d'inhibidors per tal de resoldre la problemàtica associada a les mutacions resistents als fàrmacs comercials. L'aproximació consisteix en maximitzar les interaccions no amb les cadenes laterals sinó amb l'esquelet carbonat i amb els residus més conservats de la transcriptasa inversa com és el cas de W229.¹⁴ Dos dels fàrmacs dissenyats seguint aquest principi, capravirine i TMC 125, es troben actualment en fase clínica II (Fig. 7).

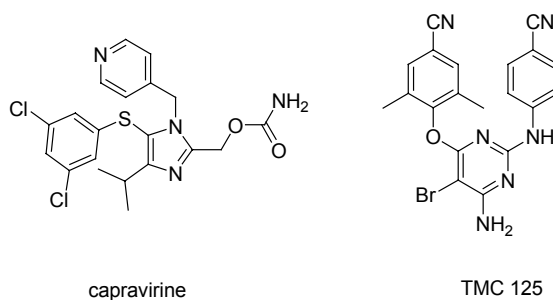


Figura 7: NNRTIs en fase clínica

¹¹ De Clercq, E.; *Chem. Biodiversity*, **2004**, *1*, 44-64.

¹² Pauwels, R.; *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2004**, *4*, 437-446.

¹³ Domaol, R.A.; Demeter, L.M.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2004**, *36*, 1735-1751.

¹⁴ Pelemans, H.; Esnouf, R.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; *Mol. Pharmacol.*, **2000**, *57*, 954-960.

Inhibidors de la proteasa

El genoma del VIH es pot dividir en 3 gens principals: *gag*, *pol* i *env*. El producte del *gag* és una poliproteïna de 55 kDa (Pr55gag) que conté les proteïnes estructurals de la matriu, la càpside i la nucleocàpside, juntament amb altres pèptids que participen en l'ensamblatge del virió i en la morfogènesi. El gen *pol* conté seqüències pels 3 enzims virals (la transcriptasa inversa, la proteasa i la integrasa) que són traduïts en forma de complex poliproteïc de 160 kDa (Pr160gag-pol). La proteasa té la funció d'escindir aquests fragments Pr55gag i Pr160gag-pol per formar les corresponents proteïnes funcionals, procés d'elevada importància per la maduració dels nous virions (Fig. 8).

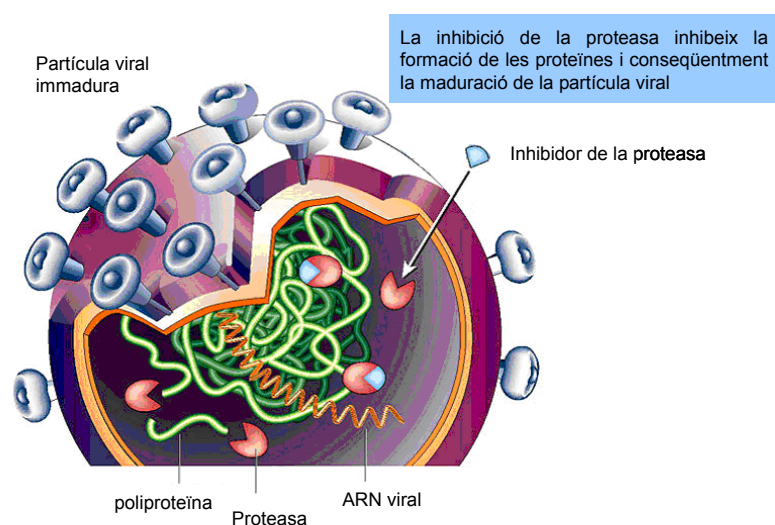


Figura 8: Mecanisme d'acció dels inhibidors de proteasa

La proteasa és un homodímer no covalent de la família de les aspartil proteases. El lloc actiu està situat a la interfase dimèrica i conté un residu d'Asp catalític de cada monòmer (D25 i D125).¹⁵

Actualment hi ha 11 inhibidors de la proteasa aprovats per la FDA, fent d'aquest tipus de fàrmacs un dels protagonistes principals de la teràpia antiviral (Taula 3). Aquests compostos són anàlegs que mimetitzen l'estat de transició i tots ells contenen un isòster de l'estat de transició no hidrolitzable (Fig. 9).

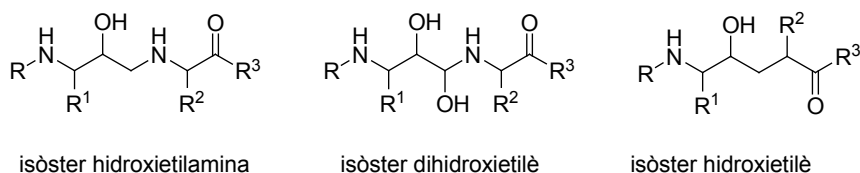
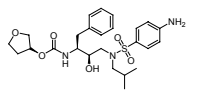
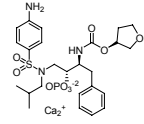
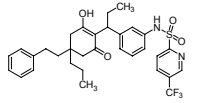
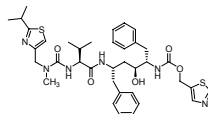
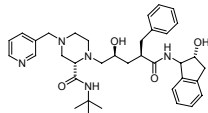
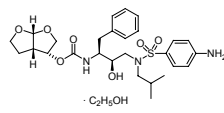
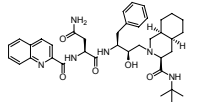
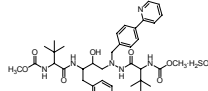
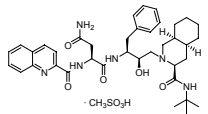
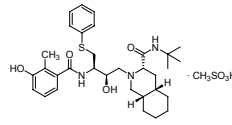
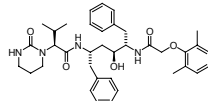


Figura 9: Alguns isòsters de l'estat de transició dels inhibidors de la proteasa del VIH-1

¹⁵ Wlodawer, A.; Gustchina, A.; *Biochim. Biophys. Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology*, **2000**, 1477, 16-34.

| Nom comercial Nom genèric | Fórmula | Empresa Data d'aprovació | Nom comercial Nom genèric | Fórmula | Empresa Data d'aprovació |
|--|---|---------------------------------|--|--|---------------------------------------|
| Agenerase® amprenavir |  | GlaxoSmithKline Abril 99 | Lexiva® fosamprenavir calcium |  | GlaxoSmithKline Oct. 03 |
| Aptivus® tipranavir |  | Boehringer Ingelheim Juny 05 | Norvir® ritonavir (ABT-538) |  | Abbott Laboratories Març 96 |
| Crixivan® indinavir (IDV, MK-639) |  | Merck Març 96 | Prezista® darunavir |  | Tibotec Juny 06 |
| Fortovase® saquinavir |  | Hoffmann-La Roche Nov. 97 | Reyataz® atazanavir sulfate |  | Bristol-Myers Squibb Juny 03 |
| Invirase® saquinavir mesylate (SQV) |  | Hoffmann-La Roche Dec. 95 | Viracept® nelfinavir mesylate (NFV) |  | Agouron Pharmaceuticals Març 97 |
| Kaletra® lopinavir + ritonavir |  | Abbott Laboratories Set. 00 | | | |

Taula 3: Inhibidors de la proteasa aprovats per la FDA

Tot i que aquests compostos són altament actius *in vitro* i també presenten activitats elevades en la fase clínica, comporten un seguit de desavantatges, com són el problema de la resistència i la resistència creuada. A més a més, molts d'aquests fàrmacs presenten baixa biodisponibilitat a causa del seu caràcter peptídic, elevada toxicitat i efectes secundaris com són la lipodistròfia i l'augment de colesterol i triglicèrids en sang.

Inhibidors de fusió

L'entrada del virus és un procés complex que com ja s'ha comentat anteriorment es divideix en 3 etapes: adhesió, interacció amb el coreceptor i fusió (Fig. 10).

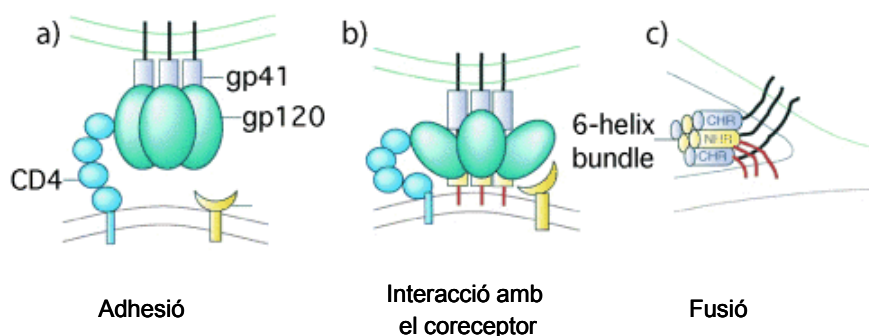


Figura 10: Adhesió i entrada del VIH: a) unió, b) interacció amb el coreceptor i c) fusió

Cadascuna de les 3 etapes ofereix una aproximació terapèutica diferent.¹⁶ L'any 2003, la FDA va aprovar el primer inhibidor de fusió, l'enfuvirtide (ENF) o Fuzeon®. Es tracta d'un pèptid sintètic de 36 aminoàcids (YTSLIHSKIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF), que conté una seqüència derivada de la regió HR2 de la glicoproteïna gp41 (residus 127-162).

El mode d'inhibició d'aquest fàrmac consisteix en mimetitzar la regió HR2 i unir-se a la regió HR1, impedint que s'uneixi al HR2 viral. D'aquesta manera es forma una agrupació de 6 hèlixs deficient que no permet l'entrada del virus. Tot i l'elevada potència d'aquest fàrmac, el seu cost extremadament elevat i la baixa biodisponibilitat, justifiquen la recerca de nous inhibidors d'aquest tipus.

Efectes secundaris de l'actual teràpia

Tenint en compte el fet que la SIDA va ser catalogada com a malaltia fa poc més de vint anys, no és gaire sorprenent que els fàrmacs disponibles actualment presentin un seguit d'efectes secundaris. Mentre que a finals dels anys 80, l'elevada toxicitat intrínseca dels terminadors de les cadenes d'ADN (NRTIs) era poc significant degut a l'alta mortalitat dels pacients, actualment els efectes secundaris de la teràpia antiretroviral han esdevingut més significants i evidents, ja que gràcies al HAART l'esperança de vida dels pacients s'ha vist augmentada.

Probablement, l'efecte secundari més important és la toxicitat mitocondrial associada als NRTIs. Els mitocondris són els orgànuls subcel·lulars responsables de la generació de l'energia requerida per la cèl·lula. Les possibles alteracions en aquests orgànuls comporten resultats catastròfics quan la demanda d'energia és més gran que la que es pot subministrar. L'efecte al fetge o al pàncreas pot arribar a ser mortal.

Un altre efecte secundari important és la síndrome de redistribució del greix o lipodistròfia. Aquesta síndrome es manifesta amb una pèrdua o redistribució del greix corporal, la qual cosa condueix a canvis en l'aparença i destorbs en el metabolisme dels lípids i la glucosa, que pot comportar una resistència a la insulina o diabetis.

Als primers mesos després de l'aplicació de la HAART, el nivell de virus al plasma es veu reduït a nivells gairebé indetectables. Tot i així, tècniques de detecció més sensibles han demostrat que mitjançant el HAART no s'aconsegueix suprimir totalment la reproducció viral. Les diferents mutacions que pateix el virus fan que els fàrmacs puguin esdevenir, en un futur, inactius.

La identificació de mutacions específiques causades arrel dels fàrmacs actuals pot ajudar a identificar les combinacions de fàrmacs apropiades i a definir les especificitats desitjades en la propera generació de fàrmacs. Hi ha l'esperança de poder desenvolupar un nou còctel de fàrmacs o una vacuna, que acabi completament amb la malaltia, però actualment, l'única alternativa realista és continuar amb la recerca dels fàrmacs actuals i de nous. Abans que es descobreixi la nova "bala màgica", és bastant probable que les noves teràpies incloguin una barreja de fàrmacs contra el VIH, formada per fàrmacs que reforcen la resposta biològica natural i fàrmacs que contraresten els efectes secundaris dels altres fàrmacs.

¹⁶ a) Krambovitis, E.; Porichis, F.; Spandidos, D.A.; *Acta Pharmacologica Sinica*, **2005**, 26, 1165-1173. b) Jiang, S.; Siddiqui, S.; Liu, S.; *Drug Discovery Today Ther. Strategies*, **2004**, 1, 426-430. c) O'Hara, B.M.; Olson, W.C.; *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2002**, 2, 523-528.

Noves estratègies

Idealment, un agent anti-VIH hauria d'aturar la virulència i evitar les infeccions de noves cèl·lules sense provocar cap tipus de toxicitat en l'organisme. Per tal d'assolir aquest objectiu, s'estan investigant un seguit de noves dianes terapèutiques i nous compostos que siguin capaços de complir aquests requisits.

- **Primer contacte:** la manera més atractiva de combatre el virus és impedir que entri a l'organisme. S'estan investigant biocides d'ús tòpic per tal de prevenir la transmissió. Mentre que alguns candidats prometedors, com ara l'espermicida nonoxinol-9 (Fig. 11), han estat posats en dubte a causa de la seva toxicitat i ineficàcia, altres candidats estan sota procés d'investigació.

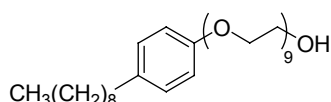


Figura 11: Estructura química de l'espermicida nonoxinol-9

Una de les rutes més atractives consisteix en el desenvolupament d'una vacuna efectiva, que tot i no representar un ajut per a les persones ja infectades, contribuiria a aturar l'ampli abast de l'epidèmia. Aquest repte topa amb un seguit d'obstacles degut a les mutacions contínues del genoma del VIH-1 provocades per l'alt nivell d'error de la transcriptasa inversa, a més a més de la limitació de models animals. Des que es va identificar el VIH com l'agent etiològic de la SIDA, s'han desenvolupat més de 40 vacunes potencials, però malauradament encara no se n'ha identificat cap de totalment eficaç.¹⁷

- **Entrada del virus:** tot i que com s'ha comentat abans, l'enfurvirtide (Fuzeon®) és l'únic inhibidor de fusió aprovat per la FDA, molts altres fàrmacs es troben en fase preclínica i clínica.¹⁸ Molècules petites antagonistes dels coreceptors CCR5 i CXCR4 han demostrat activitat antivírica potent així com bona biodisponibilitat oral. Els compostos més avançats d'aquestes classes es mostren a la Figura 12:¹⁹

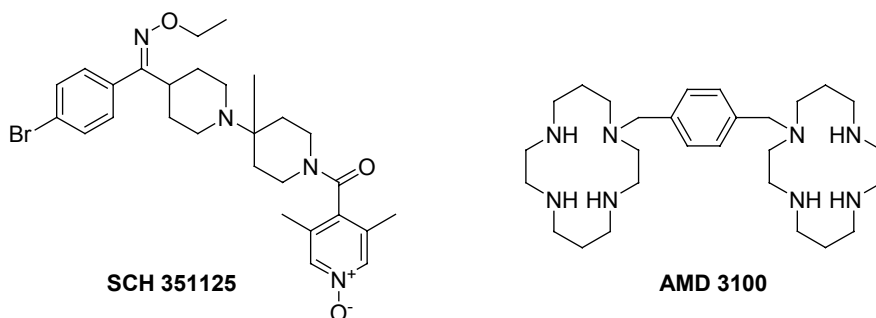


Figura 12: Exemples d'antagonistes del coreceptor CCR5 (SCH 351125) i del coreceptor CXCR4 (AMD 3100)

¹⁷ Puls, L.R.; Emery, S.; *Clinical Science*, **2006**, *110*, 59-71.

