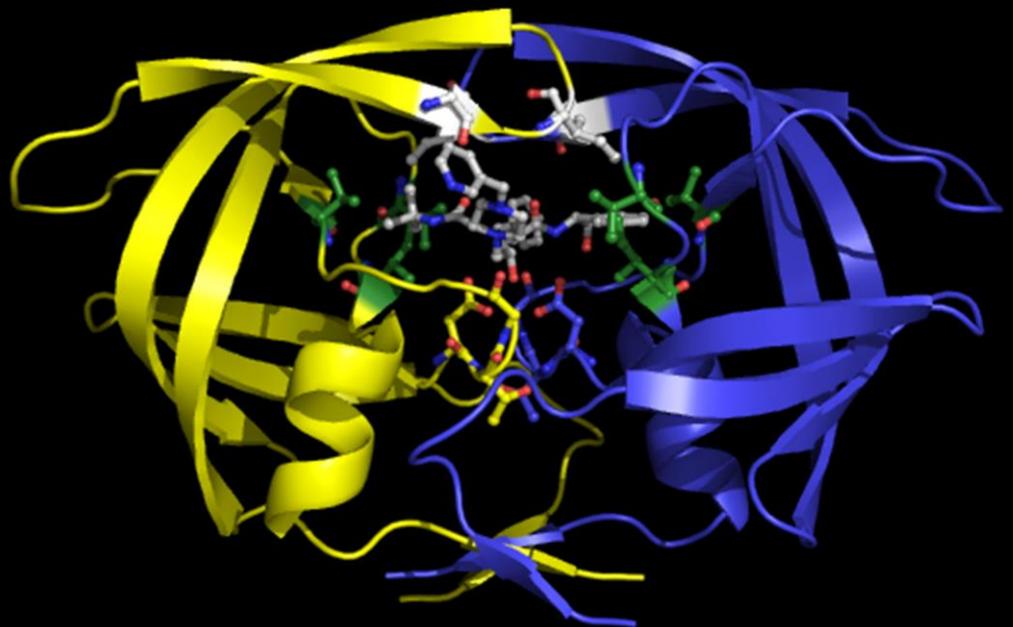


2015

Fármacos Inhibidores de proteasas virales

Optimización de su Relación Estructura- Actividad

Revisión Bibliográfica. Fármacos inhibidores de proteasas utilizados en el
tratamiento de virus de importancia clínica: VIH y VHC



Autor: Miguel Fernández García; Tutor: José Ángel Otero
Universidad Complutense de Madrid
14/06/2015 DNI: 53495379R; Convocatoria: Junio 2015

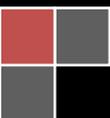


Tabla de contenidos

Resumen	1
Palabras clave	2
Introducción	3
Proteasas virales y desarrollo de fármacos	1
Relación estructura/características de un fármaco: actividad, efectividad, farmacocinética y toxicidad	3
Aproximaciones para la determinación de compuestos farmacológicamente activos	4
Proceso de selección de candidatos	5
Objetivos	5
Metodología	6
Resultados y discusión	7
Desarrollo de inhibidores de la proteasa del VIH	7
Desarrollo de inhibidores de la proteasa NS3/4A del VHC	13
Conclusiones	17
Bibliografía	18

Resumen

Esta revisión recopila información sobre el desarrollo y optimización de las estructuras de diferentes compuestos inhibidores de proteasas del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) y Virus de la Hepatitis C (HCV), evaluando el panorama actual de medicamentos comercializados y diferentes líneas de investigación involucradas en el desarrollo de estos fármacos. En los distintos fármacos descritos, previa descripción de sus dianas terapéuticas y mecanismo de acción, se citan numerosas modificaciones estructurales para mejorar las características farmacodinámicas, farmacocinéticas, referentes a seguridad y a aparición de resistencias, tales como creación de nuevas interacciones enzima-sustrato, uso de bioisómeros, restricción conformacional, limitación de interacciones aminoácidos necesarios para la actividad enzimática, reducción del peso molecular, modificación a profármacos. La selección de una estructura química adecuada es el primer punto de partida en el proceso de desarrollo de un fármaco, apareciendo nuevas generaciones de fármacos con mejores perfiles de eficacia y seguridad.

In this review, the development and optimization of the structures of different protease inhibitors of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus is summarized. The actual landscape of commercialized drugs and different on-the-pipeline or on research drugs is evaluated. After describing the therapeutic targets and the mechanism of action of these compounds, several structural modifications are described, in order to improve their pharmacodynamic, pharmacokinetic, safety and resistance characteristics: new enzyme-inhibitor interactions, bioisostere substitutions, conformational restriction, reduction of the number of interactions to backbone enzyme residues, molecular weight reduction and prodrug development. The smart design of chemical structures is the starting point of the drug development process. Subsequently, better structures lead to new drug generations with improved efficacy and safety profiles.

Palabras clave

Proteasa, SAR, estructura, virus, inhibidores

Introducción

Proteasas virales y desarrollo de fármacos

Las proteasas son enzimas cuya actividad es responsable de la hidrólisis de péptidos y proteínas. Esta hidrólisis se puede producir mediante diferentes mecanismos moleculares,

criterio por el cual las proteasas se clasifican en distintas subfamilias: aspartato proteasas, serina proteasas, treonina proteasas, cisteína proteasas, ácido glutámico proteasas y metaloproteasas (1). A día de hoy, un gran número de proteasas han sido identificadas, cuyas funciones biológicas son muy diversas, interviniendo en procesos muy dispares, desde hidrólisis de moléculas que adquieren actividad hormonal hasta degradación de proteínas (2). El procesamiento de proteínas mediante proteasas también se encuentra en ciertos virus, produciéndose en ellos una maduración de las proteínas a partir de

poliproteínas precursoras, productos de la traducción de su ARN mensajero. Este procesamiento proteolítico es esencial para la formación de las partículas víricas maduras, ya que confiere a las proteínas hidrolizadas (tanto enzimas como proteínas estructurales) su capacidad funcional, interviniendo el ciclo vital del virus. Debido a esto, se han desarrollado fármacos que, inhibiendo la actividad proteasa, interfiriendo en la formación de nuevos viriones, reduciéndose la carga viral en pacientes infectados (3). Esto tiene especial importancia en el tratamiento de ciertas enfermedades, tales como la infección por HIV o HCV, frente a las cuales, la ausencia de vacunas efectivas hace aún más importante el desarrollo de este tipo de fármacos.

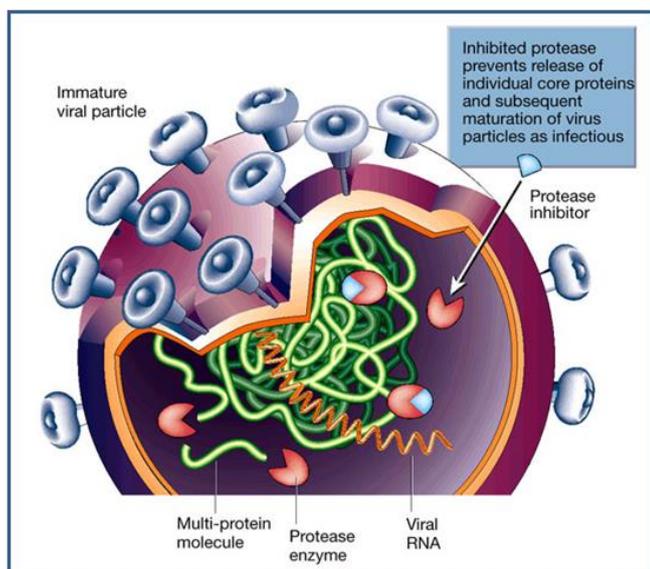


Figura 1: la inhibición de la proteasa viral previene la maduración de partículas víricas

Las proteasas virales presentan diferencias en función del tipo de virus que las exprese. Varían, entre otros aspectos, tanto en su especificidad de sustrato como en su secuencia aminoacídica, sus subunidades, su mecanismo de

proteólisis y su unión con cofactores activadores o inhibidores. No obstante, todas ellas comparten características comunes: las proteasas virales generalmente hidrolizan enlaces específicos entre aminoácidos específicos, y todas ellas poseen una serie de regiones de especificidad por el sustrato sobre el que actúan, en su centro activo. Sin embargo, estas regiones son diferentes para cada proteasa, y son determinantes en relación al desarrollo de inhibidores que actúen sobre el centro activo, ya que presentan interacciones específicas debido a los distintos aminoácidos que presentan en estas zonas, denominadas pliegues. Éstos, son enumerados S1, S2, S3, y así sucesivamente, cuando interactúan con la parte que contiene el extremo amino terminal de la poliproteína/inhibidor, y S'1, S'2, S'3... cuando son relativas a la parte carboxilo terminal. De este modo, S1 corresponde a la región donde se produce una interacción entre el radical variable del aminoácido previo al enlace peptídico que sufre hidrólisis, denominado P1; S2 corresponde a la región responsable de la interacción mediada por el aminoácido anterior (P2), y así sucesivamente, siendo análoga la numeración de las regiones que interactúan con P'1, P'2, P'3 (4).

