

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



5. ASSAIGS BIOLÒGICS AMB ELS INHIBIDORS SINTETITZATS

Un cop sintetitzats els compostos descrits en el Capítol 4 (pg. 121), ens plantejarem com mesurar l'activitat d'aquest tipus de substàncies. El conjunt d'experiments i resultats obtinguts per cadascun d'aquests assaigs es troba recollit en aquest Capítol i es poden classificar en:

- **Assaigs *in vitro*:** consisteixen en mesurar l'activitat sobre la HIV-1 PR mitjançant experiments de fluorescència. Aquests assaigs permeten l'obtenció de les IC₅₀ dels inhibidors sintetitzats i l'estudi del mode d'inhibició dels compostos actius.
- **Assaigs *in vivo*:** consisteixen en mesurar l'activitat dels compostos sintetitzats directament sobre el virus. Aquesta part del treball es realitzà gràcies a una col·laboració amb el grup del Dr. Esté, de l'Hospital Germans Trias i Pujol. S'assajaren els compostos tant amb el virus *wild type* com amb una forma mutant del virus. Aquests assaigs permeten l'obtenció de les EC₅₀ i CC₅₀ dels inhibidors sintetitzats.
- **Estudi calorimètric:** es va estudiar mitjançant una valoració calorimètrica isoterma (*ITC*) la interacció entre el compost amb millor activitat *in vivo* (**176**) i la HIV-1 PR.

Per tal de poder dur a terme els assaigs de fluorescència i de calorimetria, calia disposar de la HIV-1 PR, per la qual cosa va ser necessari l'expressió d'aquesta proteïna en *E.coli*. Aquesta part del treball es dugué a terme en els laboratoris del Dr. Giralt i del Dr. Pons.

5.1 EXPRESSIÓ DE LA HIV-1 PR EN *E. COLI*

Amb l'objectiu de poder assajar l'activitat dels compostos sintetitzats sobre la HIV-1 PR, i degut a l'elevat cost de la proteïna comercial (~ 10.000 €/mg), s'optà per expressar la proteïna del VIH-1 en *E. coli*. L'expressió d'aquesta proteïna es troba àmpliament descrita a la literatura¹⁵⁹ i en tractar-se d'una proteïna relativament petita (dues unitats de 99 aminoàcids cadascuna), també se n'ha descrit la seva síntesi química.¹⁶⁰

Aquesta part del capítol relacionada amb la biologia molecular es dugué a terme en col·laboració amb la Sílvia Frutos del laboratori del Dr. Ernest Giralt.

5.1.1 Transformació

El material genètic necessari per a l'expressió de la proteïna en forma de plàsmid recombinant ens va ser cedit per la Sílvia Frutos. En aquest cas es tractava d'un plàsmid amb 5 mutacions

¹⁵⁹ a) Lin, X.L.; Lin, Y.Z.; Tang, J.; *Methods of Enzymology*, **1994**, *241*, 195-224. b) Porter, D.J.T.; Hanlon, M.H.; Carter, L.H.; Danger, D.P.; Furfine, E.S.; *Biochemistry*, **2001**, *40*, 11131-11139. c) Louis, J.; McDonald, R.; Nashed, N.; Wondrak, E.M.; Jerina, D.; Oroszlan, S.; Mora, P.; *Eur. J. Biochem.*, **1991**, 361-369.

¹⁶⁰ a) Copeland, T.D.; Oroszlan, S.; *Gene Anal. Tech.*, **1988**, *5*, 109-115. b) Nutt, R.F.; Brady, S.F.; Darke, P.L.; Ciccarone, T.M.; Colton, C.D.; Nutt, E.M.; Rodkey, J.A.; Bennett, C.D.; Waxman, L.H.; Sigal, I.S.; Anderson, P.S.; Veber, D.F.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, *85*, 4686-4690. c) Schneider, J.; Kent, S.B.H.; *Cell*, **1988**, *54*, 363-368.

en l'ADN codificant: Q7K, L33I, L63I, C67A i C95A. Aquestes mutacions no modifiquen l'activitat catalítica de la HIV-1 PR, però n'augmenten la resistència a l'autohidròlisi.

Els plàsmids són molècules circulars d'ADN bicatenari que es troben separades de l'ADN cromosòmic de la cèl·lula i que són presents de forma natural en els bacteris i en les cèl·lules eucariotes unicel·lulars inferiors. Els plàsmids més utilitzats en la tecnologia de l'ADN recombinant són els que es repliquen en *E. coli*. Generalment, els vectors plasmídics contenen 3 regions essencials per a la clonació de l'ADN: un origen de replicació, un marcador que permet la selecció (gairebé sempre un gen de resistència a fàrmacs) i una regió en la qual es poden inserir fragments exògens d'ADN. La inclusió d'un polil·ligador (*polilinker*) sintètic que contingui les seqüències de reconeixement per diferents enzims de restricció incrementa la versatilitat del vector plasmídic (Fig. 81).

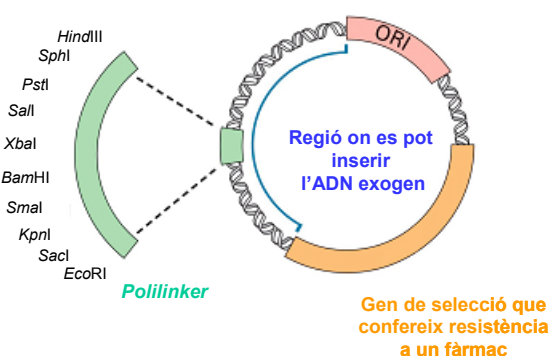


Figura 81: Components bàsics d'un vector de clonació plasmídica

Els enzims de la cèl·lula hoste repliquen el plàsmid començant en l'origen de replicació (ORI), una seqüència d'ADN específica de 50-100 parells de bases. Un cop iniciada la replicació de l'ADN en l'origen de replicació, aquesta continua al voltant del plàsmid circular, sense importar la seqüència de nucleòtids. Per tant, qualsevol seqüència d'ADN inserida en aquest plàsmid es replica juntament amb la resta d'ADN.

Un cop preparat el plàsmid, cal que les cèl·lules d'*E. coli* l'incorporin, procés que rep el nom de transformació.

Per a la transformació es varen fer servir cèl·lules competents de la soca *Rosseta-pLys*, cedides pel laboratori del Dr. Miquel Pons. El fet que siguin competents significa que han estat prèviament tractades amb CaCl_2 per tal de fer la membrana cel·lular més permeable i facilitar la incorporació del plàsmid. Els ions de CaCl_2 neutralitzen la repulsió entre els caps fosfolípidics carregats negativament de la membrana cel·lular i els grups fosfat també carregats negativament de l'ADN. La transformació s'inicià amb un xoc tèrmic, provocant un gradient de temperatures que permet l'entrada de l'ADN extracromosòmic a la cèl·lula. Després d'una breu incubació per tal de permetre l'expressió dels gens de resistència a antibiòtics, se sembrà sobre una placa d'agar amb els antibiòtics canamicina i cloramfenicol. Com que el plàsmid utilitzat presentava resistència a la canamicina i al cloramfenicol, només sobrevisqueren les cèl·lules transformades, és a dir, les que havien incorporat el plàsmid recombinant amb l'ADN

codificant per a la proteasa del VIH-1. S'agafà una de les colònies i s'inicià la multiplicació cel·lular (Fig. 82).

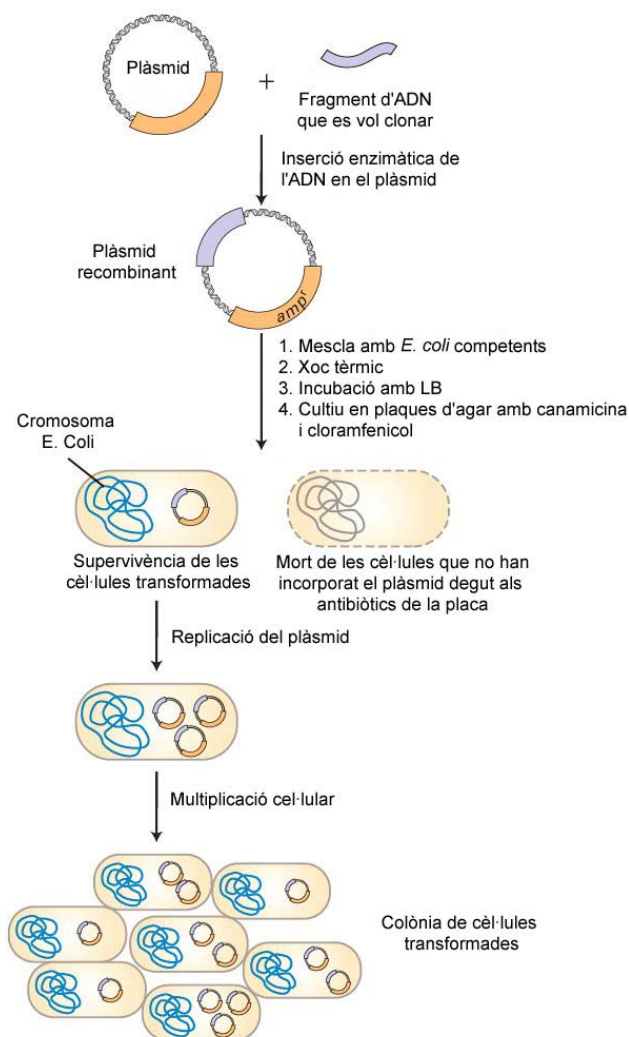


Figura 82: Representació gràfica del procés de transformació i multiplicació cel·lular

El medi de cultiu utilitzat pel creixement dels bacteris és l'anomenat LB (*Lysogeny broth*, *Luria broth* o *Luria-Bertani broth*) i es tracta d'un medi nutricional ric compost per diferents pèptids, peptones de caseïna, vitamines i minerals. El creixement tingué lloc en un erlenmeyer agitat contínuament amb un agitador orbital, amb suficient espai sobre el medi de cultiu per tal de facilitar una difusió adequada de l'oxigen. S'aturà el creixement de les cèl·lules bacterianes en arribar a una mesura d'absorbància de 0,8 a $\lambda = 595$ nm.

5.1.2 Expressió

Els protocols d'expressió, purificació i replegament de la proteïna emprats són els descrits per Tomasselli *et al.*¹⁶¹

¹⁶¹ Tomasselli, A.G.; Olsen, M.K.; Hui, J.O.; Staples, D.J.; Sawyer, T.K.; Heinrichson, R.L.; Tomich, C.S.C.; *Biochemistry*, **1990**, *29*, 264-269.

Per tal d'induir l'expressió de la HIV-1 PR als bacteris amb el plàsmid incorporat, s'hi afegí isopropil- β -D-tiogalactòsid (IPTG). Generalment els plàsmids recombinants incorporen una seqüència d'ADN, anomenada promotor, a partir de la qual es pot començar la transcripció de l'ADN (en aquest cas el promotor *lac*). Tal i com es mostra en la Figura 83, el gen *lacZ* (que en condicions normals en presència d'IPTG produeix mARN *lacZ* i desencadena la formació de la β -galactosidasa) pot ser eliminat i substituït per ADN clonat. En aquest cas, l'addició d'IPTG i la transcripció subseqüent del promotor *lac* produeixen mARN de la HIV-1 PR, que finalment és traduït a la proteasa del VIH-1.

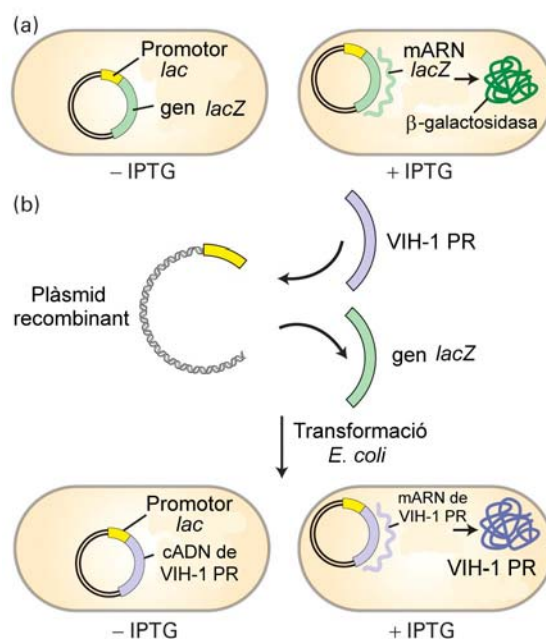


Figura 83: Inducció de l'expressió mitjançant IPTG

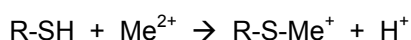
5.1.3 Aïllament i purificació

El pas inicial per a l'aïllament de la proteïna consisteix en la destrucció de la membrana cel·lular, per tal de poder alliberar totes les proteïnes de l'interior de la cèl·lula. El tipus de destrucció dependrà del tipus de cèl·lula utilitzada. Els bacteris tenen un diàmetre aproximat de l'ordre de 1 a 4 μm i generalment presenten parets cel·lulars molt rígides. En el cas dels bacteris Gram-negatiu (*E. coli*), la membrana plasmàtica es troba envoltada d'una capa prima (2-3 nm) de peptidoglican i d'una segona membrana exterior de lipopolisacàrid. Aquestes membranes es poden trencar per mitjà de sonicació. Com que l'ús d'aquesta metodologia genera una gran quantitat de calor, les mostres han de romandre en un bany de gel durant el tractament.

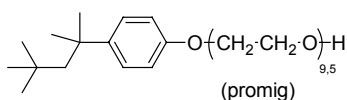
Un cop trencada la membrana cel·lular, es dugueren a terme una sèrie de rentats per tal de fer una purificació preliminar i separar determinats orgànuls, fragments de membrana, ADN i

metabòlits, entre d'altres. Aquests rentats es feren amb diferents solucions tampó i per mitjà de centrifugació a 4 °C. Generalment, s'acostumen a utilitzar solucions tampó de Tris o fosfat, que presentin una força iònica (0,1 M – 0,2 M) i pH (7,0 – 8,0) similars als de la cèl·lula. A més a més s'hi afegeixen altres reactius amb finalitats específiques com ara:

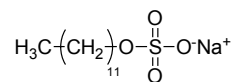
- **Antioxidants:** dins de la cèl·lula, la proteïna es troba en un ambient altament reductor, però quan és alliberada a la solució tampó, s'exposa a un ambient molt més oxidant. Com que la majoria de proteïnes contenen grups tiol de l'aminoàcid cisteïna que es podrien oxidar per formar ponts disulfur inter- i intramoleculars, s'acostuma a afegir un agent reductor com el ditiotreitòl (DTT).
- **EDTA:** per tal d'eliminar els ions divalents metàl·lics que podrien reaccionar amb els grups tiol de les proteïnes per donar mercàptids.



- **Detergents:** per solubilitzar les proteïnes amb regions hidrofòbiques i que presenten baixa solubilitat en solucions tampó aquoses. Es poden utilitzar detergents iònics com el dodecil sulfat de sodi (SDS) o no iònics com el Tritó X-100.