¹⁸ O'Hara, B.M.; Olson, W.C.; *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2002**, *2*, 523-528.

¹⁹ Palani, A.; Shapiro, S.; Clader, J.W.; Greenlee, W.J.; Cox, K.; Strizki, J.; Endres, M.; Baroudy, B.M.; *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 3339-3342.

Recentment, Hartley i col·laboradors han identificat un inhibidor d'entrada del VIH (actiu en el rang picomolar), basat en la proteïna RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell, Expressed and Secreted*, un lligand natural per la CCR5; Fig. 13).²⁰

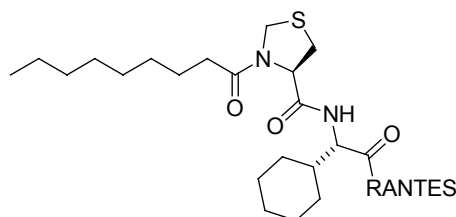


Figura 13: Estructura de l'inhibidor d'entrada més potent basat en la proteïna RANTES ($IC_{50} = 36 \text{ pM}$)

Neffe i Meyer també han contribuït recentment al progrés dels inhibidors d'entrada viral.²¹ Partint de l'estructura cristal·lina de la gp120 unida a CD4 i basant-se en la seqüència del decapeptid que entra en contacte directe amb CD4, han eliminat els residus no essencials, per tal de disminuir-ne el pes molecular i hi han incorporat elements no naturals amb la intenció de minimitzar la susceptibilitat del pèptid a hidròlisi enzimàtica. D'aquesta manera, han identificat un pentapeptid modificat capaç d'unir-se a CD4 i bloquejar la interacció entre gp120 i CD4 (Fig. 14).

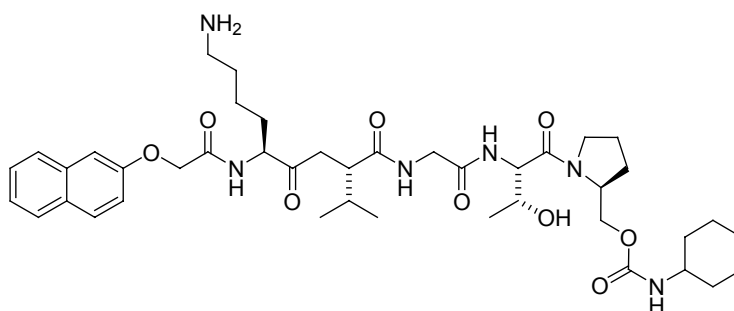


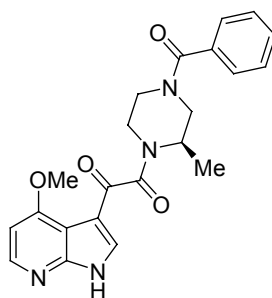
Figura 14: Estructura d'un compost peptidomimètic capaç d'unir-se a CD4 ($K_D = 35 \text{ }\mu\text{M}$)

Els principals inconvenients d'aquest tipus de fàrmacs és el fet que es tracta de grans estructures peptídiques o peptidomimètiques i a més a més, molts d'ells són antagonistes dels coreceptors CD4 o quemoquina. El principal repte actual consisteix en trobar una molècula petita que actui com a inhibidors d'entrada, però no sobre els coreceptors. Un dels pocs èxits en aquest camp ha vingut d'investigadors de Bristol-Meyers-Squibb, amb el compost BMS-378806, que presenta un EC_{50} de 12 nM (Fig. 15).²²

²⁰ Hartley, O.; Gaerntner, H.; Wilken, J.; Thompson, D.; Fish, R.; Ramos, A.; Pastore, C.; Dufour, B.; Cerini, F.; Melotti, A.; Heveker, N.; Picard, L.; Alizon, M.; Mosier, D.; Kent, S.; Offord, R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 16460-16465.

²¹ Neffe, A.T.; Meyer, B.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 2937-2940.

²² Lin, P.F.; Blair, W.; Wang, T.; Spicer, T.; Guo, Q.; Zhou, N.; Gong, Y.F.; Wang, H.G.; Rose, R.; Yamanaka, G.; Robinson, B.; Li, C.B.; Fridell, R.; Deminie, C.; Demers, G.; Yang, Z.; Zadjura, L.; Meanwell, N.; Colono, R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 5036-5041.



BMS-378806

Figura 15: Estructura d'un inhibidor petit d'entrada

- **Integració:** la integrasa (IN), un dels tres enzims virals del VIH-1, és una de les noves dianes terapèutiques més prometedores. Es tracta d'una proteïna de 32 kDa responsable de la inserció de l'ADN viral de doble cadena al genoma de la cèl·lula hoste, on pot ser replicat fent servir la maquinària cel·lular aliena. La característica que fa que aquesta proteïna sigui tan interessant és el fet que no es troba present en els mamífers, cosa que fa pensar que el nivell de toxicitat dels possibles fàrmacs seria relativament baix. A més a més, la integració és una part essencial del cicle de replicació viral i la regió de la integrasa del gen *pol* es troba més conservada que no pas la de la transcriptasa inversa o la de la proteasa. Existeix controvèrsia al voltant de si la integrasa representa una diana terapèutica viable ja que el seu període d'activitat és relativament curt en el cicle de replicació viral. El seu centre actiu ample i poc profund i l'organització tridimensional poc clara dels seus dominis *in vivo* són alguns dels reptes amb els que es topa el disseny de fàrmacs contra aquest enzim. Tot i això, en els darrers cinc anys s'ha progressat considerablement i actualment alguns caps de sèrie estan començant a entrar a la fase clínica a l'espera de resultats prometedors. Aquests desenvolupaments suggereixen que els inhibidors d'integrasa constituïran una part important de les futures teràpies combinades.
- **Maduració del virió:** com ja s'ha comentat anteriorment, en aquest procés clau per la creació de noves partícules hi intervé la proteasa. Paral·lelament a la cerca de nous inhibidors que combatin la resistència, en els darrers anys ha sorgit una nova aproximació d'inhibició que consisteix en inhibidors que s'uneixin no al centre actiu, sinó a la interfase de dimerització, prevenint l'ensamblatge dels dos monòmers.²³ És en aquest context en el qual s'emmarca la present Tesi doctoral.

²³ Bowman, M.J.; Chmielewski, J.; *Biopolymers*, **2002**, 66, 126-133.

1.2 LA PROTEASA DEL VIH-1

1.2.1 Estructura de la proteasa del VIH-1

Navia *et al.* dels laboratoris Merck van ser el primer grup en obtenir l'estructura cristal·lina de la proteasa del VIH, seguits de l'obtenció d'una estructura més detallada pel grup de Kent.^{24,25}

La proteasa del VIH pertany a la família de les aspartil proteases i com a membre d'aquesta família (a la qual també pertanyen enzims endògens com la pepsina, la catepsina D i la renina, entre d'altres), conté la tríada Asp-(Ser/Thr)-Gly en el centre catalític.

La proteasa del VIH és un homodímer de forma relativament plana, format per dos monòmers idèntics de 99 residus cadascun. Les estructures obtingudes mitjançant raigs X revelen que té un centre de simetria C_2 al voltant del lloc actiu central. El dímer està unit predominantment per fulles β interdigitades, formades a la base de l'enzim pels extrems *N*- i *C*-terminals de cada monòmer (Fig. 16).

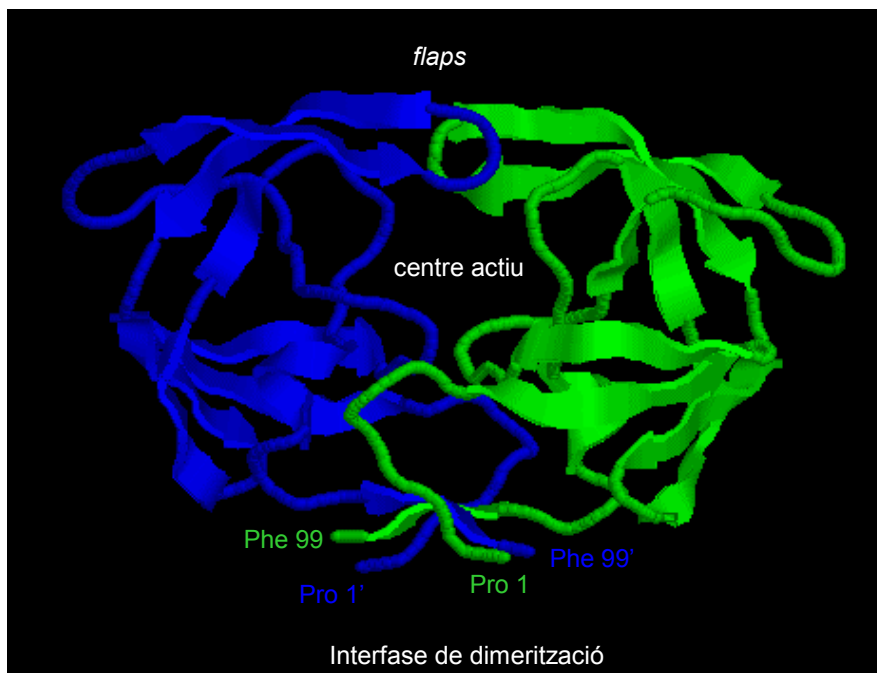


Figura 16: Esquema de la proteasa del VIH

Cada monòmer conté un regió de fulla β (un *loop* ric en glicina) conegut amb el nom de *flap*, que constitueix en part el lloc d'unió amb el substrat i juga un paper important en aquesta unió. A més a més, cada monòmer aporta un dels dos residus essencials d'àcid aspàrtic (Asp-25 i Asp-25'), que es troben a sota de la cavitat. El substrat s'uneix en la conformació estesa, en la qual les interaccions amb les diferents cadenes laterals dels aminoàcids determinen l'especificitat de l'enzim.

²⁴ Navia, M.A.; Fitzgerald, M.D.P.; McKeever, B.M.; Leu, C.T.; Heimbach, J.C.; Herber, W.K.; Sigal, I.S.; Darke, P.L.; Spronger, J.P.; *Nature*, **1989**, 337, 615-620.

²⁵ Wlodawer, A.; Miller, M.; Jaskolski, M.; Sathyanarayana, B.K.; Baldwin, E.; Weber, I.T.; Selk, L.M.; Clawson, L.; Schneider, J.; Kent, S.B.H.; *Science*, **1989**, 245, 616-621.

1.2.2 Mecanisme de la proteasa del VIH-1

Les proteases tenen un paper important en molts processos biològics. Catalitzen la hidròlisi d'enllaços peptídics amb una elevada selectivitat i eficàcia catalítica. Aquests enzims duen a terme la seva tasca a través de dos mecanismes diferents, la qual cosa permet classificar-los en dos grups diferents. La primera classe d'enzims utilitza una molècula d'aigua activada per atacar el carbonil de l'enllaç amida del substrat. L'activació de la molècula d'aigua es pot aconseguir mitjançant un catió zinc (les zinc metal·loproteïnases) o mitjançant dos grups β -carboxiaspartil en el lloc actiu (les aspartil proteases). En la segona classe de proteases, és un àtom nucleofílic de la cadena lateral d'un aminoàcid (un hidroxil en el cas de Ser o un grup tiol en el cas de Cys) el que inicia la hidròlisi de l'amida. El nucleòfil activat ataca el carbonil de l'enllaç amida per formar un acil èster o un acil tioèster intermedi. Finalment aquest intermedi acil és hidrolitzat per una molècula d'aigua i s'obtenen d'aquesta manera els productes d'hidròlisi.

Com ja s'ha comentat anteriorment, diferents estudis demostren que la proteasa del VIH pertany a la família de les aspartil proteases, ja que comparteix la seqüència altament conservada d'aquesta classe d'enzims, la tríada Asp-Thr-Gly.²⁶ Així doncs, resulta lògic pensar que la proteasa del VIH presenti unes característiques i un mecanisme semblant al de les altres aspartil proteases. Estudis mutacionals basats en la substitució de l'Asp-25 per diferents residus com Asn²⁷, Thr²⁸ o Ala²⁹, han evidenciat la pèrdua d'activitat proteolítica d'aquest enzim degut a l'absència del grup aspàrtic. Altres dades que donen suport al fet que la proteasa del VIH pertany a la classe d'aspartil proteases provenen de la inhibició *in vitro* d'aquest enzim per la pepstatina, un producte natural que inhibeix selectivament els membres d'aquesta família.^{28,29,30} Finalment, l'estructura tridimensional de l'enzim també dona suport a la classificació de la HIV-1 PR en la família de les aspartil proteases.^{25,26}

L'estructura dimèrica en la qual cada monòmer contribueix amb una tríada Asp-Thr-Gly al centre actiu és indistingible del de les aspartil proteases monomèriques.

El mecanisme catalític de les aspartil proteases no virals ha estat abastament estudiat, mitjançant mètodes cinètics, de marcatge i de cristal·lografia de raigs X. Tot i que s'han proposat diferents mecanismes, la majoria d'aquests estudis es decanten per un mecanisme àcid-base, en el qual els dos residus aspartat juguen un paper essencial per tal d'activar la molècula d'aigua, que actua com a nucleòfil i ataca el grup carbonil de l'enllaç amida hidrolitzable.

El mecanisme més àmpliament acceptat per les aspartil proteases ha estat descrit per Suguna *et al.* (Esquema 1).³¹ Aquest mecanisme es basa en el fet que només un dels dos àcids aspàrtics del lloc actiu es troba sense protonar.³²

²⁶ a) Cairns, J.; Overbaugh, J.; Miller, S.; *Nature*, **1988**, 335, 142-145. b) Stahl, F.W.; *Nature*, **1988**, 335, 112-113.

²⁷ a) Col, N.E.; Emini, E.A.; Schleif, W.A.; Davis, L.J.; Davis, J.C.; Heimbach, J.C.; Dixon, A.F.; Scolnick, E.M.; Sigal, I.S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, 85, 4686-4690. b) Darke, P.L.; Leu, C.T.; Davis, L.J.; Heimbach, J.C.; Diehl, R.E.; Hill, W.S.; Dixon, R.A.; Sigal, I.S.; *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 2307-2312.

²⁸ Seelmeier, S.; Schmidt, H.; Turk, V.; Von Der Helm, K.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, 85, 6612-6616.