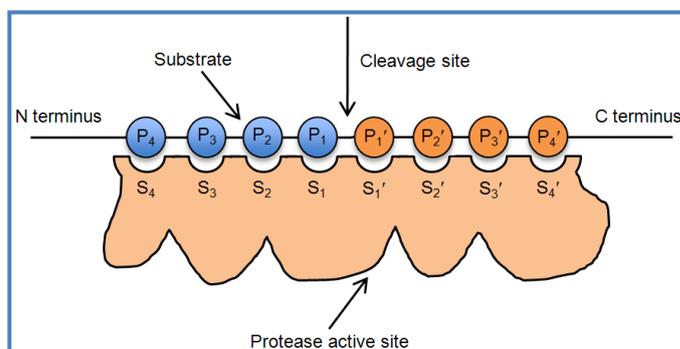


Figura 2: centro activo de una proteasa e interacciones entre residuos y pliegues

Relación estructura/características de un fármaco: actividad, efectividad, farmacocinética y toxicidad

El diseño racional de la estructura de un fármaco es una herramienta fundamental para la identificación y el desarrollo de nuevos fármacos. En este desarrollo, partiendo de ciertas premisas, se buscan estructuras que cumplan los requerimientos de un fármaco en cuanto a sus características farmacodinámicas (mecanismo, potencia), farmacocinéticas (adecuada vía de administración, comportamiento frente a ADME) y toxicológicas (seguridad) (5). En relación a los inhibidores de la proteasa (IP), otro factor a tener en cuenta es la posible aparición de resistencias, que en gran medida depende de la interacción inhibidor-enzima. Existen parámetros *in vitro* que deben evaluarse para obtener compuestos candidatos a ser comercializados:

Parámetros indicadores de la actividad de un fármaco: La afinidad de un inhibidor por su enzima es medida mediante **K_i**, que define la concentración a la cual la actividad proteasa es disminuida en un 50%. Esta está relacionada con IC₅₀, El potencial de inhibición de la replicación viral se mide por **EC₅₀** e **IC₅₀**, que expresan la concentración a la cual el virus destruye al 50% de células en un ensayo, o bien el número de copias de un virus es reducido en un 50% en un ensayo *in vitro* con células infectadas, respectivamente (6). Mientras que K_i es una constante, EC₅₀ e IC₅₀ varían en función del tipo de ensayo que se realice. Fármacos con baja afinidad, o baja actividad inhibitoria, no serán o bien activos, o bien eficaces frente al virus. Se buscan, por norma general como moléculas candidato aquellas que

presenten una alta especificidad por proteasas virales y una alta inhibición de su actividad (cercana a valores nanomolares de K_i), factores relacionados con la reducción de efectos secundarios y toxicidad.

Parámetros farmacocinéticos: la determinación de ciertos parámetros de gran importancia es fundamental, entre otros la **Biodisponibilidad**, que es definida como el porcentaje de fármaco que, administrado por una vía determinada, alcanza el torrente sanguíneo. Existen numerosos factores inherentes a la estructura química que condicionan la biodisponibilidad y el balance hidrofílico lipofílico, y por tanto la **permeabilidad celular**. Moléculas que no presenten una adecuada biodisponibilidad o permeabilidad celular no podrán alcanzar concentraciones adecuadas en su lugar de acción, precisando de mayor dosis, pudiendo presentarse un mayor número de efectos secundarios (7). Otro parámetro importante es la **Semivida plasmática**, indicadora de la excreción de un fármaco. Se define como el tiempo necesario para que el fármaco reduzca su concentración sanguínea en un 50%. Fármacos con una inadecuada semivida plasmática pueden resultar problemáticos debido a su posología. (8)

Parámetros indicadores de la seguridad de un fármaco: **CC₅₀** es la concentración a la cual se presenta un efecto citotóxico en el 50 % de las células de un ensayo *in vitro*. Ciertos grupos funcionales se relacionan con un incremento de toxicidad. Cuanto mayor sea el índice terapéutico (**IC₅₀/CC₅₀**) menor será el riesgo de presentarse efectos citotóxicos a una concentración efectiva del fármaco. (9)

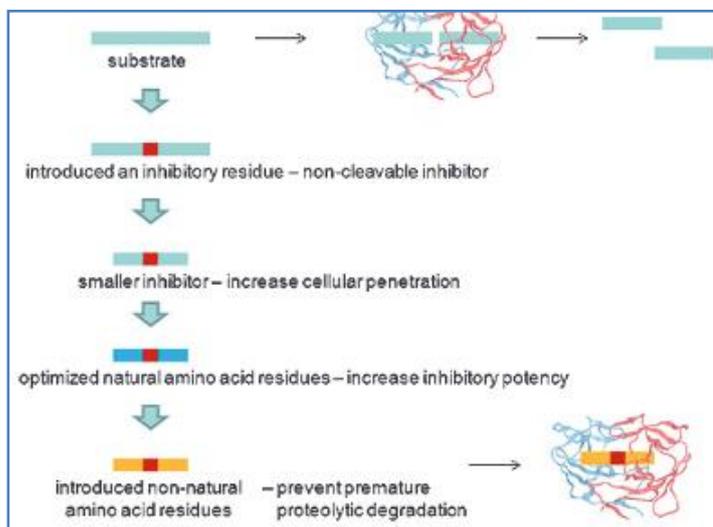


Figura 3: modificaciones en relación con el diseño de IP dirigidos al centro activo

Aproximaciones para la determinación de compuestos farmacológicamente activos

Basados en información de dianas terapéuticas similares: los IP de similar mecanismo de acción (misma familia de proteasa) podrían presentar cierta actividad inhibitoria en proteasas virales objetivo, de manera que la estructura del fármaco podría ser un punto de partida para el desarrollo de un fármaco antiviral. Esta aproximación ha sido aplicada experimentalmente numerosas veces. Ejemplos de ello son tanto inhibidores de la pepsina o renina en el desarrollo de compuestos frente al VIH (10), como inhibidores de la proteasa del VIH para el desarrollo de inhibidores de la proteasa del HTLV-1. (11)

Basados en el cribado de compuestos: al poseerse un método adecuado, fiable y rápido de evaluación de la actividad proteasa, numerosas moléculas, procedentes de diferentes fuentes (librerías químicas, extractos naturales) pueden evaluarse para descubrir diversas estructuras que

actividad deseada. Esta aproximación permite identificar nuevas estructuras activas, aparte de ser capaz de descubrir nuevos mecanismos inhibitorios distintos de los ya dilucidados (4).

Basados en métodos quimiinformáticos: técnicas como el QSAR, el diseño de farmacóforos y el cribado virtual de compuestos que presenten características deseadas frente a la diana sobre la que actúan aportan información *in silico* que puede ser un punto de partida de gran utilidad para la evaluación de la actividad inhibitoria *in vitro* de distintas moléculas candidato (12).

Basados en información estructural: La elucidación de estructuras proteicas mediante cristalización de proteínas, y su evaluación mediante Difracción de Rayos X (DRX) o Resonancia Magnética Nuclear (RMN) permiten aportar información acerca de la conformación tridimensional de la proteína en el espacio, que determina sus estructuras terciarias y cuaternarias. Cuando estas proteínas son cristalizadas junto con sus inhibidores, estas pueden también aportar información acerca de las interacciones enzima sustrato. La determinación de las posiciones en el espacio de los residuos aminoacídicos del enzima permiten postular nuevas posibles estructuras en fármacos, que al poseer interacciones deseadas con el enzima, posean una mayor potencia inhibitoria, o bien presenten otras características farmacocinéticas o farmacodinámicas deseadas. (4).

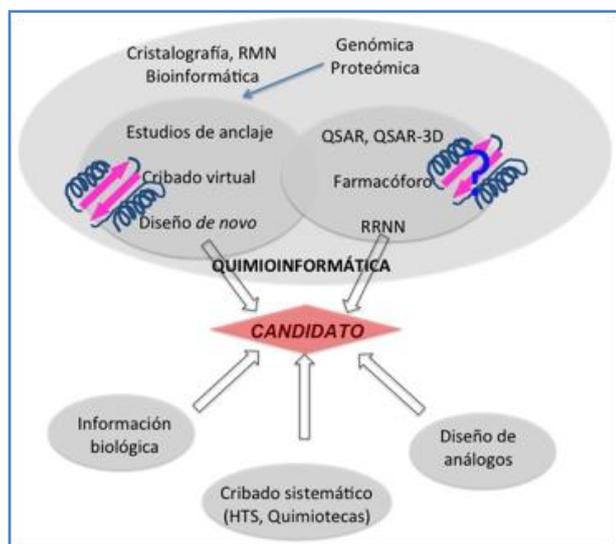


Figura 4: múltiples aproximaciones convergen en el diseño de un fármaco

Proceso de selección de candidatos

La identificación de compuestos químicos adecuados frente a una diana terapéutica es un proceso altamente complejo, esquematizado por la figura 5. Basándose en todas las aproximaciones anteriormente descritas, el proceso comienza con la identificación de actividad biológica en ciertas estructuras químicas. Estos compuestos, son denominados “hits”. Dentro de estos “hits” existen compuestos que presentan características en ensayos *in vitro* particularmente importantes. Estos compuestos, son denominados **cabezas de serie**. Por último, frente a estos compuestos, se realizan modificaciones estructurales, generándose series de estructuras con distintos sustituyentes. Estas modificaciones, se pueden realizar tanto realizando aproximaciones mediante diseño racional, como por química combinatoria, en la cual se evalúan distintas estructuras generadas al azar. Las características de estos nuevos compuestos son evaluadas. Si alguna de estas estructuras es considerada particularmente prometedora, se selecciona, comenzando sobre

ella el resto de ensayos preclínicos involucrados en el desarrollo de un **potencial nuevo fármaco**. (13).

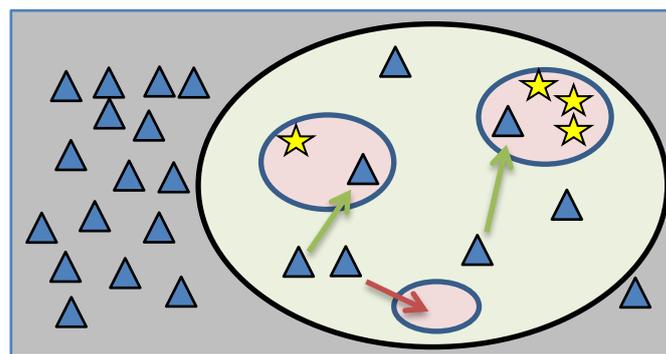


Figura 5: proceso de identificación de candidatos a fármacos. ▲ = compuestos. Verde: zona de “hits”; Rosa: zona de cabezas de serie;★ = fármaco potencial

Objetivos

- Identificar los aspectos relevantes conocidos sobre proteasas virales como dianas terapéuticas, desarrollo de IP, modificaciones químicas y diferentes mecanismos de inhibición enzimática.
- Resumir información sobre las diferentes líneas de investigación abiertas en relación con el desarrollo de inhibidores de proteasas virales.
- Proporcionar información amplia sobre el desarrollo de inhibidores de proteasas.
- Identificar las aproximaciones teóricas y metodológicas relacionadas con el desarrollo de inhibidores de proteasas virales.
- Sugerir aspectos o temas de investigación.
- Ahorrar tiempo y esfuerzo en la lectura de documentos primarios.
- Contribuir a superar las barreras idiomáticas
- Ayudar al lector a preparar comunicaciones, clases, protocolos, revisiones, etc.

