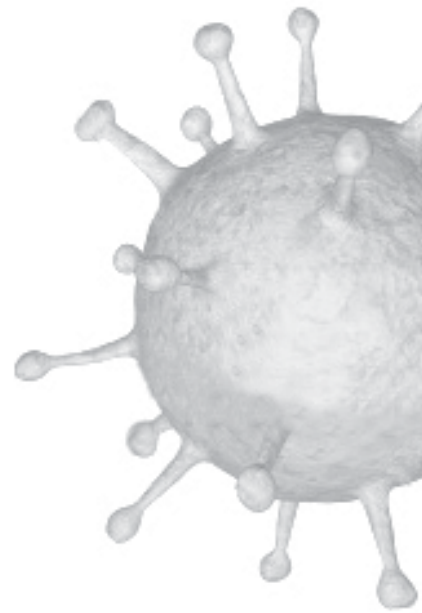


# Determinació de l'activitat antiviral de nous compostos inhibidors del VIH-1



Imma Clotet i Codina

Laboratori de Retrovirologia. Fundació irsiCaixa.  
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.  
Tesi Doctoral. 2007.

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia  
Facultat de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona

# **Determinació de l'activitat antiviral de nous compostos inhibidors del VIH-1**

Imma Clotet i Codina

Laboratori de Retrovirologia  
Fundació irsiCaixa  
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

Memòria de la tesi presentada per obtenir el grau de Doctora en Immunologia  
per la Universitat Autònoma de Barcelona  
Bellaterra, Octubre de 2007

Director: Dr. José A. Esté  
Tutora: Dra. Paz Martínez

Amb el suport del Departament d'Educació i Universitats de la Generalitat de  
Catalunya i del Fons Social Europeu



El Dr. José A. Esté Araque, Investigador Sènior del Laboratori de Retrovirologia de la Fundació irsiCaixa de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona,

Certifica:

Que el treball experimental i la redacció de la memòria de la Tesi Doctoral titulada “**Determinació de l’activitat antiviral de nous compostos inhibidors del VIH-1**” han estat realitzades per l’Imma Clotet i Codina sota la seva direcció i considera que és apta per ser presentada per optar al grau de Doctora en Immunologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que en quedi constància, signa aquest document a Badalona, 29 d’Octubre del 2007.

Dr. José A. Esté Araque



La Dra. Paz Martínez Ramírez, Coordinadora de Tercer Cicle de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Certifica:

Que el treball experimental i la redacció de la memòria de la Tesi Doctoral titulada “**Determinació de l’activitat antiviral de nous compostos inhibidors del VIH-1**” han estat realitzades per l’Imma Clotet i Codina sota la seva tutoria i considera que és apta per ser presentada per optar al grau de Doctora en Immunologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que en quedi constància, signa aquest document a Bellaterra, 29 d’Octubre del 2007.

Dra. Paz Martínez Ramírez



Als meus pares.





“El meu missatge, dirigit sobretot a la joventut, és que si senten inclinació per la ciència, la segueixin, doncs no deixarà de proporcionar-los satisfaccions inigualables. Cert és que abunden els moments de desànim i frustració, però aquests s’obliden aviat, mentre que les satisfaccions no s’obliden mai.”

Santiago Ramón y Cajal



## **Publicacions**

### **Anti-HIV Activity and Resistance Profile of the CXCR4 antagonist POL3026.**

Gemma Moncunill, Mercedes Armand-Ugon, **Imma Clotet-Codina**, Eduard Pauls, Anuska Llano, Steve De Marco, Bonaventura Clotet and José A. Esté  
Manuscript enviat a publicar.

### **Coreceptor-independent HIV-1 transmission from infected Dendritic Cells to primary CD4+ T lymphocytes.**

**Imma Clotet-Codina**, Berta Bosch, María Teresa Fernández-Figueras, Ruth Peña, Margarita Bofill, Bonaventura Clotet and José A. Esté.  
Manuscript enviat a publicar.

### **HIV-1 resistance to the anti-HIV activity of a shRNA targeting a dual-coding region.**

Jordi Senserrich, Eduardo Pauls, Mercedes Armand-Ugón, **Imma Clotet-Codina**, Gemma Moncunill, Bonaventura Clotet and José A. Esté.  
Manuscript acceptat per publicar a Virology.

### **Dihydro-alkylthio-benzyl-oxopyrimidines as inhibitors of Reverse Transcriptase: synthesis and rationalization of the biological data on both wild type enzyme and relevant clinical mutants**

Mugnaini, Claudia; Alongi, Maddalena; Togninelli, Andrea; Gevariya, Harsukh; Brizzi, Antonella; Manetti, Fabrizio; Bernardini, Cesare; Angeli, Lucilla; Tafi, Andrea; Bellucci, Luca; Corelli, Federico; Massa, Silvio; Maga, Giovanni; Samuele, Alberta; Facchini, Marcella; **Clotet-Codina, Imma**; Armand-Ugon, Mercedes; Este, Jose; Botta, Maurizio  
J Med Chem 2007 Nov.

**Synthesis and Biological Properties of Novel 2-Aminopyrimidin-4(3H)-ones Potent at Nanomolar/Subnanomolar Level against HIV-1 Mutant Strains.**

Antonello Mai, Marino Artico, Dante Rotili, Domenico Tarantino, **Imma Clotet-Codina**, Mercedes Armand-Ugón, Rino Ragno, Silvia Simeoni, Gianluca Sbardella, Maxim B. Nawrozkij, Alberta Samuele, Giovanni Maga, José A. Esté  
J Med Chem 2007 Oct 2.

**Slow-, Tight-Binding HIV-1 Reverse Transcriptase Non-Nucleoside Inhibitors Highly Active against Drug-Resistant Mutants.**

Reynel Cancio, Antonello Mai, Dante Rotili, Marino Artico, Gianluca Sbardella, **Imma Clotet-Codina**, José A. Esté, Emmanuele Crespan, Samantha Zanolli, Ulrich Hübscher, Silvio Spadari, Giovanni Maga  
ChemMedChem 2007 April.

**Search for alpha-glucosidase inhibitors: new N-substituted valienamine and conduramine F-1 derivatives.**

Lysek R, Schutz C, Fayre S, O'Sullivan AC, Pillonel C, Krulle T, Jung PM, **Clotet-Codina I**, Esté JA, Vogel P.  
Bioorg Med Chem. 2006 Sep 15;14(18):6255-82.

**A combination of molecular dynamics and docking calculations to explore the binding mode of ADS-J1, a polyanionic compound endowed with anti-HIV-1 activity.**

Manetti F, Tintori C, Armand-Ugon M, **Clotet-Codina I**, Massa S, Ragno R, Esté JA, Botta M.  
J Chem Inf Model. 2006 May-Jun;46(3):1344-51.

**Synthesis and biological investigation of S-aryl-S-DABO derivatives as HIV-1 inhibitors.**

Mugnaini C, Manetti F, Esté JA, **Clotet-Codina I**, Maga G, Cancio R, Botta M, Corelli F.  
Bioorg Med Chem Lett. 2006 Jul 1;16(13):3541-4.

**Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection in macrophages by an alpha-v integrin blocking antibody.**

Bosch B, **Clotet-Codina I**, Blanco J, Pauls E, Coma G, Cedeno S, Mitjans F, Llano A, Bofill M, Clotet B, Piulats J, Esté JA.

Antiviral Res. 2006 Mar;69(3):173-80.

**Recent advances in combinatorial chemistry applied to development of anti-HIV drugs.**

Pettersson S, **Clotet-Codina I**, Esté JA, Borrell JI, Teixidó J.

Mini Rev Med Chem. 2006 Jan;6(1):91-108.

**Parallel solution-phase and microwave-assisted synthesis of new S-DABO derivatives endowed with subnanomolar anti-HIV-1 activity.**

Manetti F, Esté JA, **Clotet-Codina I**, Armand-Ugon M, Maga G, Crespan E, Cancio R, Mugnaini C, Bernardini C, Togninelli A, Carmi C, Alongi M, Petricci E, Massa S, Corelli F, Botta M.

J Med Chem. 2005 Dec 15;48(25):8000-8.

**Inhibition of coreceptor independent cell-to-cell HIV-1 transmission by a CD4-IgG2fusion protein.**

Berta Bosch, Julià Blanco, Eduardo Pauls, **Imma Clotet-Codina**, Mercedes Armand- Ugón, Boyan Grigorov, Delphine Muriaux, Bonaventura Clotet, Jean-Luc Darlix, José A. Esté

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005 Oct;49(10):4296-304.

**HIV-1 Resistance to ADS-J1.**

Mercedes Armand-Ugón, **Imma Clotet-Codina**, Cristina Tintori, Fabrizio Manetti, Bonaventura Clotet, Mauricio Botta and José A. Esté.

Virology. 2005 Dec 5;343(1):141-9.

**A multiparametric assay to screen and dissect the mode of action of anti HIV envelope drugs.**

Julià Blanco, **Imma Clotet-Codina**, Berta Bosch, Mercedes Armand-Ugón, Bonaventura Clotet, and José A. Esté .

Antimicrob Agents Chemother. 2005 Sep;49(9):3926-9.

**Effect of Polyanion-resistance on HIV-1 infection.**

Michael D. Bobardt, Mercedes Armand-Ugón, **Imma Clotet**, Zhe Zhang, Guido David, José A. Esté and Phillippe A. Gallay .

Virology 325 (2): 389-98, 2004.

## Abreviacions

ADN	àcid desoxiribonucleic
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APC	<i>allophycocyanin</i>
ARN	àcid ribonucleic
AZT	azidotimidina o zidovudina
CA	càpsida
CC <sub>50</sub>	concentració citotòxica 50
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DABO	dihidro-alcoxi-benzil-oxopirimidines
DIOC6	<i>dihexaoxocarbocyanine iodide</i>
DMSO	sulfòxid de dimetil
DS	dextrà sulfat
EC <sub>50</sub>	concentració efectiva 50
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GRID	<i>Gay-Related Immune Deficiency</i>
HCl	àcid clorhídric
HR	<i>heptat repeat</i>
HTLV	<i>Human T-Cell Lymphotropic Virus</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IN	integrasa
IP	inhibidor de la proteasa
ITIAN	inhibidor de la transcriptasa inversa anàleg de nucleòtid
ITINAN	inhibidor de la transcriptasa inversa no anàleg de nucleòtid
Kb	kilobase
Ki	constant d'inhibició
LAV	<i>Lymphadenopathy-Associated Virus</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>



MA	matriu
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
moi	multiplicitat d'infecció
MRC	<i>Medical Research Council</i>
MTT	metil de tetrazoli
NC	nucleocàpsida
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
nm	nanòmetre
NNBS	<i>non-nucleoside binding site</i>
NNIBP	<i>non-nucleoside inhibitor binding pocket</i>
NNRTI	<i>non- nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
NRTI	<i>nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
NSI	<i>non- syncytium inducing</i>
PBMC	cèl·lules mononucleades de sang perifèrica
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	<i>phycoerythrin</i>
PerCP	<i>peridin chlorophyll protein</i>
PR	proteasa
RH	<i>rapid/high</i>
rpm	revolucions per minut
SBF	sèrum boví fetal
SI	<i>syncytium inducing</i>
SIDA	Síndrome d' Immunodeficiència Adquirida
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SL	<i>slow/low</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TARGA	tractament antiretroviral de gran activitat
TAS	temps d'arrest de temperatura
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TI	transcriptasa inversa
UNAIDS	<i>The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
VIH	Virus de la Immunodeficiència Humana

# Índex

<b>1. Introducció</b>	<b>1</b>
1.1 El descobriment del virus de la immunodeficiència humana	1
1.2 Estructura, composició i genoma del VIH-1	2
1.3 Cèl·lules diana pel VIH-1 i tropisme cel·lular	6
1.4 Cicle de replicació del VIH-1	9
1.5 Curs de la infecció pel VIH-1 in vivo	11
1.6 Intervenció terapèutica en la infecció pel VIH-1	14
1.6.1 Etapes del desenvolupament d'un fàrmac	15
1.6.2 Les drogues anti-VIH	16
1.6.3 Noves dianes terapèutiques	18
<b>2. Objectius</b>	<b>23</b>
<b>3. Material i Mètodes</b>	<b>25</b>
3.1. Línies cel·lulars i medis de cultiu	25
3.1.1 Línies cel·lulars estables	25
3.1.2 Cèl·lules primàries	26
3.1.3 Cèl·lules MOLT-4/CCR5 crònicament infectades	27
3.2 Soques virals	28
3.2.1 Generació d'un estoc viral	28
3.3 Compostos i anticossos amb activitat antiviral	29
3.3.1 Inhibidors de l'entrada viral	29
3.3.2 Inhibidors de la TI	29
3.3.3 Inhibidors de la proteasa i d'integració	30
3.4 L'assaig d'MTT (3-[4,5-Dimetiltiazole-2-il]-2,5-difeniltetrazol-bromit)	30
3.5 Titulació d'un estoc viral en cèl·lules MT-4	31
3.6 Avaluació de l'activitat anti-VIH-1 i la citotoxicitat de compostos en cèl·lules MT-4 per MTT	32
3.7 Assaig de temps d'addició d'una droga	37
3.8 Citometria de flux	39
3.8.1 Marcatges d'antígens de superfície	39
3.8.2 Marcatges d'antígens intracel·lulars	40
3.8.3 Anàlisi de la viabilitat cel·lular	41
3.8.4 Marcatge conjunt dels receptors virals	42
3.9 Cocultius de cèl·lules infectades pel VIH-1 amb cèl·lules no infectades	43
3.10 Validació de les cèl·lules perdudes com a mesura de la formació de sincicis	44
3.11 Anàlisi estadística	44
<b>4. Resultats</b>	<b>45</b>
4.1 Cribratge a gran escala per a la determinació de l'activitat anti-VIH de compostos	45
4.2 Assaig multiparamètric per testar i determinar el mecanisme d'acció de drogues contra l'embolcall del VIH-1	46
4.2.1 Contactes entre cèl·lules infectades pel VIH-1 i cèl·lules no infectades	48

4.2.2 Anàlisi quantitatiu de les funcions dels embolcalls virals.....	49
4.2.3. Validació del criteri de determinació de la mort cel·lular per morfologia .....	52
4.2.4 Efectes dels processos de fixació i permeabilització en el recompte de la mort cel·lular per morfologia .....	53
4.2.5 Validació de la permanència de les cèl·lules mortes en el cultiu durant l'assaig .....	53
4.2.6 Drogues dirigides contra l'embolcall del VIH-1 mostren diferents perfils d'inhibició .....	55
<b>4.3 Anàlisi de l'activitat antiviral i determinació del mecanisme d'acció de compostos inhibidors de l'entrada del VIH-1.....</b>	<b>58</b>
4.3.1 Inhibidors de CXCR4.....	59
4.3.1.1 Determinació de l'activitat antiviral en cèl·lules MT-4 .....	60
4.3.1.2 Inhibició de la unió d'anticossos monoclonals.....	62
4.3.1.3 Confirmació del mecanisme d'acció per mitjà de l'assaig de temps d'addició d'una droga .....	65
4.3.2 La família dels BMS .....	66
4.3.2.1 Determinació de l'activitat antiviral en cèl·lules MT-4 .....	68
4.3.2.2 Genotipat de les soques salvatge i multiresistent .....	70
4.3.2.3 Assaig de temps d'addició per a la determinació del mecanisme d'acció .....	71
<b>4.4 Determinació de l'activitat antiviral de nous compostos inhibidors de la transcriptasa inversa.....</b>	<b>73</b>
4.4.1 Nous ITINANs derivats d'S-DABO .....	74
4.4.1.1 Determinació de l'activitat antiviral dels derivats d'S-DABO.....	77
4.4.2 Nous ITINANs derivats d'S-aril-S-DABO .....	81
4.4.2.1 Determinació de l'activitat antiviral dels derivats d'S-aril-S-DABO .....	81
4.4.3 Nous ITINANs derivats d' <i>N,N</i> -DABO.....	83
4.4.3.1 Determinació de l'activitat antiviral dels derivats d' <i>N,N</i> -DABO ....	85
4.4.3.2 Determinació de la inhibició de l'activitat enzimàtica de la TI.....	88
4.4.4 Nous ITINANs derivats d' <i>F</i> <sub>2</sub> - <i>N,N</i> -DABOs .....	90
4.4.4.1 Determinació de l'activitat antiviral dels derivats d' <i>F</i> <sub>2</sub> - <i>N,N</i> -DABO. ....	90
4.4.4.2 Determinació de la inhibició de l'activitat enzimàtica de la TI.....	97
4.4.4.3 Determinació del mecanisme d'unió dels nous <i>F</i> <sub>2</sub> - <i>N,N</i> -DABOs ..	98
<b>5. Discussió .....</b>	<b>101</b>
<b>6. Conclusions.....</b>	<b>111</b>
<b>7. Bibliografia.....</b>	<b>113</b>
<b>8. Agraïments.....</b>	<b>127</b>

# 1. Introducció

---

## 1.1 El descobriment del virus de la immunodeficiència humana

Era l'any 1981 quan un grup de metges del *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) nord-americà va observar en un conjunt de joves homosexuals i prèviament sans de *Los Angeles* (Califòrnia) una sèrie de malalties oportunistes poc comuns, com el sarcoma de Kaposi, pneumònia causada per *Pneumocystis carinii* i alguns casos de limfadenopaties persistents (4, 5, 8, 83). Degut a la raresa d'aquestes malalties, fins al moment restringides a malalts amb una forta immunodeficiència, i veient l'augment en la incidència d'aquestes (58) i altres infeccions com els limfomes indiferenciats no-hodgkinians (185), aviat esdevingué evident que tots aquells individus tenien un dèficit immunològic comú, resultat d'una pèrdua predominant de cèl·lules T CD4+ circulants. L'aparició de nous casos en homes homosexuals, suggeria que un agent infecciós de transmissió sexual en podia ser l'agent etiològic (1), i per això s'anomenà al nou síndrome GRID de l'anglès "*Gay-Related Immune Deficiency*". Poc temps després i amb l'aparició de les mateixes infeccions oportunistes en hemofílics (7, 10), es va descriure la Síndrome de la Immunodeficiència Adquirida (SIDA) com a l'associació d'aquestes malalties juntament amb un estat immunodeficitari de causa desconeguda (124). Al maig de 1983, investigadors del grup del Dr. Luc Montagnier de l'Institut Pasteur a França, van aïllar un nou retrovirus de cèl·lules de gangli limfàtic, al que van anomenar virus associat a la limfadenopatia (LAV, de l'anglès *Lymphadenopathy-Associated Virus*), i que van descriure com a l'agent causal de la SIDA (16). Un any més tard, als Estats Units, el grup del Dr. Robert Gallo del *National Cancer Institute* (NCI) va aïllar un virus que també causava la SIDA, al que van anomenar virus limfotròpic de cèl·lules T humanes de tipus III (HTLV-III, de l'anglès *Human T-cell Lymphotropic Virus-III*) (71, 77). A principis de 1985, es va demostrar que ambdós virus eren el mateix agent infecciós (150) i al 1986 el Comitè Internacional sobre Taxonomia dels Virus (ICTV) va

unificar-ne la nomenclatura com a VIH (Virus de la Immunodeficiència Humana) (41). Segons l'últim informe epidemiològic publicat per la UNAIDS (*The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*), s'estima que entre 34 i 47 milions de persones vivien amb el VIH el passat 2006. (Fig. 1)



Figura 1. Distribució mundial de la infecció per VIH (desembre 2006). Figura adaptada d'UNAIDS.

## 1.2 Estructura, composició i genoma del VIH-1

El VIH-1 és un retrovirus del gènere lentivirus i de la família *Retroviridae*. Juntament amb el VIH-2, són els dos lentivirus humans coneguts, són variants del virus de la immunodeficiència de simi (SIV, de l'anglès *simian immunodeficiency virus*), i procedeixen d'una transmissió zoonòtica d'una de les espècies de ximpanzé comú, el *Pan troglodytes troglodytes*, i del *Cercocebus atys*, un cercopitecoide o mona de l'Àfrica Occidental, respectivament (74, 75, 86). El genoma del VIH-1 (Fig. 2) es troba codificat per una molècula d'ARN d'unes 9,8 kilobases (kb), que compona les nou pautes de lectura diferents, pertanyents a tres gens estructurals, dos de reguladors i quatre d'accessoris, que codifiquen per un total de quinze proteïnes virals (68, 130).

Els tres gens estructurals *gag*, *pol* i *env*, que trobem comuns en tots els retrovirus, codifiquen per les proteïnes Gag, Pol i Env, imprescindibles per la formació de la partícula viral. *Gag* codifica pels precursors de les proteïnes de la càpsida viral: MA (de la matriu o p17), CA (de la càpsida o p24), NC (de la nucleocàpsida o p7) i p6. *Pol* codifica pels precursors dels diferents enzims virals necessaris per a la replicació viral com la transcriptasa inversa (TI), la proteasa (PR) i la integrasa (IN), i finalment el gen *env* codifica pels precursors de les dues glicoproteïnes de l'embolcall, la de superfície gp120 (SUgp120) i la transmembrana gp41 (TMgp41).

Els dos gens reguladors, el transactivador transcripcional *tat* i el regulador de l'expressió viral *rev*, codifiquen per proteïnes essencials per a la replicació viral. Els quatre gens accessoris *vif*, *vpr*, *nef* i *vpu*, no són essencials per a la replicació viral.

El genoma del VIH-2 és una mica més gran que el del VIH-1 (10,3 kb) i en comptes del gen accessori *vpu* en presenta un altre que rep el nom de *vpx*.

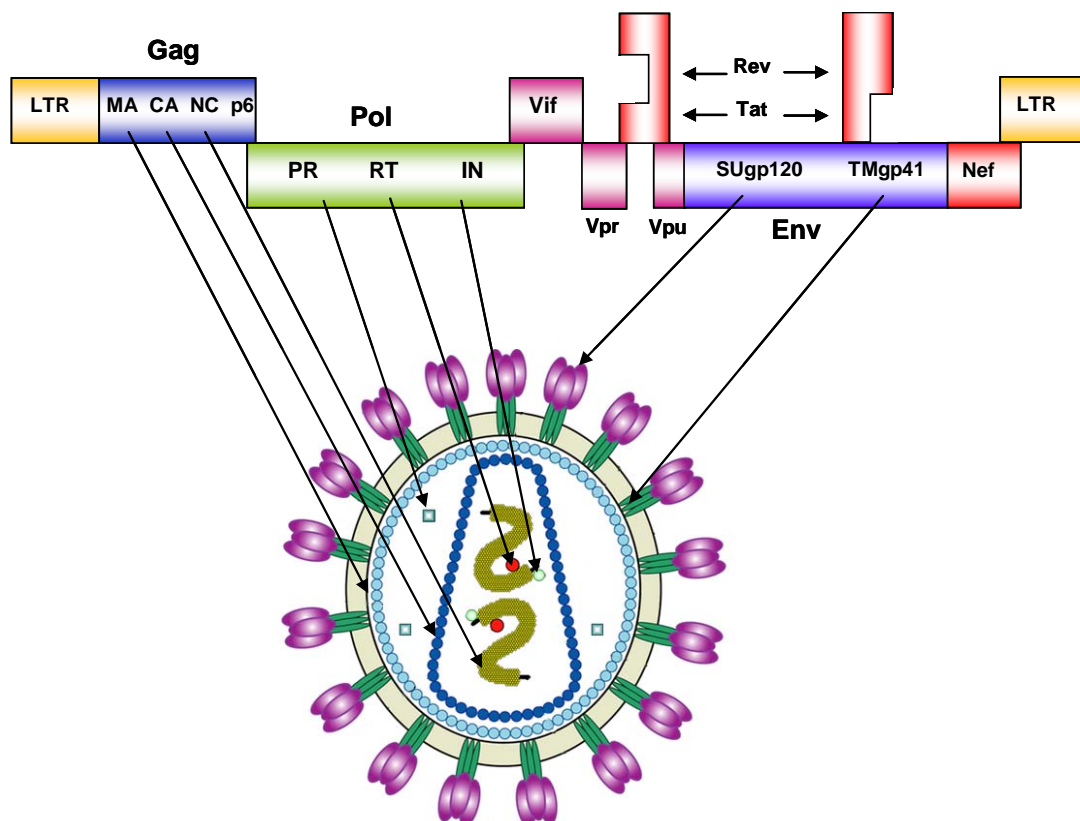
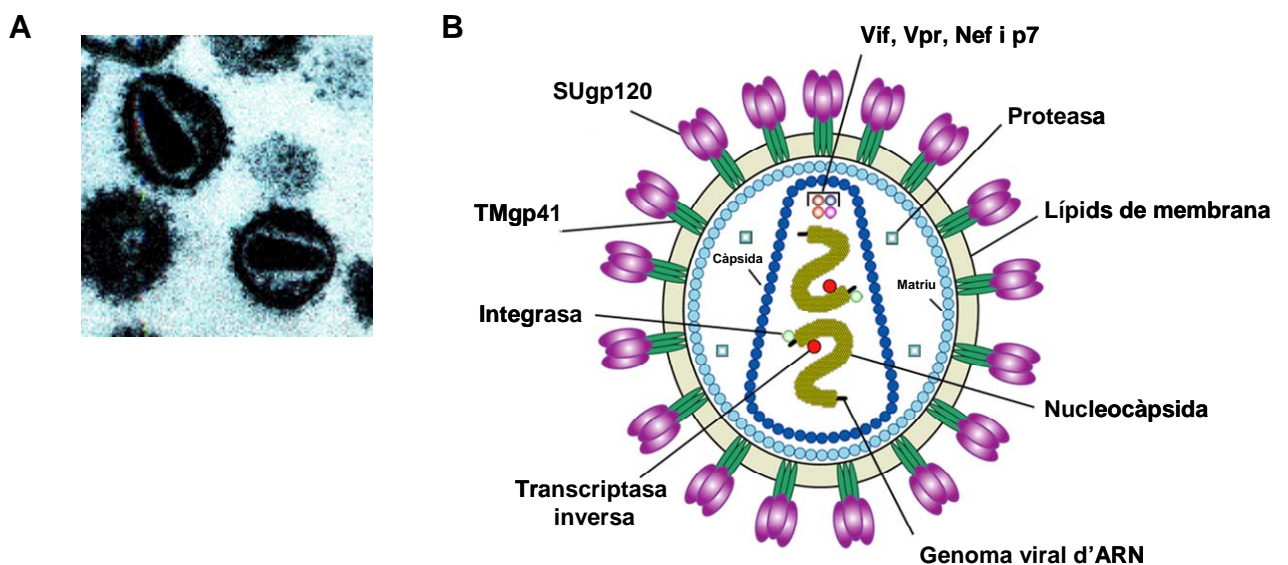


Figura 2. Genoma del VIH-1 i estructura d'un viri. Figura adaptada de (68).

Com la resta de retrovirus, el genoma del VIH-1 presenta una forma extracel·lular, on dues còpies idèntiques d'ARN de cadena senzilla i polaritat positiva es troben contingudes dins de virions madurs, i una forma intracel·lular en forma de doble cadena d'ADN integrada dins el genoma cel·lular i flanquejada per dues seqüències de nucleòtids no codificants anomenades *Long Terminal Repeats* (LTR). Dins els LTR hi trobem el promotor de la transcripció dels gens virals, imprescindible per a la transcripció inversa, la integració, l'expressió gènica i la poliadenilació de l'ARN missatger. Aquest genoma viral integrat es coneix amb el nom de provirus.



**Figura 3. Estructura del VIH-1. (A) Micrografia electrònica del virus** (d'Otago School of Medical Sciences). **(B) Representació de l'estructura del virió del VIH-1** (figura adaptada de l'NIH).

La partícula viral madura del VIH-1 (Fig. 3) té morfologia icosaèdrica i un tamany d'uns  $145 \pm 25$  nm de diàmetre (28, 125, 140). Un embolcall format per una bicapa lipídica provinent de la cèl·lula hoste en forma la part més externa de la partícula, on s'hi inseriran les proteïnes codificades pel gen *env*, constituint unes espícules formades per la unió no-covalent de la proteïna SUgp120 a la TMgp41 (184). A la part interna de la bicapa lipídica hi trobem la matriu, formada per la proteïna MAp17, que participa en el procés d'assemblatge i dins hi trobarem la càpsida viral. Aquesta càpsida de forma

cònica, formada per la proteïna CAp24 (28), a més de protegir el genoma viral juga un paper important tant en la infecciositat de les partícules virals com en els processos de desencapsidació i assemblatge que tenen lloc durant el cicle de replicació del virus. Aquesta càpsida conté les dues molècules d'ARN de cadena senzilla i polaritat positiva, els enzims PR, TI i IN i les proteïnes accessòries Vif, Vpr i Nef. Una nucleocàpsida formada per la proteïna NCp7 n'embolcalla el material genètic.

La PR intervé en els processos de maduració de les partícules virals de nova producció, catalitzant la proteòlisi dels productes de la traducció dels gens *gag* i *pol* (les poliproteïnes Gag i Gag-Pol), i també és important en la infecciositat d'aquestes noves partícules. El producte del gen *env* (Env), en canvi, és proteolitzat per les proteases cel·lulars (167).

La TI duu a terme les reaccions de polimerització de l'ADN viral de doble cadena a partir d'un motlle d'ARN o ADN de cadena senzilla. Durant aquest procés, l'ARN de l'híbrid ARN-ADN que es forma és degradat per l'ARNasaH de la mateixa TI (68, 130). La funció principal de la IN és permetre la integració del genoma viral als cromosomes de la cèl·lula hoste, preferentment en gens actius activats durant el procés d'infecció pel VIH-1 (159).

Pel que fa referència a les funcions de les proteïnes reguladores, Tat és essencial per a l'expressió dels gens virals, degut a la seva funció de regulador transcripcional, augmentant els nivells de transcripció del promotor de l'LTR del VIH-1 regulant el processament de l'ARN polimerasa II (108). Rev en canvi, intervé activant l'exportació cap al citoplasma de molècules d'ARN que han patit el procés parcial o nul d'empalmament (*splicing*, en anglès) al nucli. Les poliproteïnes Gag, Gag-Pol i Env, i les proteïnes accessòries Vif, Vpr i Vpu, requereixen de la funció de Rev, ja que són codificades per transcrits virals amb un màxim d'un procés d'empalmament (130).

Dins les proteïnes accessòries, Vif és important en la producció de partícules virals infeccioses, al bloquejar la funció d'APOBEC3G, una citidindesaminasa cel·lular que impedeix la formació de provirus funcionals degut a la desaminació de les citosines de la cadena d'ADN sintetitzada per la TI (79). Aquesta hipermutació letal inhibeix la replicació per modificació directa del genoma viral.



Vpr pot arrestar el cicle cel·lular, transactivar l'expressió tant de gens virals com cel·lulars, modular la cinètica de replicació viral i induir apoptosi, però la seva funció principal és la de facilitar la localització nuclear del complex de preintegració del VIH-1 (166).

Nef augmenta la infecciositat del VIH-1 permetent que el genoma viral penetri a través del citoesquelet d'actina cortical (34), un cop partícula viral i membrana cel·lular s'han fusionat. També redueix els nivells de CD4 de la cèl·lula provocant-ne la degradació per transport des de la superfície cel·lular a l'aparell de Golgi i als lisosomes (166).

Finalment, Vpu afavoreix la degradació de les molècules de CD4 sintetitzades al reticle endoplasmàtic, orgànul on simultàniament s'expressen el receptor CD4 i les glicoproteïnes de l'embolcall del VIH-1. Aquest fet afavoreix la formació de complexos CD4-Env que disminueixen la quantitat de proteïnes de l'embolcall disponibles pel procés d'assemblatge de nous virions. Vpu acaba alliberant les glicoproteïnes de l'embolcall que es troben formant complexos amb el receptor CD4, que s'acabarà degradant al proteasoma. Tot aquest procés aconseguirà optimitzar la infecciositat dels nous virus produïts per les cèl·lules infectades (166). Treballs recents també descriuen que Vpu inhibiria l'endocitosi de les partícules virals naixents dins la pròpia cèl·lula infectada, augmentant així la producció d'aquests nous virions (139).

### **1.3 Cèl·lules diana pel VIH-1 i tropisme cel·lular**

El VIH-1 pot infectar de forma productiva limfòcits T CD4+, macròfags i cèl·lules dendrítiques. Tots aquests tipus cel·lulars formen part del sistema immunitari i tenen en comú l'expressió del receptor viral CD4 a la seva superfície (49). La molècula de CD4 és una immunoglobulina, lligand natural del complex major d'histocompatibilitat (MHC, de l'anglès *major histocompatibility complex*) de tipus II. La funció natural de la molècula de CD4 és estabilitzar les interaccions entre el receptor de cèl·lules T (TCR, de l'anglès *T-cell receptor*), expressat pels limfòcits T CD4+, i la molècula d'MHC-II, expressada per les cèl·lules presentadores d'antigen "professionals" (APC, de l'anglès *antigen presenting*

cell). La unió de proteïnes de tipus quinasa al domini citoplasmàtic del receptor CD4 produeix la senyalització i activació del limfòcit T CD4+ (56, 76).

L'expressió del receptor CD4 a la cèl·lula diana és essencial però no suficient per a la seva infecció. La presència d'uns coreceptors del virus, com són els receptors de quimiocines CXCR4 i CCR5, és necessària per a la penetració de la partícula viral al citoplasma cel·lular (Fig. 4) (11, 57, 65). Aquests coreceptors formen part de la superfamília de receptors de quimiocines formats per set dominis transmembrana acoblats a proteïna G. La quimiocina CXCL12 (o SDF-1) és el lligand natural de CXCR4, mentre que CCL3 (o MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (o MIP-1 $\beta$ ) i CCL5 (o RANTES) ho són per CCR5. Aquestes quimiocines, unides al seu receptor, poden inhibir la infecció per VIH-1. S'han descrit també altres molècules, algunes d'elles receptors de quimiocines, que en cultiu podrien actuar també com a coreceptors de la infecció viral, com són CCR3, CCR2b, CCR8, CX3CR1, CCR9 o CXCR6 (54, 96, 126, 132, 182). Tot i la importància del receptor CD4 en la infecció viral, s'han descrit infeccions independents de CD4 i de coreceptor, a través del receptor CD8. Aquest fet ens podria estar indicant que el virus s'ha vist forçat a mutar per tal de poder usar altres molècules com a receptors (155).




	<b>CD4</b>	<b>CCR5</b>	<b>CXCR4</b>
			
<b>Estructura</b>	4 dominis tipus Ig	7 dominis transmembrana Receptor associat a proteïna G	7 dominis transmembrana Receptor associat a proteïna G
<b>Funció</b>	Coreceptor per MHC de classe II durant l'estimulació de limfòcits T col·laboradors	Receptor per CCL3 (MIP1- $\alpha$ ) CCL4 (MIP1- $\beta$ ) CCL5 (RANTES)	Receptor per CXCL12 (SDF-1)
<b>Expressió</b>	Limfòcits T CD4+ Macròfags Micròglia Cèl·lules dendrítiques	Poblacions de limfòcits T CD4+ de memòria	Constituitiu en nombrosos tipus cel·lulars, inclosos limfòcits T CD4+ i macròfags

Figura 4. El receptor i coreceptors del VIH-1. Figura adaptada de (63).

El tropisme és la capacitat que té el VIH-1 d'infectar determinats tipus cel·lulars i pot variar segons la soca viral. Al llarg del temps, s'han descrit fins a tres maneres diferents per classificar les soques del VIH-1 segons el seu tropisme, abans de l'actual, perquè no es coneixia l'existència de CXCR4 i CCR5.

La primera classificació definia soques M-tròpiques o T-tròpiques, segons si la soca viral infectava macròfags o limfòcits T CD4+, respectivament. Aquesta nomenclatura però, no tenia en compte la capacitat d'infectar limfòcits T CD4+ activats que tenen totes les soques de VIH-1. La segona classificació, tenia en compte la capacitat de la soca viral de produir cèl·lules gegants multinucleades, o sincicis, en la línia cel·lular MT-2, que expressa tan sols el coreceptor CXCR4 i no CCR5. D'aquesta manera, es classificaven com a soques formadores de sincicis (SI, de l'anglès *syncytium-inducing*) o no formadores de sincicis (NSI, de l'anglès *non-syncytium-inducing*). De nou, aquesta classificació no era del tot completa, ja que no contemplava la capacitat de les soques NSI de formar sincicis en cèl·lules que expressen el coreceptor CCR5. La tercera classificació, diferenciava entre les soques virals lentes (SL, de l'anglès *slow/low*) o ràpides (RH, de l'anglès *rapid/high*), segons la seva cinètica de creixement en cultiu *in vitro*. La classificació actual del tropisme de les soques virals, es basa en la capacitat d'aquestes d'usar un determinat coreceptor per a l'entrada del virus a la cèl·lula (Fig. 5). D'aquesta manera, les soques que utilitzen el coreceptor CCR5, i no CXCR4, s'anomenen soques R5; les que utilitzen CXCR4 però no CCR5 s'anomenen X4, i les soques amb capacitat d'utilitzar ambdós coreceptors amb eficiències semblants s'anomenen R5X4 o de tropisme dual (19). Si fem correspondre les diferents classificacions, les soques X4 correspondrien a les soques SI o T-tròpiques, i les R5 a les NSI o M-tròpiques .

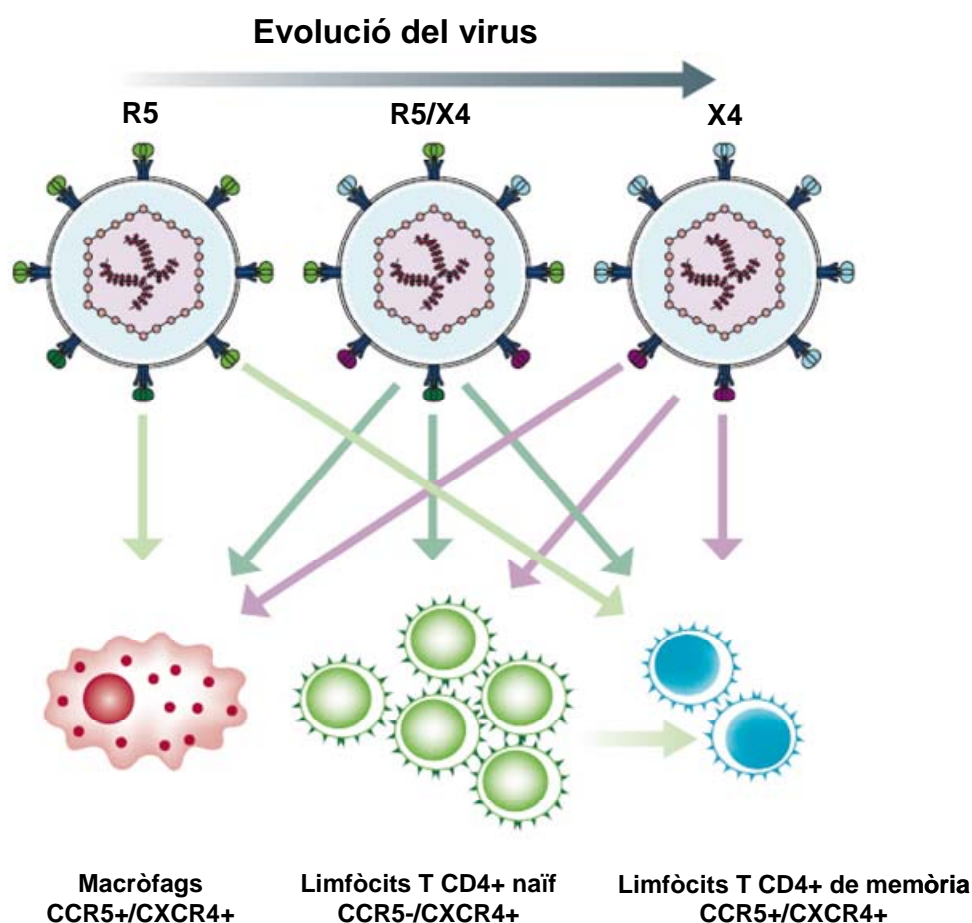


Figura 5. Evolució del virus i tropisme cel·lular. Figura adaptada de (63).

## 1.4 Cicle de replicació del VIH-1

El VIH-1 segueix l'esquema general de cicle de replicació d'un retrovirus. Es diferencien clarament dues fases: una fase primerenca, que comprèn des de l'entrada del virus a la cèl·lula fins a l'etapa d'integració del provirus al genoma de la cèl·lula hoste, i una fase tardana, que comprèn des de la transcripció dels gens virals fins a la formació dels nous virions (Fig. 6). En ambdues fases hi estan involucrades tant proteïnes del propi virus, com factors de la cèl·lula hoste.