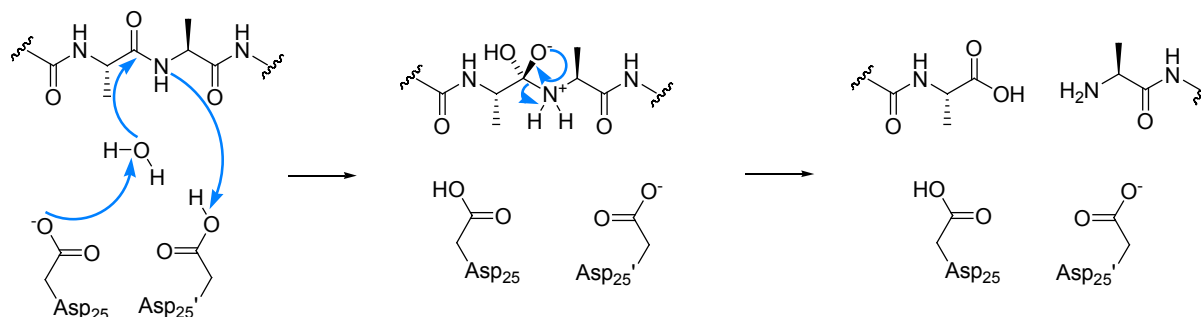
²⁹ Mous, J.; Heimer, E.P.; Le Grice, S.J.J.; *J. Virol.*, **1988**, 62, 1433-1436.

³⁰ Lee, C.S.; Choy, N.; Park, C.; Choi, H.; Son, Y.C.; Kim, S.; Ok, J.H.; Yoon, H.; Kim, S.C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, 6, 589-594.

³¹ Suguna, K.; Padlan, E.A.; Smith, C.W.; Carlson, W.D.; Davies, D.R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 7009-7013.

³² Hofmann, T.; Hodges, R.S.; James, M.N.G.; *Biochemistry*, **1984**, 23, 635-643.

Després de l'activació de la molècula d'aigua que es troba al mig dels dos residus d'Asp, per mitjà de la cadena lateral de l'aspartat carregada negativament, aquesta ataca el grup carbonil de l'enllaç del substrat per generar un intermedi oxaniònic tetraèdric. La protonació de l'àtom de nitrogen de l'enllaç amida escindit i la conseqüent transposició provoquen el trencament de l'intermedi tetraèdric per proporcionar els productes d'hidròlisi.



Esquema 1: Mecanisme proposat de les aspartil proteases

1.2.3 Inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1

Amb tants inhibidors de la proteasa del VIH-1 (HIV-1 PR) i fàrmacs ja en el mercat, se'ns planteja la pregunta de si calen realment nous inhibidors d'aquesta proteasa. Desgraciadament i com ja s'ha comentat anteriorment, degut a l'alta velocitat de mutació del VIH, no existeix encara cap estratègia terapèutica que faci ús d'un sol inhibidor de la proteasa. El disseny més prometedori d'inhibidors de la proteasa apunta cap al desenvolupament d'agents que actuïn sobre regions de la proteasa no susceptibles a mutacions. Les mutacions de la proteasa que creen resistència als fàrmacs generalment es troben en la cavitat d'unió amb el substrat. Tanmateix, hi ha àrees de la proteasa que es troben altament conservades en un gran nombre dels VIH-1 aïllats. Una d'aquestes regions és la interfase de dimerització de la proteasa, que presenta una estructura de fulla β antiparal·lela entre les 4 cadenes peptídiques terminals de l'enzim (Fig. 17).

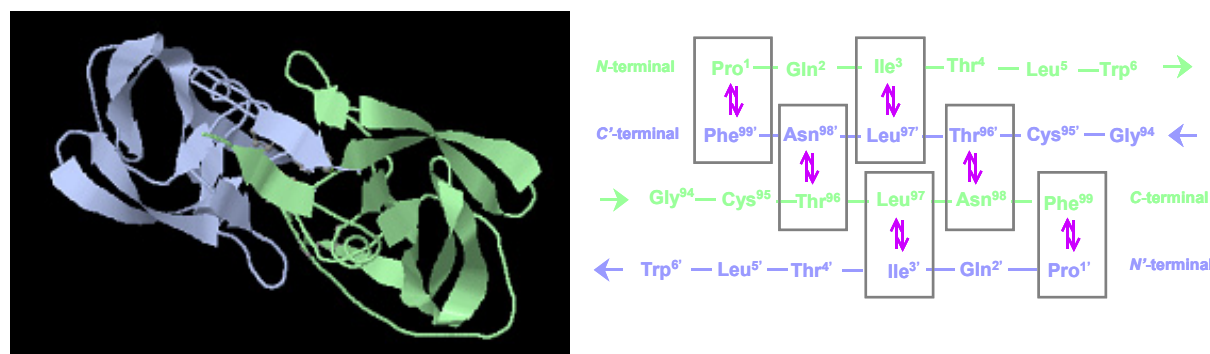


Figura 17: Representació de la interfase de dimerització de la HIV-1 PR i les principals interaccions entre aminoàcids

L'àrea centrada al voltant dels extrems *N*- i *C*-terminals (Fig. 18) contribueix en major part a l'estabilització de l'enzim ja que representa el 50% dels ponts d'hidrogen i contactes entre

monòmers.³³ De l'anàlisi termodinàmica de la proteasa del VIH-1, se'n pot deduir que els residus localitzats a l'extrem carboxílic (Cys-95, Thr-96, Leu-97, Asn-98 i Phe-99) i a l'extrem amino-terminal (Pro-1, Ile-3 i Leu-5) contribueixen prop d'un 75% de l'energia total d'unió en la dimerització.

Donat que la formació del dímer genera el centre catalític de l'enzim, resulta raonable pensar que qualsevol agent que actuï impedit la formació de la interfase dimèrica, acabi consegüentment destruint l'activitat viral de la proteasa.

Els agents que tinguin aquesta zona de la proteasa com a diana terapèutica, a part d'oferir un nou mode d'acció diferent al dels inhibidors tradicionals de la PR, s'espera que siguin menys propensos a la resistència que pateixen altres tipus d'inhibidors.

El fet que aquesta regió de la proteasa estigui tan altament conservada (només se'n coneix una mutació Leu97Val)³⁴ es deu a aquesta estructura interdigitada dels extrems terminals, ja que una mutació de l'extrem *N*-terminal requeriria la corresponent mutació en l'extrem *C*-terminal, per tal de poder formar el dímer.

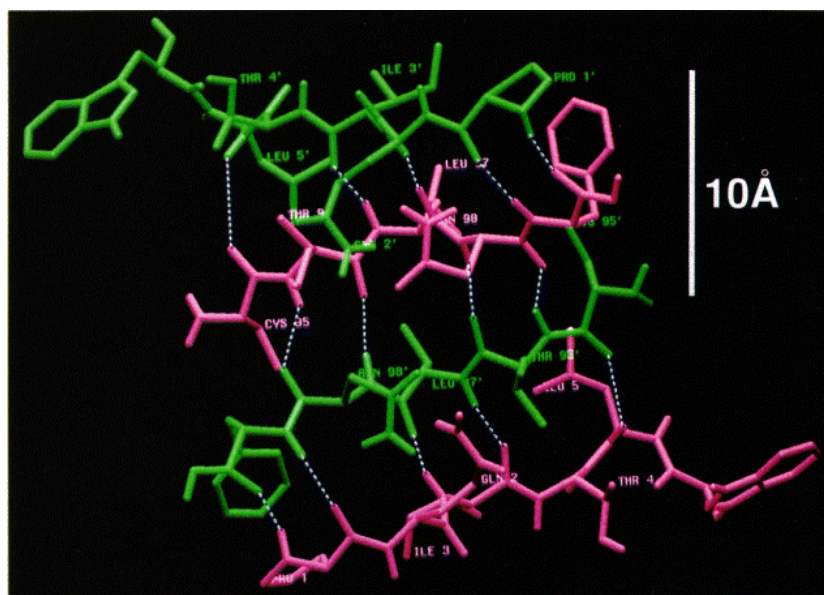


Figura 18: Esquema de la interfase dimèrica de la proteasa del VIH-1 (un monòmer verd i l'altre rosa)

Pèptids interfacials i anàlegs

La inhibició d'enzims dimèrics mitjançant la interferència d'oligopeptids en la formació del complex proteic havia estat documentada prèviament pel cas de l'enzim ribonucleòtid reductasa del virus de l'herpes simplex,³⁵ la proteïna reguladora VP16³⁶ i la proteasa del virus de la mieloblastosi aviària.³⁷

³³ Todd, M.J.; Semo, N.; Freire, E.; *J. Mol. Biol.*, **1998**, *283*, 475-488.

³⁴ King, R.W.; Winslow, D.L.; Garber, S.; Scarnati, H.T.; Bachelor, L.; Stack, S.; Otto, M.; *J. Antiviral Res.*, **1995**, *28*, 13-24.

³⁵ a) Dutia, B.M.; Frame, M.C.; Subak-Sharpe, J.H.; Clark, W.N.; Marshden, H.S.; *Nature*, **1986**, *321*, 439-443. b) Cohen, E.A.; Gaudreau, P.; Brazeau, P.; Langelier, Y.; *Nature*, **1986**, *321*, 441-443. c) McClements, W.; Yamanaka, G.; Garsky, V.; Perry, H.; Bacchetti, S.; Colono, R.; Stein, R.B.; *Virology*, **1988**, *162*, 270-273.

³⁶ Haigh, A.; Greaves, R.; O'Hare, P.; *Nature*, **1990**, *344*, 257-259.

³⁷ Katoh, I.; Ikawa, Y.; Yoshinaka, Y.; *J. Virol.*, **1989**, *63*, 226-2232.

Estudis inicials en els grups de Craik³⁸ i Zhang³⁹ van demostrar que els mateixos pèptids corresponents als extrems *N*- i *C*-terminals de la proteasa del VIH actuaven com a inhibidors febles de l'activitat de la proteasa (Fig. 19).

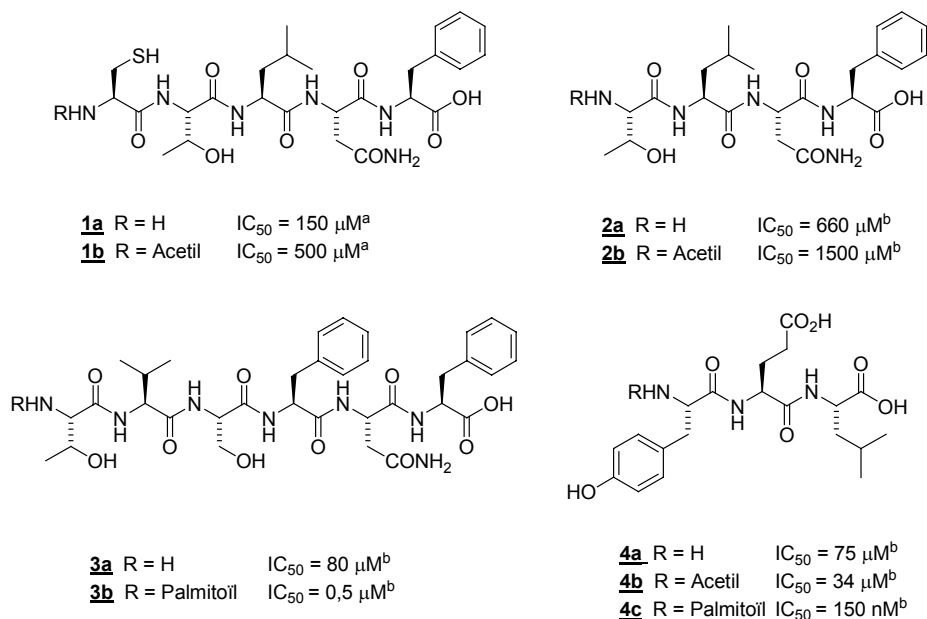


Figura 19: Inhibidors peptídics interfacials de la HIV-1 PR. ^a 10 nM HIV-1 PR. ^b 12 nM HIV-1 PR.

El compost **1a**, per exemple, correspon al pentapèptid de la seqüència *C*-terminal, format pels residus 95-99 de la HIV-1 PR. Aquest compost presenta una inhibició feble de la proteasa del VIH, mentre que el seu derivat acetilat per l'extrem *N*-terminal, el compost **1b**, presenta una pèrdua important de l'activitat inhibidora. L'eliminació d'un aminoàcid i la posterior acetilació en els compostos **2a** i **2b** també va tenir un impacte negatiu en la inhibició. El grup de Schramm va descriure altres modificacions del compost **1a**, com la incorporació i la mutació de dos residus, que van conduir al compost acetilat **3a**, que presenta el doble d'activitat inhibidora.⁴⁰ Posteriorment, el mateix grup va sintetitzar l'inhibidor tripeptídic **4a**, que és equipotent a **3a**, però amb la meitat de residus.⁴¹ Cal destacar que l'addició d'una cadena hidrofòbica llarga a l'extrem *N*-terminal dels pèptids **3a** i **4a** resultà en uns increments de l'activitat inhibidora considerables (aproximadament 200 vegades més potents).⁴² Aquests resultats van conduir a l'estudi de la influència del grup palmitoïl o 2-aminopalmitoïl unit als extrems *N*- i *C*-terminal sobre l'especificitat i el poder d'unió amb el monòmer.⁴³ També es va explorar la importància de l'aminoàcid *C*-terminal, introduint derivats bifenílics com la tironina i la tiroxina (Fig. 20).

³⁸ Babé, L.M.; Rosé, J.; Craik, C.S.; *Protein Science*, **1992**, *1*, 1244-1253.

³⁹ Zhang, Z.-Y.; Poorman, R.A.; Maggiora, L.L.; Heinrikson, R.L.; Kézdy, F.J.; *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 15591-15594.

⁴⁰ Schramm, H.J.; Breipohl, G.; Hansen, J.; Henke, S.; Jaegger, E.; Meichsner, C.; Rieb, G.; Ruppert, D.; Rucknagel, K.-P.; Schafer, W.; Schramm, W.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1992**, *184*, 980-985.

⁴¹ Schramm, H.J.; Billich, A.; Jaeger, E.; Rucknagel, K.-P.; Arnold, G.; Schramm, W.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1993**, *194*, 595-600.

⁴² Schramm, H.J.; de Rosny, E.; Reboud-Ravaux, M.; Buttner, J.; Dick, A.; Schramm, W.; *Biol. Chem.*, **1999**, *380*, 593-596.

⁴³ Dumond, J.; Boggetto, N.; Schramm, H.J.; Schramm, W.; Takahashi, M.; Reboud-Ravaux, M.; *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, *40*, 1097-1102.

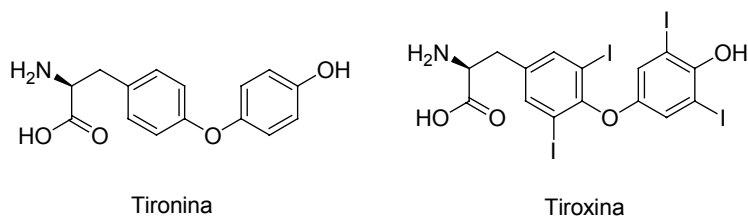


Figura 20: Estructures de la tironina i tiroxina.