Tritó X-100
(polioxietilen(9,5)*p*-*t*-octilfenol)



SDS
(dodecilsulfat de sodi)

En aquest cas, la HIV-1 PR romangué durant els rentats en el precipitat, i s'anaren decantant els sobrenedants i substituint per noves solucions tampó. En l'etapa final de rentat, els cossos d'inclusió formats per agregats insolubles de la proteïna desnaturalitzada se solubilitzaren amb hidroclorur de guanidini i es procedí a una purificació per exclusió molecular.

Cromatografia d'exclusió molecular

La gran aplicabilitat, rapidesa i sensibilitat de l'HPLC ha fet que esdevingui la forma més important de cromatografia de molècules biològiques com ara aminoàcids, pèptids i proteïnes. Els instruments dedicats exclusivament a la separació de proteïnes han donat lloc a la tècnica que es coneix com a FPLC (*fast protein liquid chromatography*). Aquests aparells són compatibles amb qualsevol tipus de columna i tècnica: cromatografia en fase reversa, cromatografia d'afinitat, d'exclusió molecular, d'interaccions hidrofòbiques i d'intercanvi iònic. Generalment s'utilitzen eluents aquosos, fent servir fases estacionàries de diàmetres similars als utilitzats en l'HPLC convencional. Tanmateix, la pressió de treball (1 – 2 MPa) és inferior a la utilitzada en l'HPLC.

En primer lloc es duigué a terme una purificació en el FPLC per exclusió molecular. Aquesta tècnica es basa en la separació dels diferents compostos en base a la seva grandària, fent-los passar a través d'una columna composta de perles poroses fabricades de poliacrilamida, dextrà

o agarosa. Per a la primera purificació de la HIV-1 PR es va utilitzar una columna Superdex 75, composta per dextrans i agarosa. D'aquesta manera, en fer passar la barreja d'analits per la columna, els compostos de major grandària són eluïts ràpidament ja que passen a través dels espais intersticials entre les partícules. En canvi, les molècules més petites queden retingudes en les partícules del rebliment de la columna i es van eluint gradualment, a mesura que van sent arrossegades per l'eluent.

Les columnes de cromatografia d'exclusió molecular acostumen a ser més llargues que les utilitzades en altres tècniques cromatogràfiques, per tal de tenir més volum de fase estacionària i afavorir la separació.

El cromatograma d'aquesta primera separació cromatogràfica ens mostra la presència de dos pics majoritaris. Després de l'anàlisi per electroforesi de les diferents fraccions es concloué que la proteasa del VIH-1 s'elueix en el segon pic (Fig. 84).

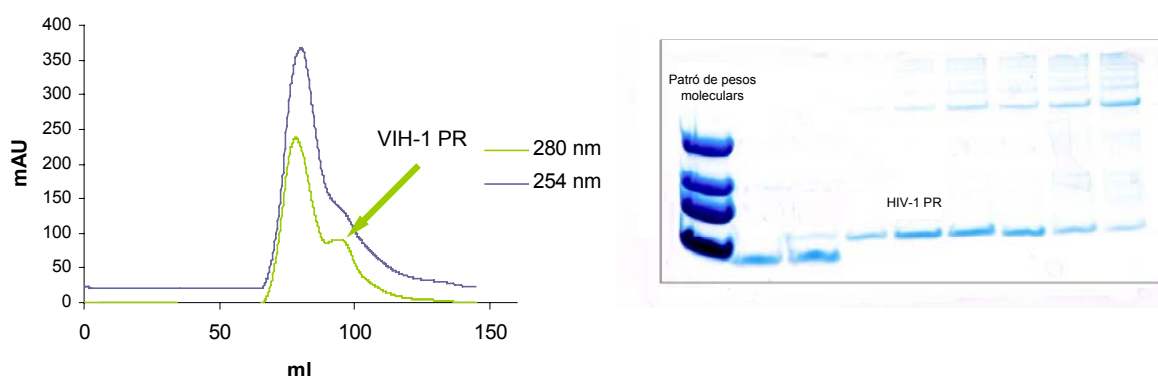


Figura 84: Cromatograma obtingut en la cromatografia d'exclusió molecular amb la columna Superdex 75 i gel d'electroforesi obtingut de les diferents fraccions eluïdes

D'aquesta manera, les fraccions pràcticament pures es reservaren per a la cromatografia d'intercanvi iònic mentre que les fraccions que presentaven més impureses, es reagruparen, es concentraren i es tornaren a purificar mitjançant cromatografia d'exclusió molecular de forma anàloga a l'anterior.

Cromatografia de bescanvi iònic

Les fraccions pràcticament pures obtingudes de la cromatografia d'exclusió molecular es tornaren a purificar per cromatografia d'intercanvi iònic. Aquesta tècnica cromatogràfica es basa en l'atracció entre partícules carregades positivament i negativament.

El punt isoelèctric calculat de la HIV-1 PR és aproximadament 9,7¹⁶², fent que en estar dissolta en un tampó de pH = 8, la càrrega global de la proteïna sigui positiva. Per aquest motiu en el nostre cas es va utilitzar una columna de bescanvi catiònic (*SP Sepharose High Performance*). L'elució de la proteïna va tenir lloc per un gradient de força iònica, fent servir concentracions creixents de NaCl. Finalment, les fraccions obtingudes s'analitzaren per electroforesi de forma anàloga a l'anterior i se seleccionaren les de més elevada puresa.

¹⁶² http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html

Determinació de la concentració de proteïna

Un cop aïllada i purificada la HIV-1 PR, calia determinar-ne la concentració. L'únic mètode acurat per determinar la concentració d'una proteïna en solució consisteix en hidrolitzar una porció de la mostra i dur a terme un anàlisi d'aminoàcids. Tanmateix, aquest procés és molt llarg i no resulta adequat per a les purificacions rutinàries. Existeixen altres mètodes colorimètrics més senzills, que consisteixen en fer reaccionar una mostra de la solució proteica amb un reactiu que produeix un producte colorejat. La quantitat d'aquest producte es mesura amb un espectrofotòmetre UV-Vis i utilitzant una recta de calibratge amb patrons de diferents concentracions d'albumina de sèrum boví (BSA), es calcula aproximadament la concentració de proteïna.

Per tal de mesurar la concentració aproximada de la HIV-1 PR es va fer ús del mètode de Bradford.¹⁶³ Aquest mètode es basa en la unió del colorant *Coomassie Brilliant Blue* amb la proteïna. A pHs baixos, el colorant lliure presenta màxims d'absorció a 470 i 650 nm, però quan s'uneix a la proteïna presenta un màxim d'absorció a 595 nm. Aquest mètode no és d'una elevada sensibilitat ja que la unió del colorant varia en funció del contingut d'aminoàcids bàsics (Arg i Lys) de la proteïna, però tanmateix, ens serveix per tenir una idea aproximada de la concentració de proteïna.

La recta de calibratge que s'obté mesurant l'absorbància de diferents concentracions d'albumina de sèrum boví havia estat realitzada prèviament per la Sílvia Frutos:

$$\text{Abs}_{595 \text{ nm}} = 0,0271 \cdot x - 0,0023 \quad \text{on } x = [\text{proteïna}] \text{ en } \mu\text{g/ml}$$

A partir de la mesura d'absorbància de la solució de la nostra proteïna ($\text{Abs}_{595 \text{ nm}} = 0,274$), i tenint en compte la dilució feta (3/80) en l'assaig, es pogué determinar la concentració de HIV-1 PR en el tampó provinent de la cromatografia de bescanvi catiònic (Tris·HCl 50 mM, NaCl 500 mM, urea 6 M, EDTA 1mM, pH = 8)

[HIV-1 PR] = 25,4 μM

5.1.4 Plegament de la HIV-1 PR

Com que la purificació de la proteïna tingué lloc en presència de tampons desnaturalitzants (6 M d'urea) i d'elevada força iònica (500 mM NaCl), fou necessari dur a terme posteriorment el replegament per tal de recuperar l'activitat de la HIV-1 PR. Amb aquesta finalitat, s'acidificà la solució de proteïna amb TFA 10% fins a pH = 3,5 i es dugué a terme una diàlisi a 4 °C. Aquest procés consisteix en dipositar la solució de proteïna en una espècie de bossa semipermeable (típicament una membrana de cel·lulosa amb porus) i submergir-la en una solució diferent, de manera que les molècules prou petites com per traspasar la bossa es moguin seguint un

¹⁶³ Bradford, M.M.; *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248-254.

gradient de concentració decreixent. Les molècules amb dimensions significativament més grans que els porus queden retingudes dins de la bossa de diàlisi. Per això, aquesta tècnica sovint s'utilitza per disminuir el contingut de salts d'una solució proteica. La importància de dur a terme la diàlisi a baixa temperatura rau en l'intent de minimitzar l'autodegradació de la proteasa.

Finalment, es calculà la concentració de proteïna mitjançant l'absorbància mesurada a $\lambda = 595 \text{ nm}$, fent ús del mètode de Bradford de manera anàloga a la descrita anteriorment.

La concentració final obtinguda en el tampó de diàlisi (NaOAc 10 mM, DTT 1 mM i NaCl 30 mM, pH = 4,6) fou:

$$[\text{HIV-1 PR}] = 20,0 \mu\text{M}$$

5.2 FLUORIMETRIA

Com ja s'ha comentat en la Introducció de la present Tesi doctoral, la proteasa del VIH-1 és una diana terapèutica molt estudiada en la recerca de fàrmacs per combatre la SIDA. Els polipèptids precursors dels gens *gag* i *pol* s'hidrolitzen per mitjà d'aquesta proteasa per formar els gens madurs. L'existència d'un assaig que permeti l'avaluació automatitzada d'inhibidors potencials de la proteasa i la seva optimització és d'importància cabdal pel desenvolupament de nous fàrmacs. Inicialment, l'avaluació d'aquests compostos es basava en la separació per HPLC dels productes i el substrat a diferents intervals de temps,¹⁶⁴ però ràpidament aquest tipus d'assaig es va convertir en una de les etapes limitants pel descobriment de nous inhibidors.

L'any 1990 Matayoshi *et al.* van desenvolupar un assaig fluorimètric que permetia l'avaluació de forma senzilla i continuada dels inhibidors de la proteasa del VIH.¹⁶⁵ Aquest assaig es basa en una de les estratègies més àmpliament utilitzades per la detecció de reaccions hidrolítiques, un fenomen conegut com a FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), els fonaments del qual es troben descrits en forma d'Annex al final d'aquest Capítol.

5.2.1 Assaig desenvolupat per Matayoshi

A la literatura es troben descrits múltiples assaigs per a la mesura de l'activitat de la proteasa mitjançant aquesta tècnica de fluorescència. Toth *et al.*,¹⁶⁶ Wang *et al.*,¹⁶⁷ i Geoghegan *et al.*¹⁶⁸ han desenvolupat assaigs similars al de Matayoshi, basant-se en el mateix principi però fent ús de diferents substrats fluorogènics.

L'assaig de Matayoshi es basa en l'ús de l'octapèptid que constitueix el substrat de la HIV-1 PR, unit als cromòfors EDANS i DABCYL, que actuen com a donador i acceptor, respectivament (Fig. 85).

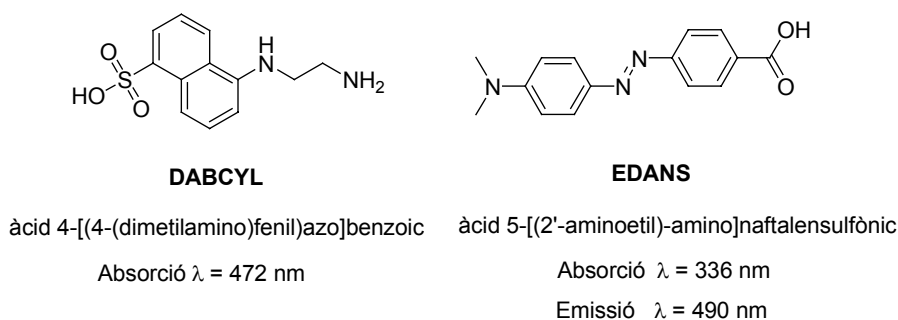


Figura 85: Estructures dels cromòfors DABCYL i EDANS

¹⁶⁴ a) Schneider, J.; Kent, S.B.H.; *Cell*, **1988**, *54*, 363-368; b) Darke, P.L.; Nutt, R.F.; Brady, S.F.; Garsky, V.M.; Cicarone, T.M.; Leu, C.T.; Lumma, P.K.; Freidinger, R.M.; Veber, D.F.; Sigal, I.S.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, *156*, 297-303; c) Moore, M.L.; Bryan, W.M.; Fakhoury, S.A.; Magaard, V.W.; Huffman, W.F.; Dayton, B.D.; Meek, T.D.; Hyland, L.; Dreyer, G.B.; Metcalf, B.W.; Strickler, J.E.; Gorniak, J.G.; Debouck, C.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1989**, *159*, 420-425.

¹⁶⁵ Matayoshi, E.D.; Wang, G.T.; Krafft, G.A.; Erickson, J.; *Science*, **1990**, *247*, 954-958.

¹⁶⁶ Toth, M.V.; Marshall, G.R.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1990**, *36*, 544-550.

¹⁶⁷ Wang, G.T.; Matayoshi, E.; Huffacker, H.J.; Krafft, G.A.; *Tet. Lett.*, **1990**, *31*, 6493-6496.

¹⁶⁸ Geoghegan, K.F.; Spencer, R.W.; Danley, D.E.; Contillo, L.G.; Andrews, G.C.; *FEBS Lett.*, **1990**, *262*, 119-122.

La seqüència de l'octapèptid (SQNYPIVQ) correspon al lloc d'hidròlisi natural p17/p24 de la Pr55^{gag}. La hidròlisi té lloc per l'enllaç peptídic entre la tirosina i la prolina. S'ha demostrat que aquesta seqüència és millor substrat que altres pèptids sintètics basats en llocs d'hidròlisi diferents.¹⁶⁹ Aquesta seqüència incorpora també un espaiador d'àcid γ -aminobutíric entre el grup DABCYL i el grup amino-terminal de la serina per tal d'evitar que l'impediment estèric d'aquest cromòfor impedeixi la hidròlisi del substrat per part de la proteasa.

Inicialment, la fluorescència intrínseca del donador EDANS es veu reduïda dràsticament degut a la transferència d'energia envers l'acceptor DABCYL present en el substrat. Tan bon punt el substrat és hidrolitzat per la proteasa, la interacció de FRET desapareix ja que donador i acceptor deixen d'estar a la distància adequada, i com a conseqüència s'observa un augment de fluorescència (Fig. 86). Tanmateix, en presència d'un inhibidor de la proteasa que impedeixi en major o menor grau la reacció d'hidròlisi del substrat, s'observa una disminució de la fluorescència.