Metodología

Búsqueda bibliográfica

Se utilizaron dos tipos de bases de datos: PubMed y Google Académico. En ellas, se introdujeron los siguientes términos de búsqueda: “protease inhibitor”, “protease inhibitors”, “protease inhibitors review”, “viral protease”, “viral proteases”, “HIV protease inhibitor”, “HIV protease inhibitors”, “HIV protease”, “HIV protease review”, “HCV protease inhibitor”, “HCV protease inhibitors”, “HCV protease”, “HCV protease review”, “HTLV 1 protease inhibitor”, “HTLV 1 protease inhibitors”, “HTLV 1 protease”, el nombre del principio activo de cada IP a definir seguido de “X ray”, “crystallography”, “binding” y “mechanism”. Algunos resultados de búsqueda se filtraron con los filtros “antigüedad inferior a 5 años” y/o “artículos de libre acceso”.

Se realizó una búsqueda de tesis doctorales mediante Google académico, con los siguientes términos: “protease inhibitor thesis”, “HIV protease thesis”, “HIV protease inhibitor thesis”, “HCV protease thesis”, “HCV protease inhibitor thesis”.

Se realizó una búsqueda en la Biblioteca Digital Complutense, en la sección colección de libros electrónicos suscritos por la UCM, con los siguientes términos de búsqueda: “protease”, “proteases”, “proteasa”, “proteasas”.

Criterios de selección

Se seleccionaron artículos que resumieran las características específicas de las proteasas virales, revisiones bibliográficas que contuvieran información amplia sobre proteasas virales e inhibidores de proteasas, imágenes relevantes y artículos científicos que indican nuevas familias de compuestos inhibidores.

Análisis de la variabilidad, fiabilidad y validez de los artículos

Se analizó que las afirmaciones realizadas por los artículos estuvieran correctamente referenciadas, y que los artículos estuvieran publicados en revistas científicas o libros accesibles.

Resultados y discusión

Desarrollo de inhibidores de la proteasa del VIH-1

Estructura de la proteasa del VIH-1

La proteasa del VIH (HIV1pr) es un enzima perteneciente a la subclase de las aspartato proteasas, formada por un dímero que posee dos subunidades idénticas, de 99 aminoácidos de longitud. Sus aminoácidos se denominan 1-99 y 1'-99'. Posee un centro activo rodeado de hélices β que contiene dos tríadas catalíticas de Asp, Gly y Thr (25-27 y 25'-27'). Entre ambos monómeros, se producen varias interacciones, siendo de mayor importancia las de tipo enlace de H y enlace iónico, principalmente en tres zonas: el centro activo, sobre el que se han identificado 5 enlaces de H en los residuos 25-27 (25'-27'); la región solapante, formada por los residuos 49-52 (49'-52'), contribuye con 2 enlaces de H. Esta zona puede adquirir distintos grados de conformación entre abierta y cerrada (14); por último, se producen interacciones en los extremos de la secuencias aminoacídicas tanto amino como carboxilo terminales, formando cuatro láminas β , interactuando los residuos 1-4 (1'-4') y 96-99 (96'-99'), formando 19 enlaces de H y 2 pares iónicos, contribuyendo los residuos 96-99 (96'-99') al 75% del total de la energía de Gibbs de dimerización (4). También se producen 8 enlaces de H entre los residuos 6-8 (6'-8'), 29 (29') y 87 (87').

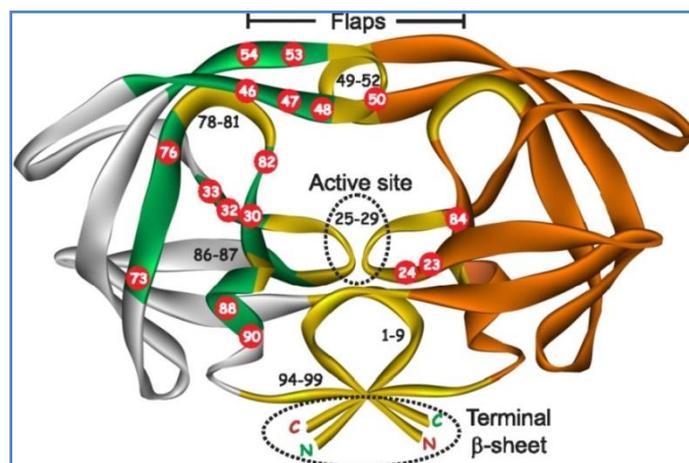


Figura 6: estructura de HIVpr

Mecanismo de acción

Al producirse interacciones entre los diferentes pliegues del centro activo y la poliproteína, el enlace a romper se sitúa en su posición adecuada y se produce la hidrólisis debido a la acción de los residuos Asp25 y Asp25' de ambas subunidades. Ambos se encuentran coordinados con una molécula de agua, encontrándose uno de ellos protonado. Esta molécula de agua produce una sustitución nucleófila sobre el carbono carbonílico del enlace peptídico, produciéndose después la rotura del enlace peptídico.

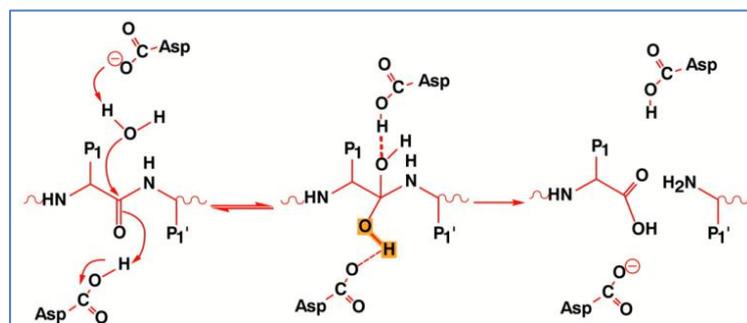


Figura 7: mecanismo de acción de de HIVpr. Uno de los Asp interviene en la activación del H₂O que ataca al carbonilo del enlace peptídico, el cual se protona debido a la acción del otro Asp, creando un estado de transición tetraédrico

Pese a no existir una secuencia consenso claramente definida en relación a los péptidos que son hidrolizados por este enzima, estos poseen Phe en P1 y generalmente Pro en P'1. (S1 y S'1) son estructuralmente muy similares (15). Poseen, además generalmente un aminoácido ramificado en P2. (16). Asimismo, los carbonos carbonílicos en P1 y P'1 del péptido hidrolizable, se encuentran coordinados con una molécula de H₂O, que a su vez interactúa con los residuos Ile50 e Ile50' de las solapas del enzima, siendo necesaria esta interacción para la actividad enzimática (17).

Desarrollo de IP

Debido a las características de la proteasa, los inhibidores desarrollados se fundamentan generalmente en dos líneas de actuación: inhibición de la actividad catalítica del centro activo e inhibición de la dimerización del enzima.

Inhibidores dirigidos al centro activo

A fecha de hoy, todos los inhibidores de proteasa del HIV-1 que han sido comercializados pertenecen a este grupo. A excepción de tipranavir, Todos ellos son peptidomiméticos cuya estructura contiene un grupo hidroxilo sobre un carbono quiral, lo que les convierte en análogos del estado de transición del sustrato natural del enzima (18). De esta manera, se produce una inhibición reversible, al ocupar estos compuestos el centro activo con mayor afinidad mientras compiten con las poliproteínas virales.

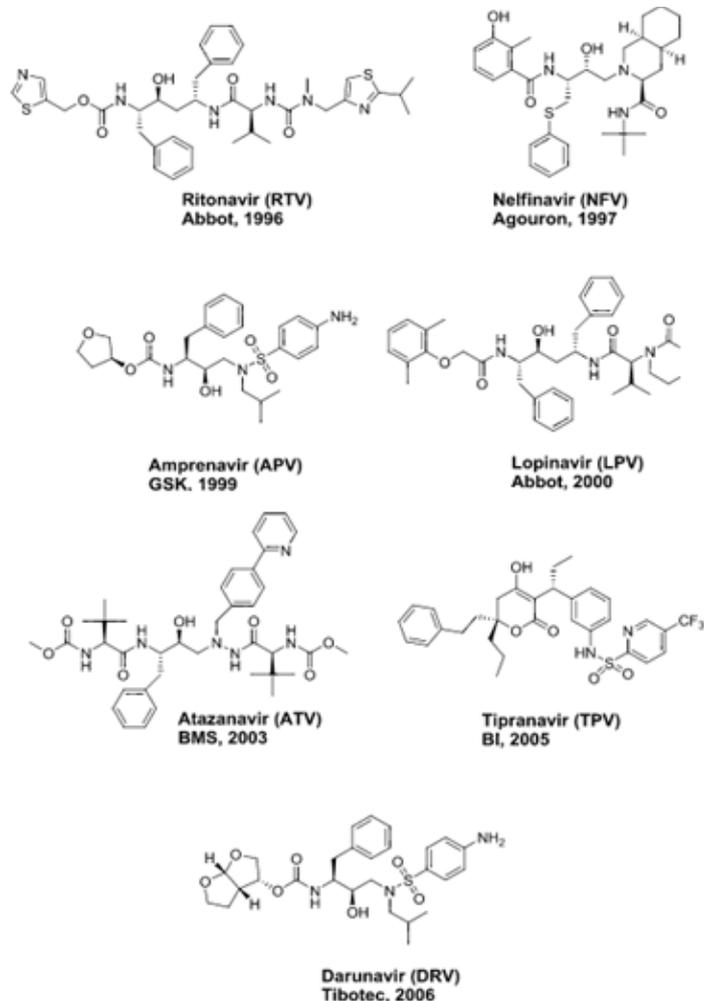
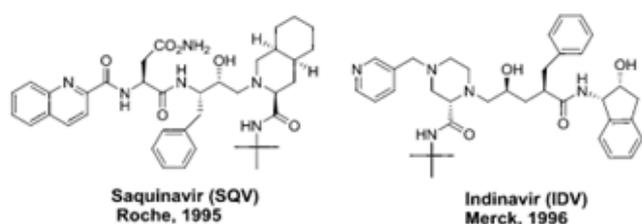


Figura 8: IP anti VIH comercializados

El primer IP comercializado fue **Saquinavir** (1995, EC₅₀ = 37,7 nM). En él, se sustituye el enlace peptídico por un derivado de hidroxietilamina, que impide la hidrólisis. Por analogía con secuencias de poliproteínas virales presenta un residuo de Phe en la posición P1 y un residuo optimizado a partir de Pro en P'1 (z-(S,S,S)-decahidroisoquinolina-3-carbonilo o DIQ), con potencial inhibidor aumentado, ya que este grupo carbonilo interactúa con las solapas del enzima y la molécula de agua que interactúa coordinada con ellas (19). Pese a ser útil en el tratamiento del HIV-1, este compuesto presenta baja biodisponibilidad oral (4%), posiblemente debido a su marcado carácter peptídico (4). Los grupos carboxamida y quinolina en P2 y P3 presentan interacciones con residuos de la proteína, aumentando su afinidad. **Nelfinavir**

(1997, $EC_{50} = 30-60$ nM), impide la hidrólisis al ser un derivado de hidroxietileno. Contiene el mismo grupo DIQ que saquinavir, ya que está basado en su estructura y otro compuesto (LY289612). Contiene un grupo 2-metil-3-hidroxibenzamida, con el que establece enlaces de H. Contiene además un grupo S-fenilo en la posición P1 que dota de una mayor potencia al compuesto, al causar interacciones hidrofóbicas (20).