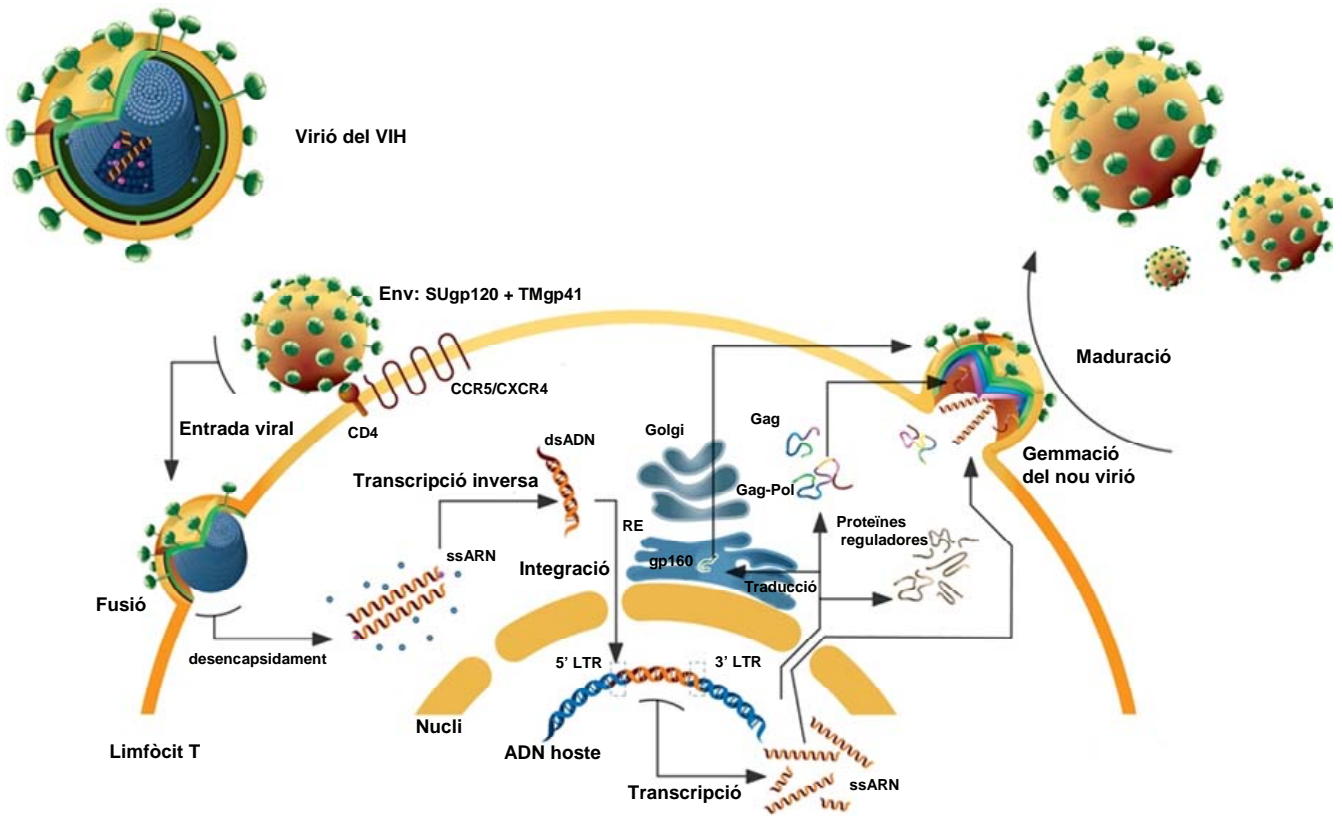


Figura 6. Esquema del cicle de replicació del VIH-1. Figura adaptada de [www.tibotec.com](http://www.tibotec.com)

Durant la fase primerenca, els processos són duts a terme per les proteïnes que aporta la partícula viral que ha infectat la cèl·lula, ja que en aquesta fase no es produeix encara la síntesi de proteïnes virals. La fase s'inicia amb la unió del virus a la cèl·lula diana per mitjà d'interaccions inespecífiques on hi poden participar molècules d'adhesió cel·lular (174). La unió de la glicoproteïna de l'embolcall SUgp120 al receptor cel·lular CD4 (49, 101) produeix uns canvis conformacionals en la mateixa SUgp120 que permeten la seva unió als coreceptors CXCR4 o CCR5 (20). Aquesta unió desencadena més canvis conformacionals en les proteïnes de l'embolcall que deixen al descobert el pèptid de fusió de la TMgp41, que fusionarà les membranes viral i cel·lular (72), permetent així l'alliberament de la capsida viral a l'interior del citoplasma cel·lular, on tindrà lloc la desencapsidació. Allí, la TI associada a l'ARN viral inicia la síntesi de l'ADN de doble cadena usant l'ARN com a motlle. Un cop la transcripció inversa ha finalitzat, l'ADN s'inclou al complex de preintegració (30), que és transportat al nucli cel·lular per mitjà de la proteïna Vpr i allí la IN

en permet la integració per la unió covalent de l'ADN viral amb el cel·lular (70). Com fan altres lentivirus, el VIH-1 és capaç d'entrar al nucli de cèl·lules que no estan en divisió (29, 69, 90, 175), com per exemple els macròfags. El provirus integrat dins el genoma cel·lular, pot romandre-hi de forma latent durant períodes llargs de temps (80, 157).

La fase tardana del cicle de replicació del VIH-1 s'inicia amb la transcripció de l'ADN proviral, procés transactivat per Tat. Mitjançant processos d'empalmament (o *splicing*, en anglès), es processa l'ARN obtingut donant lloc així a diferents transcrits virals (141). Rev s'encarrega de transportar els transcrits cap al citoplasma on tindrà lloc la traducció als diferents precursors de les proteïnes virals. Aquests precursors són transportats a la membrana cel·lular on s'assemblaran junt amb dues molècules senceres d'ARN viral. Tot seguit, es dona la gemmació de les noves partícules virals immadures en regions de la membrana plasmàtica on s'hi expressen les proteïnes de l'embolcall del VIH-1 (43). D'aquesta manera, durant el procés de gemmació, la nova partícula viral incorpora tant les proteïnes de l'embolcall viral (SUgp120/TMgp41) com altres proteïnes cel·lulars que li facilitaran la posterior infecció d'una nova cèl·lula. Ja per acabar, la PR duu a terme la proteòlisi dels precursors de les proteïnes codificades pels gens *gag* i *pol*, donant lloc així a partícules virals madures i amb capacitat d'iniciar un nou cicle d'infecció i replicació (103).

## 1.5 Curs de la infecció pel VIH-1 in vivo

*In vivo*, la infecció pel VIH-1 es caracteritza per tres etapes diferenciades: una fase aguda, una de crònica o de latència clínica i la fase final de SIDA (Fig. 7). La primera etapa, o fase aguda, és l'etapa en la que ha tingut lloc la primoinfecció i seroconversió de l'individu i es caracteritza per una elevada càrrega viral (nombre de còpies d'ARN viral /ml de plasma) juntament amb una disminució del nombre de limfòcits T CD4+ provocada per la disseminació del virus a l'organisme (39). Al mateix temps, una forta resposta immunològica és generada per l'individu per controlar la replicació del virus (112).

La segona etapa o fase crònica es caracteritza per un període asimptomàtic que pot oscil·lar entre un i deu anys, on l'individu és capaç de controlar la infecció però no de forma total. En aquesta fase, el virus es manté a nivells de replicació baixos, però amb capacitat de destrucció de les cèl·lules que infecta, obligant al sistema immunitari a generar noves cèl·lules T. Tot i que els nivells de càrrega viral no augmenten significativament, la disminució dels limfòcits T CD4+ és lenta, però continuada, fet que conduirà a l'individu a la destrucció progressiva de les cèl·lules del sistema immunitari i a un augment de la replicació viral (66, 93, 144, 177). Aquests dos factors d'augment de la càrrega viral i disminució de la funcionalitat del sistema immunitari de l'individu l'acabarà portant a la tercera i última fase, la SIDA (177). Aquesta fase comença quan un elevat nombre de cèl·lules T CD4+ són deplecionades i el sistema immunitari és incapaç de reestablir-ne la pèrdua (128). El recompte de cèl·lules T CD4+ cau fins a valors inferiors a les 200 cèl·lules/ml, mentre que la quantitat de virus presents en plasma augmenta fins a nivells comparables als que trobem als òrgans limfoides. Com a conseqüència, hi ha un fracàs immunitari que permet l'aparició d'infeccions oportunistes causades per virus, bacteris i fongs, i fins hi tot certs tipus de càncer. Abans de l'aparició dels tractaments antiretrovirals efectius, el temps mig per la progressió cap a la mort de l'individu era d'aproximadament 11 anys (109). Tot i això, un reduït nombre de pacients, anomenats no progressors de llarg termini, es mantenen asimptomàtics sense mostres de progressió de la malaltia en absència de tractament (37).

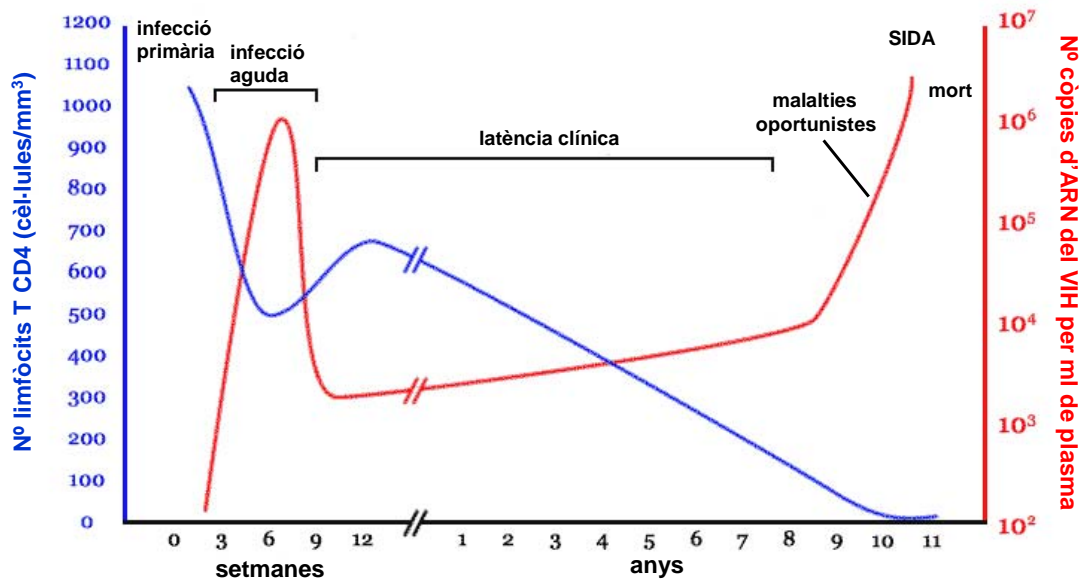


Figura 7. Curs de la infecció per VIH-1. Figura adaptada de (20).

En aquest procés d'infecció pel VIH-1, normalment les soques que són transmiseses d'un individu a un altre són de tipus R5, capaces d'infectar tant macròfags com cèl·lules T CD4+ primàries a través del coreceptor CCR5 (42, 160) i essent les prevalents durant el període asimptomàtic de la malaltia. Amb el temps, entre els tres i sis anys posteriors a la primoinfecció, les soques virals poden evolucionar cap a X4 o R5X4, podent infectar així altres línies cel·lulars T que expressen CXCR4 a la seva superfície. Hipòtesis sobre la major patogenicitat de les soques de tropisme X4 respecte les de tropisme R5, podrien explicar la destrucció massiva del sistema immunitari i la ràpida progressió cap a SIDA (21, 42, 160). Les causes per les que es dona aquest canvi de tropisme en les soques virals durant el curs de la infecció encara són font d'estudi, però la presència de CC quimiocines (lligands naturals del coreceptor CCR5) producte de la infecció per soques X4, en podria afavorir la seva expansió (113, 114, 123, 170, 173).



## 1.6 Intervenció terapèutica en la infecció pel VIH-1

El principal objectiu de la teràpia antiretroviral és intentar curar la infecció per VIH-1, o en el cas de no ser possible, intentar frenar la progressió de la malaltia. Per tal d'aconseguir-ho, s'intervé interferint el cicle de replicació del virus per tal de disminuir o revertir el progressiu deteriorament del sistema immunitari del pacient. Teòricament, qualsevol de les etapes del cicle viral, així com les proteïnes que hi intervenen, poden esdevenir diana pels agents antivirals (60, 134, 169) .

Des de mitjans de la dècada dels 90, el curs de la infecció pel VIH-1 s'ha modificat de forma destacada gràcies a l'aparició del tractament antiretroviral de gran activitat (TARGA o HAART, de l'anglès *highly active antiretroviral therapy*) (168). El coneixement dels mecanismes moleculars implicats en cada pas del cicle de replicació del VIH-1 proporciona una base essencial pel descobriment i desenvolupament de nous compostos antivirals i teràpies dirigides al bloqueig de la replicació viral i a la prevenció o retard de la malaltia. Les característiques del VIH-1 com a retrovirus el fan un virus difícil pel desenvolupament de teràpies efectives.

La TI del VIH-1 és un enzim sense activitat correctora d'errors, amb una freqüència d'incorporació d'error de  $10^{-4} - 10^{-5}$  parells de bases per cicle de replicació (146, 147), i si a aquest fet també es té en compte la naturalesa diploide del genoma d'ARN i l'elevada taxa de replicació (146), en poc temps es generen un elevat nombre de variants virals (81). Aquestes variacions de seqüència dels lentivirus, formant una estructura poblacional en quasiespècies (38) els converteixen en difícils dianes terapèutiques, ja que les pressions de selecció mitjançades pels fàrmacs antiretrovirals actuaran sobre aquesta estructura poblacional, i no sobre genomes individuals, afavorint una ràpida adaptació del virus als canvis del medi.

A part d'aquest procés de transcripció inversa, també cal tenir en compte com a dificultat afegida en el disseny de mecanismes per al control de la infecció per VIH-1 la integració del genoma viral al genoma de l'hoste.

La integració del provirus dins el genoma de la cèl·lula hoste permet als retrovirus comportar-se com a element genètic de l'hoste, fet que comporta que els provirus integrats puguin ser transmesos a la progènie cel·lular. Aquests

provirus integrats, poden a més mantenir-se en latència o expressar-se a molt baixos nivells, fet que dificulta l'acció de les drogues antivirals, que actuen principalment sobre virus replicants. És important també tenir en compte els anomenats santuaris virals (94, 151), reservoris virals on l'evolució del virus, la càrrega viral i els perfils de resistència a fàrmacs és diferent de l'observada en plasma. Els principals reservoris pel VIH-1 són el sistema nerviós central, el tracte genital i el teixit limfoide. En alguns casos el motiu del fracàs terapèutic en pacients podria estar causat per una penetració ineficient de les drogues en aquests compartiments, fet que propiciaria una replicació sostinguda del virus, selecció de resistències i el subseqüent fracàs en el control de la virèmia en plasma.

### **1.6.1 Etapes del desenvolupament d'un fàrmac**

En el procés de desenvolupament d'un fàrmac, podem distingir diferents etapes sequencials en el temps per les que aquest ha de passar abans de ser comercialitzat. El primer pas en el desenvolupament de fàrmacs és la definició del projecte, on s'identificarà i prioritzarà la diana d'acció o indicació terapèutica que es vol intervenir. Un cop definida la diana, un intens procés de cribatge a gran escala s'inicia amb la síntesi de milers de molècules tant per química combinatorial com convencional, que acabaran amb l'optimització d'una molècula ideal, que en la majoria de casos es patentarà. Aquesta molècula ideal passarà llavors a les fases d'assajos preclínic, on se'n determinarà la seva activitat, toxicitat, tolerància i farmacocinètica tant en assajos *in vitro* com en animals. Un cop superats els assajos preclínic, es passa ja a estudis en humans, que anomenarem assajos clínics. Aquí el compost ha de passar per tres fases diferents (assajos clínics de fase I fins a fase III) on es determinarà la seva seguretat i efectivitat en individus sans i malalts. Un cop superades aquestes fases clíniques i aprovada la seva comercialització per l'organisme pertinent de cada país, la molècula ja pot ser comercialitzada i sotmesa als posteriors assajos clínics de fase IV.

Actualment el temps d'explotació d'una patent de producte és de 20 anys, dels quals entre 10 i 15 transcorren durant el procés de desenvolupament del fàrmac, des de l'inici del projecte fins a la seva comercialització. Els costos

totals de tot el procés de desenvolupament poden ascendir a més de 500 milions d'euros.

### 1.6.2 Les drogues anti-VIH

La primera droga antiretroviral contra el VIH-1 que va aprovar al 1987 la FDA (de l'anglès, *Food and Drug Administration*) va ser un anàleg de nucleòsid que anomenaren Zidovudina o AZT (azidotimidina) (64, 104, 154, 178) i que basava la seva activitat en la inhibició de l'acció de la transcriptasa inversa (TI) del virus. A més de la família dels inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs de nucleòsid (ITIANs o NRTIs, de l'anglès *nucleoside reverse transcriptase inhibitor*) trobem els inhibidors de la transcriptasa inversa no anàlegs de nucleòsid (6) (ITINANs o NNRTIs, de l'anglès *non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor*) que van aparèixer anys més tard, després del descobriment i posterior aplicació a la clínica dels inhibidors de la proteasa (IPs) (142, 183). La combinació de dos inhibidors de la transcriptasa inversa juntament amb un inhibidor de la proteasa va donar lloc a la primera teràpia combinada del TARGA (102, 168). Des de l'aparició del primer fàrmac contra el VIH-1 s'han continuat desenvolupant noves classes de fàrmacs amb acció en diferents punts del cicle de replicació del virus. Fins al moment, es troben a la clínica un total de vuit ITIANs, tres ITINANs, deu IPs, els inhibidors de la fusió Enfuvirtide o T-20 (17, 18, 59, 106), un pèptid sintètic que impedeix l'entrada del virus a la cèl·lula unint-se a la subunitat TMgp41 del virus i l'inhibidor de CCR5 maraviroc, recentment aprovat per la FDA (2). Finalment trobem també el Raltegravir, el primer inhibidor de la integrasa del virus aprovat (Taula 1).

<b>Inhibidors de la Transcriptasa Inversa</b>
<b>Anàlegs de Nucleòsid</b>
Abacabir (ABC, Ziagen ®)
Didanosina (ddI, Videx ®)
Emtricitabina (FTC, Emtriva ®)
Lamivudina (3TC, Epivir ®)
Estavudina (d4T, Zerit ®)
Tenofovir (DF, Viread ®)
Zalcitabina (ddC, Hivid ®)
Zidovudina (AZT, Retrivir ®)
<b>Combinacions de fàrmacs</b>
Combivir ® (AZT+3TC)
Epzicom ® o Kivexa ® (ABC + 3TC)
Trizivir ® (ABC + 3TC + AZT)
Truvada ® (FTC + DF)
Atripla ® (EFV + FTC + DF)
<b>No anàlegs de Nucleòsid</b>
Delavirdina (DLV, Rescriptor ®)
Efavirenz (EFV, Sustiva ®)
Nevirapina (NVP, Viramune ®)
<b>Inhibidors de la Proteasa</b>
Amprenavir (AMP, Agenerase ®)
Atazanavir (ATZ, Reyataz ®)
Fosamprenavir (GW-433908, Lexiva ®)
Indinavir (IDV, Crivixan ®)
Nelfinavir (NFV, Viracept ®)
Ritonavir (RTV, Norvir ®)
Saquinavir (SQV, Fortovase ®, Invirase ®)
Tipranavir (TPV, Aptivus ®)
Lopinavir (ABT-378)
Darunavir (TMC114, Prezista ®)
<b>Combinacions de fàrmacs</b>
Kaletra ® (ABT-378 + RTV)
Telzir ® (RTV + GW-433908)
<b>Inhibidors de Fusió</b>
Enfuvirtide (T-20, Fuzeón ®)
Maraviroc (UK-437,857, Selzentry ®)
<b>Inhibidors de la Integrasa</b>
Raltegravir (MK-0518, Isentress ®)

Taula 1. Fàrmacs inhibidors del VIH-1 a la clínica. Dades d'octubre de 2007.

### 1.6.3 Noves dianes terapèutiques

Gràcies als tractaments antiretrovirals, s'ha aconseguit que la càrrega viral dels pacients es mantingui durant molt de temps de forma indetectable o molt baixa i com a conseqüència el nombre de cèl·lules T CD4+ vagi en augment fins a mantenir-se a nivells estables (107). Aquest fet ha desencadenat que la infecció pel VIH-1 es pugui arribar a considerar amb el temps una malaltia crònica. Tot i l'existència d'aquests tractaments, cal recordar que gràcies a la gran capacitat de mutació del virus, l'aparició de mutacions de resistència als fàrmacs permet al VIH-1 escapar de l'acció d'aquests, fent-los ineficaços per al control de la malaltia i portant al pacient a nombrosos canvis de tractament, i en molts casos al posterior fracàs terapèutic (40, 78, 95, 116).

A més de l'aparició de variants resistents, els efectes de toxicitat a llarg termini dels tractaments actuals, així com la manifestació de la lipodistrofia associada al tractament amb antiretrovirals, han posat de manifest la necessitat de noves classes de drogues antiretrovirals per fer front a la infecció per VIH-1. Diferents etapes del cicle de replicació del virus són potencials dianes per a la intervenció terapèutica, diferenciant principalment entre esdeveniments d'entrada i esdeveniments post-entrada (63).

Degut al gran interès que ha despertat el disseny de noves drogues que actuen a etapes diferents a les ja emprades en la clínica, un gran nombre de grups de recerca s'han dedicat a desenvolupar drogues amb acció en les etapes d'entrada i fusió del virus a la cèl·lula diana (63, 133). L'entrada i fusió del VIH-1 a la cèl·lula diana es presenta com a una bona alternativa en el desenvolupament de nous fàrmacs per a la clínica de cara a poder tractar amb èxit aquells pacients que han fracassat en la resta de tractaments existents.

A més de l'etapa de fusió de membranes, dins l'entrada viral podem discriminar dues etapes més com a possibles dianes, la unió del virus al receptor CD4 per mitjà de la SUgp120, i la posterior unió d'aquesta mateixa proteïna viral de superfície amb els coreceptors CXCR4 o CCR5 (Taula 2).

Compost	Diana	Fase de desenvolupament	Desenvolupat per
<b>PRO542</b>	CD4	II (aturat 2006)	Progenics
<b>TNX-355</b>	CD4	II (2006)	Tanox
<b>Sifurvitide</b>	TMgp41	I	FusoGen Pharmaceuticals
<b>TR-291144 i TR-290999</b>	TMgp41	preclínic	Roche + Trimeris
<b>KRH-3955 i KRH-3140</b>	CXCR4	preclínic	Kureha Chemical Industry
<b>AK602</b>	CCR5	I	Kumamoto University
<b>PRO140</b>	CCR5	I (aturat 2005)	Progenics
<b>Vicriviroc (SCH-D)</b>	CCR5	II-III (2007)	Schering Plough
<b>INCB9471</b>	CCR5	II (2007)	Incyte Corporation
<b>TAK-652</b>	CCR5	I (2006)	Takeda
<b>HGS004</b>	CCR5	I (2006)	Human Genome Sciences
<b>SP01A</b>	Unió a colesterol	II (2006)	Samaritan Pharma

**Taula 2. Drogues en estudis clínics amb acció en etapes d'entrada del virus a la cèl·lula.** Dades d'octubre de 2007.

L'últim fàrmac aprovat per la FDA per al seu ús en teràpia contra el VIH en pacients multitractats (2, 136) és l'inhibidor de CCR5 maraviroc de Pfizer (2, 55). La seva formulació en pastilles i no per via intravenosa com requereix T-20 i els resultats positius obtinguts en els assajos clínics de fase III realitzats fins al moment, han fet de maraviroc el primer inhibidor de coreceptor aprovat per al seu ús en la clínica.

Un factor però a tenir en compte amb els inhibidors de coreceptor (fins al moment, maraviroc per CCR5 o futurs inhibidors de CXCR4) és la més que possible demanda d'un prova de tropisme viral en el pacient prèvia a l'inici del tractament (3). Cal tenir en compte que, com s'ha esmentat anteriorment, la majoria de primoinfeccions es donen amb virus de tropisme R5, però al llarg de la infecció per VIH els virus poden canviar el tropisme R5 per l'X4 o el R5X4. Aquest fet podria limitar l'ús d'inhibidors de coreceptor a pacients amb un determinat tropisme viral. A més de la pròpia evolució de cada pacient en el tropisme viral, el fet d'usar inhibidors d'un determinat coreceptor planteja la possibilitat que això indueixi l'ús del coreceptor que no s'està interferint.

En el cas concret de maraviroc i els inhibidors de CCR5, si com a conseqüència s'indueix l'ús de soques amb tropisme X4, s'haurien de tenir molt en compte en els efectes en el pacient, a l'associar-se aquestes soques X4 a un avanç més ràpid de la malaltia (179). Tots aquests factors fan pensar en la necessitat de dissenyar els tractaments d'una manera més personalitzada a l'estat de cada pacient.

Una segona generació de pèptids inhibidors de la fusió, derivats de la regió HR2 de la TMgp41 (TR-291144 i TR-290999) s'estan avaluant en estudis preclínic. Una millor activitat antiviral enfront virus salvatges i resistents a T-20, així com una millor biodisponibilitat per tal de subministrar-los un cop per setmana en comptes de dos cops al dia, són algunes de les millores que es busca en ells.

Altres dianes terapèutiques per fer front a la infecció per VIH, a part de les ja conegudes, també passen per la inhibició de l'enzim viral integrasa, la fase de maduració i la interferència en l'acció de la transcriptasa inversa amb una estratègia diferent a l'actual (Taula 3).

Compost	Diana	Fase de desenvolupament	Desenvolupat per
<b>Racivir</b>	TI (ITIAN)	II	Pharmasset
<b>Elbucitavina</b>	TI (ITIAN)	II	Achillion
<b>Apricitavina (AVX754)</b>	TI (ITIAN)	II	Avexa Pharmaceuticals
<b>Etravirina (TMC-125)</b>	TI (ITINAN)	III-EAP	Tibotec
<b>Rilpivarina (TMC-278)</b>	TI (ITINAN)	II	Tibotec
<b>BILR-355</b>	TI (ITINAN)	II	Boehringer-Ingelheim
<b>PPL-100</b>	PR	I	Ambrilia Biopharma
<b>Brecanavir (GW640385)</b>	PR	II (aturat)	GlaxoSmithKline
<b>GS-9137</b>	IN	II	Gilead Sciences
<b>GSK364735</b>	IN	I	GlaxoSmithKline + Shinogi
<b>Bevirimat (PA-457)</b>	Maduració	II	Panacos Pharmaceutical
<b>UK-201844</b>	Maduració	preclínic	Pfizer
<b>KP-1461</b>	TI (NMC)	I	Koronis Pharmaceutical

**EAP:** Expanded access program

**NMC:** nucleòsid mutagènic competidor

**Taula 3. Drogues en estudis clínics amb acció en etapes post-entrada del virus a la cèl·lula.** Dades d'octubre de 2007.

Sembla que la incorporació dels inhibidors de la IN a la clínica no es farà esperar molt, degut a la recent aprovació del Raltegravir. Els resultats dels assajos clínics de fase III presentats recentment van mostrar resultats esperançadors pel que fa a reducció de la càrrega viral, i al nivell de triglicèrids i colesterol en sang dels pacients tractats, obtenint resultats millors als observats amb tractaments amb ITINANs i inhibidors de la PR.

Pel que fa referència als inhibidors de la maduració, aquests actuarien unint-se a les proteïnes que processa la PR viral, impedit-ne així el seu processament, i donant partícules virals immadures, incapaces d'infectar una nova cèl·lula. Actualment trobem el Bevirimat de Panacos Pharmaceutical en estudis de fase II i el UK-201844 de Pfizer en fases preclíniques.

Finalment, Koronis Pharmaceuticals ha desenvolupat un nucleòsid mutagènic competidor de la TI que actualment es troba en estudis de fase I. A diferència d'altres medicaments contra el VIH que busquen limitar la capacitat de mutar del virus, el KP-1461 actuaria forçant al VIH a fer tantes mutacions que l'impedissin poder replicar (l'anomenada mutagènesi terminal). Aquest medicament però, planteja difícils interrogants sobre com se n'ha d'estudiar i avaluar el seu efecte en humans.

Amb tot aquest nou marc d'intervenció terapèutica, nous objectius centrats en factors cel·lulars que intervenen en la infecció del VIH han despertat l'interès de l'empresa farmacèutica. És el cas d'APOBEC3G, un factor cel·lular que actua naturalment a la cèl·lula inhibint el VIH. Vif interfereix amb APOBEC3G de dues maneres, adherint-s'hi i fent que aquest es descompongui i quedi inactiu enfront el VIH i també per una senyalització cel·lular de regulació negativa. Aquesta intervenció de Vif sobre APOBEC3G acaba amb l'esgotament d'aquest a la cèl·lula. L'objectiu en aquest cas, seria intervenir en la interacció entre Vif i APOBEC3G, de manera que Vif al no poder unir-se a l'enzim, aquest no en veies disminuïda la seva producció a la cèl·lula, podent actuar així en el bloqueig del VIH.

SP01A, de la companyia Samaritan Pharmaceuticals, s'ha desenvolupat com a un nou compost, actualment en assajos clínics de fase II, que modula el contingut de colesterol a la membrana de la cèl·lula diana, fet que dificultaria l'entrada del virus a la cèl·lula en el moment d'infecció. Els resultats dels assajos clínics presentats, mostren una disminució en els nivells de càrrega



viral dels pacients tractats, especialment quan es subministra com a adjuvant d'algun altre antiretroviral en clínica. El seu ús en monoteràpia també es té en compte de cara a futurs assajos clínics.

## 2. Objectius

---

Donada la necessitat d'incorporar nous fàrmacs en la teràpia contra el VIH, un abundant nombre de compostos de nova síntesi han estat dissenyats per inhibir les diferents etapes del VIH-1. La importància de determinar la capacitat d'aquests nous compostos per a inhibir la replicació del virus tant en soques salvatges com en soques resistents als actuals tractaments, ens va plantejar els següents objectius:

1. Estandaritzar i implementar un assaig a gran escala que ens permetés avaluar de forma simultània l'activitat antiviral d'un gran nombre de compostos, mantenint la fiabilitat i reproductibilitat dels assajos individuals fins ara realitzats.
2. Desenvolupar un assaig que permetés determinar i discernir de forma ràpida el mecanisme d'acció de drogues que actuen a nivell d'entrada i fusió del VIH-1 a la cèl·lula diana.
3. Determinar l'activitat antiviral i mecanisme d'acció de compostos de nova síntesi dissenyats contra noves dianes del virus, com l'entrada del virus a la cèl·lula diana i la unió als coreceptors virals.
4. Determinar la capacitat d'inhibir soques salvatges i resistents del VIH-1 de nous compostos inhibidors de la transcriptasa inversa no anàlegs de nucleòsid amb disseny millorat respecte els actuals.



## 3. Material i Mètodes

---

### 3.1. Línies cel·lulars i medis de cultiu

#### 3.1.1 Línies cel·lulars estables

**MT-4.** Línia cel·lular provinent de cèl·lules T humanes aïllades d'un pacient amb leucèmia de cèl·lules T (provocada per la infecció per HTLV-I, virus de la leucèmia humana de cèl·lules T de tipus 1) obtinguda al laboratori a través de l'*NIH AIDS Research & Reference Reagent Program*, Bethesda, EUA. L'HTLV és el responsable de l'elevada sensibilitat a la mort d'aquestes cèl·lules, fet que les considera apropiades per al seu ús en assajos d'infecció per VIH-1 on es vol determinar l'efecte en la mort cel·lular. Es cultiven en suspensió amb medi RPMI 1640 L-Glutamine (GIBCO, Invitrogen, Espanya) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (SBF) (Cambrex, Espanya) inactivat per temperatura (30 minuts a 56° C), 100 U/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomicina (GIBCO, Invitrogen, Espanya) i mantingudes a l'incubador a una temperatura de 37° C i un 5% de CO<sub>2</sub>. És una línia cel·lular que expressa entre d'altres CD4 i CXCR4 a la seva superfície.

**CEM-CCR5 (A3.01/CCR5-F7).** Línia cel·lular T CD4+ humana. Clon F7 de la cèl·lula A3-01 que expressa CCR5, amb resistència a genètica (G418). Obtingudes del *Medical Research Council (MRC) Centralised Facility for AIDS Reagents*, Gran Bretanya. Es cultiven en suspensió amb medi RPMI 1640 L-Glutamine (GIBCO, Invitrogen) suplementat amb un 10 % de SBF inactivat per temperatura (Cambrex), 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina (GIBCO, Invitrogen) i 1 mg/ml G418 (Invitrogen) i mantingudes a l'incubador a una temperatura de 37° C i un 5% de CO<sub>2</sub>. Expressa CD4, CXCR4 i CCR5 a la seva superfície.

**MOLT-4/CCR5.** Línia cel·lular humana d'origen limfoide. Obtinguda al laboratori a través de *NIH AIDS Research & Reference Reagent Program*. Es cultiven en suspensió amb medi RPMI 1640 L-Glutamine (GIBCO, Invitrogen) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (SBF) (Cambrex) inactivat per temperatura (30

minuts a 56° C), 100 U/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomicina (GIBCO, Invitrogen), i mantingudes a l'incubador a una temperatura de 37° C i un 5% de CO<sub>2</sub>. És una línia cel·lular que expressa CD4, CXCR4 i CCR5 a la seva superfície.

### 3.1.2 Cèl·lules primàries

Les cèl·lules primàries utilitzades en aquest treball es van obtenir a partir de sang de donants sans del Banc de Sang i Teixits de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona. A partir del subministre de la fracció de cèl·lules o capa leucoplaquetària (de l'anglès *buffy coat*), es va diluir a la meitat amb tampó fosfat salí (PBS, de l'anglès *phosphate buffered saline*, Roche, Espanya) en un volum final de 45 ml i es va procedir a dues centrifugacions consecutives a 900 revolucions per minut (rpm) durant 15 minuts a partir de les quals es van obtenir dues fraccions. La fracció superior, que contenia plasma i plaquetes, es descartava i la fracció inferior, enriquida en eritròcits i leucòcits, va ser sotmesa a un gradient de densitat Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™, ATOM S.A, Espanya). A partir d'aquest gradient, 30 minuts de centrifugació a 1850 rpm, amb acceleració i desacceleració lentes, es va recuperar la capa leucocitària formada pels PBMCs (cèl·lules mononucleades de sang perifèrica, de l'anglès *peripheral blood mononuclear cells*), que apareixia diferenciada de la resta de cèl·lules sanguínies. Aquest núvol de PBMCs es va rentar dues vegades amb PBS, 5 minuts a 1400 rpm, en un volum final de 45 ml. La població de PBMCs obtinguda es va mantenir amb medi base, format per RPMI 1640 L-Glutamine (GIBCO, Invitrogen) suplementat amb un 20% de sèrum boví fetal (SBF) (Cambrex) inactivat per temperatura (30 minuts a 56° C), 100 U/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomicina (GIBCO, Invitrogen).

**Limfòcits T CD4+ no estimulats.** Per obtenir limfòcits T CD4+ no estimulats, es va partir dels PBMCs i es va procedir a una purificació de la població desitjada per mitjà d'un mètode de selecció magnètica negativa. Aquest mètode consistia en la incubació d'un determinat nombre de PMBCs resuspesos amb PBS suplementat amb un 2% de SBF inactivat per temperatura, amb un còctel d'anticossos dissenyat per a la purificació específica de la població de limfòcits

T CD4<sup>+</sup> (StemCell Technologies, Vancouver, Canadà). La incubació amb aquest còctel, format per anticossos monoclonals dirigits contra les cèl·lules CD8, CD14, CD16, CD19, CD56 o glicoforina A positives i que alhora estaven dirigits contra dextrà, era de 15 minuts a temperatura ambient. Passada la primera incubació, es procedia a una segona incubació de mateixa durada, amb una suspensió col·loidal de partícules magnètiques de dextrà i ferro. Un cop finalitzades les dues incubacions, els PBMCs eren introduïts a una columna, de manera que sotmesos a un camp magnètic, les cèl·lules no desitjades quedaven retingudes a la columna i es recuperaven així específicament els limfòcits T CD4<sup>+</sup>. Per tal de comprovar la puresa de la purificació cel·lular obtinguda, es marcaven amb el còctel d'anticossos de superfície TriTEST (CD4-FITC/ CD8-PE/ CD3-PerCP) (BD, Espanya) i s'analitzaven amb un citòmetre de flux FACScalibur (BD). La puresa mínima que s'obtenia de les purificacions era del 95%. Aquests limfòcits T CD4<sup>+</sup> obtinguts eren resuspesos a una concentració final d' $1 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml, en RPMI 1640 L-Glutamine (GIBCO, Invitrogen) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (SBF) (Cambrex) inactivat per temperatura (30 minuts a 56° C), 100 U/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomicina (GIBCO, Invitrogen) i mantinguts a l'incubador a 37° C i un 5% de CO<sub>2</sub>. El protocol de marcatge es detalla més endavant dins l'apartat 3.8 de citometria de flux.

### 3.1.3 Cèl·lules MOLT-4/CCR5 crònicament infectades

Les cèl·lules MOLT-4/CCR5 crònicament infectades amb diferents soques de VIH-1, van ser generades al nostre laboratori després de la infecció amb l'aïllat clínic VIH-1<sub>CI-1-SI</sub> (MOLT-4/CCR5 CI-1-SI) i amb els virus recombinants amb l'esquelet de la soca viral VIH-1<sub>HXB2</sub> i les proteïnes de l'embolcall de les soques VIH-1<sub>NL4-3</sub> (MOLT-4/CCR5 NL4-3) o VIH-1<sub>BaL</sub> (MOLT-4/CCR5 BaL). Després del pic d'infecció, es van fer créixer els cultius persistentment infectats en els que es va analitzar al producció viral i l'expressió dels gens de l'embolcall del VIH-1. Com a control negatiu es va utilitzar la línia cel·lular no infectada MOLT-4/CCR5 (22).

## 3.2 Soques virals

Les soques de laboratori usades en aquest treball han estat la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>, obtinguda del NIH (*National Institut of Health*, Bethesda, EUA) i amb tropisme X4, i les soques VIH-1<sub>K103N</sub>, VIH-1<sub>Y181C</sub> i VIH-1<sub>Y188L</sub>, amb mutacions de resistència a ITINANs en la TI, obtingudes de MRC, i també de tropisme X4, generades sobre un esquelet de VIH-1<sub>HXB2</sub>.

La soca VIH-2<sub>ROD</sub> també va ser obtinguda del NIH i és una soca salvatge de VIH-2 (85).

També s'han utilitzat les soques VIH-1<sub>NL4-3</sub>AMD3100res i VIH-1<sub>NL4-3</sub>T-20res, resistents als inhibidors d'entrada AMD3100 i T-20 respectivament, i generades al nostre laboratori (13, 17). A més de les soques de laboratori esmentades, també s'han emprat els aïllats clínics VIH-1<sub>Cl-1-SI</sub> (13, 61) amb múltiples mutacions en les regions V2 i V3 de la glicoproteïna SUgp120 de l'embolcall, entre d'altres, que li confereixen resistència a diversos inhibidors, i el VIH-1<sub>IRLL98</sub> (31, 122) amb mutacions en la PR i la TI que li confereixen resistència a ITIANs i ITINANs. Ambdós aïllats clínics són de tropisme X4.

### 3.2.1 Generació d'un estoc viral

Totes les soques virals emprades en aquest treball s'han fet créixer en cèl·lules MT-4 per a la generació d'estocs virals que posteriorment s'han genotipat i fenotipat per a determinar-ne el seu patró de resistències a les diferents drogues antivirals control.

Un total de  $5 \cdot 10^6$  cèl·lules MT-4 es centrifuguen 5 minuts a 1400 rpm, es resuspenen en un volum aproximat de 10 ml, i s'infecten amb una quantitat de virus que pot variar segons la infecciositat inicial d'aquest. En el nostre cas i per a la generació d'estocs de les soques adquirides de l'NIH, es van infectar amb 100 µl de cada estoc. L'evolució de la mort de les cèl·lules MT-4 induïda pel VIH-1 es va seguir dia a dia per mitjà del comptatge al microscopi i valoració de la mort cel·lular al cultiu amb blau de tripà. L'evolució de la replicació viral al cultiu es va fer per mitjà de l'avaluació de la producció de l'antígen viral CAp24 al sobrenedant amb un ELISA comercial (de l'anglès, *enzyme-linked immunosorbent assay*, INNOTEST™ HIV antigen mAb, Innogenetics, Espanya). Quan la mort cel·lular va assolir valors superiors al 70% del total del cultiu i la producció d'antígen CAp24 valors aproximats a  $1 \cdot 10^6$  pg/ml, es va centrifugar el

cultiu 5 minuts a 1400 rpm i s'aliquotà i guardà el sobrenedant a  $-80^{\circ}$  C fins al seu ús.

A partir del sediment cel·lular resultat de la centrifugació, es va extreure l'ADN viral integrat per mitjà d'un *kit* comercial (QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Espanya), s'amplificà la regió SUgp120 amb els encebadors apropiats i es va procedir a la seqüenciació de la regió amb el dRhodamine Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EUA) (61).

### 3.3 Compostos i anticossos amb activitat antiviral

Els següents compostos i anticossos van ser usats per a la inhibició de la replicació del VIH-1 en les diferents etapes del cicle viral.

**3.3.1 Inhibidors de l'entrada viral.** Dextrà sulfat (DS), polianió que inhibeix la unió del virus a la cèl·lula diana (Sigma, Espanya); l'anticòs monoclonal humà anti-gp120 IgGb12 (MRC) i l'anticòs monoclonal anti-CD4 Leu3a (BD, Espanya), que inhibeixen la unió CD4-SUgp120; l'antagonista de CCR5 TAK-779 (NIH, EUA) i l'anticòs monoclonal anti-CCR5 2D7 (BD, Espanya); l'antagonista de CXCR4 AMD3100 i els pèptids sintètics de la proteïna TMgp41 inhibidors de la fusió C-34 (12) i DP178 o T-20 (100) (sintetitzats pel Servei de Síntesi de Pèptids de la Universitat de Barcelona). Els diferents compostos de la família dels BMS que s'avaluen en el capítol de resultats van ser sintetitzats pel Departament de Química Orgànica, a la Facultat de Química, de la Universitat de Barcelona. Els compostos inhibidors de CXCR4 que s'avaluen en el capítol de resultats van ser sintetitzats pel Grup d'Enginyeria Molecular (GEM), Institut Químic de Sarrià (IQS), Universitat Ramon Llull, Barcelona (148).

**3.3.2 Inhibidors de la TI.** Es van fer servir com a inhibidors control de la TI l'ITIAN azidotimidina o AZT (Sigma, Espanya) i els ITINANs nevirapina i efavirenz (ambdós de l' NIH, EUA). Els diferents ITINANs que s'avaluen en el capítol de resultats van ser sintetitzats per l'Istituto di Genetica Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche di Pavia (Itàlia) (36), pel Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Università degli Studi di Siena (Itàlia) (122) i per



l'Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti, Dipartimento di Studi Farmaceutici, Università degli Studi di Roma "La Sapienza" (Itàlia) (119).

**3.3.3 Inhibidors de la proteasa i d'integració.** Com a compostos inhibidors de la proteasa del virus i de la integració es van utilitzar els compostos Ritonavir (NIH, EUA) i L731-988 (Merck, Espanya) respectivament.