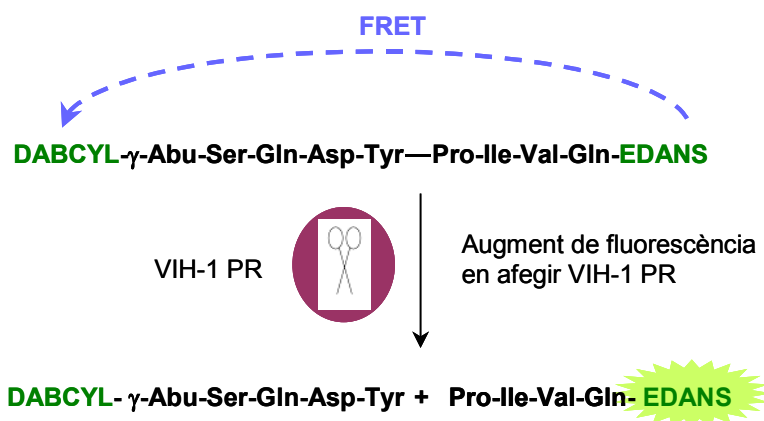


Figura 86: Esquema de l'assaig desenvolupat per Matayoshi *et al.* basat en el fenomen de FRET

D'aquesta manera es pot monitoritzar l'activitat proteolítica de forma continuada, simplement enregistrant la variació de fluorescència respecte al temps. Entre els avantatges que presenta aquesta tècnica destaca el fet que és homogènia, no-isotòpica, sensible, apte per a mesures cinètiques i que no requereix reactius addicionals.

5.2.2 Determinació de la IC₅₀ dels inhibidors sintetitzats

Per a la determinació dels IC₅₀ (concentració a la qual la inhibició de l'enzim és del 50%) dels inhibidors sintetitzats seguint l'assaig descrit per Matayoshi cal disposar de:

- Substrat DABCYL- γ -Abu-SQNYPIVQ-EDANS: assequible comercialment i adquirit en el nostre cas a Bachem.
- HIV-1 PR: expressada en *E. coli* tal i com s'ha explicat en l'apartat 5.1 d'aquest Capítol.

¹⁶⁹ a) Billich, S.; Knoop, M.T.; Hansen, J.; Strop, P.; Sedlacek, J.; Mertz, R.; Moelling, K., *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 17905-17908.

- Fluorímetre: en un principi es començaren a fer les mesures en un fluorímetre de cubetes Shimadzu, però en vista de la quantitat de mesures necessàries, l'absència de programari per processar les dades generades i de la durada de cada mesura (aproximadament 30 min), s'optà per optimitzar el procés i fer servir un fluorímetre de plaques Bio-tek, que permet la mesura simultània de 96 mostres diferents.

Optimització de la [HIV-1 PR] per a l'assaig

Les concentracions de HIV-1 PR descrites a la literatura per a la determinació de la IC₅₀ dels diferents inhibidors varien considerablement depenent dels autors. Així, per exemple, Matayoshi¹⁶⁴ fa ús d'una concentració de HIV-1 PR de 35 nM, mentre que Reboud-Ravaux i Chmielewski utilitzen concentracions de 7,5 nM i 25 nM, respectivament.^{49,60}

Així doncs, prèvia a l'avaluació dels inhibidors, es dugué a terme la determinació de l'activitat enzimàtica de la HIV-1 PR per tal de trobar la concentració òptima d'assaig en el fluorímetre del que disposàvem, de manera que les mesures es trobessin en la zona de linealitat de l'activitat.

Es van dur a terme varies mesures amb diferents concentracions de HIV-1 PR (7,5 nM, 15 nM, 30 nM, 45 nM, 60 nM, 75 nM i 90 nM), mantenint la concentració de substrat constant ([S] = 5,0 µM). Donat que la millor resposta s'obtingué amb una [PR] = 75 nM, es procedí a treballar amb aquesta concentració en la resta d'experiments per a la determinació dels IC₅₀ dels inhibidors.

Mesures de les IC₅₀ dels inhibidors

Seguint les condicions descrites pel grup de Reboud-Ravaux,⁴⁹ es treballà a una temperatura de 30 °C i amb una solució tampó (1 M NaCl, 100 mM NaOAc, 1 mM EDTA) de pH = 4,7. Els filtres d'excitació i d'emissió del fluorímetre van ser de 360/40 nm i 485/20 nm, respectivament.

Es prepararen dissolucions mares de concentració 50 mM de substrat i inhibidor en DMSO i a partir d'aquestes, se'n prepararen de concentració 3 mM.

Amb la intenció de tenir una idea aproximada de la potència dels inhibidors, cada inhibidor s'assajà en primer lloc a una concentració de 0 µM, 50 µM i 100 µM. Les mostres es prepararen amb els volums que s'indiquen a la Taula 11. En treballar amb les plaques de 96 pouets, s'utilitzà un volum final de 150 µl.

	HIV-1 PR (stock de 2,2 µM)	Inhibidor (stock de 3 mM)	Substrat (stock de 3 mM)	Tampó d'assaig	Volum total
[I] = 0 µM	5,1 µl	0 µl	0,25 µl	75 + 69,65 µl	150 µl
[I] = 50 µM	5,1 µl	2,5 µl	0,25 µl	75 + 67,15 µl	150 µl
[I] = 100 µM	5,1 µl	5 µl	0,25 µl	75 + 64,65 µl	150 µl

Taula 11: Volums necessaris per la determinació aproximada de les IC₅₀ dels diferents inhibidors

Cada compost s'assajà per triplicat i en cada experiment es feren les següents mesures:

- control positiu: proteasa i substrat ($[I] = 0 \mu\text{M}$)
- $[I] = 50 \mu\text{M}$
- $[I] = 100 \mu\text{M}$
- control negatiu substrat ($[PR] = 0 \mu\text{M}$, $[I] = 0 \mu\text{M}$)

La proteasa i l'inhibidor s'incubaren prèviament a 30°C durant 10 min i a continuació, s'hi addicionà ràpidament el substrat amb una pipeta multicanal. Les mesures d'absorbància s'enregistraren durant 30 min.

Un cop processats els valors obtinguts, s'obtingueren una sèrie de corbes, de les quals se'n mostren algunes a tall d'exemple a la Figura 87 (la resta de corbes obtingudes per a cada compost es troben representades al final d'aquesta Tesi, Capítol 9)

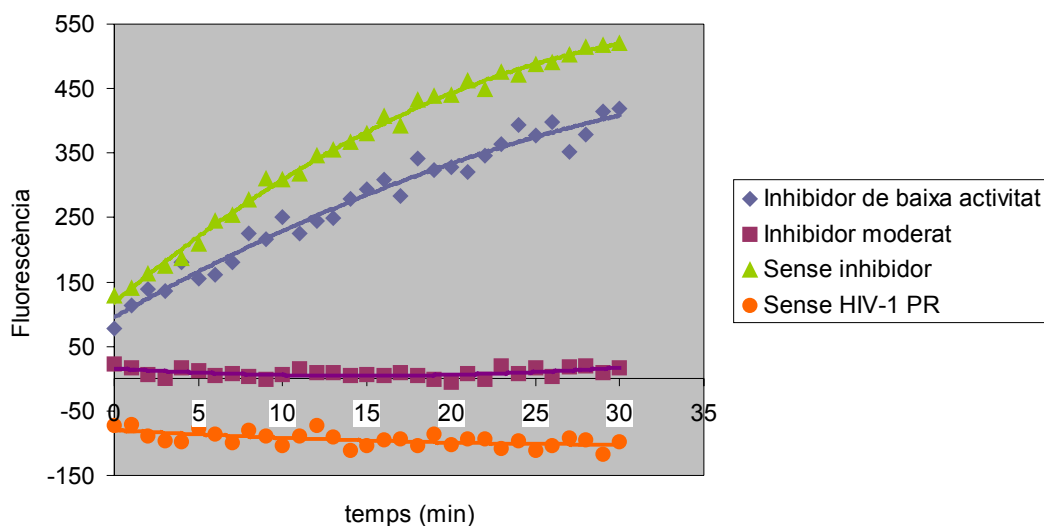


Figura 87: Exemple de les corbes obtingues per un compost de baixa activitat i un compost d'activitat moderada a $[I] = 100 \mu\text{M}$

Resultats obtinguts

Els valors dels IC_{50} dels compostos actius s'obtingueren representant el % d'inhibició en funció de la concentració d'inhibidor i fent servir l'Equació 1:

$$\% \text{ inhibició} = 100 \times \frac{[I]_0}{[I]_0 + IC_{50}} \quad \text{[Equació 1]}$$

Entre els 25 inhibidors assajats, es trobaren:

- 10 compostos que no presentaven activitat antiproteasa a $[I] \leq 100 \mu\text{M}$ (Fig. 88)
- 8 compostos amb baixa activitat (Fig. 89)
- 7 compostos amb activitat moderada ($IC_{50} < 100 \mu\text{M}$) (Fig. 90)

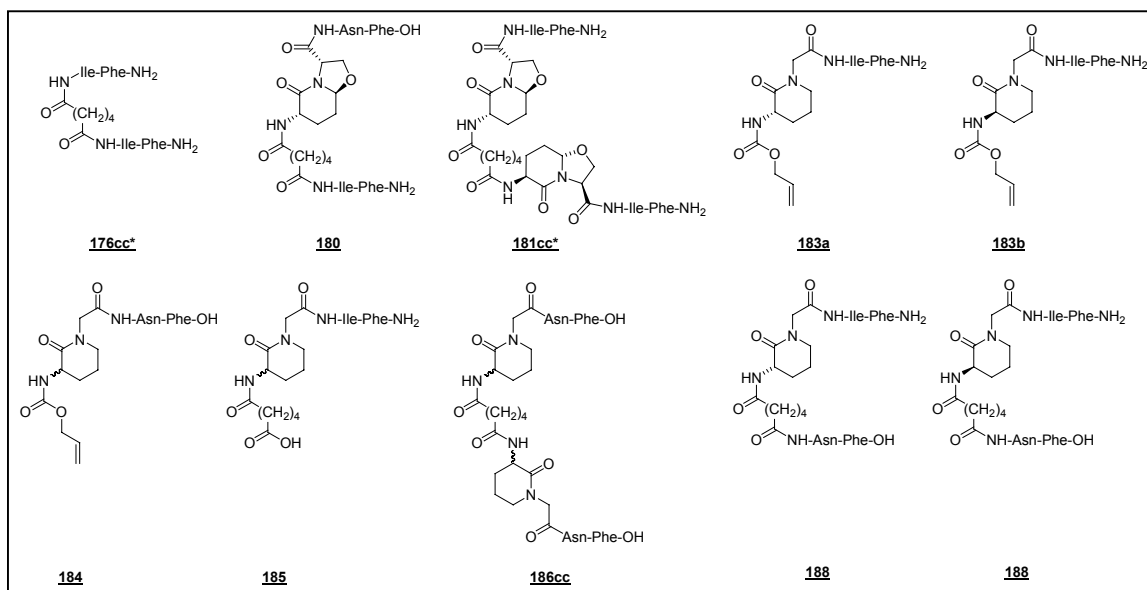


Figura 88: Estructures dels compostos que no presentaren activitat en l'assaig de fluorescència. * Resultats obtinguts amb el fluorímetre de cubetes

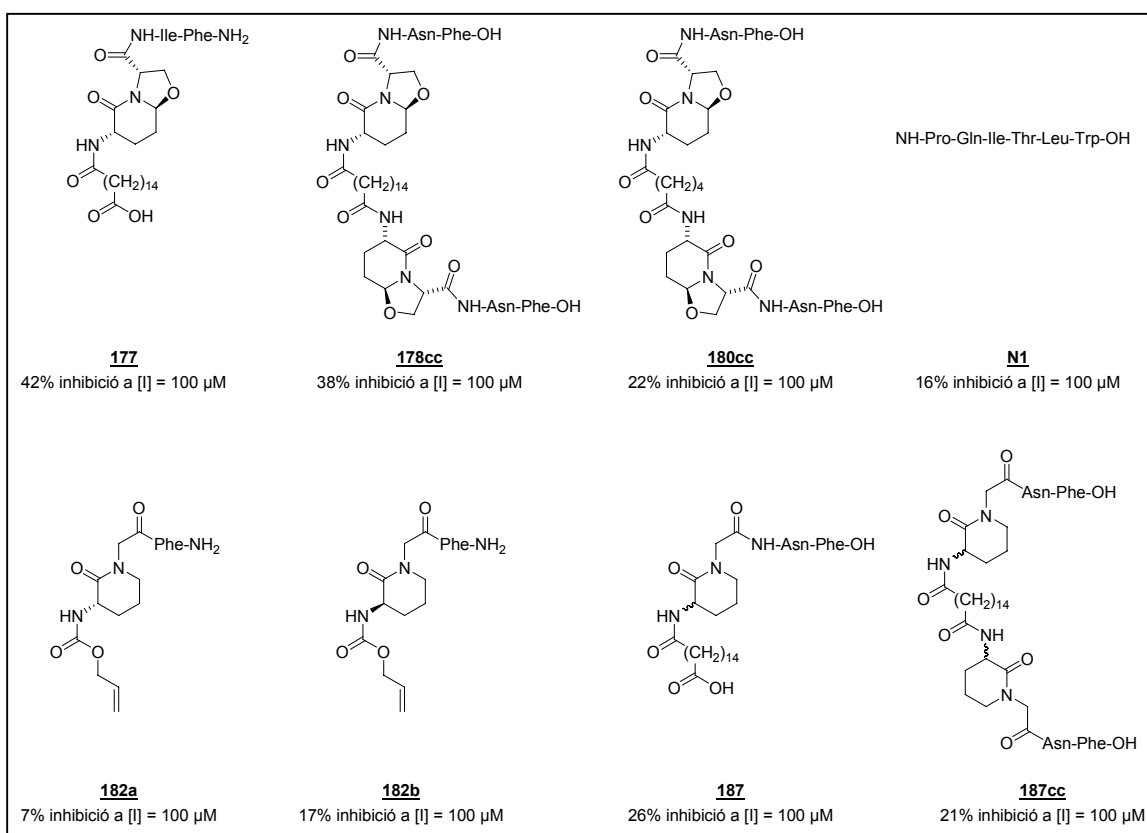


Figura 89: Estructures dels compostos amb baixa activitat

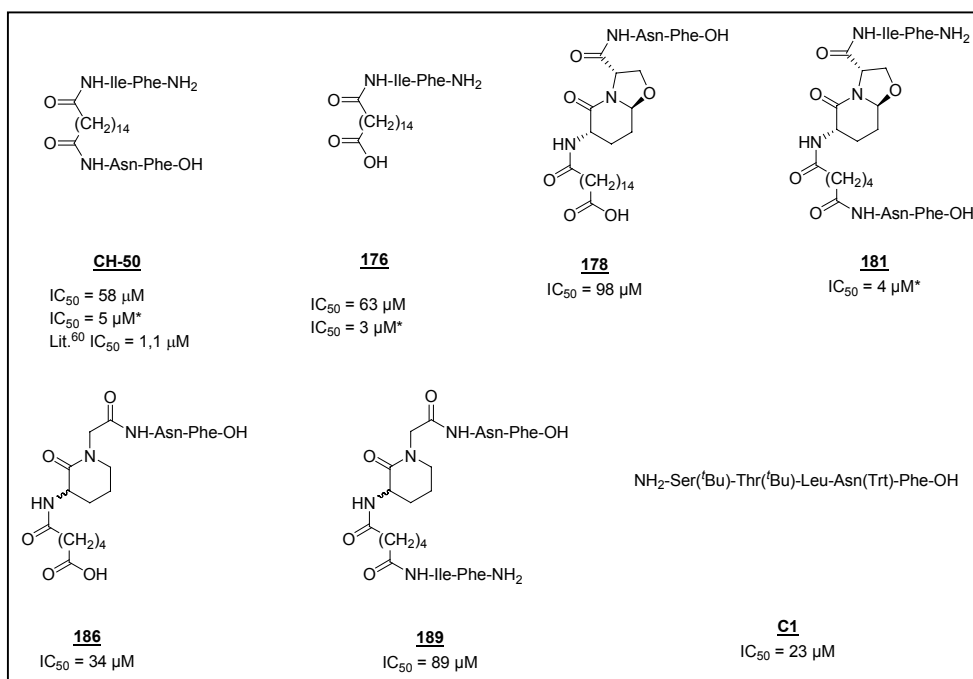


Figura 90: Estructura dels compostos amb activitat moderada i llur IC_{50} . *Resultats obtinguts amb el fluorímetre de cubetes

Si ens fixem en els IC_{50} dels compostos **CH-50** i **176**, dels quals teníem dades obtingudes en assaigs preliminars amb el fluorímetre de cubetes i valors descrits en la literatura, queda clar que la sensibilitat del fluorímetre de plaques no és gaire elevada, la qual cosa ens condueix a pensar que la resta de compostos podrien ser un ordre de magnitud més actius del que mostren els valors obtinguts. El fluorímetre de plaques, tot i presentar menys sensibilitat que el de cubetes, ens permet fer mesures simultànies que garanteixen la uniformitat dels resultats i ens possibilita la comparació dels resultats obtinguts. En canvi, si haguéssim volgut assajar els 25 inhibidors per triplicat i a 3 concentracions diferents amb el fluorímetre de cubetes, hauria estat necessari fer 225 mesures, cosa bastant inviable si tenim en compte que cada mesura dura 30 min., i que la proteasa va perdent activitat amb el temps. També cal tenir en compte, el grau d'error inherent a aquest tipus d'assaig.