Indinavir (1996, $EC_{50} = 5,5$ nM) presenta importantes modificaciones, las cuales hacen aumentar su potencia. Forma importantes interacciones con HIV-1pr wild type (HIV_{pr,wt}) mediante enlaces de H con Asp29/29', Gly27', Asp25, Asp25/25', Arg8', Ile50 e Ile50' y 95 interacciones por fuerzas de Van der Waals, como las producidas entre el grupo Phe (P'1), Pro81 y Val82 (21). Indinavir posee un nitrógeno básico, del cual se hipotetizó que aumentaría su biodisponibilidad, la cual en efecto alcanza un 65% (22). No obstante, es eliminado rápidamente del organismo, y presenta una baja solubilidad.

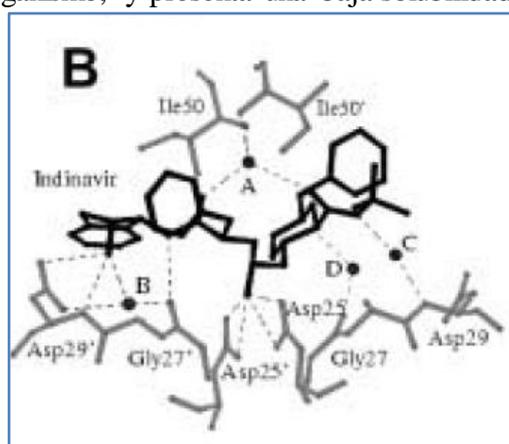


Figura 9: enlaces de H entre indinavir y HIV1_{pr,wt}

Ritonavir (1996, $EC_{50} = 25$ nM), fue desarrollado basándose en la pseudoigualdad de los pliegues de la proteasa (debido a su estructura homodimérica), por lo que presenta una alta

simetría, presentando residuos Phe en ambos P1 y P'1. Contiene un grupo isopropiltiazolil en P3 presentando interacciones adicionales con el enzima (23). Debido a ser también un potente inhibidor del citocromo CYP3A4, este compuesto es utilizado como “booster” en combinación con otros IPs. **Lopinavir** (2000, $EC_{50} = 30-60$ nM) se desarrolló a partir de la estructura de Ritonavir. Los grupos 5-tiazolil (P2) y urea cíclica de 6 átomos (P2') son más pequeños, presentando menos interacción con el residuo 82, y presentando mayor potencia frente a cepas resistentes de HIV-1 (24).

Amprenavir (1999, $EC_{50} = 12-80$ nM), posee un grupo furano en P2, un residuo de Phe en P1, un grupo isobutilo en P'1, y un grupo sulfonamida en P'2. Su estructura fue optimizada para reducir el Pm de los IP, de manera que se redujera su eliminación hepática, manteniendo buenas características farmacocinéticas (4). Su bajo número de estereocentros en comparación con otros IP se ha relacionado con un aumento de la biodisponibilidad oral (25). **Fosamprenavir** (2003, $EC_{50} = 12-80$ nM) es un profármaco que es metabolizado a amprenavir. Fue desarrollado para conseguir una eliminación más lenta del fármaco. Estudios han demostrado que posee mayor seguridad y eficacia que amprenavir (26).

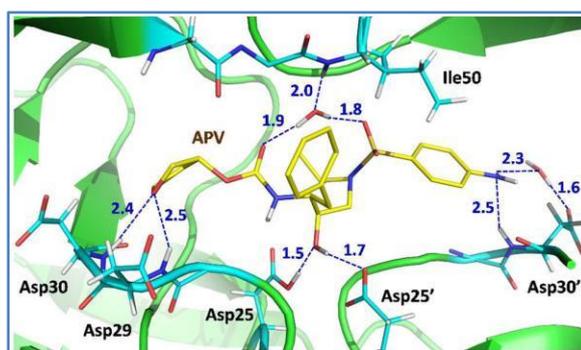


Figura 10: enlaces de H entre amprenavir y HIV1_{pr,wt}

Atazanavir (2003, $EC_{50} = 2.6-5.3$ nM) posee un aza-dipéptido que sustituye al enlace hidrolizable en las poliproteínas virales. Contiene un radical fenilpiridilo en la posición P¹, que produce interacciones hidrofóbicas con Ile84, Val82, Arg8, Pro81 y Gly49'. Otras interacciones importantes son enlaces de H con Asp29/29', Gly27', Gly 48 Asp25/25', Arg8', e Ile50/50' (27). Este compuesto presenta una biodisponibilidad oral mejorada, que permite una posología de una única dosis diaria (23).

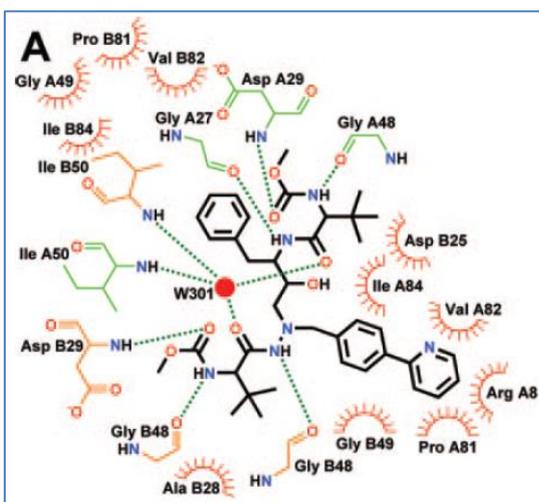


Figura 11: interacciones atazanavir- HIV1pr_{wt}

Tipranavir (2005, $EC_{50} = 30-70$ nM) fue desarrollado en ciclos iterativos de optimización de SAR a partir de un derivado de la 4-hidroximarina, cuya actividad anti HIV se determinó mediante cribado sistemático de librerías de compuestos. Es por ello que, presentando una estructura distinta al resto de IP dirigidos al centro activo, se sitúa en una zona del centro activo distinta, interactuando su carbono carbonílico lactónico con los residuos Ile50 y Ile50'. Otras interacciones importantes se producen en Gly48, Asp25/25', Gly48, Asp29 y Asp30. (28) El perfil de interacciones hace que las mutaciones que causan resistencia a tipranavir

sean sustancialmente diferentes a la del resto de los IP comercializados.

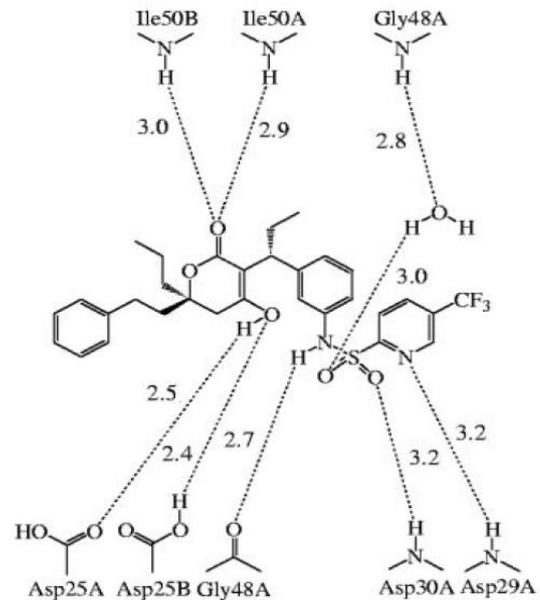


Figura 12: enlaces de H entre tipranavir y HIV1pr_{wt}

Darunavir (2006, $EC_{50} = 1-2$ nM), es el último fármaco comercializado hasta la fecha. Se desarrolló a partir de la estructura de amprenavir, pero en lugar de THF, posee un grupo bis-THF como sustituyente en P₂, que establece interacciones adicionales con Asp30', responsables de la elevada potencia de este compuesto y de su baja aparición de resistencias. Produce enlaces de H con Asp 25/25', Asp 29, Asp 30/30', Gly27 e Ile50/50'. Ile 84 es una interacción importante en P₁ (29).

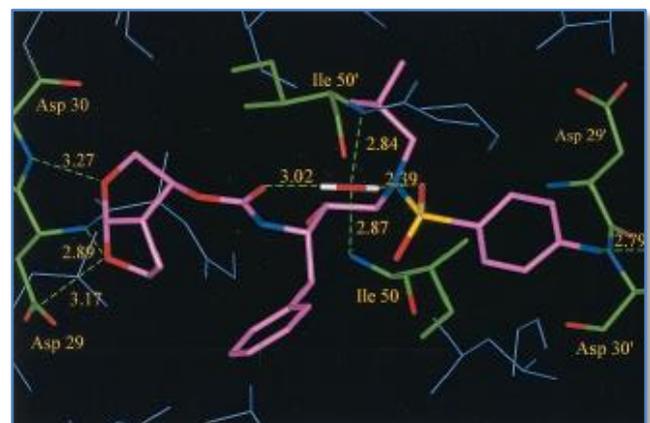


Figura 13: interacciones entre amprenavir y HIV1pr_{wt}

Líneas de investigación

Otros compuestos de interés en el desarrollo de este tipo de IP son los derivados de ureas cíclicas. Estos se desarrollaron, basándose en la creación de un farmacóforo que incorporase en su estructura un análogo a la molécula de H₂O coordinada con las solapas del enzima, de esta manera presentarían interacciones más fuertes con el enzima, distintas del centro activo, aumentando su potencia y perfil de resistencia (4). El desarrollo de estas estructuras llevo a la entrada en ensayos clínicos de **mozenavir**. Su desarrollo fue discontinuado, al no observarse ningún beneficio en comparación a los IP comercializados en aquellos momentos (30).