### **3.4 L'assaig d'MTT (3-[4,5-Dimetiltiazole-2-il]-2,5-difeniltetrazol-bromit)**

Aquest assaig s'ha fet servir al llarg de la tesi per a determinar la viabilitat de les cèl·lules en cultiu per colorimetria, tant en cultius infectats (com els assajos d'activitat antiviral) com en cultius no infectats (en assajos on es vol determinar la toxicitat de determinats compostos en cultiu). La reducció del bromur de la sal de tetrazoli (MTT), de color groc, a sal de formazant, de color lilós, es dona per l'acció de la succinat deshidrogenasa dels mitocondris de les cèl·lules viables. D'aquesta manera, les cèl·lules del cultiu que siguin viables, reduiran aquesta sal i donaran un color lilós, mentre que les cèl·lules que hagin mort en el cultiu (per acció citotòxica d'algun compost o bé per l'acció del VIH-1), no la metabolitzaran i el cultiu quedarà de color groc.

El primer assaig colorimètric amb la sal de tetrazoli es publicà al 1983 (135) com a eina per a la quantificació de la supervivència i la proliferació de cèl·lules de mamífer, però presentava diverses limitacions, com problemes de baixa sensibilitat o elevada variabilitat en les lectures. Tres anys més tard es milloraren les limitacions que aquest presentava (51), oferint així al nou protocol més fiabilitat i sensibilitat, comparable en molts casos a la donada pels assajos amb timidina tritiada. Basant-nos en aquestes modificacions del protocol, i usant el metil de tetrazoli comercial (Sigma-Aldrich, Espanya), l'assaig està estandaritzat per a placa de 96 pous amb un volum final de 200 µl i per cèl·lules MT-4, tot i que també és aplicable a altres línies cel·lulars en suspensió i adherents.

Partint d'un cultiu de 200 µl en placa de 96 pous, que ha estat incubat durant la durada de l'experiment a 37° C i un 5% de CO<sub>2</sub>, s'afegeixen 20 µl de la solució d'MTT a 7,5 mg/ml en PBS 1x (10% del volum final). S'incuba durant una hora

a l'incubador de CO<sub>2</sub>, a 37° C (el temps d'incubació pot variar segons el tipus cel·lular). A continuació s'eliminen 150 µl del sobrenedant del cultiu i s'hi afegeixen 150 µl de la solució de solubilització (isopropanol: Tritó X-100: HCl (37%) a una relació v/v de 5: 0,3: 0,03). Es deixa a temperatura ambient i a la foscor fins que es dissolgui completament el formazant i es llegeix l'absorbància de la preparació a una longitud d'ona de 550 nm utilitzant una referència de 620 nm.

### **3.5 Titulació d'un estoc viral en cèl·lules MT-4**

Per a la titulació d'un estoc viral en cèl·lules MT-4 per al seu ús en assajos d'avaluació de l'activitat antiviral de diferents compostos contra el VIH-1, es segueix el següent protocol. En plaques de 96 pous (96 Microwell plates, Nunc) i mitjançant una pipeta electrònica multicanal, s'omplen tots els pous, excepte els pous 2B:2G, amb 100 µl de medi de cultiu RPMI 1640 L-Glutamine (GIBCO, Invitrogen) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (SBF) (Cambrex) inactivat per temperatura (30 minuts a 56° C), 100 U/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomicina (GIBCO, Invitrogen) (a partir d'ara R10). S'afegeixen 125 µl d'una dilució baixa i coneguda del virus a titular als pous 2B:2G, i es fan nou dilucions seriades de factor cinc (1/5), en sèries de sis pous, de la columna dos a la deu. Els sis pous de la columna 11 (11B:11G) es deixen sense virus, com a control de cultiu no infectat. A continuació s'afegeixen 50 µl de medi als 60 pous centrals de la placa (2B:11G). S'afegeixen després 50 µl de cèl·lules MT-4 prèviament centrifugades i resuspeses a una concentració final de  $0,6 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml en medi R10, als 60 pous centrals, dispensant així un total de 30.000 cèl·lules MT-4 per pou. Finalment s'afegeixen 100 µl de R10 als pous perifèrics, i s'incuba durant cinc dies a 37° C i un 5% de CO<sub>2</sub>.

Després de cinc dies, es realitza l'assaig d'MTT (detalls a l'apartat 3.4) i es calcula la dilució màxima del virus que dona el mínim d'absorbància. Aquella dilució de l'estoc serà la necessària per a realitzar les proves d'avaluació de l'activitat anti-VIH-1 de compostos contra aquell estoc viral.

Per a les proves d'avaluació de l'activitat anti-VIH-1 de diferents compostos, s'inclou com a control de la infecció el títol del virus usat en cada assaig. El procediment en aquest cas, és el mateix que s'ha descrit en aquest apartat, però en el pas d'afegir els 125 µl de virus a la columna dos, s'afegeixen d'una dilució de factor dos de la dilució final de virus que s'afegirà a les plaques (especificacions a l'apartat següent).

### **3.6 Avaluació de l'activitat anti-VIH-1 i la citotoxicitat de compostos en cèl·lules MT-4 per MTT**

Amb la finalitat de tenir les cèl·lules a un estat òptim de creixement i tenint en compte que el temps de duplicació de les MT-4 és d'aproximadament 24 hores, el dia anterior a l'inici de l'assaig d'avaluació de l'activitat antiviral, es preparen les cèl·lules a una concentració de  $0,6 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml en R10.

Usant les plaques de 96 pous amb fons pla i una pipeta multicanal electrònica, s'omplen tots els pous amb 100 µl de medi de cultiu R10.

Es prepara un estoc de treball de cada compost a testar a una concentració deu vegades concentrada (10x) de la concentració inicial a la que es vol determinar la seva possible activitat antiviral.

Si per exemple es vol que la primera concentració de compost a testar sigui 10 µg/ml, s'haurà de preparar tanta quantitat com sigui necessària (un mínim de 25 µl/pou, per sis rèpliques de cada compost) a una concentració deu vegades més concentrada de la concentració desitjada. Així doncs, es prepararia el compost a testar a una concentració de 100 µg/ml, en medi de cultiu R10, a partir d'una solució estoc mare del compost més concentrada, que normalment estarà resuspesa a una concentració elevada (per exemple 20 mg/ml) i dissolta en sulfòxid de dimetil (DMSO). El fet de tenir l'estoc mare del compost dissolt en DMSO, és un factor a tenir en compte ja que el DMSO a una concentració superior al 0,8 % final en el cultiu, resulta tòxic a les cèl·lules MT-4. Per aquest motiu, els compostos que es resuspenen en DMSO, cal tenir-los el més concentrats possible per tal de diluir-los el suficient per evitar així toxicitats derivades del propi disolvent, i no del compost en sí.

Un cop es té el compost preparat, s'afegeixen 25 µl a dues sèries de tres pous de la segona columna de la placa de 96 pous (2B:2G) tal i com mostra la figura 8, obtenint ara el compost a una concentració final de 2x.

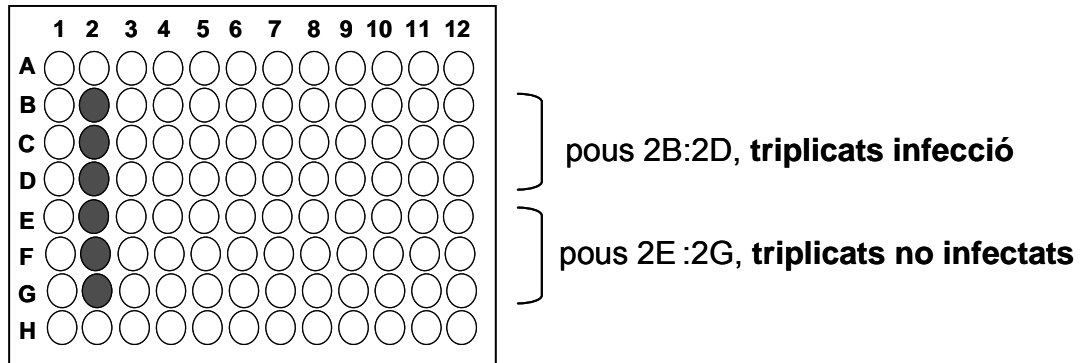


Figura 8. Disposició dels compostos 10x concentrats en la placa de 96 pous

A continuació es passa a fer dilucions seriades de factor cinc del compost (dels sis pous centrals B:G) des de la segona columna fins a la desena, com es mostra a la figura 9. La columna 11 quedarà com a columna control sense compost, donant així el valor de màxima mort cel·lular induïda pel virus (pous 11B:11D) i el valors de màxima viabilitat cel·lular (pous 11E:11G) sense infectar.

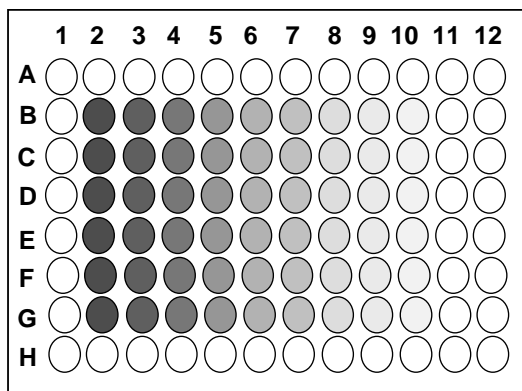


Figura 9. Dilucions 1/5 a partir de la primera columna amb el compost 10x concentrat

Un cop diluït el compost, s'afegeixen 50 µl de medi de cultiu R10 a la sèrie inferior no infectada (pous 2E:11G).

El següent pas és afegir 50 µl d'una dilució de l'estoc viral 4x la concentració final calculada en l'assaig previ de titulació (detallat a l'apartat anterior), als pous de la sèrie infectada (2B:11D).

Per exemple, si en l'assaig de titulació de l'estoc viral s'ha determinat que cal una dilució de factor 100 de l'estoc, per a l'assaig d'avaluació de l'activitat antiviral caldrà preparar el virus a una concentració 4 cops més concentrada, i per tant es prepararia fent una dilució de factor 25.

Un cop dispensat el virus a la part d'infecció i el medi a la part de toxicitat, es passa a dispensar les cèl·lules MT-4. Un cop determinada la quantitat de cèl·lules necessàries per a l'assaig (30.000 cèl·lules MT-4 per pou), es contenen les cèl·lules i es centrifuguen cinc minuts a 1400 rpm. Es decanta el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules en medi R10 a una concentració final de  $0,6 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml.

D'aquestes cèl·lules es dispensaran 50 µl a cada un dels 60 pous centrals de la placa (2B:11G).

Amb aquests darrers passos d'addició d'un volum total de 100 µl més per cada pou (50 µl de virus o medi, i 50 µl de cèl·lules), el compost que estava dues vegades concentrat en un volum de 100 µl un cop fetes les dilucions seriades de factor cinc, queda ja a la concentració 1x de treball que s'havia determinat a l'inici de l'assaig.

Finalment s'afegeixen 100 µl de medi R10 als pous perifèrics de la placa.

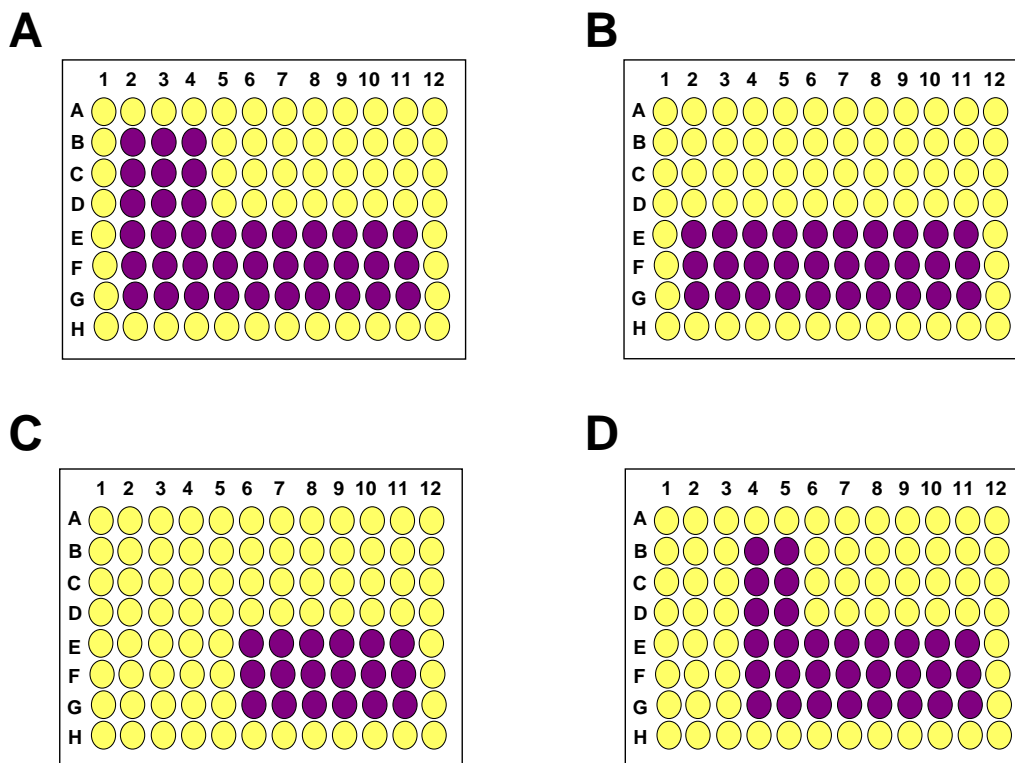
S'incuba a 37° C i un 5% de CO<sub>2</sub> durant cinc dies i un cop transcorregut aquest temps es procedeix a fer l'assaig d'MTT especificat en l'apartat 3.4.

Un cop dissolt el formazant, es procedeix a les lectures de les absorbàncies i al càlcul de la concentració efectiva 50 o concentració necessària per inhibir el 50 % de la mort cel·lular induïda pel VIH-1 (EC<sub>50</sub>) en base a l'absorbància dels pous 2B:11D, i la concentració citotòxica 50 o concentració necessària per induir el 50 % de mort cel·lular induïda per la toxicitat del compost (CC<sub>50</sub>) en base a l'absorbància dels pous 2E:11G. Aquests càlculs de les EC<sub>50</sub> i CC<sub>50</sub> es van realitzar mitjançant el programa EnzFitter, un paquet genèric d'ajustament de corbes no lineals especialment dissenyat per l'anàlisi de dades de cinètiques d'enzims. Ajusta les equacions usant l'algorisme de Levenberg-Marquardt, una

modificació del mètode de Newton dissenyat per minimitzar funcions que siguin suma dels quadrats d'altres funcions no lineals.

Dels valors d' $EC_{50}$  obtinguts de l'avaluació de l'activitat antiviral d'un mateix compost contra diferents soques de VIH-1 diferents a la salvatge, es van extrapolar els valors de resistència, resultants de la divisió entre l' $EC_{50}$  contra la soca resistent i l' $EC_{50}$  contra la soca salvatge.

Les següents figures il·lustren l'aspecte de les plaques en les que s'ha avaluat l'activitat antiviral d'un compost i els quatre possibles resultats que es poden obtenir junt amb la seva interpretació.



**A:** compost no tòxic i amb activitat antiviral fins a la tercera dilució

**B:** compost ni tòxic ni actiu

**C:** compost tòxic fins a la quarta dilució i no actiu a concentracions inferiors a les tòxiques.

**D:** compost tòxic fins a la segona dilució i actiu sense toxicitat en el marge de les concentracions de la tercera i quarta dilució.

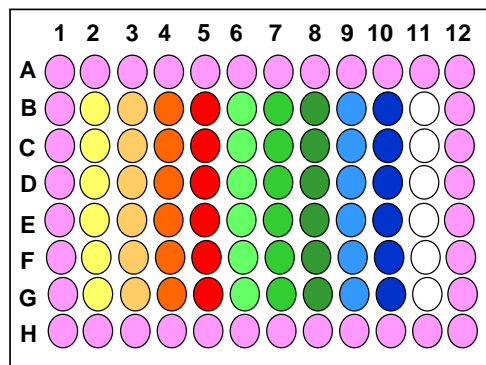
**Figura 10.** Exemples de quatre aspectes diferents que podem trobar en les plaques d'activitat antiviral després de l'assaig d'MTT.

S'ha de tenir en compte que el protocol aquí especificat és el de l'assaig realitzat de forma manual, amb l'avaluació d'un compost a cada placa de 96 pous. Aquest protocol s'ha optimitzat per a la seva adaptació a l'ús del Multimek 96 (Beckman Coulter), un robot amb capacitat dispensadora de 96 canals alhora, que ens ha permès l'avaluació a mitjana-gran escala de múltiples compostos en el mateix assaig.

La principal diferència amb l'assaig manual és l'avaluació de nou compostos diferents alhora a cada placa de 96, disposant una mateixa concentració de cada compost a cada placa, i efectuant les dilucions seriades de factor cinc, de placa en placa, i no de columna en columna com en l'assaig manual.

Així doncs, per a l'avaluació de nou compostos amb nou dilucions de cada compost, es tindran nou plaques de 96, una corresponent a cada dilució del compost. D'aquesta manera, i a l'hora de fer-ne l'anàlisi i càlcul de les EC<sub>50</sub> i CC<sub>50</sub>, s'haurà d'integrar els valors de les nou plaques de cada sèrie de dilucions per a cada compost.

La figura 11 exemplifica la disposició de la placa inicial amb la concentració de compost més elevada, a partir de la qual es faran les següents dilucions seriades de factor cinc.



**Figura 11. Disposició dels compostos 10x concentrats en la placa de 96 pous per a l'assaig d'activitat antiviral en el Multimek 96.**

Cada columna de color diferent (de la dos a la deu) representa un compost diferent. Els pous perifèrics i els de la columna 11 s'hi disposarà medi R10 sol. Els tres pous superiors (B :D) continuaran essent els triplicats d'infecció i els inferiors (E :G) els de toxicitat

### 3.7 Assaig de temps d'addició d'una droga

Amb la finalitat de tenir les cèl·lules a un estat òptim de creixement el dia anterior a l'assaig es preparen les cèl·lules MT-4 a una concentració de  $0,6 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml en medi R10.

L'assaig de temps d'addició consisteix en sincronitzar una infecció de cèl·lules per arrest de temperatura (la temperatura es manté a  $19-21^{\circ}$  C, temperatura inferior a la temperatura en que es fa possible l'entrada del virus a les cèl·lules), i la posterior addició de diferents drogues a diferents temps post-infecció. L'objectiu de l'assaig és determinar en quin moment deixa d'inhibir la infecció cada droga i s'avalua per mitjà de la quantificació de la producció d'antigen CAp24 en cada punt a 30 hores post-infecció (temps en que ja s'ha donat tot un cicle sencer de replicació) .

Aquest assaig diferencia clarament dos procediments en el temps d'arrest de temperatura (a partir d'ara temps TAS), un primer on les cèl·lules s'incuben amb el virus en presència de droga en tot moment (es realitza en tubs eppendorf d'1,5 ml i correspondrà al temps preTAS) i un segon on les cèl·lules són incubades amb el virus sense presència de cap inhibidor (es realitza en tub Falcon de 50 ml). Aquesta segona infecció serà la que un cop sincronitzada la infecció es dividirà en els diferents punts on s'addicionarà droga per a determinar-ne el moment d'acció.

Un total de  $2 \cdot 10^5$  cèl·lules MT-4 són necessàries per a cada punt d'infecció. La infecció de l'assaig és d'una multiplicitat d'infecció (moi) de 0,5 i el volum final de cada punt és de 200  $\mu$ l. La concentració de droga a testar s'ha estimat de 100 vegades superior a la seva  $EC_{50}$  en l'assaig tipus d'activitat antiviral en cèl·lules MT-4 (apartat 3.6).

Depenent del tipus de droga que es vol determinar el seu mecanisme o moment d'acció, es poden definir diferents temps d'addició de droga. En el nostre cas, a l'avaluar principalment compostos dissenyats per a actuar en etapes inicials de la infecció del VIH-1, els temps d'addició es van definir curts (inferiors a les dues hores) per a poder discernir bé entre les diferents etapes de l'entrada viral (unió virus-cèl·lula, unió a coreceptor i fusió de membranes). Totes elles estan compreses entre el temps d'inici de la infecció i la primera hora post-infecció.



Es centrifuga 5 minuts a 1400 rpm la quantitat necessària de cèl·lules MT-4 en funció del nombre de compostos a avaluar i els temps d'addició de droga a determinar i es resuspenen en un volum final de 180 µl de medi R10 per a cada punt.

Es dispensen 180 µl de cèl·lules en cada eppendorf corresponent al temps de preTAS de cada una de les drogues a testar. Aquests punts seran infectats en presència ja de la droga en tot moment. Es retiren també les cèl·lules per als punts de control sense infectar i per als punts de toxicitat i es reserven la resta de cèl·lules en un tub Falcon de 50 ml per a la infecció sense drogues.

S'addicionen 20 µl de droga deu vegades concentrada sobre els 180 µl de cèl·lules dels eppendorf.

A continuació s'addiciona la quantitat de virus calculada necessària per a una moi de 0,5 tant als eppendorf (punts preTAS), com al tub Falcon (la resta de punts de la infecció).

S'inicia en aquest punt l'arrest de temperatura (TAS), on s'incuben tots els punts a 19-21° C durant una hora.

Durant l'hora d'arrest de temperatura es prepara la placa de toxicitats, on es disposaran els 180 µl de cèl·lules i 20 µl de droga 10x, en placa de 96 pous, i es deixarà a l'incubador fins a finalitzar tot l'assaig l'endemà.

Un cop passada l'hora d'incubació en arrest de temperatura per a sincronitzar la infecció, es renten el tub falcon (35 ml de PBS, cinc minuts a 1400 rpm) i els eppendorf ( 1 ml de PBS, tres minuts a 2000 rpm) dos cops amb PBS fred.

S'afegeixen 20 µl de droga 10x als pous de la placa de 96 on hi aniran els punts de preTAS i de temps zero d'addició de droga. Es resuspenen els sediments cel·lulars dels eppendorf preTAS amb 180 µl de medi R10 i es dispensen als pous de la placa corresponents a aquest temps on ja hi tenim els 20 µl de droga 10x. Es resuspen el sediment cel·lular del tub Falcon amb 180 µl de medi R10 per a cada punt i es dispensen 180 µl a la resta de punts dels diferents temps de la placa de 96.

Es deixa la placa a l'incubador a 37° C i 5% de CO<sub>2</sub> i es comença a contar el temps. Es van afegint les diferents drogues a cada interval de temps que s'ha determinat assajar. En el cas de voler determinar entrada viral, aquest interval

és cada set minuts durant els primers 35 minuts i llavors als temps de 60 i 120 minuts i un temps final de 24 hores.

A les 30 hores d'haver iniciat la infecció (inclosa l'hora de TAS), es recullen els sobrenedants de cada punt i es mesura la quantitat de CAp24 produït amb un ELISA comercial (INNOTEST™ HIV antigen mAb, Innogenetics).

Les toxicitats es determinen amb el mètode MTT (descriu a l'apartat 3.4).

Una possible organització de l'assaig en la placa de 96 pous seria disposar un compost diferent en les files B:G, on les columnes 2:10 correspondrien a temps diferents d'addició de compost, essent la columna dos la corresponent al temps preTAS, la columna tres al temps zero, la columna quatre al temps set minuts i així correlativament fins a la columna deu, que correspondria al darrer temps a testar, que normalment és el temps de 24 hores.

### 3.8 Citometria de flux

El citòmetre de flux FACScalibur (BD) ha estat una eina important per a determinar la presència de determinats antígens de membrana i intracel·lulars en les diferents poblacions cel·lulars que s'han emprat en els diferents assajos. És un aparell que ens permet diferenciar les poblacions cel·lulars per criteris de morfologia, com el tamany (FSC, de l'anglès *forward scatter*) i la rugositat (SSC, de l'anglès *side scatter*), i a més ens permet el marcatge amb anticossos conjugats amb fins a quatre fluorocroms diferents: isotiocianat de fluoresceïna (FITC, de l'anglès *fluorescein isothiocyanate*), ficoeritrina (PE, de l'anglès *phycoerythrin*), clorofil·la peridina (PerCp, de l'anglès *peridin chlorophyll protein*) i al·lofococianina (APC, de l'anglès *allophycocyanin*).

#### 3.8.1 Marcatge d'antígens de superfície

Es va analitzar l'expressió dels marcadors CD4, CD3 i CD8 en la població de PBMCs aïllats de la capa leucoplaquetària per a determinar quina d'elles era la més apropiada per a la següent separació dels limfòcits T CD4+. El marcatge es va realitzar mitjançant el còctel d'anticossos de superfície TriTEST: CD4-FITC/ CD8-PE / CD3-PerCP (BD, Espanya). Un cop separada la població desitjada, es realitzava el marcatge dels limfòcits T CD4+ per a determinar-ne

la seva puresa i expressió de receptors. Es va usar l'anticòs monoclonal anti-CD4 humà Leu3a conjugat amb PerCp, l'anticòs monoclonal anti-CCR5 humà 2D7 conjugat amb FITC i l'anticòs monoclonal anti-CXCR4 humà 12G5 conjugat amb PE (tots ells de BD).

Per a la realització dels marcatges es rentaven un total de  $2 \cdot 10^5$  cèl·lules amb PBS i s'incubaven durant 20 minuts a la foscor i a temperatura ambient amb una dilució 1/10 de l'anticòs o còctel d'anticossos. Per rentar l'excés d'anticòs, un cop passada la incubació, es van rentar amb PBS centrifugant les cèl·lules cinc minuts a 1400 rpm. Finalment es van fixar les cèl·lules amb una solució de PBS a l'1% de formaldehid i s'analitzà al citòmetre de flux FACScalibur (BD) mitjançant el programa CellQuest (BD).

### 3.8.2 Marcatge d'antígens intracel·lulars

Mitjançant citometria de flux es va analitzar la transferència d'antígens virals de la cèl·lula efectora MOLT-4/CCR5 infectada a la cèl·lula T CD4<sup>+</sup> diana, per la presència de l'antigen CAp24. Per a realitzar aquest marcatge intracel·lular, els cocultius de cèl·lules efectores i diana que havíem deixat tota la nit (especificats a l'apartat 3.9) es van resuspendre en el mateix medi de cultiu per pipeteig i 100 µl del cocultiu es van barrejar amb  $5 \cdot 10^4$  boles fluorescentes (Perfect-Count Microspheres, Cytognos, Salamanca) en microtubs d'1 ml en format de placa de 96 pous (Costar, Barcelona). La barreja del cocultiu amb les boles fluorescentes es rentà un cop en PBS i posteriorment es van fixar i permeabilitzar utilitzant el *kit* comercial Fix & Perm (Caltag, Burlingame, CA). La fixació es va portar a terme durant 15 minuts a temperatura ambient utilitzant la solució de formaldehid al 4% inclosa el mateix *kit*. Després del rentat amb PBS de 5 minuts a 1400 rpm, es van permeabilitzar les cèl·lules durant 20 minuts a temperatura ambient i en foscor utilitzant una dilució 1/100 de l'anticòs monoclonal de ratolí anti-CAp24 KC57 (Coulter, Barcelona, Espanya) en el medi de permeabilització del *kit*. Després de rentar l'excés d'anticòs amb una centrifugació amb PBS durant 5 minuts a 1400 rpm, es va afegir una solució de PBS a l'1% de formaldehid i s'analitzà al citòmetre de flux FACScalibur.

Deu mil events acotats dins la regió de les boles fluorescentes (acotats per criteris de morfologia i fluorescència) van ser analitzats.

Donat que les dues poblacions de cèl·lules que es van cocultivar eren fàcilment diferenciables per criteris de morfologia (tamany i rugositat) en el citòmetre de flux, l'anàlisi de la transferència d'antígens virals CAp24 de les cèl·lules efectores MOLT-4/CCR5 infectades als limfòcits T CD4+ diana es va fer analitzant el percentatge de cèl·lules diana vives positives per a aquest antígen, utilitzant com a control negatiu de marcatge els limfòcits T CD4+ cocultivats amb les cèl·lules MOLT-4/CCR5 no infectades.

### 3.8.3 Anàlisi de la viabilitat cel·lular

Mitjançant la citometria de flux es va poder determinar el percentatge de mort dels limfòcits T CD4+ induïda per les proteïnes de l'embolcall del VIH-1 expressades en les cèl·lules MOLT-4/CCR5 infectades en el cocultius de tota la nit. Això va ser possible gràcies a les diferències morfològiques de les cèl·lules diana vives i mortes, ja que aquestes últimes presenten valors de FSC menors i superiors de SSC respecte la població viva.

Per tal de validar la detecció de mort cel·lular mesurada a partir dels canvis morfològics per citometria de flux que experimenten les cèl·lules,  $2,5 \cdot 10^5$  cèl·lules T CD4+ en un volum de 250  $\mu$ l, es van tractar amb l'inductor d'apoptosi puromicina (Sigma, Espanya) a concentracions de 5 a 20  $\mu$ M o es van cocultivar amb  $2,5 \cdot 10^5$  cèl·lules MOLT-4/CCR5 no infectades o infectades amb VIH-1. Després de 24 hores en cultiu, es van determinar la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial i la integritat de la membrana cel·lular després d'incubar els cultius durant 15 minuts a 37° C amb 40 nM de la sonda mitocondrial DiOC<sub>6</sub> (Molecular Probes, Leiden, NL) i 1  $\mu$ g/ml de iodur de propidi (Sigma, Espanya). La mort cel·lular es va determinar per citometria de flux en cèl·lules no fixades acotant per morfologia la regió de cèl·lules vives i mortes i determinant el percentatge de cèl·lules amb baixa fluorescència en verd per DiOC<sub>6</sub> tal i com està descrit (22). En el mateix anàlisi es va registrar el percentatge de cèl·lules considerades mortes per morfologia (mostrant valors baixos de FSC i elevats de SSC).

### 3.8.4 Marcatge conjunt dels receptors virals

Per determinar l'activitat antiviral de compostos dirigits contra el receptor viral CD4 i els coreceptors CXCR4 i CCR5 es va desenvolupar un protocol de marcatge conjunt de tots els receptors mitjançant l'avaluació de la unió d'anticossos monoclonals dirigits contra aquests en cèl·lules CEM-CCR5, i la possible inhibició d'aquesta unió per part dels compostos a testar. Aquesta unió s'analitza per citometria de flux.

Es centrifuguen cèl·lules CEM-CCR5 cinc minuts a 1400 rpm i es distribueixen  $1 \cdot 10^5$  cèl·lules en un volum de 50  $\mu$ l en tubs de 4 ml per a citometria de flux (BD, Espanya).

A continuació s'addicionen 25  $\mu$ l del compost a 4x de la concentració a testar. Finalment s'afegeixen 25  $\mu$ l d'un còctel d'anticossos contra els receptors virals i també contra un marcador control com és la glicoproteïna de membrana CD45, també a 4x de la seva concentració de treball (CD45-FITC, CXCR4-PE, CD4-PerCp i CCR5-APC, tots de BD). Així el volum final del marcatge és de 100  $\mu$ l.

Es deixa el marcatge durant 30 minuts a la foscor i a temperatura ambient, i a continuació es renta cada tub amb 4 ml de PBS i es fixa amb una solució de PBS amb formaldehid a l'1%. Els resultats de la unió s'analitzen amb el citòmetre de flux FACScalibur.

Diferents antagonistes d'acció coneguda, com l'anticòs monoclonal dirigit contra CD4 Leu3a (BD, usat a una dilució 1/100), l'antagonista de CXCR4 AMD3100 (usat a una concentració d'1  $\mu$ g/ml) i l'anticòs monoclonal anti-CCR5 2D7 (BD, usat a una dilució 1/100), es van fer servir com a controls de la inhibició específica de la unió de cada anticòs al seu lligand. El marcatge de CD45 es va usar com a control de l'especificitat d'unió.

L'anàlisi del percentatge de cèl·lules que expressen el receptor i la intensitat d'aquesta fluorescència permeten determinar la capacitat inhibidora dels compostos a testar.

### 3.9 Cocultius de cèl·lules infectades pel VIH-1 amb cèl·lules no infectades

L'eix central del segon capítol de resultats d'aquest treball es basa en l'estudi de l'efecte de diferents drogues antivirals sobre les funcions de l'embolcall del VIH-1 en els contactes que s'estableixen entre una cèl·lula efectora productora de partícules virals i una cèl·lula diana per a la infecció, no infectada.

El model de cocultiu que es va dur a terme va ser usant les cèl·lules MOLT-4/CCR5 crònicament infectades amb les soques del VIH-1<sub>NL4-3</sub>, VIH-1<sub>BaL</sub> i VIH-1<sub>CI-1-SI</sub> com a cèl·lules efectores. Com a cèl·lules efectores control es van utilitzar les MOLT-4/CCR5 sense infectar.

Les cèl·lules diana per a la infecció del VIH-1 que es van triar per als cocultius, van ser els limfòcits T CD4+ primaris no estimulats.

Un total de  $2,5 \cdot 10^5$  limfòcits T CD4+ purificats de PBMCs de donants sans es van cocultivar en plaques de 96 pous amb  $2,5 \cdot 10^5$  MOLT-4/CCR5 no infectades o crònicament infectades amb VIH-1, durant 18 hores (o cocultiu durant la nit, tot i que en alguns casos també poden ser cocultius de menor temps) en medi R10, en un volum final de 250  $\mu$ l, i en presència o absència de concentracions creixents dels inhibidors determinats. Normalment els experiments de dosi dependència de droga es van fer usant dilucions 1/10 seriades de les drogues. Les drogues es preincubaven amb les cèl·lules diana T CD4+ durant 15 minuts i a temperatura ambient prèviament a l'addició de les cèl·lules efectores MOLT-4/CCR5 infectades o no infectades amb el VIH-1. Tots els experiments es van realitzar com a mínim per duplicat. Els cocultius de les cèl·lules diana amb les efectores no infectades ens van servir per determinar el nombre total, el nivell basal de mort cel·lular i el nivell basal associat al marcatge de l'antígen viral CAp24. Els cocultius no infectats també ens van servir per determinar la citotoxicitat de les drogues, determinat per la mesura dels canvis de la morfologia tal i com s'ha descrit en l'apartat 3.8.3.

Les drogues i concentracions usades en els assajos de cocultiu van ser: l'anticòs monoclonal dirigit contra CD4 Leu3a (dilució 1/100), l'antagonista de CXCR4 AMD3100 (1  $\mu$ g/ml), l'antagonista de CCR5 TAK-779 (1  $\mu$ M), el pèptid mimètic de TMgp41 C34 (1  $\mu$ g/ml) i l'inhibidor de la TI AZT (1  $\mu$ g/ml).

### **3.10 Validació de les cèl·lules perdudes com a mesura de la formació de sincicis**

Cocultius de limfòcits T CD4+ amb cèl·lules MOLT-4/CCR5 no infectades o infectades amb el virus VIH-1<sub>NL4-3</sub> van ser analitzats per citometria de flux per determinar el nombre absolut de limfòcits T CD4+ (vius i morts). La pèrdua de cèl·lules T CD4+ en els cocultius infectats es calculà restant el total de les cèl·lules T CD4+ del cocultiu infectat del total del cocultiu no infectat. Aquests cocultius van ser alhora microfotografiats per quantificar la formació dels sincicis. La superfície ocupada pels sincicis es va definir manualment en la micrografia i la superfície es calculà mitjançant el programa NIH Image 1.63.

### **3.11 Anàlisi estadística**

L'anàlisi estadística de les dades obtingudes es va dur a terme usant el test de la T d'Student amb dues cues. Valors de  $P < 0.05$  van ser considerats com a estadísticament significatius. Les corbes d'inhibició amb dosi dependència de les diferents drogues van ser analitzades usant una regressió no lineal amb el programa EnzFitter. Les correlacions es van examinar amb el coeficient de correlació de Pearson.

## 4. Resultats

---

### 4.1 Cribratge a gran escala per a la determinació de l'activitat anti-VIH de compostos

L'assaig per determinar l'activitat anti-VIH dels diferents compostos que fins al moment s'emprava al nostre laboratori es basava en la tècnica descrita per Pauwels i col·laboradors l'any 1988 (145). Aquest assaig, més detallat en aquest treball a l'apartat de 3.6 de material i mètodes, permetia determinar l'activitat antiviral d'un compost individual quantificant la inhibició de la mort de les cèl·lules MT-4, sensibles i permisibles a la infecció per VIH, mitjançant la reacció colorimètrica fruit de la reducció del bromur de la sal de tetrazoli (MTT). D'aquesta manera es podia determinar en un mateix assaig la concentració efectiva 50 (EC<sub>50</sub>) i la concentració citotòxica 50 (CC<sub>50</sub>) de cada compost.

Degut l'elevat nombre de compostos que ens vam proposar avaluar al nostre grup amb l'objectiu d'identificar un possible compost candidat per ser optimitzat per entrar en assajos clínics, es fa fer palesa la necessitat de millorar aquest assaig per tal de poder incrementar el nombre de compostos avaluats per assaig, mantenint les característiques de reproductibilitat i sensibilitat que la tècnica ens oferia.

Va ser aquesta necessitat la que va portar-nos a un dels objectius principals d'aquest treball: estandaritzar i implementar l'assaig de determinació de l'activitat anti-VIH de compostos, per tal de convertir-lo en un assaig de cribratge a mitjana-gran escala.

Un cop adquirit i programat el robot amb dispensador automàtic de 96 canals (Multimek 96), es va estandaritzar i implementar l'assaig per tal de passar de fer una avaluació de nou concentracions diferents d'un mateix compost en una mateixa placa, a avaluar una mateixa concentració de nou compostos diferents per placa, tal i com es detalla a l'apartat 3.6 de material i mètodes.

El fet de disposar d'un assaig que de forma ràpida ens permetés avaluar alhora la capacitat d'inhibir la replicació del VIH-1 d'un elevat nombre de compostos, ens permetia fer un primer cribratge en funció de la seva activitat antiviral i de la



seva toxicitat cel·lular. D'aquesta manera, compostos amb potents  $EC_{50}$  contra una soca salvatge del VIH-1 i reduïdes  $CC_{50}$  passaven a ser avaluats amb més detall en assajos de determinació del seu mecanisme d'acció així com d'activitat antiviral contra soques amb resistències conegudes. Pel contrari, compostos amb pobres capacitats inhibidores o elevades toxicitats cel·lulars eren descartats per a posteriors assajos.

Aquest escalat de l'assaig tradicional d'activitat antiviral, ens va permetre avaluar fins a 108 compostos per assaig, dos cops per setmana, durant els quatre anys de duració d'aquesta tesi doctoral. Alguns d'aquests compostos s'analitzen amb més detall dins els apartats 4.3 i 4.4 de resultats.

Per comprovar la reproductibilitat i sensibilitat del nostre assaig vam comparar els valors d' $EC_{50}$  obtinguts amb AZT i AMD3100, drogues que s'utilitzen com a controls en els diferents assajos d'activitat antiviral realitzats durant els últims quatre anys. Unes  $EC_{50}$  promig per AZT de  $0.0006 \pm 0.0002 \mu\text{g/ml}$  i de  $0.0019 \pm 0.0009 \mu\text{g/ml}$  per AMD3100 van ser calculades a partir dels resultats obtinguts de 25 assajos d'activitat antiviral escollits a l'atzar d'entre el total d'assajos realitzats entre els anys 2004 i 2007. El valor promig i la desviació estàndard de les  $EC_{50}$  calculades per aquestes drogues control ens permeten mostrar la reproductibilitat i sensibilitat de l'assaig estandaritzat amb el temps. Aquest fet ens permet la comparació de resultats obtinguts en assajos diferents, importants a l'hora d'analitzar famílies de compostos que han estat generades en diferents períodes de temps, però que s'han d'analitzar conjuntament.

Així doncs, la confirmada fiabilitat de l'assaig, així com l'elevat nombre de compostos avaluats en aquests anys ens permet afirmar la correcta estandarització i implementació de l'assaig d'activitat antiviral a mitjana-gran escala.

## **4.2 Assaig multiparamètric per testar i determinar el mecanisme d'acció de drogues contra l'embolcall del VIH-1**

L'embolcall del virus de la immunodeficiència humana de tipus 1 (VIH-1) (SUgp120/TMgp41) és l'encarregat de dur a terme la fusió de la membrana viral amb la membrana de la cèl·lula diana. Aquest procés involucra la interacció de la subunitat SUgp120 amb el receptor CD4 i un dels coreceptors del virus, CXCR4 o CCR5 que activa la glicoproteïna TMgp41 a forçar l'hemifusió i posterior fusió de membranes. En aquesta primera part del treball s'han quantificat simultàniament alguns d'aquests esdeveniments usant un assaig ràpid basat en el cocultiu de cèl·lules crònicament infectades pel VIH-1 amb cèl·lules T primàries CD4+ no estimulades. Les cèl·lules primàries s'han escollit bàsicament per dos motius: la seva sensibilitat a la mort induïda per embolcalls del VIH expressats a la superfície cel·lular (22, 23) i la seva incapacitat de replicació del VIH-1. Els contactes cel·lulars mitjançats per la unió de la glicoproteïna SUgp120 al receptor CD4 indueixen la transferència del VIH-1 de les cèl·lules efectores infectades a les cèl·lules diana, mesurada pel marcatge de l'antígen viral CAp24. La mort de cèl·lules diana individuals, associada a esdeveniments d'hemifusió, es va mesurar per canvis en la morfologia cel·lular i la formació de cèl·lules multinucleades (sincicis), associada a esdeveniments de fusió, es va determinar per la desaparició de cèl·lules T CD4+ individuals del cultiu. L'anàlisi de la sensibilitat a diferents drogues ens determinà el perfil inhibitori de drogues que actuen inhibint diferents etapes de la funció de l'embolcall del VIH-1. Drogues que tinguin com a diana la unió de la glicoproteïna SUgp120 a CD4 bloquejaran completament la transferència del VIH-1, la mort cel·lular i la fusió cèl·lula a cèl·lula, mentre que inhibidors de la unió als coreceptors o de la glicoproteïna TMgp41 actuaran després de la unió a CD4 inhibint la mort cel·lular i la fusió cèl·lula a cèl·lula però incrementant la transferència del VIH-1. Combinant l'ús dels embolcalls X4 i R5 del VIH-1 i aquest anàlisi multiparamètric, s'ha desenvolupat un mètode ràpid per avaluar la unió de SUgp120 a CD4 i els esdeveniments d' hemifusió i fusió mitjançats pels coreceptors i TMgp41.

Aquest anàlisi pot esdevenir una eina útil per a confirmar o determinar el mecanisme d'acció i la pròpia activitat antiviral de compostos dirigits contra l'embolcall del VIH-1.

