

Tesi doctoral presentada per En/Na

**Eulàlia PIÑOL OLLÉ**

amb el títol

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

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

FARMÀCIA

Barcelona, 20 de juny del 2007.

Facultat de Farmàcia  
Departament de Farmacologia i Química Terapèutica



UNIVERSITAT DE BARCELONA



## 6. RESUM I CONCLUSIONS

### Síntesi dels pseudodipèptids

- En la primera part de la present Tesi Doctoral s'ha aconseguit sintetitzar les següents estructures pseudodipeptídiques: l'oxazolopiperidona **80**, el lactam de Freidinger **82** i les pirrolizidinones **(6R)-** i **(6S)-79**, adaptant llurs estructures per a la síntesi peptídica en fase sòlida.
- En l'intent de sintetitzar l'espirolactam **81**, s'han topat amb diferents dificultats sintètiques que han fet inviable la síntesi d'aquest pseudodipèptid per a la síntesi de nous inhibidors de dimerització de la HIV-1 PR. Tanmateix, s'ha aconseguit sintetitzar l'espiropiperidina **121**.
- En el cas de les pirrolizidinones **(6R)-** i **(6S)-79**, s'ha dut a terme una anàlisi conformacional de les metilamides derivades **(6R)-** i **(6S)-168** mitjançant estudis de RMN i de modelització molecular, que deixa entreveure la capacitat d'aquestes estructures per a la inducció de girs de tipus  $\gamma$ . La capacitat d'inducció de girs d'aquestes pirrolizidinones evidencia el potencial d'aquestes estructures per a l'estudi de relacions estructura-activitat en el camp del peptidomimetisme.
- S'ha estudiat el comportament químic de l'isòmer **(6R)-79** i les possibles transformacions en la posició C6, però s'ha topat amb l'estabilitat inusual del derivat mesilat **(6R)-169**, probablement a causa de la conformació còncava adoptada pel bicicle que dificulta qualsevol possible atac nucleofílic per la cara oposada.

### Síntesi dels inhibidors

- Mitjançant SPPS, s'han sintetitzat 26 inhibidors diferents de la HIV-1 PR, fent ús de les estructures pseudodipeptídiques **80** i **82**.
- Els inhibidors sintetitzats es poden subdividir en 3 categories:
  - 5 inhibidors patró formats per aminoàcids naturals
  - 11 inhibidors de tipus I, formats per una sola cadena peptídica i que incorporen una de les estructures pseudodipeptídiques
  - 5 inhibidors de tipus II, formats per dues cadenes peptídiques i que incorporen una de les estructures pseudodipeptídiques
  - 5 inhibidors de tipus II, formats pels subproductes de reacció simètrics fruit de l'entrecreuant entre cadenes peptídiques.

### Avaluació dels inhibidors

- Fruit d'una col·laboració amb el laboratori del Dr. Ernest Giralt, s'ha pogut expressar, purificar i plegar la proteasa del VIH-1 amb elevats rendiments, la qual cosa ens ha permès poder realitzar l'avaluació *in vitro* dels inhibidors sintetitzats mitjançant experiments de fluorimetria (FRET).

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

### **Futures perspectives**

- Queda pendent fer un càlcul comparatiu de modelització molecular dels compostos actius (obtinguts i descrits en la literatura) per tal de poder observar si existeix un patró estructural comú i d'aquí deduir l'estructura del farmacòfor. Amb aquest model, es disposaran de dades per poder fer un disseny millorat de nous inhibidors de la proteasa del VIH-1.
- Caldria estudiar més a fons el mode d'acció d'aquests inhibidors, ja sigui per RMN amb marcatges isotòpics o amb l'ajut de la modelització molecular. El coneixement precís del seu mode d'acció és clau per a un desenvolupament racional de nous inhibidors de dimerització. El compost **176** pot ser l'estructura de partida per a la cerca del que actualment es defineix com a "fàrmac adaptatiu", és a dir, un compost amb l'habilitat d'inhibir diferents variants d'una molècula diana amb elevada afinitat. Es tracta de trobar un compromís entre la introducció d'elements de rigidificació del fàrmac per tal de preformar la conformació bioactiva (afavorint d'aquesta manera la formació de les interaccions més crítiques per a l'activitat) i la introducció de funcionalitats flexibles que permetin l'adaptació del compost a les diferents formes de la diana terapèutica.