

Tesis Doctoral

DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTRUCTURA DE DOMINIOS  
HELICOIDALES  
INFLUENCIA DE LA INTRODUCCIÓN DE AMINOÁCIDOS D

Carmen Giovana Granados Ramírez



Departamento de Química Orgánica  
Facultad de Química  
Universidad de Barcelona  
Barcelona, 2007

**CAPÍTULO 1**  
*Diseño, síntesis y caracterización de inhibidores de la fusión de VIH-1  
análogos del péptido C34 de gp41 con aminoácidos D*



# 1. Diseño, síntesis y caracterización de inhibidores de la fusión de VIH-1 análogos del péptido C34 de gp41 con aminoácidos D

## 1.1. Introducción

La infección por VIH es una infección causada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) que paulatinamente es capaz de causar la destrucción del sistema inmune, permitiendo que otras infecciones oportunistas o diferentes tipos de cáncer ataquen al organismo<sup>1,2</sup>, a esta última etapa se denomina síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA. El VIH es un retrovirus compuesto de un genoma de ARN y una transcriptasa inversa que usa el ARN viral como molde para hacer ADN complementario que puede integrarse al del organismo huésped. VIH es una enfermedad que está expandiéndose a grandes pasos sin que hasta ahora exista una vacuna o tratamiento definitivo. De acuerdo con UNAIDS/WHO (del inglés, The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS / World Health Organization) 39.5 millones de personas estaban conviviendo con VIH y 2.9 millones de personas murieron a causa de SIDA o enfermedades asociadas en el 2006<sup>3</sup>.

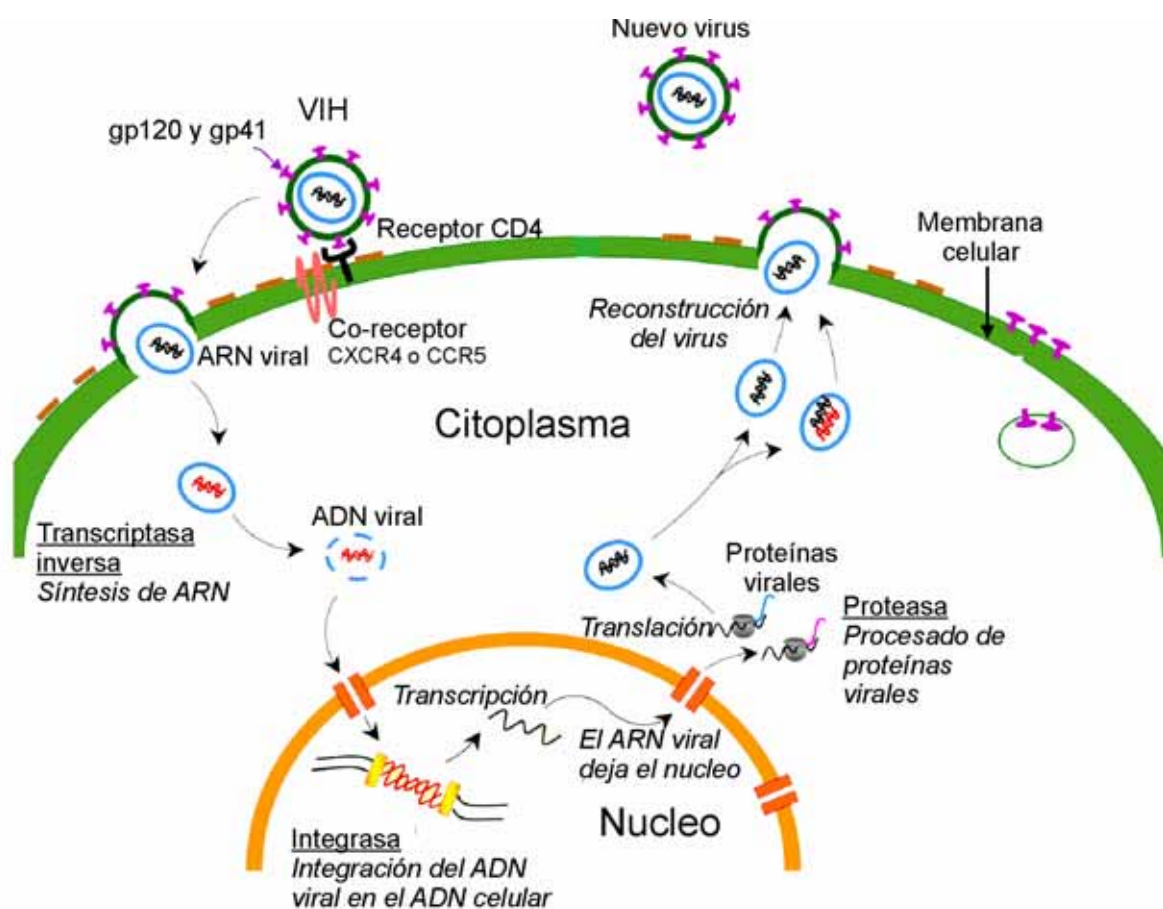
Este virus sólo puede replicarse cuando está dentro de una célula diana, los linfocitos T CD4+ de la sangre. Las proteínas de la cubierta del virus reconocen el receptor CD4 y los co-receptores CXCR4 y CCR5, las cuales son proteínas de la membrana de la célula huésped. Una vez el virus entra en la célula este se despoja de las proteínas de la cubierta y la cápside y libera el material genético con las enzimas que contiene. Para entender cómo funcionan los medicamentos anti-VIH, es útil conocer el ciclo de vida del virus. El proceso infeccioso está marcado por las siguientes etapas (**Figura 1**):

- Circulación del virus en los fluidos internos.
- Unión: al receptor de membrana de los linfocitos CD4.
- Internalización: por fusión a la membrana de la célula infectada.
- Transcripción inversa: copiado del ARN por la transcriptasa inversa a ADN. En este punto esta enzima actúa como una ADN polimerasa dependiente de ARN.
- Integración: El ARN es degradado por la ARNasa H codificada por el virus. Ahora la transcriptasa inversa actúa como una polimerasa dependiente del ADN y copia una doble hebra de ADN. Esto es denominado pro virus.
- Transcripción: La doble hebra de ADN es integrada dentro del ADN de la célula huésped usando la enzima integrasa. El ADN viral es copiado junto con el ADN

celular. El ARN genómico es copiado y procesado a partir del ADN integrado por las enzimas de la célula.

- Síntesis de proteínas virales, las cuales se denominan poli-proteínas. Las poli-proteínas son fragmentadas en pequeñas piezas antes de crear un nuevo virus. Este procesamiento es realizado por la proteasa viral.
- Ensamblaje: Las nuevas proteínas son ensambladas en nueva partículas virales.
- Liberación de nuevas partículas virales: Las nuevas partículas virales salen de la célula para infectar nuevos blancos.

Figura 1. Ciclo de replicación del VIH



### 1.1.1. Tipos de medicamentos anti-VIH

Los medicamentos en el mercado están dirigidos a puntos específicos del ciclo viral<sup>4</sup>, como son (Tabla 1):

### **1.1.1.1. Inhibidores de la transcriptasa inversa**

Estos medicamentos interfieren en la acción de la transcriptasa inversa del VIH-1 previniendo que el material genético del virus sea usado para generar nuevos virus. Actualmente, hay dos tipos de inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos y los no nucleósidos.

Análogos de nucleósidos: AZT (Retrovir), ddl (Videx), ddC (Hivid), 3TC (Epivir), d4T (Zerit). Algunas veces son llamados inhibidores nucleósidos de transcriptasa inversa (nucleoside reverse transcriptase inhibitors, o NRTI). Estos imitan nucleótidos presentes en material genético. La transcriptasa inversa convierte el ARN del VIH en ADN, construyendo una nueva cadena de nucleótidos, esta es inhibida por nucleósidos análogos que finalicen anticipadamente la síntesis de la cadena. Por ejemplo, los análogos de la timina, AZT y d4T. La efectividad de este tratamiento requiere la combinación paralela de diferentes fármacos que análogo de los diferentes nucleotidos.

Análogos no nucleósidos: (Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, o NNRTI). Estos compuestos interfieren también en la acción de la transcriptasa inversa, pero el mecanismo de inhibición es diferente. Estos se unen a la enzima y bloquean su acción catalítica. Algunos de estos medicamentos son nevirapine (Viramune), delavirdine (Rescriptor) y efavirenz (Sustiva, DMP-266).

### **1.1.1.2. Inhibidores de la integrasa**

Los inhibidores de la integrasa interfieren en la acción de la enzima y previenen la inserción del ADN viral en el material genético del núcleo de la célula infectada. Actualmente no hay inhibidores de integrasa aceptados<sup>5</sup>. Sin embargo, los fármacos MK-0518 (raltegravir) y GS-9137 están en proceso de estudio.

### **1.1.1.3. Inhibidores de la proteasa viral**

Los medicamentos inhibidores de la proteasa interfieren el procesamiento de las poliproteínas (cadenas largas de proteínas) del VIH, antes de que se conviertan en proteínas funcionales. Cuando los inhibidores de proteasa actúan, la enzima no trabaja apropiadamente, y se producen partículas de VIH vacías, que no pueden infectar otras células sanas. Los inhibidores de proteasa disponibles son saquinavir (Fortovase o Invirase),

indinavir (Crixivan), ritonavir (Norvir) y nelfinavir (Viracept).

#### **1.1.1.4. Inhibidores de la entrada del virus**

Estos inhibidores son antagonistas del co-receptores de quimiocinas (CCR5 y CXCR4) que junto con el receptor CD4 están involucrados en el proceso de entrada del virus dentro del linfocito<sup>6</sup>.

#### **1.1.1.5. Inhibidores de fusión**

Los inhibidores de fusión evitan la infección de VIH inhibiendo la unión o fusión con la célula diana. La glicoproteína 41 de VIH, o gp 41, la subunidad transmembranal de la cubierta (Env) ha emergido recientemente como una diana viable en la búsqueda de inhibidores de la fusión. Si el virus no puede entrar en la célula, este no puede replicarse y causar la enfermedad. Actualmente sólo el péptido T-20 (Fuzeon, enfuvirtide) está aprobado para ser usado en humanos<sup>7</sup>.

#### **1.1.1.6. Combinación de medicamentos**

La combinación de medicamentos permite atacar la infección por VIH en más de un punto del ciclo de vida viral. El virus puede mutar y en este proceso se generan cepas resistentes a fármacos específicos. El uso de diferentes fármacos obliga al virus a mutar más, este fenómeno hace que se creen variantes tan mutadas, que pueden llegar a debilitarse o llegar a ser incapaces de funcionar. Al mismo tiempo, el ataque de diferentes etapas del desarrollo viral permite disminuir la probabilidad de infección de otras células. Estas dos acciones permiten aumentar la probabilidad de disminuir el avance de la enfermedad.

### **1.1.2. Entrada y fusión del virus**

La estructura del virus posee una cubierta exterior (env) cuya composición en gran parte se compone de membrana plasmática de la célula diana. La fusión es promovida por un complejo de glicoproteínas localizadas en la cubierta viral, que es codificada por el material genético del virus y producidas por la célula infectada como la poli-proteína precursora gp160<sup>8</sup>. Esta proteína es procesada para dar lugar a dos subunidades que permanecen

asociadas en trímeros de forma no covalente, una unidad superficial o gp120 y una unidad transmembranal o gp 41 (Figura 2). Sólo un trímero del complejo gp120/gp41 es suficiente para que el virus pueda entrar en la célula<sup>9</sup>. La unidad superficial gp120 es la responsable de reconocer y unirse al receptor de membrana de la célula diana CD4 y co-receptores. Después del reconocimiento de la célula diana, gp41 sufre un cambio conformacional que produce el acercamiento de las membranas viral y del célula T<sup>10-12</sup>.

**Tabla 1. Medicamentos usados en el tratamiento de infección por VIH aprobados por la FDA<sup>a</sup>.**

Nombre	Otros nombres	Laboratorio	Fecha de aprobación
<b>Medicamentos combinados de diferentes clases</b>			
Atripla	efavirenz, emtricitabine, tenofovir disoproxil fumarato	Bristol-Myers Squibb y Gilead Sciences	12-7-2006
<b>Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (NRTIs)</b>			
Combivir	lamivudine y zidovudine	GlaxoSmithKline	27-9-1997
Emtriva	emtricitabine, FTC	Gilead Sciences	2-7-2003
Epivir	lamivudine, 3TC	GlaxoSmithKline	17-11-1995
Epzicom	abacavir y lamivudine	GlaxoSmithKline	2-8-2004
Hivid	zalcitabine, dideoxycytidine, ddC	Hoffmann-La Roche	19-6-1992
Retrovir	zidovudine, azidothymidine, AZT, ZDV	GlaxoSmithKline	19-3-1987
Trizivir	abacavir, zidovudine, lamivudine	GlaxoSmithKline	14-11-2000
Truvada	tenofovir disoproxil fumarato, emtricitabine	Gilead Sciences, Inc.	2-8-2004
Videx EC	enteric coated didanosine, ddl EC	Bristol Myers-Squibb	31-10-2000
Videx	didanosine, dideoxyinosine, ddl	Bristol Myers-Squibb	9-10-1991
Viread	tenofovir disoproxil fumarato, TDF	Gilead	26-10-2001
Zerit	stavudine, d4T	Bristol Myers-Squibb	24-6-1994
Ziagen	sulfato de abacavir, ABC	GlaxoSmithKline	17-12-1998
<b>Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTIs)</b>			
Rescriptor	delavirdine, DLV	Pfizer	4-4-1997
Sustiva	efavirenz, EFV	Bristol Myers-Squibb	17-9-1998
Viramune	nevirapine, NVP	Boehringer Ingelheim	21-6-1996
<b>Inhibidores de protease (PIs)</b>			
Agenerase	amprenavir, APV	GlaxoSmithKline	15-4-1999

<sup>a</sup> Esta tabla continúa en la siguiente página.



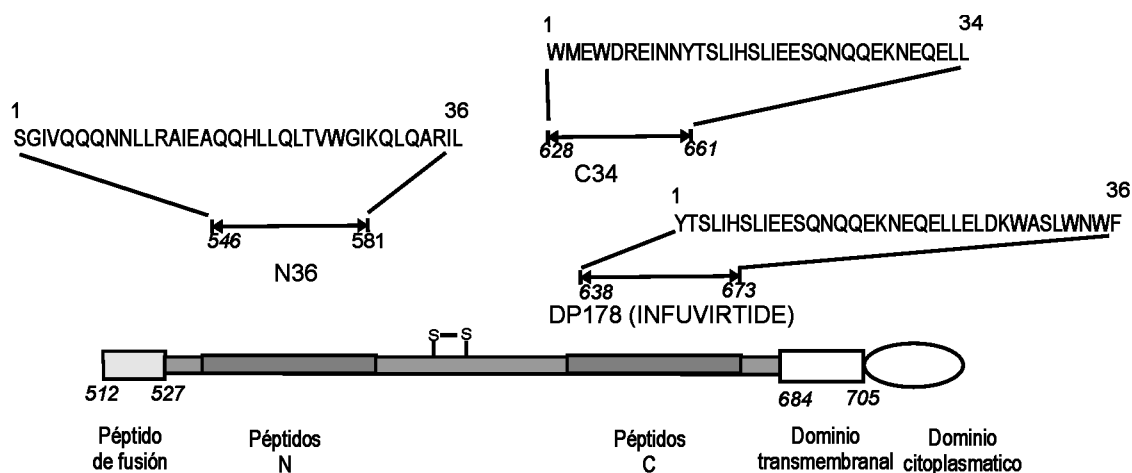
Aptivus	tipranavir, TPV	Boehringer Ingelheim	22-6-2005
Crixivan	indinavir, IDV,	Merck	13-3-1996
Fortovase	saquinavir (se retiro del mercado)	Hoffmann-La Roche	7-11-1997
Invirase	saquinavir mesylate, SQV	Hoffmann-La Roche	6-12-1995
Kaletra	Lopinavir, ritonavir, LPV/RTV	Abbott Laboratories	15-9-2000
Lexiva	Fosamprenavir, FOS-APV	GlaxoSmithKline	20-10-2003
Norvir	ritonavir, RTV	Abbott Laboratories	1-3-1996
Prezista	darunavir	Tibotec, Inc.	23-6-2006
Reyataz	sulfato de atazanavir, ATV	Bristol-Myers Squibb	20-6-2003
Viracept	mesilato de nelfinavir, NFV	Agouron Pharmaceuticals	14-3-1997
<b>Inhibidores de la fusión</b>			
Fuzeon	enfuvirtide, T-20	Hoffmann-La Roche & Trimeris	13-3-2003
<b>Inhibidores de la entrada-antagonistas del co-receptor CCR5</b>			
Selzentry	maraviroc	Pfizer	6-8-2007

La entrada del virus a la célula T requiere del reconocimiento del receptor CD4 y de un co-receptor<sup>13,14</sup>. La interacción de gp120 con CD4 genera un cambio conformacional que expone el sitio de unión al co-receptor. Estos cambios hacen a gp120 susceptible a la acción de enzimas de la superficie celular que rompen enlaces disulfuro (disulfuro isómeras, PDI), aumentando el reconocimiento entre gp120 y los co-receptores<sup>15</sup>. Se han identificado dos de estos co-receptores, CCR5 y CXCR4<sup>b</sup>, los cuales son receptores de quimiocinas de linfocitos T y macrófagos<sup>c</sup>. Después de la interacción de gp120 con el receptor de quimiocinas, se produce un cambio conformacional entre el complejo gp120-gp41, que reestructura la gp41 acercando los extremos N-terminal (NHR) y C-terminal (CHR) de la proteína. Esto permite al virus unirse a la membrana celular y de esta forma liberar la cápside viral en el citoplasma de la célula diana<sup>16</sup>.

<sup>b</sup> CXCR4, receptor de quimiocina 4; CCR5, receptor de quimiocina 5.