#### **4.2.1 Contactes entre cèl·lules infectades pel VIH-1 i cèl·lules no infectades**

Evidències recents suggereixen que els contactes entre cèl·lules infectades pel VIH-1 i cèl·lules T CD4+ no infectades estan organitzats de forma sinàptica per tal d'afavorir la propagació del virus (98). La transferència de partícules infeccioses semblava requerir l'expressió dels coreceptors, però malgrat això vam descriure (24) que cèl·lules T CD4+ en absència del coreceptor apropiat podien capturar grans quantitats d'antígens del VIH-1 durant els contactes cel·lulars mitjançats per la unió de SUgp120 a CD4. A més de la transferència viral, el contacte de cèl·lules infectades pel VIH-1 amb cèl·lules T CD4+ diana que expressen els coreceptors virals (156) pot finalitzar en la mort de cèl·lules T CD4+ individuals després de la interacció cel·lular mitjançada per TMgp41 (23), i també en la fusió d'ambdues membranes, viral i cel·lular, donant lloc a la formació de sincicis (Fig. 12A) (22). Amb tot això, com a mínim tres esdeveniments diferents poden tenir lloc després del contacte entre una cèl·lula efectora infectada pel VIH-1 i una cèl·lula diana no infectada, depenent de l'expressió de coreceptors en la cèl·lula diana i el tropisme viral dels embolcalls presentats per les cèl·lules efectores infectades (Fig. 12B).

Tenint en compte que la majoria de cèl·lules T CD4+ expressen el coreceptor CXCR4 en la seva superfície però només un baix nombre d'elles expressa CCR5 (22, 25), els esdeveniments majoritaris després de la presentació d'un embolcall X4 serà la mort cel·lular i la fusió (22), mentre que embolcalls R5 induiran baixos nivells de mort cel·lular però elevats nivells de transferència d'antígens del VIH-1 independents de coreceptor (22, 46).

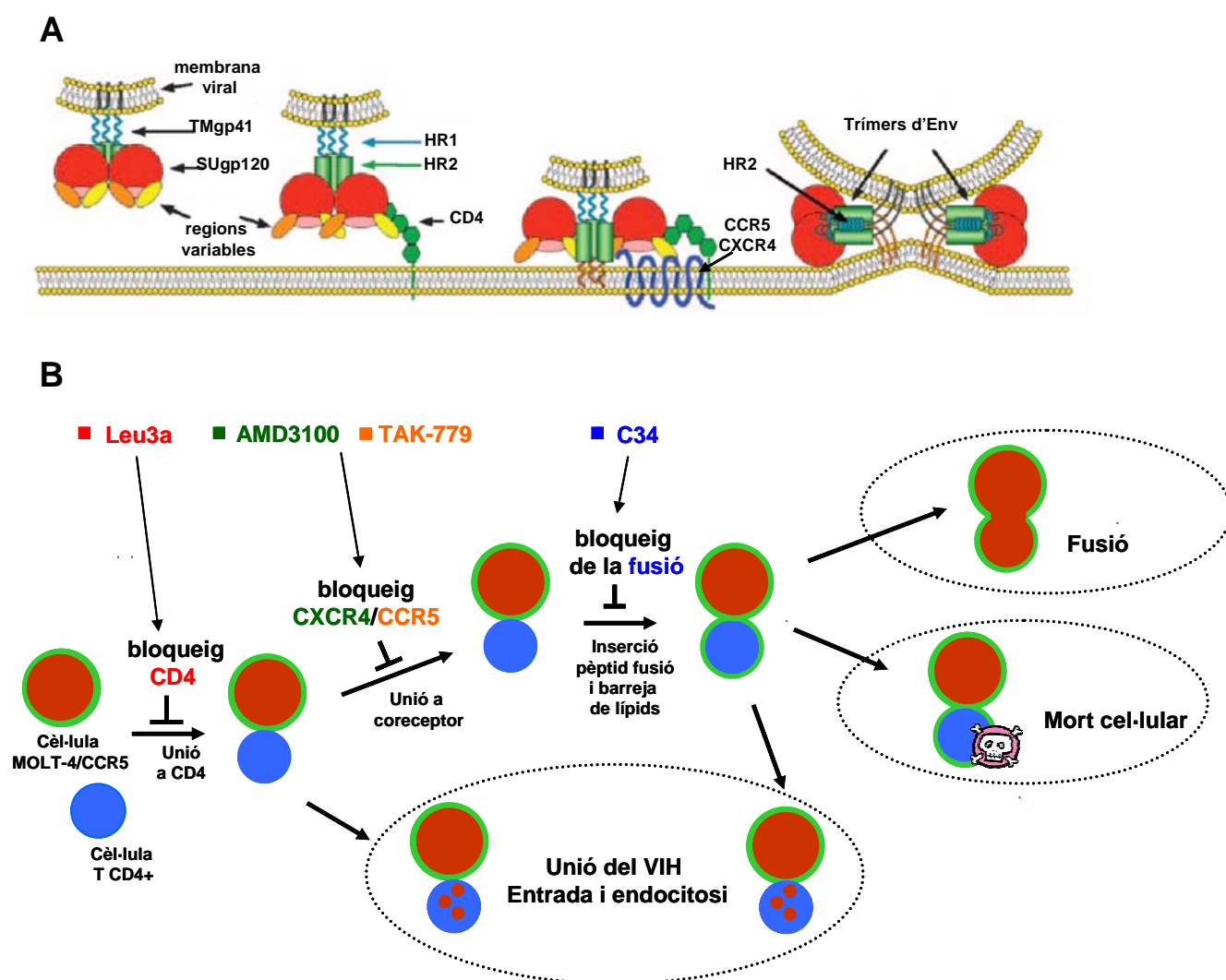


Figura 12. (A) Procés d'entrada del VIH a la cèl·lula. Figura modificada de (133). (B) Progressió dels esdeveniments que es deriven dels contactes cèl·lula a cèl·lula.

#### 4.2.2 Anàlisi quantitatiu de les funcions dels embolcalls virals

Es va desenvolupar un assaig quantitatiu que va servir per avaluar separatament els diferents esdeveniments conseqüència dels contactes cel·lulars generats en els cocultius. La citometria de flux va ser usada per avaluar la transferència de partícules virals (per marcatge de l'antígen CAp24 després de la fixació i permeabilització de les cèl·lules), la mort cel·lular (amb l'anàlisi dels marcatges conjunts de DiOC<sub>6</sub> i iodur de propidi de cèl·lules no fixades) i la pèrdua de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> (amb la quantificació per citometria de flux mitjançant esferes fluorescentes) (22, 23).

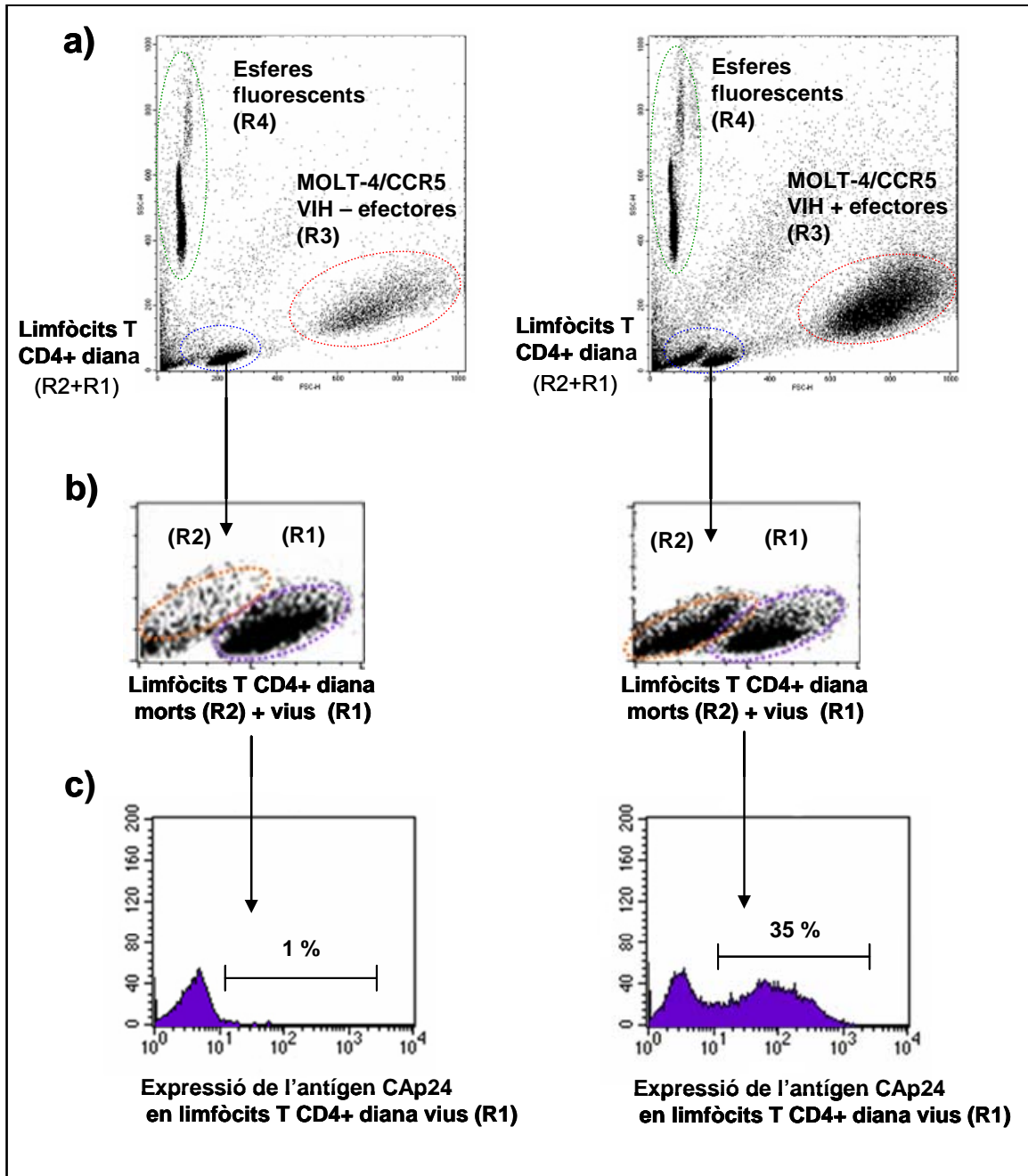
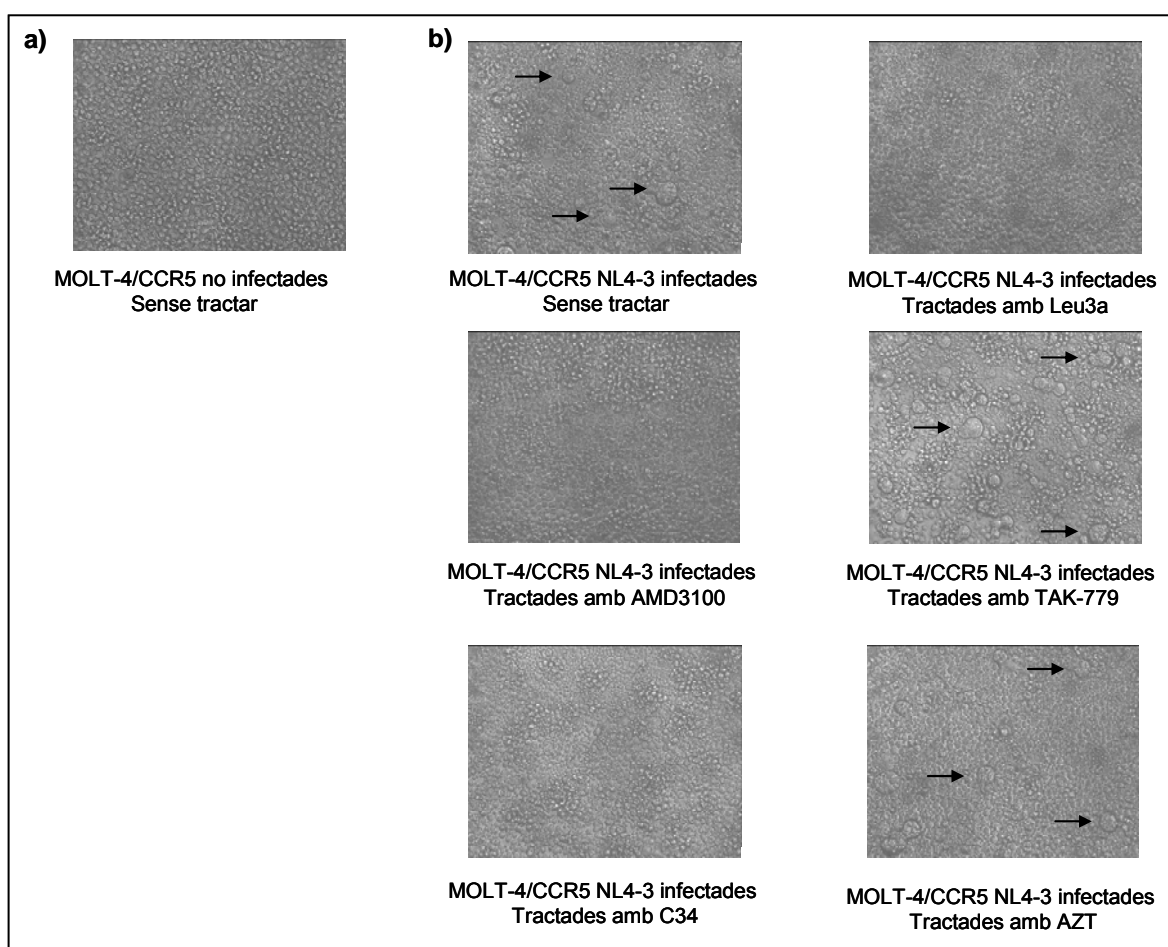


Figura 13. Quantificació dels esdeveniments de transferència d'antígens i mort cel·lular de cèl·lules efectores no infectades (panells esquerres) i infectades amb el VIH-1 (panells drets) a limfòcits T CD4+ diana. (a) Diagrama de punts on es visualitzen les poblacions de cèl·lules diana (R2+R1), efectores (R3) i esferes fluorescents (R4). (b) Diagrama de punts on es mostren les diferències morfològiques entre les cèl·lules diana viues (R1) i mortes (R2). (c) Histogrames on es mostra el percentatge d'antigen viral CAP24 transferit a la cèl·lula diana viva.

Les cèl·lules diana T CD4<sup>+</sup> apareixen representades com a una doble població que diferencia per morfologia les cèl·lules vives (R1) i les cèl·lules mortes (R2) (Fig. 13), mentre que les cèl·lules efectores apareixen clarament diferenciades per la seva major grandària (R3). El fet de poder diferenciar clarament entre la població de cèl·lules diana vives i mortes ens va permetre analitzar la transferència de partícules virals de les cèl·lules efectores cap a les cèl·lules diana vives mitjançant el marcatge de l'antigen viral CAp24.



**Figura 14.** Micrografies 100x dels cocultius entre cèl·lues efectores no infectades (a) o infectades amb la soca VIH-1<sub>NL4-3</sub> (b) i cèl·lules diana en presència o absència dels inhibidors indicats. Les fletxes indiquen sincicis en el cocultiu.

La distinció entre cèl·lules diana i efectores també es pot observar clarament en les micrografies dels cocultius a 100x augments (Fig. 14). Aquestes micrografies ens van permetre observar amb claredat la formació de sincicis entre cèl·lues efectores infectades i cèl·lules diana. La formació d'aquests

sincicis es veia clarament inhibida en presència d'inhibidors d'entrada al cocultiu, com l'anticòs monoclonal anti-CD4 Leu3a, l'antagonista de CXCR4 AMD3100 en el cas dels cocultius amb les cèl.lules efectores infectades amb la soca VIH-1<sub>NL4-3</sub>, o bé l'inhibidor de fusió C34. Ni l'inhibidor de la transcriptasa inversa AZT, ni l'antagonista de CCR5, van inhibir la formació d'aquestes cèl.lules multinucleades en els cocultius amb cèl.lules efectores infectades amb la soca X4.

#### 4.2.3. Validació del criteri de determinació de la mort cel·lular per morfologia

Per tal de poder considerar correcte el recompte de la mort cel·lular després dels processos de fixació i permeabilització de les cèl.lules, vam validar el nostre criteri (determinar la mort cel·lular per canvi de morfologia de les cèl.lules diana) comparant els nostres resultats amb els resultats obtinguts del potencial de membrana. Es va representar el percentatge de cèl.lules no fixades que mostraven un baix marcatge amb la sonda DiOC<sub>6</sub> (marcatge que s'obté quan les cèl.lules són apoptòtiques o mortes) vers els percentatge de mort cel·lular determinat per criteris de morfologia en les mateixes mostres i el resultat va ser una forta correlació entre ambdós paràmetres, obtenint una  $r^2 = 0.99$  i una  $p < 0.001$ . Aquests resultats van permetre validar el criteri d'anàlisi de la mort cel·lular que posteriorment es va usar per al nostre anàlisi multiparamètric (Fig. 15).

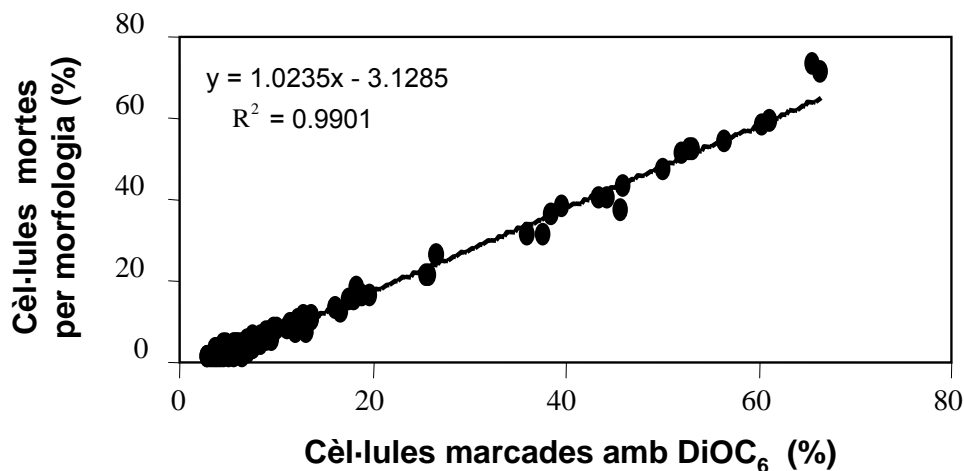


Figura 15. Validació del criteri de determinació de la mort cel·lular per morfologia en limfòcits T CD4+.

#### 4.2.4 Efectes dels processos de fixació i permeabilització en el recompte de la mort cel·lular per morfologia

També es va determinar l'efecte que tenien els processos de fixació i permeabilització (necessaris per poder realitzar el marcatge intracel·lular de l'antígen CAp24) en la morfologia d'aquestes cèl·lules, per tal de validar la nostra quantificació de cèl·lules diana vives i mortes. No es van observar diferències significatives entre el percentatge de cèl·lules T CD4+ mortes en els cultius no tractats (sense el procés de fixació i permeabilització) i aquells on es van dur a terme els processos de fixació i permeabilització, en cocultius de cèl·lules diana amb les diferents cèl·lules efectores usades en l'assaig (Fig. 16).

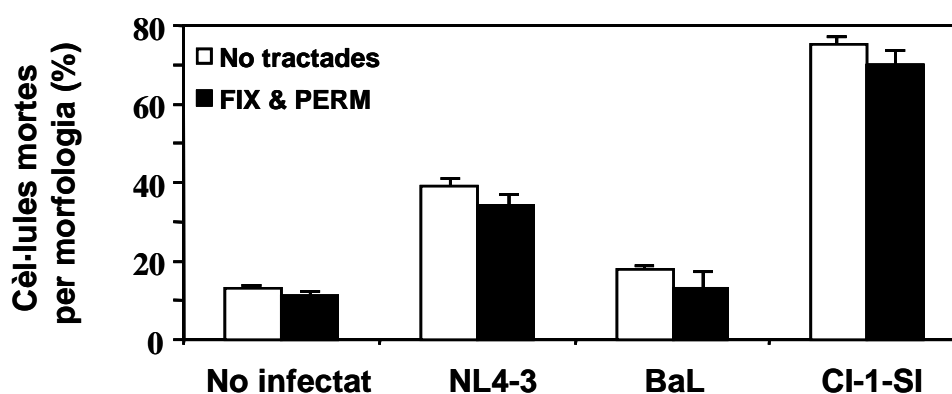


Figura 16. Efectes dels processos de fixació i permeabilització en el recompte de la mort cel·lular per morfologia. Els resultats són la mitjana de dos experiments realitzats.

#### 4.2.5 Validació de la permanència de les cèl·lules mortes en el cultiu durant l'assaig

L'últim aspecte a tenir en compte a l'hora de considerar per correctes les nostres estimacions del nombre absolut de cèl·lules T CD4+ (com a la suma del total de cèl·lules vives i mortes, segons el criteri de morfologia per citometria de flux), era confirmar la permanència de les cèl·lules mortes en el nostre cultiu. Per poder-ho determinar es va quantificar el nombre absolut (com la suma de cèl·lules vives i mortes) de cèl·lules T CD4+ tractades amb puromicina, un inductor d'apoptosi, a diferents concentracions. La quantificació es va fer mitjançant l'addició d'esferes fluorescents al cultiu (representades com a R4 en



la figura 13) abans d'analitzar-les per citometria de flux. Tot i el gran efecte apoptòtic de la puromicina sobre les cèl·lules T CD4+ (més d'un 85% de mort cel·lular a una concentració de 20  $\mu$ M), el nombre total de cèl·lules no es va veure significativament afectat, suggerint que les cèl·lules mortes romanien en el cultiu durant l'assaig. Resultats similars es van poder observar en cultius posteriorment fixats i permeabilitzats (Fig. 17).

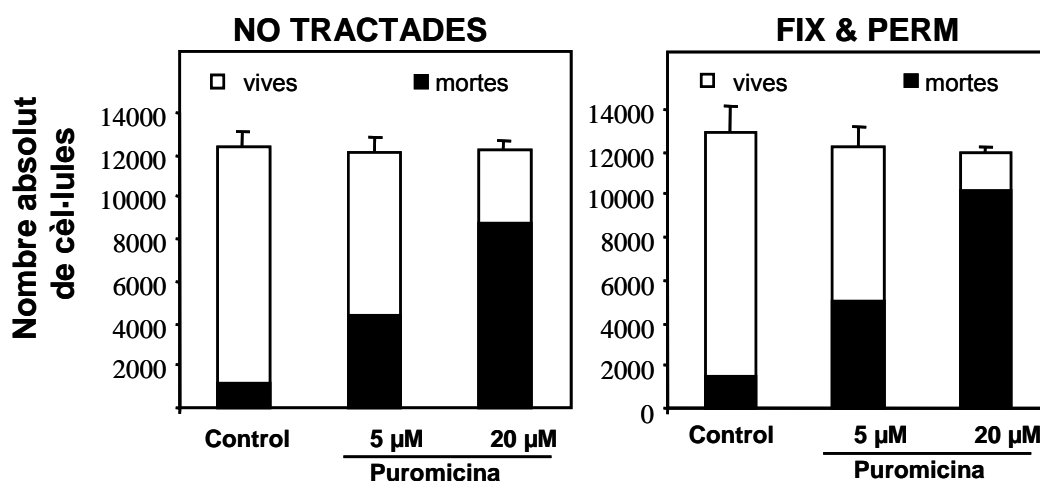


Figura 17. Validació de la permanència de les cèl·lules mortes en el cultiu durant l'assaig. Comparació dels cultius no fixats (no tractats) i els tractats amb els reactius de Fix&Perm. **Els resultats són la mitjana de dos experiments realitzats.**

Aquests resultats ens indiquen com l'anàlisi quantitativa de les cèl·lules T CD4+, acotades en les regions determinades per morfologia, ens permeten la correcta avaluació del nombre absolut de cèl·lules individuals vives i mortes. Aquest fet ens permet calcular el percentatge de mort cel·lular i el nombre absolut de cèl·lules perdudes, definides com la diferència entre el nombre absolut de cèl·lules T CD4+ en el cultiu no infectat respecte del cultiu infectat. Aquesta pèrdua de cèl·lules T CD4+ observada en els cultius infectats s'ha correlacionat amb la formació de cèl·lules multinucleades o sincicis (143). La validació d'aquest paràmetre es va fer analitzant l'àrea ocupada per aquests sincicis en imatges microscòpiques dels cultius. La bona correlació observada ( $r^2 = 0.85$ ) entre el percentatge de cèl·lules perdudes (la resta entre el nombre absolut de

cèl·lules T CD4+ en cultius no infectats i infectats) i l'àrea ocupada pel sincici ens permet validar aquest càlcul com a una mesura indirecta de la fusió entre cèl·lules (111) (Fig. 18).

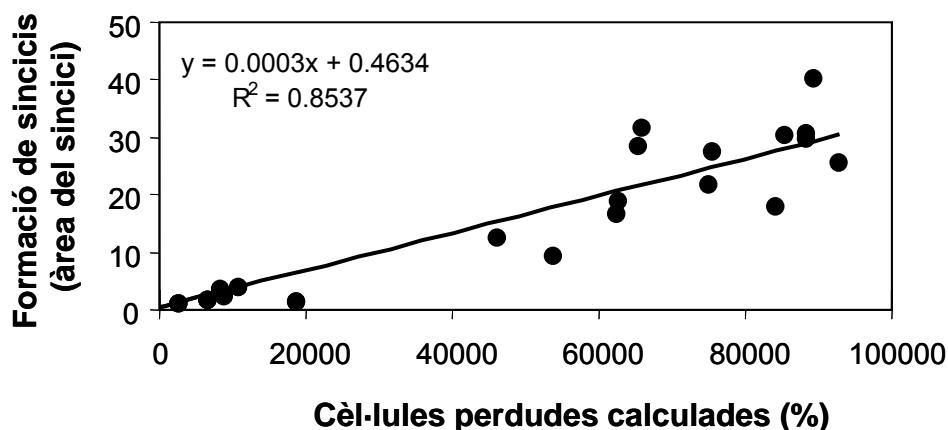


Figura 18. Validació del recompte de cèl·lules perdudes com a mesura indirecta d'esdeveniments de fusió cèl·lula a cèl·lula.

#### 4.2.6 Drogues dirigides contra l'embolcall del VIH-1 mostren diferents perfils d'inhibició

Un cop validat, el nostre model de cocultiu va ser usat per avaluar l'activitat antiviral de diferents drogues dirigides contra diferents etapes mitjançades per l'embolcall del VIH-1 o drogues dirigides contra etapes posteriors del cicle de replicació del virus, com la transcripció inversa. Com es mostra en la figura 19 tots els canvis associats a contactes cel·lulars mitjançats per l'embolcall del VIH-1 com la fusió, la transferència cèl·lula a cèl·lula i la mort individual de cèl·lules diana, es veuen bloquejats quan s'actua inhibint la interacció entre la glicoproteïna SUgp120 de l'embolcall del VIH-1 i la molècula CD4 de la cèl·lula diana usant l'anticòs monoclonal Leu3a dirigit contra CD4. Per altra banda, antagonistes de CXCR4 i CCR5 (AMD3100 i TAK-779 respectivament) bloquegen eficientment la fusió cèl·lula a cèl·lula i la mort individual de cèl·lules diana induïdes per embolcalls X4 i R5 (61, 72) respectivament, però no poden bloquejar la transferència del VIH-1. L'inhibidor de la funció de TMgp41 (C34) bloqueja la fusió i la mort cel·lular induïdes tant per embolcalls X4 com R5, però tampoc pot inhibir la transferència del VIH-1. De fet, antagonistes de

coreceptors i inhibidors de la fusió mostren un increment en la transferència del VIH-1 associat a la completa inhibició d'efectes citopàtics (Taula 4).

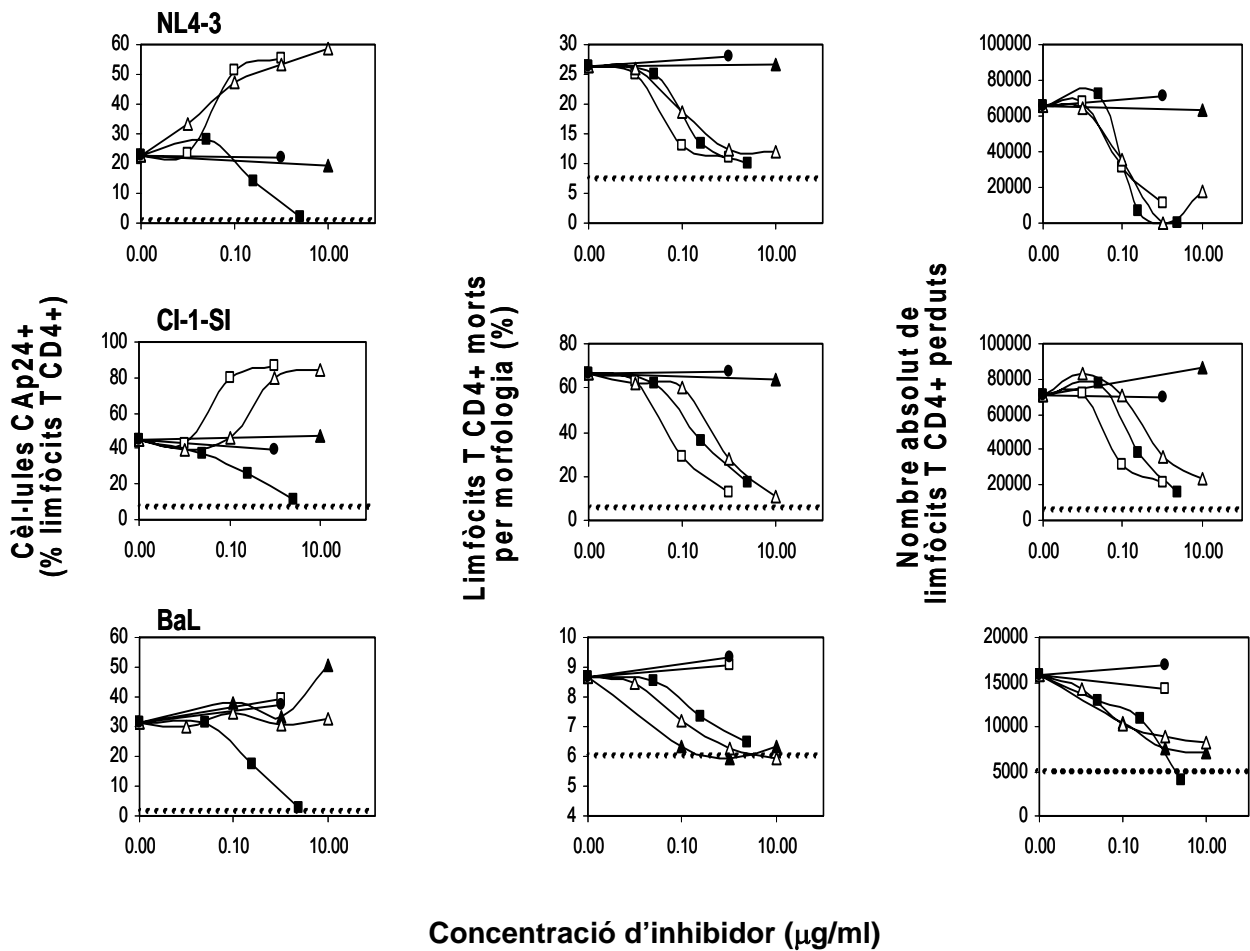


Figura 19. Avaluació de la inhibició de les funcions de l'embolcall del VIH-1 per diferents drogues. L'efecte de Leu3a (quadrats plens), AMD3100 (quadrats buits), TAK-779 (triangles plens), C34 (triangles buits) i AZT (cercles plens) en la transferència de partícules virals (columna esquerra), mort cel·lular (columna central) i fusió (columna dreta), es va determinar en cocultius de cèl·lules T CD4+ amb cèl·lules MOLT-4/CCR5 que expressen les embolcalls virals VIH-1<sub>NL4-3</sub> (fila superior), VIH-1<sub>CI-1-SI</sub> (fila central) o VIH-1<sub>BaL</sub> (fila inferior), en presència de concentracions creixents de cada inhibidor. Els resultats són representatius d'un dels tres experiments realitzats.

Etapa bloquejada	Transferència del VIH-1		Mort cel·lular		Fusió	
	NL4-3	BaL	NL4-3	BaL	NL4-3	BaL
CD4	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
CXCR4	+ <sup>b</sup>	=	-	=	-	=
CCR5	= <sup>c</sup>	+	=	-	=	-
TMgp41	+	+	-	-	-	-

Taula 4. Diferents perfils d'inhibició de drogues que actuen a nivell de CD4, coreceptor (CXCR4/CCR5) i TMgp41, sobre els paràmetres de transferència, mort cel·lular i fusió.

a (-) indica completa inhibició dosi-depenent.

b (+) indica un increment en l'efecte.

C (=) indica no efecte a la màxima concentració testada.

Finalment, drogues amb acció contra etapes més tardanes en el cicle de replicació del VIH-1, com AZT, no tenen cap acció en els efectes de l'embolcall que es mesuren en l'assaig, però mostren una elevada activitat antiviral en cèl·lules MT-4. Totes les drogues testades en el nostre assaig van mostrar valors comparables de concentració efectiva 50 ( $EC_{50}$ ), tot i que els valors van resultar majors que els obtinguts en un assaig amb cèl·lules MT-4 pel mètode MTT (145). Aquestes diferències es poden deure a la major multiplicitat d'infecció associada al nostre assaig (0.4 pg CAp24/ cèl·lula diana comparat amb els 0.004 pg CAp24/ cèl·lula diana usats en l'assaig en MT-4/MTT), o a les diferències entre fusions cèl·lula a cèl·lula del nostre assaig i les virus a cèl·lula de l'assaig en cèl·lules MT-4 (Taula 5).

<b>EC<sub>50</sub> (µg/ml)<sup>a</sup></b>				
	<b>Assaig multiparamètric</b>			<b>Assaig en MT-4</b>
	<b>Transferència del VIH-1</b>	<b>Mort cel·lular</b>	<b>Fusió</b>	
<b>Leu3a</b>	0.7 ± 0.4	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	<sup>b</sup>
<b>AMD3100</b>	> 1	0.07 ± 0.04	0.3 ± 0.2	0.0026 ± 0.0004
<b>C34</b>	> 10	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.022 ± 0.0013
<b>AZT</b>	> 1	> 1	> 1	0.0006 ± 0.0001

Taula 5. Activitat anti-VIH dels inhibidors d'entrada calculada per l'assaig multiparamètric i per l'assaig de viabilitat cel·lular pel mètode MTT en cèl·lules MT-4.

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub>: concentració efectiva 50 o concentració necessària per inhibir el 50% de la mort cel·lular induïda pel VIH-1, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

<sup>b</sup> El compost Leu3a va resultar ser tòxic en l'assaig en cèl·lules MT-4 amb una CC<sub>50</sub> de 0.02 ± 0.01 µg/ml.

### 4.3 Anàlisi de l'activitat antiviral i determinació del mecanisme d'acció de compostos inhibidors de l'entrada del VIH-1

La necessitat de noves classes de drogues antiretrovirals s'ha posat de manifest amb la creixent preocupació sobre l'elevat nombre de pacients amb canvis freqüents de tractament, l'aparició de variants del VIH-1 resistents a les actuals teràpies i els efectes de toxicitat a llarg termini dels tractaments actuals (44). Diferents etapes del cicle de replicació del VIH són potencials dianes per a la intervenció terapèutica, diferenciant principalment entre esdeveniments d'entrada i esdeveniments post-entrada (63).

L'entrada viral s'està postulant com a una diana interessant per a la inhibició de la replicació del VIH-1 (133). Entre les diferents fases de l'entrada viral distingim la unió del virus a la cèl·lula diana a través de la interacció de la

SUgp120 del virus amb el receptor cel·lular CD4, la unió de SUgp120 als coreceptors virals CXCR4 o CCR5 i finalment la fusió de membranes per mitjà de la TMgp41. El primer fàrmac inhibidor de l'entrada viral ha estat Enfuvirtide (o T-20), un pèptid sintètic que mimetitza els aminoàcids 127-162 de la proteïna de l'embolcall TMgp41, que són claus per a l'últim pas de l'entrada viral, la fusió de membranes (67, 127). D'altra banda, el primer fàrmac aprovat per al seu ús en la clínica que interfereix la interacció del virus amb el coreceptor CCR5 ha estat maraviroc (55).

L'estudi del potencial antiviral *in vitro* de compostos de nova síntesi, així com el seu mecanisme d'acció, formen part dels passos a seguir per a valorar la possibilitat de continuar desenvolupant un determinat compost per a una futura aplicació en la clínica.

En aquest apartat del treball s'analitzaran les propietats antivirals i els mecanismes d'acció d'un conjunt d'inhibidors del coreceptor viral CXCR4, així com d'un conjunt de compostos derivats de la família dels BMS.

#### 4.3.1 Inhibidors de CXCR4

Vam disposar d'una sèrie de deu compostos de nova formulació sintetitzats a l'Institut Químic de Sarrià (IQS) i dissenyats per a actuar com a inhibidors de l'entrada del VIH-1, mitjançant la inhibició del receptor de quimiocines CXCR4.

S'han identificat petites molècules inhibidores dels receptors de quimiocines (134), de les quals són inhibidors específics de CXCR4 Allelix-40-4C, T22 i els seus anàlegs (53, 138), peptoides com CGP64222, derivats d'arginines (32, 33, 48) i biciclams (27, 52, 62, 158).

El biciclams antagonista de CXCR4 AMD3100 va aconseguir reduir la càrrega viral en un individu infectat amb una soca X4 del VIH-1 en assajos clínics. El desenvolupament de l'AMD3100 com a possible nou fàrmac per al tractament del VIH es va abandonar al 2001 degut a una possible toxicitat cardíaca i hepàtica (91, 92). A més, la baixa biodisponibilitat oral relacionada amb la seva elevada càrrega positiva en medi fisiològic podia presentar limitacions a llarg termini per a la seva aplicació en teràpia (88).

Els actuals compostos principals o *leads*, presenten espaiadors aromàtics o alifàtics en sistemes polinitrogenats. Compostos amb una sola unitat de ciclams i

amb l'espaiador 1,4-fenilenbismetilè com l'AMD3465 van mostrar ser fins a 10 vegades més actius que l'AMD3100 (88, 149). Amb aquests antecedents el grup de l'IQS es va plantejar obtenir compostos en els que es substituïssin ambdós anells de ciclams, per altres sistemes cíclics o heterocíclics nitrogenats de menor basicitat, mantenint la seva activitat com a inhibidors del coreceptor d'entrada CXCR4. Aquests compostos sintetitzats es troben sota patent (171), fet que només ens permet mostrar les estructures genèriques dels mateixos que apareixen en l'esmentada patent (Fig. 20).

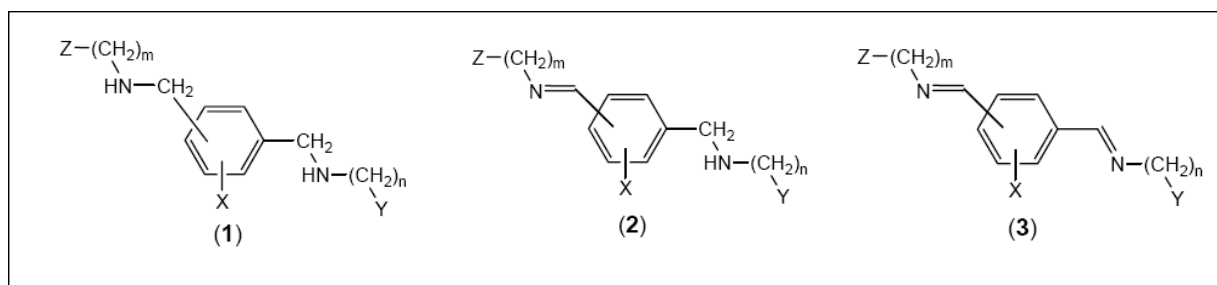


Figura 20. Estructures químiques dels compostos sintetitzats en les que es basen els compostos analitzats.

#### 4.3.1.1 Determinació de l'activitat antiviral en cèl·lules MT-4

El primer assaig que es va realitzar amb els nous compostos va ser un assaig d'activitat antiviral en cèl·lules MT-4 i contra la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>. Aquest assaig ens va permetre determinar l'activitat anti-VIH-1 dels compostos i calcular-ne la seva EC<sub>50</sub>, així com determinar-ne la seva toxicitat cel·lular i calcular-ne la seva CC<sub>50</sub>. Dels deu compostos testats, només el SP328 va mostrar no ser actiu a la màxima concentració testada de 25 µg/ml. La resta de compostos van mostrar un rang d'EC<sub>50</sub> entre 0.009 µg/ml el compost més actiu (SP337) i 22.65 µg/ml el menys actiu (SP318) (Taula 6). Un cop determinada la seva activitat contra la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>, es va determinar la seva activitat contra tres soques resistents a diferents inhibidors coneguts. La soca VIH-1<sub>NL4-3</sub> AMD3100-res va ser generada al nostre laboratori (13) i mostra una resistència a l'antagonista de CXCR4 AMD3100 d'unes 100 vegades, comparada amb la soca salvatge parental. La soca VIH-1<sub>NL4-3</sub> T-20-res, igual que la AMD3100-res, va ser generada al nostre laboratori (17) i presenta

elevada resistència a aquest inhibidor de fusió. Finalment també es va usar la soca VIH-1<sub>CI-1-SI</sub>, provinent de virus aïllat d'un pacient multiresistent de la Unitat de VIH de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Aquesta soca presenta resistència a inhibidors de la transcriptasa inversa, entre d'altres (61).

Els resultats de les activitats antivirals contra les soques resistents ens va començar a indicar la diana d'acció dels nostres compostos, ja que cap d'ells era capaç d'inhibir el virus resistent a AMD3100 a la màxima concentració testada de 25 µg/ml. Aquest resultat suggeria que la diana pel que havien estat dissenyats aquests compostos era la mateixa que AMD3100, el coreceptor CXCR4. El resultat d'inhibició del virus resistent a l'inhibidor de fusió T-20 va mostrar una lleugera pèrdua de sensibilitat a la majoria de compostos testats, explicada per les mutacions en diversos punts de la regió de la SUgp120 (mutacions en els llaços V1, V2 i V4), així com mutacions específiques en la regió HR1 de la proteïna TMgp41, lloc d'interacció de T-20. El virus provinent de l'aïllat clínic multiresistent VIH-1<sub>CI-1-SI</sub> va mostrar una major disminució de la sensibilitat als compostos testats, explicable per les múltiples mutacions descrites per aquest aïllat en diverses regions del seu genoma, tant en la SUgp120 com en la transcriptasa inversa. Les mutacions en aquestes regions queden reflexades en la disminució de la sensibilitat a compostos control com AZT i AMD3100.