Sorprenentment, el grup tiroxina, tot i ser més impedit estèricament, resultà igual de favorable que la tironina, demostrant d'aquesta manera que el lloc d'interacció amb el residu C-terminal és gran i hidrofòbic. Els millors inhibidors obtinguts en aquest estudi ($K^{\text{dim}} = 5\text{-}10\text{ nM}$) presenten el grup tiroxina a l'extrem C-terminal i el grup D,L-2-aminopalmitoil a l'extrem N-terminal.

Degut a l'homologia que presenten els segments terminals de la proteasa del VIH-1 amb els d'altres proteïnes procedents també del domini *gag-pol*, Schramm i col·laboradors van investigar també els pèptids corresponents a l'extrem N- i C-terminals de la transcriptasa inversa (compostos **5** i **6**) i l'extrem C-terminal de la proteïna p6* (compost **7**).⁴¹

| | | |
|--------------------------------|--|--------------------------|
| 5 N-terminal VIH-1 RT: | NH-Pro-Ile-Ser-Pro-Ile-Glu-CONH ₂ | No inhibeix |
| 6 C-terminal VIH-1 RT: | Ac-Val-Gly-Ala-Glu-Thr-Phe-COOH | No inhibeix |
| 7 C-terminal VIH-1 p6*: | Ac-Thr-Val-Ser-Phe-Asn-Phe-COOH | IC ₅₀ = 80 μM |

Figura 21: Pèptids terminals d'altres dominis del segment *gag-pol* del VIH-1

Es va poder comprovar que els pèptids derivats de les seqüències N- i C-terminal de la transcriptasa inversa no presentaven activitat inhibidora envers la proteasa del VIH, mentre que la seqüència corresponent a l'extrem C-terminal de la proteïna p6* sorprenentment inhibia l'activitat de la proteasa. Una possible explicació a aquest fet és que la p6* actuï com a protectora de la proteasa. El mecanisme d'inhibició postulat pel grup de Schramm es basa en què en l'autoprocessat de la proteasa del VIH-1, s'allibera la proteïna p6* i el seu segment C-terminal lliure bloqueja reversiblement la proteasa. Degut a l'elevada concentració de p6* a la partícula viral (rang mil·limolar), es produeix una aturada total de la proteolisi. La reactivació de la proteasa per dilució té lloc quan, després de l'entrada del virus a la cèl·lula hoste, es torna a requerir l'activitat proteolítica.

En el període de redacció de la present Tesi doctoral, el grup de Davis ha publicat un nou inhibidor peptídic de la dimerització de la proteasa del VIH-1, que inclou en la seva estructura les regions N- i C-terminal d'aquesta proteasa, juntament amb l'extrem C-terminal de la p6*, a més a més d'un domini de permeabilitat cel·lular derivat de la proteïna reguladora *Tat* del VIH-1 (Fig. 22).⁴⁴

⁴⁴ Davis, D.A.; Brown, C.A.; Singer, K.E.; Wang, V.; Kaufman, J.; Stahl, S.J.; Wingfield, P.; Maeda, K.; Harada, S.; Yoshimura, K.; Kosalaraksa, P.; Mitsuya, H.; Yarchoan, R.; *Antiviral Res.*, **2006**, 72, 89-99.

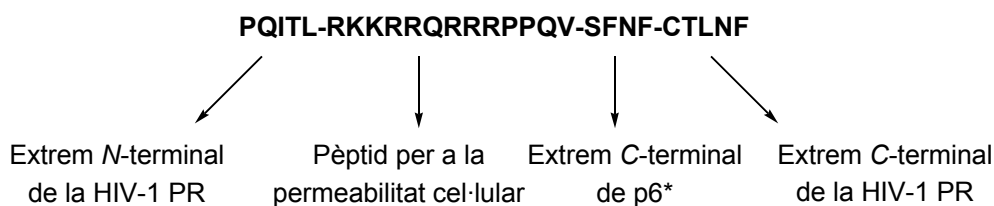


Figura 22: Seqüència peptídica de l'inhibidor de dimerització desenvolupat per Davis

Aquest pèptid ha demostrat inhibir la dimerització de la proteasa tant del virus *wild-type* com d'un virus mutant resistent als inhibidors de proteasa comercials amb un IC_{50} de 0,23-0,32 μM .

Inhibidors entrecruats de dimerització de la proteasa del VIH-1

En el primer intent d'entrecruar dues regions interfacials de la proteasa del VIH-1 en un mateix compost, Babé i col·laboradors van sintetitzar un pèptid de 13 aminoàcids, el compost **8** (Fig. 23), format pels pèptids N- i C-terminals units per un espaiador de 3 residus de Gly. Aquesta modificació va conduir a un augment de l'activitat de 4 vegades respecte a l'inhibidor no entrecruat **1a**.³⁸

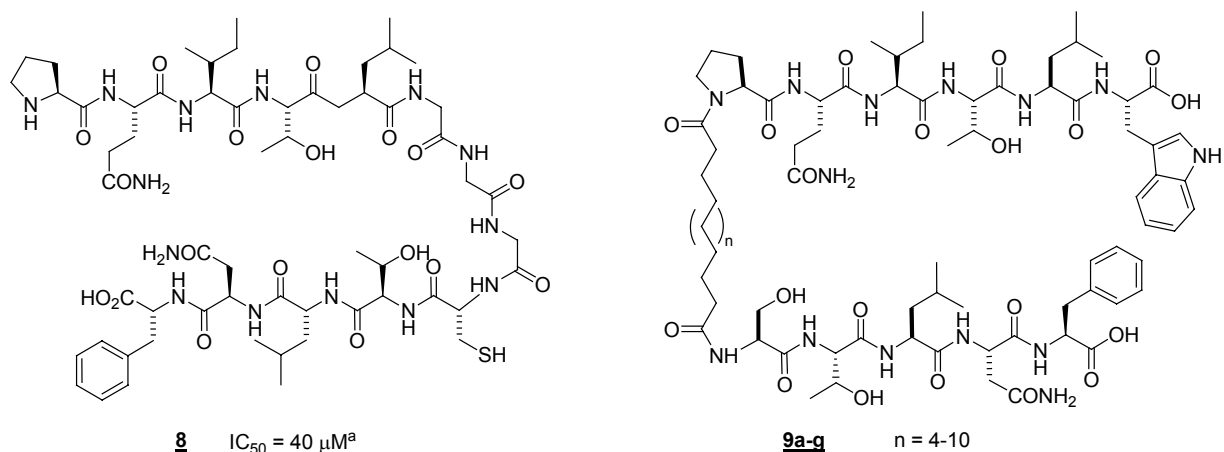


Figura 23: Estructures dels primers inhibidors entrecruats. ^a [HIV-1 PR] = 10 nM.

Com que segons l'estructura cristal·lina de la proteasa, la distància entre els dos pèptids interfacials és de 10 Å, i la proporcionada per l'espaiador de 3 Gly és només de 3 Å, el grup de Chmielewski va intentar optimitzar l'espaiador mitjançant un linker alifàtic de diferents llargades, per tal d'obtenir informació sobre la distància òptima per a una inhibició efectiva.⁴⁵ La millor activitat inhibidora s'observà quan $n = 8$ ($K^{\text{dim}} = 220 \text{ nM}$, $IC_{50} = 0,3 \mu\text{M}$), és a dir, amb un espaiador de 14 unitats metilè entre els pèptids interfacials. L'entrecruament dels pèptids interfacials suposà d'aquesta manera un augment de la inhibició dràstic (500 vegades més actiu) respecte el compost **1a**.

⁴⁵ Zutschi, R.; Franciskovich, J.; Shultz, M.; Schweitzer, B.; Bishop, P.; Wilson, M.; Chmielewski, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 4841-4845.

▪ Espaiadors restringits

Posteriorment, diferents grups han investigat anàlegs amb espaiadors més restringits, partint del fet que una reducció dels graus de llibertat hauria de preorganitzar els fragments peptídics i disminuir el cost entròpic de la unió amb el monòmer (Fig. 24).

Tanmateix, la introducció d'un alquí (compostos **10a-c**), d'un *cis*-alquè (compostos **11a-c**) o d'un *trans*-alquè (compostos **12a-c**) va conduir a una reducció de l'eficàcia d'inhibició de la proteasa, en comparació amb els anàlegs més flexibles, recuperant activitat inhibidora en augmentar la llargària de la cadena alifàtica.⁴⁶

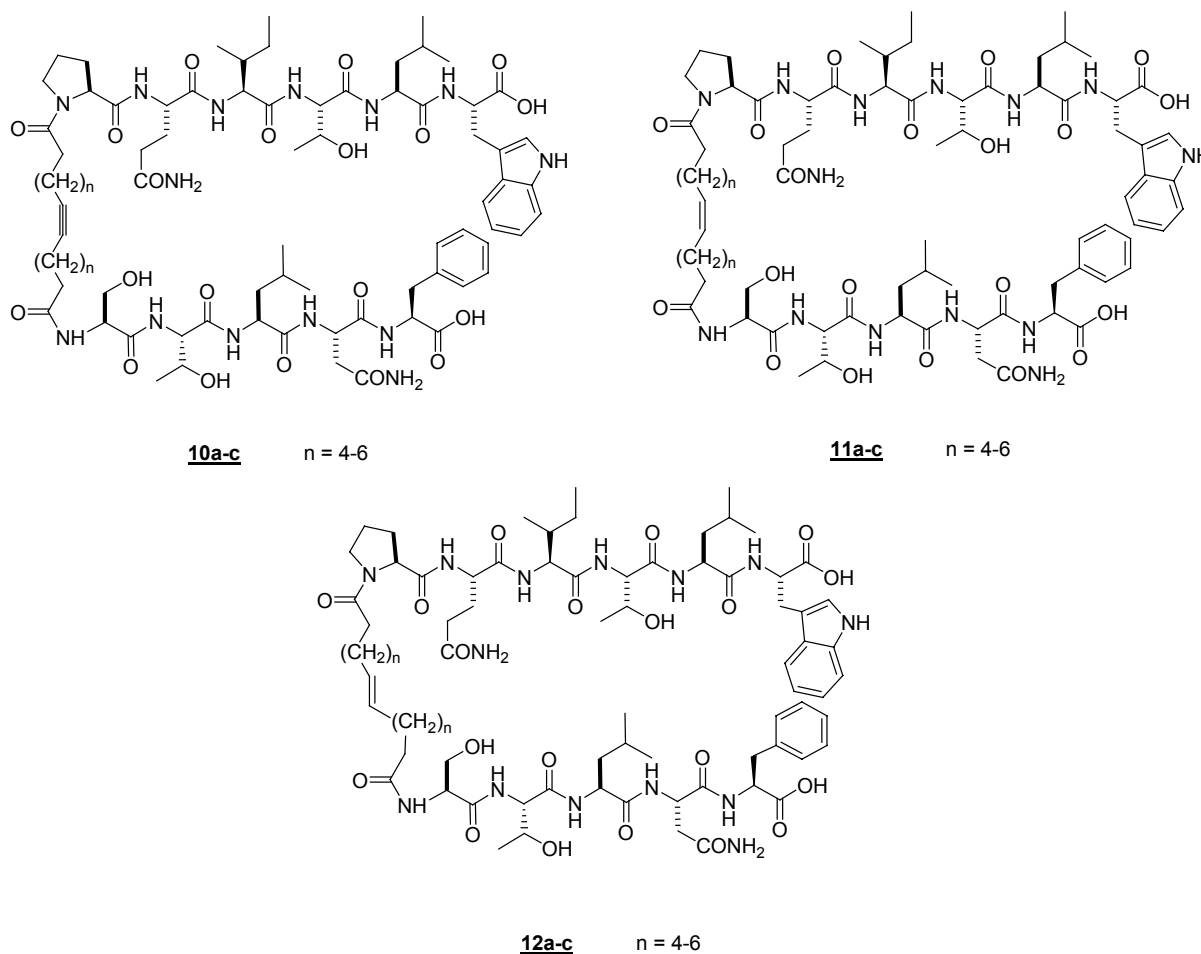


Figura 24: Estructures d'inhibidors entrecuats amb espaiadors insaturats

Amb l'objectiu de situar els dos fragments peptídics en disposició paral·lela i separats per una distància de 10 Å, es va incorporar un espaiador completament restringit basat en l'estructura de l'androstadiol (Fig. 25).⁴⁷

⁴⁶ Ulysse, L.G.; Chmielewski, J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 3281-3286.

⁴⁷ Zutshi, R.; Shultz, M.D.; Ulysse, L.; Lutgring, R.; Bishop, P.; Schweitzer, B.; Vogel, K.; Franciskovich, J.; Wilson, M.; Chmielewski, J.; *Synlett*, **1998**, 1040-1044.

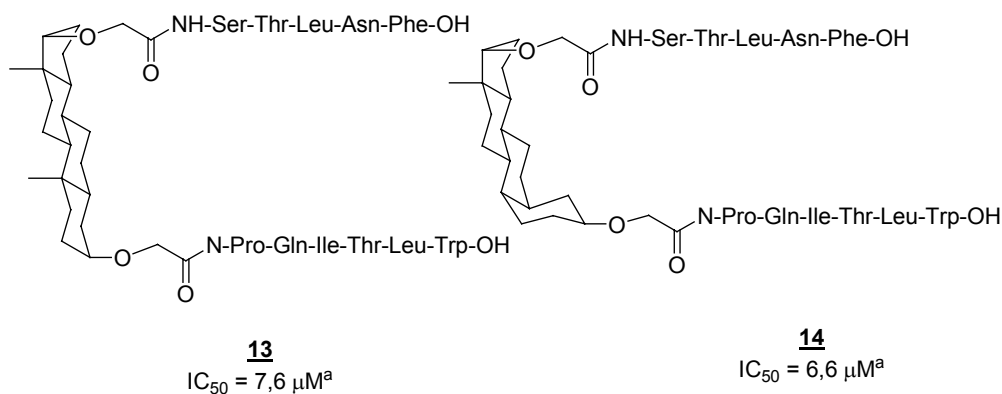


Figura 25: Inhibidors entrecuats amb espaiador esteroïdal. ^a [PR] = 100 nM.

Aquests compostos contenen espaiadors amb sistemes d'anells fusionats van resultar ser menys potents que els anàlegs flexibles **9**.