<sup>c</sup> Las quimiocinas son moléculas de bajo peso molecular que hacen parte de la respuesta inmune (8-14 kDa), que tienen la capacidad de modular la actividad funcional de células individuales y de tejidos, muchas de ellas poseen propiedades quimioatrayentes, regulando el trasvase de leucocitos hacia órganos y tejidos. Estas moléculas tienen estructuralmente en común la conservación de cuatro residuos de cisteína que se unen formando dos puentes disulfuro, fundamentales para la actividad de la molécula. Las quimiocinas se han clasificado en dos grupos, CXC (Cys-X-Cys) y CC (Cys-Cys), dependiendo de si los residuos de cisteína están separados por otro aminoácido o

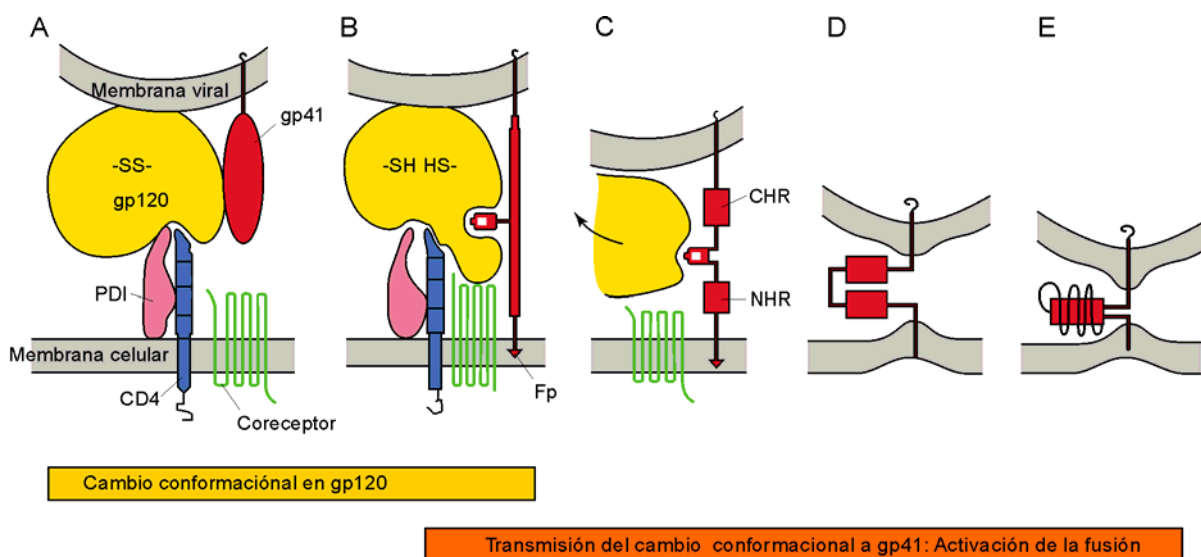
Figura 2. Esquema de los gp41 de VIH-1 indicando las regiones en donde se encuentran los péptidos que interaccionan para formar el núcleo hidrofóbico. Se muestran las regiones que son funcionalmente importantes: el péptido de fusión, un enlace disulfuro, el dominio transmembranal y el dominio citoplasmático. La numeración en cursiva indica la posición de la proteína precursora de gp41, la gp160, y los números en la parte superior de cada secuencia indican la numeración de cada uno de los péptidos<sup>17</sup>.



Posición*	Secuencia
512	AVGIGALFL GFLGAAGSTM GAASMTLTVQ ARQLLSGIVO QONNLLRAIE AQOHLLOLTV
	N36
571	WGIKOLOARI LAVERYLKDQ QLLGIWGCSSG KLICTTAVPW NASWSNKSLE QIWNHTTWME
631	WDREINNYTS LIHSLIEESQ NQOEKNEQEL LELDKWASLW NWFNITNWLW YIKLFIMIVG
	C34
691	GLVGLRIVFA VLSIVNRVRQ GYSPLSFQTH LPTPRGPDRP EGIEEEGGER DRDRSIRLVN
751	GSLALIWDDL RSLCLFSYHR LRDLLLVTR IVELLGRRGW EALKYWWNLL QYWSQELKNS
811	LLAVSLLNAT AIAVAEGTDR VIEVVQGACR AIRHIPRRIR OGLERI

El cambio conformacional que sucede en el complejo gp120-gp41 después de la interacción con los receptores de la célula diana es el paso anterior a la internalización del VIH<sup>18</sup>. El modelo propuesto considera que el cambio entre la estructura nativa y la estructura fisiológica ocurre secuencialmente. En primer lugar, se da una migración del péptido de fusión de gp41 hacia la membrana de la diana, este paso corresponde a la formación de una estructura intermedia, denominada prehorquilla (preharpin), la cual es un estado intermedio después de la unión al receptor celular y antes de la formación del haz de seis hélices. Posteriormente, la proteína se pliega sobre sí misma, dando lugar a la formación de la estructura fisiológica de gp41, la cual termina en el acercamiento entre las dos membranas (Figura 3).

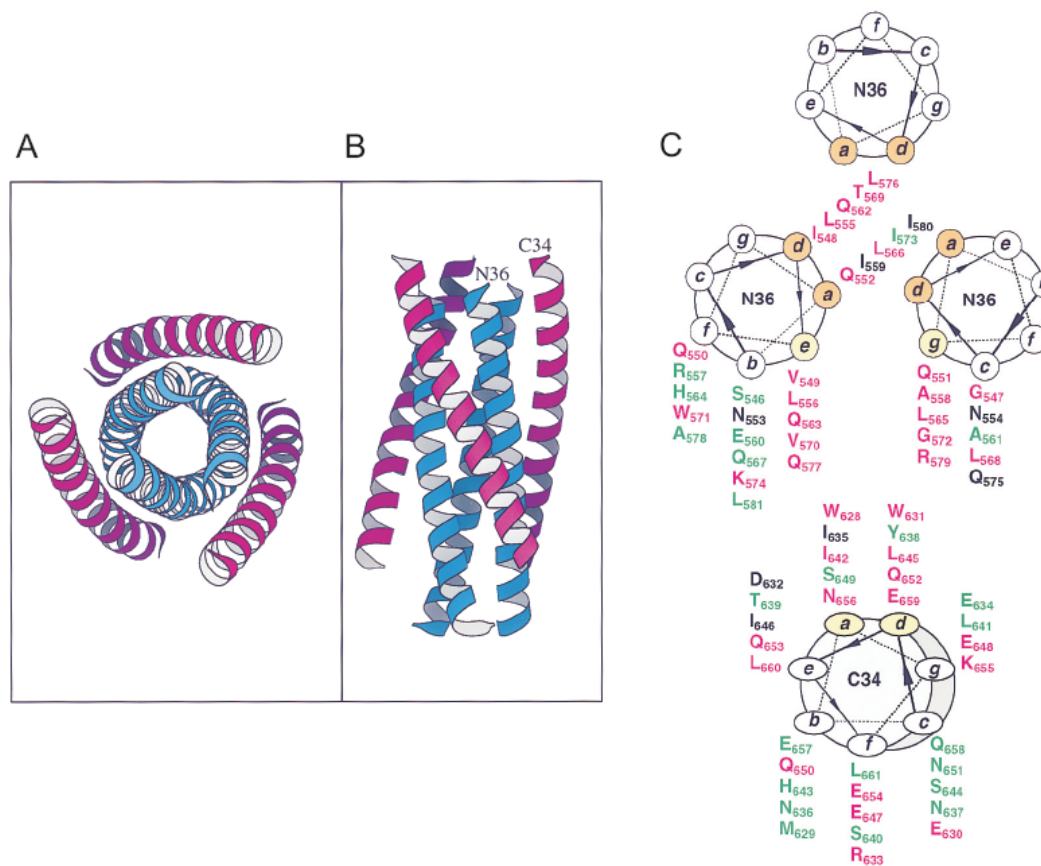
Figura 3. Mecanismo de fusión y entrada de VIH-1. A. gp1 entra en contacto con el receptor C34. B. Se producen cambios conformacionales en gp120, por reducción de enlaces disulfuro que estabilizan la estructura prefusiogénica, esto incrementa el reconocimiento por parte de los co-receptores (CXCR4 o CCR5). Los cambios conformacionales se transmiten a gp41 provocando que el péptido de fusión de su extremo N-terminal se inserte en la membrana celular. C, D. Activación de gp41 con la formación de un estado intermedio que involucra la región helicoidal N-terminal (NHR) y la región helicoidal C-terminal (CHR) de gp41. E. Formación del haz de seis hélices entre CHR y NHR que desencadena la entrada del virus (La interacción de gp120 y gp41 se da en forma de trímeros)



La conformación fusiogénica de gp41 fue identificada a partir de la obtención del ectodominio de gp41, sin la secuencia correspondiente al péptido de fusión, el cual fue eliminado por proteólisis. Por medio de este procedimiento se obtuvo el subdominio helicoidal estable de la proteína, que está conformado por un complejo de péptidos que poseen secuencias de regiones discontinuas de gp41<sup>19</sup>. Estas secuencias correspondían a las regiones N- y C-terminal de la proteína, denominados N51 y C43. Estos péptidos resultantes forman un complejo trimérico de heterodímeros con un 100% de estructura helicoidal. Todos estos fragmentos derivados de estas regiones han sido denominados frecuentemente como N-péptidos y C-péptidos. La estructura cristalográfica del ectodominio se obtuvo a partir del complejo formado por los péptidos C34 y N36, versiones cortas de N51 y C43<sup>20</sup>. La estructura ha sido descrita como un haz de seis hélices (trimer of harpins or six helix bundle), donde tres unidades de C-péptidos se unen a tres cavidades hidrofóbicas de un núcleo de N-péptidos. Los estudios precisan que los N-péptidos forman un núcleo central de tres hélices paralelas, con tres C-péptidos helicoidales unidos alrededor, en

dirección antiparalela<sup>17,21</sup> (Figura 4).

Figura 4. Vista general del complejo N36/C34<sup>17</sup>. A. Vista axial B. Vista lateral . La hélices N36 se representan de color azul y la hélices de C34 se muestran de color rosado. Los diagramas se realizaron usando el programa VMD<sup>22</sup> C. Representación de Edmundson<sup>23</sup> (proyección helicoidal) del complejo N36/C34 como la proyección en dos dimensiones del haz de seis hélices A. Los residuos de cada posiciones a y d de la helices N36 interactúan entre sí en el núcleo hidrofóbico central (en naranja) mientras las posiciones e y g de N36 interactúan con la posiciones a y d de las hélices C34 (en amarillo).



### 1.1.3. Inhibición de la entrada y fusión del virus

La identificación, caracterización de la estructura molecular y biología del virus, sus receptores celulares, así como también la determinación del proceso de entrada viral en detalle, ha llevado al desarrollo de estrategias enfocadas en la inhibición de la entrada de VIH<sup>24</sup>. Este proceso incluye las siguientes etapas: reconocimiento a los receptores de la célula diana, unión del virus al receptor, interacción del virus con los co-receptores celulares, la fusión e internalización dentro de la célula.

Una de las vías en el diseño de inhibidores de la entrada del virus esta dirigida a bloquear el reconocimiento de las moléculas CD4 por parte de la proteína viral gp120. Inicialmente fue propuesto el uso directo de versiones solubles de CD4. Sin embargo, en el tratamiento con CD4, de pacientes con SIDA, se necesitaban usar dosis muy elevadas para obtener buenos resultados<sup>25</sup>. Con el objetivo de mejorar la farmacocinética y la afinidad por la gp120 de VIH-1 con mínimos efectos inmunogénicos, se han desarrollado proteínas quiméricas del tipo CD4-inmunoglobulina. Algunas de estas combinaciones son PRO 542 y PRO 140 (Progenics Pharmaceuticals, Tarrytown, NY) las cuales están en fase de evaluación clínica. También se han usado anticuerpos monoclonales para bloquear el receptor CD4, uno de estos anticuerpos es el denominado TNX-355 (Tanox, Inc., Houston, Texas), el cual se encuentra en estudios clínicos<sup>26</sup>.

En esta misma línea se han propuesto inhibidores de la unión que disminuyan la producción del receptor CD4, ya que indirectamente estaría asociada la disminución del poder infectivo del VIH. Inhibidores de la fusión derivados de las ciclotriazadisulfonamidas tienen como mecanismo de acción la disminución del receptor CD4 en linfocitos y monocitos. La ciclotriazadisulfonamida (CADA) es un macrociclo sintético con una amplio rango de actividad en varias cepas de VIH<sup>27</sup>.

Algunos inhibidores de la fusión, en fase de investigación, son algunos polímeros sulfatados y polianiones de naftaleno. Sin embargo, el mecanismo de acción no es completamente conocido y en pruebas clínicas has dado resultados ambiguos. No obstante, uno de estos polímeros, PRO 2000 es capaz de unirse a CD4 y ha mostrado prevenir la transmisión vaginal de VIH en modelos primates<sup>28,29</sup>.

Los antagonistas de los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 son otra vía en la cual se ha enfocado el desarrollo de inhibidores la unión del virus. Inhibidores, aun en desarrollo contra esta etapa, son los análogos de quimiocinas (p.e RANTES<sup>d</sup> y sus ligandos naturales) y compuestos no peptídicos como los derivados de piperazinil metilpiperidina<sup>30</sup>(SCH-D o Vicriviroc, de Schering Plough), una nueva espirodictopiperazina<sup>31</sup>(AK602, Kumamoto University en Japon) y un derivado del núcleo de benzazepina<sup>32</sup>(TAK-652, Takeda Pharmaceutical Company Limited, Osaka, Japan). Recientemente, el fármaco Maraviroc (Selzentry, Pfizer) antagonista del co-receptor CCR5 ha sido aprobado para ser usado en humanos por la FDA<sup>6</sup>.

---

20 <sup>d</sup> RANTES: del ingles , Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted.

### 1.1.4. Péptidos que inhiben la fusión

Previamente se ha hablado de las vías de inhibición de fusión a través del bloqueo de la interacción de gp120 con los receptores celulares. Los mecanismos de fusión también pueden bloquearse inhibiendo las interacciones o cambios conformacional de gp41. En este frente, los péptidos han sido los principales protagonistas. Péptidos sintéticos, derivados de la región C-terminal o N-terminal del ectodominio de gp41, bloquean la formación del complejo y potencialmente inhiben la entrada del virus<sup>33,34</sup>. La inhibición se da cuando péptidos C-terminales se unen a la región N-terminal de gp41, expuesta transitoriamente, cuando adopta la conformación intermediaria extendida previa a la fusión<sup>21,35</sup>. Péptidos que solapan las regiones enmarcadas por las secuencias de los péptidos N51 y C43 de la gp41 tienen una elevada actividad antiviral (Tabla 2). Los péptidos más activos poseen secuencias derivadas de la región C-terminal<sup>33</sup>. Incluso, se ha propuesto que péptidos derivados de la región C-terminal podrían usarse como microbicidas tópicos que puedan bloquear la transmisión sexual de VIH a través de mucosas<sup>36</sup>

T20 (Fuzeon™, Enfuvirtide, DP178) es un péptido derivado de la región C-terminal de gp41 que está aprobado para ser usado en el tratamiento de la infección por VIH-1, en pacientes que han generado resistencia a otros antivirales. Su secuencia comprende la región entre los residuos 638 a 673 de la proteína gp41 de VIH-1 LAI<sup>37</sup>. Este péptido lineal de 36 residuos se sintetiza químicamente con el grupo N-terminal acetilado y el grupo C-terminal en forma de carboxamida y está compuesto únicamente de aminoácidos L. El medicamento desarrollado a partir de T20, FUZEON™, es un inyectable producido por Hoffmann-La Roche Inc. T20 se une al intermedio conformacional expuesto durante la activación de gp41. Recientemente se ha encontrado evidencia de que la acción de T20 sigue varios mecanismos, que incluyen su interacción tanto con gp41 como con gp120<sup>38-40</sup>. Debido al carácter peptídico de T20 es procesado rápidamente hasta sus aminoácidos constituyentes, los cuales entran en el metabolismo normal del organismo. Esto se refleja en su bajo tiempo de vida media, una dosis subcutánea de 90 mg de T20 tiene un tiempo de vida media de  $3.8 \pm 0.6$  horas.

A pesar de la eficiencia terapéutica de T20 se han encontrado cepas de virus resistentes<sup>41,42</sup>. Como segunda generación de inhibidores peptídicos de la fusión, el péptido T1249 fue diseñado. Este está compuesto de 39 residuos de secuencias derivadas de VIH-1, VIH-2 y de VIS. En ensayos clínicos se encontró que este péptido era más activo que T20 y que mantenía su actividad aun contra cepas resistentes a T20<sup>43</sup>. Este péptido puede ser adsorbido por las membranas ricas en colesterol, lo que aumenta la concentración local y

aumenta su capacidad de inhibir la fusión<sup>44</sup>. Empero estas propiedades, los estudios clínicos fueron suspendidos, por dificultades en sistema de formulación farmacéutica de este péptido, que hacia necesaria la administración de cuatro dosis diarias<sup>45</sup>, y el descubrimiento de nuevas cepas virales resistentes<sup>46</sup>.

**Tabla 2. Secuencias de los péptidos de la región C-terminal de gp41 (CHR) que inhiben la fusión.**

Péptido	Secuencia
T20	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF
T1249	WQEWQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF
T651	MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL-----
T2410	MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLEL-----
C34	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL-----
C43	NHTTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKW-----

En esta misma línea de péptidos inhibidores de la fusión y como una tercera generación, se están investigado dos péptidos, TRI-999 y TRI 1144, los cuales han mostrado ser activos en cepas resistentes a T20 y T1249<sup>47</sup>. Estos péptidos se diseñaron a partir de una secuencia C-terminal de gp41 desplazada hacia la región amino respecto a T20. TRI-999 tiene una secuencia nativa de gp41 con un ácido graso unido a una lisina interna. TRI-1144 además contiene motivos para estabilizar la estructura helicoidal, como puentes salinos y sustituciones por alanina a lo largo de la secuencia de la región C-terminal. A pesar de la gran cantidad de mutaciones TRI-1144 es capaz de formar complejos estables con péptidos de la región N-terminal<sup>48</sup>. Estos péptidos se encuentran en estudios clínicos preliminares.

Otros péptidos derivados de la región C-terminal de gp41 como C34 (residuos 628-661) y T651 (residuos 626-661) presentan mayor actividad y reducida susceptibilidad a resistencia que T20. Sin embargo su uso como medicamentos se ha visto limitada por su baja solubilidad en medios acuosos<sup>49</sup>. A diferencia de T20, C34 posee en su secuencia el fragmento que interacciona con una cavidad profunda presente en el trímero formado por N36 (residuos 546-581), que incluye cadenas laterales que se encuentran en la región entre los residuos 569-577<sup>17</sup>. Con el fin de aumentar la solubilidad de la secuencia de C34 se han diseñado péptidos en los cuales se han cambiado los residuos irrelevantes en la interacción por residuos polares que puedan formar puentes salinos<sup>49</sup>, sin embargo esto los hizo más susceptibles a la acción por parte de proteasas. No obstante, los inhibidores de la fusión derivados de C34 son candidatos atractivos, en el diseño de inhibidores de la fusión, por varias razones:

- 1) inhiben en los primeros estadios del ciclo de vida de virus y forman complejos estables con el fragmento N-terminal de gp41<sup>38</sup>.
- 2) Son activos a muy bajas concentraciones.
- 3) Su secuencia diana en la gp41 es altamente conservada, disminuyendo la posibilidad encontrar cepas de virus resistentes.