Tot i que la fiabilitat del valor absolut dels IC_{50} obtinguts queda qüestionada, els resultats obtinguts ens proporcionen una idea ràpida i aproximada de la potència dels compostos sintetitzats.

D'aquests resultats se'n poden extreure un seguit d'observacions pel que fa a la relació estructura-activitat:

- Els compostos amb el grup amino del lactam protegit en forma d'Al·loc no presenten activitat (**183a**, **183b** i **184**) o presenten una activitat molt baixa (**182a** i **182b**).
- Els compostos simètrics fruit de l'entrecruament (*cross-linking*) presenten activitat nul·la (**176cc**, **181cc** i **186cc**) o baixa (**178cc**, **180cc** i **187cc**). Això està en concordança amb els resultats publicats pel grup de Sicsic, on comparaven inhibidors amb iguals i diferents braços peptídics.⁴⁹

- S'ha comprovat que l'hexapèptid procedent de l'extrem aminoterminal de la proteasa (**N1**) presenta activitat però no gaire elevada.⁴¹
- Curiosament, el pentapèptid derivat de l'extrem carboxiterminal (**C1**) amb els aminoàcids Ser i Thr protegits amb el grup ^tBu i l'aminoàcid Asn protegit amb el grup Trt presenta millor activitat, amb un IC₅₀ de 23 µM.
- En comparar el compost **187** amb el **186**, s'observa com la disminució del nombre de carbonis de l'espaiador de 16 a 6 fa augmentar l'activitat de l'inhibidor
- En comparar el compost **187** amb el **178**, s'observa l'augment de potència inhibidora causada per la substitució del pseudodipèptid amb estructura de valerolactam **82** per l'oxazolopiperidona **80**.
- En canvi, la introducció del pseudodipèptid amb estructura d'oxazolopiperidona **80** en el compost **177** fa disminuir l'activitat en relació amb l'inhibidor **176** format només per aminoàcids naturals.
- La substitució de l'aminoàcid Ile per Asn i la terminació en carboxiamida per carboxiàcid transforma el compost inactiu **185** en el compost **186** amb un IC₅₀ de 34 µM.
- En afegir la cadena sud Asn-Phe-OH al compost **185** per formar els compostos **188** la inactivitat inhibidora es manté. En afegir la cadena Ile-Phe-NH₂ en el compost **186** per formar el compost **189** es manté l'activitat moderada.
- Curiosament, l'intercanvi de cadena nord i sud en els compostos **180** i **181** provoca grans canvis d'activitat, ja que el compost **180** no presenta activitat antiproteasa mentre que el compost **181** presenta un IC₅₀ de 4 µM.
- El compost **176** és el més actiu in vitro, seguit del **181**.

Aquestes relacions estructura-activitat ens proporcionen informació per a la tendència en el disseny de nous inhibidors però també fan palesa la necessitat de conèixer exactament de quina manera actuen aquests inhibidors per tal de poder tenir més eines per a l'enfocament d'aquest disseny.

Coneguda l'activitat dels compostos sintetitzats, es va voler dur a terme l'estudi cinètic descrit per Zhang³⁹ amb els inhibidors més potents, per tal de comprovar que actuaven com a inhibidors de dimerització.

5.2.3 Estudis cinètics de la inhibició dissociativa d'enzims dimèrics

L'any 1991, Zhang *et al.* van publicar per primera vegada la caracterització cinètica per a la inhibició dissociativa d'enzims dimèrics, i en concret per a la HIV-1 PR.³⁹

Quan un enzim dimèric (D) està en equilibri ràpid amb els seus monòmers (M) i reacciona amb el substrat (S), es poden donar diverses situacions en posar-lo en contacte amb un inhibidor (I) (Fig. 91):

- Que l'inhibidor s'uneixi amb el dímer (inhibició competitiva)
- Que l'inhibidor s'uneixi amb el monòmer (inhibició dissociativa o de dimerització)
- Que l'inhibidor s'uneixi amb el complex dímer-substrat (inhibició incompetitiva)

- Que l'inhibidor s'uneixi tant al dímer com al complex dímer-substrat (inhibició no competitiva)

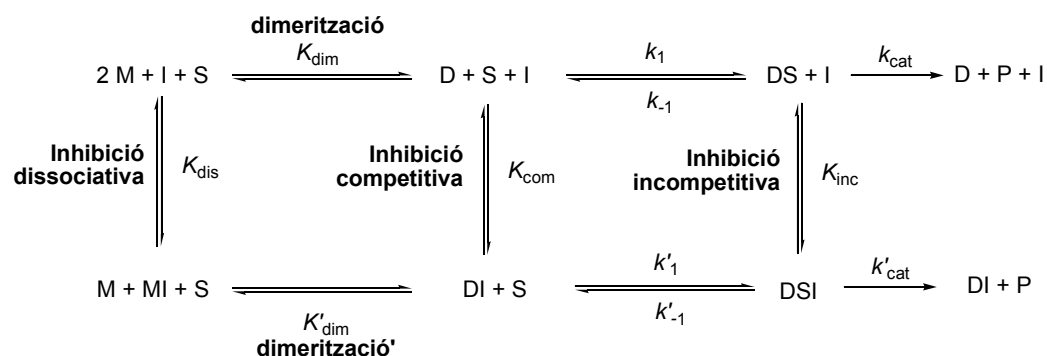


Figura 91: Representació dels equilibris possibles per una inhibició amb un enzim dimèric

En el model cinètic de Zhang s'assumeix que tots els equilibris són més ràpids que l'etapa catalítica i les diferents constants es defineixen com a constants de dissociació:

$$K_{\text{dis}} = [M]^2 / [D]; K_{\text{com}} = [D] \cdot [I] / [DI]; K_{\text{inc}} = [DS] \cdot [I] / [DSI]; K_M = [D] \cdot [S] / [DS] = (k_{-1} + k_{\text{cat}}) / k_1$$

Mitjançant la substitució i eliminació de variables i fent servir les equacions que defineixen les diferents constants i el balanç de matèria de l'enzim (que expressa la concentració inicial de l'enzim com a suma de les concentracions de les diferents espècies dels equilibris, $[E] = [D] + [DS] + [DSI] + [DI] + [M]/2 + [MI]/2$), s'arriba a l'Equació 2, on s'expressa $[E]$ en funció de la velocitat, la $[S]$ i la $[I]$.

$$[E] = \frac{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{\text{com}}}\right) + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{\text{inc}}}\right)}{k_{\text{cat}} + k'_{\text{cat}} \cdot \frac{[I]}{K_{\text{inc}}}} \cdot \frac{v}{[S]} + \frac{\left(\frac{K_{\text{dim}} \cdot K_M}{4}\right)^{1/2} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{\text{dis}}}\right)}{\left(k_{\text{cat}} + \frac{k'_{\text{cat}} \cdot [I]}{K_{\text{inc}}}\right)^{1/2}} \cdot \left(\frac{v}{[S]}\right)^{1/2} \tag{Equació 2}$$

El primer terme de la suma correspon a les inhibicions competitiva (K_{com}) i incompetitiva (K_{inc}) clàssiques que segueixen la cinètica de Michaelis-Menten, mentre que el segon terme de la suma reflecteix la dissociació de l'enzim dimèric en dos monòmers inactius (K_{dim}) i la inhibició dissociativa (K_{dis}).

Pel cas de l'assaig de fluorescència descrit anteriorment per a la HIV-1 PR (on $[S] \lll K_M$), s'ha comprovat que la reacció obeeix una cinètica de primer ordre, amb una constant de velocitat experimental k_{exp} . La condició de primer ordre implica que $[DS]$ i $[DSI]$ són negligibles respecte a les altres formes d'enzim. Això es tradueix en una simplificació del balanç de matèria ($[E] = [D] + [DI] + [M]/2 + [MI]/2$) i de l'Equació 2, ja que el terme $[S] \cdot (1 + [I]/K_{\text{inc}})$ és negligible enfront del terme $K_M \cdot (1 + [I]/K_{\text{com}})$. Si a més a més, tenim en compte la relació $v/[S] = k_{\text{exp}}$, podem reescriure l'Equació 2 de la següent manera (Equació 3):

$$\frac{[E]}{k_{exp}^{1/2}} = \frac{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{com}}\right)}{k_{cat} + k'_{cat} \cdot \frac{[I]}{K_{inc}}} \cdot k_{exp}^{1/2} + \frac{\left(\frac{K_{dim} \cdot K_M}{4}\right)^{1/2} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{dis}}\right)}{\left(k_{cat} + \frac{k'_{cat} \cdot [I]}{K_{inc}}\right)^{1/2}} \quad [\text{Equació 3}]$$

En absència d'inhibidor, aquesta equació queda reduïda a:

$$\frac{[E]}{k_{exp}^{1/2}} = \frac{K_M}{k_{cat}} \cdot k_{exp}^{1/2} + \left(\frac{K_{dim} \cdot K_M}{4 \cdot k_{cat}}\right)^{1/2} \quad [\text{Equació 4}]$$

En primer lloc, Zhang *et al.* determinaren la k_{exp} per a la hidròlisi d'un substrat fluorogènic per part de la proteasa del VIH-1, a diferents concentracions d'enzim en absència d'inhibidor i representaren $[E]/k_{exp}^{1/2}$ respecte k_{exp} , obtenint una recta de pendent K_M/k_{cat} (Fig. 92). D'aquest experiment se'n pogué deduir la K_{dim} .

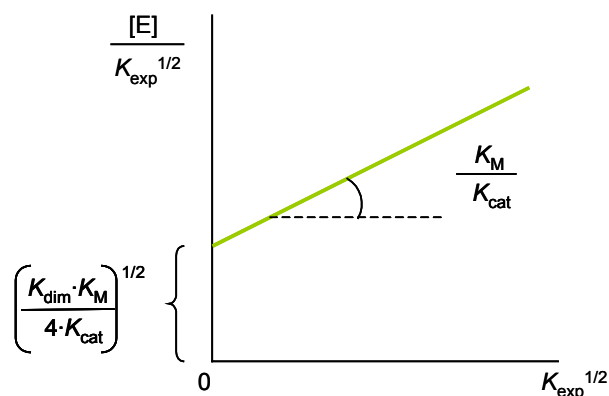


Figura 92: Determinació de la K_{dim} en absència d'inhibidor

A continuació, repetiren l'experiment però afegint-hi una concentració constant d'inhibidor $[I]$ i variant les concentracions d'enzim. En la representació d'aquesta nova recta, s'observà que presentava el mateix pendent que l'anterior, és a dir, es tractava de línies paral·leles (Fig. 93) i per tant se'n deduí que:

$$\frac{K_M}{k_{cat}} \sim \frac{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{com}}\right)}{k_{cat} + k'_{cat} \cdot \frac{[I]}{K_{inc}}} \quad [\text{Equació 5}]$$

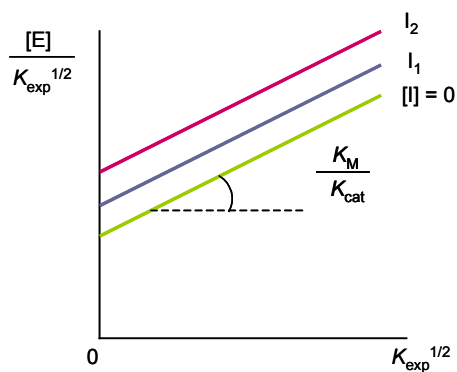


Figura 93: Determinació de la K_{dis} per un inhibidor de dimerització

Això fa palès que K_{com} té un valor molt gran en relació amb K_M i que k'_{cat}/K_{inc} és negligible, la qual cosa indica que no es produeix cap inhibició competitiva ni incompetitiva. Així doncs, per inhibidors de dimerització l'Equació 3 es podria simplificar de la manera següent:

$$\frac{[E]}{k_{exp}^{1/2}} = \frac{K_M}{k_{cat}} \cdot k_{exp}^{1/2} + \left(\frac{K_{dim} \cdot K_M}{4 \cdot k_{cat}} \right)^{1/2} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{dis}} \right) \quad \text{[Equació 6]}$$

A través de la intersecció amb l'eix d'ordenades es pot calcular la constant d'inhibició dissociativa o de dimerització (K_{dis}).

Aquesta expressió també és vàlida si en lloc d'utilitzar la k_{exp} , es prefereixen utilitzar les velocitats inicials (v_i), fent les mesures cinètiques durant els primers minuts de reacció, on es manté la linealitat. Si es té en compte la relació $v_i = k_{exp} \cdot [S]$, l'equació es transforma en:

$$\frac{[E]}{v_i^{1/2}} = \frac{K_M}{k_{cat} \cdot [S]} \cdot v_i^{1/2} + \left(\frac{K_{dim} \cdot K_M}{4 \cdot [S] \cdot k_{cat}} \right)^{1/2} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{dis}} \right) \quad \text{[Equació 7]}$$

D'aquesta manera, mitjançant la representació gràfica de $[E]/v_i^{1/2}$ respecte $v_i^{1/2}$ amb una concentració d'inhibidor constant, l'obtenció de línies paral·leles en absència i presència d'inhibidor permet reconèixer ràpidament que es tracta d'una inhibició de dimerització.