Cap dels compostos analitzats va mostrar toxicitat cel·lular a 25 µg/ml, la màxima concentració de compost testada en l'assaig.



Compost	EC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>a</sup> ± desv est				CC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>b</sup>
	NL4-3 salvatge	NL4-3 AMD3100-res	NL4-3 T-20-res	CI-1-SI	
SP30	0,66 ± 0,19	>25	2,41	8,28	>25
SP308	4,47 ± 3,07	>25	14,62	>25	>25
SP309	0,15 ± 0,07	>25	0,33	1,64	>25
SP318	22,65 ± 3,33	>25	>25	>25	>25
SP316	0,15 ± 0,07	>25	0,34	1,55	>25
SP323	11,18 ± 0,01	>25	>25	>25	>25
SP324	0,62 ± 0,24	>25	5,16	10,80	>25
SP328	>25	>25	>25	>25	>25
SP335	16,92 ± 4,54	>25	>25	>25	>25
SP337	0,009 ± 0,001	>25	0,27	1,11	>25
AZT	0,0008 ± 0,0001	0,001	0,0009	>1	>1
AMD3100	0,003 ± 0,001	0,22	0,003	0,01	>5
Nevirapina	0,05 ± 0,029	0,16	0,07	0,14	>2
T-20	0,09 ± 0,05	0,01	>5	0,02	>5
Ritonavir	0,06 ± 0,004	0,07	0,06	0,07	>1

Taula 6. Activitat antiviral i toxicitat cel·lular dels diferents compostos contra diferents soques de VIH-1.

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub>: concentració efectiva 50 o concentració necessària per inhibir el 50% de la mort cel·lular induïda pel VIH-1, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

<sup>b</sup> CC<sub>50</sub>: concentració citotòxica 50 o concentració que indueix el 50 % de mort cel·lular en els cultius no infectats, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

#### 4.3.1.2 Inhibició de la unió d'anticossos monoclonals

Per determinar l'activitat antiviral de compostos dirigits contra el coreceptor viral CXCR4 vam dur a terme un protocol de marcatge conjunt dels tres receptors implicats en la infecció per VIH-1 (CD4, CXCR4 i CCR5), i un receptor control (CD45) mitjançant l'avaluació de la unió d'anticossos monoclonals dirigits contra aquests receptors en la línia cel·lular CEM-CCR5, que els expressa tots ells. Aquesta unió s'analitzà per citometria de flux.

Del total de deu compostos dels que disposàvem, basant-nos en els resultats previs d'activitat antiviral en cèl·lules MT-4, vam seleccionar els quatre compostos més actius (SP30, SP309, SP316 i SP337) així com també un amb

activitat més reduïda com a control (SP308). La figura 21 mostra el percentatge del marcatge de l'anticòs monoclonal anti-CXCR4 humà 12G5 en les cèl·lules que han estat incubades amb quatre concentracions diferents dels cinc compostos testats (25, 5, 1 i 0.2  $\mu\text{g/ml}$ ). Al mateix temps, també es mostra el gràfic amb una concentració fixa de les drogues control que inhibeixen específicament cada un dels receptors que s'analitza (l'anticòs monoclonal anti-CD4 Leu3a, l'antagonista de CXCR4 AMD3100 i l'anticòs monoclonal anti-CCR5 2D7) així com una droga control amb diana diferent (l'ITIAN AZT).

El control negatiu (c -) mostra els nivells basals d'autofluorescència de les cèl·lules sense marcar amb cap anticòs, i el control positiu (c +) mostra el percentatge de marcatge de cada receptor en les CEM-CCR5 quan són marcades amb el còctel d'anticossos a analitzar (CD4, CXCR4, CCR5 i CD45) en absència de drogues control o compostos.

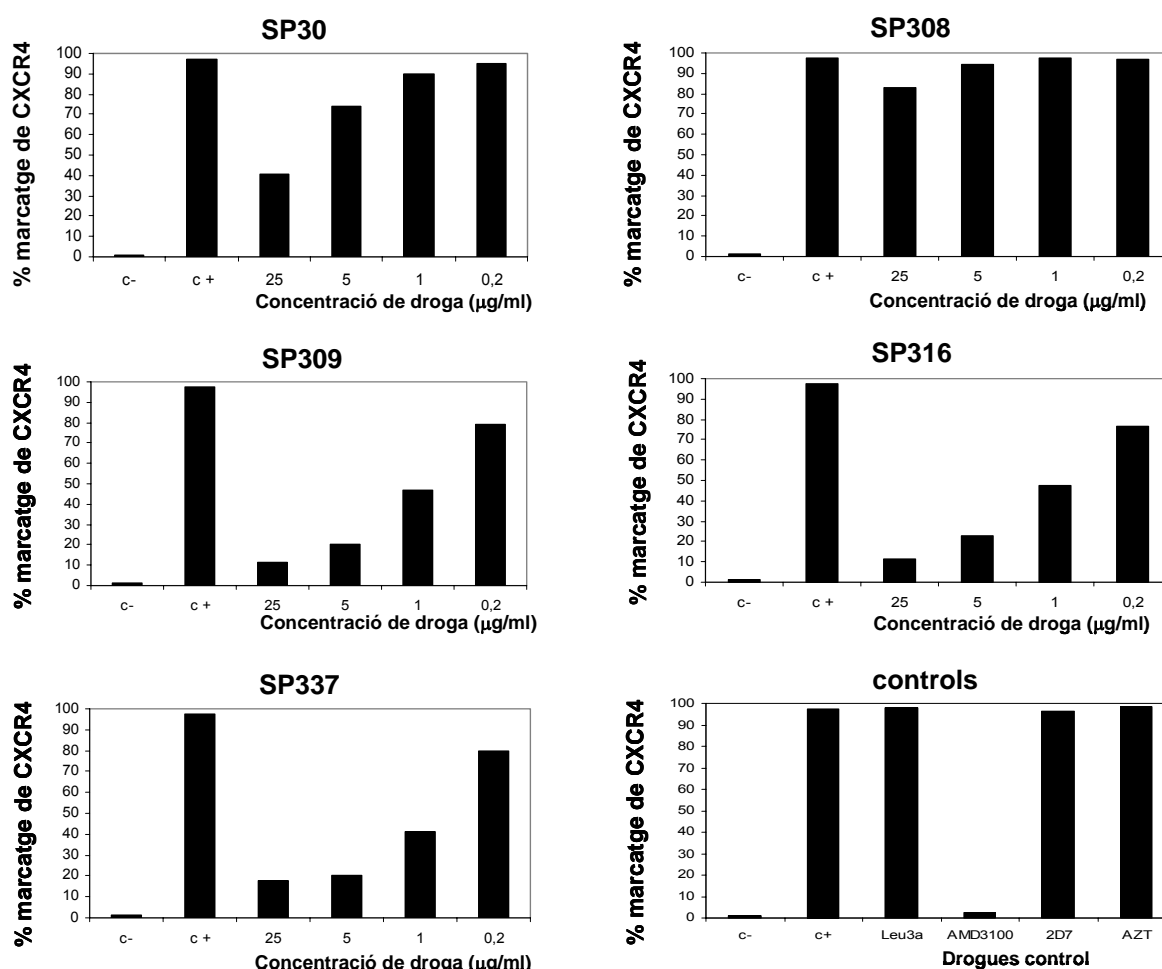


Figura 21. Percentatge d'unió de l'anticòs monoclonal anti-CXCR4 en cèl·lules CEM-CCR5 en presència de cinc dels inhibidors a testar i de les drogues control.

Cal tenir en compte que per a aquests assajos de marcatge amb anticossos monoclonals, sempre es posa una concentració apropiada i constant d'anticòs, per tal de poder assegurar que la concentració és suficient per assolir el total de marcatge en els controls positius i no obtenir un valor infravalorat de marcatge degut a la manca d'anticòs, que es podria interpretar com a una falsa inhibició per part dels compostos. També cal tenir en compte que la concentració necessària per a la inhibició d'aquests marcatges és superior a la necessària per inhibir la replicació viral en l'assaig d'activitat antiviral .

Els resultats confirmen la inhibició del marcatge de l'anticòs específic per CXCR4 de manera dosi-depenent per part dels compostos testats. A més, mantenint clarament una relació de percentatge d'inhibició relacionada amb la seva capacitat inhibidòria en l'assaig d'activitat antiviral en cèl·lules MT-4. Així, el compost SP308, amb menor  $EC_{50}$  en l'assaig en cèl·lules MT-4, va resultar ser el menys actiu en inhibició del marcatge de CXCR4 (només un 20% d'inhibició a la màxima concentració testada). La resta de compostos van mostrar una clara inhibició superior o igual al 50% a 1  $\mu\text{g/ml}$ , a excepció del SP30, que la mostrava a la màxima concentració de 25  $\mu\text{g/ml}$ .

Cap dels compostos testats va mostrar inhibició del marcatge de la resta de receptors (CD45, CD4 i CCR5), mostrant així l'especificitat d'inhibició pel coreceptor CXCR4 (Fig. 22).

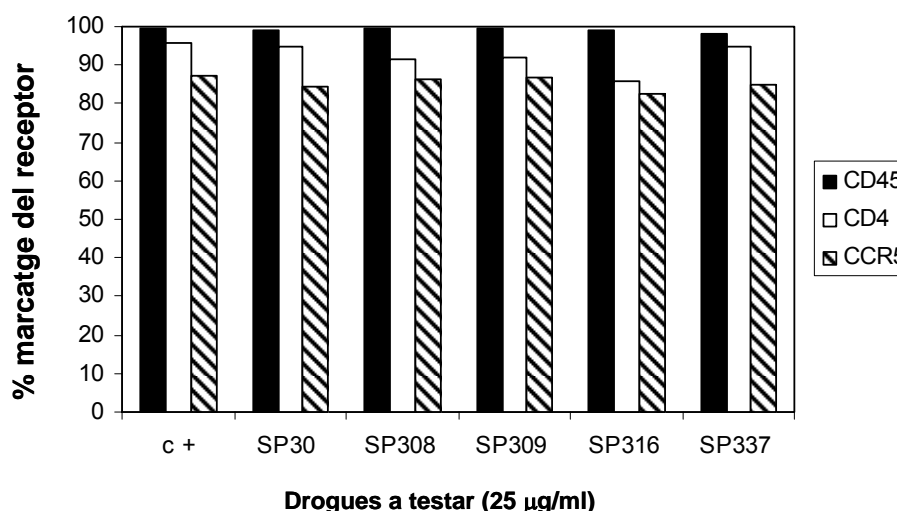


Figura 22. Percentatge d'unió dels anticossos monoclonals anti-CD45 (barres negres), anti-CD4 (barres blanques) i anti-CCR5 (barres ratllades) en cèl·lules CEM-CCR5 en presència de cinc dels inhibidors a la màxima concentració testada de 25  $\mu\text{g/ml}$  .

#### 4.3.1.3 Confirmació del mecanisme d'acció per mitjà de l'assaig de temps d'addició d'una droga

Per tal de confirmar el mecanisme d'acció dels compostos a testar, es va realitzar l'assaig de temps d'addició de droga en cèl·lules MT-4 i amb un virus VIH-1<sub>NL4-3</sub> salvatge. Gràcies a la comparació de la corba d'inhibició dels nostres compostos a testar amb la de les drogues control, es va poder confirmar que el comportament dels nostres compostos era el mateix que AMD3100 i per tant actuaven a nivell d'inhibició del coreceptor CXCR4.

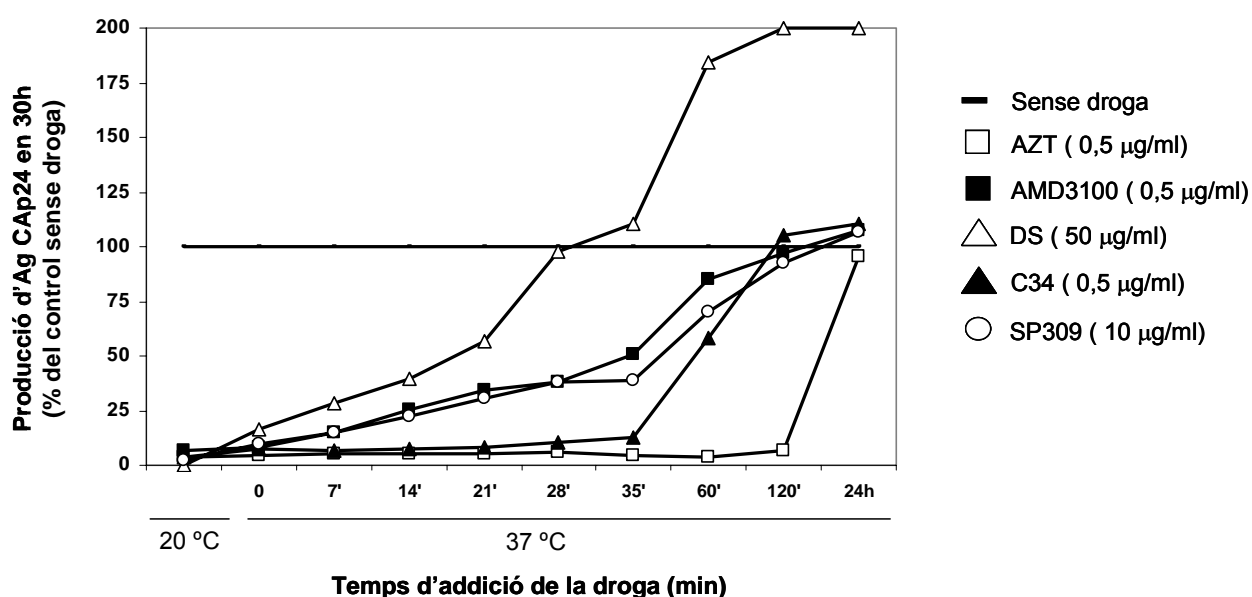


Figura 23. Assaig de temps d'addició per determinar el mecanisme d'acció de drogues inhibidores de l'entrada viral. Producció d'antigen viral CAP24 a les 30 hores post-infecció de les cèl·lules MT-4 amb la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>. Les corbes mostren l'efecte de l'addició de les diferents drogues testades a diferents temps en la inhibició de la replicació viral.

Es va realitzar l'assaig per als quatre compostos més actius (SP30, SP309, SP316 i SP337) i tots ells van mostrar el mateix perfil d'inhibició. El gràfic mostra el perfil de SP309 (Fig. 23), on es pot observar com el compost comença a perdre la seva capacitat inhibidora quan s'afegeix a partir del minut 14 post-infecció, perfil que també s'observa amb AMD3100 i característic dels inhibidors de coreceptor. L'assaig clarament ens mostra com el compost actua en una etapa de l'entrada viral posterior a la unió del virus a la cèl·lula, inhibida pel polianió dextrà sulfat (DS) i anterior a l'etapa de fusió de membranes viral i cel·lular, inhibida pel pèptid C34. L'anàlisi de la viabilitat cel·lular pel mètode colorimètric MTT ens confirma la no toxicitat d'aquests compostos en el temps i condicions de l'assaig (Fig. 24).

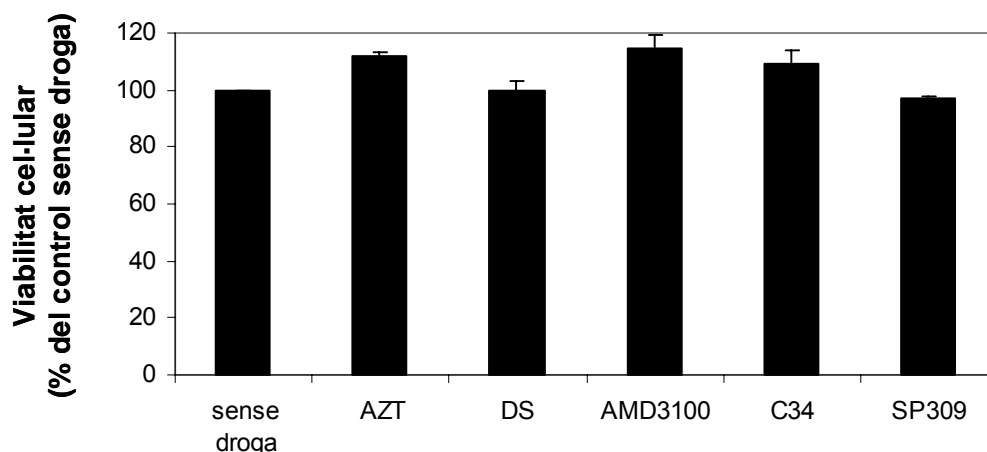


Figura 24. Viabilitat cel·lular de l'assaig de temps d'addició. Percentatge de cèl·lules vives respecte el control sense droga dels cultius de 30 hores no infectats, en presència dels inhibidors. Determinació pel mètode colorimètric MTT.

#### 4.3.2 La família dels BMS

Els BMS són una família de compostos de baix pes molecular sintetitzats per primer cop per Bristol-Myers Squibb dels que se'n va descriure la seva activitat anti-VIH a l'any 2003 (176). El membre més estudiat de la família i el primer en ser caracteritzat va ser l'anomenat BMS-806 (BMS-378806) (84, 110), que va permetre l'inici d'assajos clínics que van arribar fins a fase II, on van ser aturats. Gràcies a una col·laboració amb el departament de Química Orgànica

de la Universitat de Barcelona, vam poder disposar d'una sèrie de compostos derivats del BMS-806 per tal de determinar-ne la seva activitat anti-VIH-1, així com el seu mecanisme d'acció. Un total de 14 compostos (VIL/IC120 (BMS-806) i 13 derivats) van ser sintetitzats i analitzats.

Els BMS estan descrits com a inhibidors de la unió de la SUgp120 al receptor CD4, tot i que en la literatura hi trobem descrits diferents mecanismes d'acció per a aquesta inhibició (110, 163). Aquestes diferències en la determinació del mecanisme d'acció real d'aquesta família de compostos ens va dur a realitzar estudis per a la determinació de la seva capacitat inhibidòria del VIH-1 així com el seu mecanisme d'acció. Dels 14 compostos sintetitzats disponibles, vam centrar-nos principalment en els compostos VIL/JC095 (a partir d'ara BMS#155) i VIL/JC104 (a partir d'ara BMS#151) (Fig. 25).

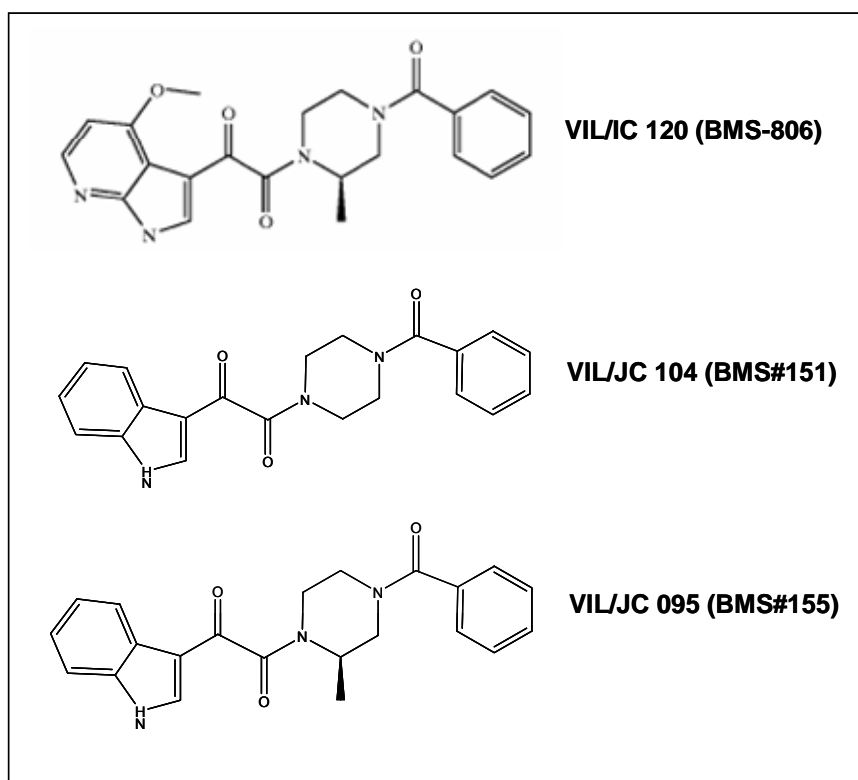


Figura 25. Estructura química dels compostos BMS-806, BMS#151 i BMS#155.

#### 4.3.2.1 Determinació de l'activitat antiviral en cèl·lules MT-4

Per determinar la capacitat inhibidora dels 14 compostos sintetitzats es va realitzar un assaig de determinació de l'activitat antiviral en cèl·lules MT-4 i pel mètode MTT, inicialment contra la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>. Per al BMS-806 van ser calculats valors d'EC<sub>50</sub> de  $0.0002 \pm 0.0001$  µg/ml, comparables als descrits en la literatura. Valors majors d'EC<sub>50</sub> van ser obtinguts en la resta de compostos derivats, podent distingir clarament diferents grups de compostos amb perfils de potència inhibidora diferents (Taula 7).

Compost	EC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>a</sup> ± desv est			CC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>b</sup>
	NL4-3 salvatge	CI-1-SI	VIH-2 <sub>ROD</sub>	
VIL/JC095 (BMS#155)	$0,003 \pm 9 \cdot 10^{-4}$	0,33	>25	>25
VIL/JC104 (BMS#151)	$0,088 \pm 0,009$	5,59	>25	>25
VIL/JC106	>25	ND	ND	>25
VIL/JC105	$6,38 \pm 2,23$	ND	ND	>25
VIL/JC100	$9,65 \pm 4,33$	ND	ND	>25
VIL/JC103	$11,87 \pm 2,84$	ND	ND	>25
VIL/JC001	>25	ND	ND	>25
VIL/IC017 (BMS-853)	$0,0001 \pm 2 \cdot 10^{-5}$	ND	ND	>25
VIL/IC018	$0,0001 \pm 2 \cdot 10^{-5}$	ND	ND	>25
VIL/IC019	$0,094 \pm 0,001$	ND	ND	>25
VIL/IC020	$0,0018 \pm 0,002$	ND	ND	>25
VIL/IC112	0,04	ND	ND	>25
VIL/IC118	0,01	ND	ND	>25
VIL/IC120 (BMS-806)	$0,0002 \pm 1 \cdot 10^{-4}$	1,59	>25	>25
AZT	$0,0006 \pm 4 \cdot 10^{-4}$	0,86	0,0005	>1
AMD3100	$0,0019 \pm 0,001$	0,009	0,001	>5

Taula 7. Activitat antiviral i toxicitat cel·lular dels diferents compostos contra diferents soques de VIH-1.

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub>: concentració efectiva 50 o concentració necessària per inhibir el 50% de la mort cel·lular induïda pel VIH-1, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

<sup>b</sup> CC<sub>50</sub>: concentració citotòxica 50 o concentració que indueix el 50 % de mort cel·lular en els cultius no infectats, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

ND: no determinat.

Distingim doncs entre compostos amb elevada potència inhibidora, amb valors d' $EC_{50}$  de l'ordre de ng/ml (VIL/IC017 a VIL/IC020, VIL/IC112 i 118 i els BMS-806, #151 i #155) i compostos amb moderada capacitat inhibidora de l'ordre de  $\mu\text{g/ml}$  (VIL/JC100, 103 i 105) o sense activitat antiviral a la màxima concentració testada (VIL/JC001 i 106). Els compostos BMS#151 i BMS#155, centrals en aquest estudi, van donar unes  $EC_{50}$  de  $0.088 \pm 0.009 \mu\text{g/ml}$  i  $0.003 \pm 0.0009 \mu\text{g/ml}$  respectivament. En el mateix assaig vam determinar també la  $CC_{50}$  de tots els compostos i cap d'ells va resultar citotòxic a  $25 \mu\text{g/ml}$ , la màxima concentració de compost testada en l'assaig.

Un cop determinada i confirmada l'activitat antiviral dels dos compostos centrals de l'estudi i del control BMS-806, vam decidir testar-ne la seva capacitat inhibidora en dues soques més de VIH. Al disposar de la soca salvatge VIH-2<sub>ROD</sub>, vam voler determinar si els BMS en podrien inhibir la replicació viral, malgrat diferències genotípiques en regions importants per a l'entrada viral de les soques de VIH-2 en comparació amb les de VIH-1 (161). En aquest cas, cap dels tres compostos BMS testats contra la soca VIH-2<sub>ROD</sub> van mostrar capacitat inhibidora a  $25 \mu\text{g/ml}$ , la màxima concentració testada en l'assaig en cèl·lules MT-4. En canvi, l'inhibidor de la TI AZT i l'antagonista de CXCR4 AMD3100 van inhibir-ne la replicació viral amb valors d' $EC_{50}$  comparables als obtinguts contra la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub> ( $0.0005$  i  $0.001 \mu\text{g/ml}$  respectivament pel VIH-2<sub>ROD</sub>, i  $0.0006$  i  $0.0019 \mu\text{g/ml}$  respectivament pel VIH-1<sub>NL4-3</sub>).

La soca VIH-1<sub>CI-1-SI</sub>, provinent d'un aïllat clínic multiresistent, també va mostrar ser resistent als tres BMS testats. En aquest cas els compostos van ser capaços d'inhibir-ne la replicació, tot i que amb unes  $EC_{50}$  de  $1.59 \mu\text{g/ml}$  pel BMS-806,  $5.59 \mu\text{g/ml}$  pel BMS#151 i  $0.33 \mu\text{g/ml}$  pel BMS#155. Aquests valors d' $EC_{50}$  van resultar ser 8000 cops superiors al valor calculat amb el virus salvatge per BMS-806, 64 cops superior per BMS#151 i 110 cops superior per BMS#155. Els resultats de les drogues control de l'assaig, van confirmar la ja coneguda resistència del VIH-1<sub>CI-1-SI</sub> a l'AZT en comparació amb el virus salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>, amb una  $EC_{50}$  de  $0.86 \mu\text{g/ml}$  i una disminuïda sensibilitat a l'AMD3100 comparada amb la de la soca salvatge, amb una  $EC_{50}$  de  $0.009 \mu\text{g/ml}$ .





#### 4.3.2.3 Assaig de temps d'addició per a la determinació del mecanisme d'acció

Un cop determinada l'activitat antiviral dels BMS#151 i #155 i calculada la seva  $EC_{50}$  en la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>, vam determinar el mecanisme d'acció dels compostos per mitjà de l'assaig de temps d'addició d'una droga. Amb la sincronització de la infecció de cèl·lules MT-4 amb el mateix virus salvatge i l'addició del compost a testar o de les drogues control abans de la infecció i a diferents temps post-infecció, vam poder determinar que els BMS tenien la seva diana d'acció en una etapa molt primerenca de l'entrada viral. El resultat ens suggeria que per inhibir la infecció de les cèl·lules MT-4 amb els BMS testats era necessària la presència del compost des d'abans de la infecció (temps en arrest de temperatura a 19-21° C), ja que un cop infectades les cèl·lules i augmentada la temperatura a 37° C per permetre la infecció de les cèl·lules, es va observar que l'addició dels BMS no era capaç d'inhibir-ne la infecció i posterior replicació del virus (Fig. 27).

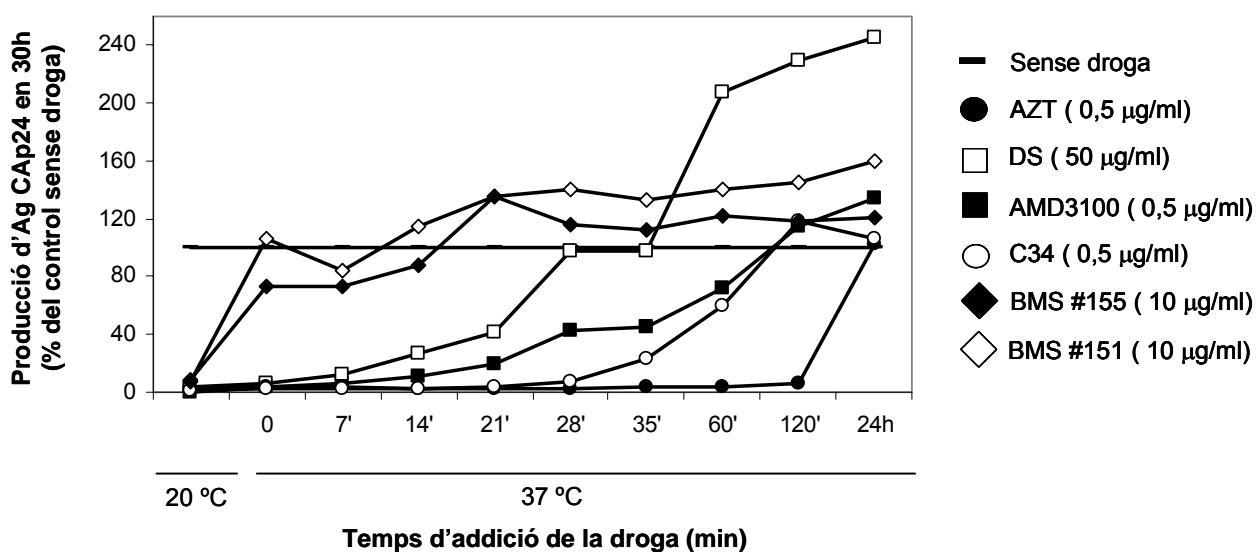


Figura 27. Assaig de temps d'addició per determinar el mecanisme d'acció de drogues inhibidores de l'entrada viral. Producció d'antigen viral CAP24 a les 30 hores post-infecció de les cèl·lules MT-4 amb la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>. Les corbes mostren l'efecte de l'addició de les diferents drogues testades a diferents temps en la inhibició de la replicació viral.

Inhibidors d'acció coneguda mostren patrons d'inhibició amb el temps ben diferenciats. Així, el polianió dextrà sulfat era capaç d'inhibir la infecció si era afegit just en el moment de la infecció (temps en arrest de temperatura o temps 0 a 37° C), però quan era afegit un cop iniciada la infecció perdia ràpidament la seva capacitat inhibidora (entre els temps 7 i 14 minuts). L'antagonista de CXCR4 AMD3100, en canvi, podia ser afegit fins a uns minuts després de l'inici de la infecció, començant a perdre la seva capacitat d'inhibició entre els temps 14 i 21 minuts. Els inhibidors de l'etapa de fusió, com el pèptid C34, mantenien la seva capacitat d'inhibició fins hi tot quan eren afegits passats els 28 minuts d'infecció, començant a perdre aquesta capacitat a partir de temps superiors als 35 minuts. Cap dels compostos testats va mostrar ser tòxic per a les cèl·lules MT-4 durant el temps de l'assaig.

Inhibidors que actuen en etapes posteriors a l'entrada viral, com l'inhibidor de la TI AZT, mantenen la seva activitat inhibidora fins passats els 120 minuts post-infecció i s'ha determinat la pèrdua de la seva acció a les cinc hores, en un assaig de temps d'addició que inclou l'addició de les drogues a diferents temps per diferenciar no només les diferents etapes de l'entrada viral, sinó les diferents etapes del cicle de replicació: entrada, transcripció inversa, integració i proteasa (Fig. 28).

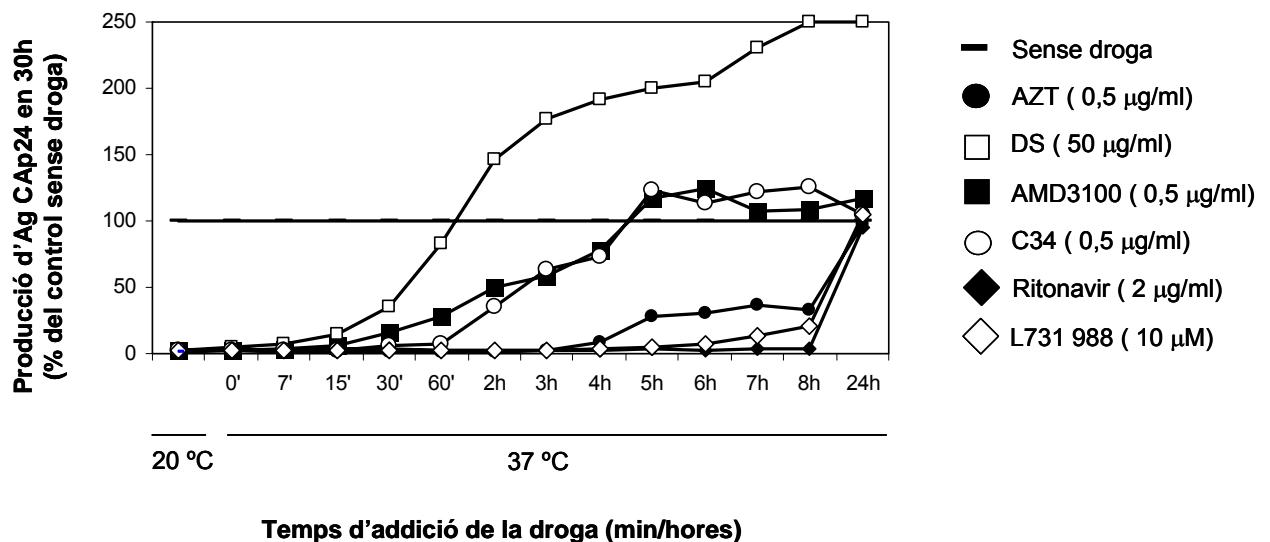


Figura 28. Assaig de temps d'addició per determinar el mecanisme d'acció de drogues inhibidores del VIH-1 en diferents etapes del seu cicle de replicació. Producció d'antigen viral CAp24 a les 30 hores post-infecció de les cèl·lules MT-4 amb la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>. Les corbes mostren l'efecte de l'addició de les diferents drogues testades a diferents temps en la inhibició de la replicació viral.

Amb tot, els resultats obtinguts d'activitat antiviral contra soques virals salvatges i mutades amb els BMS, i especialment els obtinguts en l'assaig de temps d'addició, confirmarien una inhibició de la replicació del VIH-1 interferint en una etapa molt primerenca de l'entrada viral, prèvia a la unió al coreceptor, com seria la interacció del virus amb el receptor viral CD4.

#### **4.4 Determinació de l'activitat antiviral de nous compostos inhibidors de la transcriptasa inversa**

Els actuals tractaments per fer front al VIH es basen principalment en combinacions d'inhibidors de la transcriptasa inversa (TI) i de la proteasa del virus. Els inhibidors de la TI anàlegs de nucleòsid (ITIANs) van ser els primers fàrmacs anti-VIH en sortir a la clínica i posteriorment a aquests, es van desenvolupar i aplicar al tractament els inhibidors de la proteasa i els inhibidors de la TI no anàlegs de nucleòsid (ITINANs). Els membres d'aquesta última família de compostos van resultar ser més potents i selectius que els ITIANs i, a diferència d'aquests, actuaven de forma no competitiva sobre la TI. Van ser importants en els seus inicis per mostrar efectivitat sobre soques resistents a l'AZT, el primer ITIAN en utilitzar-se com a fàrmac en la teràpia contra el VIH i el primer doncs en desenvolupar resistències. L'ús dels ITINANs en la clínica està aprovat en combinació amb altres antiretrovirals (87), degut a què en monoteràpia es va veure que ràpidament desenvolupaven resistències (50). Actualment es troben en la clínica tres ITINANs diferents (delavirdina, efavirenz i nevirapina) i, a trets generals, es consideren medicament ben tolerats i segurs (99, 105).

Avui en dia, l'interès en desenvolupar noves classes de ITINANs segueix vigent i és per això que nombrosos grups centren els seus esforços en la caracterització de compostos de nova formulació actius no només contra soques salvatges del VIH-1, sinó també contra les soques que han desenvolupat resistències als actuals tractaments amb inhibidors de la transcriptasa inversa.

En aquest apartat de resultats es mostraran les avaluacions de les activitats antivirals contra virus salvatges i resistents del VIH-1, de quatre sèries de nous compostos inhibidors de la TI no anàlegs de nucleòsid derivats de la família dels dihidro-alcoxi-benzil-oxopirimidines (DABOs). Aquestes quatre sèries de derivats de DABOs, inclouen les famílies de compostos S-DABO, S-aril-S-DABO, *N,N*-DABO i *F*<sub>2</sub>-*N,N*-DABO, tots ells sintetitzats i publicats en col·laboració amb quatre grups de recerca (36, 119, 122, 137).

#### **4.4.1 Nous ITINANs derivats d'S-DABO**

La transcriptasa inversa del VIH-1 és un enzim multifuncional format per dues subunitats, la p66 i la p51, responsables de la conversió de l'ARN viral de cadena simple en ADN de doble cadena. Els ITINANs tenen un mecanisme d'acció comú, unint-se a l'enzim TI a una regió alostèrica corresponent a la butxaca hidrofòbica de p66, anomenada butxaca d'unió a inhibidors no nucleòsids (NNIBP, de l'anglès *non-nucleoside inhibitor binding pocket*). Aquesta NNIBP està localitzada uns 10 Å del lloc catalític de la subunitat p66. Durant el procés d'unió de l'inhibidor es donen canvis conformacionals en la orientació de les cadenes laterals d'alguns residus, particularment la Y181 i la Y188, que acaben amb l'acomodament de l'inhibidor en la NNIBP. La gran flexibilitat de la NNIBP permet a la TI la interacció d'inhibidors de diferents formes i tamanys (14). Tot i que els ITINANs en general mostren baixes toxicitats i favorables propietats farmacocinètiques, la ràpida taxa de replicació del VIH-1 juntament amb la seva variabilitat inherent fruit de l'elevada taxa d'error, fan que la generació de virus resistents sigui sovint responsable del fracàs terapèutic amb ITINANs.

Dels ITINANs, els dihidro-alcoxi-benzil-oxopirimidines (DABOs) en són una classe amb interessant activitat antiviral a concentracions nanomolars. Van ser descrits a principis de la dècada dels 90 (172) i s'han anat desenvolupant al llarg dels anys cap a S-DABOs (per addició d'un grup isopropil a la posició C-5 de l'anell de timina) (121).

A partir de dos compostos cap de sèrie (compostos 1 i 2) amb activitat antiviral moderada ( $EC_{50}$ : 400  $\mu$ M), el Dipartimento Farmaco-Chimico-Tecnologico de la Università degli Studi de Siena va desenvolupar un conjunt de derivats

d'aquests dos caps de sèrie amb la intenció de millorar la interacció entre l'anell de benzè del lligand i l'anell de benzè de la Y188 localitzat a la NNIBP de l'enzim (122).

Les estructures i característiques dels compostos sintetitzats i avaluats es representen a la figura 29, i a la taula 8, respectivament.

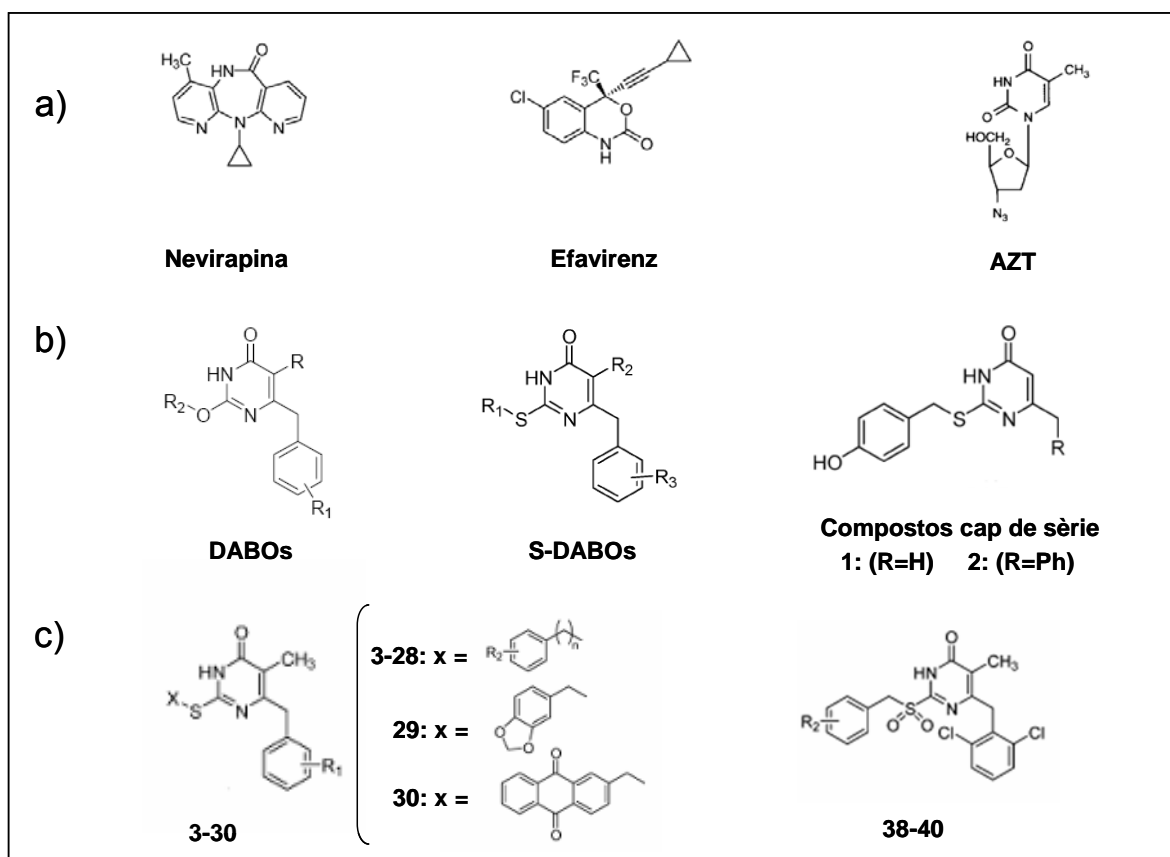


Figura 29. (a) Estructura química de les drogues control. (b) Estructura química dels ITINANs DABOs, S-DABOs i els compostos cap de sèrie 1 (R=H) i 2 (R=Ph). (c) Estructura química dels nous compostos (compostos 3-40).