Amb el mateix objectiu de disminuir la llibertat conformacional dels espaiadors, el col·lectiu d'investigadors coordinat per Reboud-Ravaux va desenvolupar el que ells anomenen "tenalles moleculars". Basant-se en la modelització molecular a partir de l'estructura cristal·lina de la HIV-1 PR, van introduir diferents esquelets rígids en l'espaiador, com ara el resorcinol, el 2,6-piridindiol, el 2,7-naftalendiol i el 2,7-quinolindiol, orientant d'aquesta manera les dues cadenes peptídiques en forma de full β antiparal·lel i proporcionant la distància de separació adequada (Fig. 26).^{48,49}

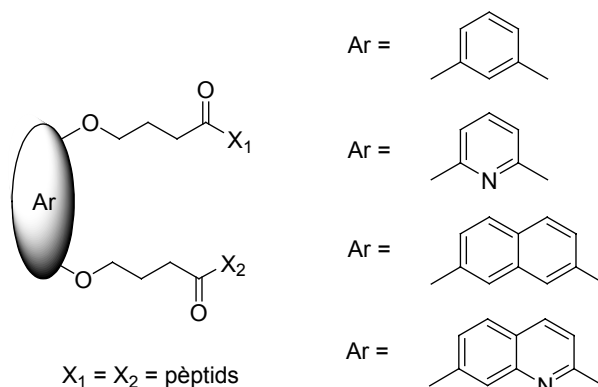


Figura 26: Inhibidors entrecuats amb espaiadors aromàtics

La funció dels braços carboxipropil és la de permetre la flexibilitat necessària pel procés de complexació de l'inhibidor amb el monòmer de la HIV-1 PR. Pel que fa a les cadenes peptídiques, van partir de les seqüències naturals Thr-Leu-Asn-Phe i Gln-Ile-Thr-Leu, i van fer diferents variacions per tal de disminuir l'impediment estèric i la llargada de la cadena, però mantenint-ne el caràcter hidrofòbic. Tanmateix, els resultats obtinguts no foren gaire satisfactoris: en el cas del resorcinol no s'observà inhibició, mentre que en el cas del piridindiol i naftalendiol la inhibició no és superior a la que presentaven els espaiadors polialquílics. Des d'un punt de vista estèric, és probable que els

⁴⁸ Bouras, A.; Boggetto, N.; Benatalah, Z.; de Rosny, E.; Sicsic, S.; Reboud-Ravaux, M.; *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 957-962.

⁴⁹ Merabet, N.; Dumond, J.; Collinet, B.; Van Baelinghem, L.; Boggetto, N.; Ongeri S.; Ressayd, F.; Reboud-Ravaux, M.; Sicsic, S.; *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 6392-6400.

derivats de naftalendiol assoleixin de forma més eficaç la distància de 10 Å requerida entre els dos fragments peptídics, mentre que des d'un punt de vista electrònic, els derivats de piridindiol podrien afavorir una interacció iònica entre la piridina carregada positivament en el medi d'assaig i la Phe-99 del monòmer carregada negativament. Per tal de reunir les propietats estèriques dels derivats de naftalendiol i les propietats electròniques dels anàlegs de piridindiol, es van sintetitzar compostos fent servir quinolindiol com a espaiador. Fent servir diferents cadenes peptídiques, van poder observar experimentalment que les cadenes tripeptídiques produeixen millors resultats que les dipeptídiques i que la hidrofobicitat de les cadenes és una propietat favorable per la inhibició. Alguns dels millors inhibidors obtinguts en aquests estudis es mostren a la Figura 27.

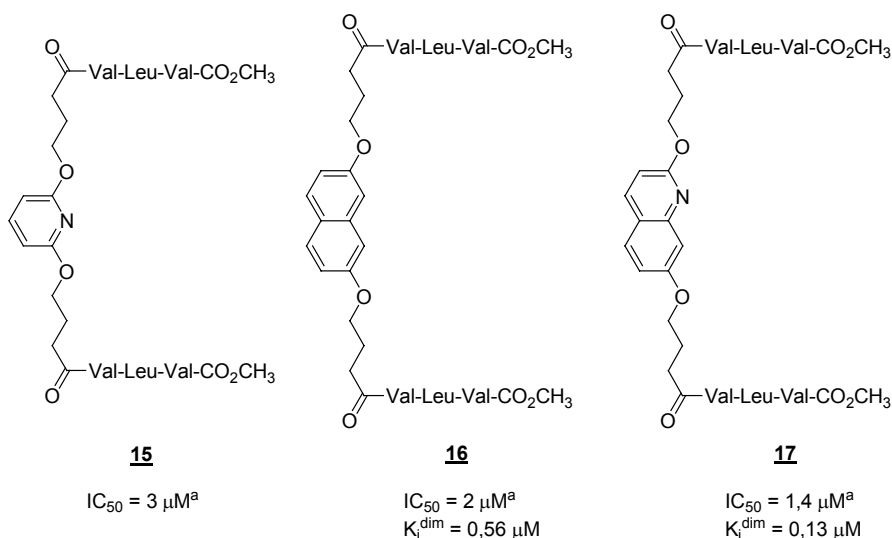


Figura 27: Inhibidors entrecruats amb espaiadors anàlegs de piridina, naftalè i quinolina. ^a [PR] = 7,5 nM.

Aquests resultats van esperonar l'exploració del grup guanidini com a unitat central entre la cadena derivada de l'extrem C-terminal i un grup hidrofòbic addicional, basant-se en la interacció electrostàtica del grup guanidini amb el carboxilat de la Phe-99 (Fig. 28).⁵⁰

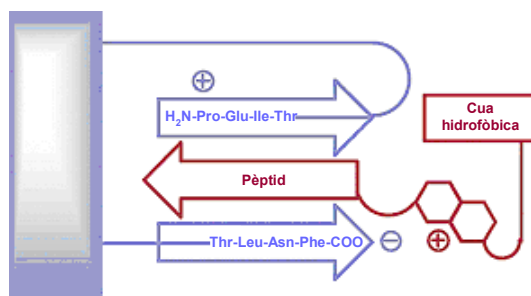


Figura 28: Esquema d'inhibició de dimerització basada en la interacció del carboxilat amb el guanidini

Es van dissenyar els compostos **18-26** amb lleugeres modificacions (Fig. 29). La cadena adipat unida al pentapeptid Ala-Thr-Leu-Asn-Phe-OMe confereix el nombre d'àtoms necessaris per unir el pèptid a

⁵⁰ Breccia, P.; Boggetto, N.; Pérez-Fernández, R.; Van Gool, M.; Takahashi, M.; René, L.; Prados, P.; Badet, B.; Reboud-Ravaux, M.; de Mendoza, J.; *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5196-5207.

la unitat de guanidini sense distorsionar els ponts d'hidrogen d'aquesta estructura. Es va modificar la cadena del pèptid natiu per tal de facilitar la síntesi i augmentar l'estabilitat. Per aquestes raons es van substituir els aminoàcids Gln-2 i Cys-95 per Ala. Es va optar pels ésters metílic i benzílic amb la finalitat de prevenir l'autodimerització dels inhibidors. També es van sintetitzar una segona generació d'inhibidors incorporant el grup mercaptoacetilglicina i un grup silil lipofílic, amb l'objectiu de disminuir la llibertat conformacional de l'espaiador. Finalment, el substituent silil es va substituir per un altre residu estèricament impedit, no aromàtic i lipofílic, el substituent tiocolesterol del compost **26**, per tal d'avaluar la influència dels residus aromàtics en la cua lipofílica.

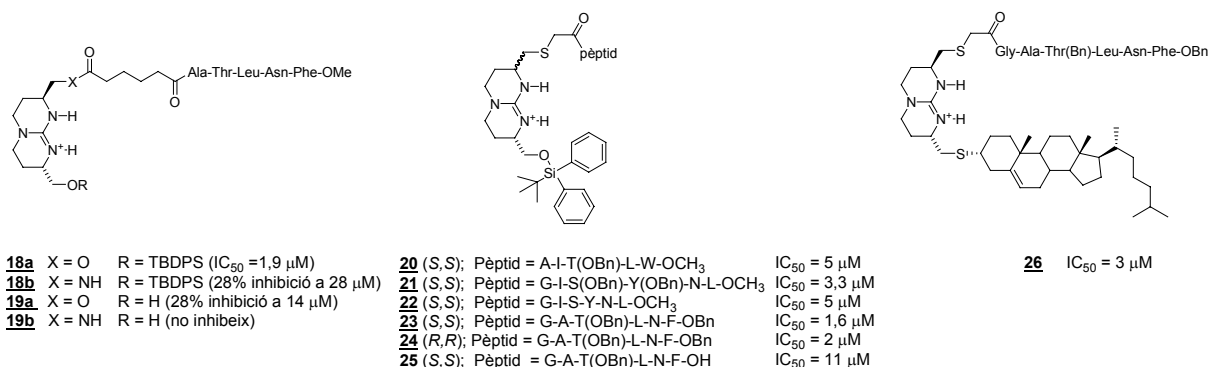


Figura 29: Inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1 derivats del guanidini

Aquests compostos, que a diferència dels sintetitzats anteriorment només posseeixen una cadena peptídica, van resultar ser actius. La rigidesa de l'espaiador contribueix a la reducció del cost entròpic en la complexació amb el monòmer i la càrrega positiva del guanidini aporta un interacció addicional amb el carboxilat de la Phe-99.

En un altre intent de rigidificar l'espaiador, el grup de Song va incorporar un grup fluorenil connectant les seqüències C- i N-terminal de la HIV-1 PR, per tal de facilitar els ponts d'hidrogen intramoleculars i proporcionar la distància apropiada entre els dos pèptids (Fig. 30).⁵¹

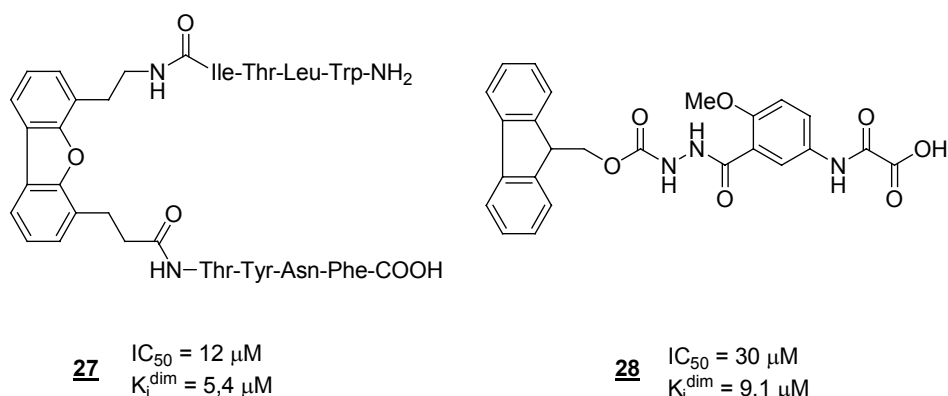


Figura 30: Inhibidor de dimerització amb espaiadors derivats del fluorenil

⁵¹ Song, M.; Rajesh, S.; Hayashi, Y.; Kiso, Y.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 2465-2468.

En el mateix estudi, Song i col·laboradors incorporaren també l'aminoàcid no natural Hao, dissenyat pel grup de Nowick com a cadena de full β i compost per hidrazina, àcid 5-amino-2-metoxi-benzoic i grups d'àcid oxàlic.⁵² El compost **28**, tot i exhibir una activitat moderada, es pot considerar com el primer exemple d'inhibidor de dimerització no peptídica, que podria servir de cap de sèrie pel desenvolupament d'inhibidors més potents.

▪ Espaiadors hidrofílics

A banda d'intentar rigidificar els espaiadors, una altra de les estratègies explorades ha estat la d'augmentar-ne el caràcter hidrofílic, ja que sembla raonable pensar que la naturalesa hidrofòbica de l'espaiador pot ser un desavantatge si s'exposa a un dissolvent polar o al carboxilat de la Phe-99. Per tal de comprovar aquesta hipòtesi, el grup de Chmielewski va dissenyar agents amb una funció polar (grups amino i trietilenglicol) dins de l'espaiador (Fig. 31).^{47,53}

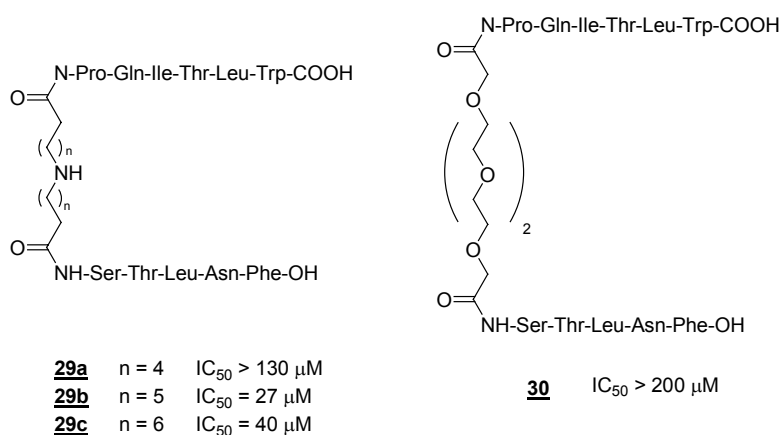


Figura 31: Exemples d'inhibidors amb espaiadors hidrofílics

Sorprenentment, el canvi de polaritat de l'espaiador per mitjà de grups amino conduí a una disminució important de l'efectivitat dels inhibidors i en el cas del compost amb l'espaiador de trietilenglicol s'observà una pèrdua total de l'activitat. Així doncs, aquests resultats suggereixen que les interaccions hidrofòbiques participen en l'associació inhibidor-proteasa, deixant de banda les interaccions electrostàtiques o per pont d'hidrogen. Reexaminant l'estructura cristal·lina de la proteasa, es va observar que els aminoàcids Ile-3 i Leu-97 de cada monòmer de la proteasa formen una espècie de cavitat hidrofòbica, on presumiblement l'espaiador prefereix encabir-s'hi abans d'exposar-se al dissolvent. En qualsevol cas, aquest estudi posa en evidència que la naturalesa hidrofòbica de l'espaiador és essencial per a la unió òptima amb el monòmer de la HIV-1 PR. Un altre estudi dut a terme per Licini i Scrimin presenta una nova estratègia que fa ús de la complexació de l'ió Zn^{2+} amb l'espaiador tris(2-aminoetil)amina.⁵⁴ Estudis de modelització molecular van predir que la distància entre els dos extrems *N*-terminals dels pèptids seria de 10 Å amb aquest espaiador i només quan aquest estigués unit a un metall com el Zn^{2+} , en concordança amb dades cristal·logràfiques

⁵² a) Nowick, J.S.; *Acc. Chem. Res.*, **1999**, *32*, 287-296. b) Nowick, J.S.; Tsai, J.H.; Bui, Q.-C.D.; Maitra, S.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 8409-8410. c) Nowick, J.S.; Chung, de M.; Maitra, K.; Maitra, S.; Stigers, K.D.; Sun, Y.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 7654-7661.

⁵³ Schultz, M.D.; Chmielewski, J.; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 3881-3886.

⁵⁴ Valente, S.; Gobbo, M.; Licini, G.; Scarso, A.; Scrimin, P.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *40*, 3899-3902.

obtingues per una tetramina similar. En cas contrari, els braços del lligand lliure, en tenir els àtoms de nitrogen protonats a pH neutre i àcid, es troben separats a causa de les repulsions electrostàtiques. Efectivament, l'orientació dels braços peptídics després de la complexació amb l'ió Zn^{2+} conduí a un increment de la inhibició de 7 vegades, tot i que l'activitat fou 6 vegades menys potent que l'inhibidor flexible **9** ($n = 8$). En el disseny del sistema, s'escollí el naftalè per funcionalitzar el tercer braç, el qual és necessari per impartir rigidesa però no pel reconeixement enzimàtic, ja que d'aquesta manera pot servir com a control fluorescent de la complexació amb els ions metàl·lics (Fig. 32).