Els equilibris presentats anteriorment, en aquest cas, es redueixen als que es mostren a la Figura 94.

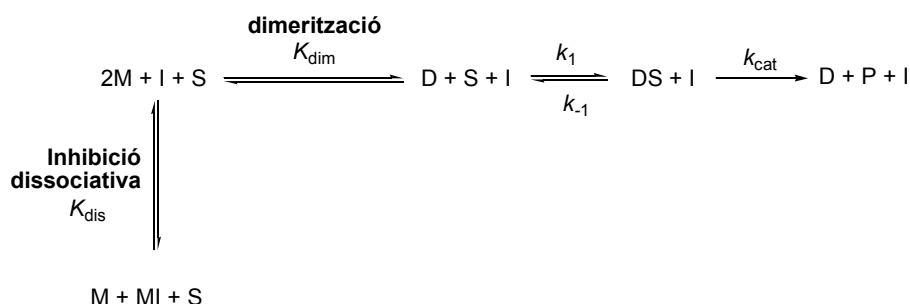


Figura 94: Representació dels equilibris possibles per una inhibició dissociativa

Si es tracta d'un inhibidor competitiu, l'Equació 3 continua sent vàlida. Tanmateix, en aquest cas, la representació gràfica mostra rectes de diferent pendent però amb la mateixa ordenada en l'origen, ja que ara la K_{com} no és negligible, però la K_{dis} sí que es pot despreciar (Fig. 95).

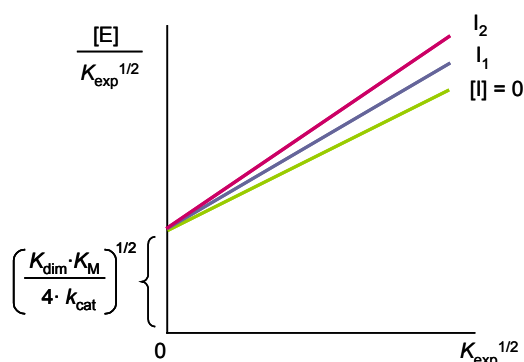


Figura 95: Determinació de la K_{com} per un inhibidor competitiu

En aquest cas l'Equació 3 se simplificaria de la manera següent:

$$\frac{[E]}{k_{\text{exp}}^{1/2}} = \frac{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{\text{com}}}\right)}{k_{\text{cat}}} \cdot k_{\text{exp}}^{1/2} + \left(\frac{K_{\text{dim}} \cdot K_M}{4 \cdot k_{\text{cat}}}\right)^{1/2} \quad \text{[Equació 8]}$$

També es pot donar la situació que es tracti d'un inhibidor mixt, és a dir d'un compost que actui simultàniament com a inhibidor competitiu i dissociatiu. En aquest cas, la representació gràfica que s'obté és una mescla de les dues anteriors, on les rectes difereixen tant en el pendent com en l'ordenada en l'origen.

Resultats obtinguts

Es va decidir comprovar el tipus d'inhibició per 3 dels compostos que havien mostrat millor IC_{50} : **CH-50**, **176** i **181**. Com que el compost **CH-50** ja havia estat descrit per Chmielewski⁶⁰ com a inhibidor de dimerització, es va fer servir de referència i per comprovar que amb l'assaig de

Matayoshi s'obtenien els mateixos resultats que amb l'assaig de Toth i Marshall,¹⁸⁸ utilitzat per Chmielewski.

Amb aquesta intenció es va mesurar la fluorescència a diferents concentracions de HIV-1 PR (90 nM, 150 nM, 275 nM i 330 nM) i a una concentració fixa d'inhibidor (0 μ M, 3 μ M o 6 μ M) durant els 2 min inicials de la reacció. Per a cada concentració d'inhibidor es varen representar les diferents rectes obtingudes i del pendent d'aquestes rectes, se'n dedueïren les velocitats inicials.

En la Figura 96, es pot observar una mostra de les rectes obtingudes en el cas de l'inhibidor **181** a una concentració de 3 μ M i a diverses concentracions de la HIV-1 PR.

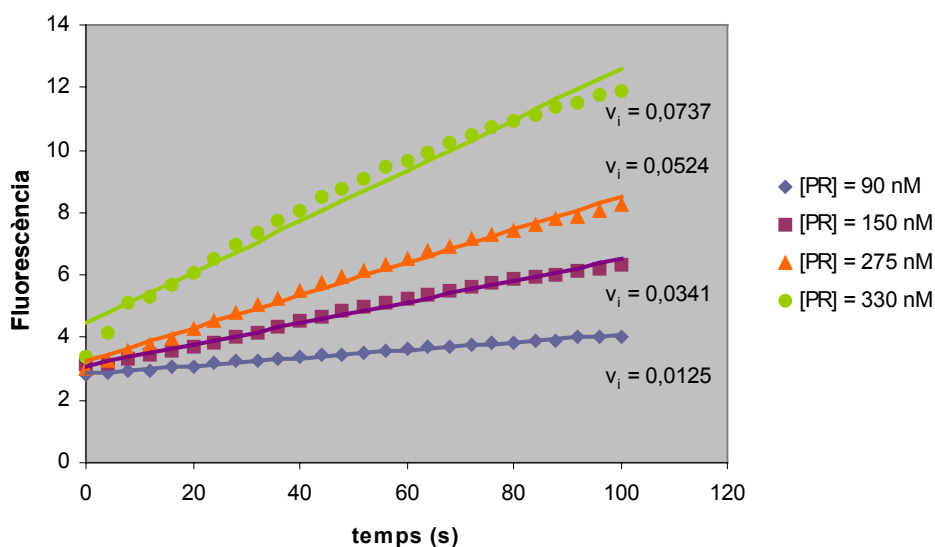


Figura 96: Obtenció de les velocitats inicials a partir del pendent de les rectes de fluorescència respecte el temps a diferents concentracions d'enzim per l'inhibidor **181**

Un cop obtingudes les velocitats inicials, es representà $[E]/v^{1/2}$ respecte $v^{1/2}$ per a la reacció en absència i en presència d'inhibidor. En els tres casos estudiats, **CH-50**, **176** i **181**, s'obtingueren rectes paral·leles tal i com es mostra a la Figura 96, la qual cosa és indicativa d'una inhibició dissociativa.

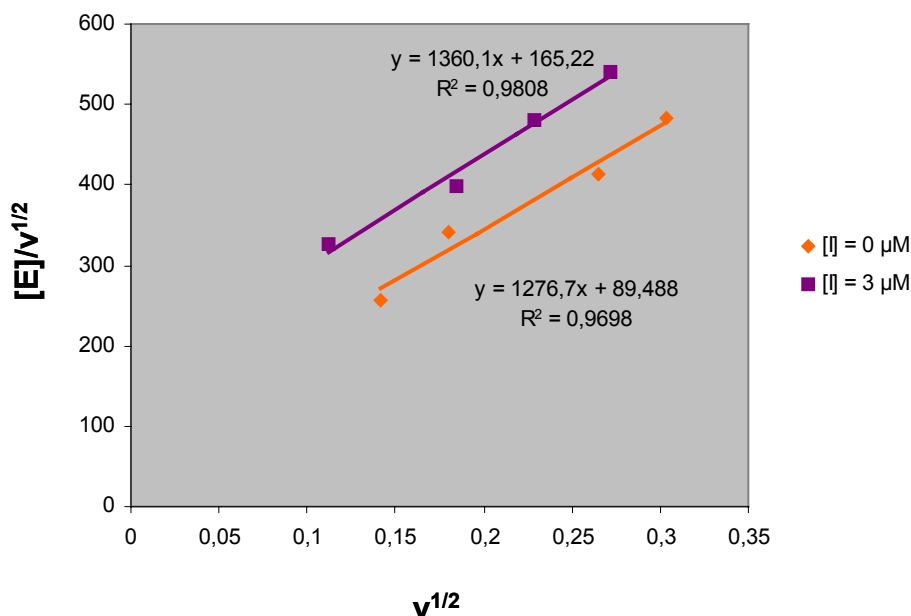


Figura 97: Representació de $[E]/v^{1/2}$ respecte $v^{1/2}$ pel compost **191** i obtenció de rectes paral·leles, indicatives d'una inhibició dissociativa

D'aquesta manera queda demostrat que la introducció del pseudodipèptid amb estructura d'oxazolopiperidona, disminuint així el caràcter peptídic de l'inhibidor i fent-lo menys susceptible a la degradació de proteases *in vivo*, no afecta el mode d'inhibició.

Així doncs, es van identificar 7 inhibidors d'activitat moderada que poden servir de punt de partida per al desenvolupament de nous compostos amb una activitat millorada. El coneixement precís del seu mode d'acció és clau per a un desenvolupament racional de nous inhibidors de dimerització.

En vista dels resultats obtinguts, es feu palesa la necessitat d'assajar aquests compostos *in vivo*, per tal d'observar-ne la seva activitat directament sobre el virus. Aquesta part del treball es troba descrita en el següent apartat d'aquest capítol (Apartat 5.3) i es va fer en col·laboració amb el grup del Dr. Esté de l'Hospital Germans Trias i Pujol.

Queda pendent fer un càlcul comparatiu de modelització molecular dels compostos actius (obtinguts i descrits en la literatura) per tal de poder observar si existeix un patró estructural comú i d'aquí deduir l'estructura del farmacòfor. Amb aquest model, disposarem de dades per poder fer un disseny millorat de nous inhibidors de la proteasa del VIH-1.

5.3 ASSAIGS *IN VIVO*

Amb la intenció de veure l'activitat dels inhibidors sintetitzats no només sobre la proteasa del VIH-1 sinó directament sobre cèl·lules infectades amb el virus de la immunodeficiència humana, es van dur a terme els assaigs biològics que es descriuen en aquest Capítol en col·laboració amb el grup del Prof. Esté de l'Hospital Germans Trias i Pujol. Cal remarcar el fet que fins al moment de redacció de la present Tesi Doctoral no es trobaven precedents a la literatura d'assaigs d'inhibidors de dimerització directament sobre el virus, però recentment el grup de Davis ha publicat un article on també es descriuen assaigs de proliferació cel·lular amb inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1.¹⁷⁰

5.3.1 Avaluació sobre el virus “*wild type*”

En primer lloc, es va avaluar l'activitat anti-VIH en un cultiu cel·lular contra una soca de VIH “*wild type*” (VIH-1 NL4-3), fent servir com a detecció el mètode MTT.¹⁷¹ Aquest mètode colorimètric de proliferació cel·lular es basa en la capacitat de la deshidrogenasa mitocondrial present en les cèl·lules vives per reduir els anells de tetrazoli del MTT (bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli) i formar cristalls de formazà de color blau fort (Fig. 98).

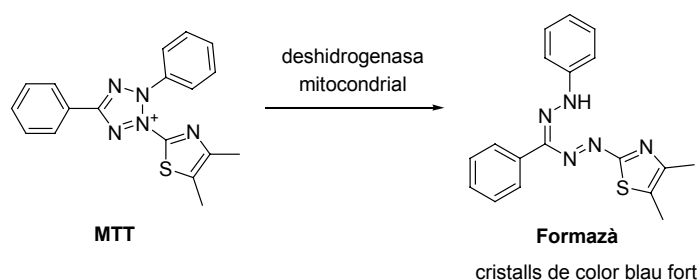


Figura 98: Reacció de reducció del MTT per mitjà de la deshidrogenasa mitocondrial

Aquest compost és impermeable a la membrana cel·lular, i per tant s'acumula dins les cèl·lules. L'addició posterior d'un detergent provoca l'alliberació d'aquests cristalls i la conseqüent solubilització. Donat que el nombre de cèl·lules supervivents és directament proporcional al nivell de formazà creat, la mesura del color en un espectrofotòmetre ($\lambda = 570$ nm) ens permet quantificar i avaluar l'efecte dels inhibidors en cèl·lules infectades amb el virus del VIH-1.

Paral·lelament, també es va dur a terme un estudi de la citotoxicitat dels inhibidors, per tal observar la toxicitat d'aquests compostos en cèl·lules sense la presència del virus.

Tots aquests experiments van ser duts a terme per Imma Clotet del grup del Prof. Esté de l'Hospital Germans Trias i Pujol i els resultats obtinguts es resumeixen en la Taula 12.

¹⁷⁰ 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.

¹⁷¹a) Mosmann, T.; *J. Immunol. Methods*, **1983**, *65*, 55-63. b) Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, R.; Schols, D.; Herdewijn, P.; Desmyter, J.; De Clercq, E.; *J. Virol. Methods*, **1988**, *20*, 309-321.

Els valors obtinguts es troben expressats en forma de:

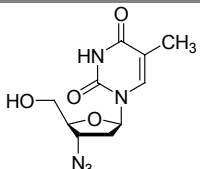
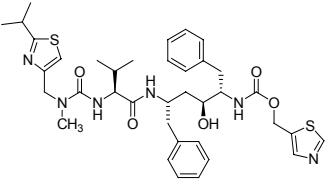
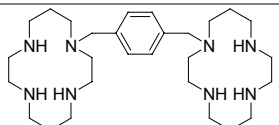
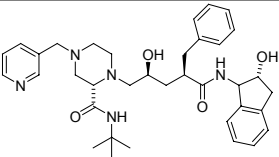
- **concentració efectiva al 50% (EC₅₀):** la concentració necessària per inhibir en un 50% la mort de les cèl·lules limfoides MT-4 infectades amb el VIH-1
- **concentració citotòxica al 50% (CC₅₀):** la concentració necessària per induir la mort cel·lular en el 50% de les cèl·lules limfoides MT-4 no infectades

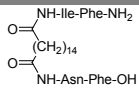
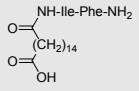
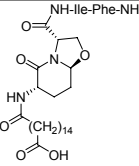
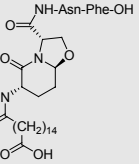
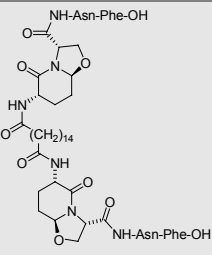
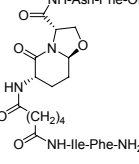
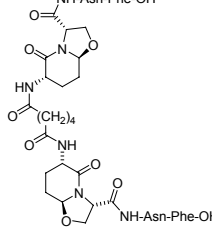
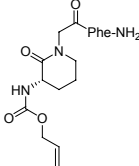
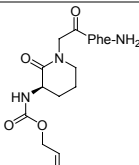
En aquest assaig s'utilitzaren com a control: un inhibidor comercial de la transcriptasa inversa (AZT), un inhibidor comercial de la proteasa (ritonavir) i un inhibidor d'entrada en fase clínica (AMD3100, antagonista del receptor CXCR4).