Compost	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	n
3	2,6-diCl	H	1
4	2,6-diCl	4-F	1
5	2,6-diCl	4-Cl	1
6	2,6-diCl	4-Br	1
7	2,6-diCl	4-OH	1
8	2,6-diCl	4-OCH <sub>3</sub>	1
9	2,6-diCl	4-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1
10	2,6-diCl	4-Obu	1
11	2,6-diCl	4- <i>i</i> Pr	1
12	2,6-diCl	4-CN	1
13	2,6-diCl	4-NO <sub>2</sub>	1
14	2,6-diCl	3-F	1
15	2,6-diCl	3-Cl	1
16	2,6-diCl	3-CN	1
17	2,6-diCl	2,4-diOCH <sub>3</sub>	1
18	2,6-diCl	3,4-diOCH <sub>3</sub>	1
19	2,6-diCl	3,5-diOCH <sub>3</sub>	1
20	2,6-diCl	4-OCH <sub>3</sub>	2
21	2,6-diCl	4-OCH <sub>3</sub>	3
22	2,6-diF	4-OCH <sub>3</sub>	1
23	2,6-diF	4- <sup>i</sup> Pr	1
24	2,6-diF	4-CN	1
25	2,6-diF	4-NO <sub>2</sub>	1
26	2,6-diF	3,5-diOCH <sub>3</sub>	1
27	4-F	4-NO <sub>2</sub>	1
28	4-F	4-OCH <sub>3</sub>	1
29	2,6-diCl		1
30	2,6-diCl		1
38	2,6-diCl	4-OCH <sub>3</sub>	1
39	2,6-diCl	4-NO <sub>2</sub>	1
40	2,6-diCl	4-Br	1

Taula 8. Informació química dels nous compostos sintetitzats.

#### 4.4.1.1 Determinació de l'activitat antiviral dels derivats d'S-DABO

Un total de 31 compostos derivats d'S-DABOs van ser avaluats en cèl·lules MT-4 i contra quatre soques de VIH-1 diferents, la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>, la soca multiresistent IRL98 provinent d'un aïllat clínic amb tropisme X4 i amb les mutacions en la TI K101Q, Y181C i G190A, que confereixen resistència a nevirapina, delavirdina i efavirenz, respectivament (115, 152), i dues soques de VIH-1 amb les mutacions puntuals K103N i Y188L en la TI, que confereixen resistència a nevirapina i efavirenz (118). Els resultats (Taula 9) mostren interessants valors d'activitat antiviral contra el virus salvatge, amb valors d'EC<sub>50</sub> de l'ordre de micromolar i en alguns casos nanomolar i picomolar. Els resultats contra els virus resistents a ITINANs van mostrar diferents capacitats inhibidores dels compostos. El virus VIH-1<sub>IRLL98</sub> va ser el que es va poder inhibir amb un major nombre de compostos (fins a 15), aproximadament la meitat del total de tots els compostos testats. Aquesta dada és de notable importància per l'origen d'aquesta soca viral, ja que recordem prové d'un aïllat clínic d'un pacient multiresistent. La inhibició dels virus VIH-1 amb les mutacions K103N i Y188L, va ser més difícil d'aconseguir, ja que aquestes dues soques virals són fortament resistents a ITINANs, com ho demostren els valors obtinguts amb els compostos a testar, així com amb les drogues control nevirapina i efavirenz.



Compost	EC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>				CC <sub>50</sub> (µM) <sup>b</sup>
	NL4-3 salvatge	HXB2 RT IRL98	HXB2 RT K103N	HXB2 RT Y188L	
3	0,83	>64	>64	>94	>64
4	0,11	2,7	27	>61	>61
5	0,47	2,1	>59	>59	>59
6	0,79	>53	>53	>53	13
7	>41	>41	>41	>41	41
8	0,007	0,047	4,7	>32	32
9	0,25	1,90	>58	>58	>58
10	>3,1	>3,1	>3,1	>3,1	3,1
11	35% a 2,3	>57	>58	>58	11
12	0,17	1,0	0,10	>60	>60
13	0,79	3,3	11	>58	>58
14	0,15	2,20	>61	>61	>61
15	0,31	4,80	>59	>59	>59
16	0,89	5,00	>60	>60	>60
17	1,33	>55	>55	>55	>55
18	0,2	0,93	10	>55	>55
19	33	>55	>55	>55	>55
20	<0,0001	0,0002	0,87	6,9	>57
21	0,0004	0,11	>1,0	>1,0	1,0
22	0,026	0,69	0,69	10	>64
23	0,58	16	33% a 62	>62	>62
24	0,052	>65	>65	>65	>65
25	0,074	>62	>62	>62	>62
26	18	>60	>60	>60	>60
27	>65	>65	>65	>65	>65
28	>8,9	>8,9	>8,9	>8,9	8,9
29	0,12	0,51	5,3	33	>57
30	13	>48	>48	>48	>48
38	>2,8	>2,8	>2,8	>2,8	2,8
39	>53	>53	>53	>53	>53
40	>50	>50	>50	>50	>50
AZT	0,003	0,008	0,003	0,003	>3,7
Nevirapina	0,052	>7,5	3,9	>7,5	>7,5
Efavirenz	0,001	0,2	0,057	0,3	>0,32

Taula 9. Activitat antiviral i toxicitat cel·lular dels diferents compostos contra diferents soques de VIH-1.

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub>: concentració efectiva 50 o concentració necessària per inhibir el 50% de la mort cel·lular induïda pel VIH-1, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

<sup>b</sup> CC<sub>50</sub>: concentració citotòxica 50 o concentració que induïx el 50 % de mort cel·lular en els cultius no infectats, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4

Tot i això, els compostos 8, 12, 13, 16, 18, 22 i 29, van mostrar perfils d'inhibició i resistència interessants (Taula 10), sobretot en els virus VIH-1<sub>IRLL98</sub> i VIH-1<sub>K103N</sub>. El compost 20 va mostrar ser el més actiu de tota la sèrie de nous compostos sintetitzats, amb una EC<sub>50</sub> millor que la de la droga control nevirapina i comparable amb efavirenz, tant en el virus salvatge com en les tres soques resistents. Per a aquest compost es va poder calcular un índex de selectivitat (CC<sub>50</sub> / EC<sub>50</sub>) en la soca salvatge superior a 570000.

Compost	EC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>	Resistència <sup>b</sup>		
		NL4-3 salvatge	HXB2 RT IRLL98	HXB2 RT K103N
8	0,007	7	670	>4500
12	0,17	6	1	>350
13	0,79	4	14	>73
16	0,89	5	>67	>67
18	0,20	5	50	>275
22	0,026	26	26	384
29	0,12	4	44	275
AZT	0,003	3	1	1
Nevirapina	0,052	>144	75	>144
Efavirenz	0,001	200	57	300

**Taula 10. Resistència als diferents compostos de les diferents soques de VIH-1**

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub>: concentració efectiva 50 o concentració necessària per inhibir el 50% de la mort cel·lular induïda pel VIH-1, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

<sup>b</sup> Resistència: valor obtingut del coeficient entre l'EC<sub>50</sub> de cada compost en el virus mutat respecte la del virus salvatge. Quan el valor d'EC<sub>50</sub> és major que la màxima concentració de compost testada, es fa servir aquesta concentració per a fer el càlcul de resistència.

De tots els compostos analitzats, tot i que un total de set van mostrar toxicitat cel·lular, cap dels compostos amb perfil inhibitori més interessant va mostrar toxicitats cel·lulars elevades.

L'estudi del model d'interacció de la orientació del compost 8 dins la NNIBP (Fig. 30) que van fer al Dipartimento Farmaco-Chimico-Tecnologico de la Università degli Studi de Siena ens suggeria que el grup metil terminal de la cadena lateral a la posició dos entrava en contacte tant amb la P225 com la

P236 a la superfície de la TI. D'altra banda, el grup 3-NH de l'anell de pirimidinona estava involucrat en una interacció de pont d'hidrogen amb l'oxigen carbonil de la Lys101. Finalment, la cadena benzil a la posició sis s'acomodava dins la gran butxaca, definida principalment per les cadenes laterals hidrofòbiques de la L100, W229, F227, Y181, Y183 i la Y188.

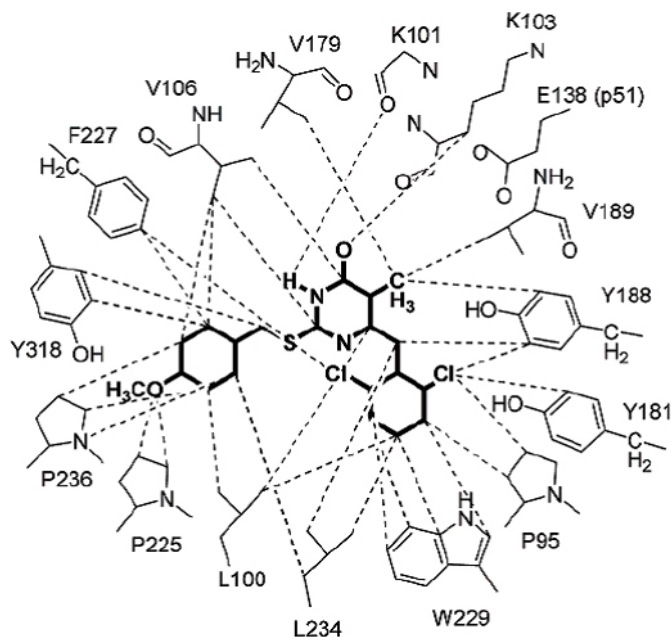


Figura 30. Representació esquemàtica de la orientació del compost 8 dins la butxaca d'unió a inhibidors no nucleòsids (NNIBD).

Així doncs, els resultats obtinguts de les avaluacions de les activitats antivirals dels nous compostos derivats d'S-DABOs van mostrar resultats interessants d'activitat i resistència a tenir en compte de cara a considerar el desenvolupament, a partir d'aquesta sèrie de compostos, d'un compost amb propietats millorades de cara a ser inclòs en futurs assajos clínics.

#### 4.4.2 Nous ITINANs derivats d'S-aril-S-DABO

Una altra família d' ITINANs és la formada per nous derivats dels DABOs. Dins d'aquesta família els dihidro-alquiltio-benzil-oxopirimidines (S-DABOs) (120) (Fig. 31a) es caracteritzen per la presència d'un substituent arilalquiltió a la posició dos, molt divers tant pel patró de substitució com per l'allargada de l'espaiador alquil. Un grup del Dipartimento Farmaco-Chimico Tecnologico de la Università degli Studi di Siena, va començar estudis amb aquesta família de compostos (122). Veient la seva potent capacitat inhibidora de l'activitat de la TI del VIH-1 tant en virus salvatges com en virus mutats resistents van decidir continuar investigant en aquesta línia de compostos. Van centrar els seus estudis en les propietats antivirals d'una nova família de compostos, els S-aril-S-DABOs (137), amb estructura com la que mostra la figura 31b.

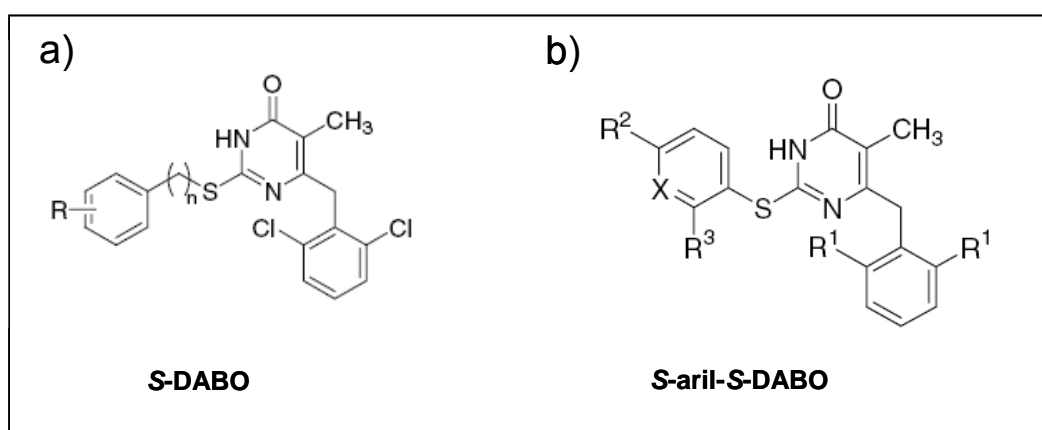


Figura 31. (a) Estructura química dels S-DABOs. (b) Estructura química dels S-aril-S-DABOs (compostos 2a-i)

##### 4.4.2.1 Determinació de l'activitat antiviral dels derivats d'S-aril-S-DABO

Un total de nou compostos (del 2a al 2i) derivats d'S-aril-S-DABOs (Taula 11) van ser avaluats en cèl·lules MT-4 contra la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>, la soca multiresistent VIH-1<sub>IRLL98</sub> (provinent d'un aïllat clínic amb tropisme X4 i amb mutacions que confereixen resistència a nevirapina, delavirdina i efavirenz) i tres soques de VIH-1 amb les mutacions puntuals K103N, Y181C i Y188L en la TI, que confereixen resistència a nevirapina i efavirenz.

Compost	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	X
2a	F	F	F	CH
2b	F	H	H	CH
2c	F	Cl	H	CH
2d	F	OCH <sub>3</sub>	H	CH
2e	Cl	OCH <sub>3</sub>	H	CH
2f	Cl	H	H	CH
2g	Cl	F	F	CH
2h	Cl	CN	H	CH
2i	Cl	OCH <sub>3</sub>	H	N

**Taula 11. Informació química dels nous compostos sintetitzats.**

Com es mostra a la taula 12, els nou compostos avaluats van mostrar ser actius contra el virus salvatge, essent els compostos 2a-2d un ordre de magnitud més actius que els compostos 2e-2i, coincidint amb el canvi de substituent en el radical R1. Els compostos més actius, amb unes EC<sub>50</sub> inferiors a 1 µM, van ser aquells amb un fluor en el radical R1, en detriment del clor en la mateixa posició, que mostrà menor eficiència en la inhibició del virus salvatge amb uns valors d'EC<sub>50</sub> superiors en tots els casos a 1 µM. En el cas de la inhibició dels virus mutats resitents a ITINANs, vam poder comprovar com algun dels compostos era capaç d'inhibir la replicació tant de l'aïllat clínic VIH-1<sub>IRLL98</sub> (cinc dels nou compostos), com del mutant VIH-1<sub>K103N</sub> (dos dels nou compostos) tot i que amb valors superiors als obtinguts contra el virus salvatge, fet que evidencia la resistència dels virus avaluats sobre els nous compostos. Dels quatre compostos avaluats contra el virus mutant VIH-1<sub>Y181C</sub>, tres d'ells van resultar ser actius a concentracions semblants a les que inhibeixen el virus salvatge (compostos 2f, 2h i 2i). Cap dels nous compostos testats va inhibir el virus mutat VIH-1<sub>Y188L</sub>, mutació que juntament amb la Y181C, s'ha descrit que confereixen elevada resistència als ITINANs (153, 162). Només dos dels nou compostos avaluats van mostrar toxicitat cel·lular a concentracions elevades. De tots els compostos avaluats, el compost 2b va ser el que va presentar un millor índex de selectivitat, amb un valor superior a 800.

Compost	EC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>					CC <sub>50</sub> (µM) <sup>b</sup>
	NL4-3 salvatge	HXB2 RT IRL98	HXB2 RT K103N	HXB2 RT Y181C	HXB2 RT Y188L	
2a	0,31	25,8	>65,8	ND	>65,8	>65,8
2b	0,09	16,7	42,5	ND	>72,7	>72,7
2c	0,10	>66,1	8,01	ND	>66,1	>66,1
2d	0,67	>57,5	>57,5	ND	>57,5	57,5
2e	26,5	>61,4	>61,4	>61,4	>61,4	>61,4
2f	1,80	4,91	>66,3	12,10	>66,3	>66,3
2g	3,36	44,7	>60,5	ND	>60,5	>60,5
2h	2,49	>27,6	>27,6	5,10	>27,6	27,6
2i	2,72	8,68	>61,7	6,52	>61,3	>61,3
AZT	0,003	0,008	0,003	0,003	0,003	>3,7
Nevirapina	0,052	>7,5	3,9	0,87	>7,5	>7,5
Efavirenz	0,001	0,20	0,057	0,006	0,30	>0,32

**Taula 12. Activitat antiviral i toxicitat cel·lular dels diferents compostos contra diferents soques de VIH-1.**

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub>: concentració efectiva 50 o concentració necessària per inhibir el 50% de la mort cel·lular induïda pel VIH-1, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

<sup>b</sup> CC<sub>50</sub>: concentració citotòxica 50 o concentració que induïx el 50 % de mort cel·lular en els cultius no infectats, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

ND: no determinat.

De nou, els resultats obtinguts amb aquesta sèrie de compostos derivats d'S-aril-S-DABOs van mostrar interessants perfils d'inhibició de la soca salvatge del VIH-1, tot i que la seva capacitat d'inhibició de virus resistents a altres ITINANS va resultar ser molt menor, o fins i tot inexistent.

#### 4.4.3 Nous ITINANS derivats d'*N,N*-DABO

Dins dels compostos antiretrovirals usats actualment en la clínica, els ITINANS desperten un gran interès degut a la seva elevada potència inhibidora, la baixa toxicitat cel·lular i les seves propietats farmacocinètiques favorables. Malauradament, i com ja s'ha comentat, ràpidament es seleccionen soques virals amb mutacions que alteren la forma de la butxaca hidrofòbica del NNIBP (120). La resistència a un ITINAN, normalment s'associa amb resistències creuades a altres ITINANS. Aquest fet fa necessari millorar i estendre la teràpia amb aquest tipus d'inhibidors de la TI.

Un grup de l'Istituto di Genetica Molecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche de la Università di Pavia, es va proposar estudiar el patró de resistències de la família d'ITINANs DABOs. Per tal d'establir una correlació entre les característiques químiques de la família DABO i la seva activitat antiviral contra virus mutats resistents, es van proposar estudiar una sèrie de nous compostos anomenats *N,N*-DABOs [5-alkuil-2-(*N,N*-disubstituit)amino-6-(2,6-difluorefenilalquil)-3,4-dihidropirimidin-4(3*H*)-ona], juntament amb els prototips de *S*-DABO i *NH*-DABO (Fig. 32).

Un total de nou *N,N*-DABOs (Taula 13) van ser sintetitzats (compostos 3a-3i), juntament amb els prototips de *S*-DABO i *NH*-DABO (compostos 1 i 2, respectivament) (36).

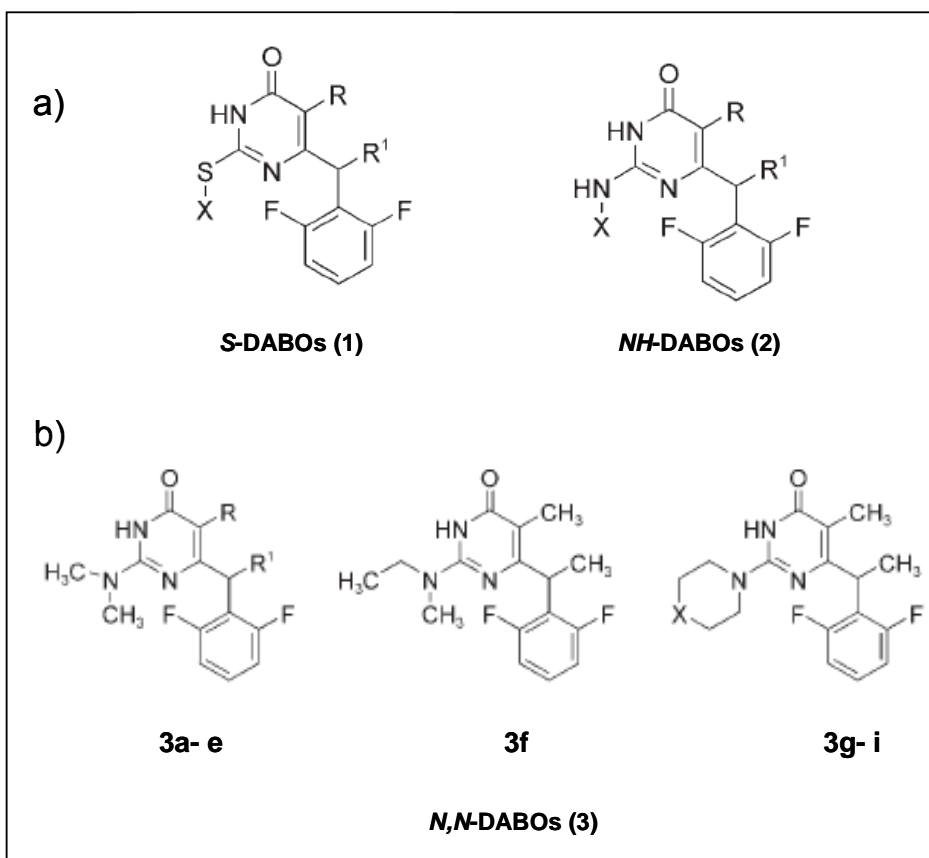


Figura 32. (a) Estructura química dels ITINANs *S*-DABOs (compost 1), *NH*-DABOs (compost 2). (b) Estructura química dels *N,N*-DABOs (compostos 3a-i).

Compost	X	R	R <sup>1</sup>
1	ciclopentil	Me	Me
2	ciclopentil	Me	Me
3a		H	H
3b		Me	Me
3c		Me	H
3d		H	Et
3e		Et	Me
3f			
3g	CH <sub>2</sub>		
3h	O		
3i	S		

Taula 13. Informació química dels nous compostos sintetitzats.

#### 4.4.3.1 Determinació de l'activitat antiviral dels derivats d'*N,N*-DABO

Els compostos sintetitzats (del 3a al 3i) derivats d'*N,N*-DABOs i els dos compostos prototip de *S*-DABO i *NH*-DABO (compostos 1 i 2, respectivament) van ser avaluats en cèl·lules MT-4 contra la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>, la soca multiresistent VIH-1<sub>IRLL98</sub> (amb les mutacions en la TI K101Q, Y181C i G190A, que confereixen resistència a nevirapina, delavirdina i efavirenz) i tres soques de VIH-1 amb les mutacions puntuals K103N, Y181C i Y188L en la TI, que també confereixen resistència a ITINANs.

Tal i com es mostra a la taula 14, tots els compostos van mostrar ser actius inhibint la replicació del virus salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub> a concentracions nanomolars, i alguns d'ells subnanomolars (compostos 3b i 3f). Aquesta elevada potència inhibidora contra el virus salvatge, també es va veure reflexada en la inhibició de les soques resistents. Tots els compostos van inhibir la replicació viral de l'aïllat clínic multiresistent VIH-1<sub>IRLL98</sub> a concentracions micromolars, mantenint les relacions de potència observades contra el virus salvatge, ja que els compostos que van mostrar major activitat en la soca salvatge (compostos 3b i 3f) també inhibien l'aïllat clínic amb una menor EC<sub>50</sub> que la resta, de l'ordre nanomolar. Pel que fa a la inhibició dels virus amb una sola mutació de resistència als ITINANs, vam poder observar comportaments diferents segons la soca viral. El virus VIH-1<sub>K103N</sub> va ser inhibit per tots els compostos testats mantenint EC<sub>50</sub> micromolars, amb excepció del compost 3a que no va ser



capaç d'inhibir-ne la replicació viral a la màxima concentració testada. Tal i com va quedar palès en la soca salvatge i l'aïllat VIH-1<sub>IRLL98</sub>, els compostos 3b i 3f van ser els que van mostrar un major efecte inhibitori a concentracions submicromolars. Pel que fa a la inhibició de la soca de VIH-1 amb la mutació Y181C, tots els compostos van inhibir-ne la replicació amb comportaments semblants als mostrats amb els tres virus anteriors, mantenint EC<sub>50</sub> micromolars, però majors a les obtingudes en el virus salvatge. Finalment, la soca viral VIH-1<sub>Y188L</sub> va ser la que va mostrar més resistència als nous compostos, ja que del total de compostos, cinc d'ells no van poder inhibir-ne la replicació a la màxima concentració testada. Els sis compostos que la van inhibir, ho van fer a concentracions més elevades que les mostrades contra el virus salvatge, però en tots els casos mantenint valors micromolars i millors als mostrats per la droga control nevirapina.

Compost	EC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>					CC <sub>50</sub> (µM) <sup>b</sup>
	NL4-3 salvatge	HXB2 RT IRLL98	HXB2 RT K103N	HXB2 RT Y181C	HXB2 RT Y188L	
1	0,0011	0,12	0,23	0,10	>3	>3
2	0,002	0,05	0,19	0,03	>10	53
3a	0,023	2	>10	3,60	>10	>94
3b	0,0003	0,005	0,05	0,014	0,05	>17
3c	0,005	0,5	2,4	1,82	>10	>89
3d	0,002	1,6	0,18	0,43	>10	73
3e	0,002	0,88	0,25	0,10	0,55	>81
3f	0,0003	0,003	0,02	0,002	0,03	81
3g	0,007	0,06	0,52	0,07	0,39	>75
3h	0,002	0,05	0,39	0,09	0,56	>74
3i	0,003	0,06	1,24	0,03	0,86	>71
AZT	0,003	0,008	0,003	0,003	0,003	>3,7
Nevirapina	0,08	9,9	1,8	0,87	5,6	>100
Efavirenz	0,004	0,08	0,09	0,006	0,23	>0,3

Taula 14. Activitat antiviral i toxicitat cel·lular dels diferents compostos contra diferents soques de VIH-1.

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub>: concentració efectiva 50 o concentració necessària per inhibir el 50% de la mort cel·lular induïda pel VIH-1, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

<sup>b</sup> CC<sub>50</sub>: concentració citotòxica 50 o concentració que indueix el 50 % de mort cel·lular en els cultius no infectats, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

El nivell de resistència dels diferents virus testats a tots els compostos es mostra a la taula 15 i és resultat del coeficient de l'EC<sub>50</sub> de cada compost en el virus mutat respecte la del virus salvatge. Els compostos amb millor perfil de resistències (que van mostrar millor inhibició dels virus mutants respecte l'obtinguda en el virus salvatge) van ser el prototip de *NH-DABO* (compost 2) i els *N,N-DABOs* 3b, 3f i 3g.

Compost	EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	Resistència <sup>b</sup>			
		NL4-3 salvatge	HXB2 RT IRL98	HXB2 RT K103N	HXB2 RT Y181C
1	0,0011	109	209	91	>2700
2	0,002	25	95	15	>5000
3a	0,023	87	>434	156	>434
3b	0,0003	17	167	47	167
3c	0,005	100	480	364	>2000
3d	0,002	800	90	215	>5000
3e	0,002	440	125	50	275
3f	0,0003	10	67	7	100
3g	0,007	9	74	10	56
3h	0,002	25	195	45	280
3i	0,003	20	413	10	287
AZT	0,003	3	1	1	1
Nevirapina	0,080	124	23	11	70
Efavirenz	0,004	20	22	1,5	57

Taula 15. Resistència als diferents compostos de les diferents soques de VIH-1

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub>: concentració efectiva 50 o concentració necessària per inhibir el 50% de la mort cel·lular induïda pel VIH-1, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

<sup>b</sup> Resistència: valor obtingut del coeficient entre l'EC<sub>50</sub> de cada compost en el virus mutat respecte la del virus salvatge. Quan el valor d'EC<sub>50</sub> és major que la màxima concentració de compost testada, es fa servir aquesta concentració per a fer el càlcul de resistència.

Tres dels onze compostos testats van mostrar certa toxicitat cel·lular a la màxima concentració testada (compostos 2, 3d i 3f). Els valors calculats de CC<sub>50</sub> es mostren a la taula 14.

Amb els valors d'EC<sub>50</sub> i CC<sub>50</sub>, vam calcular uns índex de selectivitat superiors a 26000, 56000, 270000 i 10000 pels compostos 2, 3b, 3f i 3g, respectivament.

#### 4.4.3.2 Determinació de la inhibició de l'activitat enzimàtica de la TI

Al mateix laboratori on van fer la síntesi dels compostos van voler determinar la capacitat d'inhibició de l'activitat enzimàtica de la TI per part dels nous *N,N*-DABOs sintetitzats i els dos prototips control. Van realitzar el test enzimàtic enfront l'enzim provinent de la soca salvatge VIH-1<sub>IIIB</sub> i les soques amb les mutacions K103N, Y181I, L100I, V106A, V179D i Y188L (15, 180). A la taula 16 es mostren els valors obtinguts de les constants d'inhibició ( $K_i$ ) de la unió dels compostos als diferents enzims de la TI analitzats.

Compost	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>						
	IIIB salvatge	HXB2 RT K103N	HXB2 RT Y181I	HXB2 RT L100I	HXB2 RT V106A	HXB2 RT V179D	HXB2 RT Y188L
1	0,005	0,03	0,9	0,3	0,5	0,25	1,4
2	0,03	0,03	0,8	1,3	5	3,1	5
3a	0,08	3	3	10	0,5	5	30
3b	0,1	0,5	4	1	ND	2	0,5
3c	0,8	10	>20	10	ND	ND	11
3d	0,1	10	>20	3,3	ND	ND	5
3e	0,05	2	5	4	ND	ND	10
3f	0,04	0,5	10	2,5	ND	ND	4
3g	0,07	0,6	>20	2	ND	ND	3,5
3h	0,003	3,3	>20	10	>20	>20	5,5
3i	0,06	10	>20	5	ND	ND	4
Nevirapina	0,4	7	35	9	10	0,3	18
Efavirenz	0,03	3	0,08	ND	ND	ND	ND

Taula 16. Activitat enzimàtica dels compostos contra diferents enzims de la TI del VIH-1.

<sup>a</sup>  $K_i$ : constant d'inhibició dels compostos envers diferents enzims de la TI.

ND: no determinat.

A menor  $K_i$ , major afinitat del compost per l'enzim, i per tant una millor potència inhibidora. Es pot observar com els diferents compostos mostren diferents perfils d'activitat enzimàtica segons la mutació de resistència de cada TI. Els compostos 1 i 2 mostren una clara potència inhibidora en tots els enzims de la TI testats, inclosos els mutants, tot i que en aquests es comprova una pèrdua d'afinitat, i per tant una major  $K_i$ . De la resta de compostos testats, tal i com es va mostrar en la prova d'activitat antiviral en la línia cel·lular MT-4, tots ells van mostrar una elevada potència inhibidora enfront l'enzim salvatge, tot i que aquesta potència es va veure especialment reduïda en la majoria dels enzims mutats, fet que també es correlaciona amb els resultats de cultiu *in vitro*.

Un dels compostos que va mostrar un perfil d'inhibició semblant en tots els enzims testats va ser el compost 3b. Tal i com es mostra en la figura 33 el seu perfil de resistència respecte l'enzim salvatge ( $K_{i \text{ mut}} / K_{i \text{ salv}}$ ) en quatre dels enzims mutats de la TI en les posicions K103N, Y181I, L100I i Y188L, va ser semblant i en general millor que els compostos prototip 1 i 2 i que la droga de referència nevirapina.

Així doncs, els resultats obtinguts amb els nous derivats d' *N,N*-DABO mostren la descripció i caracterització de nous compostos que poden inhibir virus amb resistència als actuals ITINANs usats en la clínica.

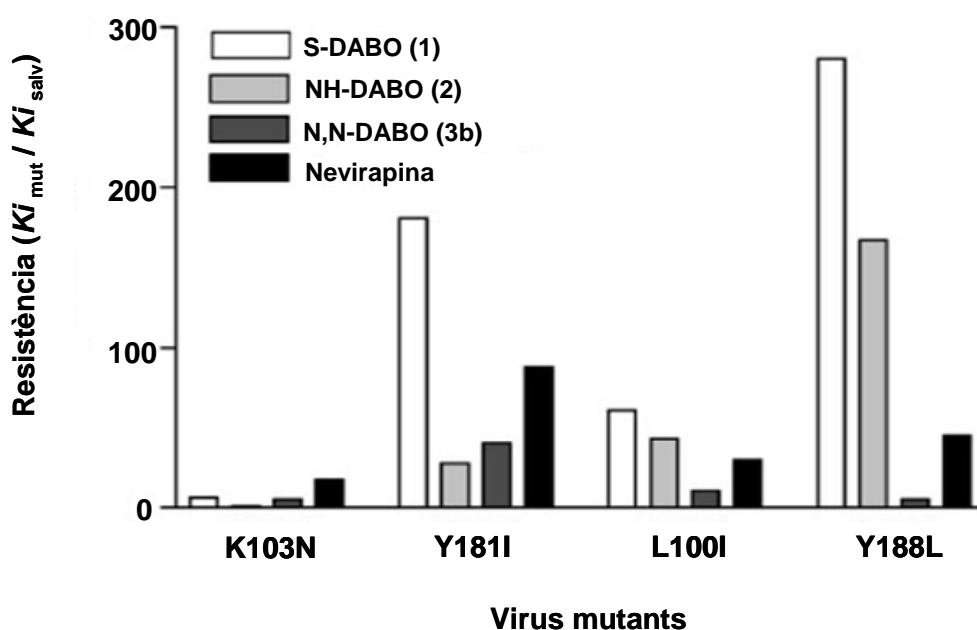


Figura 33. Perfil de resistència als compostos 1, 2, 3b i nevirapina dels enzims mutats K103N, Y181I, L100I i Y188L respecte l'enzim salvatge de la TI.

#### 4.4.4 Nous ITINANs derivats d' $F_2$ - $N,N$ -DABOs

Els nous esforços en el camp dels ITINANs es basen ara en el desenvolupament de nous compostos dotats amb activitats anti-VIH-1 més elevades i un perfil de resistència diferent al dels ITINANs ja coneguts.

Seguint el camí de la nombrosa família de compostos ITINANs, composta per més de 50 classes d'estructures diferents (35), un grup del Dipartimento di Studi Farmaceutici, de la Università degli Studi di Roma "La Sapienza" es va proposar estudiar amb més detall un seguit de compostos derivats de les famílies DABOs, S-DABOs i  $NH$ -DABOs com a inhibidors potents i selectius de la TI del VIH-1. Els nous compostos, 5-alkil-2-( $N,N$ -disubstituit)-amino-6-(2,6-difluorofenilalkil)-3,4-dihidropirimidina-4(3H)-ones, definits com a  $F_2$ - $N,N$ -DABOs, es van caracteritzar com a DABOs amb la presència d'un grup amino  $N,N$ -disubstituit o una amina cíclica a la posició pirimidina- $C_2$ , un àtom d'hidrogen o un grup alkil petit (metil o etil) al  $C_5$  i/o a la posició del benzílic i el grup funcional 2,6-difluorobenzil a la posició  $C_6$  (119).

##### 4.4.4.1 Determinació de l'activitat antiviral dels derivats d' $F_2$ - $N,N$ -DABO.

Del total de compostos sintetitzats per aquest grup, 39 d'ells a més dels dos compostos derivats d'S-DABO (compost 2a) i  $NH$ -DABO (compost 3a) van ser escollits per a l'anàlisi de la seva activitat anti-VIH-1 en cèl·lules MT-4 i contra el virus salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>, l'aïllat clínic multiresistent VIH-1<sub>IRLL98</sub> i les soques de VIH-1 resistents a ITINANs amb les mutacions K103N, Y181C i Y188L.

La figura 34 i la taula 17 mostren les estructures químiques i els radicals de cadascuna de les diferents estructures dels compostos a avaluar (S-DABO,  $NH$ -DABO i  $F_2$ - $N,N$ -DABO).

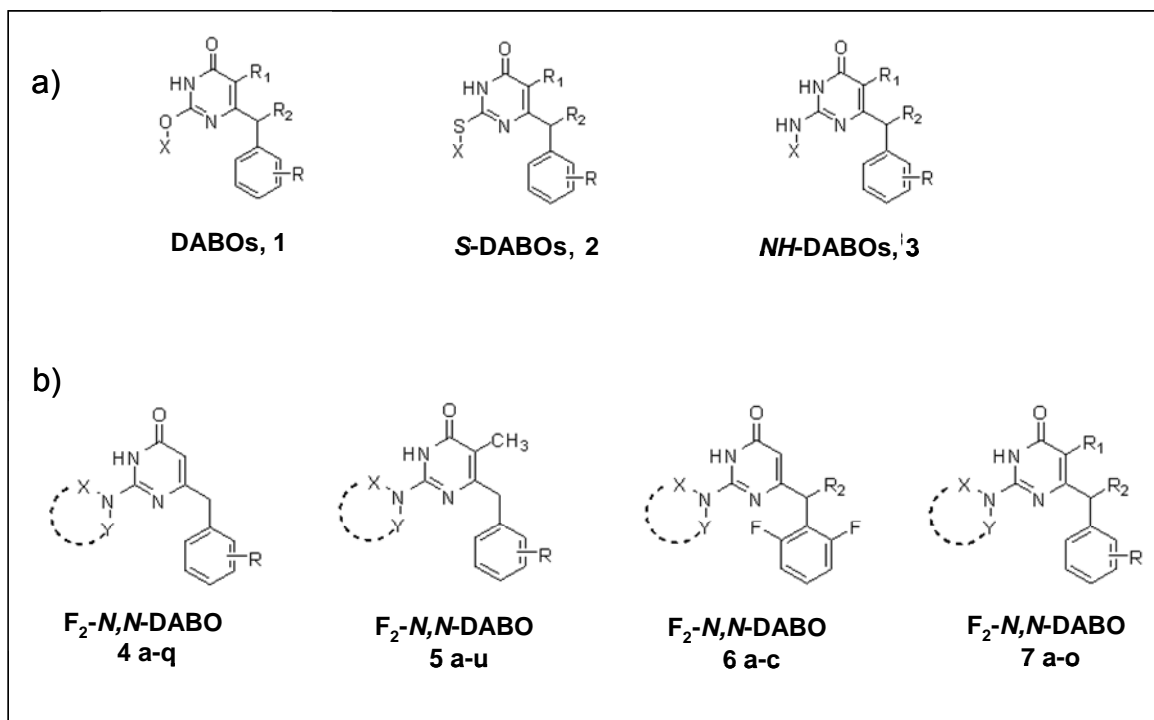


Figura 34. (a) Estructura química dels ITINANs DABOs (compost 1), S-DABOs (compost 2) i NH-DABOs (compost 3). (b) Estructura química dels F<sub>2</sub>-N,N-DABOs (compostos 4-7).

Del total de 41 compostos avaluats, tots ells (compostos 2, 3 i els dels grups 4-7) van mostrar ser actius inhibint la replicació viral de la soca salvatge en la línia cel·lular MT-4 a nivells submicromolar i fins hi tot alguns d'ells subnanomolar (compostos 7a, f, g i h) (Taula 18).

Compost	R	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	X, Y
4a	2,6-F <sub>2</sub>	H	H	Me, Me
4b	2,6-F <sub>2</sub>	H	H	Me, Et
4c	2,6-F <sub>2</sub>	H	H	Me, <i>i</i> -Pr
4g	2,6-F <sub>2</sub>	H	H	pirrolidin-1-il
4i	2,6-F <sub>2</sub>	H	H	piperidin-1-il
4j	2,6-F <sub>2</sub>	H	H	2-Me-piperidin-1-il
4k	2,6-F <sub>2</sub>	H	H	3-Me-piperidin-1-il
4l	2,6-F <sub>2</sub>	H	H	4-Me-piperidin-1-il
4m	2,6-F <sub>2</sub>	H	H	hexahidroazepin-1-il
4n	2,6-F <sub>2</sub>	H	H	morfolin-4-il
4o	2,6-F <sub>2</sub>	H	H	tiomorfolin-4-il
5a	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	Me, Me
5b	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	Me, Et
5c	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	Me, <i>i</i> -Pr
5d	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	Me, <i>n</i> -Pr
5e	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	Me, <i>c</i> -hexil
5i	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	pirrolidin-1-il
5k	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	piperidin-1-il
5l	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	2-Me-piperidin-1-il
5m	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	3-Me-piperidin-1-il
5n	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	4-Me-piperidin-1-il
5o	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	hexahidroazepin-1-il
5p	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	morfolin-4-il
5q	2,6-F <sub>2</sub>	Me	H	tiomorfolin-4-il
6a	2,6-F <sub>2</sub>	H	Me	Me, Me
6b	2,6-F <sub>2</sub>	H	Me	Me, <i>n</i> -Pr
6c	2,6-F <sub>2</sub>	H	Et	Me, Me
7a	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Me	Me, Me
7d	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Et	Me, Me
7e	2,6-F <sub>2</sub>	Et	Me	Me, Me
7f	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Me	Me, Et
7g	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Me	Me, <i>i</i> -Pr
7h	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Me	Me, <i>n</i> -Pr
7i	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Me	pirrolidin-1-il
7j	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Me	piperidin-1-il
7k	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Me	3-Me-piperidin-1-il
7l	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Me	4-Me-piperidin-1-il
7n	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Me	morfolin-4-il
7o	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Me	tiomorfolin-4-il
2a	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Me	ciclopentil
3a	2,6-F <sub>2</sub>	Me	Me	<i>n</i> -propil

Taula 17. Informació química dels nous compostos sintetitzats.