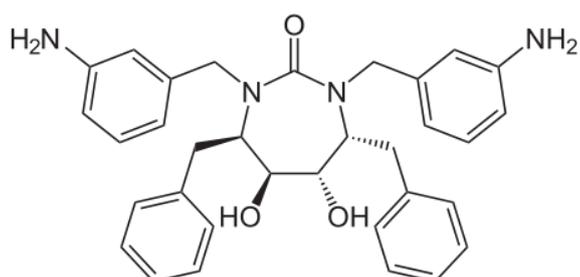


Figura 14: estructura de mozenavir

Al existir un amplio arsenal terapéutico de IP reversibles dirigidos al centro activo, la mayoría de los compuestos en investigación son evaluados para abordar dos inconvenientes de los IP: el desarrollo de compuestos activos frente a cepas de VIH multiresistentes (MDR HIV), y la reducción de efectos secundarios causados por los IPs actualmente comercializados. Los nuevos compuestos cuya actividad se ha evaluado frente a MDR HIV son generalmente compuestos cuya estructura está basada en darunavir. GRL-1388 y GRL-1398 poseen un sustituyente tetrahidropirano-THF (tp-THF), en lugar del Bis THF presente en darunavir; GRL-02492a y GRL-

02492b, poseen un biciclo integrado por un ciclopentano y un THF sustituido con N-metoxicarboxamida; GRL-02031 también posee un biciclo Tp-THF y un sustituyente metil-4-pirrolidona. En P2; GRL-0519A posee un triciclo formado por tres grupos THF; todos estos compuestos presentan un buen perfil de EC₅₀ frente a MDR HIV-1, debido interacciones adicionales con el enzima que intensifican su afinidad por ella. (31) (32) (33).

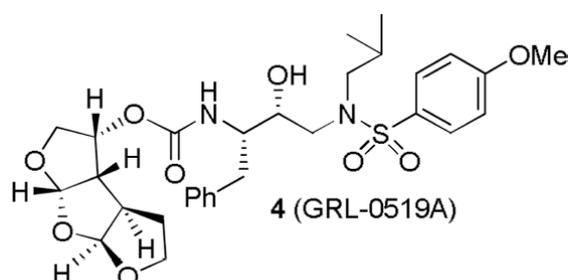


Figura 15: estructura de GRL-0519 A

Otra modificación realizada en compuestos en líneas de investigación actuales es la inclusión de un grupo fosfonato en P'1 (GS-8374, K_i = 9pM), el cual produce un aumento de actividad antiviral. Este grupo produce interacciones hidrofóbicas entre los grupos etilo y Phe253 y Pro 81 (34).

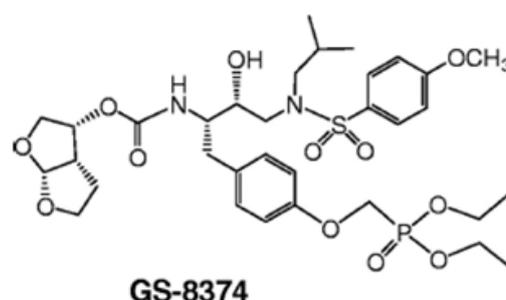


Figura 16: estructura de GS-8374

Inhibidores alostéricos

Inhibidores de la dimerización: son moléculas peptidomiméticas, dirigidas a las láminas β terminales del dímero. Péptidos que interactúan con ambos extremos terminales poseen mayor eficacia que aquellos que sólo interactúan con un extremo (N ó C terminal) (4). Posteriormente, se observó que uniendo ambas secuencias peptídicas con un fragmento de naturaleza no peptídica, la actividad del compuesto aumenta más aún (23). Estos compuestos, denominados “molecular tongs” inhiben la dimerización del enzima con constantes de inhibición en el rango nanomolar (35) y, pese a no estar comercializados, son una alternativa prometedora a IP anti HIV convencionales, ya que poseen un distinto mecanismo de acción.

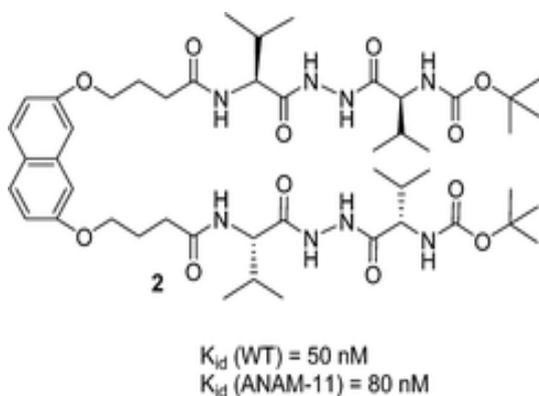


Figura 17: estructura de un “molecular tong”

Peptídicos cíclicos: son moléculas identificadas a partir de librerías de compuestos, cuya actividad se ha demostrado mediante ensayos de expresión de HIVpr en *E.Coli*. (REF) La inhibición de HIVpr por estos compuestos se ha relacionado con su residuo de p-benzoilfenilalanina, el cual interactúa específicamente con Lys14, aminoácido que no se encuentra ni en el centro activo ni en la interfaz de dimerización de la proteasa, de manera que

ejercen su acción de un modo alternativo, presentando concentraciones inhibitorias en el rango micromolar (36).

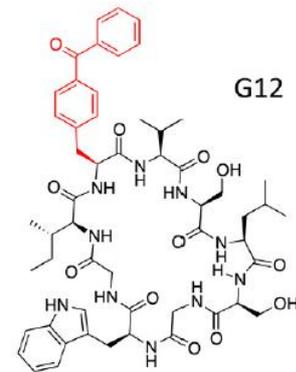


Figura 18: G12, péptido cíclico. $IC_{50} = 0,96 \text{ mM}$

Otros inhibidores

Algunos derivados de bencilpenicilina presentan actividad anti HIVpr, en el rango bajo nanomolar (37). No obstante, presentan problemas farmacocinéticos, ya que tienen una rápida eliminación que ha hecho que se descontinúe su investigación. Otros compuestos activos frente a HIVpr poseen estructura de porfirina (38). No obstante, su utilidad se ha visto cuestionada debido a la presencia de albúmina en sangre, que inhibiría la utilidad de estos compuestos. Estos son ejemplos de un largo número de inhibidores cuya investigación es baja o nula, o bien ha sido discontinuada.

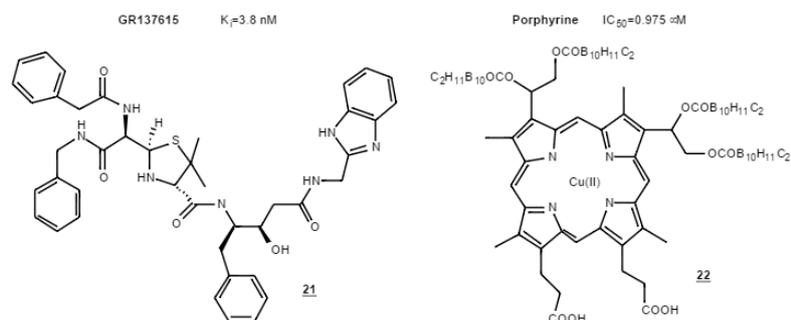


Figura 19: derivado de bencilpenicilina (izquierda); porfirina (derecha)

Desarrollo de inhibidores de la proteasa NS3/4A del VHC

La proteasa NS3/4A. Estructura (39)

La proteasa NS3/4A pertenece a la familia de las serina proteasas. La actividad proteasa reside en NS3, proteína de 631 aminoácidos, que estrictamente desempeña la función proteasa. NS4A es una subunidad activadora de NS3, sin la cual esta reduce su actividad drásticamente. NS3 es una proteína multifuncional, ya que además de poseer actividad proteasa (la cual se encuentra en aproximadamente su primer tercio desde el extremo N terminal), los dos tercios de su secuencia desde el extremo C terminal desempeñan una función helicasa. NS4A interacciona con NS3 en una zona distinta al centro activo, siendo esta interacción mediada principalmente por aminoácidos hidrofóbicos. Otro cofactor importante es el Zinc, que juega un papel estructural en el enzima. Las poliproteínas hidrolizadas por NS3/4A poseen Asp/Glu en P6, y a veces en P5, que interactúan principalmente con residuos cargados positivamente, Arg123, Arg161 y Lys165. También presentan un residuo Ser/Cys en P1, siendo S1 determinado principalmente por Leu135, Phe154, y Ala157. Poseen un residuo Ser/Ala en P'1. Destacan también el residuo Gly 137, que junto con Ser 139 forman la “cavidad del oxianión”. Además, una hélice formada por Arg155, Ala156, Ala157, y Val158 interactúa con algunos IP por enlaces de H en P1 y P3.

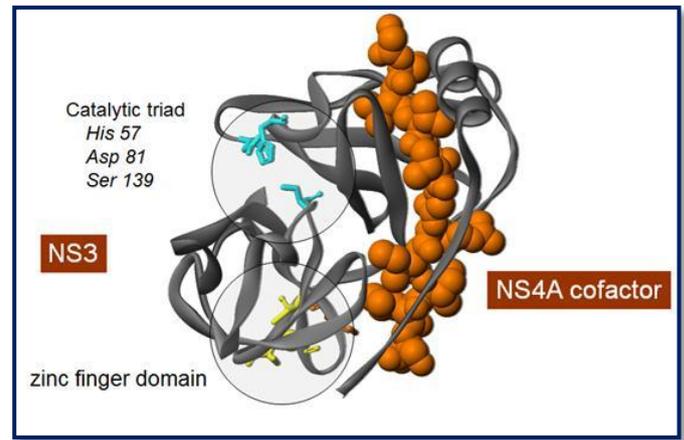


Figura 19: estructura de NS3/4A, en la que se localiza el dominio de unión a zinc y la tríada catalítica

Mecanismo de acción

NS3 presenta una tríada catalítica, formada por los aminoácidos His57, Asp81 y Ser139. Éstos son responsables de la proteólisis. En concreto, el aminoácido Ser139 ataca al carbonilo del enlace peptídico a hidrolizar por un mecanismo S_N2 , y coordinándose con His57 y Asp81, vuelve a quedar en forma libre, produciendo rotura del enlace peptídico, regenerándose a su forma original (40).