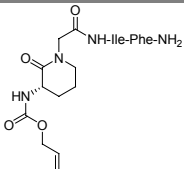
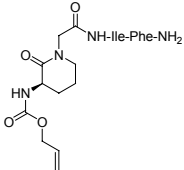
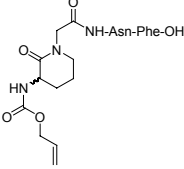
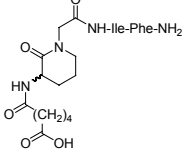
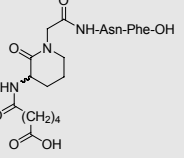
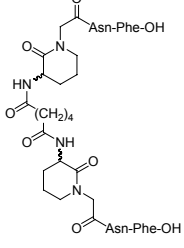
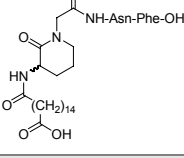
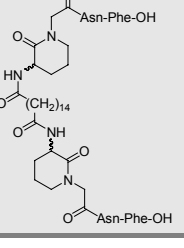
Tal i com s'observa a la Taula 12, 7 dels 22 inhibidors assajats mostren algun tipus d'activitat, tot i que les EC₅₀ són moderades i significativament majors a les dels inhibidors comercials. La resta de compostos no presenten cap activitat anti-VIH-1 a [I] ≤ 125 µg/ml. Cinc d'aquests compostos que presenten activitat coincideixen amb els que resultaren actius en els assaigs de fluorescència (**CH-50**, **176**, **178**, **186** i **189**).

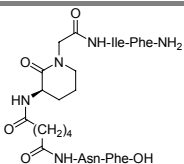
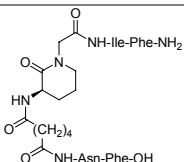
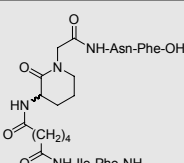
Un altre fet destacable que es fa palès amb aquest estudi és que aquest tipus de molècules no presenten toxicitat a [I] ≤ 125 µg/ml, a excepció del compost **C1** que té un CC₅₀ de 68,7 µg/ml.

Per tal de corroborar aquestes dades, es va realitzar una segona avaluació dels inhibidors que havien mostrat activitat en l'assaig anterior (Mesura 2, Taula 12).

Codi	Estructura	M.W. (g/mol)	EC ₅₀ (virus <i>wild type</i>) (µg/ml)		EC ₅₀ µM	CC ₅₀ (µg/ml)
			Mesura 1	Mesura 2		
AZT		276,24	0,0004	0,0002	1,09 nM	> 1
Ritonavir		720,94	0,016	0,052	47,16 nM	> 1
AMD3100		502,78	0,001	0,001	2,00 nM	> 5
Indinavir		613,79	-	0,005	8,15 nM	> 1,2

Codi	Estructura	M.W. (g/mol)	EC ₅₀ (virus wild type) (µg/ml)		EC ₅₀ µM	CC ₅₀ (µg/ml)
			Mesura 1	Mesura 2		
CH-50		806,05	33%	-	-	> 125
176		573,76	54,4	57,1	97,17	> 125
177		727,93	> 125	-	-	> 125
178		729,86	49%	> 125	-	> 125
178cc		1173,31	46%	47%	-	> 125
180		848,94	> 125	-	-	> 125
180cc		1033,05	> 125	-	-	> 125
182a		402,44	> 125	-	-	> 125
182b		402,44	> 125	-	-	> 125

Codi	Estructura	M.W. (g/mol)	EC ₅₀ (virus <i>wild type</i>) (µg/ml)		EC ₅₀ µM	CC ₅₀ (µg/ml)
			Mesura 1	Mesura 2		
183a		515,60	> 125	-	-	> 125
183b		515,60	> 125	-	-	> 125
184		517,53	> 125	-	-	> 125
185		559,32	> 125	-	-	> 125
186		561,58	1,17	2,16	2,96	> 125
186cc		977,03	> 125	-	-	> 125
187		701,85	> 125	-	-	> 125
187cc		1117,29	73,1	121,4	87,04	> 125

Codi	Estructura	M.W. (g/mol)	EC ₅₀ (virus <i>wild type</i>) (µg/ml)		EC ₅₀ µM	CC ₅₀ (µg/ml)
			Mesura 1	Mesura 2		
188a		819,94	> 125	-	-	> 125
188b		819,94	> 125	-	-	> 125
189		820,93	1,95	1,71	2,23	> 125
N1	NH-PQITLW-OH	756,89	> 125	-	-	> 125
C1	NH ₂ -S(^t Bu)T(^t Bu)LN(Trt)F-OH	935,16	> 125	-	-	68,7

Taula 12: Resultats de l'activitat antiviral i de la citotoxicitat dels inhibidors sintetitzats ([I] = 125 µg/ml)

Tal i com es pot observar, els inhibidors que presenten una millor activitat envers el virus *wild type* són els compostos **186** i **189**, amb una EC₅₀ entre 2,96 i 2,23 µM respectivament. L'estructura d'aquests inhibidors coincideix en el fet de tenir incorporat l'anell de 3-aminolactam, de tenir el dipèptid Asn-Phe-COOH en la cadena nord i de tenir un espaiador de 6C de llargada. Els dos compostos difereixen en el fet que el **189** porta incorporada una cadena sud amb el dipèptid Ile-Phe-CONH₂, mentre que el **186** acaba amb el grup carboxílic de l'espaiador. En tots dos casos, es tracta de mesclades diastereomèriques.

La importància del residu d'Asn de la cadena nord queda palesa si comparem l'activitat del compost **185** amb la del **186**. Mentre el primer, on l'Asn és substituïda per una Ile, no mostra senyals d'inhibició a [I] ≤ 125 µg/ml, el segon presenta una EC₅₀ de 2,96 µM. És de suposar que la major polaritat del residu d'Asn s'adeqüi millor en el lloc d'interacció amb la HIV-1 PR que el residu hidrofòbic de Ile.

També es pot observar la importància de la llargada de l'espaiador si comparem l'activitat del compost **186** (que amb un espaiador de 6C presenta una EC₅₀ de 2,96 µM), amb la del compost **187**, que té un espaiador de 16C de llargada i no presenta activitat a [I] ≤ 125 µg/ml.

Curiosament, el producte de *cross-coupling* **186cc** (amb un espaiador de C6) no presenta activitat, mentre que el producte de *cross-coupling* **187cc** (amb un espaiador de C16) presenta un EC₅₀ de 73,1 µM. A més a més, els compostos **188a** i **188b**, que tenen la cadena nord i sud

intercanviades respecte el compost **189** tampoc presenten activitat en les condicions de l'assaig.

En general, s'observa que els inhibidors amb l'estructura d'oxazolopiperidona incorporada presenten activitats significativament menors a les que incorporen l'estructura de 3-aminolactam i que els compostos que contenen un grup amino terminal protegit en forma d'Al-loc no presenten activitat a $[I] \leq 125 \mu\text{g/ml}$.

Finalment, també s'observa que els inhibidors constituïts només per aminoàcids naturals presenten activitat, sent **176** amb l'àcid carboxílic lliure més actiu que el compost desenvolupat per Chmielewski⁶⁰ **CH-50**, que incorpora la cadena sud Asn-Phe-OH. Tanmateix, ambdós compostos presenten activitats significativament menors que les dels compostos **186** i **189**.

5.3.2 Avaluació sobre el virus resistent a inhibidors comercials

Els inhibidors que havien mostrat millor activitat en l'assaig sobre el virus *wild type*, es van avaluar sobre un virus resistent als inhibidors de proteasa comercials, per tal d'observar si mantenien l'activitat inhibidòria en virus mutants.

La proteasa d'aquest virus resistent IRL98 Δ PRO, extret d'un pacient de l'Hospital Germans Trias i Pujol,¹⁷² conté 10 mutacions d'aminoàcids: L10I (interfase de dimerització), E35D, N37D, G48V i I54V (*flap*), L63P, A71V, V82A (centre actiu), L90M i I93L (interfase de dimerització) (Fig. 100).

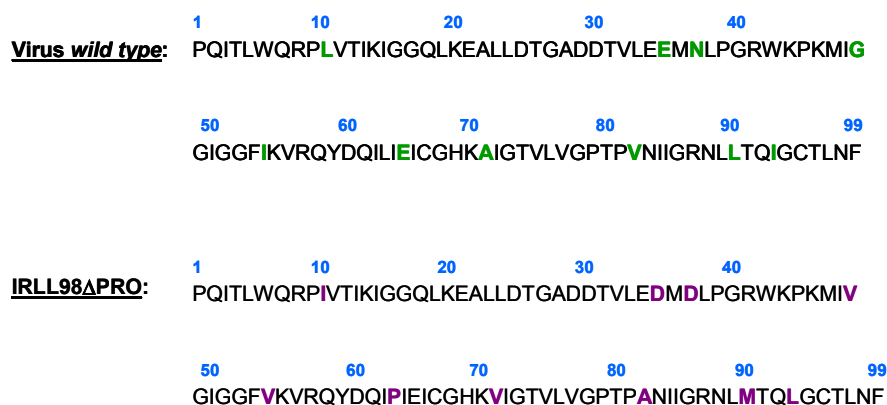


Figura 100: Comparació de les seqüències d'aminoàcids de la proteasa del virus *wild type* i del virus resistent IRL98 Δ PRO

En molts casos, les mutacions causades per la resistència als fàrmacs, alteren la geometria del lloc d'unió, sense canviar-ne el caràcter químic (polaritat o hidrofobicitat). D'aquesta manera, els inhibidors conformacionalment restringits no es poden adaptar a aquests canvis i

¹⁷² Martínez, M.A.; Cabana, M.; Parera, M.; Gutierrez, A.; Esté, J.A.; Clotet, B.; *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, *44*, 1132-1139.

disminueixen les interaccions estabilitzants com les de van der Waals. En canvi, el substrat, en tractar-se d'un pèptid, presenta una elevada flexibilitat i una millor capacitat d'adaptació a la distorsió del lloc actiu, i la seva afinitat no es veu tan afectada.

Els resultats obtinguts de l'avaluació amb el virus resistent es mostren a la Taula 13.

Estructura	EC ₅₀ (IRLL98ΔPRO) (µg/ml)	Factor de resistència	Estructura	EC ₅₀ (IRLL98ΔPRO) (µg/ml)	Factor de resistència*
 AZT	0,0008 (2.90 nM)	4	 AMD3100	0,004 (8.00 nM)	4
 Ritonavir	> 1	19	 Indinavir	0,52 (0.85 µM)	104
 176	75,6 (1.32 µM)	1,36	 186	> 125 (> 58)	-
 178	> 125	-	 187cc	> 125	-
 178cc	> 125	-	 189	> 125 (> 73)	-

Taula 13: Resultats de l'avaluació amb el virus resistent IRLL98ΔPRO. Factor resistència = EC₅₀ mutant / EC₅₀ wild type

El terme **factor de resistència** correspon al quocient entre EC_{50} virus mutant / EC_{50} virus *wild type*. Per tant, un elevat factor de resistència és indicatiu de la pèrdua d'activitat degut al virus mutant, mentre que un factor de resistència proper a 1 indica que un inhibidor produeix la mateixa activitat envers el virus *wild type* i el virus mutat.

Pel que fa als inhibidors comercials, com era d'esperar s'observà que l'activitat antiviral de l'inhibidor de la transcriptasa inversa (AZT) i de l'inhibidor d'entrada al virus (AMD3100) no es veia alterada per les mutacions en la seqüència d'aminoàcids de la proteasa. Contràriament, s'observà una disminució en l'activitat dels inhibidors del centre actiu de la proteasa ritonavir i indinavir.

Dels resultats obtinguts, cal destacar que el compost **176** pràcticament presenta la mateixa activitat observada en el virus *wild type* que en el virus resistent i que té un millor factor de resistència que els patrons comercials assajats. Una altra de les aventatges que presenta aquest compost és la seva baixa toxicitat ($CC_{50} > 125 \mu\text{g/ml}$). Tot i que l' EC_{50} observada (al voltant de $100 \mu\text{M}$) és elevada per considerar aquest compost com a un inhibidor potent, es tracta d'un bon cap de sèrie per dur a terme modificacions i estudis d'estructura-activitat de nous inhibidors de la HIV-1 PR, per fer front al greu problema de la resistència als fàrmacs comercials.

5.4 ESTUDIS DE MICROCALORIMETRIA

Per tal que un compost cap de sèrie arribi a ser un bon candidat a fàrmac, a part de complir uns criteris de biodisponibilitat, farmacocinètica i toxicitat, cal que l'afinitat d'unió del fàrmac amb la diana terapèutica sigui elevada i que, a la vegada, mostri una gran selectivitat. El desenvolupament d'estratègies que permetin el disseny de fàrmacs d'elevada afinitat requereix un control sobre les forces que maximitzen l'afinitat sobre la diana desitjada i minimitzen l'afinitat envers altres proteïnes.

Amb aquesta finalitat, es va decidir dur a terme un estudi calorimètric per estudiar l'afinitat d'unió dels inhibidors més actius (segons les dades dels estudis *in vitro* i *in vivo*) amb la proteasa del VIH-1, mitjançant una valoració calorimètrica isotèrmica (ITC, *isothermal titration calorimetry*). A causa dels problemes de solubilitat dels inhibidors escollits en el tampó de l'assaig, finalment l'estudi es va realitzar únicament amb l'inhibidor que havia mostrat més potencial com a cap de sèrie (**176**) i que presentava millor solubilitat.

5.4.1 Valoració calorimètrica isotèrmica (ITC)

La microcalorimetria va començar a guanyar importància a principis dels 90 quan, gràcies a avenços tecnològics i metodològics, es feu possible la mesura precisa de petits canvis de calor associats a la interacció no-covalent entre molècules biològiques.¹⁷³ Des de llavors, aquesta tècnica ha estat àmpliament utilitzada en l'estudi de processos de reconeixement molecular.¹⁷⁴ La microcalorimetria mesura directament la calor associada a un determinat procés, la qual, en cas de pressió constant, equival al canvi d'entalpia (ΔH) d'aquest procés. Mitjançant una valoració calorimètrica isotèrmica (ITC) es pot estudiar la calor que es desprèn o s'absorbeix en un procés de reconeixement lligand-proteïna.

L'instrument està format fonamentalment per dues cel·les: una de referència amb només dissolució tampó i una cel·la de mostra que conté la proteïna dissolta en la mateixa dissolució tampó. Entre aquestes dues cel·les, es manté constant una lleugera diferència de temperatura mitjançant l'aplicació d'un corrent constant a la cel·la de referència i un corrent variable de compensació (*feedback*) a la cel·la de treball.

¹⁷³ a) McKinnon, I.R.; Fall, L.; Parody-Morreale, A.; Gill, S.J.; *Anal. Biochem.*, **1984**, *139*, 134-139. b) Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J.F.; Lin, L.N.; *Anal. Biochem.*, **1989**, *179*, 131-137. c) Freire, E.; Mayorga, O.L.; Straume, M.; *Anal. Chem.*, **1990**, *62*, 950A-959A. d) El Harrous, M.; Gill, S.J.; Parody-Morreale, A.; *Meas. Sci. Technol.*, **1994**, *5*, 1065-1077.