### 1.1.5. Objetivos

El objetivo general de este estudio se orientó hacia la evaluación de la influencia del cambio de la quiralidad en el péptido C34 tanto total como parcialmente. En primer lugar, se planteó evaluar las consecuencias sobre la actividad del cambio total de la quiralidad de los residuos de C34 tanto como enantiómero o retroenantiómero. Y en segundo lugar, se buscaba establecer una estrategia para el diseño de péptidos heteroquirales derivados de C34, que conservaran la capacidad de formar complejos con N36 y, por consiguiente, la capacidad de inhibir la fusión.

**Tabla 3. Secuencias de los péptidos sintetizados. Los sufijos L y D diferencian los isómeros todo-L y todo-D, respectivamente. El prefijo R indica el isómero con la secuencia inversa (retroisómero). El prefijo M indica los diferentes péptidos modificados a partir de la secuencia de C34. OHCCO indica el grupo aldehído N-terminal después de la oxidación de N36. Todos los péptidos se sintetizaron como carboxamidas en el residuo C-terminal. A excepción de los péptidos con (\* o OHCCO) el grupo N-terminal es acetilo.**

Péptido	Secuencia
C34L	Ac-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL-NH <sub>2</sub>
C34L*	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL-NH <sub>2</sub>
C34D	Ac-wmewdreinnytslihslieesqnqqekneqell-NH <sub>2</sub>
C34D*	wmewdreinnytslihslieesqnqqekneqell-NH <sub>2</sub>
RC34L(Retro-C34)	Ac-LLEQENKEQQNQSEEILSHILSTYNNIERDWEMW-NH <sub>2</sub>
RC34D (Retroenantio-C34)	Ac-lleqenkeqqnqseeilshilstynnierdwemw-NH <sub>2</sub>
M <sub>1</sub> C34L	Ac-WEDMWRNNVTEYLSSILEHVEQQSNKQEEQENLL-NH <sub>2</sub>
M <sub>1</sub> C34D	Ac-wedmwrnnvteylssilehveqqsnkqeeqenll-NH <sub>2</sub>
M <sub>2</sub> C34	Ac-WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQ <b>e</b> KNE <b>k</b> ELL-NH <sub>2</sub>
M <sub>3</sub> C34	Ac- <b>w</b> eEWD <b>R</b> KINNYTSLIHSLIEESQNQQ <b>e</b> KNE <b>k</b> ELL-NH <sub>2</sub>
N36	Ac-SGIVQQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQARIL-NH <sub>2</sub>
Glioxilil-N36	OHCCO-GIVQQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQARIL-NH <sub>2</sub>



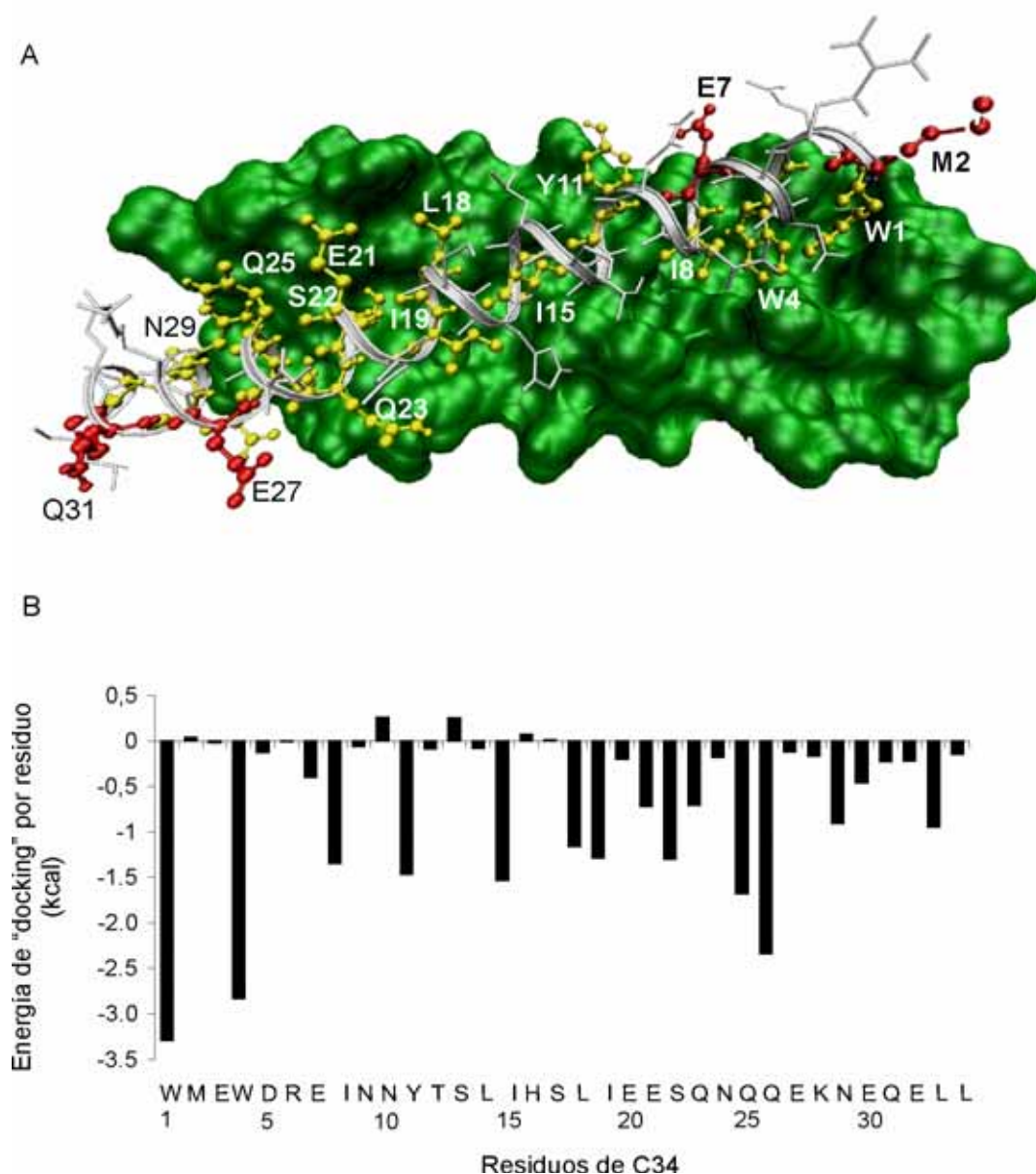
## 1.2. Diseño de péptidos análogos de C34 con sustituciones parciales por aminoácidos D

La introducción de aminoácidos D en la secuencia de C34 disminuye la susceptibilidad del péptido a ser degradado por proteasas, tanto si se trata de un cambio total de la quiralidad del péptido o de mutaciones puntuales<sup>50-52</sup>. La influencia de la introducción de aminoácidos D sobre la estructura y actividad del péptido de partida depende del tipo de conformaciones y del mecanismo por el cual actúa<sup>53</sup>.

La introducción de aminoácidos D en C34 puede cambiar la estructura global del péptido helicoidal y por ende la interacción con N36. Para analizar el efecto de la modificación de la secuencia de C34 con aminoácidos D se investigaron varias estrategias. Por un lado, se analizó el efecto del cambio total de la quiralidad del péptido, y por otro, la influencia de modificaciones puntuales. En el diseño se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones: en primer lugar, se intentó conservar la helicidad del sistema, y en segundo, aumentar la solubilidad del péptido. El efecto del cambio total de la quiralidad se analizó en tres péptidos compuestos de aminoácidos D (todo-D): el enantiómero (C34D), el péptido con la secuencia de C34 invertida o retroenantiómero (RC34D) y un análogo modificado del enantiómero (M<sub>1</sub>C34D) (Tabla 3). Este último péptido se diseñó a partir de la secuencia de C34D, de forma que conservara tanto la tendencia a tener estructura helicoidal como los residuos topológicamente importantes para la interacción, según la estructura conocida del complejo N36/C34. Por último, se diseñaron dos péptidos heteroquirales que poseían modificaciones puntuales por aminoácidos D. Las sustituciones se realizaron en la región C-terminal, en M<sub>2</sub>C34, y también en la región N-terminal, en M<sub>3</sub>C34.

Para realizar las modificaciones en M<sub>1</sub>C34D y los péptidos heteroquirales, se establecieron los residuos más importantes en la interfase de unión entre N36/C34 a partir de la estructura cristalográfica del complejo (código PDB ,1AIK)<sup>17</sup> por cálculos de la energía de “docking”. Estos estudios fueron realizados por el Dr. Sergio Madurga. Los cálculos se realizaron con el programa AutoDock (versión 4), para analizar la unión entre una cadena de C34L y un núcleo de tres hélices paralelas de N36 (Figura 5). De acuerdo al perfil de energía de “docking” por residuo de C34L, los residuos que mostraron tener mayor contribución a la unión se encontraban en la región N-terminal, entre los que destacaron Trp1, Trp4, Ile8, Tyr11 e Ile15.

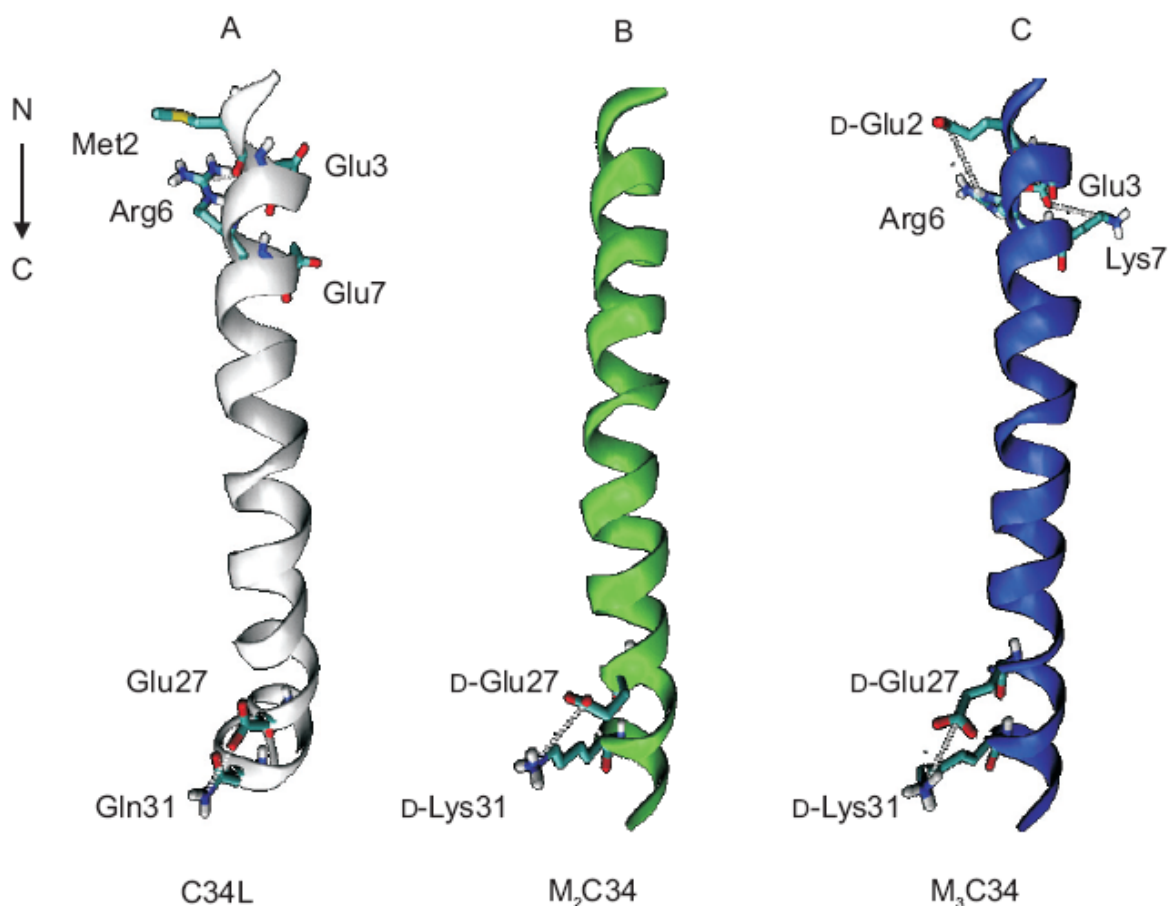
Figura 5. A. Representación de la hélice de C34L (tipo cintas en gris) y la superficie de contacto con dos unidades de N36 (en verde) a partir del PDB: 1AIK. Los residuos de color amarillo están directamente involucrados en la interacción. Los residuos en rojo señalan las posiciones en la cuales se realizaron las modificaciones en los análogos de C34L heteroquirales. B. Curva de energía de “docking” de todos los residuos de C34L de acuerdo a lo calculado con AutoDock4<sup>54</sup>



Los residuos de la mitad N-terminal de C34, importantes en la unión con N36, mostraron tener mayor energía de “docking” y estaban localizados discontinuamente con contribuciones energéticas altas. Mientras que los residuos localizados en la mitad C-terminal, involucrados en la unión, mostraron individualmente menores contribuciones, pero se encontraban formando grupos de dos o tres residuos continuos. Los residuos de mayor

contribución a la interacción en la región C-terminal fueron: Leu 18, Ile19, Glu21, Ser 22, Gln23, Gln 25, Asn29, Glu30 y Leu 33. Los residuos involucrados directamente en las interacciones del núcleo hidrofóbico se intentaron conservar o se modificaron para que se distribuyeran de forma similar al péptido natural en el diseño de M<sub>1</sub>C34D y los péptidos heteroquirales.

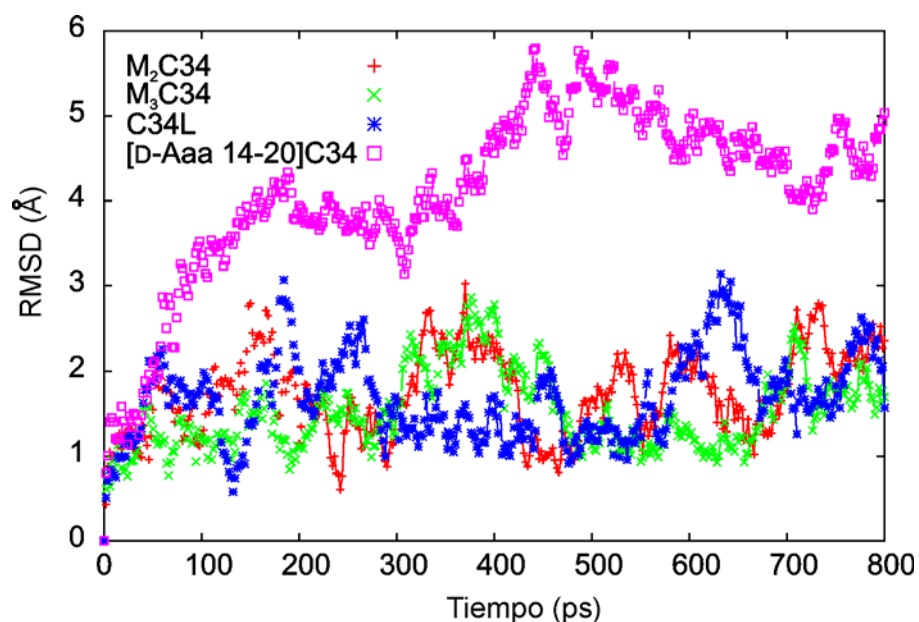
**Figura 6. Representación tipo cinta de los modelos helicoidales de los péptidos C34 (A), M<sub>2</sub>C34 (B) y M<sub>3</sub>C34 (C). El modelo de C34 se construyó a partir de las coordenadas obtenidas del PDB en el código 1IAK. Los modelos de M<sub>2</sub>C34 y de M<sub>3</sub>C34 se construyeron usando las coordenadas características de una hélice canónica.**



La introducción de aminoácidos D en la secuencia de una hélice  $\alpha$  implica un alto coste energético. Para compensar este coste, en el diseño de los péptidos heteroquirales se incluyeron residuos que favorecieran interacciones electrostáticas adicionales. Debido al gran porcentaje de residuos polares en la secuencia nativa se decidió realizar mutaciones por D aminoácidos en estas posiciones y conservar o favorecer interacciones electrostáticas, entre las cadenas laterales de residuos separados  $i+4$  residuos<sup>55-58</sup>. Las mutaciones se realizaron sólo en las regiones C-terminal y N-terminal, de tal forma que los

residuos implicados en la interacción con N36 no resultaran afectados conformacionalmente. Además, se intentó con estas modificaciones estabilizar el macrodipolo, teniendo en cuenta que una estructura helicoidal se genera un momento dipolar permanente, debido al alineamiento de los grupos carbonilos amida con el eje principal de esta estructura. El dipolo generado produce que una carga parcial positiva localizada en la región N-terminal y una carga parcial negativa localizada en la región C-terminal de la hélice<sup>59,60</sup>. Por esta razón, las sustituciones por aminoácidos D se realizaron de forma que residuos ácidos se ubicaran en dirección N-terminal y los residuos básicos en dirección C-terminal respecto a la ubicación del residuo con el que se intentaba generar la interacción (Figura 6).

**Figura 7. Curvas de RMSD calculadas a partir de los datos de dinámica molecular de C34L, M2C34, M2C34D y [D-Aaa 14-20]C34.**



Para estudiar la estabilidad conformacional de las modificaciones se realizaron cálculos de dinámica molecular de C34L, M<sub>2</sub>C34, M<sub>3</sub>C34D y un análogo de C34 donde se substituyeron por aminoácidos D los residuos entre las posiciones 14-20 ([D-Aaa 14-20]C34<sup>e</sup>). El cálculo del RMSD manifestó que el análogo [D-Aaa 14-20]C34 presentaba una desviación de distancias mayor a lo obtenido para el péptido natural y sus análogos heteroquirales (Figura 7). Las modificaciones realizadas en este diastereoisómero comprenden dos vueltas de hélice  $\alpha$ , localizadas en el centro de la secuencia. Esto desestabilizó la conformación y rompió la estructura helicoidal del péptido. Sin embargo, las modificaciones puntuales por aminoácidos D, realizados al inicio y final en los péptidos heteroquirales, no cambiaron

<sup>e</sup> [D-Leu<sup>14</sup>, D-Ile<sup>15</sup>, D-His<sup>16</sup>, D-Ser<sup>17</sup>, D-Leu<sup>18</sup>, D-Ile<sup>19</sup>, D-Glu<sup>20</sup>]C34

notablemente la estructura general respecto a la del péptido natural. De acuerdo con esto, estas modificaciones, las cuales se realizaron de forma que no afectaran directamente la región involucrada en la interacción con N36, no tendrían mayor influencia sobre la estructura del péptido en el complejo.