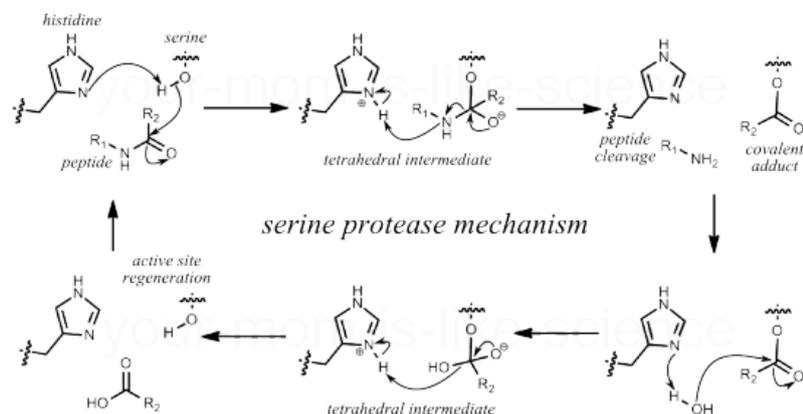


Figura 20: mecanismo de acción de las serina proteasas

Desarrollo de IP

La mayor parte de los IP frente a VHC ejercen su acción en el centro activo del enzima. Existen otro tipo de inhibidores que ejercen su acción en el dominio helicasa de NS3, aunque no son considerados IP (41).

Inhibidores dirigidos al centro activo

Los primeros inhibidores comercializados fueron boceprevir y telaprevir. Estos inhibidores, se basan en la formación de un enlace covalente entre su grupo α -cetoamida, y Ser139, que al disociarse lentamente inutiliza el enzima. Este mecanismo de acción es denominado “trampa de serina” (42). Esto compensa la pérdida de actividad que se produce al eliminar interacciones con S6, ya que tanto un alto Pm como la presencia de grupos carboxilo dificultan la biodisponibilidad de peptidomiméticos (43). Poseedor de estas características, **Boceprevir** (2011, $EC_{50} = 0,52\mu\text{M}$) posee residuos hidrofóbicos de Tert butilo en P3 y P4 y un residuo derivado de Pro en P2. El extremo carboxilo terminal es sustituido por un grupo amida, y en P1 destaca un grupo ciclopropilmetilo. Debido a los sustituyentes presentes en boceprevir, se pone de manifiesto la alta hidrofobicidad del centro activo de NS3/4A (44) (39).

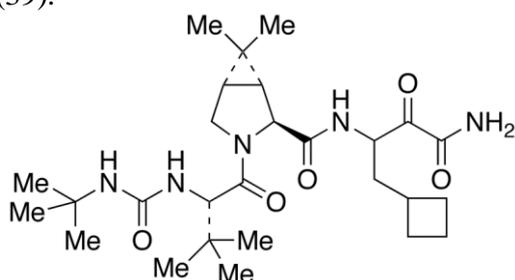


Figura 21: estructura de boceprevir

Otro fármaco, comercializado prácticamente a la vez que boceprevir es

telaprevir (2011, $EC_{50} = 0,06 \mu\text{M}$). Este compuesto, es también un tetrapéptido, en el que existen destacables diferencias. El grupo amino, que sustituye al extremo amino terminal, se encuentra en forma de amida primaria, debido a que está sustituido con un radical ciclopropilo, el cual presenta un mayor número de interacciones hidrofóbicas. En P1, se encuentra un residuo hidrofóbico de propilo, que interactúa en S1, fundamentalmente con Phe154 (45). P2, en lugar de contener un residuo de Pro, contiene un biciclo, el cual aumenta las interacciones hidrofóbicas. P3 es similar que en boceprevir. P4, es un radical ciclohexilo, el cual también establece interacciones hidrofóbicas. Por último, boceprevir posee un grupo de piperazina en P5, resultante de un N-capping del peptidomimético, mediante el cual presenta interacciones adicionales (46).

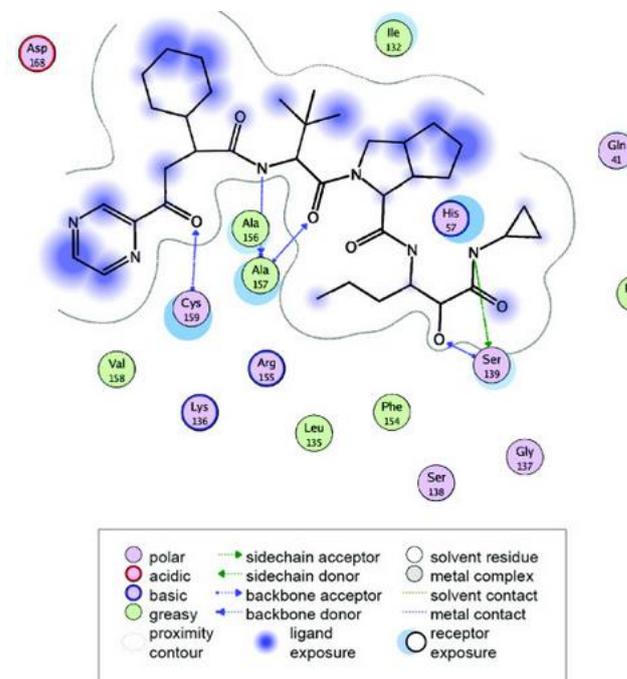


Figura 22: estructura de telaprevir y principales interacciones

Al poseer estos fármacos efectos secundarios, asociados con su grupo α -cetoamida, el cual podría interactuar con proteínas humanas (47), una nueva aproximación estructural al desarrollo de IP fue considerada. La inclusión de

anillos aromáticos unidos a Pro de P2, como la introducción de ácido 1-aminociclopropanocarboxílico (ACCA) en el extremo C terminal, permitieron la reducción del peptidomimético a una longitud de tres residuos (48). De esta manera, este grupo se optimizó a ácido (1R, 2S)-1-amino-2-vinilciclopropanocarboxílico, lo cual produjo un gran aumento de potencia en estos IP (49). Al observarse por estudios de RMN que S3 y S1 se encuentran próximas en su conformación espacial (50), se optimizaron estos compuestos uniendo dichos sustituyentes, formándose peptidomiméticos macrocíclicos como **ciluprevir** ($EC_{50} = 3nM$), el cual presenta una alta potencia inhibitoria en comparación con boceprevir y telaprevir. Sin embargo, este compuesto fue discontinuado en ensayos clínicos de fase II por detectarse cardiotoxicidad en monos rhesus (51).

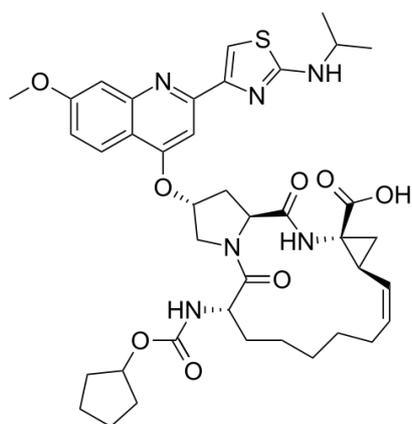


Figura 23: estructura de ciluprevir

Simeprevir (2013, $EC_{50} = 0,06 \mu M$) contiene anillos aromáticos similares a ciluprevir, unidos a un ciclo aromático. P1 y P3 se encuentran unidos, mientras que posterior optimización hizo incluir un grupo ciclopropilsulfonamido, el cual tiene más afinidad por la “cavidad del oxianión”, aumentando la potencia del inhibidor (52). Simeprevir se reduce

presenta un N-capping de P3 de menor tamaño (53).

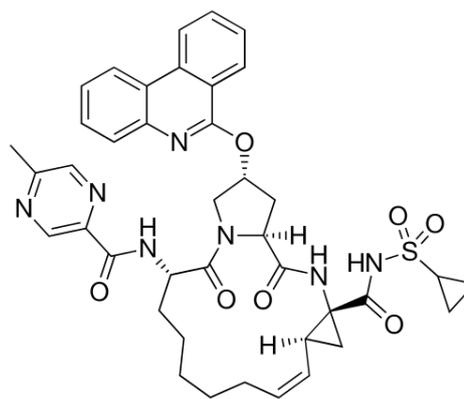


Figura 23: estructura de simeprevir

Paritaprevir (2014, $EC_{50} = 0,06 \mu M$), el más reciente IP comercializado hasta la fecha, posee características comunes con distintos IP. Contiene un residuo ciclopropilsulfonamida, al igual que simeprevir. P2 es un residuo de Pro como en ciluprevir, pero éste posee sustituyentes aromáticos diferentes. Asimismo, P1 y P3 están unidos covalentemente, y éste último posee un N-capping de metilpiperazina (54).

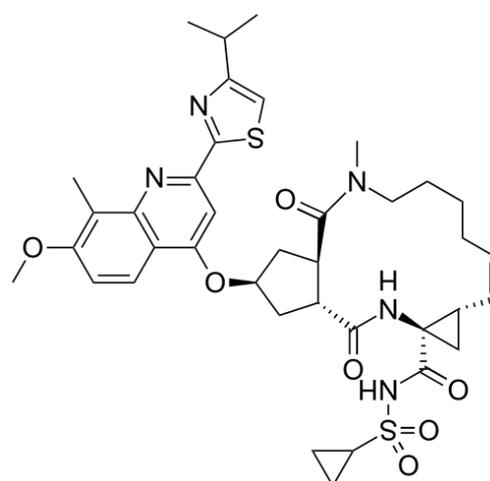


Figura 24: estructura de paritaprevir

Líneas de investigación

Existen una serie de compuestos similares a aquellos dirigidos al centro activo del enzima, que se encuentran actualmente en ensayos clínicos. Danoprevir y vaniprevir, los cuales se encuentran en ensayos clínicos de fase III, presentan características comunes con los últimos IP comercializados de este tipo, como la presencia de ciclopropanosulfonamida, la presencia de un grupo aminociclopropano (modificado) y derivado de Pro aromáticamente sustituidos en P2. Sin embargo, estos péptidos macrocíclicos no poseen restricciones conformacionales debidas a enlaces entre P1 y P3, sino entre el N-capping de P3 y el sustituyente aromático de P2 (55) (56). Otros tipos de compuestos en ensayos clínicos, como grazoprevir, sovaprevir o vedroprevir, poseen estructuras similares, si bien vedroprevir ($EC_{50} = 4nM$), mostrando unas características farmacocinéticas mejoradas (57), posee un sustituyente aromático más extenso en Pro de P2, posee un ácido carboxílico en lugar del grupo ciclopropanosulfonamida.