¹⁷⁴ a) Cliff, M.J.; Gutierrez, A.; Ladbury, J.E.; *J. Mol. Recognit.*, **2004**, *17*, 513-523. b) Ward, W.H.; Holdgate, G.A.; *Prog. Med. Chem.*, **2001**, *38*, 309-376.

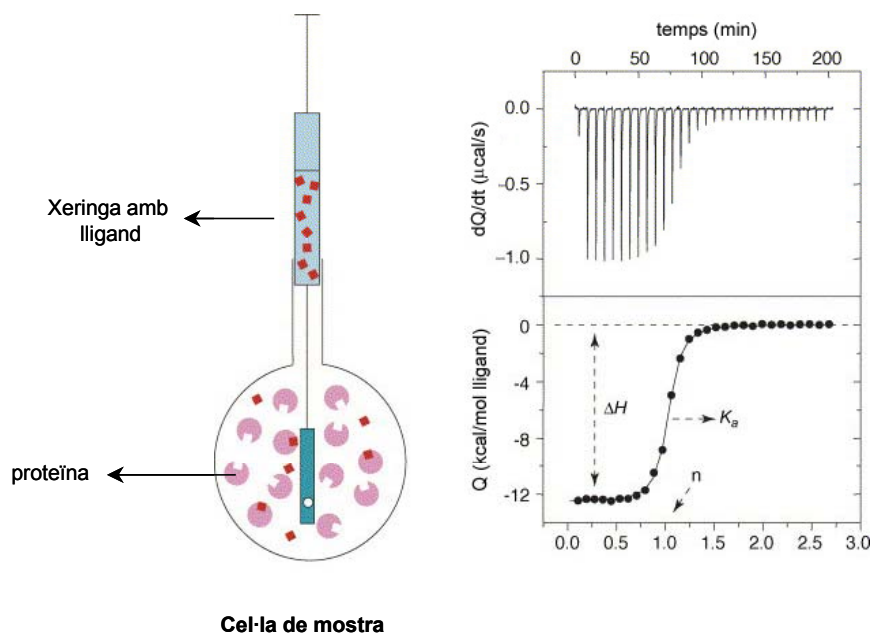


Figura 101: Representació esquemàtica del procés de reconeixement lligand-proteïna que té lloc a la cel·la de mostra i exemple de les dades obtingudes per ITC

L'experiment consisteix en l'addició gradual de petites quantitats de lligand per mitjà d'una xeringa sobre una cel·la que conté la proteïna dissolta en solució tampó. L'addició del lligand comporta una variació de temperatura en la cel·la, variació que és detectada pel calorímetre. Automàticament, l'aparell ajusta el corrent de compensació de la cel·la de mostra per tal que segueixi mantenint la mateixa diferència de temperatura respecte la cel·la de referència.

L'instrument enregistra contínuament aquest corrent de compensació, de manera que de la integració de les seves fluctuacions se n'obté la calor després o absorbida en el procés de reconeixement. Al final de l'experiment s'arriba a la saturació de la proteïna, que es caracteritza per l'observació de senyals molt petits propers a 0. Aplicant regressions no lineals i fent servir el model apropiat pel tractament de dades, l'instrument ens proporciona els valors de la constant d'afinitat, l'entalpia d'unió i l'estequiometria, i a partir d'aquestes dades se n'extreu l'entropia d'unió i l'energia lliure de Gibbs del procés.

La valoració calorimètrica isotèrmica és una tècnica experimental que permet discernir el component entàlpic i el component entròpic de l'energia d'unió, cosa que ha fet que hagi esdevingut ràpidament una tecnologia clau en l'optimització de fàrmacs.¹⁷⁵

El fonament de la tècnica i les principals equacions involucrades es troben descrites al final del Capítol en forma d'Annex.

¹⁷⁵ a) Freire, E.; *Drug Discovery Today*, **2004**, *1*, 295-299. b) Velázquez-Campoy, A.; Freire, E.; *Biophys. Chem.*; **2005**, *115*, 115-124.

5.4.2 Experiments realitzats

a) Determinació de la calor d'interacció inhibidor-proteasa

Amb l'objectiu de minimitzar l'error de mesura provocat per la calor de mescla, cal que tant la solució de la proteïna com el lligand estiguin dissoltes en el mateix dissolvent. Com que la proteïna procedent es trobava dissolta en el tampó emprat pel replegament (10 mM NaOAc, 30 mM NaCl, 1 mM DTT), es va dissoldre el compost **176** en el mateix tampó. Es va afegir un 5% de DMSO tant a la solució de proteïna com a la de l'inhibidor amb l'objectiu d'augmentar-ne la solubilitat en el tampó aquós. S'addicionaren periòdicament cada 3 min volums de 10 μ l de la solució d'inhibidor ($[I] = 400 \mu\text{M}$) sobre la solució de HIV-1 PR ($[\text{HIV-1 PR}] = 20 \mu\text{M}$) i s'enregistrà la calor despresa (Fig. 102).

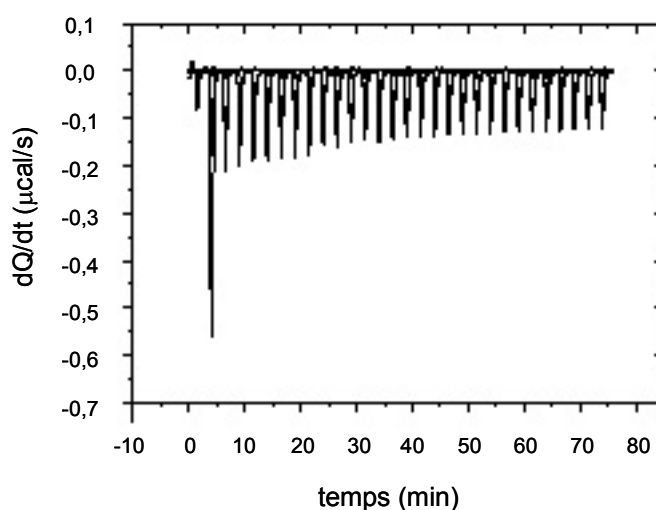


Figura 102: Termograma obtingut en la valoració de l'inhibidor **176** sobre la HIV-1 PR

Tal i com es pot observar en les Figura 102, el procés de reconeixement entre el compost **176** i la HIV-1 PR és de caràcter exotèrmic.

b) Determinació de la calor de dilució de l'inhibidor

Cal tenir en compte la calor de dilució del lligand ja que la concentració inicial de lligand en la cel·la de mostra és nul·la però s'addiciona mitjançant la xeringa en petits volums d'elevada concentració (20 vegades la concentració de la proteïna). Per aquest motiu, es realitzà un blanc fent un experiment anàleg a l'anterior, però afegint l'inhibidor sobre solució tampó.

La calor de dilució de l'inhibidor resultà ser pràcticament negligible.

c) Determinació de la calor de dilució de la proteasa

El fet que la calor d'interacció inhibidor-proteasa en restar la calor de la dilució de l'inhibidor no tendís a 0 en saturar la proteïna, ens va fer sospitar que hi estés intervenint algun altre procés. Per aquest motiu, es procedí a la determinació de la calor de dilució de la proteïna, tot i que

generalment sol ser despreciable ja que la variació de concentració que es produeix en cada addició és mínima.

Es duagué a terme una valoració afegint també sobre la proteïna de manera anàloga a com s'havia fet en el cas de l'inhibidor.

Efectivament, s'observà que en la dilució de la proteasa es desprenia una calor no negligible (~ 1140 cal), probablement degut a la naturalesa dimèrica d'aquesta proteïna.

En la Figura 103 es troben representats els resultats dels 3 experiments realitzats. Se'n dedueix així que la calor de dilució de l'inhibidor és despreciable, mentre que la calor de dilució de la proteasa és rellevant. Aquest fet es podria interpretar en relació a la naturalesa dimèrica de la proteasa activa.

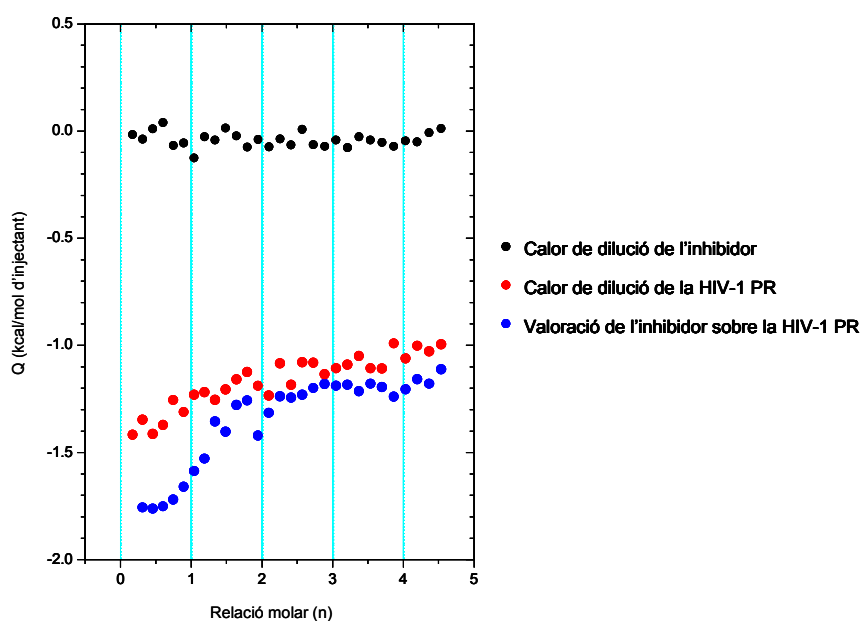


Figura 103: Representació de les calors de dilució de l'inhibidor i de la HIV-1 PR i representació de la valoració de l'inhibidor sobre la HIV-1 PR

La mitjana de la calor de dilució de la proteasa (~ 1140 cal) es restà dels valors obtinguts en la valoració del procés de reconeixement inhibidor-proteasa, es despreciaren els punts menys significatius i mitjançant el tractament matemàtic adequat que ens proporciona l'instrument, s'obtingueren els valors de la constant d'afinitat K_a , de l'entalpia del procés ΔH i l'estequiometria. A partir d'aquests valors, es determinaren l'energia lliure de Gibbs (ΔG) i l'entropia (ΔS) del procés (Fig. 104).

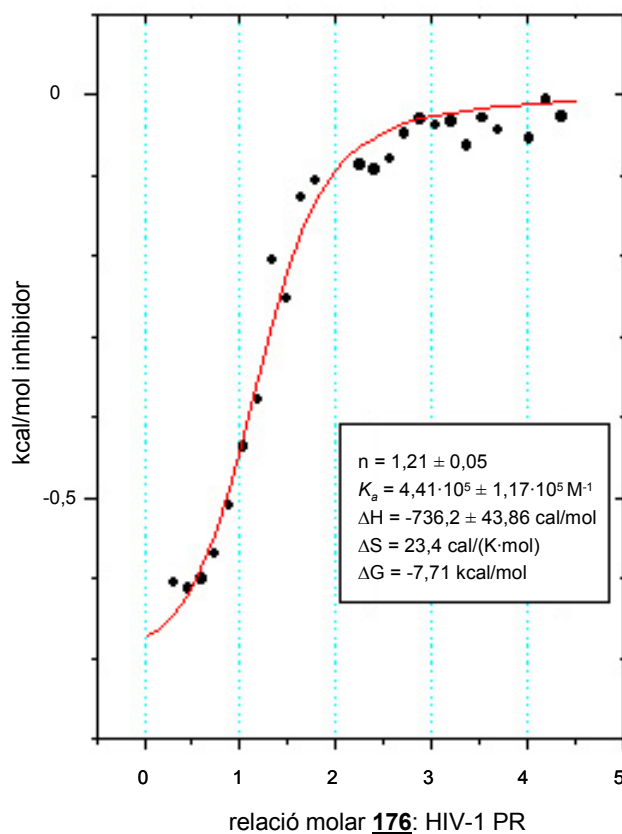


Figura 104: Representació gràfica dels resultats obtinguts en la ITC del procés de reconeixement del compost **176** i la HIV-1 PR, un cop restades les calor de dilució de l'inhibidor i de la proteasa

Interpretació dels resultats obtinguts

- **ΔH :** Generalment, el fet que la contribució entàlpica sigui favorable ($\Delta H < 0$) va associat amb una bona especificitat, selectivitat i adaptabilitat del lligand, i conseqüentment a l'existència d'interaccions específiques. En el nostre cas, el valor obtingut d' ΔH és negatiu ($-736,2 \pm 43,86 \text{ cal/mol}$), tot i que no gaire elevat. Tanmateix, com es pot veure a la Figura 105, el valor obtingut és més favorable que en els casos dels inhibidors comercials indinavir, nelfinavir i saquinavir.¹⁷⁶
- **ΔS :** En el nostre cas el valor d'entropia obtingut fou de $\Delta S = 23,4 \text{ cal/(K}\cdot\text{mol)}$. Tenint en compte que la valoració es realitzà a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (298 K), s'observa que el terme entròpic contribueix en $-6,97 \text{ kcal/mol}$ a l'energia lliure de Gibbs, enfront de la petita contribució del terme entàlpic que és d'aproximadament $-0,74 \text{ kcal/mol}$. La força dominant de la unió inhibidor-proteasa es deu, per tant, a la contribució entròpica. És de suposar que aquest terme entròpic favorable es degui en major part a l'entropia de solvatació causada per la penetració d'una gran part hidrofòbica de l'inhibidor en l'interior de la proteïna.

¹⁷⁶ Todd, M.J.; Luque, I.; Velázquez-Campoy, A.; Freire, E.; *Biochemistry*, **2000**, *39*, 11876-11883.

- **ΔG** : Les dades obtingudes de la variació d'entalpia i d'entropia ens permeten calcular la variació d'energia lliure de Gibbs (ΔG), que en el nostre cas fou de $-7,71$ kcal/mol.

A la gràfica de la Figura 105 es poden observar de forma comparativa les principals contribucions entàlpiques i entròpiques dels inhibidors comercials, comparades amb les del compost **176**.¹⁹⁸

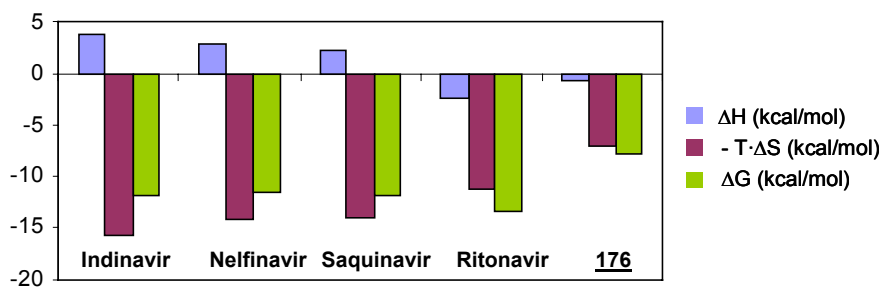


Figura 105: Comparació de les contribucions entàlpiques i entròpiques dels inhibidors comercials de la HIV-1 PR i **176**

La nova tendència en el desenvolupament d'inhibidors de la HIV-1 PR es basa en intentar augmentar la seva contribució entàlpica, la qual cosa permet disminuir lleugerament la contribució entròpica. Això es tradueix en inhibidors amb elements més flexibles per tal que es puguin adaptar a la variabilitat de la proteasa, però que idealment continuïn presentant elevades afinitats degut a l'existència de fortes interaccions amb la proteasa.