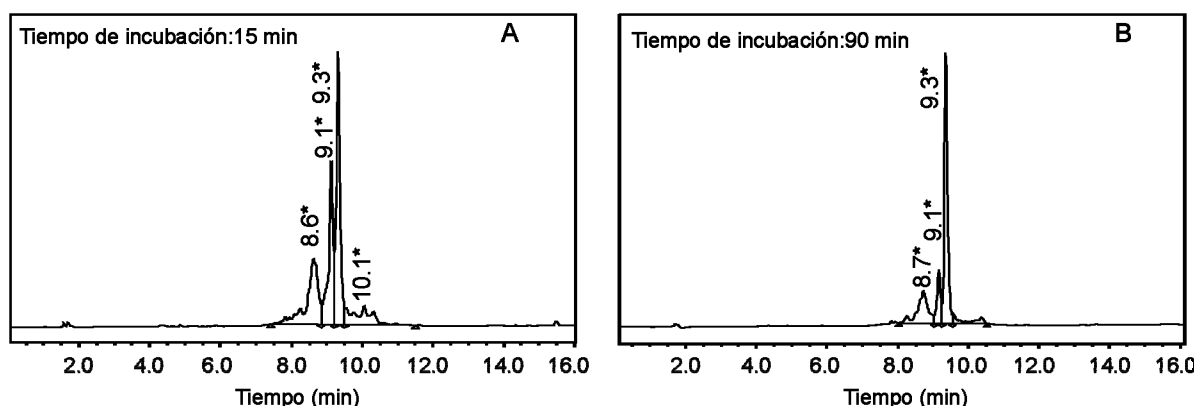
### 1.3. Síntesis y purificación de C34 y análogos

Los péptidos C34 acetilado y no acetilado en el residuo amino terminal se sintetizaron en fase sólida usando química Fmoc/tBu sobre una resina Rink amida de baja funcionalización (0.03 mmol/ g de resina). Con el fin de reducir cantidad de subproductos debidos a eliminaciones incompletas del grupo Fmoc se usó piperidina al 22% en DMF con 0.07% de tritón x-100 (ver 6.2). El acoplamiento de cada uno de los residuos se realizó por medio de un sintetizador automático usando como sistema de activación de los aminoácidos TBTU/HOBt. Al final de la síntesis se dividió la peptidil resina en dos porciones una de las cuales se acetilo en el grupo amino terminal usando anhídrido acético al 15% con 5% de DIEA en DMF y la otra se dejo con el grupo amino libre. Para obtener los péptidos libres y eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales se usó TFA al 94% usando como capturadores de carbocationes 2% TIS y 4% agua. Después de precipitar los péptidos con TBME estos se disolvieron en agua. Los crudos obtenidos inmediatamente después del tratamiento ácido presentaban un perfil cromatografico complejo. Sin embargo, después de dejarlos en disolución a temperatura ambiente por más de 60 min., el perfil cromatografico cambió y se observó prácticamente sólo una especie para cada uno de los péptidos (Figura 8). Este comportamiento se debe a la formación de agregados que también son responsables de la baja solubilidad en agua de este péptido. Cualitativamente estos péptidos son poco solubles en agua, acetonitrilo, ácido acético y presentan una buena solubilidad disoluciones acuosas con pH básico. El péptido con el grupo amino terminal libre es ligeramente más soluble que el péptido acetilado. El rendimiento de síntesis después de purificar por cromatografía en fase inversa fue del 17%.

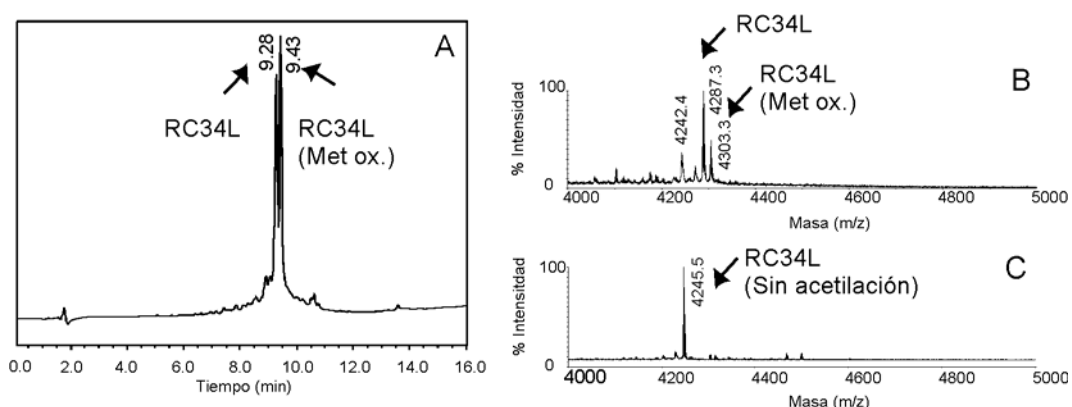
Las síntesis de los análogos de C34 se realizaron usando las mismas condiciones de la síntesis. Los productos crudos obtenidos presentaban como especie mayoritaria el péptido esperado (Tabla 4), a excepción de los péptidos con la secuencia invertida (RC34L y RC34D), en los cuales se observó que el residuo de metionina 33 se oxidaba después de acetilar el péptido(Figura 9). Esto se observó al realizar en paralelo las reacciones de acetilación y escisión del péptido de C34L y sus análogos con la secuencia invertida. Los péptidos crudos de RC34L y RC34D sin acetilar, después de la escisión con TFA, no

mostraron esta reacción secundaria. Teniendo en cuenta este comportamiento, la oxidación del péptido acetilado se evitó realizando la reacción de acetilación en atmósfera de nitrógeno.

**Figura 8. Cromatogramas del producto crudo obtenido en la síntesis de C34L a diferentes tiempos de incubación en agua a 25 °C justo después del desanclaje de la resina usando un gradiente lineal de de 10-80 % de ACN con 0.036% de TFA en 15 min. A. Producto crudo después de 15 min de incubación. B. La misma disolución después de 90 min de incubación. El asterisco indica que poseen la misma masa molecular**



**Figura 9. Cromatograma de RP-HPLC de producto crudo de RC34L usando un gradiente lineal de 10-80 % de ACN con 0.036% de TFA en 15 min, después de 90 min de incubación de la muestra disuelta en agua, a los 9.2 se eluye el péptido y a 9.4 min el péptido oxidado (A). A la derecha de la figura se muestran los espectros de masas de los péptidos crudos, acetilado (B) y antes de la acetilación (C)**



Los análogos presentaron propiedades similares a C34, tanto las de solubilidad como la tendencia a formar aglomerados observables por HPLC. Antes de liofilizar los péptidos, estos se disolvieron hasta obtener una disolución homogénea en carbonato de amonio 50 mM ajustando el pH a 7 con ácido acético al 10% en agua. Esto se hizo con el doble fin de

disolver el péptido y de eliminar los contraiones de trifluoroacetato.

**Tabla 4. Rendimiento de los péptidos sintetizados con la masa esperada y masa encontrada**

Péptido	Rendimiento (%)	Masa esperada (M+H) <sup>+</sup>	Masa encontrada (M+H) <sup>+</sup>
C34L	17	4288.0	4287.9
C34L*	17	4246.0	4245.6
C34D	17	4288.0	4287.9
C34D*	17	4246.0	4245.9
RC34L	18	4288.0	4287.9
RC34D	18	4288.0	4287.5
M <sub>1</sub> C34L	26	4259.9	4260.4
M <sub>1</sub> C34D	32	4259.9	4259.8
M <sub>2</sub> C34	26	4288.1	4289.5
M <sub>3</sub> C34	34	4285.1	4286.6
N36	24*	4162.4	4162.6
Glioxilil-N36	24*	4090.3	4089.2

(\*)El rendimiento de la primera síntesis fue del 6%

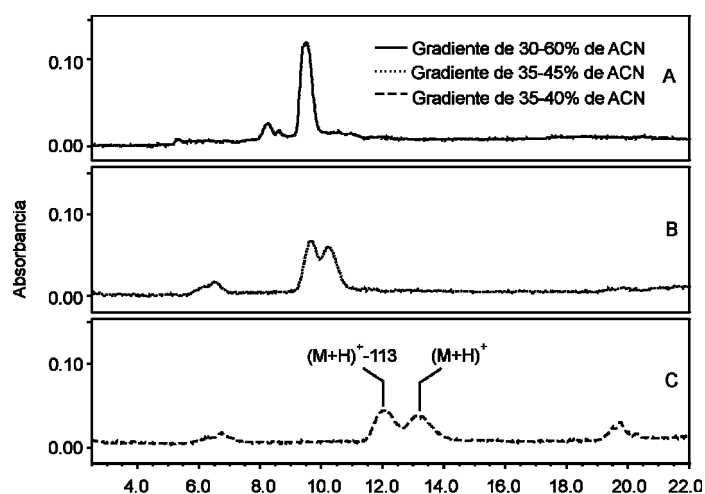
## 1.4. Síntesis y purificación de N36

El péptido N36 es un péptido de 36 residuos cuya secuencia se encuentra ubicada entre las posiciones 546-581 de la proteína GP160 precursora de gp41, la cual esta involucrada directamente en la interacción con la secuencia que corresponde a C34L<sup>17</sup>. Este péptido se sintetizó por química Fmoc/tBu, al igual que los péptidos anteriores en esta síntesis se usó resina de poliestireno funcionalizada con el grupo Rink (0.03 mmol/ g de resina) y los mismos reactivos de acoplamiento de los aminoácidos y eliminación del grupo Fmoc. Sin embargo, fue necesario realizar dos síntesis al identificarse una secuencia truncada que redujo el rendimiento en más de un 75%. En el primer intento se síntesis encontró que se habían obtenido dos productos principales que poseían tiempos de retención por RP-HPLC muy cercanos entre sí y de diferente masa molecular (Figura 10). Las masas moleculares encontradas se diferenciaban entre sí en 113 Da, la mayor de ellas correspondía a la masa molecular esperada. Esta diferencia de masa se debía a la presencia de un péptido con un residuo menos de Leu o Ile. Esto dificultaba la ubicación del residuo que faltaba puesto que la secuencia de N36 posee cuatro Ile y siete Leu. Aunque este es un péptido largo fue posible obtener el espectro de fragmentación MALDI TOF/TOF del péptido con la secuencia truncada. Se encontró que el residuo faltante se encontraba en la posición 35 que

correspondía a una isoleucina (Figura 11). Teniendo en cuenta esta información se realizó una segunda síntesis en donde este residuo se introdujo haciendo dos ciclos de acoplamiento. El producto obtenido de esta síntesis mostró un perfil cromatográfico en donde el pico principal correspondía a la masa molecular esperada para N36. Después de purificar por RP-HPLC en fase inversa se obtuvo un rendimiento total del 24%.

La interacción de este péptido con C34 se analizó por espectrofotometría de dicroísmo circular y resonancia de plasmon circular (SPR). Para inmovilizar N36 sobre la superficie de un sensor de RPS se aprovechó la serina terminal con el grupo amino libre, el cual se oxidó con periodato de sodio para obtener un grupo aldehído N-terminal. Este grupo funcional se utilizó para unir quimiosselectivamente este péptido a la superficie del sensor.

**Figura 10. Cromatogramas de la primera síntesis de N36 con diferentes gradientes de agua/ACN. A. Gradiente de 30-60% de ACN con 0.036% de TFA en 15 min. B. Gradiente de 35-45% de ACN con 0.036% de TFA en 15 min. C. Gradiente de 35-40% de ACN con 0.036% de TFA en 15 min**



## 1.5. Ensayos de Inhibición de la fusión

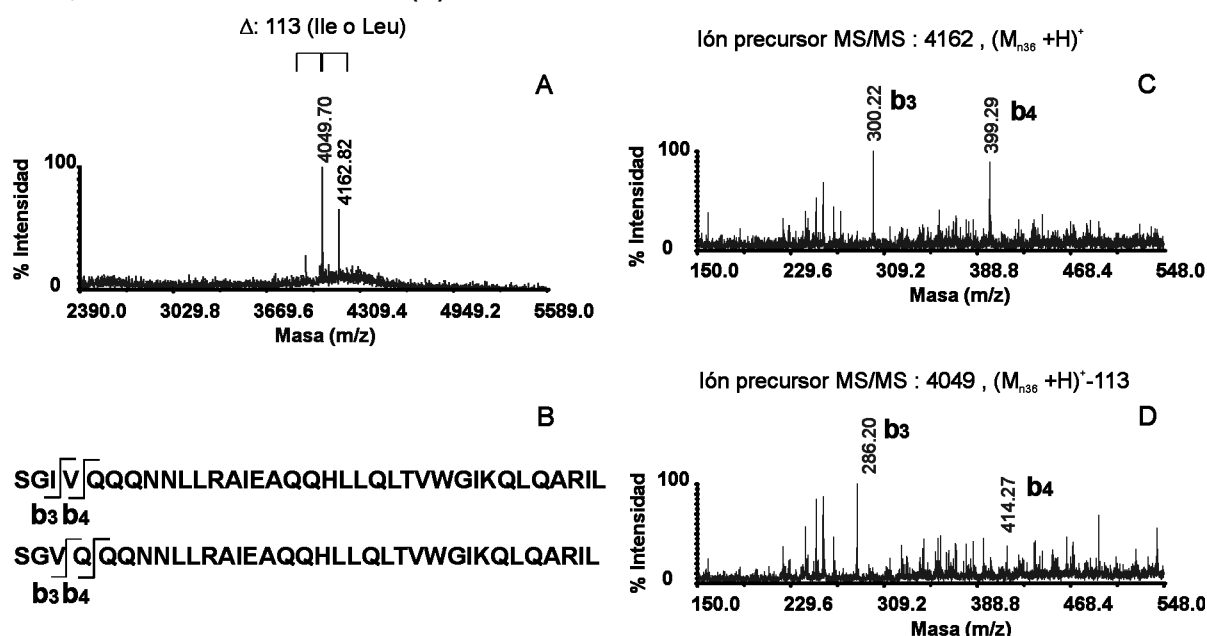
Se realizaron dos tipos de ensayos de inhibición. En uno de los ensayos, se midió la inhibición de la replicación del VIH-1 producida por los péptidos, al cuantificar la cantidad de antígeno p24 producido por el virus al infectar células HeLa<sup>f</sup>. En el otro ensayo, se midió la inhibición de formación de células gigantes multinucleadas o sincitios, entre células HeLa

<sup>f</sup> Células HeLa: son una línea de células inmortalizadas. Esta línea celular se derivó de las células aisladas de Henrietta Lacks de un tumor producido por cáncer cervical (1951).



que expresaban el receptor CD4 y el co-receptor (CCR5 o CXCR4) de linfocitos T, junto con células HeLa que expresaban las proteínas virales gp120 y gp41. Estos ensayos fueron realizados por Fabrice Gaston del grupo del profesor Elmostafa Bahraoui en el “Laboratoire d'Immuno-virologie des Lentivirus des Primates” de la Universidad Paul Sabatier en Toulouse (Francia).

**Figura 11. Espectro de masas MALDI-TOF del producto crudo de la primera síntesis de N36 (A) y espectros de fragmentación MALDI TOF/TOF usando como iones precursores el correspondiente N36, m/z: 4162, (C) y a la impureza mayoritaria, m/z: 4049, (D). El residuo que faltaba en la secuencia se encontró que correspondía a la Ile 35 debido a la desaparición del ión b<sub>3</sub> generado por N36 y la aparición de un nuevo ión de fragmentación correspondiente al ion b<sub>3</sub> de la secuencia truncada (B).**



### 1.5.1. Ensayo de Inhibición de la replicación de VIH-1

La actividad de los péptidos enantiómeros se comprobó inicialmente mediante un ensayo de inhibición de la replicación viral. Para ello se tomaron células HeLa y se incubaron con VIH-1 durante dos horas a 37°C en medio FCS en presencia de diferentes cantidades de péptido ( $10^{-6}$ - $10^{-9}$  M). Al tercer y séptimo día se recogió el sobrenadante y se determinó la presencia de antígeno p24 (proteína de 24 kDa de la cubierta externa del VIH) por medio de un ensayo de ELISA.

Los resultados demostraron que C34L inhibía la fusión incluso a  $10^{-9}$  M, mientras su

enantiómero no inhibía la fusión y tampoco lo hicieron los análogos con la secuencia inversa, RC34L y RC34D, ni el M<sub>1</sub>C34D, ni siquiera a concentraciones de 10<sup>-6</sup> M. El péptido M<sub>1</sub>C34L mostró algo de actividad siete días después de la infección con VIH-1 (Figura 12), este péptido conservaba los residuos de las posiciones más importantes en la interacción con N36. Este resultado puso de manifiesto, en primer lugar, que la inversión en la quiralidad de todos los aminoácidos en el enantiómero todo-D de C34 eliminaba la actividad del péptido natural al alterar la topología de las cadenas laterales. Y por otro lado, la inversión de la secuencia en RC34L anuló también la actividad, que en este caso era previsible, por la inversión de la dirección de la cadena principal y del macrodipolo del péptido. En el caso del retroenantiómero, RC34D, donde además del cambio de dirección en los residuos se cambió el centro quiral de todos los residuos, tampoco reportaron resultados positivos en este ensayo. La aproximación retroenantiómero ha sido satisfactoria principalmente cuando hay involucradas interacciones del tipo lámina β<sup>53</sup> o en el caso de hélices α cortas<sup>61</sup> o cuya interacción depende de las cargas de las cadenas laterales<sup>62</sup>, como en el caso de los péptidos antimicrobianos<sup>63,64</sup>. En nuestro caso el hecho de que en la formación del núcleo hidrofóbico estén involucrados motivos helicoidales grandes, de al menos 8 vueltas, que interactúan a su vez con dos hélices de N36 aumenta las posibilidades de contacto que no necesariamente son simétricas (Figura 4). Esto aumenta la dependencia de la quiralidad no sólo de cada uno de los residuos sino también de la conformación helicoidal.

La inversión de la quiralidad trajo como consecuencia la pérdida de la capacidad para inhibir la fusión que posee el péptido natural. Habiendo comprobado esto, se decidió explorar la posibilidad de introducir aminoácidos D únicamente en posiciones específicas que favorecieran interacciones entre cadenas y que no afectaran la superficie de contacto entre C34 y N36 (Figura 6). Los péptidos M<sub>2</sub>C34 y M<sub>3</sub>C34 (Tabla 3) se diseñaron teniendo en cuenta estas pautas y su actividad se midió en un ensayo de replicación de inhibición de VIH-1 similar al usado anteriormente (Figura 13). En este caso, se observó inhibición de la replicación incluso desde los primeros tres días después de la infección con VIH-1.

Figura 12. Ensayo de inhibición de la replicación de VIH-1 en células HeLa usando los péptidos C34L, RC34L y M<sub>1</sub>C34L y sus enantiómeros a una concentración de 10<sup>-6</sup>M. Se analizaron los sobrenadantes tres días (negro) y siete días (gris) después de la infección con VIH-1.