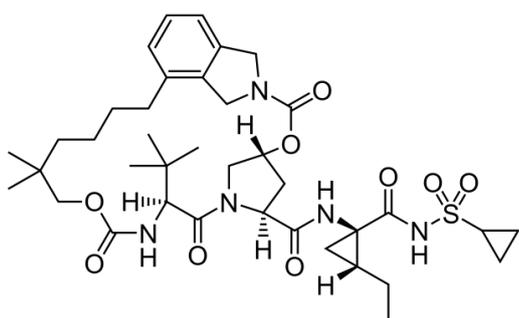


Figura 25: estructura de Vaniprevir ($EC = 4,1 nM$)

Inhibidores con sustituyentes de fenilglicina en P2

Estos inhibidores, contienen fenilglicina en lugar de Pro en P2. Esta, posee generalmente un radical m-vinilo, y, en algunos inhibidores se

encuentra enlazada con sustituyentes en el grupo sulfonamida de P'1. Estos compuestos, poseen K_i en el orden del bajo nanomolar (58).

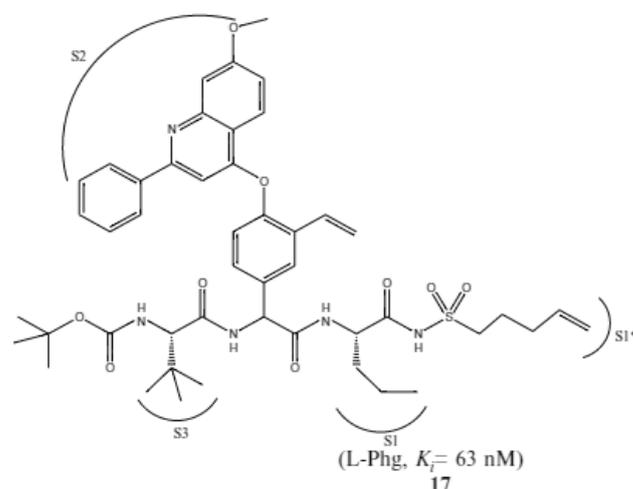


Figura 26: estructura de un inhibidor con m-vinilglicina orto sustituida en P2

Otros inhibidores. Compuestos naturales

El ácido oleanólico es triterpeno ampliamente distribuido en el reino vegetal. Realizando distintas sustituciones en su estructura y evaluando la actividad inhibitoria frente a NS3/4A, se han detectado compuestos con una considerable actividad inhibitoria, especialmente un compuesto de naturaleza dimérica (inhibición en el rango del bajo milimolar) (59) Aunque su mecanismo de inhibición no está bien establecido, pueden ser el punto de partida para desarrollar IP con un diferente perfil de acción y resistencias.

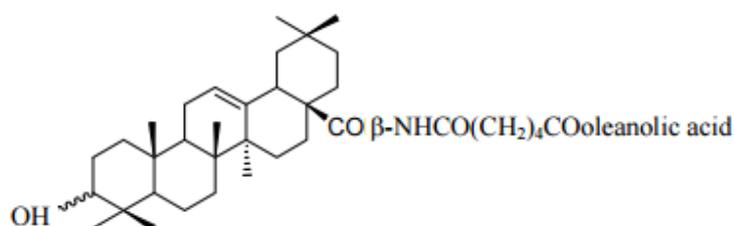


Figura 27: derivado del ácido oleanólico

Conclusiones

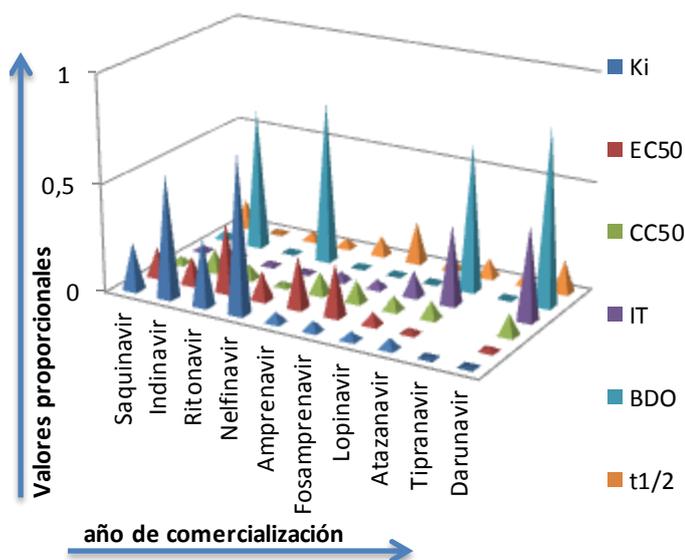


Figura 28: El gráfico muestra cómo con el transcurso del tiempo y la aparición de nuevas generaciones de fármacos, se comprueba cómo se desarrollan fármacos más potentes, solventando los inconvenientes de una baja semivida plasmática, aumentándose la biodisponibilidad oral y aumentando el perfil de seguridad del medicamento al poseer ventanas terapéuticas más amplias

La optimización de la estructura de IP busca en efecto resolver los problemas farmacodinámicos, farmacocinéticos, toxicológicos y relacionados con la aparición de resistencias. La correcta optimización de la estructura de IP tiene como consecuencia un aumento de actividad, eficacia y biodisponibilidad a la par que disminuyen las concentraciones citotóxicas, aumentando el índice terapéutico. Para ello, se han descrito diversas modificaciones químicas, entre otras: nuevas interacciones enzima-sustrato, uso de bioisómeros, restricción conformacional, limitación de interacciones aminoácidos necesarios para la actividad enzimática, reducción del peso molecular,

modificación a profármacos. La búsqueda de estructuras que interactúen fundamentalmente con residuos esenciales para la actividad de la proteasa tiene como consecuencia la menor aparición de resistencias, debido a la pérdida de actividad inherente a las posibles mutaciones. El desarrollo de atazanavir pone de manifiesto la presencia de grupos funcionales “inocuos” (su radical fenilpiridilo en P1 se ha relacionado con la no aparición de dislipidemia en tratamientos con atazanavir (60) (61)). El estudio de la inclusión de grupos funcionales similares en nuevos fármacos, puede reducir la aparición de efectos secundarios. Por otro lado, frente a cepas MDR, el desarrollo de IP efectivos que no presenten interacciones con residuos responsables de principales resistencias es un planteamiento adecuado. Otra línea importante de actuación es desarrollar moléculas que, presentando actividad inhibitoria, ejerzan su acción en un lugar de la proteasa distinto a los IP convencionales. No debe nunca olvidarse la consideración de que normalmente los IP comercializados se utilizan en terapia combinada con otros antivirales, de manera que el beneficio terapéutico abarca a todos los fármacos que se utilizan simultáneamente. El desarrollo de IP ha hecho posible reducir costes e investigación en el desarrollo de otros IP dirigidos a proteasas similares, como la del HTLV-1 (11). Por último, el desarrollo de nuevos IP frente al HCV podría incrementar el éxito de la terapia frente a ciertos genotipos del virus, al igual que la nueva generación de IP ha desplazado a boceprevir y telaprevir. Los ejemplos descritos en distintas líneas de investigación, ponen de manifiesto el amplio y potencial campo de los IP.

Bibliografía

1. López-Otín C, Bond JS. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *J Biol Chem*. 2008 Nov 7;283(45):30433-7.
2. Chakraborti S, Dhalla NS. Proteases in Health and Disease - Advances in Biochemistry in Health and Disease. New York, US. Springer, 2013. 403p
3. Anderson J, Schiffer CA, Lee SK, and Swanstrom RI [Internet]. "Viral protease inhibitors" Handbook of experimental pharmacology. 2009; 189 [citado el 14 de Jun. de 2015]

disponible en: http://works.bepress.com/celia_schiffer/7
4. Lebon F, Ledeq M. Approaches to the Design of Effective HIV-1 Protease Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* 2000;7:455-477.
5. de la Nuez A, Rodríguez R. Current methodology for the assessment of ADME-Tox properties on drug candidate molecules. *Biotecnología Aplicada*. 2008;25:97-110
6. Roy S, Maréchal E, Lafanèchere L. Chemogenomics and Chemical Genetics. Springer; c2011. capítulo 5, Measuring Bioactivity: KI, IC50 and EC50 selección de la muestra: 55-65.
7. PharmaInformatic [Internet]. Emden, Alemania: oral bioavailability [citado el 14 de Jun. de 2015]. Disponible desde http://www.pharmainformatic.com/html/oral_bioavailability_f.html.
8. Universidad autónoma de Madrid. Facultad de Medicina [Internet]. Madrid, España: Bases farmacocinéticas para el diseño de una pauta terapéutica [citado el 14 de Jun. de 2015]. Disponible desde: https://www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/Enfermeria/Enf_T7.pdf.
9. Food and Drug Administration [Internet]. MD, US: Guidance for Industry Antiviral Product Development — Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency. [citado el 14 de Jun. de 2015] Disponible desde: <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/05d-0183-gdl0002-01.pdf>
10. Richards AD, Roberts R, Dunn BM, Graves MC, Kay J et al. Effective blocking of HIV-1 proteinase activity by characteristic inhibitors of aspartic proteinases. *FEBS Lett*. 1989 Apr 10;247(1):113-7.
11. Gustchina A, Jaskólski M, Wlodawer A. Lessons learned fighting HIV can be applied to anti-cancer drug design. *Cell Cycle*. 2006 Mar;5(5):463-4.
12. Chang MW, Ayeni C, Breuer S, Torbett BE. Virtual Screening for HIV Protease Inhibitors: A Comparison of AutoDock 4 and Vina. *PLoS One*. 2010 Aug 4;5(8):e11955.
13. Edx courses. Davidson [internet]. Medicinal Chemistry: The Molecular Basis of Drug Discovery [citado el 14 de Jun. de 2015] disponible desde: <https://www.edx.org/course/medicinal-chemistry-molecular-basis-drug-davidsonx-d001x>
14. Heal JW, Jimenez-Roldan JE, Wells SA, Freedman RB, Römer RA. Inhibition of HIV-1 protease: the rigidity perspective. *Bioinformatics*. 2012 Feb 1;28(3):350-7.
15. Brik A, Wong CH. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Org. Biomol. Chem*. 2003; 1(9):5-14
16. Adamson CS. Protease-Mediated Maturation of HIV: Inhibitors of Protease and the Maturation Process. *Mol Biol Int*. 2012; 2012: 604261.
17. Shao W, Everitt L, Manchester L, Loeb DD, Hutchison CA and Swanstrom R. Sequence requirements of the HIV-1 protease flap region determined by saturation mutagenesis and kinetic analysis of flap mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 18; 94(6): 2243–2248.
18. Alterman M. Design and Synthesis of HIV-1 Protease Inhibitors [Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy (Faculty of Pharmacy) in Organic Pharmaceutical Chemistry]. Uppsala, Sweden: Lindbergs Grafiska HB; 2001.