Compost	EC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>					CC <sub>50</sub> (µM) <sup>b</sup>
	NL4-3 salvatge	HXB2 RT IRL98	HXB2 RT K103N	HXB2 RT Y181C	HXB2 RT Y188L	
4a	0,023	2	>10	3,60	>10	>94
4b	0,013	2	>10	0,50	>10	>89
4c	0,008	0,2	>10	0,03	>10	85
4g	0,093	>10	>10	>10	>10	>86
4i	0,013	2,2	>10	0,71	8,00	>82
4j	0,107	3	>10	1,14	>10	>78
4k	0,032	1,8	>10	0,43	>10	>78
4l	0,035	4,6	>10	1,29	>10	>78
4m	0,022	1,4	>10	0,43	>10	>78
4n	0,211	>10	>10	>10	>10	>81
4o	0,035	>10	>10	>10	>10	>77
5a	0,005	0,5	2,4	1,82	>10	>89
5b	0,018	0,42	4,6	0,71	8	>85
5c	0,002	0,08	1,2	0,03	2,3	79
5d	0,002	0,055	0,75	0,04	1,6	>81
5e	0,009	2	4,4	0,14	6,2	>72
5i	0,032	>10	>10	5,15	>10	>82
5k	0,003	0,82	>10	0,14	10	>78
5l	0,009	1,4	>10	0,14	>10	75
5m	0,018	2,1	>10	0,57	>10	>75
5n	0,100	>10	>10	>10	>10	>75
5o	0,050	1,7	>10	0,57	>10	>75
5p	0,026	>10	>10	>10	>10	>78
5q	0,004	>10	>10	>10	>10	>74
6a	0,001	0,67	0,12	0,26	>10	89
6b	0,0006	0,15	0,08	0,05	>10	>81
6c	0,002	1,6	0,18	0,43	>10	73
7a	0,0003	0,005	0,05	0,014	0,05	>17
7d	0,007	1,18	1,83	0,29	0,48	>81
7e	0,002	0,88	0,25	0,1	0,55	>81
7f	0,0003	0,003	0,02	0,002	0,03	81
7g	0,0005	0,001	0,006	0,0007	0,04	>78
7h	0,0006	0,001	0,01	0,0006	0,03	>78
7i	0,002	0,2	0,155	0,071	>10	>75
7j	0,007	0,06	0,52	0,07	0,39	>72
7k	0,003	0,2	0,193	0,014	0,12	54
7l	0,002	0,3	0,322	0,01	0,22	>72
7n	0,002	0,05	0,39	0,09	0,56	>74
7o	0,003	0,06	1,24	0,03	0,86	>71
2a	0,001	0,12	0,225	0,097	>3	>3
3a	0,003	0,09	0,37	0,06	>10	35
AZT	0,003	0,008	0,003	0,003	0,003	>3,7
Nevirapina	0,08	9,9	1,8	0,87	5,6	>7
Efavirenz	0,004	0,08	0,09	0,006	0,23	>0,3

Taula 18. Activitat antiviral i toxicitat cel·lular dels diferents compostos contra diferents soques de VIH-1.

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub>: concentració efectiva 50 o concentració necessària per inhibir el 50% de la mort cel·lular induïda pel VIH-1, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

<sup>b</sup> CC<sub>50</sub>: concentració citotòxica 50 o concentració que induïx el 50 % de mort cel·lular en els cultius no infectats, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.



De les diferents classes de F<sub>2</sub>-N,N-DABOs sintetitzats, els del grup 7 van mostrar ser els més actius amb unes EC<sub>50</sub> menors a la resta de compostos, totes elles de l'ordre de nanomolar o subnanomolar.

Els resultats de l'avaluació de l'activitat antiviral contra les quatre soques de virus resistents a ITINANs van mostrar uns resultats clarament diferents segons el grup de compostos avaluats.

Els compostos 2 i 3, prototips de S-DABO i NH-DABO respectivament, clarament van inhibir les soques VIH-1<sub>IRLL98</sub>, VIH-1<sub>K103N</sub> i VIH-1<sub>Y181C</sub> amb unes EC<sub>50</sub> submicromolars, però en canvi a la màxima concentració testada no van inhibir la soca VIH-1<sub>Y188L</sub>.

Els 11 compostos pertanyents al grup 4, tot i mostrar una elevada potència inhibidora contra el virus salvatge, van resultar ser substancialment menys actius a l'hora d'inhibir les soques VIH-1<sub>IRLL98</sub> i VIH-1<sub>Y181C</sub>. La majoria d'ells no van ser capaços d'inhibir la replicació de les soques VIH-1<sub>K103N</sub> i VIH-1<sub>Y188L</sub> a la màxima concentració de compost testada.

Els 13 compostos del grup 5 van mostrar perfils d'inhibició molt semblants als anteriors. Tots ells van mostrar EC<sub>50</sub> submicromolars contra la soca salvatge, però en canvi ràpidament perdien la seva potència en la inhibició de les quatre soques resistents. Dins del mateix grup 5, podem distingir tres subgrups de compostos: el subgrup de compostos en que a la posició X hi trobem un metil i a la posició Y hi trobem un grup petit (5a- 5d), el compost 5e amb un grup metil i un altre de mida més gran i finalment els compostos entre el 5i i el 5q, on els radicals X i Y formen una estructura cíclica, de tamany major que els anteriors. Entre aquests tres subgrups de compostos dins del grup 5, es poden diferenciar tres perfils d'inhibició diferents de les soques resistents. El primer subgrup de quatre compostos, format per radicals més petits, mostren una clara inhibició de la replicació de les soques resistents a concentracions micromolars, així com el compost 5e, que tot i que amb valors d'EC<sub>50</sub> majors que els anteriors, també inhibeix les quatre soques resistents. Dins el tercer subgrup de compostos del grup 5, cap d'ells va inhibir ni la soca K103N, ni la Y188L a la màxima concentració testada, i només alguns d'ells van mostrar certa inhibició de les soques VIH-1<sub>IRLL98</sub> i VIH-1<sub>Y181C</sub>.

Aquest grup 5 de compostos, ens suggereix una clara relació entre l'estructura química i l'activitat antiviral dels diferents compostos. A major grandària dels

radicals X i Y, clarament es disminueix la capacitat inhibidora del compost contra els virus resistents.

El grup 6 de compostos (6a- 6c), format per tres elements amb radicals petits en les posicions X i Y, van mostrar  $EC_{50}$  submicromolars tant contra el virus salvatge com contra els resistents, a excepció del VIH-1<sub>Y188L</sub>, que no va ser inhibit a la màxima concentració testada per cap dels compostos.

Els 12 elements que formen el grup 7 van mostrar ser els més actius de tota la sèrie de compostos analitzats. En aquest cas, tots ells van inhibir tots els virus testats, tant el salvatge com els resistents, a concentracions micromolars i submicromolars, a excepció del compost 7i, que a la màxima concentració testada no va inhibir la soca resistent VIH-1<sub>Y188L</sub>. Aquest grup es caracteritza per tenir un grup alquil petit en els radicals R1 i R2 (grup metil o etil), que els diferencia de la resta de grups, fet que sembla ser important a l'hora de definir-ne la potència inhibidora.

A la taula 19 es mostren els valors de resistència als compostos dels virus testats. Els valors mostren el coeficient de l' $EC_{50}$  de cada compost en el virus mutat respecte la del virus salvatge. Tal i com la taula pròpia d' $EC_{50}$  mostrava, els compostos de les sèries 6 i 7 van ser els que van mostrar un millor perfil de resistències.

Compost	EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	Resistència <sup>b</sup>			
		NL4-3 salvatge	HXB2 RT IRL98	HXB2 RT K103N	HXB2 RT Y181C
4a	0,023	87	>435	156	>435
4b	0,013	154	>769	38	>769
4c	0,008	22	>1250	4	>1250
4g	0,093	>108	>108	>108	>108
4i	0,013	169	>769	55	615
4j	0,107	28	>93	11	>83
4k	0,032	56	>313	13	>313
4l	0,035	131	>286	37	>286
4m	0,022	64	>455	19	>455
4n	0,211	>47	>47	>47	>47
4o	0,035	>286	>286	>286	>286
5a	0,005	100	480	364	>2000
5b	0,018	23	256	39	444
5c	0,002	40	600	15	1150
5d	0,002	27	375	19	800
5e	0,009	222	489	16	689
5i	0,032	>313	>313	161	>131
5k	0,003	273	>3333	47	3333
5l	0,009	156	>1111	16	>1111
5m	0,018	117	>556	32	>556
5n	0,100	>100	>100	>100	>100
5o	0,050	34	>200	11	>200
5p	0,026	>385	>385	>385	>385
5q	0,004	>2500	>2500	>2500	>2500
6a	0,001	670	120	260	>10000
6b	0,0006	250	133	83	>16667
6c	0,002	800	90	215	>5000
7a	0,0003	17	167	47	167
7d	0,007	169	261	41	69
7e	0,002	440	125	50	275
7f	0,0003	10	67	7	100
7g	0,0005	2	12	1,4	80
7h	0,0006	1,7	17	1	50
7i	0,002	100	77	35	>5000
7j	0,007	9	74	10	56
7k	0,003	67	64	5	40
7l	0,002	150	161	5	110
7n	0,002	25	195	45	280
7o	0,003	20	413	10	287
2a	0,001	120	225	97	>10000
3a	0,003	30	125	20	>3333
AZT	0,003	3	1	1	1
Nevirapina	0,08	124	23	11	70
Efavirenz	0,004	20	22	1,5	57

Taula 19. Resistència als diferents compostos de les diferents soques de VIH-1.

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub>: concentració efectiva 50 o concentració necessària per inhibir el 50% de la mort cel·lular induïda pel VIH-1, avaluada pel mètode MTT i en cèl·lules MT-4.

<sup>b</sup> Resistència: valor obtingut del coeficient entre l'EC<sub>50</sub> de cada compost en el virus mutat respecte la del virus salvatge. Quan el valor d'EC<sub>50</sub> és major que la màxima concentració de compost testada, es fa servir aquesta concentració per a fer el càlcul de resistència.

En general, els  $F_2$ -N,N-DABOs avaluats en aquest apartat van mostrar bons índex de selectivitat, en cap cas inferiors a 400. Per als compostos de les sèries 6 i 7, en general es van poder calcular índex de selectivitat superiors en tots els casos a 10000.

#### 4.4.4.2 Determinació de la inhibició de l'activitat enzimàtica de la TI

El mateix grup que va fer la síntesi dels compostos es va encarregar de determinar la capacitat d'inhibir l'activitat enzimàtica de diferents TI recombinants d'alguns dels nous  $F_2$ -N,N-DABOs sintetitzats. Van realitzar el test enzimàtic enfront l'enzim provinent de la soca salvatge VIH-1<sub>III B</sub> i les soques amb les mutacions K103N, L100I, V106A, V179D, Y181I i Y188L (15, 180). A la taula 20 es mostren els valors obtinguts de les constants d'inhibició ( $K_i$ ) de la unió de 22  $F_2$ -N,N-DABOs i els compostos controls, als diferents enzims de la TI analitzats. Tots els compostos analitzats van mostrar valors de  $K_i$  entre micromolar i nanomolar quan es van testar contra l'enzim salvatge de la TI.

Els compostos analitzats del grup 7, correlacionant amb el resultat obtingut en l'avaluació d'activitat antiviral en la línia cel·lular MT-4, van ser els que van mostrar una major potència inhibidora contra l'enzim salvatge de la TI i en general, contra la resta d'enzims mutats testats.

Compost	K <sub>i</sub> (μM) <sup>a</sup>						
	IIIB salvatge	HXB2 RT K103N	HXB2 RT L100I	HXB2 RT V106A	HXB2 RT V179D	HXB2 RT Y181I	HXB2 RT Y188L
4a	0,1	3	10	0,5	5,0	3	30
4i	2,5	>20	10	0,2	>20	>20	>20
4n	0,7	>20	15	3	>40	>20	>20
4o	0,2	1,5	1	3	1	0,4	1
4p	11,2	>20	>20	>40	>40	>20	>20
5a	0,1	9	10	0,7	1,6	>20	11
5d	0,1	>20	18	0,008	0,2	>20	>20
5p	0,05	>20	0,9	0,4	8,3	>20	>20
5q	0,15	>20	5	0,09	40	>20	>20
5r	2	ND	ND	0,9	>40	ND	ND
5t	0,25	>20	0,22	4,1	8,5	>20	25,7
5u	0,05	>20	>20	0,01	0,01	>20	0,49
6c	0,1	10	3,3	0,14	0,03	>20	5
7a	0,1	0,5	1	0,1	2	4	0,5
7d	1	>20	>20	>40	>40	>20	>20
7e	0,05	2	4	0,06	0,03	5	10
7f	0,04	0,5	2,5	0,02	0,02	10	4
7g	0,04	0,08	0,12	0,03	ND	0,85	1,19
7h	0,03	0,17	0,18	0,02	ND	1,26	1,43
7j	0,07	0,6	2	0,02	0,01	>20	3,5
7n	0,003	3,3	10	>20	>20	>20	5,5
7o	0,06	10	5	0,03	0,02	>20	4
2a	0,005	0,03	0,3	0,5	0,25	0,9	1,4
3a	0,04	0,47	0,31	0,04	ND	5,02	3,11
Nevirapina	0,4	7	9	10	0,3	35	18
Efavirenz	0,03	3	ND	ND	ND	0,08	ND

Taula 20. Activitat enzimàtica dels compostos contra diferents enzims de la TI del VIH-1.

<sup>a</sup> K<sub>i</sub>: constant d'inhibició dels compostos evers diferents enzims de la TI.

ND: no determinat.

#### 4.4.4.3 Determinació del mecanisme d'unió dels nous F<sub>2</sub>-N,N-DABOs

L'ús del programa Autodock (82) ha servit en nombroses ocasions al grup del Dipartimento di Studi Farmaceutici de la Università degli Studi di Roma "La Sapienza" com a eina per determinar el mecanisme d'unió i fer el disseny de nous inhibidors de l'enzim TI. Per tal de determinar el mecanisme d'unió dels nous F<sub>2</sub>-N,N-DABOs sintetitzats a l'enzim TI, aquest grup va decidir usar aquest programa per a realitzar proves d'engalament (o *docking* en anglès). Van escollir el compost 7h com a compost representatiu de tota la sèrie de nous compostos sintetitzats, per haver mostrat ser un dels més actius contra la

soca salvatge i les soques resistents tant en els assajos cel·lulars *in vitro* com en els d'activitat enzimàtica.

A la figura 35 es mostren els angles de torsió que influencien la flexibilitat del compost 7h. En estudis d'engalzament creuat (o *cross-docking* en anglès) comparant el compost 7h amb el compost 3a, es va observar un elevat nivell d'adaptabilitat en la butxaca del lloc d'unió dels no nucleòsids (NNBS, de l'anglès *non-nucleoside binding site*), que implicava una combinació d'ajustaments conformacionals (o *wiggling* en anglès) i canvis rotacionals i translacionals (o *jiggling* en anglès) de l'inhibidor dins la butxaca d'unió.

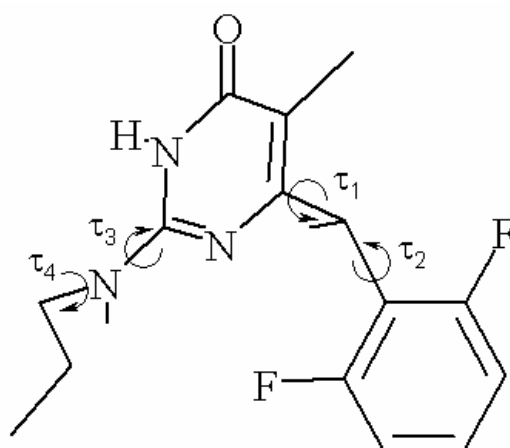


Figura 35. Angles de torsió que influencien la flexibilitat del compost 7h.

Aparentment, els nous  $F_2$ -*N,N*-DABOs poden canviar la seva conformació i reorientar-se com a resposta a canvis en el NNBS causats per les mutacions. A la figura 36 es mostren les conformacions d'engalzament de menor energia proposades pel programa Autodock pel compost 7h en les isoformes de la TI salvatge i amb les mutacions K103N, Y181C i Y188L.

Aquesta adaptabilitat ens ajudaria a explicar la potenciada habilitat d'aquests compostos per inhibir les soques de VIH-1 amb mutacions de resistència en la TI, tal i com han mostrat els bons resultats obtinguts en els assajos d'activitat antiviral realitzats.

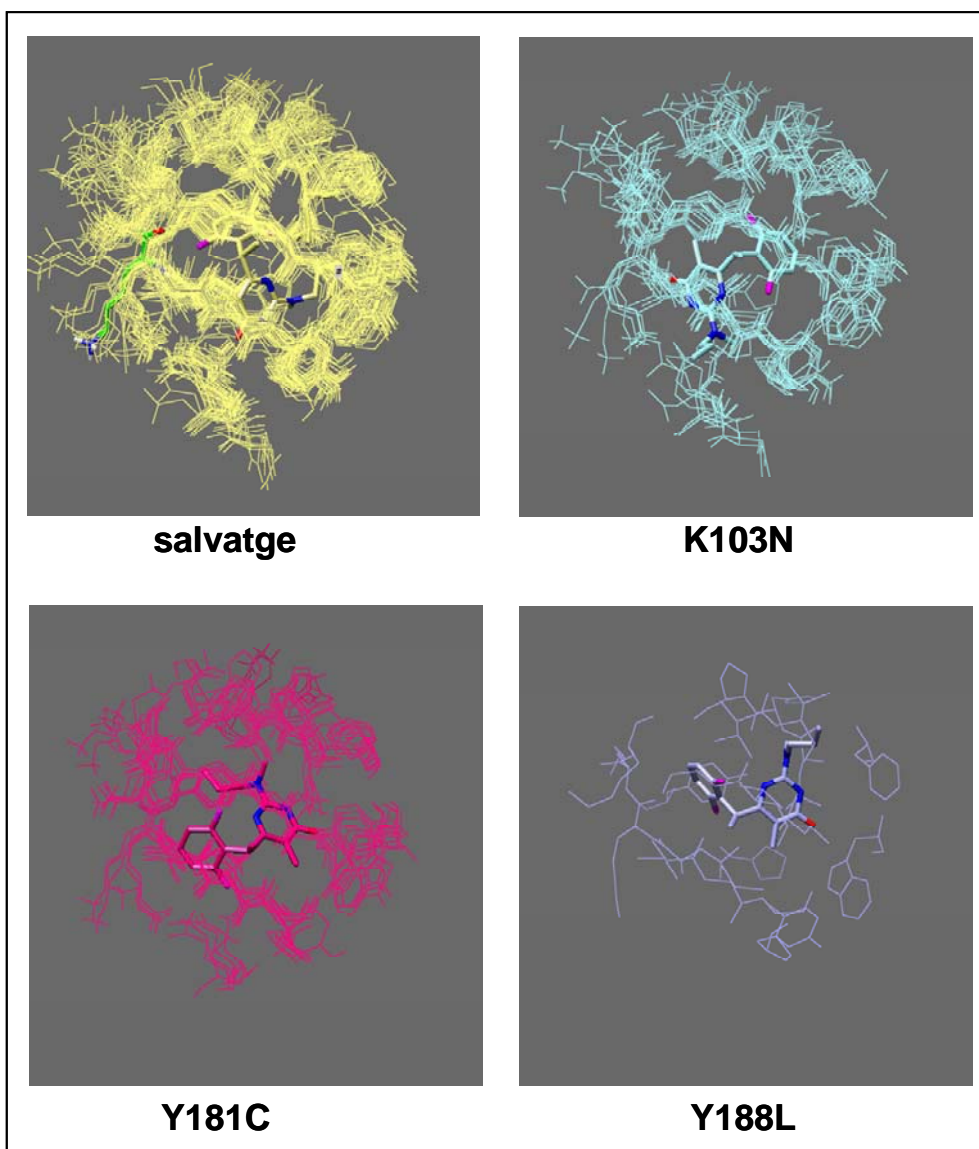


Figura 36. Conformacions d'engalament de menor energia del compost 7h en les isoformes salvatge i mutant K103N (panells superiors) i mutants Y181C i Y188L (panells inferiors).

## 5. Discussió

---

Des dels inicis de la teràpia antiretroviral a finals de la dècada dels 80, amb l'aparició de l'AZT, s'ha modificat significativament el curs de la infecció per VIH (64, 104). L'actual teràpia en la clínica per fer front a la infecció per VIH es basa principalment en combinacions de fàrmacs amb acció inhibidora dels enzims transcriptasa inversa i proteasa del virus. Les elevades toxicitats dels tractaments existents, així com l'aparició de nombroses mutacions de resistència van plantejar la necessitat d'incloure nous fàrmacs pel tractament del VIH (134). Els intents per introduir noves classes d'inhibidors del VIH a la clínica, diferents als inhibidors de la transcriptasa inversa, van començar a donar fruit a partir de la introducció dels inhibidors de la proteasa al 1996 (9, 97, 129) i de T-20 al 2003 (17, 100). T-20, com a inhibidor de l'etapa de fusió que s'uneix a l'intermediari estructural de la glicoproteïna TMgp41 que es forma després de la unió de la SUgp120 amb el coreceptor (73, 89), forma part dels anomenats inhibidors d'entrada i va sorgir després de la resolució de l'estructura de la TMgp41 (45). El procés d'entrada del VIH ens ofereix diferents dianes terapèutiques separades en l'espai i el temps, fet que el converteix en un procés interessant de cara a la teràpia. A part de l'entrada viral, altres etapes del cicle de replicació del VIH com la integració i la maduració també han despertat interès com a dianes farmacològiques (134). Però la partícula viral en sí, no ha estat l'únic focus d'interès per al desenvolupament de noves dianes, ja que les investigacions actuals també busquen en factors cel·lulars que intervenen en la infecció per VIH, possibles noves vies d'inhibició del virus (165).

El coneixement en detall de cada una de les potencials dianes terapèutiques, ha permès el disseny racional de noves molècules inhibidores del virus. Aquest fet ha incrementat el nombre de nous compostos sintetitzats, tant per part de les empreses farmacèutiques com pels diferents grups de recerca bàsica a nivell universitari.



La capacitat d'avaluar nous compostos com a agents amb activitat anti-VIH, especialment centrats en les etapes d'entrada viral i transcripció inversa, va despertar el nostre interès des de l'inici d'aquest treball. La possibilitat de disposar d'un elevat nombre de compostos de nova síntesi provinents de departaments de química de diferents universitats estatals i internacionals ens va fer adonar de la necessitat de desenvolupar una metodologia útil per a l'estudi més en detall d'aquests grups d'inhibidors.

La determinació de l'activitat anti-VIH d'un compost és el primer assaig a que es sotmeten les molècules de nova síntesi per tal de determinar-ne la seva validesa com a inhibidors de la replicació viral. Si un dels nostres propòsits era avaluar un gran nombre de nous compostos dissenyats per inhibir el VIH-1, el primer pas a tenir en compte era la implementació de l'assaig d'activitat antiviral que fins al moment s'havia usat al laboratori. Amb aquesta finalitat, l'assaig es va automatitzar parcialment per tal de poder assolir l'avaluació d'un elevat nombre de compostos en un mateix assaig. Gràcies a la implementació i estandarització del protocol d'activitat antiviral, avaluacions a mitjana-gran escala es van poder realitzar mantenint la qualitat de l'assaig individual. Aquesta millora del protocol, avui en dia eina bàsica del nostre treball quotidià al laboratori, ens va permetre realitzar un cribratge de més d'un miler i mig de compostos de nova síntesi i que dia a dia va en augment.

Un cop resolta la nostra capacitat d'avaluació de l'activitat antiviral de nous compostos, vam voler posar a punt un altre assaig per a la determinació de l'acció de compostos amb l'entrada viral com a diana.

Resultats observats en treballs anteriors (23, 24, 26) van fer-nos decidir pel cocultiu entre cèl·lules T crònicament infectades pel VIH-1 i limfòcits primaris T CD4+, com a eina principal per desenvolupar un assaig que ens permetés determinar i discernir de forma ràpida i concisa el mecanisme d'acció i la pròpia activitat anti-VIH-1 dels nous compostos amb diana en les diferents etapes de l'entrada del virus a la cèl·lula. El contacte de cèl·lules infectades pel VIH-1 amb cèl·lules T CD4+ diana que expressen els coreceptors virals (156), a més de la transferència d'antígens virals de la cèl·lula efectora a la cèl·lula diana, pot finalitzar en la mort de cèl·lules T CD4+ individuals després de la interacció cel·lular mitjançada per la TMgp41 (23) i també en la fusió d'ambdues membranes, viral i cel·lular, donant lloc a la formació de sincicis (22). El fet que

cada un d'aquests esdeveniments sequencials fos susceptible de ser bloquejat per un tipus diferent d'inhibidor, ens va permetre el disseny d'un assaig on s'avalués la capacitat de diferents compostos d'inhibir-los.

Cada un dels paràmetres avaluats requeria però diferent tractament de les cèl·lules; mentre que normalment la mort cel·lular es determina en cèl·lules sense fixar (22), el marcatge de l'antígen viral CAp24 requereix processos de fixació i permeabilització, al tractar-se d'un marcatge intracel·lular. Per aquest motiu, i degut a que es volien avaluar tots els paràmetres alhora en una mateixa mostra, es va parar especial atenció a la precisió de l'avaluació dels paràmetres de mort cel·lular. Es va determinar si les cèl·lules primàries T CD4+ mortes restaven en el cultiu o patien una disgregació ràpida. Tal i com es mostra en el segon apartat de resultats, en tractaments amb diferents concentracions de puromicina que causen del 15 al 85 % de mort en cèl·lules T CD4+ (valors similars als causats per la infecció amb el VIH-1) no es modifica el recompte del nombre absolut (cèl·lules vives + cèl·lules mortes) de cèl·lules primàries T CD4+. Una segona limitació que podia esdevenir del nostre assaig, estava associada al càlcul indirecte de la fusió de cèl·lula a cèl·lula, valor correlacionat amb la formació de cèl·lules multinucleades o sincicis. Dels nostres assajos vam obtenir una bona correlació entre el càlcul directe de l'àrea ocupada pels sincicis formats en el cultiu i el càlcul indirecte de la fusió cèl·lula a cèl·lula calculat com a cèl·lules perdudes en el cultiu. Aquests resultats ens permetien afirmar que els processos de fixació i permeabilització no alteraven la morfologia de les cèl·lules a estudiar, permetent-nos així realitzar un anàlisi quantitatiu de la fusió, la mort cel·lular i la transferència de partícules de VIH-1 de cèl·lula a cèl·lula. Estudis anteriors realitzats pel nostre grup van determinar que cocultius d'entre 16 i 24 hores d'incubació eren suficients per obtenir valors òptims dels paràmetres avaluats en el nostre assaig (22). La inducció d'apoptosi mesurada per canvis en la morfologia cel·lular requereix 24 hores per obtenir valors òptims (22), mentre que la transmissió d'antígens virals de cèl·lula a cèl·lula arriba a valors òptims entre les 8 i les 16 hores i es manté estable durant cultius més llargs (24).

La funció fisiològica del complex que forma l'embolcall del VIH-1, la fusió de les membranes viral i cel·lular, és un procés que implica diferents etapes on les subunitats SUgp120 i TMgp41 i diferents receptors cel·lulars hi participen

activament. Cada etapa mitjançada per l'embolcall del VIH-1, des de la primera interacció electrostàtica del virus amb la superfície de la cèl·lula diana fins a l'etapa final de fusió de membranes, és susceptible a esdevenir una diana per al desenvolupament de noves drogues amb activitat contra el VIH-1.

Assumint que la inhibició d'etapes tardanes no afecten a les etapes més primerenques de la funció de l'embolcall viral, l'anàlisi simultani de les funcions primerenques i tardanes de l'embolcall viral ens permet discriminar i determinar el mecanisme d'acció de drogues dirigides contra l'embolcall del VIH-1. La capacitat d'inhibir la transferència del VIH-1 està restringida als inhibidors de la interacció entre la subunitat SUgp120 del virus i la molècula CD4 de la cèl·lula diana (com l'anticòs monoclonal anti-CD4 Leu3a), mentre que els inhibidors de coreceptors (AMD3100 i TAK-779) es poden identificar per la seva capacitat selectiva d'inhibir la mort i la fusió cel·lulars mitjançades pels embolcalls X4 o R5 respectivament en absència d'inhibició de la transferència viral. Finalment, inhibidors de la TMgp41 (com el pèptid C34) mostren una total inhibició no dependent de tropisme de la mort i la fusió cel·lulars sense mostrar inhibició de la transferència viral. Considerant que l'embolcall del virus és el responsable la major part dels efectes citopàtics associats a la infecció per VIH-1 (47), l'ús de drogues que siguin eficients en el bloqueig de la funció de l'embolcall viral pot significar una reducció en els desordres immunològics induïts pel VIH-1 i d'aquesta manera contribuir a la millora de la resposta immunitària del pacient enfront al VIH-1.

El nostre assaig però, també ens va deixar al descobert alguna limitació a millorar, com la baixa expressió del coreceptor viral CCR5 en limfòcits primaris T CD4+. Pràcticament el 100% dels limfòcits T CD4+ expressen el coreceptor CXCR4, mentre que el coreceptor CCR5 tan sols es troba present en aquestes cèl·lules entre un 5 i un 15% (25). Aquest fet limita l'assaig a l'ús de limfòcits primaris T CD4+ amb un elevat percentatge d'expressió del coreceptor CCR5 per tal d'assegurar la correcta avaluació en soques de tropisme R5. Tot i que aquesta condició no sempre és fàcil d'obtenir, degut a l'elevada diversitat i diferent qualitat de la sang obtinguda de donants sans a partir de la qual s'obtenen els limfòcits primaris, el fet de poder fer l'avaluació de l'activitat antiviral dels compostos en cèl·lules primàries ens ajuda a poder fer un assaig

el més aproximat possible a la realitat, fet que vam considerar més important que la pròpia limitació de l'expressió de CCR5 en les cèl·lules diana.

Amb tot, l'assaig presentat pot esdevenir un bon mètode per a la caracterització i confirmació del mecanisme d'acció de noves drogues desenvolupades contra l'embolcall del VIH-1, i per tant amb acció inhibidora de l'entrada del virus a la cèl·lula.

Un cop definit un assaig que ens pogués ajudar a determinar el mecanisme d'acció de diferents compostos amb acció en l'entrada del virus a la cèl·lula, el següent pas va ser centrar-nos en l'avaluació de nous compostos inhibidors del VIH-1, tant en etapes d'entrada del virus a la cèl·lula, com a nivell de la transcriptasa inversa del virus.

Els coreceptors virals s'han postulat com a diana interessant fins al punt que tal i com ja s'ha descrit anteriorment, el proper inhibidor acceptat per la FDA a entrar a la clínica per fer front a la infecció per VIH serà l'inhibidor del coreceptor CCR5 maraviroc (55). Resultats positius obtinguts en els estudis clínics amb aquest nou inhibidor, fan pensar en la importància de dissenyar nous inhibidors amb acció en aquests coreceptors virals. Basant els seus estudis en determinar i millorar els components estructurals que van fer fracassar en la clínica el biciclams AMD3100, el Grup d'Enginyeria Molecular de l'Institut Químic de Sarrià va desenvolupar una sèrie de compostos dissenyats com a inhibidors del coreceptor CXCR4. Aquests compostos, estructura dels quals es troba sota la patent (171), van mostrar ser eficaços en la inhibició de la replicació de la soca salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub>, en absència de toxicitat cel·lular a 25 µg/ml.

Tot i la canviada estructura respecte els biciclams descrits anteriorment, cap dels nous compostos va mostrar activitat contra la soca viral resistent a AMD3100, tot i haver mostrat interessants valors d'EC<sub>50</sub> inferiors a 1 µg/ml contra la soca salvatge. Aquest resultat, tot i negatiu pel que fa a la potència dels compostos contra un virus resistent, ens començava a confirmar que el mecanisme d'acció dels nous compostos, era certament la inhibició del coreceptor CXCR4, la mateixa diana que l'AMD3100. Quan els compostos van ser avaluats contra la soca viral resistent a l'inhibidor de fusió T-20 i l'aïllat clínic multiresistent VIH-1<sub>CI-1-SI</sub>, els resultats obtinguts van mostrar en la majoria de

compostos una lleugera resistència dels virus als nous inhibidors de CXCR4, causada amb tota probabilitat per les mutacions en la regió de la SUgp120 presents tant en el virus resistent a T-20 com en l'aïllat clínic. Tot i aquesta lleugera resistència als compostos, la majoria d'ells van poder mantenir unes  $EC_{50}$  de l'ordre de  $\mu\text{g/ml}$ , fet rellevant si es té en compte que els possibles receptors de teràpia amb inhibidors de coreceptor seran pacients en els que les actuals teràpies hauran esdevingut un fracàs terapèutic i els nous inhibidors suposaran una alternativa de rescat. Si tot i que lleugera, els nous inhibidors mostren capacitat d'inhibició de virus resistents a teràpies actuals, aquests podran esdevenir fermes candidats en futurs règims terapèutics.

Tot i que els resultats obtinguts dels assajos d'activitat antiviral contra les diferents soques de VIH-1 ja ens perfilaven clarament els nous compostos com a inhibidors del coreceptor CXCR4, calia confirmar-ne la seva especificitat.

Per això es van realitzar assajos d'inhibició de la unió d'anticossos monoclonals i de temps d'addició d'una droga. Al posar en contacte concentracions decreixents d'alguns dels nous compostos amb l'anticòs anti-CXCR4 12G5, vam poder confirmar la inhibició de la unió de l'anticòs a la cèl·lula de forma dosi-depenent. Amb la unió a la cèl·lula dels anticossos anti-CD45, anti-CD4 i anti-CCR5 en presència dels nostres compostos, vam demostrar l'especificitat d'aquests pel coreceptor CXCR4. Finalment, quan es va realitzar l'assaig de temps d'addició de droga, els compostos van mostrar un perfil d'inhibició igual a l'AMD3100, fet que confirmava del tot el mecanisme d'acció d'aquests compostos com a inhibidors d'etapes primerenques de l'entrada viral, com és la inhibició del coreceptor. Cap d'ells va mostrar ser tòxic a les concentracions testades en les diferents línies cel·lulars dels assajos realitzats.

En conjunt, amb els bons resultats obtinguts amb aquesta nova sèrie d'inhibidors del coreceptor CXCR4 s'obre una porta per continuar la optimització d'aquests compostos per tal de convertir-los en candidats per entrar en futurs assajos preclínic, que a la llarga els portin a entrar en la clínica.

Continuant amb l'anàlisi de compostos inhibidors de l'entrada viral, un grup del departament de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona va posar a la nostra disposició una sèrie de compostos derivats de BMS (176) amb l'objectiu

de determinar-ne amb més detall el seu perfil d'inhibició, degut a les discordants informacions que van aparèixer en la bibliografia respecte el seu mecanisme d'acció. Els assajos d'activitat antiviral contra el virus salvatge VIH-1<sub>NL4-3</sub> i l'aïllat clínic multiresistent VIH-1<sub>CI-1-SI</sub>, van mostrar una elevada potència inhibidora del virus salvatge en la majoria dels derivats, que es veia disminuïda considerablement quan s'avaluaven contra l'aïllat clínic. Vam poder demostrar gràcies al genotip de la soca salvatge i la mutada que aquesta disminució en la sensibilitat del virus pels compostos era deguda a les variacions en la proteïna SUgp120 de l'embolcall, algunes d'elles descrites posteriorment en la bibliografia com a mutacions que confereixen resistència al prototip BMS-806 (117). La importància en la seqüència de la SUgp120 per a determinar la sensibilitat del virus als compostos testats també la vam comprovar en l'avaluació de l'activitat antiviral contra la soca VIH-2<sub>ROD</sub> (161), on cap dels BMS testats en va inhibir la replicació viral a la màxima concentració testada, fet que va posar de nou en manifest la importància de la seqüència de l'embolcall del virus per definir l'activitat d'aquest grup d'inhibidors.

Un cop determinada la seva potència inhibidora contra el virus salvatge, en vam determinar el mecanisme d'acció mitjançant l'assaig de temps d'addició d'una droga. Aquest assaig ens definia els BMS com a inhibidors d'una etapa molt primerenca de l'entrada del virus a la cèl·lula, prèvia a la unió del virus als coreceptors. L'assaig suggeria doncs l'intervenció dels BMS en l'etapa d'unió del virus al receptor CD4, com a mecanisme d'inhibició de la replicació viral. Nous estudis de generació de virus resistents als BMS que s'estan duent a terme al nostre laboratori, ens ajudaran a entendre amb més detall els mecanismes del virus per escapar a la pressió exercida per aquesta família de compostos.

En els avanços en el camp de la recerca de nous compostos anti-VIH, tan sols un reduït nombre de noves drogues en desenvolupament bloquegen la replicació del virus per nous mecanismes. La majoria de drogues anti-VIH experimentals són versions millorades o noves variacions de teràpies ja existents. Aquestes teràpies ofereixen principalment un increment en la potència de les actuals drogues, simplificant-ne la dosi i reduint-ne els efectes secundaris. Algunes d'elles mostren ser efectives en la inhibició de virus

resistents als actuals tractaments en els assajos *in vitro*, però cal confirmar si aquesta efectivitat també es dona *in vivo* i fins a quin punt poden ajudar als pacients amb virus altament resistents.

Dins d'aquest marc de desenvolupament de drogues amb acció coneguda però amb propietats millorades respecte les que es troben actualment en teràpia, trobem els inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs de nucleòsid (ITINANs). Dins dels règims de TARGA, els inhibidors de la transcriptasa inversa hi són presents en bona part d'ells. Els ITINANs, des de la seva aparició a mitjans dels 90, han format part d'aquesta teràpia, i és per això que el seu ús amb el temps ha acabat per desenvolupar un elevat nombre de resistències. Són molts els grups que basen la seva recerca en el desenvolupament de nous ITINANs, entre els que trobem els grups de química que ens van proporcionar els compostos analitzats en aquest treball. En col·laboració amb tots ells, vam poder avaluar l'activitat antiviral de nous ITINANs de quatre classes diferents de dihidro-alcoxi-benzil-oxopirimidines (DABO): S-DABO, S-aril-S-DABO, N,N-DABO i F<sub>2</sub>-N,N-DABO. Els nostres estudis es van basar principalment en determinar la potència inhibidora de tots ells contra la soca salvatge del VIH-1<sub>NL4-3</sub>, així com contra soques de VIH-1 resistents als ITINANs presents en la teràpia anti-VIH-1 actual, com la nevirapina o l'efavirenz. D'aquests resultats d'activitat antiviral expressats com a EC<sub>50</sub> en vam poder extreure el valor de resistència, que reflexa la quantitat de compost necessària per inhibir el virus resistent en comparació amb la necessària per inhibir el virus salvatge. En el mateix assaig es va determinar també la seva CC<sub>50</sub>, valor amb el que vam calcular l'índex de selectivitat d'alguns dels compostos. A major índex de selectivitat i menor resistència, més interessant serà el compost de cara a considerar-lo un possible *hit* o compost d'èxit, a partir del qual fer-ne les modificacions necessàries per ser considerat per avaluar en assajos preclínic.

Del total de les quatre famílies d' ITINANs que es presenten en aquest treball, menys del 10% van resultar no ser actius contra les soques salvatge i resistents, principalment degut als propis efectes citotòxics dels mateixos.

La majoria d'ells (un 80% del total de compostos) van mostrar valors d'EC<sub>50</sub> inferiors a micromolar i en algun dels casos (fins a un 8% del total) els valors van resultar ser inferiors a nanomolar. En la majoria de casos, els compostos

que van mostrar una major potència inhibidora en la soca salvatge del VIH-1, van ser els que van mostrar millors perfils d'inhibició de les soques resistents.

Tot i l'elevada potència inhibidora mostrada pels components dels quatre grups de compostos avaluats, els millors resultats pel que fa a inhibició de la replicació de la soca salvatge i les soques resistents, els vam obtenir amb els grup dels *N,N*-DABOs i *F*<sub>2</sub>-*N,N*-DABOs.

De les relacions estructura-funció dels ITINANs derivats de DABOs que vam poder analitzar en aquest treball, vam poder definir la importància de tenir radicals petits com l'àtom d'hidrogen o un grup alquil petit (metil o etil) en la posició C<sub>5</sub> de la pirimidina, així com en el radical de la posició benzílic. La importància de grups petits en aquests radicals, principalment es basava en permetre una conformació de la molècula prou flexible per a interaccionar i adaptar-se al lloc d'unió dels inhibidors en la TI.

El grup amina en la posició C<sub>2</sub> de la pirimidina, també va mostrar una millora en la potència inhibidora dels compostos en comparació amb el grup sulfur en la mateixa posició. Quan aquesta amina assolía forma cíclica, les activitats dels compostos en cap cas es van veure perjudicades, sinó que interessants valors d'EC<sub>50</sub> van ser igualment observats.

De tots els virus avaluats amb mutacions puntuals que confereixen resistència als ITINANs (K103N, Y181C i Y188L), així com de l'aïllat clínic VIH-1<sub>IRLL98</sub>, el virus amb la mutació puntual en la tirosina en la posició 188 va resultar ser el més resistent als compostos avaluats, ja que només el 30% de tots els compostos en va poder inhibir la replicació viral, i a concentracions sempre superiors a les que inhibia el virus salvatge.

Els bons resultats obtinguts amb aquestes noves famílies d'ITINANs reflexen clarament els esforços dels diferents grups químics per desenvolupar noves molècules amb propietats millorades respecte les drogues ja existents. Aquestes millores poden representar canvis significatius en el futur del tractament anti-VIH amb ITINANs, si es poden traduir en menors dosis administrades de fàrmac, menors efectes secundaris i una disminució en l'aparició de resistències en els pacients.



L'estreta relació que mantenen els centres d'investigació bàsica amb les empreses farmacèutiques (164), en deixa fites que han canviat l'evolució de moltes malalties, entre elles la SIDA. Un clar exemple és la col·laboració del *National Cancer Institute* dels Estats Units amb l'empresa farmacèutica Burroughs Wellcome, que va permetre el descobriment de l'AZT com a inhibidor de la replicació viral (181) tot i haver estat desenvolupat originalment pel tractament contra el càncer l'any 1964. A partir d'aquí, la inclusió del fàrmac en assajos clínics (131) va acabar amb l'aprovació d'aquest com a primer fàrmac per fer front a la infecció per VIH.

Amb aquest treball, queda palesa la importància del treball realitzat pels grups d'investigació a nivell d'institucions de recerca, d'organitzacions i universitats, així com la importància de les col·laboracions interdisciplinàries tant a nivell nacional com internacional, i així ho certifiquen, entre d'altres, les publicacions originades a partir d'aquest treball en equip.

En el transcurs d'elaboració d'aquesta tesi doctoral, noves drogues anti-VIH hauran estat aprovades per entrar a la clínica i d'altres hauran quedat a mig camí. En el nostre dia a dia, algunes vegades es guanya i altres es perd. En la teràpia contra el VIH, però, així com cada victòria és una nova font d'esperança per als milers de persones infectades pel virus, cada derrota és motiu de superació per als milers de científics que dia a dia, amb els seus esforços, lluiten també per fer front a aquest company de viatge, que pacients i científics tenim en comú.