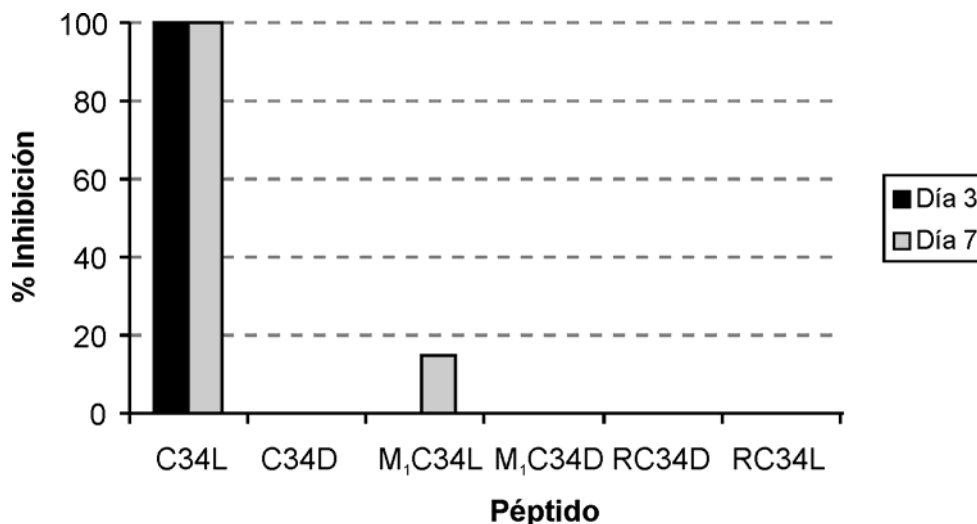
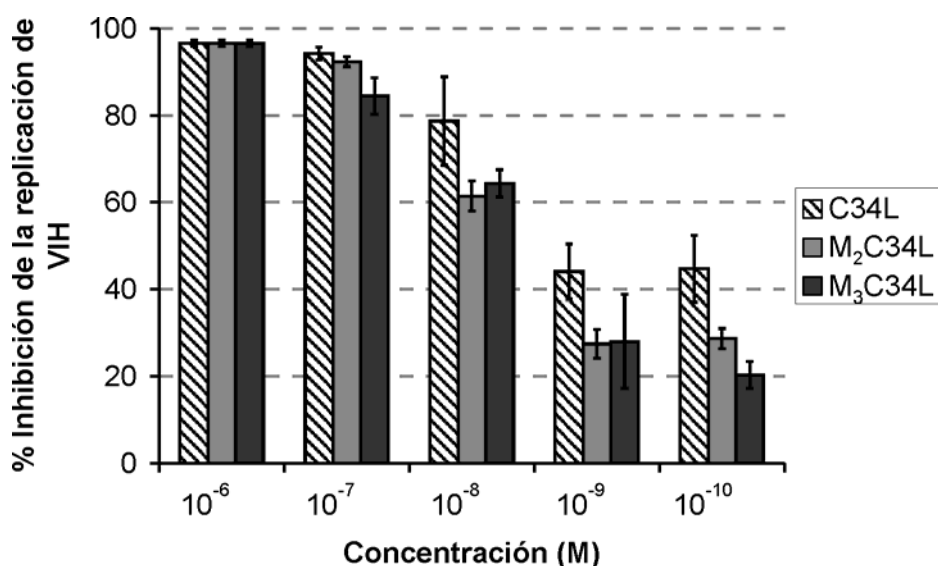


Figura 13. Inhibición de la replicación de VIH-1 en célula HeLa cuando se incuban junto con los péptido C34L, M<sub>2</sub>C34, M<sub>3</sub>C34 a diferentes concentraciones (10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-10</sup> M)

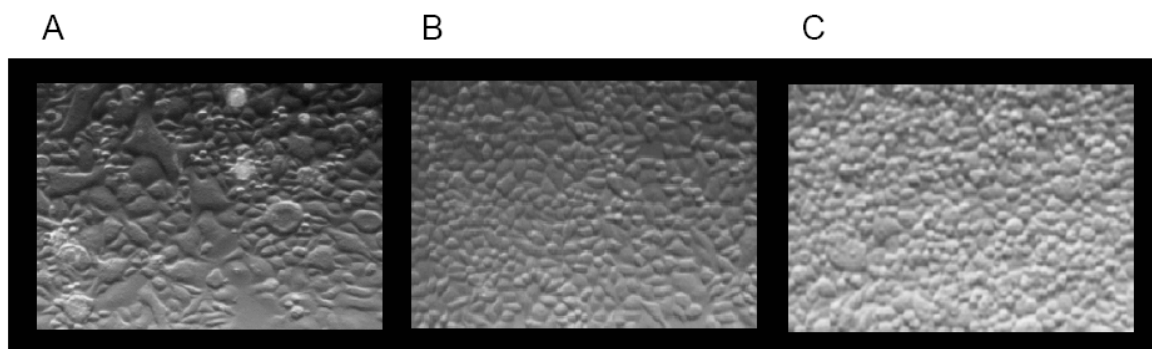


### 1.5.2. Ensayo de Inhibición de formación de sincitios

Es conocido que en cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> infectados con VIH-1, las proteínas de la cubierta del virus expresadas en la membrana de las células infectadas interactúan con los receptores CD4/CXCR de células no infectadas, produciendo la fusión de las células y después de varios ciclos de fusión entre las células estas sufren lisis celular<sup>65</sup>. A esta

formación de células gigantes multinucleadas<sup>66</sup> por fusión de al menos dos membranas celulares se ha denominado sincitios. La formación de sincitios se ha observado en infecciones por VIH, en concreto por variantes virales muy patogénicas que surgen en etapas tardías de la enfermedad. La aparición de estos virus que son capaces de promover la formación de sincitios es una señal que permite predecir el descenso de la población linfocitos T CD4+ y de la progresión clínica de la enfermedad<sup>67</sup>.

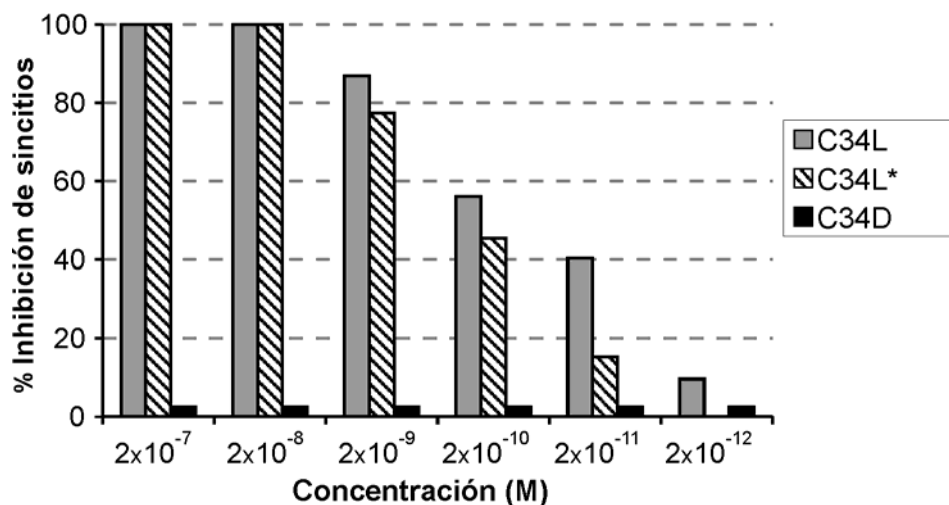
**Figura 14. A. Imagen de la formación de sincitios entre células HeLa en cuya superficie expresan CD4/CCR5 y células HeLa que expresan gp120/gp41 de VIH-1 Lai. B. Inhibición de la formación de sincitios al adicionar el inhibidor C34L ( $10^{-8}$  M) después de 20 horas de incubación. C. Imagen de células HeLa que expresan CD4/CCR5.**



Para medir la capacidad de los péptidos de inhibir la formación de sincitios se cultivaron células HeLa que expresaban CD4/CCR5 O CD4/CXCR4 junto con células HeLa que expresaban gp120/gp41 Lai o gp120/gp4 1ADA, en presencia de varias concentraciones de péptido. Después de 20 horas de incubación se midió la cantidad de sincitios formados (Figura 14).

Inicialmente se midió la capacidad inhibitoria de C34L y su análogo C34L\*, sin el grupo acetilo N-terminal, a diferentes concentraciones. Si bien, C34L puede inhibir la fusión por debajo del rango nanomolar, su baja solubilidad limita su utilización en estudios biofísicos que requieren mayor concentración (p.e RMN) y su posible uso como fármaco inhibidor la fusión<sup>49</sup>. Para aumentar la solubilidad del péptido sin cambiar su secuencia se dejó libre el grupo amino N-terminal de C34L\*, para adicionar una carga total más al péptido. El efecto de este cambio se observó en el ensayo de inhibición de la formación de sincitios. El péptido acetilado inhibió la formación de sincitios incluso a concentraciones de  $10^{-12}$  M. La eliminación del grupo acetilo reduce ligeramente la actividad pero sigue siendo inhibiendo hasta  $10^{-11}$  M. También se ensayó la actividad del enantiómero acetilado y se encontró que en un rango de concentraciones entre  $10^{-7}$  M y  $10^{-12}$  M no era capaz de inhibir la formación de sincitios.

Figura 15. Ensayo de Inhibición de formación de sincitios por parte de C34L, C34L\* y C34D a diferentes concentraciones desde  $10^{-7}$ – $10^{-12}$  M



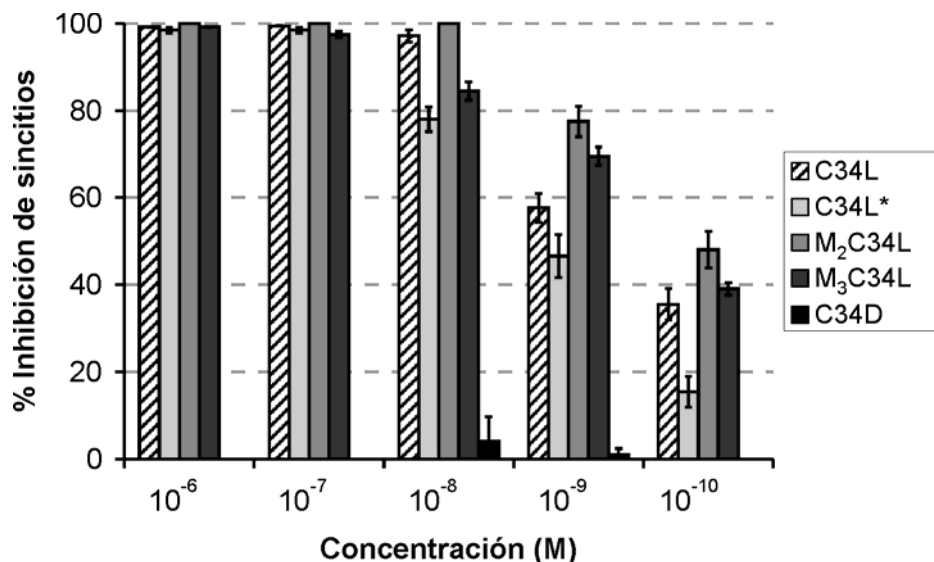
El ensayo de inhibición de formación de sincitios usando como inhibidores los péptidos heteroquirales  $M_2C34$ ,  $M_3C34$  se realizó para comparar su actividad con la del péptido natural C34L. En el rango de concentraciones entre  $10^{-7}$ - $10^{-10}$  M, los análogos heteroquirales inhibieron la formación de sincitios, incluso a concentraciones de  $10^{-10}$  M conservaban una actividad mayor que C34L y su análogo con el grupo amino libre (Figura 15). Estos resultados no sólo mostraron que los péptidos heteroquirales eran capaces de inhibir la formación de sincitios, si no también, que el efecto de las modificaciones realizadas por aminoácidos D era inferior al causado al dejar el grupo amino terminal libre del péptido natural. En estos últimos diseños sólo se realizaron modificaciones en residuos ubicados afuera de núcleo hidrofóbico, esto hizo posible introducir cambios en la quiralidad de residuos puntuales sin perjudicar la actividad de los péptidos.

## 1.6. Determinación de la solubilidad de C34L, C34L\*, $M_2C34$ y $M_3C34$

La solubilidad en medio acuoso de estos péptidos se determinó por análisis de aminoácidos. Debido a la insolubilidad de C34 es necesario disolver los péptidos primero en medio básico de carbonato de amonio y luego neutralizarlos (pH 7) con ácido acético. Posteriormente, los compuestos se secaron por liofilización y se repitió este procedimiento dos veces más, para intentar eliminar los contraiones de trifluoroacetato. Luego de repetir dos veces este procedimiento, los péptidos nuevamente se disolvieron en agua milli-Q hasta obtener una disolución saturada, la cual se filtró a través de un filtro de 0.2  $\mu$ M. La concentración de la

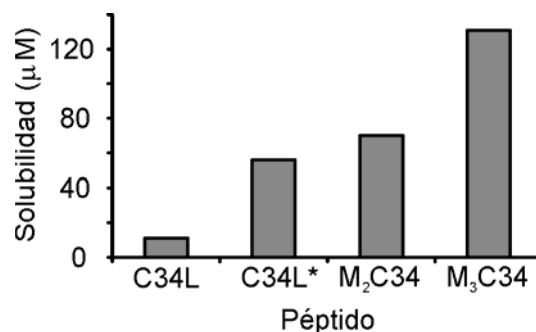
disolución filtrada se obtuvo por análisis de aminoácidos (Figura 17).

**Figura 16. Ensayo de Inhibición de formación de sincitios por parte de C34L, C34L\*, C34D, M<sub>2</sub>C34 y M<sub>3</sub>C34 a diferentes concentraciones desde 10<sup>-7</sup> – 10<sup>-10</sup> M.**



Se encontró el siguiente orden de solubilidad de los péptidos en agua: C34L (11.3  $\mu$ M) < C34L\* (56  $\mu$ M) < M<sub>2</sub>C34 (70  $\mu$ M) < M<sub>3</sub>C34 (131  $\mu$ M). La carga introducida, al dejar el grupo amino terminal libre, aumentó 5 veces la solubilidad respecto a la del péptido acetilado. Sin embargo, esta carga positiva en el extremo N-terminal genera una distorsión en el macrodipolo de la hélice<sup>59</sup>, que probablemente esta asociada a la ligera disminución de la actividad de este péptido (Figura 16). Por otra parte, el grupo acetilo N-terminal puede proteger el péptido a la degradación por exoproteasas, por esta razón se prefirió acetilar los otros péptidos análogos<sup>68,69</sup>. Los péptidos heteroquirales también mostraron mayor solubilidad que C34L. Los péptidos modificados, en la región C-terminal, M<sub>2</sub>C34, y en ambas terminaciones, M<sub>3</sub>C34, mostraron solubilidades 7 y 12 veces mayores a la del péptido natural, respectivamente. Las modificaciones parcial de algunos residuos por D conservó la actividad del C34, y por otro, lado la introducción de residuos con carga incrementó la solubilidad de los análogos heteroquirales.

Figura 17. Solubilidad en agua de los péptidos C34L, C34L\*, M<sub>2</sub>C34 y M<sub>3</sub>C34 a temperatura ambiente (25 °C).



## 1.7. Análisis conformacional de los péptidos por dicroísmo circular

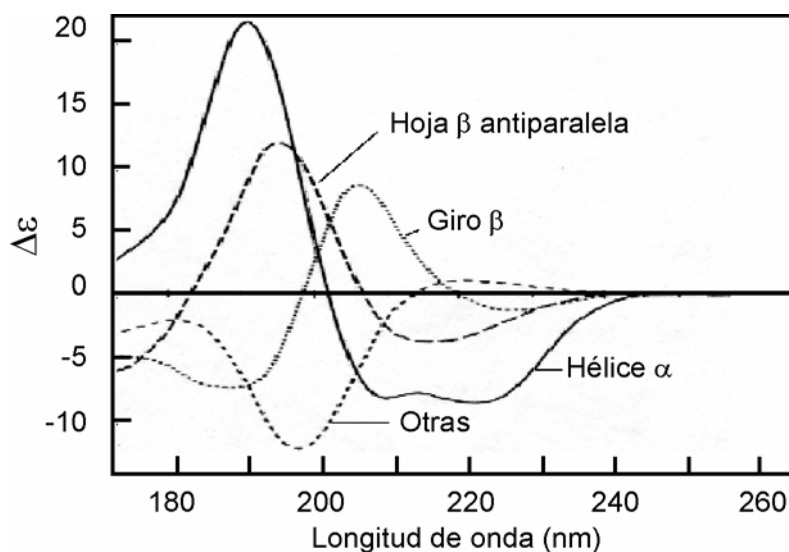
### 1.7.1. Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron con el fin de conocer la estructura secundaria de los análogos de C34. Este tipo de espectropolarimetría mide la absorción diferencial de la luz circularmente polarizada a la derecha respecto a la polarizada hacia la izquierda por parte de moléculas quirales, tales como los aminoácidos y por lo tanto los péptidos. Los espectros de dicroísmo circular permiten no sólo determinar el tipo de estructura secundaria de los péptidos sino que también puede diferenciar entre péptidos compuestos de aminoácidos L (todo-L) de los compuestos por aminoácidos D (todo-D)<sup>70</sup>. Los péptidos estructurados muestran espectros característicos, en el caso de un péptido que posee tendencia a estructurarse en hélice  $\alpha$  el espectro presenta un máximo en 190 y dos mínimos a 208 y 222 nm<sup>71,72</sup> (Figura 18).

La baja solubilidad de C34L en medio acuoso, a pH ácidos o neutros, dificultaba la obtención de su espectro de dicroísmo circular. Sin embargo, la solubilidad del péptido análogo C34\*, con el grupo amino terminal libre, es algo mayor que la del péptido acetilado, e hizo posible obtener disoluciones acuosas hasta una concentración de 56  $\mu$ M. Los espectros de los enantiómeros C34\*, con aminoácidos todo-L y todo-D, se obtuvieron en medio acuoso y con 30% de TFE. Los espectros de los enantiómeros de C34 acetilados se obtuvieron sólo en medio acuoso con 30% de TFE (Figura 19). El espectro de C34\* en medio acuoso (tampón fosfatos 10 mM, KF 50 mM a pH 7,4 y 25°C) mostró un perfil característico de estructura desordenada. Mientras que la disolución con 30% de

trifluoroetanol (TFE) presentó un espectro en donde aparecieron las bandas típicas de hélice  $\alpha$  a 190, 208 y 222 nm (Figura 19). El TFE es un co-solvente que permite observar las tendencias conformacionales de los péptidos<sup>73</sup>. La aparición de estas bandas demuestran la tendencia de este péptido a plegarse en una hélice  $\alpha$ . Por otro lado, el espectro del enantiómero, C34D\*, muestra la imagen especular de los espectros obtenidos para el péptido todo-L. El enantiómero todo-D, al igual que el péptido todo-L, mostró cierta tendencia a encontrarse como una estructura helicoidal; pero al estar compuesto sólo de aminoácidos D, la hélice es levógira, en lugar de dextrógira. Un comportamiento similar se observó en los espectros de los péptidos acetilados, C34L y su enantiómero, lo que puso de manifiesto la alta tendencia conformacional de estos péptido a estructurarse como hélice  $\alpha$ ; la cual es superior a la observada por los péptidos con el grupo amino terminal libre con 30% TFE.