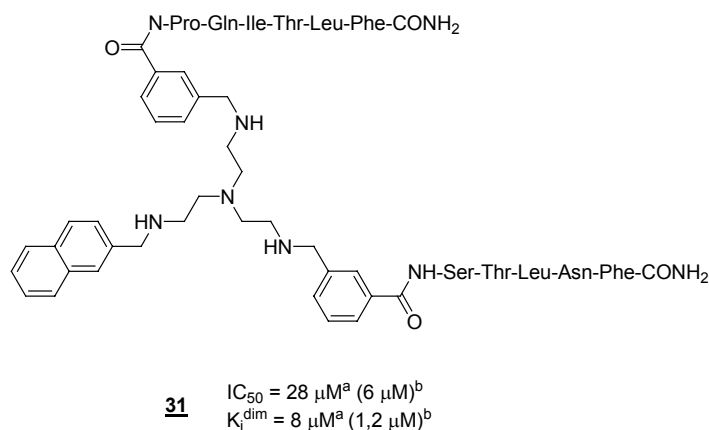


Figura 32: Inhibidor de dimerització per complexació amb ions Zn^{2+} . ^a [PR] = 25 nM HIV-1 PR. ^b Valors després de l'addició de Zn^{2+} .

▪ Modificacions en els aminoàcids de les cadenes peptídiques

La mutagènesi amb alanina ha demostrat ser una eina útil a l'hora d'identificar els residus crucials en les interaccions proteïna-inhibidor.⁵⁵ Amb l'objectiu de fer un desenvolupament racional d'inhibidors més potents, s'inicià un estudi per tal d'identificar la importància de la cadena lateral de cada residu, partint de l'inhibidor **9e** (Fig. 33).⁵⁶

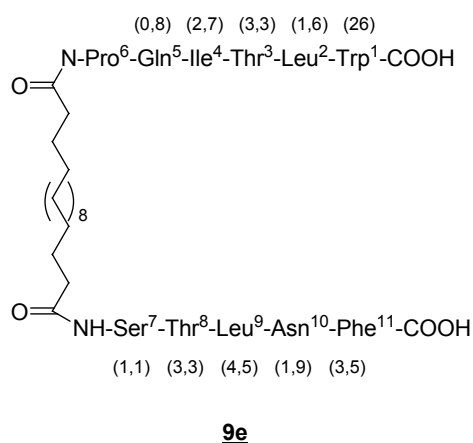


Figura 33: Resultats obtinguts de la mutagènesi per alanina del compost **9e**. Els valors entre parèntesi corresponen al factor de disminució d'activitat observat en mutar l'aminoàcid per alanina.

⁵⁵ Clackson, T.; Wells, J.A.; *Science*, **1995**, 267, 383-386.

⁵⁶ Shultz, M.D.; Chmielewski, J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 2431-2436.

Els residus de més importància detectats mitjançant aquesta tècnica van ser els grups hidrofòbics o aromàtics de les posicions 1, 9 i 11. Un estudi del grup de Freire ja havia predit anteriorment la importància de la Leu-97 (Leu-9 en l'inhibidor) juntament amb la Phe-99 (Phe-11 en l'inhibidor) en la dimerització de la proteasa del VIH-1, mentre que la importància del Trp-1 no havia estat detectada.³³ Amb la idea d'identificar la mínima estructura requerida per la inhibició, es va dur a terme un estudi que consistia en eliminar seqüencialment els aminoàcids de menys importància segons l'escaneig d'alanina de l'inhibidor **9e** (Fig. 34).⁵⁷

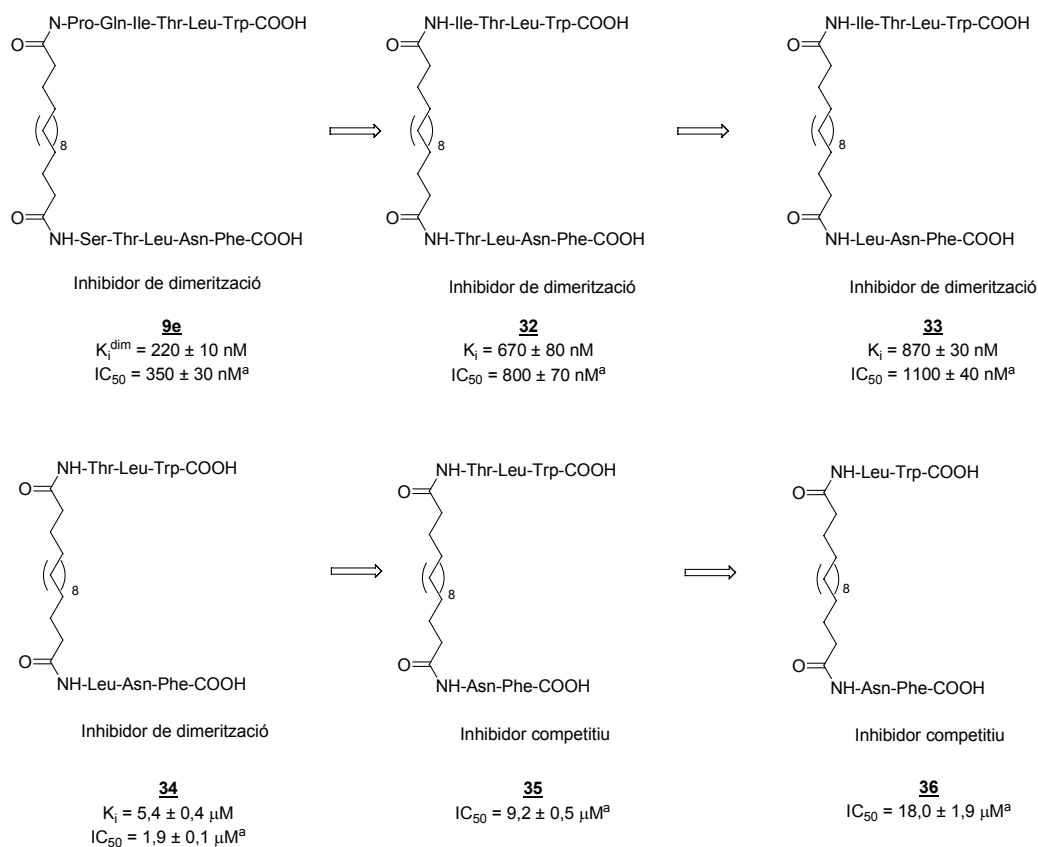


Figura 34: Inhibidors resultants de l'eliminació dels residus menys essencials. ^a [PR] = 25 nM.

Com era d'esperar, es va comprovar que l'eliminació d'aquests residus comportava una disminució en la potència inhibidora. També es va observar que en eliminar la Leu-9 de l'extrem C-terminal, el mecanisme d'inhibició passava de ser purament dissociatiu a ser un inhibició competitiva (compost **34** al **35**). Aquest resultat concorda amb els obtinguts en l'escaneig d'alanina, on es veia que la Leu-97 era el segon aminoàcid més important. Resultats anteriors del grup de Chmielewski havien evidenciat que el canvi del residu terminal Trp-COOH per Phe-CONH₂ podia arribar a triplicar la inhibició de la proteasa del VIH-1, postulant que la disminució de la cadena lateral augmentava l'eficiència de la unió amb el substrat.⁴⁷ Aquesta modificació va ser incorporada també en els compostos **35** i **36**, la qual cosa va duplicar l'activitat i va fer canviar el mecanisme d'inhibició en el cas del compost **35**, que va passar de ser inhibidor competitiu a ser inhibidor de dimerització (Fig. 35).⁵⁷

⁵⁷ Schultz, M.D.; Bowman, M.J.; Ham, Y.W.; Zhao, X.; Tora, G.; Chmielewski, J.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 2710-2713.

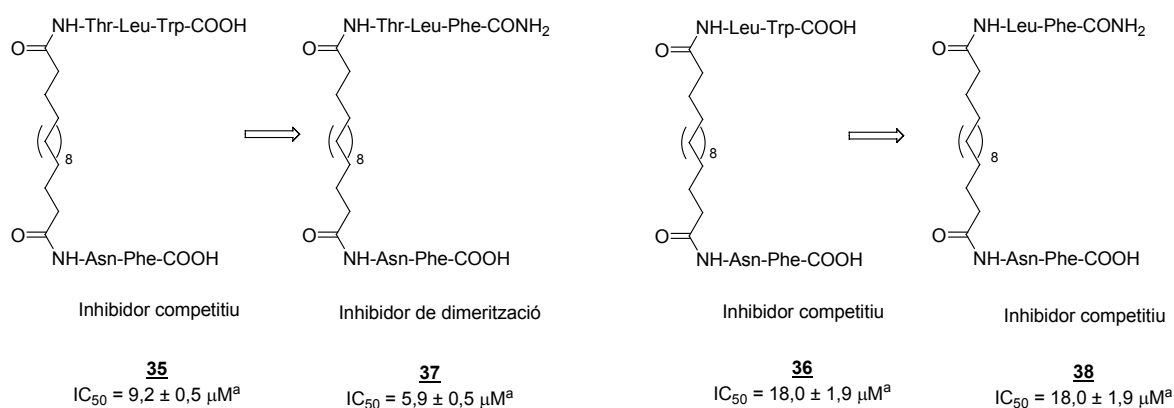
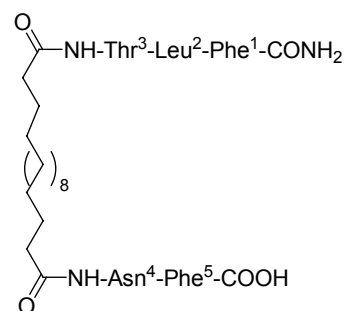


Figura 35: Inhibidors amb la substitució de Trp-COOH per Phe-CONH₂.^a [PR] = 25 nM VIH-PR.

La demostració que una única mutació podia conduir a un augment de la inhibició i al retorn al mecanisme d'inhibició desitjat indicava que probablement les interaccions de les cadenes laterals tenien més importància que no pas l'esquelet peptídic. Amb aquesta idea i amb la intenció de disminuir les unions peptídiques susceptibles a proteolisi, es van sintetitzar i avaluar els compostos *N*-metilats **39-44** per determinar la contribució de cada enllaç amida a la inhibició (Fig. 36).⁵⁸

| Compost | Modificació | IC ₅₀ μM ^a | Pèrdua d'activitat respecte 34 |
|-----------|---|----------------------------------|---------------------------------------|
| 39 | <i>N</i> -MePhe ¹ -CONH ₂ | 13,0 (± 1,0) | 2,2 |
| 40 | <i>N</i> -MeLeu ² -COOH | 8,0 (± 0,8) | 1,4 |
| 41 | <i>N</i> -MeThr ³ -COOH | 8,3 (± 0,9) | 1,4 |
| 42 | <i>N</i> -MeAsn ⁹⁸ -COOH | 4,5 (± 0,9) | --- |
| 43 | <i>N</i> -MePhe ⁹⁹ -COOH | 9,6 (± 0,3) | 1,6 |
| 44 | Eliminació CONH ₂ terminal | 5,8 (± 0,5) | --- |



37
IC₅₀ = 5,9 (± 0,6) μM

Figura 36: Inhibició de la proteasa del VIH-1 amb compostos no *N*-metilats (**37**), *N*-metilats (**39-43**) i sense grup amida (**44**).^a [PR] = 25 nM.

Partint del mateix inhibidor **37**, que presenta una estructura minimitzada però amb activitat reduïda, el grup de Chmielewski va dissenyar una biblioteca de 68 compostos amb l'objectiu de millorar-ne l'eficiència inhibidora.⁵⁹ El model del compost **37** unit a la interfase de dimerització d'un dels monòmers plegats de la proteasa del VIH-1, va servir de base per a la modificació de les característiques dels potencials inhibidors. Així doncs, es va veure que la Phe-1 es troba en una superfície hidrofòbica extesa i que podria ser substituïda per un residu amb cadenes laterals més grans, mentre que la Phe-5 ocupa una cavitat hidrofòbica ben definida i no acceptaria la substitució per residus aromàtics de mida més gran. Amb aquesta informació es van sintetitzar i avaluar els

⁵⁸ Bowman, M.J.; Chmielewski, J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 1395-1398.

⁵⁹ Shultz, M.D.; Ham, Y.-W.; Lee, S.-G.; Davis, D.A.; Brown, C.; Chmielewski, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 9886-9887.

68 inhibidors, cadascun dels quals incorpora una sola mutació. Els inhibidors més potents obtinguts per aquest estudi es mostren a la Figura 37.

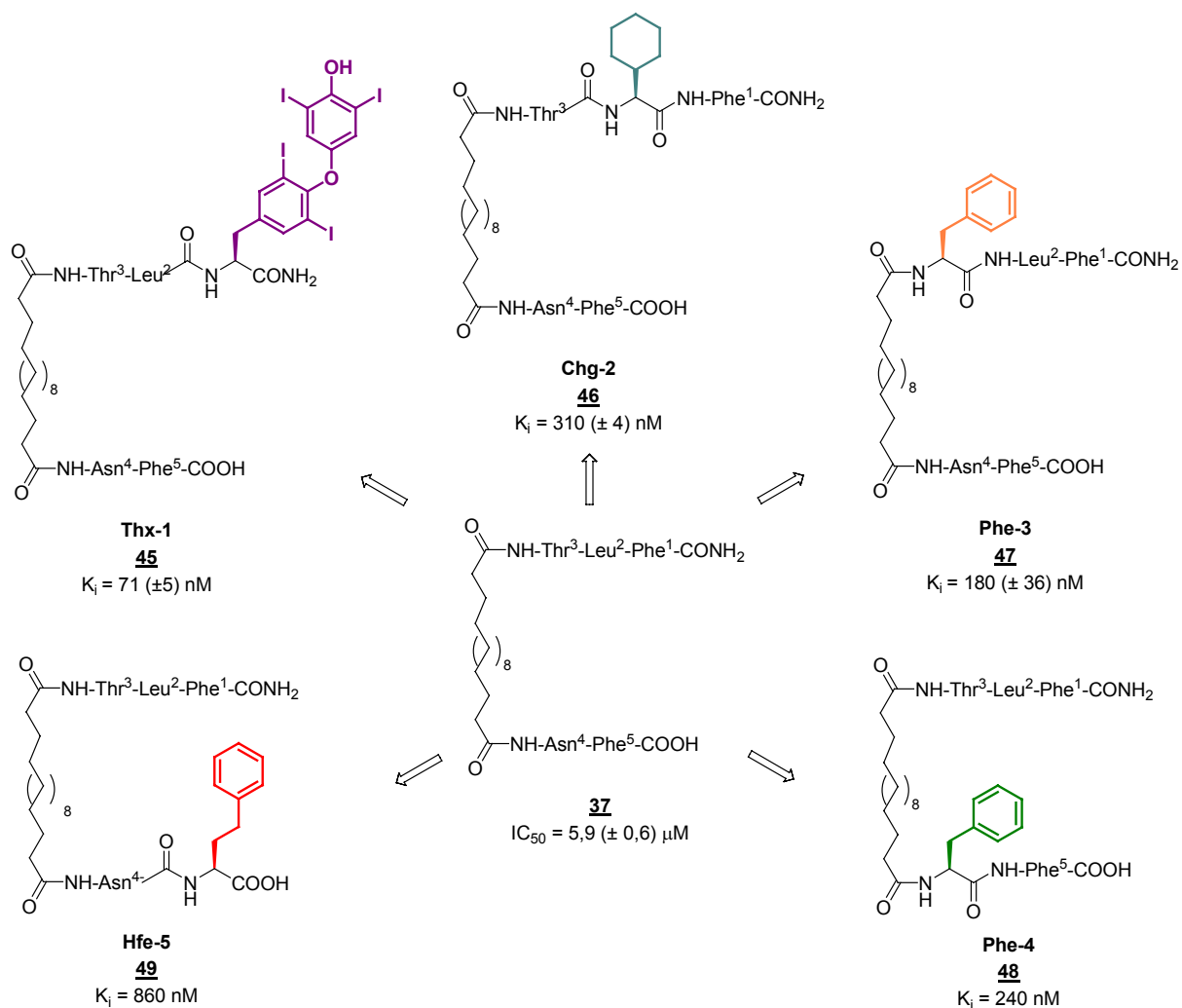
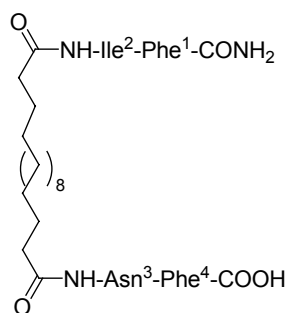