[citado el 14 de Jun. de 2015] Disponible desde: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:166067/FULLTEXT01.pdf>

19. Stromgaard K, Krogsgaard-Larsen P, Madsen U. Textbook of Drug Design and Discovery, Fourth Edition. NW, USA. CRC Press; c2009.
20. Kaldor S, Kalish VJ, Davies JF, Shetty BV, Fritz JE, Appelt K et al. Viracept (nelfinavir mesylate, AG1343): a potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease. *J Med Chem*. 1997 Nov 21;40(24):3979-85.
21. Mahalingam B, Wang YF, Boross PI, Tozser J, Louis JM, Harrison RW et al. Crystal structures of HIV protease V82A and L90M mutants reveal changes in the indinavir binding site. *Eur J Biochem*. 2004 Apr;271(8):1516-24.
22. HIV-drug interactions. University of Liverpool [Internet]. Liverpool UK: Indinavir PK fact sheet. [citado el 14 de Jun. de 2015]. Disponible desde: http://www.hiv-druginteractions.org/data/FactSheetImages/FactSheet_DrugID_123.pdf
23. Pokorná J, Machala L, Řezáčová P, a Konvalinka J. Current and Novel Inhibitors of HIV Protease. *Viruses*. 2009 Dec; 1(3): 1209–1239.
24. Sham HL, Kempf DJ, Molla A, Marsh KC, Kumar GN, Chen CM et al. ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Dec;42(12):3218-24.
25. Wlodawer A. Rational approach to AIDS drug design through structural biology. *Annu Rev Med*. 2002;53:595-614.
26. Arvieux C, Tribut O. Amprenavir or fosamprenavir plus ritonavir in HIV infection: pharmacology, efficacy and tolerability profile. *Drugs*. 2005;65(5):633-59.
27. Klei HE, Kish K, Lin PF, Guo Q, Friberg J, Rose RE et al. X-Ray Crystal Structures of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Mutants Complexed with Atazanavir. *J Virol*. 2007 Sep;81(17):9525-35.
28. Muzammil S, Armstrong AA, Kang LW, Jakalian A, Bonneau PR, Schmelmer V et al. Unique Thermodynamic Response of Tipranavir to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Drug Resistance Mutations. *J Virol*. 2007 May;81(10):5144-54.
29. Koh Y, Nakata H, Maeda K, Ogata H, Bilcer G, Mudram DT et al. Novel bis-Tetrahydrofuranylurethane-Containing Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) UIC-94017 (TMC114) with Potent Activity against Multi-PI-Resistant Human Immunodeficiency Virus In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Oct; 47(10): 3123–3129.
30. Gago F, Fatima F. HIV Protease Inhibition: Limited Recent Progress and Advances in Understanding Current Pitfalls Pitfalls. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2004; 4:671-686.
31. Ghosh AK, Xu CX, Rao KV, Baldrige A, Agniswamy J, Wang YF et al. Probing multidrug-resistance/protein-ligand interaction with oxatricyclic designed ligands in HIV-1 Protease inhibitors. *ChemMedChem*. 2010 November 8; 5(11): 1850–1854.
32. Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Steffey MP, Walters DE, Koh Y et al. Design and Synthesis of Potent HIV-1 Protease Inhibitors. *Med Chem*. 2011 January 27; 54(2): 622–634.
33. Ghosh AK, Chapsal BD, Steffey M, Agniswamy J, Wang YF, Amano M et al. Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydrofuranyl urethanes: Design, synthesis, and X-ray studies of potent HIV-1 protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 March 15; 22(6): 2308–2311.
34. Callebaut C, Stray K, Tsai L, Williams M, Yang ZY, Cannizzaro C et al. In Vitro Characterization of GS-8374, a Novel Phosphonate-Containing Inhibitor of HIV-1 Protease with a Favorable Resistance Profile. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Apr;55(4):1366-76.
35. Lee SG, Chmielewski L. Crosslinked Peptoid-Based Dimerization Inhibitors of HIV-1 Protease. *Chembiochem*. 2010 July 26; 11(11): 1513–1516.
36. Young TS, Young DD, Ahmad I, Louis JM, Benkovic SJ, and Schultz PG, Evolution of cyclic peptide protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 5; 108(27): 11052–11056.
37. Kitchin J, Bethell RC, Cammack N, Dolan S, Evans DN, Holman S et al. Synthesis and structure-activity relationships of a series of penicillin-derived HIV proteinase inhibitors: heterocyclic ring systems containing P1' and P2' substituents. *Med Chem*. 1994 Oct 28;37(22):3707-16.
38. Kubat P, Lang K, Cígler P, Kozísek M, Matejíček P, Janda P et al. Tetraphenylporphyrin-cobalt(III) bis(1,2-dicarbollide) conjugates: from the solution characteristics to inhibition of HIV protease. *J Phys Chem B*. 2007 May 3;111(17):4539-46.
39. Tan SL. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. Norfolk, UK. Horizon Bioscience; c2006.

40. Dodson G, Wlodawer A. Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem Sci.* 1998 Sep;23(9):347-52.
41. Salam KA, Akimitsu N. Hepatitis C Virus NS3 Inhibitors: Current and Future perspectives. *Biomed Res Int.* 2013;2013:467869.
42. Mehdi S. Synthetic and Naturally Occurring Protease Inhibitors Containing an Electrophilic Carbonyl Group. *Bioorg. Chem.* 1993 Sept; 21(3), 249–259.
43. Smith DA. *Metabolism, Pharmacokinetics, and Toxicity of Functional Groups: Impact of functional groups.* Cambridge, UK. Royal Society of Chemistry, 2010.
44. Zeuzem S, Sarrazin C, Rouzier R et al. Antiviral activity of SCH 503034, A HCV protease inhibitor, administered as monotherapy in hepatitis C genotype-1 (HCV-1) patients refractory to pegylated interferon (PEG-IFN-alpha) *Hepatology.* 2005;42:233A–234A.
45. Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, et al. Crystal Structure of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Domain Complexed with a Synthetic NS4A Cofactor peptide. *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):343-55.
46. Lin C, Kwong AD, Perni RB. Discovery and development of VX-950, a novel, covalent and reversible inhibitor of hepatitis C virus NS3/4A serine protease. *Infect Disord Drug Targets.* 2006 Mar;6(1):3-16.
47. Leung D, Abbenante G, Fairlie DP. Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects. *J Med Chem.* 2000 Feb 10;43(3):305-41.
48. Llinàs-Brunet M, Bailey MD, Ghio E, Gorys V, Halmos T, Poirier M et al. A Systematic Approach to the Optimization of Substrate-Based Inhibitors of the Hepatitis C Virus NS3 Protease: Discovery of Potent and Specific Tripeptide. *J Med Chem.* 2004 Dec 16;47(26):6584-94.
49. Rancourt J, Cameron DR, Gorys V, Lamarre D, Poirier M, Thibeault D. Peptide-Based Inhibitors of the Hepatitis C Virus NS3 Protease: Structure-Activity Relationship at the C-Terminal Position. *J Med Chem.* 2004 May 6;47(10):2511-22.
50. LaPlante SR, Cameron DR, Aubry N, Lefebvre S, Kukolj G, Maurice R et al. Solution Structure of Substrate-Based Ligands When Bound to Hepatitis C Virus NS3 Protease Domain. *J Biol Chem.* 1999 Jun 25;274(26):18618-24.
51. Reiser M, Hinrichsen H, Benhamou Y, Reesink HW, Wedemeyer H, Avendano C et al. Antiviral Efficacy of NS3-Serine Protease Inhibitor BILN-2061 in Patients with Chronic Genotype 2 and 3 Hepatitis C. Reiser, M., y otros, y otros. *Hepatology.* 2005 Apr;41(4):832-5.
52. Johansson A, Poliakov A, Akerblom E, Wiklund K, Lindeberg G, Winiwarter S. Acyl Sulfonamides as Potent Protease Inhibitors of the Hepatitis C Virus Full-Length NS3 (Protease-Helicase/NTPase): A Comparative Study of Different C-Terminals. *Bioorg Med Chem.* 2003 Jun 12;11(12):2551-68.
53. Rosenquist Å, Samuelsson B, Johansson PO, Cummings MD, Lenz O, Raboisson P et al. Discovery and Development of Simeprevir (TMC435) a HCV NS3/4A Protease Inhibitor. *J Med Chem.* 2014 Mar 13;57(5):1673-93.
54. Carrion AF, Gutierrez J, Martin P. New antiviral agents for the treatment of hepatitis C: ABT-450. *Expert Opin Pharmacother.* 2014 Apr;15(5):711-6.
55. Seiwert SD, Andrews SW, Jiang Y, Serebryany V, Tan H, Kossen K et al. Preclinical characteristics of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor ITMN-191 (R7227). *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Dec;52(12):4432-41.
56. McCauley JA, McIntyre CJ, Rudd MT, Nguyen KT, Romano JJ, Butcher JW, et al. Discovery of vaniprevir (MK-7009), a macrocyclic hepatitis C virus NS3/4a protease inhibitor. *J Med Chem.* 2010 Mar 25;53(6):2443-63.
57. Yang H, Robinson M, Corsa AC, Peng B, Cheng G, Tian Y. Preclinical characterization of the novel hepatitis C virus NS3 protease inhibitor GS-9451. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):647-53.58.
59. Ma CM, Wu XH, Masao H, Wang XJ, Kano Y. HCV protease inhibitory, cytotoxic and apoptosis-inducing effects of oleanolic acid derivatives. *J Pharm Pharm Sci.* 2009;12(3):243-8.
60. Yan Q, Hruz PW. Direct comparison of the acute in vivo effects of HIV protease inhibitors on peripheral glucose disposal. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;40(4):398–403.
61. Hruz PW, Yan Q, Tsai L, Koster J, Xu L, Cihlar T. GS-8374, a novel HIV protease inhibitor does not alter glucose homeostasis in cultured adipocytes or in a healthy-rodent model system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 55(4):1377–1382.