**Figura 18. Espectro de dicroísmo circular de estructuras secundarias puras de péptidos o proteínas<sup>71</sup> ( $\Delta\epsilon$ , dicroísmo circular molar o delta epsilon en  $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )**



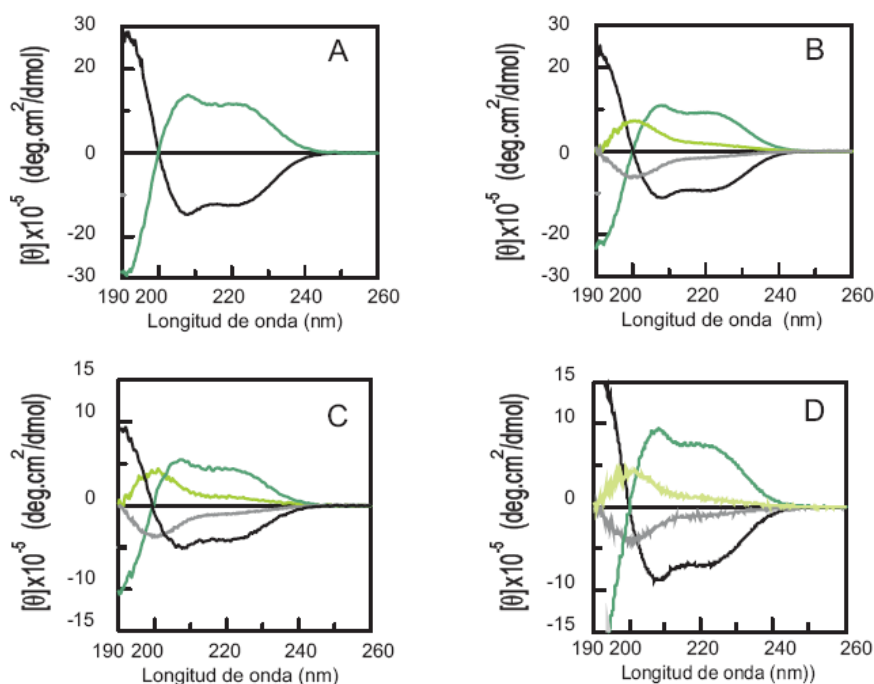
Los análogos con la secuencia invertida de C34, con aminoácidos todo-L y todo-D, RC34L y RC34D, también mostraron tendencia a estar estructurados en hélice  $\alpha$  en disolución acuosa con 30% de TFE (Figura 19). En disolución acuosa estos péptidos se observaron desestructurados. Igualmente, los espectros de los enantiómeros son imágenes especulares entre sí. Se observó que a pesar de la inversión de la secuencia se conservó la tendencia conformacional de estos péptidos, con una leve disminución en la intensidad de la banda a 222 nm.

Igualmente, la otra serie de enantiómeros compuesta por M<sub>1</sub>C34L y M<sub>1</sub>C34D, también mostraron estar desestructurados en medio acuoso y la presencia de TFE produjo un



incremento en la helicidad del sistema (Figura 19). En estos péptidos se conservaron los residuos importantes para la interacción con N36 y se modificaron el resto de la secuencias, para evitar impedimentos estéricos con los residuos del núcleo hidrofóbico. Estas modificaciones generaron un ligero aumento en la helicidad respecto a los péptidos con la secuencia inversa, pero inferior al de la secuencia nativa. En general, se observó que todos los péptidos homoquirales mantuvieron una alta tendencia a encontrarse como estructuras helicoidales.

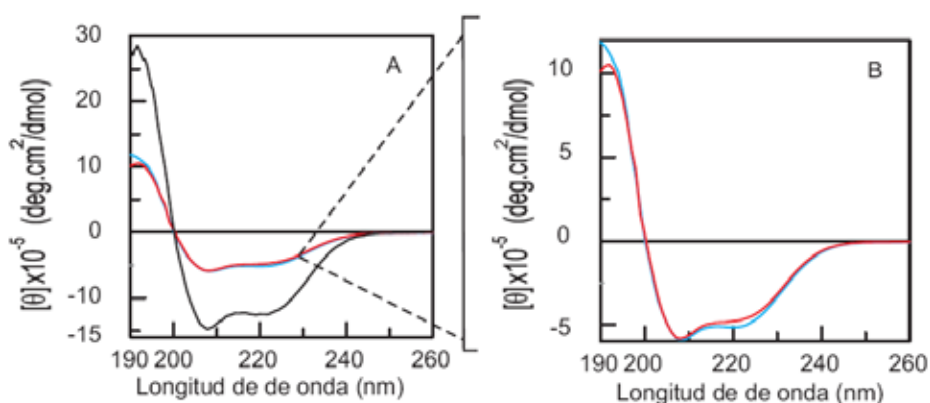
**Figura 19. Espectros de dicroísmo circular de los péptidos con aminoácidos todo-L (negro/gris) y todo-D (verde) en tampón fosfato de potasio 10 mM, KF 50 mM pH 7.4 en ausencia (colores claros) y en presencia de 30% TFE (colores oscuros). A. C34L y C34D. B. C34L\* y C34D\*, sin acetilo N-terminal. C. RC34L y RC34D. D. M<sub>1</sub>C34L y M<sub>1</sub>C34D**



Los péptidos heteroquirales M<sub>2</sub>C34 y M<sub>3</sub>C34, en los cuales se introdujeron D-aminoácidos en las posiciones puntuales terminales de la secuencia, mostraron espectros característicos de estructuras helicoidales dextróginas. Aunque, las bandas a 208 y 222 nm son menos intensas, en general, conservan la tendencia del péptido a estructurarse en hélice  $\alpha$  (Figura 20). Esto demostró que las modificaciones puntuales no afectaron la estructura global del péptido. El efecto que produce la introducción de un aminoácido D en una secuencia depende de la posición de este respecto al resto de residuos; por ejemplo, en péptidos naturales el cambio de quiralidad de un residuo favorece la formación de giros que

estabilizan macrociclos<sup>74</sup>. Por otro lado, en diseño de proteínas se ha demostrado que la modificación de un residuo de Gly, presente en un giro, por D-Ala puede aumentar la estabilidad térmica de la proteína<sup>75</sup>. En este caso, los residuos que se intercambiaron por D-aminoácidos se encontraban en la región C-terminal y/o N-terminal del péptido, y se seleccionaron de forma que se favorecieran interacciones electrostáticas entre cadenas de residuos separados una vuelta de hélice; para no afectar drásticamente la estructura global de los péptidos.

**Figura 20. Espectros de dicroísmo circular de M<sub>2</sub>C34 (azul), M<sub>3</sub>C34 (rojo) y C34L (negro) en disolución 56 μM tampón de fosfatos 10 mM, KF 50 mM a pH 7.4 con 30% de TFE a 25°C (A). A la derecha se realizó una ampliación con sólo los espectros de M<sub>2</sub>C34 (azul) y M<sub>3</sub>C34 (rojo) (B)**

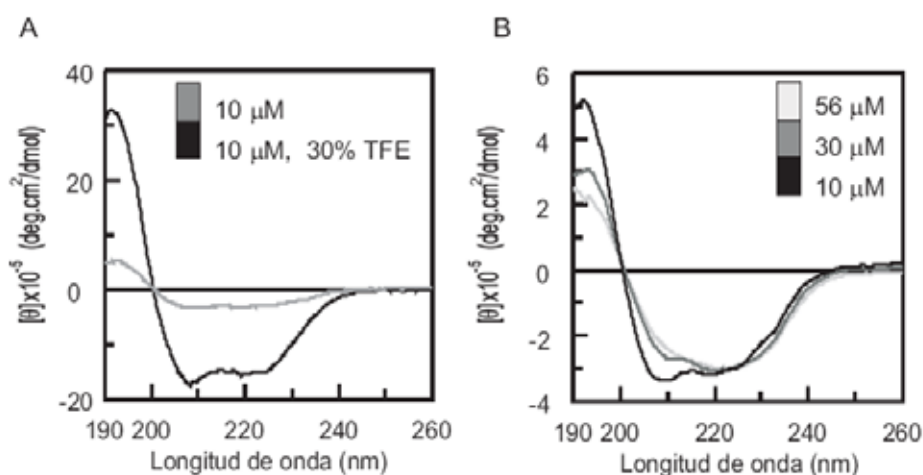


El espectro de N36 también se obtuvo en disolución acuosa en ausencia y presencia de un 30% de TFE. El perfil del espectro cambiaba al incrementar la concentración, esto reveló la tendencia de este péptido a agregarse (Figura 21). La propensión de este péptido a estructurarse en hélice  $\alpha$  se observó en medio acuoso, aun sin TFE. Las bandas características a 208 y 222 nm se encontraron en los todos espectros adquiridos a diferentes concentraciones. Adicionalmente, a concentraciones superiores a 20 mM la banda a 222 nm era más intensa que la banda a 208, lo que confirmaba la presencia de agregados.

Para observar la formación de complejos se obtuvieron los espectros de las disoluciones acuosas de las mezclas equimolares de los péptidos heteroquirales y N36, para ser comparadas con el sistema natural N36/C34L y una mezcla control N36/M<sub>1</sub>C34L. Tanto el sistema nativo, como las mezclas con M<sub>2</sub>C34 y M<sub>3</sub>C34 mostraron espectros en los cuales se observó un aumento considerable de la helicidad respecto a lo obtenido de las disoluciones de los péptidos individuales en medio acuoso (Figura 22). La aparición del máximo a 290 y dos mínimos a 208 y 222 nm, respecto a espectro correspondiente a la suma aritmética de

los espectros individuales, indicaba la formación del complejo con N36. Los espectros de las mezclas entre N36 y los péptidos heteroquirales mostraron bandas menos intensas que las del sistema nativo; pese a esto, la intensidad similar entre las bandas a 208 y 222 nm, indican la presencia de una estructura altamente helicoidal tras la formación del complejo<sup>76</sup>. También se obtuvo el espectro de la mezcla entre N36 y M<sub>1</sub>C34L, para ser usado como control, puesto que se encontró previamente que este péptido era inactivo. En este caso no se observó el desplazamiento de las bandas hacia el perfil característico de hélices  $\alpha$ . Esto demostró que M<sub>1</sub>C34L no interactuaba con N36, para formar complejos estables altamente helicoidales como los formados con C34L y sus análogos heteroquirales.

**Figura 21. Espectros de dicroísmo circular de N36 en en disolución tampón de fosfatos 10 mM, KF 50 mM a pH 7.4 y 25°C. A. Espectros obtenidos con (gris) y sin 3' de TFE (negro). B. espectros obtenidos a diferentes concentraciones de N36 en tampón fosfato (10, 30, 56  $\mu$ M).**



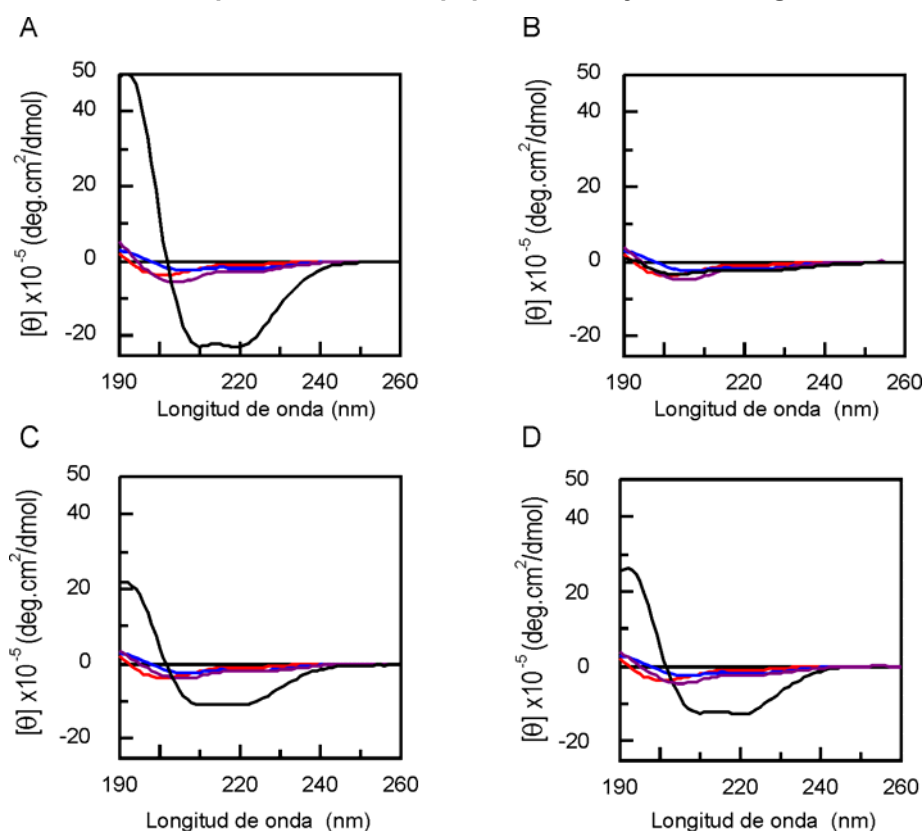
### 1.7.2. Curvas de fusión

Para observar el efecto de estas modificaciones en la estabilidad del complejo se realizaron experimentos de estabilidad térmica siguiendo el cambio en la elipticidad de a 222 nm al incrementar la temperatura. Esto se realizó para las disoluciones de los péptidos individuales C34L y N36 y los complejos de N36 con C34L, M<sub>2</sub>C34 y M<sub>3</sub>C34. La curva de estabilidad de la mezcla entre N36/M<sub>1</sub>C34L se usó como control negativo de la interacción.

Para medir la estabilidad térmica del C34L supervisando el cambio de la elipticidad de la banda a 222 nm, la estructura helicoidal del péptido se indujo adicionando un 30% de TFE a la disolución en tampón fosfato. La transición observada en la desnaturalización del péptido C34L mostró un aumento continuo de la intensidad de la banda a 222 nm, que esta

relacionado con la destrucción del contenido helicoidal del péptido en varios pasos, de forma no cooperativa, a medida que aumenta la temperatura (Figura 23). Por otro lado, la desnaturalización del péptido N36, en tampón con 30% de TFE, mostró una curva diferente, en donde alrededor de 41.0 °C se puede diferenciar una región en la cual hay un cambio importante de elipticidad, aunque sin llegar a distinguirse dos estados. Este comportamiento puede estar relacionado con la tendencia de este péptido a agregarse, de hecho un trímero de N36 se encuentra el núcleo hidrofóbico del complejo con C34L. Para comparar lo obtenido para el complejo entre N36 y C34L se realizó la curva de la mezcla en medio acuoso de N36/M<sub>1</sub>C34L, de la cual previamente se habían observado que no generaba un complejo estable, en este caso la variación con la temperatura era casi constante puesto que en este caso los péptidos se encontraban en gran parte desestructurados en disolución (Figura 23).

**Figura 22. Espectros de dicroísmo circular de disoluciones 10 mM de mezclas equimolares de los péptidos con N36 en disolución tampón de fosfatos 10 mM, KF 50 mM a pH 7.4 y 25°C. Espectros de los péptidos CHR: C34 (A), M<sub>1</sub>C34L (B), M<sub>2</sub>C34 (C), M<sub>3</sub>C34 (D), en rojo. Espectro de N36 en azul. Suma aritmética de los espectros de los péptidos CHR y N36 en violeta. Espectros de las mezclas equimolares de los péptidos CHR y N36 en negro**

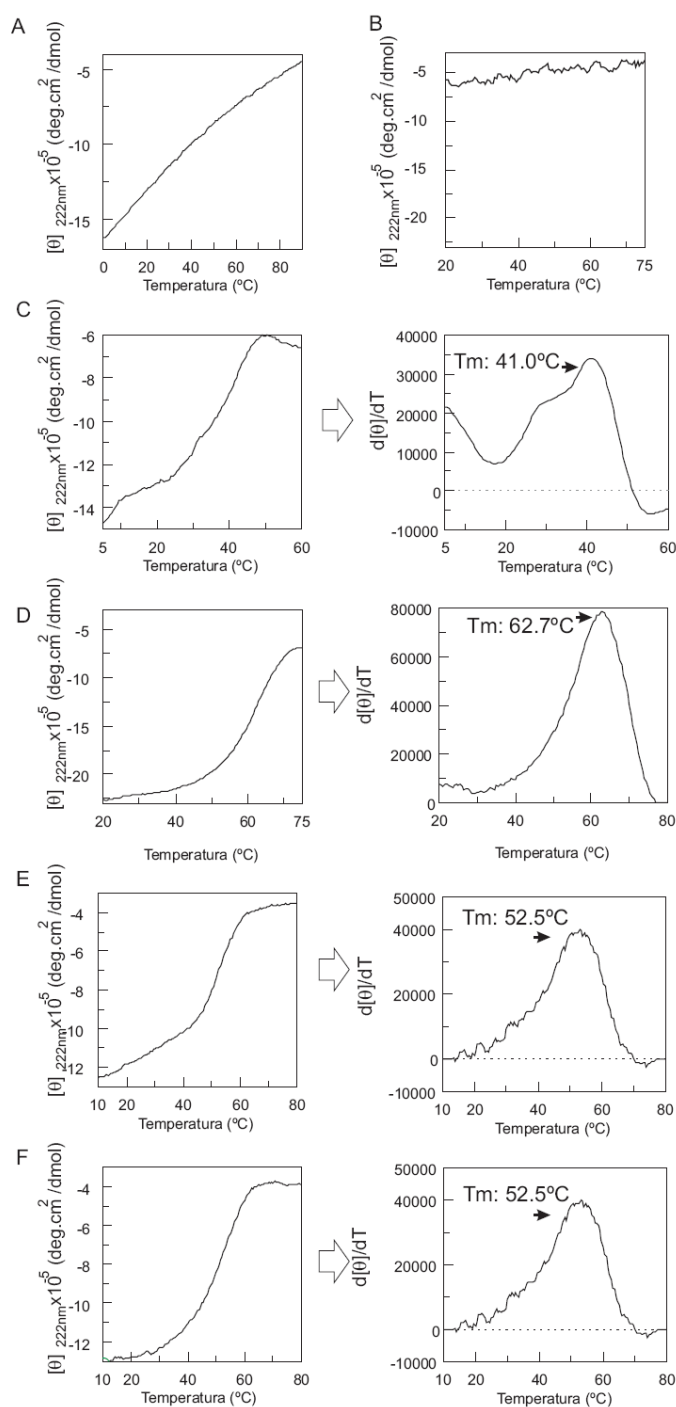


La curva de fusión del complejo N36/C34L mostró una transición importante entre dos

estados que tiene un punto medio o temperatura de fusión a 62.7 °C generando una curva de forma sigmoideal (Figura 23). Este tipo de transición denotaba la alta estabilidad del complejo, otros complejos menos estables sólo muestran una disminución continua del contenido helicoidal que esta relacionado con una transición continua entre el estado asociado y plegado a un estado desplegado (ver capítulo 3). Aunque esta curva de desnaturalización indicó que el este el proceso se da globalmente como una transición cooperativa, al ser un complejo no covalente hay que tener en cuenta que hay dos procesos involucrados, la disociación de cada una de las seis unidades complejo y el desplegamiento de las hélices.