Figura 37: Estructures d'alguns dels inhibidors més potents de la biblioteca de compostos derivats de **37**. Thx = tiroxina, Chg = ciclohexilglicina, Hfe = homofenilalanina

En un altre estudi dut a terme pel mateix grup, es va poder observar com la substitució del residu Leu per lle en l'inhibidor competitiu **38** ($IC_{50} = 11 \mu\text{M}$) conduïa a un canvi del mode d'inhibició, retornant a la inhibició per dimerització (compost **50**, $IC_{50} = 1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$).⁶⁰ Partint d'aquesta dada, es va sintetitzar una altra biblioteca de 56 compostos, incorporant cada vegada una variació en un dels 4 residus de l'inhibidor **50** (Fig. 38). La substitució de la posició 2 amb grups aromàtics amb substituents electroatracients (compost **52**) va resultar en un augment de la potència inhibidora, així com també la substitució per cadenes laterals aromàtiques exteses com el naftil (compost **51**). Les modificacions de l'Asn de la posició 3 amb cadenes laterals aromàtiques amb grups electroatracients també van comportar augments significatius en la activitat inhibidora (compostos **53**, **54** i **55**). Cal

⁶⁰ Hwang, Y.S.; Chmielewski, J.; *J. Med. Chem.*, **2004**, *48*, 2239-2242.

remarcar que d'aquesta manera es van obtenir compostos més potents que el cap de sèrie **9e** però reduint aproximadament a la meitat el pes molecular.



50

Inhibidor de dimerització

$K_i = 210 \text{ nM}$

$IC_{50} = 1,1 \text{ }\mu\text{M}$

| Compost | Posició 1 | K_i | Compost | Posició 3 | K_i |
|-----------|--------------------------|--------|-----------|---------------------------|--------|
| 51 | 2-Nal | 127 nM | 53 | Tyr (3-NO ₂) | 102 nM |
| 52 | Tyr (3-NO ₂) | 164 nM | 54 | Phe (4-NO ₂) | 103 nM |
| | | | 55 | Phe (3,4-F ₂) | 106 nM |
| | | | 56 | Tyr (OBz) | 110 nM |
| | | | 57 | Phe | 112 nM |
| | | | 58 | Phe (4-CN) | 140 nM |
| | | | 59 | Ile | 140 nM |
| | | | 60 | Hfe | 160 nM |

Figura 38: Activitats dels compostos derivats de l'inhibidor **50**. 2-Nal = 2-naftilalanina, Tyr (3-NO₂) = 3-nitrotirosina, Phe (4-NO₂) = *p*-nitrofenilalanina, Phe (3,4-F₂) = 3,4-difluorofenilalanina, Tyr (OBz) = *O*-benzyltirosina, Hfe = homofenilalanina

Amb els resultats obtinguts d'aquestes biblioteques de compostos sintetitzats fent una única variació respecte el cap de sèrie, el grup de Chmielewski ha optat recentment per dissenyar una nova col·lecció de compostos fent múltiples modificacions, per tal de millorar la potència dels inhibidors.⁶¹ En aquest treball descriuen també una nova metodologia per sintetitzar els compostos *in situ* en plaques de 96 pous, que permet assajar-los sense necessitat de purificar-los, contribuint d'aquesta manera a un estalvi considerable de temps (Fig. 39).

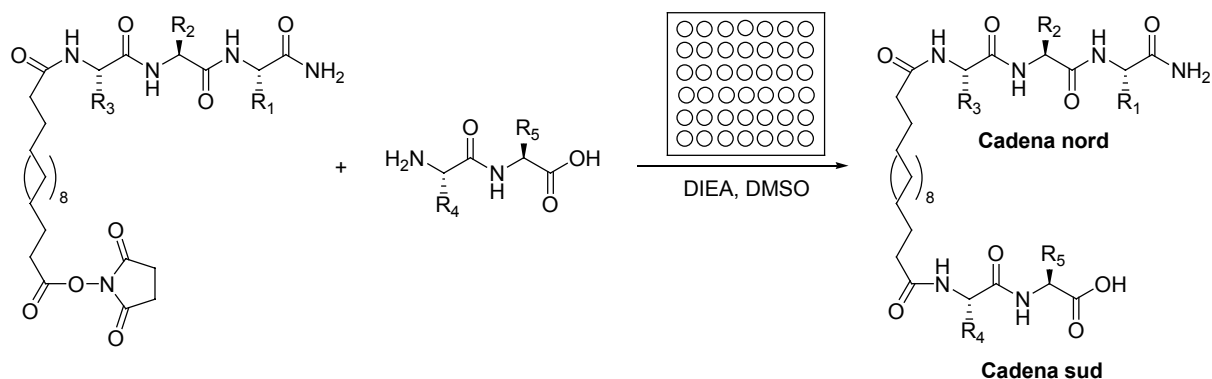
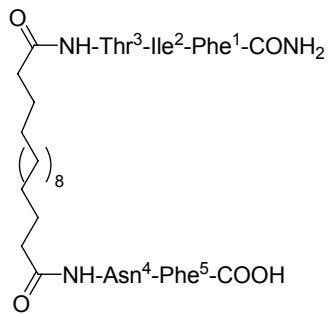


Figura 39: Esquema de la síntesi d'inhibidors en plaques

D'aquesta manera han desenvolupat una nova estratègia per sintetitzar inhibidors doblement modificats, els quals han resultat tenir una activitat més elevada que el compost de partida **37**. Més del 90% d'aquests inhibidors presenten una eficàcia superior als compostos que incorporen només

⁶¹ Lee, S.G.; Chmielewski, J.; *Chemistry & Biology*, **2006**, *13*, 421-426.

una modificació. Es va estudiar el mecanisme d'inhibició pels inhibidors més potents d'aquesta col·lecció i es va trobar que es tractava d'inhibidors de dimerització. D'aquesta manera s'han identificat els inhibidors de dimerització més potents fins al moment (Taula 4).



37
Inhibidor de dimerització
IC₅₀ = 5,9 (± 0,6) μM

| | | CADENA SUD | | | | | |
|-------------|------------|-------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | | Posició 4 | | | Posició 5 | | |
| CADENA NORD | | CMeO ₂ (2,9) | Paf (0,6) | Met (2,7) | Cha (3,7) | Hfe (4,4) | Nal (2,9) |
| Posició 1 | Thx (0,4) | 0,46 | 0,24 | 0,41 | 0,24 | 0,4 | 0,23 |
| | Bip (1,09) | 0,51 | 1,02 | 0,46 | 0,69 | 0,64 | 0,51 |
| | Chg (3,1) | 0,58 | 0,90 | 0,67 | 0,55 | 0,53 | 0,31 |
| Posició 2 | Cha (1,6) | 0,84 | 0,67 | 1,34 | 0,63 | 0,77 | 0,53 |
| | Ile (2,5) | 1,17 | 0,97 | 1,67 | 0,77 | 1,24 | 0,61 |
| | Chg (0,68) | 0,58 | 0,71 | 0,48 | 0,58 | 0,65 | 0,37 |
| Posició 3 | Leu (0,87) | 0,47 | 0,33 | 0,65 | 0,54 | 0,51 | 0,39 |
| | Val (1,3) | 0,48 | 0,32 | 0,58 | 0,41 | 0,53 | 0,38 |
| | Met (1,2) | 0,47 | 0,53 | 0,58 | 0,50 | 0,57 | 0,37 |

Taula 4: Valors IC₅₀ (μM) dels inhibidors modificats doblement. Els valors per la mutació d'un sol aminoàcid es troben entre parèntesi. Thx = tiroxina, Bip = bifenilalanina, Chg = ciclohexilglicina, Cha = ciclohexilalanina, CMeO₂ = metilcisteïnsulfona, Paf = 4-aminofenilalanina, Hfe = homofenilalanina, Nal = naftilalanina. Els inhibidors més potents es mostren en negreta.

▪ Inhibidors irreversibles

En un altre intent de desenvolupar nous inhibidors de la proteasa del VIH-1, Chmielewski i col·laboradors van provar de dissenyar inhibidors irreversibles capaços d'atrapar covalentment el monòmer.⁶² La inactivació mitjançant la modificació covalent és una bona estratègia a causa que no es requereixen concentracions de saturació de l'inhibidor, pel fet que una única unió és capaç d'inactivar l'enzim. Els inhibidors irreversibles contra la proteasa del VIH-1 sintetitzats fins a l'actualitat es basen en derivats d'epòxids,⁶³ inones i cetones α,β-insaturades,⁶⁴ dissenyats per interaccionar amb el residu Asp del centre actiu. En aquest nou estudi, la diana terapèutica del disseny dels inhibidors irreversibles és la Cys-95 que es troba present en la interfase de dimerització. Aquest

⁶² Zutschi, R.; Chmielewski, J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 1901-1903.

⁶³ a) Meek, T.D.; Dayton, B.D.; Metcalf, B.W.; Dreyer, G.B.; Strickler, J.E.; Gorniak, J.G.; Rosenberg, M.; Moore, M.L.; Magaard, V.W.; Debouck, C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, *86*, 1841-1845. b) Park, C.; Koh, J.; Son, Y.; Choi, H.; Lee, C.; Choy, N.; Moon, K.; Jung, W.; Kim, S.; Yoon, H.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, *5*, 1843-1848. c) Yu, Z.; Caldera, P.; McPhee, F.; de Voss, J.J.; Jones, P.R.; Burlingame, A.L.; Kuntz, I.D.; Craik, C.S.; Ortiz de Montellano, P.R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 5846-5856. d) Abell, A.; Houlst, D.; Bergman, D.; Fairlie, D.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 2853-2856.

⁶⁴ a) Salto, R.; Babe, L.M.; Li, J.; Rose, J.R.; Yu, Z.; Burlingame, A.L.; De Voss, J.J.; Sui, Z.; Ortiz de Montellano, P.; Craik, C.S.; *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 10691-10698; b) De Voss, J.J.; Sui, Z.; DeCamp, D.; Salto, R.; Babé, L.M.; Craik, C.S.; Ortiz de Montellano, P.; *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 665-673.

disseny és raonable si ens basem en el fet que fins ara no s'han detectat mutacions en la Cys-95 de la proteasa del VIH-1. En la interfase de dimerització, el tiol de la cadena lateral de la Cys-95 (d'un dels monòmers) està separat del C γ de la Phe-99' (de l'altre monòmer) per una distància d'aproximadament 4 Å. Es va postular que la substitució del residu Phe en l'inhibidor per un aminoàcid electròfil podria generar un enllaç covalent entre l'inhibidor i la Cys-95 de la proteasa. En el disseny d'inhibidors irreversibles, el residu de Phe va ser reemplaçat per Cys i aquest residu es va transformar en un electròfil per unió a una molècula d'àcid 5-tio-2-nitrobenzoic a través del tiol de la cadena lateral (Fig. 40). D'aquesta manera aquest inhibidor podria reaccionar fàcilment amb la Cys-95 d'un dels monòmers de la proteasa i generar un pont disulfur.

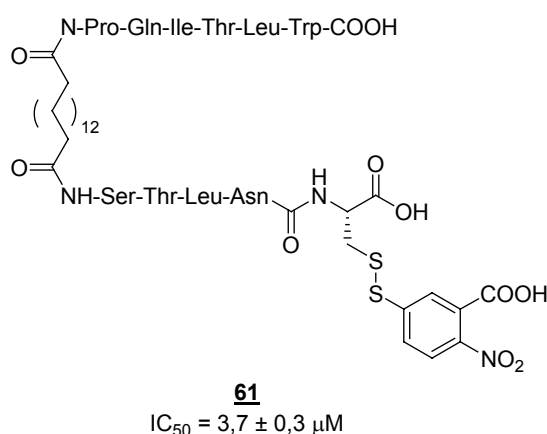


Figura 40: Inhibidor de dimerització irreversible de la proteasa del VIH-1

Tot i mostrar activitat (IC₅₀ = 3,7 ± 0,3 μM), es va observar que l'inhibidor **61** no reaccionava només amb la Cys-95, sinó que també ho feia amb la Cys-67, la qual es troba aproximadament a 8 Å de la Phe-99' en l'estructura cristal·lina.

Altres inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1

Sorprenentment, s'han trobat altres inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1 que disten molt de les estructures presentades fins al moment, ja que no es basen en els pèptids de les seqüències N- i C-terminal de la proteasa.

En un estudi dut a terme pel grup de Schramm, fent ús de la informació de les estructures cristal·lines obtingudes en estudis anteriors i mitjançant la *Cambridge Structural Database* van aconseguir identificar diferents triterpens que encaixen en la interfase hidrofòbica del monòmer de la proteasa del VIH-1 (Fig. 41).⁶⁵

⁶⁵ Querré, L.; Wenger, T.; Schramm, H.J.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, 227, 484-488.