## 6. Conclusions

---

Del nostre treball es poden treure les següents conclusions:

1. L'estandarització i implementació de l'assaig individual de determinació de l'activitat anti-VIH de compostos com a un assaig a mitjana-gran escala ens ha permès l'avaluació i cribratge d'un elevat nombre de compostos. Aquest assaig ha esdevingut decisiu com a punt de partida per a la discernir d'entre tots els compostos analitzats, aquells amb propietats antivirals i de citotoxicitat interessants per al desenvolupament de molècules ideals per a posteriors assajos preclínic.

2. S'ha desenvolupat i validat un assaig que permet la mesura simultània dels principals esdeveniments mitjançats per l'embolcall del VIH-1: la transferència de partícules virals de cèl·lula a cèl·lula, la formació de sincicis resultat de la fusió cèl·lula a cèl·lula i la mort individual de cèl·lules diana, en cocultius de cèl·lules crònicament infectades amb el VIH-1 i limfòcits T CD4+ primaris. Mitjançant el cocultiu de cèl·lules crònicament infectades pel VIH-1 que expressen l'embolcall del virus i limfòcits T CD4+ primaris es poden determinar els diferents patrons d'inhibició de drogues dirigides contra les etapes mitjançades per l'embolcall del VIH-1.

3. L'avaluació de compostos inhibidors de l'entrada viral ens ha permès definir nous compostos polinitrogenats com a inhibidors del VIH-1 en cultiu cel·lular per la inhibició del coreceptor viral CXCR4, en absència de toxicitat cel·lular. D'altra banda també s'ha estimat el mecanisme d'acció de la família de compostos BMS, inhibint l'etapa d'entrada del VIH-1 a la cèl·lula diana per la inhibició de la interacció entre el virus i el receptor CD4. Mutacions en la regió de la glicoproteïna SUgp120 han mostrat conferir resistència als BMS, fet que confirma la implicació d'aquesta regió en el seu mecanisme d'acció.

4. Nous inhibidors de la transcriptasa inversa no anàlegs de nucleòsid (ITINANs) derivats de la família de compostos dihidro-alcoxi-benzil-oxopirimidines (DABO) han resultat ser potents inhibidors del VIH-1 a concentracions en alguns casos subnanomolars i en absència de citotoxicitat. Alguns d'aquests nous compostos han mostrat capacitat inhibidora de virus resistents als actuals ITINANs usats en la clínica, fet de destacada importància de cara a la optimització d'aquests per al seu possible ús en futures teràpies antiretrovirals.

## 7. Bibliografia

---

1. 1982. A cluster of Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **31**:305-7.
2. 2007. FDA approves drug for resistant HIV. *AIDS Read* **17**:440.
3. 2007. First medication in new class of ARTs poised to be available for salvage therapy. Tropism testing helps determine best patients for drug. *AIDS Alert* **22**:85-8.
4. 1981. Follow-up on Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis pneumonia*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**:409-10.
5. 1981. Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis pneumonia* among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**:305-8.
6. 1996. Nevirapine, the first of a new class of NNRTI drugs arrives in pharmacies. *Crit Path AIDS Proj*:18-9.
7. 1982. *Pneumocystis carinii* pneumonia among persons with hemophilia A. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **31**:365-7.
8. 1981. *Pneumocystis pneumonia*--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**:250-2.
9. 1996. Ritonavir, Abbott protease inhibitor, approved. *AIDS Treat News*:2-3.
10. 1982. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **31**:507-8, 513-4.
11. **Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**:1955-8.
12. **Armand-Ugon, M., A. Gutierrez, B. Clotet, and J. A. Este.** 2003. HIV-1 resistance to the gp41-dependent fusion inhibitor C-34. *Antiviral Res* **59**:137-42.
13. **Armand-Ugon, M., M. E. Quinones-Mateu, A. Gutierrez, J. Barretina, J. Blanco, D. Schols, E. De Clercq, B. Clotet, and J. A. Este.** 2003. Reduced fitness of HIV-1 resistant to CXCR4 antagonists. *Antivir Ther* **8**:1-8.
14. **Arnold, E., K. Das, J. Ding, P. N. Yadav, Y. Hsiou, P. L. Boyer, and S. H. Hughes.** 1996. Targeting HIV reverse transcriptase for anti-AIDS drug design: structural and biological considerations for chemotherapeutic strategies. *Drug Des Discov* **13**:29-47.
15. **Balzarini, J., M. J. Perez-Perez, S. Velazquez, A. San-Felix, M. J. Camarasa, E. De Clercq, and A. Karlsson.** 1995. Suppression of the breakthrough of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in cell culture by thiocarboxanilide derivatives when used individually or in combination with other HIV-1-specific inhibitors (i.e., TSAO derivatives). *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:5470-4.

16. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-71.
17. **Barretina, J., J. Blanco, M. Armand-Ugon, A. Gutierrez, B. Clotet, and J. A. Este.** 2003. Anti-HIV-1 activity of enfuvirtide (T-20) by inhibition of bystander cell death. *Antivir Ther* **8**:155-61.
18. **Barretina, J., J. Blanco, A. Bonjoch, A. Llano, B. Clotet, and J. A. Este.** 2004. Immunological and virological study of enfuvirtide-treated HIV-positive patients. *Aids* **18**:1673-82.
19. **Berger, E. A., R. W. Doms, E. M. Fenyo, B. T. Korber, D. R. Littman, J. P. Moore, Q. J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski, and R. A. Weiss.** 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* **391**:240.
20. **Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber.** 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**:657-700.
21. **Berkowitz, R. D., S. Alexander, C. Bare, V. Linnquist-Stepps, M. Bogan, M. E. Moreno, L. Gibson, E. D. Wieder, J. Kosek, C. A. Stoddart, and J. M. McCune.** 1998. CCR5- and CXCR4-utilizing strains of human immunodeficiency virus type 1 exhibit differential tropism and pathogenesis in vivo. *J Virol* **72**:10108-17.
22. **Blanco, J., J. Barretina, B. Clotet, and J. A. Este.** 2004. R5 HIV gp120-mediated cellular contacts induce the death of single CCR5-expressing CD4 T cells by a gp41-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* **76**:804-11.
23. **Blanco, J., J. Barretina, K. F. Ferri, E. Jacotot, A. Gutierrez, M. Armand-Ugon, C. Cabrera, G. Kroemer, B. Clotet, and J. A. Este.** 2003. Cell-surface-expressed HIV-1 envelope induces the death of CD4 T cells during GP41-mediated hemifusion-like events. *Virology* **305**:318-29.
24. **Blanco, J., B. Bosch, M. T. Fernandez-Figueras, J. Barretina, B. Clotet, and J. A. Este.** 2004. High level of coreceptor-independent HIV transfer induced by contacts between primary CD4 T cells. *J Biol Chem* **279**:51305-14.
25. **Bleul, C. C., L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer, and C. R. Mackay.** 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:1925-30.
26. **Bosch, B., J. Blanco, E. Pauls, I. Clotet-Codina, M. Armand-Ugon, B. Grigorov, D. Muriaux, B. Clotet, J. L. Darlix, and J. A. Este.** 2005. Inhibition of coreceptor-independent cell-to-cell human immunodeficiency virus type 1 transmission by a CD4-immunoglobulin G2 fusion protein. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4296-304.
27. **Bridger, G. J., R. T. Skerlj, D. Thornton, S. Padmanabhan, S. A. Martellucci, G. W. Henson, M. J. Abrams, N. Yamamoto, K. De Vreese, R. Pauwels, and et al.** 1995. Synthesis and structure-activity relationships of phenylenebis(methylene)-linked bis-tetraazamacrocycles

- that inhibit HIV replication. Effects of macrocyclic ring size and substituents on the aromatic linker. *J Med Chem* **38**:366-78.
28. **Briggs, J. A., T. Wilk, R. Welker, H. G. Krausslich, and S. D. Fuller.** 2003. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *Embo J* **22**:1707-15.
  29. **Bukrinsky, M. I., S. Haggerty, M. P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, and M. Stevenson.** 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**:666-9.
  30. **Bukrinsky, M. I., N. Sharova, M. P. Dempsey, T. L. Stanwick, A. G. Bukrinskaya, S. Haggerty, and M. Stevenson.** 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6580-4.
  31. **Cabana, M., B. Clotet, and M. A. Martinez.** 1999. Emergence and genetic evolution of HIV-1 variants with mutations conferring resistance to multiple reverse transcriptase and protease inhibitors. *J Med Virol* **59**:480-90.
  32. **Cabrera, C., A. Gutierrez, J. Barretina, J. Blanco, A. Litovchick, A. Lapidot, B. Clotet, and J. A. Este.** 2002. Anti-HIV activity of a novel aminoglycoside-arginine conjugate. *Antiviral Res* **53**:1-8.
  33. **Cabrera, C., A. Gutierrez, J. Blanco, J. Barretina, A. Litovchick, A. Lapidot, A. G. Evdokimov, B. Clotet, and J. A. Este.** 2000. Anti-human immunodeficiency virus activity of novel aminoglycoside-arginine conjugates at early stages of infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:627-34.
  34. **Campbell, E. M., R. Nunez, and T. J. Hope.** 2004. Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* **78**:5745-55.
  35. **Campiani, G., A. Ramunno, G. Maga, V. Nacci, C. Fattorusso, B. Catalanotti, E. Morelli, and E. Novellino.** 2002. Non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase (RT) inhibitors: past, present, and future perspectives. *Curr Pharm Des* **8**:615-57.
  36. **Cancio, R., A. Mai, D. Rutili, M. Artico, G. Sbardella, I. Clotet-Codina, J. A. Este, E. Crespan, S. Zanolli, U. Hubscher, S. Spadari, and G. Maga.** 2007. Slow-, Tight-Binding HIV-1 Reverse Transcriptase Non-Nucleoside Inhibitors Highly Active against Drug-Resistant Mutants. *ChemMedChem* **2**:445-448.
  37. **Cao, Y., L. Qin, L. Zhang, J. Safrit, and D. D. Ho.** 1995. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **332**:201-8.
  38. **Cichutek, K., H. Merget, S. Norley, R. Linde, W. Kreuz, M. Gahr, and R. Kurth.** 1992. Development of a quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:7365-9.
  39. **Clark, S. J., M. S. Saag, W. D. Decker, S. Campbell-Hill, J. L. Roberson, P. J. Veldkamp, J. C. Kappes, B. H. Hahn, and G. M. Shaw.** 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* **324**:954-60.
  40. **Clotet, B.** 2004. Strategies for overcoming resistance in HIV-1 infected patients receiving HAART. *AIDS Rev* **6**:123-30.

41. **Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and et al.** 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science* **232**:697.
42. **Connor, R. I., and D. D. Ho.** 1994. Transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**:321-3.
43. **Cosson, P.** 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *Embo J* **15**:5783-8.
44. **Curlin, M. E., S. Iyer, and J. E. Mittler.** 2007. Optimal Timing and Duration of Induction Therapy for HIV-1 Infection. *PLoS Comput Biol* **3**:e133.
45. **Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-73.
46. **Chanel, C., I. Staropoli, F. Baleux, A. Amara, A. Valenzuela-Fernandez, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and R. Altmeyer.** 2002. Low levels of co-receptor CCR5 are sufficient to permit HIV envelope-mediated fusion with resting CD4 T cells. *Aids* **16**:2337-40.
47. **Chirmule, N., and S. Pahwa.** 1996. Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions. *Microbiol Rev* **60**:386-406.
48. **Daelemans, D., D. Schols, M. Witvrouw, C. Pannecouque, S. Hatse, S. van Dooren, F. Hamy, T. Klimkait, E. de Clercq, and A. M. VanDamme.** 2000. A second target for the peptoid Tat/transactivation response element inhibitor CGP64222: inhibition of human immunodeficiency virus replication by blocking CXC-chemokine receptor 4-mediated virus entry. *Mol Pharmacol* **57**:116-24.
49. **Dalglish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-7.
50. **Demeter, L. M., R. W. Shafer, P. M. Meehan, J. Holden-Wiltse, M. A. Fischl, W. W. Freimuth, M. F. Para, and R. C. Reichman.** 2000. Delavirdine susceptibilities and associated reverse transcriptase mutations in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients in a phase I/II trial of delavirdine monotherapy (ACTG 260). *Antimicrob Agents Chemother* **44**:794-7.
51. **Denizot, F., and R. Lang.** 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* **89**:271-7.
52. **Donzella, G. A., D. Schols, S. W. Lin, J. A. Este, K. A. Nagashima, P. J. Maddon, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, G. Henson, E. De Clercq, and J. P. Moore.** 1998. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* **4**:72-7.
53. **Doranz, B. J., K. Grovit-Ferbas, M. P. Sharron, S. H. Mao, M. B. Goetz, E. S. Daar, R. W. Doms, and W. A. O'Brien.** 1997. A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J Exp Med* **186**:1395-400.
54. **Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman, and R. W. Doms.** 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**:1149-58.

55. **Dorr, P., M. Westby, S. Dobbs, P. Griffin, B. Irvine, M. Macartney, J. Mori, G. Rickett, C. Smith-Burchnell, C. Napier, R. Webster, D. Armour, D. Price, B. Stammen, A. Wood, and M. Perros.** 2005. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4721-32.
56. **Doyle, C., and J. L. Strominger.** 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* **330**:256-9.
57. **Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton.** 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**:667-73.
58. **Durack, D. T.** 1981. Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma in homosexual men. *N Engl J Med* **305**:1465-7.
59. **Eckert, D. M., V. N. Malashkevich, L. H. Hong, P. A. Carr, and P. S. Kim.** 1999. Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell* **99**:103-15.
60. **Este, J. A.** 2003. Virus entry as a target for anti-HIV intervention. *Curr Med Chem* **10**:1617-32.
61. **Este, J. A., C. Cabrera, J. Blanco, A. Gutierrez, G. Bridger, G. Henson, B. Clotet, D. Schols, and E. De Clercq.** 1999. Shift of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates from X4 to R5 and prevention of emergence of the syncytium-inducing phenotype by blockade of CXCR4. *J Virol* **73**:5577-85.
62. **Este, J. A., C. Cabrera, E. De Clercq, S. Struyf, J. Van Damme, G. Bridger, R. T. Skerlj, M. J. Abrams, G. Henson, A. Gutierrez, B. Clotet, and D. Schols.** 1999. Activity of different bicyclam derivatives against human immunodeficiency virus depends on their interaction with the CXCR4 chemokine receptor. *Mol Pharmacol* **55**:67-73.
63. **Este, J. A., and A. Telenti.** 2007. HIV entry inhibitors. *Lancet* **370**:81-8.
64. **Ezzell, C.** 1987. AZT given the green light for clinical treatment of AIDS. *Nature* **326**:430.
65. **Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**:872-7.
66. **Finzi, D., and R. F. Siliciano.** 1998. Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell* **93**:665-71.
67. **Fletcher, C. V.** 2003. Enfuvirtide, a new drug for HIV infection. *Lancet* **361**:1577-8.
68. **Frankel, A. D., and J. A. Young.** 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**:1-25.
69. **Gallay, P., S. Swingler, C. Aiken, and D. Trono.** 1995. HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* **80**:379-88.
70. **Gallay, P., S. Swingler, J. Song, F. Bushman, and D. Trono.** 1995. HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* **83**:569-76.
71. **Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl,**



- S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic.** 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:865-7.
72. **Gallo, S. A., C. M. Finnegan, M. Viard, Y. Raviv, A. Dimitrov, S. S. Rawat, A. Puri, S. Durell, and R. Blumenthal.** 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* **1614**:36-50.
73. **Gallo, S. A., A. Puri, and R. Blumenthal.** 2001. HIV-1 gp41 six-helix bundle formation occurs rapidly after the engagement of gp120 by CXCR4 in the HIV-1 Env-mediated fusion process. *Biochemistry* **40**:12231-6.
74. **Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* **397**:436-41.
75. **Gao, F., L. Yue, A. T. White, P. G. Pappas, J. Barchue, A. P. Hanson, B. M. Greene, P. M. Sharp, G. M. Shaw, and B. H. Hahn.** 1992. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**:495-9.
76. **Gay, D., P. Maddon, R. Sekaly, M. A. Talle, M. Godfrey, E. Long, G. Goldstein, L. Chess, R. Axel, J. Kappler, and et al.** 1987. Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature* **328**:626-9.
77. **Gelmann, E. P., M. Popovic, D. Blayney, H. Masur, G. Sidhu, R. E. Stahl, and R. C. Gallo.** 1983. Proviral DNA of a retrovirus, human T-cell leukemia virus, in two patients with AIDS. *Science* **220**:862-5.
78. **Goetz, M. B., M. R. Ferguson, X. Han, G. McMillan, M. St Clair, K. A. Pappa, D. R. McClernon, and W. A. O'Brien.** 2006. Evolution of HIV resistance mutations in patients maintained on a stable treatment regimen after virologic failure. *J Acquir Immune Defic Syndr* **43**:541-9.
79. **Goff, S. P.** 2003. Death by deamination: a novel host restriction system for HIV-1. *Cell* **114**:281-3.
80. **Gondois-Rey, F., A. Biancotto, M. Pion, A. L. Chenine, P. Gluschankof, V. Horejsi, C. Tamalet, R. Vigne, and I. Hirsch.** 2001. Production of HIV-1 by resting memory T lymphocytes. *Aids* **15**:1931-40.
81. **Goodenow, M., T. Huet, W. Saurin, S. Kwok, J. Sninsky, and S. Wain-Hobson.** 1989. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2**:344-52.
82. **Goodsell, D. S., G. M. Morris, and A. J. Olson.** 1996. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J Mol Recognit* **9**:1-5.
83. **Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon.** 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**:1425-31.
84. **Guo, Q., H. T. Ho, I. Dicker, L. Fan, N. Zhou, J. Friborg, T. Wang, B. V. McAuliffe, H. G. Wang, R. E. Rose, H. Fang, H. T. Scarnati, D. R. Langley, N. A. Meanwell, R. Abraham, R. J. Colonno, and P. F. Lin.** 2003. Biochemical and genetic characterizations of a novel human

- immunodeficiency virus type 1 inhibitor that blocks gp120-CD4 interactions. *J Virol* **77**:10528-36.
85. **Guyader, M., M. Emerman, P. Sonigo, F. Clavel, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**:662-9.
86. **Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock, and P. M. Sharp.** 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**:607-14.
87. **Hammer, S. M., H. A. Kessler, and M. S. Saag.** 1994. Issues in combination antiretroviral therapy: a review. *J Acquir Immune Defic Syndr* **7 Suppl 2**:S24-35; discussion S35-7.
88. **Hatse, S., K. Princen, E. De Clercq, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, P. E. Hernandez-Abad, R. T. Skerlj, G. J. Bridger, and D. Schols.** 2005. AMD3465, a monomacrocyclic CXCR4 antagonist and potent HIV entry inhibitor. *Biochem Pharmacol* **70**:752-61.
89. **He, Y., R. Vassell, M. Zaitseva, N. Nguyen, Z. Yang, Y. Weng, and C. D. Weiss.** 2003. Peptides trap the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein fusion intermediate at two sites. *J Virol* **77**:1666-71.
90. **Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman.** 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7311-5.
91. **Hendrix, C. W., A. C. Collier, M. M. Lederman, D. Schols, R. B. Pollard, S. Brown, J. B. Jackson, R. W. Coombs, M. J. Glesby, C. W. Flexner, G. J. Bridger, K. Badel, R. T. MacFarland, G. W. Henson, and G. Calandra.** 2004. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **37**:1253-62.
92. **Hendrix, C. W., C. Flexner, R. T. MacFarland, C. Giandomenico, E. J. Fuchs, E. Redpath, G. Bridger, and G. W. Henson.** 2000. Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1667-73.
93. **Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-6.
94. **Hoetelmans, R. M.** 1998. Sanctuary sites in HIV-1 infection. *Antivir Ther* **3 Suppl 4**:13-7.
95. **Hogg, R. S., D. R. Bangsberg, V. D. Lima, C. Alexander, S. Bonner, B. Yip, E. Wood, W. W. Dong, J. S. Montaner, and P. R. Harrigan.** 2006. Emergence of drug resistance is associated with an increased risk of death among patients first starting HAART. *PLoS Med* **3**:e356.
96. **Horuk, R., J. Hesselgesser, Y. Zhou, D. Faulds, M. Halks-Miller, S. Harvey, D. Taub, M. Samson, M. Parmentier, J. Rucker, B. J. Doranz, and R. W. Doms.** 1998. The CC chemokine I-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV-1 strains. *J Biol Chem* **273**:386-91.
97. **James, J. S.** 1996. Indinavir (Crixivan), Merck protease inhibitor, approved. *AIDS Treat News*:1-2.

98. **Jolly, C., K. Kashefi, M. Hollinshead, and Q. J. Sattentau.** 2004. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med* **199**:283-93.
99. **Jordan, W. C., R. Jefferson, F. Yemofio, L. Tolbert, V. Conlon, H. Carroll, D. C. Green, A. Green, and R. Green.** 2003. Nevirapine plus efavirenz plus didanosine: a simple, safe, and effective once-daily regimen for patients with HIV infection. *J Natl Med Assoc* **95**:1152-7.
100. **Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Aldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag.** 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**:1302-7.
101. **Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767-8.
102. **Klaus, B. D., and M. J. Grodesky.** 1997. HIV and HAART in 1997. Highly active antiretroviral therapy. *Nurse Pract* **22**:139-42.
103. **Kohl, N. E., E. A. Emini, W. A. Schleif, L. J. Davis, J. C. Heimbach, R. A. Dixon, E. M. Scolnick, and I. S. Sigal.** 1988. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:4686-90.
104. **Kolata, G.** 1987. FDA approves AZT. *Science* **235**:1570.
105. **Lange, J. M.** 2003. Efficacy and durability of nevirapine in antiretroviral drug naive patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* **34 Suppl 1**:S40-52.
106. **Lazzarin, A., B. Clotet, D. Cooper, J. Reynes, K. Arasteh, M. Nelson, C. Katlama, H. J. Stellbrink, J. F. Delfraissy, J. Lange, L. Huson, R. DeMasi, C. Wat, J. Delehanty, C. Drobnes, and M. Salgo.** 2003. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med* **348**:2186-95.
107. **Lian, Y. L., B. S. Heng, V. Nissapatorn, and C. Lee.** 2007. AIDS-defining illnesses: a comparison between before and after commencement of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Curr HIV Res* **5**:484-9.
108. **Liang, C., and M. A. Wainberg.** 2002. The role of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor? *AIDS Rev* **4**:41-9.
109. **Lifson, A. R., G. W. Rutherford, and H. W. Jaffe.** 1988. The natural history of human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **158**:1360-7.
110. **Lin, P. F., W. Blair, T. Wang, T. Spicer, Q. Guo, N. Zhou, Y. F. Gong, H. G. Wang, R. Rose, G. Yamanaka, B. Robinson, C. B. Li, R. Fridell, C. Deminie, G. Demers, Z. Yang, L. Zadjura, N. Meanwell, and R. Colonna.** 2003. A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:11013-8.
111. **Lu, H., Q. Zhao, Z. Xu, and S. Jiang.** 2003. Automatic quantitation of HIV-1 mediated cell-to-cell fusion with a digital image analysis system (DIAS): application for rapid screening of HIV-1 fusion inhibitors. *J Virol Methods* **107**:155-61.

112. **Lyles, R. H., A. Munoz, T. E. Yamashita, H. Bazmi, R. Detels, C. R. Rinaldo, J. B. Margolick, J. P. Phair, and J. W. Mellors.** 2000. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis* **181**:872-80.
113. **Llano, A., J. Barretina, J. Blanco, A. Gutierrez, B. Clotet, and J. A. Este.** 2001. Stromal-cell-derived factor 1 prevents the emergence of the syncytium-inducing phenotype of HIV-1 in vivo. *Aids* **15**:1890-2.
114. **Llano, A., J. Barretina, A. Gutierrez, B. Clotet, and J. A. Este.** 2003. Interleukin-7-dependent production of RANTES that correlates with human immunodeficiency virus disease progression. *J Virol* **77**:4389-95.
115. **Maass, G., U. Immendoerfer, B. Koenig, U. Leser, B. Mueller, R. Goody, and E. Pfaff.** 1993. Viral resistance to the thiazolo-isoindolinones, a new class of nonnucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:2612-7.
116. **Macias, J., J. C. Palomares, J. A. Mira, M. J. Torres, J. A. Garcia-Garcia, J. M. Rodriguez, S. Vergera, and J. A. Pineda.** 2005. Transient rebounds of HIV plasma viremia are associated with the emergence of drug resistance mutations in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Infect* **51**:195-200.
117. **Madani, N., A. L. Perdigoto, K. Srinivasan, J. M. Cox, J. J. Chruma, J. LaLonde, M. Head, A. B. Smith, 3rd, and J. G. Sodroski.** 2004. Localized changes in the gp120 envelope glycoprotein confer resistance to human immunodeficiency virus entry inhibitors BMS-806 and #155. *J Virol* **78**:3742-52.
118. **Maga, G., M. Amacker, N. Ruel, U. Hubscher, and S. Spadari.** 1997. Resistance to nevirapine of HIV-1 reverse transcriptase mutants: loss of stabilizing interactions and thermodynamic or steric barriers are induced by different single amino acid substitutions. *J Mol Biol* **274**:738-47.
119. **Mai, A., M. Artico, D. Rotili, D. Tarantino, I. Clotet-Codina, M. Armand-Ugon, R. Ragno, S. Simeoni, G. Sbardella, M. B. Nawrozkij, A. Samuele, G. Maga, and J. A. Este.** 2007. Synthesis and Biological Properties of Novel 2-Aminopyrimidin-4(3H)-ones Highly Potent against HIV-1 Mutant Strains. *J Med Chem*.
120. **Mai, A., M. Artico, G. Sbardella, S. Massa, A. G. Loi, E. Tramontano, P. Scano, and P. La Colla.** 1995. Synthesis and anti-HIV-1 activity of thio analogues of dihydroalkoxybenzyloxypyrimidines. *J Med Chem* **38**:3258-63.
121. **Mai, A., M. Artico, G. Sbardella, S. Quartarone, S. Massa, A. G. Loi, A. De Montis, F. Scintu, M. Putzolu, and P. La Colla.** 1997. Dihydro(alkylthio)(naphthylmethyl)oxypyrimidines: novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of the S-DABO series. *J Med Chem* **40**:1447-54.
122. **Manetti, F., J. A. Este, I. Clotet-Codina, M. Armand-Ugon, G. Maga, E. Crespan, R. Cancio, C. Mugnaini, C. Bernardini, A. Togninelli, C. Carmi, M. Alongi, E. Petricci, S. Massa, F. Corelli, and M. Botta.** 2005. Parallel solution-phase and microwave-assisted synthesis of new S-DABO derivatives endowed with subnanomolar anti-HIV-1 activity. *J Med Chem* **48**:8000-8.

123. **Margolis, L. B., S. Glushakova, J. C. Grivel, and P. M. Murphy.** 1998. Blockade of CC chemokine receptor 5 (CCR5)-tropic human immunodeficiency virus-1 replication in human lymphoid tissue by CC chemokines. *J Clin Invest* **101**:1876-80.
124. **Marx, J. L.** 1982. New disease baffles medical community. *Science* **217**:618-21.
125. **Marx, P. A., R. J. Munn, and K. I. Joy.** 1988. Computer emulation of thin section electron microscopy predicts an envelope-associated icosadeltahedral capsid for human immunodeficiency virus. *Lab Invest* **58**:112-8.
126. **Matloubian, M., A. David, S. Engel, J. E. Ryan, and J. G. Cyster.** 2000. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* **1**:298-304.
127. **Matthews, T., M. Salgo, M. Greenberg, J. Chung, R. DeMasi, and D. Bolognesi.** 2004. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov* **3**:215-25.
128. **McCune, J. M.** 2001. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* **410**:974-9.
129. **McGuire, S.** 1996. Saquinavir gets accelerated approval. *Posit Aware* **7**:8.
130. **Miller, R. J., J. S. Cairns, S. Bridges, and N. Sarver.** 2000. Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *J Virol* **74**:7187-95.
131. **Mitsuya, H., K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, and S. Broder.** 1985. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:7096-100.
132. **Mognetti, B., M. Moussa, J. Croitoru, E. Menu, D. Dormont, P. Roques, and G. Chaouat.** 2000. HIV-1 co-receptor expression on trophoblastic cells from early placentas and permissivity to infection by several HIV-1 primary isolates. *Clin Exp Immunol* **119**:486-92.
133. **Moore, J. P., and R. W. Doms.** 2003. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:10598-602.
134. **Moore, J. P., and M. Stevenson.** 2000. New targets for inhibitors of HIV-1 replication. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**:40-9.
135. **Mosmann, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**:55-63.
136. **Mueller, M. C., and J. R. Bogner.** 2007. Treatment with CCR5 Antagonists: Which Patient May Have a Benefit? *Eur J Med Res* **12**:441-52.
137. **Mugnaini, C., F. Manetti, J. A. Este, I. Clotet-Codina, G. Maga, R. Cancio, M. Botta, and F. Corelli.** 2006. Synthesis and biological investigation of S-aryl-S-DABO derivatives as HIV-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **16**:3541-4.
138. **Murakami, T., T. Nakajima, Y. Koyanagi, K. Tachibana, N. Fujii, H. Tamamura, N. Yoshida, M. Waki, A. Matsumoto, O. Yoshie, T.**

- Kishimoto, N. Yamamoto, and T. Nagasawa.** 1997. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* **186**:1389-93.
139. **Neil, S. J., S. W. Eastman, N. Jouvenet, and P. D. Bieniasz.** 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* **2**:e39.
140. **Nermut, M. V., C. Grief, S. Hashmi, and D. J. Hockley.** 1993. Further evidence of icosahedral symmetry in human and simian immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**:929-38.
141. **Neumann, M., J. Harrison, M. Saltarelli, E. Hadziyannis, V. Erfle, B. K. Felber, and G. N. Pavlakis.** 1994. Splicing variability in HIV type 1 revealed by quantitative RNA polymerase chain reaction. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**:1531-42.
142. **Otto, M. J., C. D. Reid, S. Garber, P. Y. Lam, H. Scarnati, L. T. Bacheler, M. M. Rayner, and D. L. Winslow.** 1993. In vitro anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity of XM323, a novel HIV protease inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:2606-11.
143. **Ou, W., Y. Xiong, and J. Silver.** 2004. Quantification of virus-envelope-mediated cell fusion using a tetracycline transcriptional transactivator: fusion does not correlate with syncytium formation. *Virology* **324**:263-72.
144. **Pantaleo, G., C. Graziosi, J. F. Demarest, L. Butini, M. Montroni, C. H. Fox, J. M. Orenstein, D. P. Kotler, and A. S. Fauci.** 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **362**:355-8.
145. **Pauwels, R., J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter, and E. De Clercq.** 1988. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J Virol Methods* **20**:309-21.
146. **Perelson, A. S., A. U. Neumann, M. Markowitz, J. M. Leonard, and D. D. Ho.** 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**:1582-6.
147. **Persaud, D., S. C. Ray, J. Kajdas, A. Ahonkhai, G. K. Siberry, K. Ferguson, C. Ziemniak, T. C. Quinn, J. P. Casazza, S. Zeichner, S. J. Gange, and D. C. Watson.** 2007. Slow human immunodeficiency virus type 1 evolution in viral reservoirs in infants treated with effective antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**:381-90.
148. **Pettersson, S., I. Clotet-Codina, J. A. Este, J. I. Borrell, and J. Teixido.** 2006. Recent advances in combinatorial chemistry applied to development of anti-HIV drugs. *Mini Rev Med Chem* **6**:91-108.
149. **Princen, K., S. Hatse, K. Vermeire, S. Aquaro, E. De Clercq, L. O. Gerlach, M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Skerlj, G. Bridger, and D. Schols.** 2004. Inhibition of human immunodeficiency virus replication by a dual CCR5/CXCR4 antagonist. *J Virol* **78**:12996-3006.
150. **Ratner, L., R. C. Gallo, and F. Wong-Staal.** 1985. HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature* **313**:636-7.
151. **Reddy, Y. S., A. Kashuba, J. Gerber, and V. Miller.** 2003. Roundtable report: importance of antiretroviral drug concentrations in sanctuary sites and viral reservoirs. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**:167-76.
152. **Ren, J., C. E. Nichols, A. Stamp, P. P. Chamberlain, R. Ferris, K. L. Weaver, S. A. Short, and D. K. Stammers.** 2006. Structural insights into

- mechanisms of non-nucleoside drug resistance for HIV-1 reverse transcriptases mutated at codons 101 or 138. *Febs J* **273**:3850-60.
153. **Richman, D., C. K. Shih, I. Lowy, J. Rose, P. Prodanovich, S. Goff, and J. Griffin.** 1991. Human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to nonnucleoside inhibitors of reverse transcriptase arise in tissue culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:11241-5.
154. **Richman, D. D., M. A. Fischl, M. H. Grieco, M. S. Gottlieb, P. A. Volberding, O. L. Laskin, J. M. Leedom, J. E. Groopman, D. Mildvan, M. S. Hirsch, and et al.** 1987. The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* **317**:192-7.
155. **Saha, K., J. Zhang, A. Gupta, R. Dave, M. Yimen, and B. Zerhouni.** 2001. Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor. *Nat Med* **7**:65-72.
156. **Sakamoto, T., H. Ushijima, S. Okitsu, E. Suzuki, K. Sakai, S. Morikawa, and W. E. Muller.** 2003. Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and reporter gene. *J Virol Methods* **114**:159-66.
157. **Scondras, D.** 2007. Is cure possible for HIV? *AIDS Treat News*:6-7.
158. **Schols, D., S. Struyf, J. Van Damme, J. A. Este, G. Henson, and E. De Clercq.** 1997. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med* **186**:1383-8.
159. **Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman.** 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**:521-9.
160. **Schuitmaker, H., M. Koot, N. A. Kootstra, M. W. Dercksen, R. E. de Goede, R. P. van Steenwijk, J. M. Lange, J. K. Schattenkerk, F. Miedema, and M. Tersmette.** 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* **66**:1354-60.
161. **Sekigawa, I., H. Kaneko, L. P. Neoh, N. Takeda-Hirokawa, H. Akimoto, T. Hishikawa, H. Hashimoto, S. Hirose, N. Yamamoto, and Y. Kaneko.** 1998. Differences of HIV envelope protein between HIV-1 and HIV-2: possible relation to the lower virulence of HIV-2. *Viral Immunol* **11**:1-8.
162. **Shih, C. K., J. M. Rose, G. L. Hansen, J. C. Wu, A. Bacolla, and J. A. Griffin.** 1991. Chimeric human immunodeficiency virus type 1/type 2 reverse transcriptases display reversed sensitivity to nonnucleoside analog inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:9878-82.
163. **Si, Z., N. Madani, J. M. Cox, J. J. Chruma, J. C. Klein, A. Schon, N. Phan, L. Wang, A. C. Biorn, S. Cocklin, I. Chaiken, E. Freire, A. B. Smith, 3rd, and J. G. Sodroski.** 2004. Small-molecule inhibitors of HIV-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:5036-41.
164. **Smart, T.** 1995. Future of ICC debated. Inter-Company Collaboration for AIDS Drug Development. *GMHC Treat Issues* **9**:9.

165. **Stantchev, T. S., I. Markovic, W. G. Telford, K. A. Clouse, and C. C. Broder.** 2007. The tyrosine kinase inhibitor genistein blocks HIV-1 infection in primary human macrophages. *Virus Res* **123**:178-89.
166. **Steffens, C. M., and T. J. Hope.** 2001. Recent advances in the understanding of HIV accessory protein function. *Aids* **15 Suppl 5**:S21-6.
167. **Stein, B. S., and E. G. Engleman.** 1990. Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. *J Biol Chem* **265**:2640-9.
168. **Stephenson, J.** 1997. The art of 'HAART': researchers probe the potential and limits of aggressive HIV treatments. *Jama* **277**:614-6.
169. **Stevenson, M., M. Bukrinsky, and S. Haggerty.** 1992. HIV-1 replication and potential targets for intervention. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**:107-17.
170. **Tedla, N., P. Palladinetti, M. Kelly, R. K. Kumar, N. DiGirolamo, U. Chattopadhyay, B. Cooke, P. Truskett, J. Dwyer, D. Wakefield, and A. Lloyd.** 1996. Chemokines and T lymphocyte recruitment to lymph nodes in HIV infection. *Am J Pathol* **148**:1367-73.
171. **Teixidó, J., J. Borrell, S. Nonell, X. Batllori, S. Pettersson, L. Ros, R. Puig de la Bellacasa, M. Rabal, V. Pérez, J. Esté, I. Clotet, and M. Armand-Ugón.** 2006. Nuevos sistemas polinitrogenados como agentes anti-VIH. Spain.
172. **Tramontano, E., M. E. Marongiu, A. de Montis, A. G. Loi, M. Artico, S. Massa, A. Mai, and P. la Colla.** 1994. Characterization of the anti-HIV-1 activity of 3,4-dihydro-2-alkoxy-6-benzyl-4-oxopyrimidines (DABOs), new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *New Microbiol* **17**:269-79.
173. **Trumpfheller, C., K. Tenner-Racz, P. Racz, B. Fleischer, and S. Frosch.** 1998. Expression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta, and RANTES genes in lymph nodes from HIV+ individuals: correlation with a Th1-type cytokine response. *Clin Exp Immunol* **112**:92-9.
174. **Ugolini, S., I. Mondor, and Q. J. Sattentau.** 1999. HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol* **7**:144-9.
175. **von Schwedler, U., R. S. Kornbluth, and D. Trono.** 1994. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6992-6.
176. **Wang, T., Z. Zhang, O. B. Wallace, M. Deshpande, H. Fang, Z. Yang, L. M. Zadjura, D. L. Tweedie, S. Huang, F. Zhao, S. Ranadive, B. S. Robinson, Y. F. Gong, K. Ricarrdi, T. P. Spicer, C. Deminie, R. Rose, H. G. Wang, W. S. Blair, P. Y. Shi, P. F. Lin, R. J. Colonno, and N. A. Meanwell.** 2003. Discovery of 4-benzoyl-1-[(4-methoxy-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)oxoacetyl]-2- (R)-methylpiperazine (BMS-378806): a novel HIV-1 attachment inhibitor that interferes with CD4-gp120 interactions. *J Med Chem* **46**:4236-9.
177. **Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn, and et al.** 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**:117-22.



178. **Weissman, J. B.** 1987. Availability of AZT for treatment of AIDS. *N Engl J Med* **316**:1158.
179. **Westby, M., M. Lewis, J. Whitcomb, M. Youle, A. L. Pozniak, I. T. James, T. M. Jenkins, M. Perros, and E. van der Ryst.** 2006. Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol* **80**:4909-20.
180. **Winslow, D. L., S. Garber, C. Reid, H. Scarnati, D. Baker, M. M. Rayner, and E. D. Anton.** 1996. Selection conditions affect the evolution of specific mutations in the reverse transcriptase gene associated with resistance to DMP 266. *Aids* **10**:1205-9.
181. **Yarchoan, R., R. W. Klecker, K. J. Weinhold, P. D. Markham, H. K. Lyerly, D. T. Durack, E. Gelmann, S. N. Lehrman, R. M. Blum, D. W. Barry, and et al.** 1986. Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* **1**:575-80.
182. **Zabel, B. A., W. W. Agace, J. J. Campbell, H. M. Heath, D. Parent, A. I. Roberts, E. C. Ebert, N. Kassam, S. Qin, M. Zovko, G. J. LaRosa, L. L. Yang, D. Soler, E. C. Butcher, P. D. Ponath, C. M. Parker, and D. P. Andrew.** 1999. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* **190**:1241-56.
183. **Zhao, B., E. Winborne, M. D. Minnich, J. S. Culp, C. Debouck, and S. S. Abdel-Meguid.** 1993. Three-dimensional structure of a simian immunodeficiency virus protease/inhibitor complex. Implications for the design of human immunodeficiency virus type 1 and 2 protease inhibitors. *Biochemistry* **32**:13054-60.
184. **Zhu, P., J. Liu, J. Bess, Jr., E. Chertova, J. D. Lifson, H. Grise, G. A. Ofek, K. A. Taylor, and K. H. Roux.** 2006. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**:847-52.
185. **Ziegler, J. L., J. A. Beckstead, P. A. Volberding, D. I. Abrams, A. M. Levine, R. J. Lukes, P. S. Gill, R. L. Burkes, P. R. Meyer, C. E. Metroka, and et al.** 1984. Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men. Relation to generalized lymphadenopathy and the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **311**:565-70.

## 8. Agraïments

---

I ara arriba aquella pàgina on els que em coneixeu bé sabeu que si no em fa plorar mentre l'escric....poc em faltarà!

Tot i ser uns agraïments, sempre tenen un toc de comiat agredolç, perquè per molta il·lusió que faci acabar una tesi doctoral, saps que deixes enrere una colla de gent que, perquè enganyar-nos, trobaré mooolt a faltar!

Les primeres persones a qui vull agrair les estones viscudes al laboratori, sou vosaltres grup JAE! José, sincerament moltes gràcies per tot el que m'has ensenyat durant aquests anys. Hem tingut els nostres alts i baixos, però sense tu aquesta feina no s'hauria fet! Companys de grup.....què més cal que us digui que no m'hagueu sentit dir ja? Potser que vosaltres, juntament amb els que més estimo d'irsi o ex-irsi (vosaltres ja sabeu qui sou!), veu fer que el doctorat tingués sentit en moments en que semblava que no en tenia... i que sense cap mena de dubte sou el millor record que m'emporto d'aquí!

També vull donar gràcies a la resta de gent del laboratori i de l'hospital que d'una manera o altra heu fet possible aquesta tesi... i això us inclou a tots, encara que no hagueu tocat mai una pipeta!

Químics, no em puc oblidar de vosaltres! Als d'aquí i als de fora, gràcies. Sense la vostra feina, jo no hauria pogut fer la meva!

Família i amics de Caldes i rodalies (bé, Suècia i els EUA cauen una mica lluny....però ho considerarem rodalies, ok?), no em cansaré mai de donar-vos les gràcies a tots! Encara que no ho sembli, només estant al meu costat quan us he necessitat, m'heu ajudat!

A alguns de vosaltres us he de fer un lloc d'honor en aquesta pàgina: primer de tot, als de casa, perquè encara que aquest any en som menys, sempre estarem junts! Al Ferran, per regalar-me aquesta coberta tan xula! I a tu Aleix, que no cal que et digui totes les coses per les que et dono les gràcies, perquè saps que ocuparien tan o més que aquesta tesi!

A tots, un petó, sort i moltes gràcies!