En el caso de los complejos formados entre N36 y los péptidos heteroquirales se obtuvieron curvas similares a la del sistema natural, con una temperatura de fusión igual para los dos análogos de 52.5 °C. Las dos curvas tenían forma sigmoideal, lo que indicaba la cooperatividad del proceso de desnaturalización. Aunque las dos curvas eran similares entre si, en el caso de complejo N36/M<sub>2</sub>C34 la curva muestra una mayor pendiente a temperaturas por debajo de la de fusión, esto puede indicar que hay mas de un estado intermedio en el proceso de desnaturalización. La introducción de las modificaciones adicionales en el extremo N-terminal de M<sub>3</sub>C34 pareció estabilizar los cambios efectuados en el extremo C-terminal en M<sub>2</sub>C34. No obstante, la desnaturalización del complejo N36/M<sub>2</sub>C34 manifestó un cambio importante en la elipticidad cuando la temperatura se aproxima a 52 °C, lo que esta relacionado con un cambio a un estado desestructurado. Aunque los complejos formados son algo menos estables térmicamente que el sistema nativo, mantuvieron gran parte de la cooperatividad en el proceso de desnaturalización. Al comparar lo obtenido para estos complejos con las curvas de los péptidos individuales y la mezcla control N36/M<sub>1</sub>C34L se observó que el complejo formado tiene una estructura bien organizada en disolución acuosa, que no sólo incrementa la helicidad del sistema, sino que también esta relacionada con un incremento en la estabilidad térmica. Los complejos entre N36 y los péptidos heteroquirales son estables a temperatura ambiental y fisiológica.

Figura 23. Curvas de estabilidad térmica inspeccionada por seguimiento de la elipticidad a 222 nm en dicroísmo circular. Curvas de los péptidos C34L (A) y N36 (C) de disoluciones 56  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente, en tampón fosfato 10 mM, KF 10 mM a pH 7.4 y 30% de TFE. Las curvas de los complejos de N36 con C34L (D), M<sub>2</sub>C34 (E) y M<sub>3</sub>C34 (F) se obtuvieron de las disoluciones de las mezclas equimolares a 10  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 10mM, KF 10 mM a pH 7.4. Al lado derecho de cada curva de temperatura se muestra la primera derivada donde el máximo indica la temperatura de fusión. En el panel B se encuentran la curva de fusión de la mezcla equimolar 10  $\mu\text{M}$  de N36 con M<sub>1</sub>C34L en tampón fosfato 10mM, KF 10 mM a pH 7.4



## 1.8. Degradación enzimática con tripsina

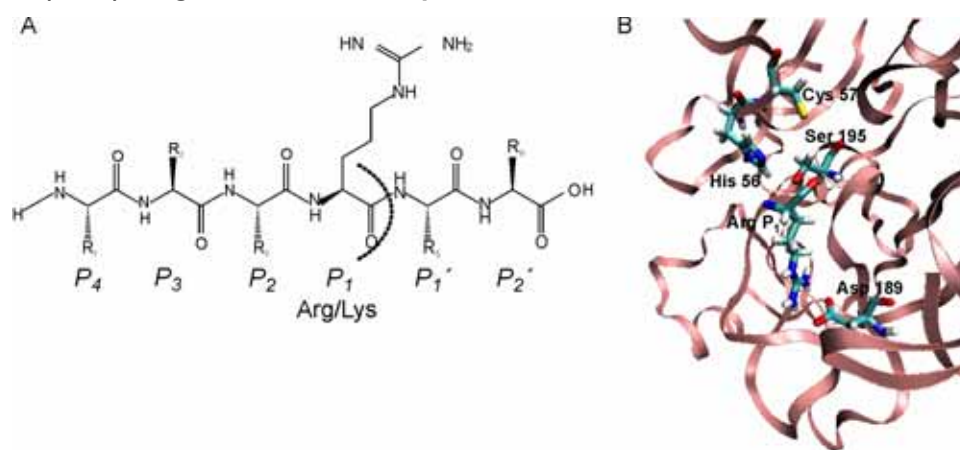
Una de las limitaciones de usar péptidos como medicamentos es la susceptibilidad que tienen a ser degradados por proteasas, lo que disminuye la vida media del producto aumentando la cantidad de compuesto que debe ser administrado para que llegue a ser activo. En el caso de T20 la dosis recomendada es de 180 mg diarios, que deben ser suministrados mediante dos inyecciones subcutáneas<sup>77</sup>. El periodo de eliminación después de ser administrado es de 3.8 h.<sup>78</sup>.

La tripsina es una enzima involucrada en el proceso de digestión de proteínas en el intestino delgado. Esta endoproteasa cataliza la hidrólisis del enlace péptido que se encuentra en el extremo carboxilo de residuos de lisina o arginina (Figura 24), esto es en la posición P1 de acuerdo a la nomenclatura de Scherber & Berger<sup>79</sup> de posiciones de escindibles de sustrato. En el ser humano hay alrededor de 47 proteínas o dominios que pertenecen al grupo de proteasas cuya actividad enzimática esta relacionada con la presencia de un residuo de serina en el centro activo que tiene actividad de tripsina<sup>80,81</sup>. En general, esta reacción se da en dos pasos, en primer lugar se produce un ataque nucleofílico de la serina del sitio activo de la enzima sobre el enlace escindible del sustrato que termina en la formación de un derivado acil-enzima y la liberación del fragmento C-terminal; en un segundo paso el complejo acil-enzima sufre un ataque de una molécula de agua y se libera el fragmento N-terminal. En general se acepta que un residuo de histidina del centro activo actúa como base aceptando un protón y así activar el residuo de serina como nucleofilo<sup>82</sup>. En el caso de la tripsina y la mayoría de proteínas homologas un residuo de aspártico ubicado en la posición 189 es el responsable de establecer un puente salino con la lisina y/o arginina del sustrato, y de esta forma es el responsable de la especificidad de esta enzima<sup>83</sup>.

La estabilidad de los péptidos frente a la tripsina se evaluó controlando la digestión enzimática por RP-HPLC y espectrometría de masas. La reacción enzimática se llevo a cabo usando una relación molar enzima/péptido de 1:1500 en tampón de carbonato de amonio 50 mM a pH 8.5 y 37 °C, condiciones optimas de la actividad de esta enzima. El progreso de la reacción se analizó cada 15 minutos durante la primera hora y posteriormente se tomaron controles más espaciados entre si, el último de obtuvo a las 48 horas. El péptido C34L se degradó inicialmente en tres fragmentos que correspondían a la ruptura de los enlace entre Arg7-Glu8 y entre Lys28-Asn29. A medida que la reacción transcurría se observó el aumento en la de la intensidad de la señal a 15.8 minutos que correspondía al fragmento C-terminal de la escisión del enlace Arg7-Glu8 (Figura 25). Con el tiempo se observó la aparición de la señal que corresponde al fragmento generado por la

ruptura entre los enlaces Arg7-Glu8 y Lys28-Asn29 de masa molecular de 2616. Después de 48 horas, se detectaron en el espectro de masas MALDI-TOF las masas moleculares de los tres fragmentos resultantes del rompimiento de los dos enlaces escindibles. Por otro lado, el enantiómero todo-D en presencia de tripsina permaneció estable a la degradación incluso después de 68 horas (Figura 26).

**Figura 24. Sitio de hidrólisis del sustrato catalizado por tripsina de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Scherber & Berger<sup>79</sup>, donde P1 puede ser arginina o lisina (A). Representación grafica del sitio activo de la tripsina en cintas (ribbons), el residuo del sustrato en la posición P1 y los residuos directamente implicados (His 56, Asp 189 y Ser 195) están representados como palos (stick), el grafico se realizo a partir de PDB 1PQ5<sup>84</sup>**



En las mismas condiciones se realizó la digestión enzimática de M<sub>2</sub>C34 y M<sub>3</sub>C34. El péptido M<sub>2</sub>C34, modificado sólo en la región carboxilo terminal, se degrado más lentamente que el péptido natural. Tras 1 hora gran parte del péptido permaneció sin ser degradado, los fragmentos derivados de la hidrólisis correspondían únicamente a la escisión del enlace entre Arg7-Glu8 (Figura 27). Aun después de 48 horas, el cambio de la quiralidad de los residuos 31 y 27 aumenta la estabilidad del péptido frente a la acción de la enzima. La modificación Glu27D-Glu esta ubicada en la posición P2 (Figura 24) y la modificación Gln31D-Lys se encuentra la posición P1, respecto al sitio de hidrólisis, esto demuestra que el cambio de quiralidad de cualquiera de las posiciones inhibe la acción de esta enzima protegiendo al péptido de la degradación.

En el caso del péptido M<sub>3</sub>C34 se cambio la quiralidad y naturaleza del residuo en la posición 2 (Trp2D-Glu) y también se sustituyó el Glu7 por Lys (Glu7Lys), además de las modificaciones ya realizadas en la región C-terminal de M<sub>2</sub>C34. En este caso, la enzima hidrolizó rápidamente el enlace entre Arg7Lys8 y además el enlace peptídico siguiente entre



los residuos Lys8 y Asn9. La modificación por D-Glu, la cual se realizó para intentar establecer un puente salino con Lys7, no fue suficiente para inhibir la acción enzimática. Así que el cambio Glu7Lys introdujo un sitio más de hidrólisis enzimática. Por otra parte, las modificaciones en la región C-terminal conservaron su resistencia a la ruptura enzimática, incluso después de 48 horas no se observó escisión de los enlace entre Lys28-Asn29 y D-Lys31-Glu32 al igual que lo ya observado para M<sub>2</sub>C34 (Figura 28). De acuerdo a estos resultados se observó que la modificación de la quiralidad de la posiciones P1 y P2, respecto al sitio de hidrólisis, protegieron al péptido de la degradación; sin embargo, una modificación a mayor distancia no afecta la actividad de la tripsina.

**Figura 25. Seguimiento de la digestión con tripsina del péptido C34L (100 uM en tampón carbonato de amonio 50 mM, pH 8.5 a 37 °C). A. Cromatogramas RP-HPLC adquiridos después de parar la reacción enzimática con ácido acético 1M a diferentes tiempos (0, 30 min., 60 min., 5 h) usando un gradiente lineal de 0-70% de ACN con 0.036% de TFA en 30 minutos. Mediante un índice numérico se indica el fragmento peptídico al cual corresponde cada pico en los Cromatogramas. El asterisco muestra las señales de RP-HPLC que dan lugar a la masa molecular del péptido sin degradar. B. Se muestran los espectros de masas MALDI-TOF de la mezcla de reacción al inicio (arriba) y 48 horas después (abajo)**

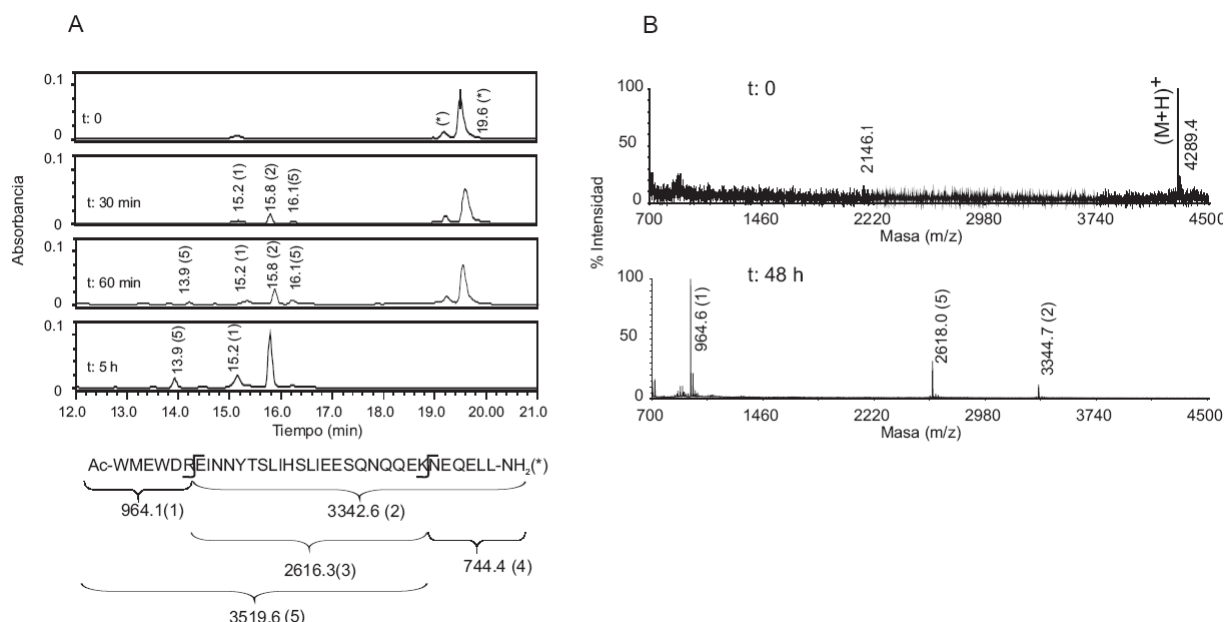


Figura 26. Seguimiento de la digestión con tripsina del péptido C34D (100  $\mu$ M en tampón carbonato de amonio 50 mM, pH 8.5 a 37 °C). A. Cromatogramas RP-HPLC adquiridos después de detener la reacción enzimática con ácido acético 1M a diferentes tiempos (0, 30 min., 60 min., 5 h) eluyendo con un gradiente lineal de 0-70% de ACN con 0.036% de TFA en 30 min. En B se muestran los espectros de masas MALDI-TOF de la mezcla de reacción al inicio (arriba) y 48 horas después (abajo)

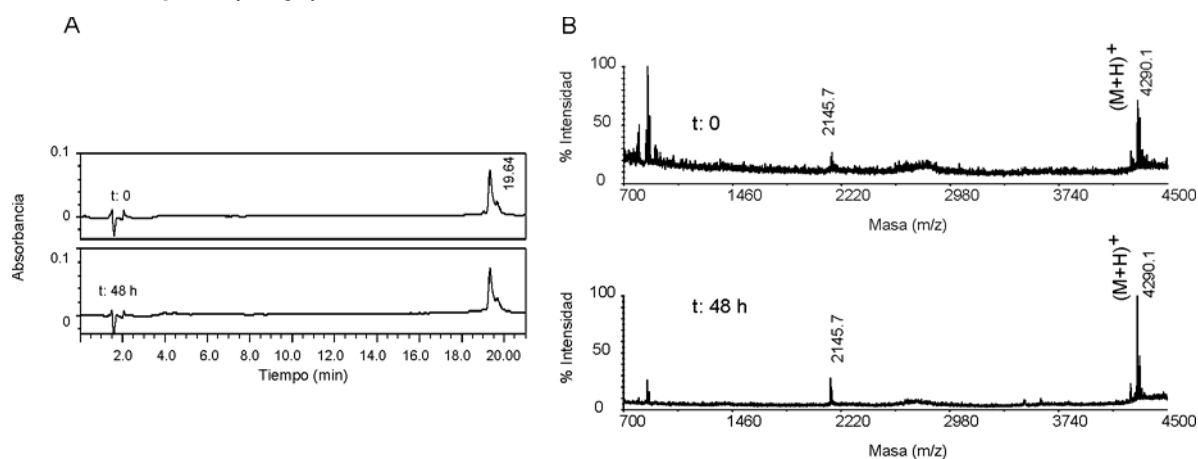
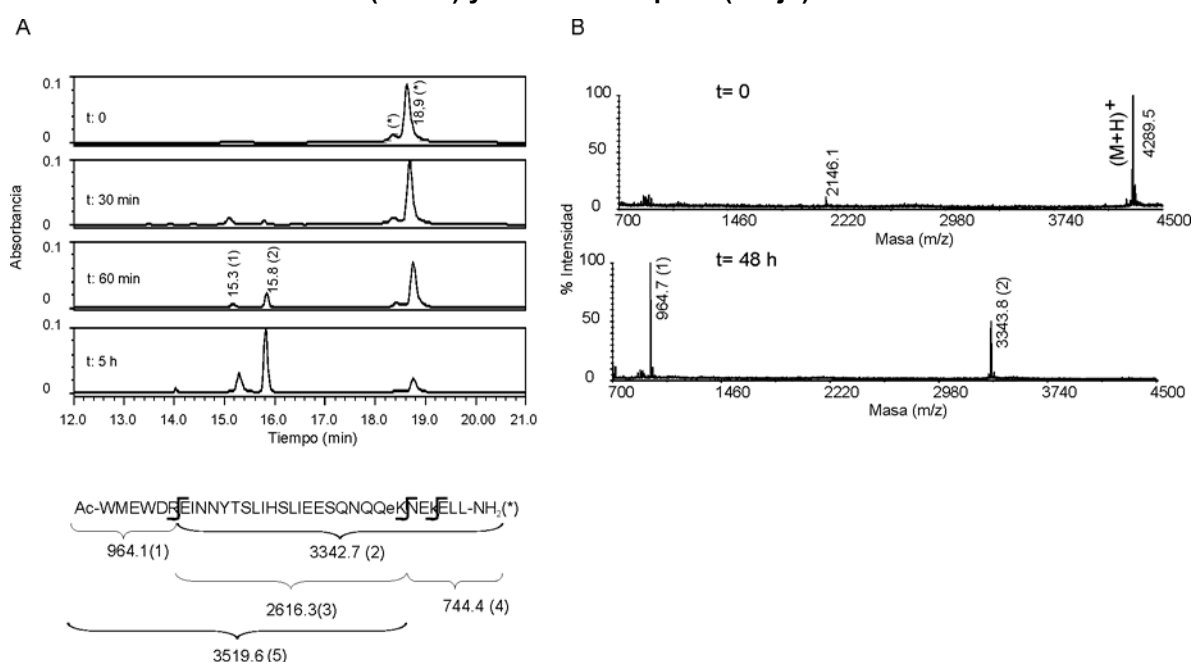
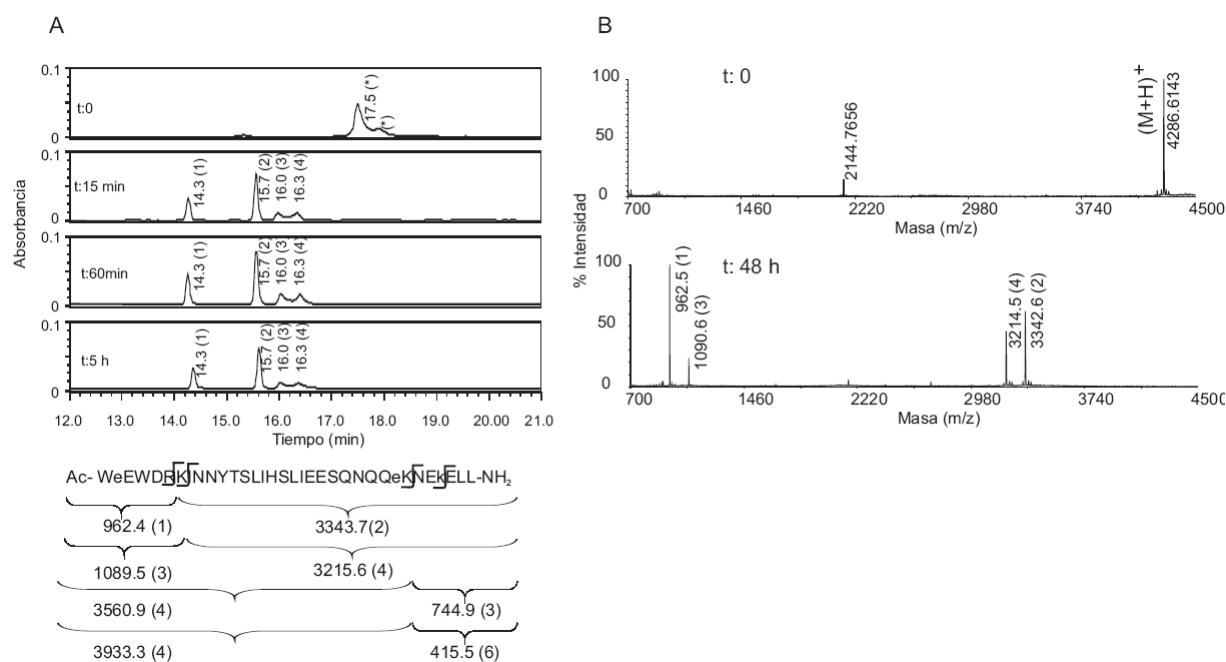