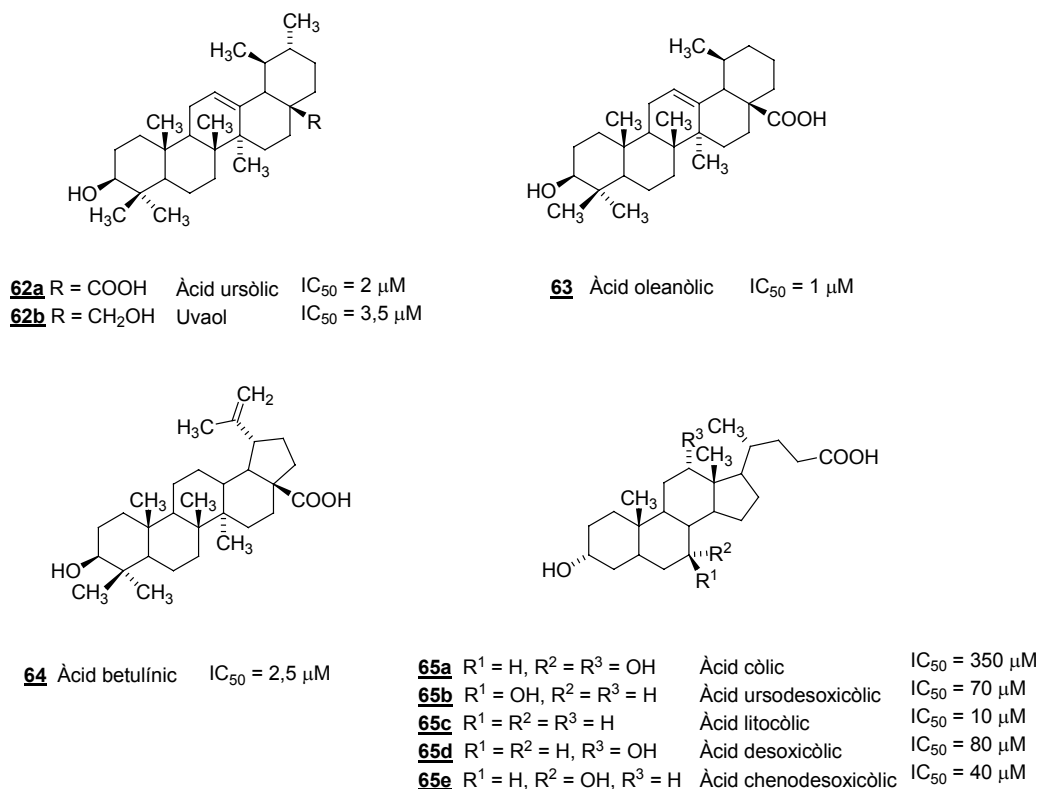


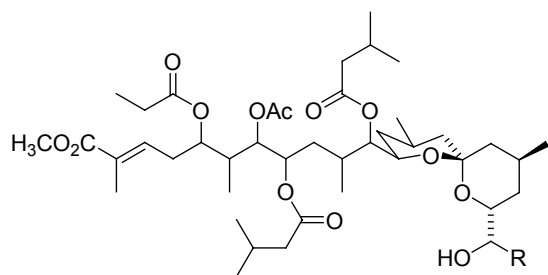
Figura 41: Estructures i IC₅₀ de diferents triterpens inhibidors de la HIV-1 PR

El tipus d'inhibició es va assajar pel cas de l'àcid ursòlic mitjançant el model cinètic descrit per Zhang³⁹ i es va observar que es tractava d'un inhibidor de dimerització ($K_i^{dim} = 3,4 \mu M$) amb una petita component d'inhibidor competitiu ($K_i^{com} = 130 \mu M$). D'aquesta manera es van identificar nous inhibidors de dimerització no peptídics que presenten avantatges com la bona biodisponibilitat oral dels esteroides, el baix cost i les múltiples possibilitats de modificació de les cadenes laterals.

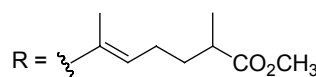
A mitjans dels 90, Rich i col·laboradors van abordar la síntesi de derivats dels didemnacetal A i B (Fig. 42),⁶⁶ espècies aïllades de l'*Ascidian didemnum* de l'illa Auluptagel i dels quals havia estat descrita la seva activitat inhibidora envers la proteasa del VIH-1 (IC₅₀ de 2 μM i 10 μM, respectivament).⁶⁷

⁶⁶ Fan, X.; Flentke, G.R.; Rich, D.H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 8893-8894.

⁶⁷ Potts, B.C.M.; Faulkner, D.J.; Chan, J.A.; Simolike, G.C.; Offen, P.; Hemling, M.E.; Francis, T.A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 6321-6322.



R = -COCH₃ Didemnacetal A IC₅₀ = 2 μM

R =  Didemnacetal B IC₅₀ = 10 μM



Ascidian didemnum

Figura 42: Estructures dels didemnacetals A, B i fotografia de l'espècie *Ascidian didemnum*

El descobriment de capacitat inhibidora per part d'anàlegs simplificats d'aquestes estructures sense la presència del grup hidroxil lliure típic dels inhibidors de centre actiu, els va conduir a estudiar detingudament el mecanisme d'inhibició d'aquests compostos. D'aquesta manera van trobar que els pentaèsters **66a-h** seguien el model cinètic descrit per Zhang i que per tant es tractava d'inhibidors de dimerització (Fig. 43).

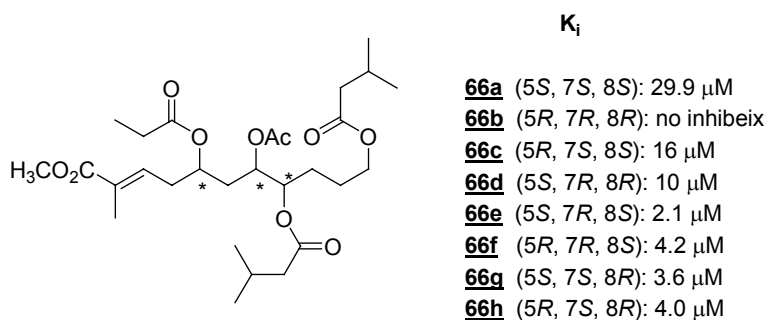


Figura 43: Inhibidors de dimerització derivats dels didemnacetals A i B

1.3 PRECEDENTS DEL GRUP

Des de fa uns anys, el nostre grup de recerca s'ha especialitzat en la utilització de 3-aminopiperidones diversament funcionalitzades per a la síntesi d'anàlegs dipeptídics de conformació restringida. L'anell de piperidona uneix el C α d'un aminoàcid amb l'àtom de nitrogen del residu següent, restringint d'aquesta manera els angles d'enllaç ω , ψ_1 i χ_1 i reduint la mobilitat dels angles ϕ_1 i ϕ_2 , ja que depenen de la conformació de cadira adoptada per l'anell de piperidona (Fig. 44).



Figura 44: Restricció dels anàlegs dipeptídics mitjançant l'anell de piperidona

L'any 1980, Freidinger va demostrar que la introducció d'un anell de lactam en una cadena peptídica induïa la formació de girs β .⁶⁸ Posteriorment, en el nostre grup s'ha observat la capacitat de l'estructura de lactam per a la inducció girs de tipus γ (Fig. 45).⁶⁹

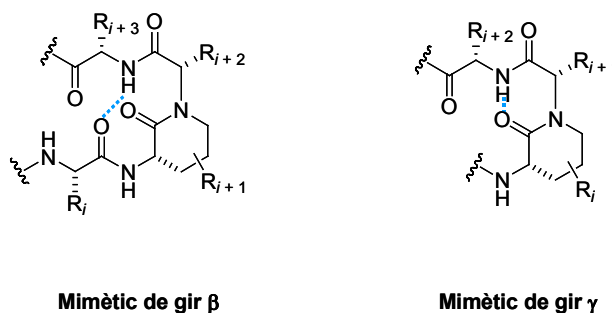


Figura 45: Representació de mimètics de girs β i γ

Actualment, el nostre grup disposa d'una col·lecció de 3-aminolactams que han estat emprats com a "scaffolds" (o esquelets de suport de grups funcionals), com a inductors d'estructures secundàries de tipus gir β i γ i com a substituents de dipeptídics en estructures d'importància biològica (Fig. 46).

⁶⁸ a) Freidinger, R.M.; Veber, D.F.; Perlow, D.S.; Brooks, J.R.; Saperstein, R.; *Science*, **1980**, *210*, 656-658. b) Freidinger, R.M.; Veber, D.F.; Hirschmann, R.; Paegle, I.M.; *Int. J. Pept. Protein Res.*; **1980**, *16*, 464-470. c) Freidinger, R.M.; Perlow, D.S.; Veber, D.F.; *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 104-109. d) Freidinger, R.M.; *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5553-5566. e) Veber, D.F.; Freidinger, R.M.; *Trends Neurosci.*, **1985**, 392-396.

⁶⁹ Fernández, M.M.; Diez, A.; Rubiralta, M.; Montenegro, E.; Casamitjana, N.; Kogan, M.J.; Giralt, E.; *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 7587-7599.

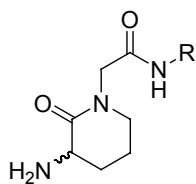
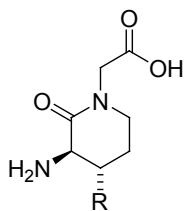
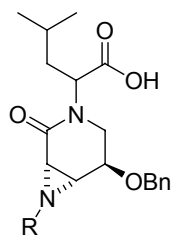
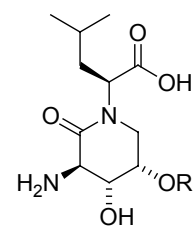
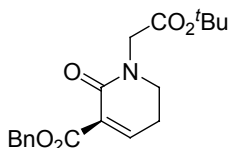
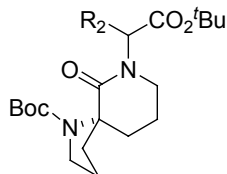
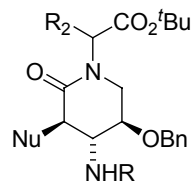
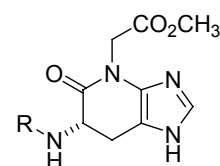
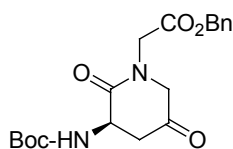
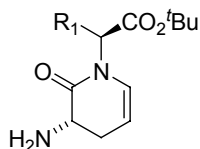
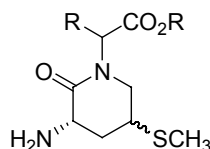
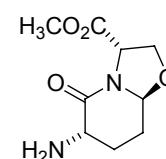
**67***Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 1633**68***J. Org. Chem.*, **2003**, 9541**69***Tetrahedron: Asymmetry*,
2002, 995**70***Tetrahedron Lett.*, **1999**, 4865**71***J. Org. Chem.*, **2003**, 9541**72***J. Org. Chem.*, **2002**, 7587**73***Tetrahedron: Asymmetry*,
2002, 995**74***Tetrahedron Lett.*, **2002**, 4343**75***Tetrahedron*, **2001**, 157**76***Tetrahedron*, **1999**, 10173**77***Tetrahedron*, **1996**, 7727**78***J. Org. Chem.*, **2000**, 6992

Figura 46: Estructures dels pseudodipèptids desenvolupats en el grup d'investigació en els darrers anys

Per exemple, el lactam **67** s'ha emprat en la síntesi d'una quimioteca d'inhibidors de triptasa d'estructura dimèrica i el lactam **77** s'ha utilitzat com a derivat restringit de Met en inhibidors del transport hepàtic del glutatión. També s'han desenvolupat derivats bicíclics com els compostos **72**, **74** i **78**.

L'objectiu de la present Tesi doctoral consisteix, doncs, en la introducció d'aquest tipus de compostos amb estructura de 3-aminolactam en les cadenes peptídiques nord i sud dels inhibidors de proteasa, per tal de disminuir la llibertat conformacional i convertir-los, d'aquesta manera, en agents més actius i menys propensos a la degradació.

D'entre aquests compostos, vam escollir els pseudodipèptids **67**, **72** i **78**.

En primer lloc, ens vam decidir pel compost **78**, amb la finalitat d'ajudar a preorganitzar la cadena nord i sud dels inhibidors per tal de formar una làmina β interdigitada ja que en estudis previs en el grup s'havia demostrat que induïa girs de tipus β -II'.⁷⁰

En segon lloc, ens vam decantar pel compost **72**, ja que en el grup també havia quedat demostrat el seu paper en la formació de girs, en aquest cas de tipus γ .⁶⁹ A causa de les dificultats sintètiques i dels baixos rendiments obtinguts que feien inviable la introducció d'aquesta molècula en les cadenes peptídiques dels inhibidors, finalment vam optar per incorporar el compost **67** en el disseny dels nostres inhibidors.

⁷⁰ Estiarte, M.A.; Rubiralta, M.; Diez, A.; Thormann, M.; Giralt, E.; *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 6992-6999.

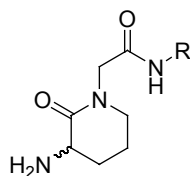
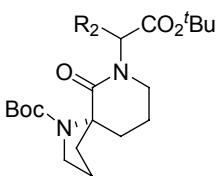
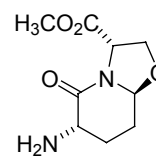
1.4 OBJECTIUS

Tot i que s'han assolit molts reptes en la lluita contra el SIDA, actualment encara se'n desconeix la cura definitiva. Tots els fàrmacs assequibles comercialment i llur combinació en l'anomenada teràpia antiretroviral altament activa (HAART) milloren la qualitat de vida de les persones infectades però l'actual teràpia té uns costos molt elevats, sobretot si tenim en compte que els 95% de la gent infectada viu en països en vies de desenvolupament, i pateix altres limitacions com ara la necessitat de dosis elevades, els efectes secundaris i sobretot, el problema de la resistència als fàrmacs. A més a més aquests inhibidors, tot i tenir una forta activitat, no són ideals, ja que en general tenen una baixa solubilitat aquosa, s'eliminen fàcilment, no són assequibles per via oral i tenen una durada d'acció breu.

La present Tesi doctoral té per objectiu el disseny, síntesi i avaluació de nous inhibidors de la proteasa del VIH-1 que actuïn per un mecanisme d'inhibició diferent als comercialitzats fins al moment i que ajudi a combatre els inconvenients associats als inhibidors comercials.

Els objectius d'aquesta Tesi es resumeixen en:

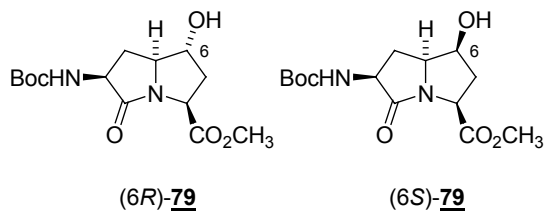
- Síntesi dels 3-aminolactams **67**, **72** i **78**

**67****72****78**

- Disseny i síntesi en fase sòlida dels inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1
- Expressió de la proteasa del VIH-1 en *E. Coli*
- Avaluació dels inhibidors i del mecanisme d'inhibició per fluorescència amb la proteasa obtinguda mitjançant l'expressió en *E. Coli*
- Avaluació dels inhibidors amb el VIH-1 en col·laboració amb el grup del Dr. Esté de l'Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona)
- Avaluació de la interacció proteasa-inhibidor mitjançant estudis de calorimetria

Una part del treball experimental d'aquesta Tesi es va dur a terme al grup del Prof. Lubell de la Universitat de Montreal. Aquest grup de recerca també utilitza estructures heterocícliques com a pseudopèptids restringits. Durant aquesta estada de 6 mesos, es va poder aprofundir en el disseny de peptidomimètics basats en l'estructura d'azabicyclo[X.Y.0]alcans. L'objectiu que es va plantejar fou:

- Expansió de la metodologia descrita prèviament al grup de la síntesi de l'aminoàcid derivat de pirrolizidinona per tal de sintetitzar diferents anàlegs substituïts en la posició 6.



- Estudi conformacional d'aquests compostos
- Derivatització dels aminoàcids de pirrolizidinona a través de la funció hidroxil, per tal de mimetitzar diferents estructures dipeptídiques