- **K_a** : Pel que fa a la constant d'afinitat mesurada, es pot dir que es tracta d'una constant moderada ($K_a = 4,41 \cdot 10^5 \pm 1,17 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), tot i que l'error que porta associat és considerable (26%).
- **n** : Els resultats de la valoració d'ITC mostren que l'estequiometria de la reacció és de $n = 1,2$, és a dir, que per arribar a saturar-se un mol de dímer necessita aproximadament un mol d'inhibidor. Això ens podria indicar que l'inhibidor s'uneix al dímer, però no arriba a desplaçar al monòmer, ja que en aquest cas cada mol de dímer necessitaria 2 mols d'inhibidor (un per cada monòmer) per arribar a saturar-se. El fet que no s'ajusti exactament a 1 podria ser degut a errors de manipulació en calcular la concentració tant de l'inhibidor com de la HIV-1 PR.

Cal tenir present que la calorimetria és una tècnica experimental que ens proporciona una informació global sobre el canvi termodinàmic produït per la unió lligand-proteïna, però que no ens proporciona coneixement sobre l'origen o la localització física de les interaccions que tenen lloc en el procés.

5.5 RECAPITULACIÓ

- Els assaigs *in vitro* realitzats han mostrat que dels 25 inhibidors desenvolupats en aquesta Tesi doctoral 8 presenten baixa activitat i 7 activitat moderada ($IC_{50} < 100 \mu M$). D'aquests compostos amb activitat moderada, els compostos **CH-50**, **176** i **181** han mostrat ser inhibidors dissociatius.
- Els assaigs *in vivo* han mostrat que 3 dels compostos tenen activitat baixa anti-VIH sobre el virus *wild type*, mentre que 4 presenten activitat moderada (**176**, **186**, **187cc** i **189**). Entre aquests compostos, l'inhibidor **176** ha resultat tenir activitat anti-VIH sobre un virus resistent als inhibidors de proteasa comercials. Els assaigs *in vivo* també han evidenciat la baixa toxicitat dels inhibidors sintetitzats.
- Els experiments de calorimetria han mostrat que el compost **176** presenta un perfil d'interacció amb la proteasa similar al del ritonavir, tot i que amb menor afinitat (K_a). Aquests experiments també han posat de manifest que l'inhibidor **176** actua sobre la forma dimèrica de la proteasa, sense arribar a desplaçar un dels monòmers.
- El compost **176** és un bon cap de sèrie per a la investigació de nous inhibidors de la proteasa del VIH-1 actius en línies cel·lulars resistents als inhibidors comercials.

5.6 ANNEX

5.6.1 Principis de la *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET)

La FRET és un fenomen físic descrit per primera vegada fa aproximadament 50 anys, i que des de llavors ha anat guanyant adeptes en la recerca biomèdica i en la descoberta de nous fàrmacs.¹⁷⁷ És un fenomen dependent de la distància que es basa en la transferència d'energia d'un grup donador prèviament excitat envers un grup acceptor. A causa de la dependència d'aquesta tècnica de la distància entre donador i acceptor, ha estat àmpliament utilitzada per l'estudi de interaccions moleculars. El grup donador és el cromòfor que inicialment absorbeix l'energia, que a continuació és transferida al grup acceptor. Aquesta interacció té lloc a distàncies més grans que les interatòmiques, sense conversió en energia tèrmica i sense cap tipus de col·lisió molecular.

Hi ha un seguit de condicions que s'han de complir per tal que tingui lloc aquest fenomen:

- La distància entre el grup donador i l'acceptor ha d'estar entre els 10-100 Å.
- L'espectre d'absorció de l'acceptor ha de solapar-se amb l'espectre d'emissió del donador, tal i com es mostra a la Figura 106. El grau de solapament ve donat pel valor de la integral de solapament espectral (J).
- Les orientacions del dipol de transició del donador i l'acceptor han de ser aproximadament paral·leles.

La dependència de l'eficiència de transferència d'energia amb la distància queda palesa en l'equació desenvolupa per Förster:¹⁷⁸

$$\text{Eficiència} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \quad [\text{Equació 9}]$$

on R_0 (radi de Förster) és la distància a la qual l'eficiència és d'un 50% i és un valor característic per cada parella de cromòfors. Els valors més útils per l'estudi de macromolècules biològiques són els que es troben entre 20 i 90 Å. Aquests valors són comparables als diàmetres de moltes proteïnes, a les gruixàries de les membranes biològiques i a les distàncies entre llocs de proteïnes formades per vàries subunitats.

Generalment, el grup donador i acceptor són diferents. Ens podem trobar en dos casos diferents (Fig. 106):

- Que el grup acceptor emeti fluorescència, un cop absorbida l'energia transferida pel grup receptor. En aquest cas, la FRET es detecta per la disminució de la fluorescència del donador i l'aparició de fluorescència a la longitud d'ona que correspon a l'acceptor.
- Que el grup acceptor absorbeixi l'energia del donador, però no emeti fluorescència (*quencher*). En aquest cas, la FRET es detecta per la desaparició de la fluorescència del donador.

¹⁷⁷ Wu, P.; Brand, L.; *Anal. Biochem.*, **1994**, *218*, 1-13.

¹⁷⁸ Förster, T.; *Ann. Phys.*, **1948**, *2*, 55-75

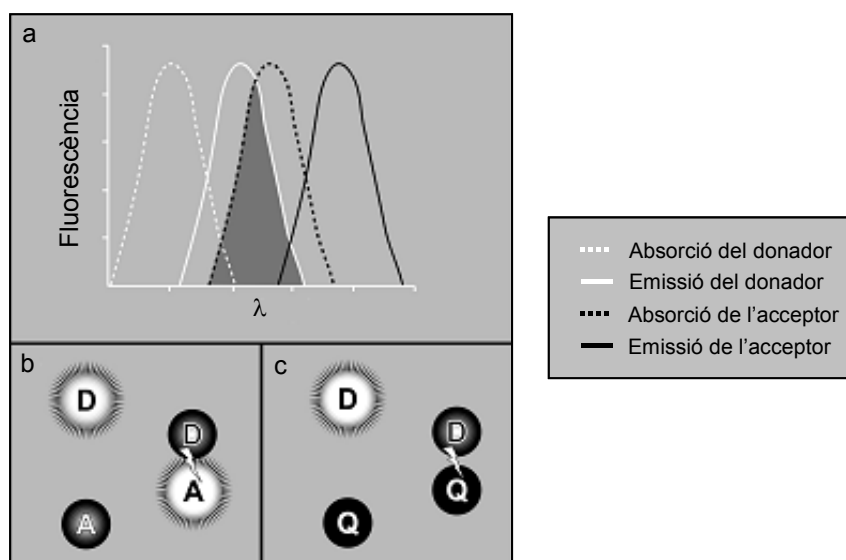


Figura 106: a) Solapament espectral de la fluorescència del donador amb l'absorció de l'acceptor. b) Representació de la interacció entre el donador, en cas que aquest sigui fluorescent . c) Cas en que el donador és un *quencher*.

El grup donador és sempre una molècula fluorescent. Amb la irradiació adequada, els seus electrons salten de l'estat fonamental (S_0) a un nivell vibracional d'un estat excitat (S_1). Molt ràpidament (en picosegons), aquests electrons decauen al nivell vibracional més baix de l'estat excitat i en algun cas (en nanosegons) retornen a l'estat S_0 emetent un fotó de llum. Quan es compleixen les condicions per a què hi hagi FRET, l'energia d'excitació es pot convertir en fluorescència per part del donador o bé es pot transferir aquesta energia a l'acceptor. En el cas de la transferència d'energia, no s'emeta cap fotó, és una interacció no radiativa, simplement l'energia es transfereix al grup acceptor, els electrons del qual passen a estar excitats com en el cas del donador (Fig. 107).

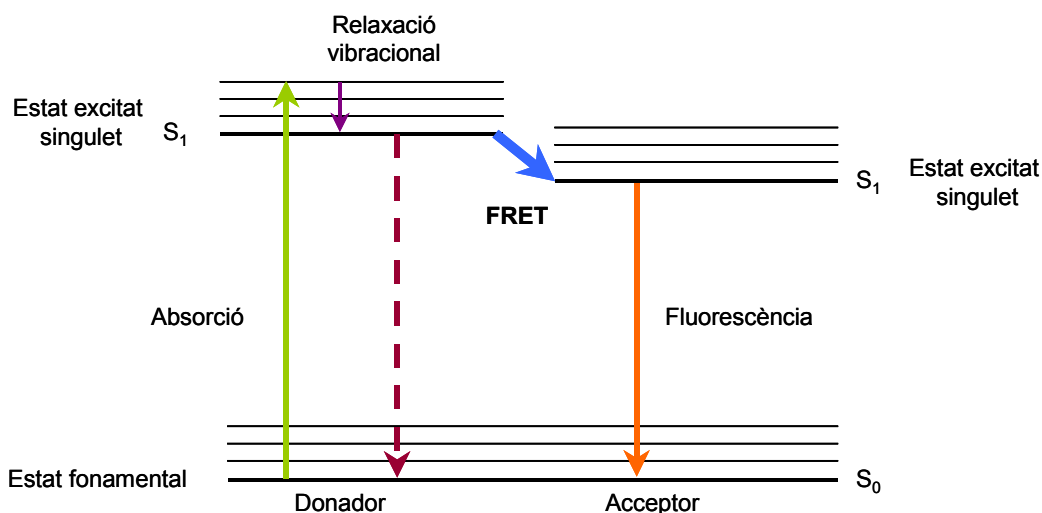


Figura 107: Diagrama del procés de FRET entre la molècula del donador i la de l'acceptor

5.6.2 Fonaments de calorimetria

La calorimetria ens permet mesurar simultàniament la constant d'associació i l'entalpia d'unió i ens dona accés a una caracterització termodinàmica completa, fent servir les relacions bàsiques que es mostren a continuació:



$$K_a = \frac{[\text{PR-I}]}{[\text{PR}] \cdot [\text{I}]} \quad [\text{Equació 10}]$$

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K_a \quad [\text{Equació 11}]$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad [\text{Equació 12}]$$

És útil expressar l'energia lliure de Gibbs en funció de les diferents contribucions, tal i com es mostra en l'Equació 13:¹⁷⁹

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S_{\text{SOL}} - T\Delta S_{\text{CONF}} - T\Delta S_{\text{R,TR}} \quad [\text{Equació 13}]$$

El terme d'**entalpia** d'unió fàrmac-diana (ΔH) depèn bàsicament de dos factors:

- un terme favorable que reflecteix la contribució energètica de les diferents interaccions (ponts d'hidrogen, van der Waals, electrostàtiques, interaccions polars i dipolars, etc.) entre el lligand i la proteïna
- un terme desfavorable que sorgeix de la desolvatació de grups polars. Per tant, una entalpia favorable constitueix una indicació de que el fàrmac estableix interaccions prou fortes amb la diana terapèutica com per compensar l'entalpia desfavorable associada amb la desolvatació.

Els tres termes principals que contribueixen a l'**entropia** d'unió, tal i com es reflecteix en l'Equació 13, són:

- el canvi d'**entropia de solvatació** (ΔS_{SOL}) que correspon al canvi d'entropia associat amb el canvi de solvatació de les molècules del lligand en ser unides a la proteïna. L'entropia de solvatació representa el guany en graus de llibertat de les molècules d'H₂O que abans de la unió es trobaven localitzades a la superfície del lligand i que després de la unió passen a estar barrejades amb la resta de dissolvent. Aquest terme normalment és favorable i bastant gran ja que la majoria dels lligands tenen un elevat percentatge de superfície no polar que queda inserida en el lloc d'unió amb la proteïna.
- el canvi d'**entropia conformacional** (ΔS_{CONF}), és a dir, el canvi d'entropia associat amb el canvi en l'espai conformacional de les molècules del lligand en unir-se amb la proteïna. El canvi d'entropia conformacional és gairebé sempre un terme desfavorable, ja que el procés

¹⁷⁹ a) Luque, I.; Freire, E.; *Methods Enzymol.*, **1998**, 295, 100-127. b) Luque, I.; Freire, E.; *Proteins*, **2002**, 49, 181-190.

d'unió comporta la pèrdua de graus de llibertat conformacional tant pel que fa al fàrmac com al receptor.

- l'**entropia roto-translacional** ($\Delta S_{R,TR}$), que correspon al canvi entròpic associat amb el canvi configuracional del lligand a causa de la unió amb la proteïna. Aquest terme també és normalment desfavorable, la unió lligand-proteïna va acompanyada normalment d'una disminució de les configuracions accessibles, la qual cosa comporta una reducció dels graus de llibertat.

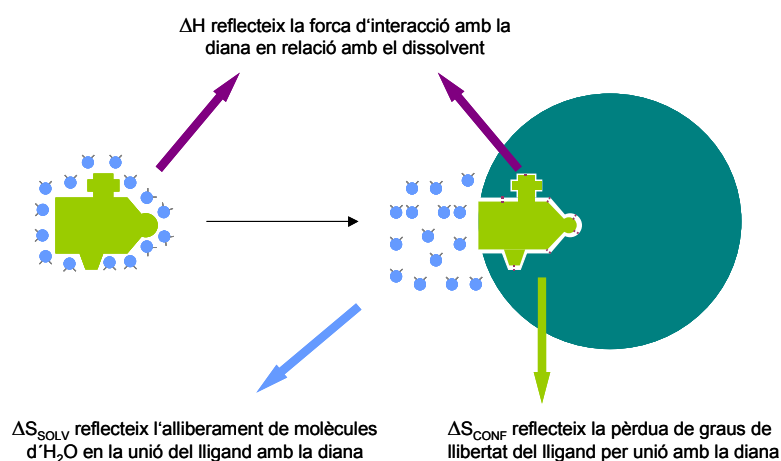


Figura 108: Representació gràfica dels termes entròpics i entàlpics que contribueixen a l' ΔG del procés de reconeixement lligand-proteïna

Tot i que és possible calcular els paràmetres termodinàmics ΔH i ΔS fent ús de l'equació de van't Hoff (Eq. 14), es tracta d'un procés laboriós i imprecís ja que el rang de temperatures de treball és limitat i l'error de l'experiment és elevat.¹⁸⁰

$$R \cdot \ln K_a = - \Delta H (1/T) + \Delta S \quad \text{[Equació 14]}$$

Per aquest motiu la valoració calorimètrica isotèrmica utilitzada en la present Tesi doctoral resulta una alternativa de gran interès.

¹⁸⁰ Eftink, M.; Biltonen, R.; Biological Microcalorimetry, Ed. Academic Press, 1980, 346-351.