Figura 27. Seguimiento de la digestión con tripsina del péptido M<sub>2</sub>C34 (100  $\mu$ M en tampón carbonato de amonio 50 mM, pH 8.5 a 37 °C). A. Cromatogramas RP-HPLC adquiridos después de parar la reacción enzimática con ácido acético 1M a diferentes tiempos (0, 30 min., 60 min., 5 h) usando un gradiente lineal de 0-70% de ACN con 0.036% de TFA en 30 minutos. Mediante un índice numérico se indica el fragmento peptídico al cual corresponde cada pico en los Cromatogramas. El asterisco muestra las señales de RP-HPLC que dan lugar a la masa molecular del péptido sin degradar. B. Se muestran los espectros de masas MALDI-TOF de la mezcla de reacción al inicio (arriba) y 48 horas después (abajo)



Al tiempo en que la enzima degrada la mitad del péptido se denomina tiempo de vida media. Este tiempo se calculó a partir de la variación de la concentración del sustrato peptídico con el tiempo. La evolución de esta reacción sigue una cinética de primer orden lo que permitió calcular la constante cinética de la reacción. A partir de la constante se calcula el tiempo de vida media como el  $\ln 2/K_e$  (ver 6.6.3). El péptido M<sub>2</sub>C34 tuvo un tiempo de vida media de 133 minutos, casi el doble que el obtenido para el péptido natural ( $t_{1/2}$ =79 min.). Las modificaciones realizadas en la región C-terminal le confirieron a M<sub>2</sub>C34 mayor estabilidad frente a la hidrólisis con tripsina.

**Figura 28. Seguimiento de la digestión con tripsina del péptido M<sub>3</sub>C34 (100 uM en tampón carbonato de amonio 50 mM , pH 8.5 a 37 °C). A. Cromatogramas RP-HPLC adquiridos después de parar la reacción enzimática con ácido acético 1M a diferentes tiempos (0, 30 min., 60 min., 5 h) usando un gradiente lineal de 0-70% de ACN con 0.036% de TFA en 30 minutos. Mediante un índice numérico se indica el fragmento peptídico al cual corresponde cada pico en los Cromatogramas. El asterisco muestra las señales de RP-HPLC que dan lugar a la masa molecular del péptido sin degradar. B. Se muestran los espectros de masas MALDI-TOF de la mezcla de reacción al inicio (arriba) y 48 horas después (abajo)**



## 1.9. Unión entre N36 y los péptidos análogos de C34 por resonancia de plasmon superficial

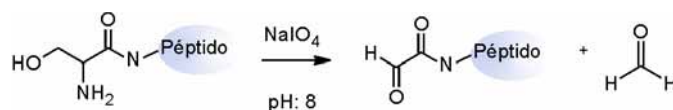
La resonancia de plasmon superficial (RPS) es una técnica que permite medir interacciones en tiempo real entre biomoléculas. Una de las moléculas, el ligando, se inmoviliza sobre la superficie del sensor (chip) y el segundo componente, el analito, se hace pasar en solución a flujo constante sobre la superficie. La unión de las moléculas de analito a la superficie de sensor genera una respuesta que es proporcional a la masa unida<sup>85</sup>. Esta respuesta se mide como un cambio en el índice de refracción del disolvente en la región cercana a la superficie causada por la asociación y disociación de las moléculas que interaccionan<sup>86</sup>.

Para obtener las medidas de SPR, los diferentes péptidos derivados de C34 se hicieron pasar a través de la superficie de un sensor con N36 inmovilizado. Para unir el péptido a la superficie, el residuo de serina N-terminal de N36 se oxidó con periodato para obtener un grupo aldehído, el cual reaccionaría con grupos carbohidrazida previamente unidos a la superficie del sensor. Este método de inmovilización del péptido a la superficie del sensor permitió unir quimiosselectivamente péptido a la superficie dejando libres las cadenas laterales para interaccionar.

### 1.9.1. Inmovilización de N36

Para unir el péptido N36 a la superficie del sensor se sintetizó un análogo modificado con un grupo aldehído en el residuo N-terminal. Los  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos como la serina, la treonina se oxidan en presencia de periodato en medio básico para dar aldehídos<sup>87</sup>. La oxidación de la serina N-terminal de N36, hasta obtener un grupo glioxililo, permitió inmovilizar este ligando selectivamente y evitar interacciones inespecíficas debidas al carácter básico de este péptido con la superficie carboxilometilada de carácter ácido.

**Figura 29. Oxidación de la serina N-terminal de un péptido con periodato de sodio para obtener un glioxilil-péptido.**



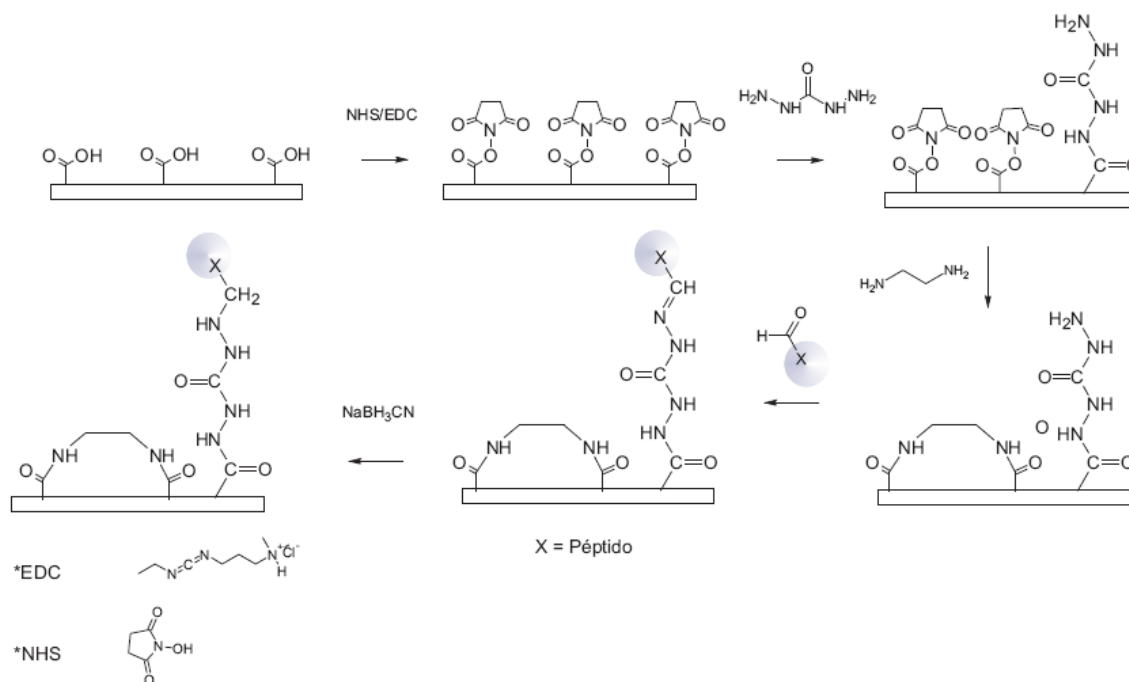
Para unir el ligando en primer lugar se activaron los grupos carboxilos de la superficie derivatizandolos hasta ésteres de N-hidroxisuccinimida. Posteriormente se hizo reaccionar la

superficie con carbohidrazida, la cual se unió a la superficie dejando un grupo hidrazida libre para reaccionar con el grupo glioxililo del ligando. La reacción del aldehído con la hidrazida dio lugar a la formación de un enlace hidrazona. Para evitar la pérdida de ligando, por hidrólisis del enlace hidrazona, este se redujo con cianoborohidruro de sodio. Los puntos del sensor con grupos aun activos se bloquearon con etilendiamina para evitar cargas negativas que conducirían a la asociación no covalente del ligando sobre la superficie.

### 1.9.2. Interacción entre N36 y los péptidos análogos de C34

Las medidas obtenidas de resonancia de plasmon superficial (SPR) permitieron determinar la interacción entre los péptidos en disolución al pasar sobre la superficie del sensor con N36 inmovilizado. Todos los péptidos análogos de C34 interactuaron con el péptido N36, lo que se observó por un aumento en la respuesta de SPR al inyectar las muestras a diferentes concentraciones. El complejo formado fue estable a diferentes condiciones de pH o viscosidad producidas al inyectar HCl 100 mM, NaCl 100 mM y 0.05% de SDS; sin embargo, el complejo pudo disociarse por tratamiento con el surfactante 0.03% de tritón X-100, el cual se empleó para regenerar la superficie al final de cada ciclo.

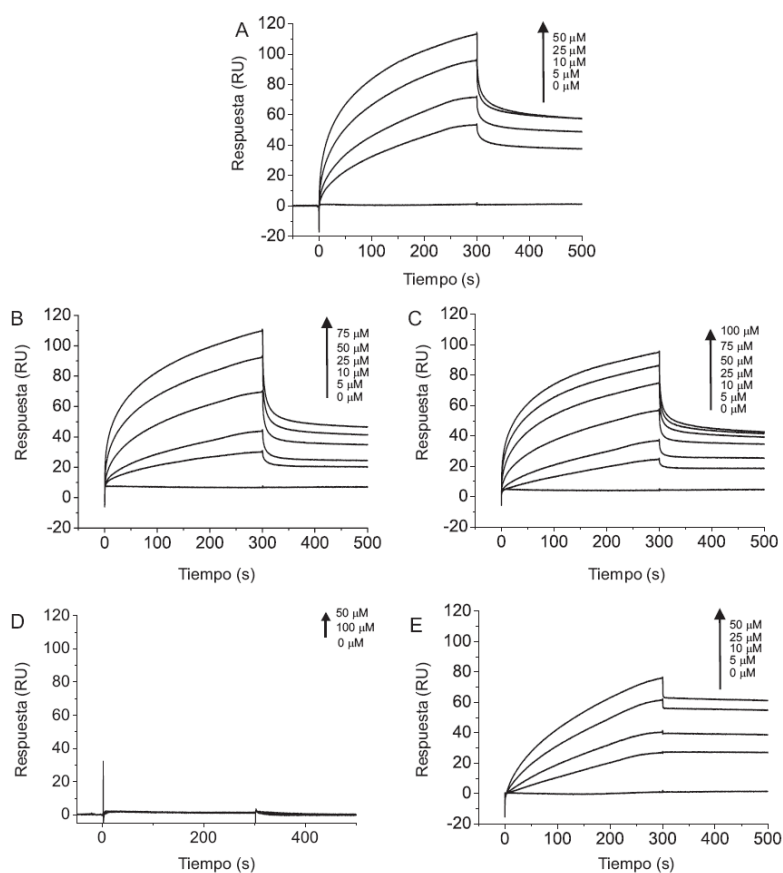
Figura 30. Inmovilización general de aldehídos sobre la superficie de un sensor CM5



Cabe destacar que, C34D fue capaz de interactuar con N36 y el complejo formado se

disociaba lentamente. Esta interacción era altamente dependiente de la concentración salina, por lo que las muestras se disolvieron en tampón con una concentración alta de sales, para evitar interacciones electrostáticas. No obstante, el hecho de que este péptido no inhibiera la fusión en ensayos *in vitro*, mostraba que esta asociación se debía a interacciones no específicas, probablemente entre los residuos básicos de N36 y los ácidos de C34D, y no a la formación de un complejo con una estructura ordenada como en el sistema nativo.

**Figura 31. Sensogramas de la unión entre N36 y los péptidos derivados de C34: C34L\* (A), M<sub>2</sub>C34 (B), M<sub>3</sub>C34 (C), control negativo<sup>9</sup> (D) y C34D\* (E). Los estudios de la interacción fueron realizados sobre un sensor CM5 (Serie S) con OHCCO-N36 inmovilizado usando un grado de inmovilización de 160 RU. Los péptidos se inyectaron en las concentraciones indicadas en la parte superior-derecha de cada conjunto de sensogramas. Cada muestra se inyectó primero durante 300 segundos y posteriormente se detectó la disociación durante al menos 200 segundos. La unión de los péptidos se realizó en tampón de fosfato 10 mM y NaCl 0.5 M usando un flujo de 5 µL/min a 25°C. Se utilizó el análogo de C34L\* con el grupo amino libre terminal libre debido a la insolubilidad del péptido acetilado.**



<sup>9</sup> El péptido control negativo es un péptido con una secuencia no relacionada con HIV-1 (Ac-AQKQASPDALAKNLPKADNASL-NH<sub>2</sub>)

Para calcular las constantes de afinidad y cinéticas se usó el modelo de unión 1:1<sup>88,89</sup>, asumiendo que cada molécula de N36 se asocia con una molécula de péptido en disolución. No obstante, el comportamiento real de la interacción es algo más complejo, puesto que estos péptidos interactúan para formar un haz de seis hélices, donde tres unidades de C34 rodean tres unidades de N36. Por esta razón, las constantes calculadas se consideraron aparentes y su significado es cualitativo (Tabla 5). Los análogos heteroquirales tuvieron una alta afinidad por N36, aunque esta fue inferior a del sistema natural con C34. Comparando el comportamiento de la interacción entre los dos análogos heteroquirales se observó que las modificaciones realizadas en M<sub>3</sub>C34 en la región N-terminal mejoraron la constante de asociación cinética ( $k_{as}$ ) con respecto al análogo M<sub>2</sub>C34 y en consecuencia se incrementó la constante de afinidad por N36. Esta diferencia en la afinidad por N36 de los dos análogos heteroquirales se correlaciona con el aumento en la helicidad y estabilidad térmica de complejo M<sub>3</sub>C34/N36 observado por dicroísmo circular.

**Tabla 5. Constantes aparentes de afinidad y cinéticas de asociación y disociación de las interacciones entre N36 y los péptidos derivados de C34 ((C34L\*, C34D\*, M<sub>2</sub>C34, M<sub>3</sub>C34).**

	$k_{as}$ (1/Ms)	$k_{dis}$ (1/s)	$K_A$ (1/M)	$K_D$ (M)	$\chi^2$
C34L*	$5.56 \times 10^2$	$7.50 \times 10^{-3}$	$7.41 \times 10^4$	$1.35 \times 10^{-5}$	4.74
M <sub>2</sub> C34	$0.62 \times 10^2$	$1.97 \times 10^{-2}$	$3.15 \times 10^3$	$3.18 \times 10^{-4}$	4.31
M <sub>3</sub> C34	$1.91 \times 10^2$	$1.12 \times 10^{-2}$	$1.70 \times 10^4$	$5.88 \times 10^{-5}$	1.91
C34D*	$2.57 \times 10^2$	$3.73 \times 10^{-3}$	$6.90 \times 10^4$	$1.45 \times 10^{-5}$	0.885

## 1.10. Conclusiones

En la síntesis de los péptidos análogos de C34 y N36 se identificaron las reacciones laterales que tenían mayor influencia en el rendimiento final. En el caso de los análogos con la secuencia inversa de C34 se observó que la oxidación del residuo de Met2 hasta sulfóxido redujo el rendimiento de la síntesis a la mitad, este subproducto se minimizó al realizar la acetilación del grupo amino terminal y la escisión del péptido de la resina en atmósfera saturada de nitrógeno. En el caso de la síntesis de N36 se encontró el acoplamiento incompleto de la Ile34, la adición de un segundo ciclo de reacción mejoró notablemente los rendimientos finales de la síntesis.

El cambio de quiralidad de todos los aminoácidos genera la pérdida de la capacidad del péptido de inhibir la fusión del virus. Aunque C34D tenga tendencia a organizarse en una

conformación helicoidal, este enantiómero es incapaz de inhibir la fusión en los ensayos con células. El cambio de estereoquímica de los centros quirales genera una distribución espacial de las cadenas laterales del péptido, en sentido contrario a las del péptido natural. Igualmente, los péptidos isómeros con la secuencia invertida (*retro-* y *retroenatio-*) aunque tienen tendencia a estructurarse en hélices son inactivos.

Los péptidos heteroquirales, con modificaciones parciales por D aminoácidos mantienen la habilidad de inhibir la fusión en los ensayos de replicación viral y de formación de sincitios. Las modificaciones en la región C-terminal de péptido protegen de la ruptura catalítica, por parte de tripsina, de los enlaces formados entre los residuos Lys28-Asn29 y D-Lys31-Glu32. Los péptidos diseñados conservaron la distribución espacial de los residuos más importantes para la interacción y sólo se modificaron los residuos ubicados fuera de núcleo hidrofóbico en los extremos terminales. Esto hizo posible introducir cambios de quiralidad de residuos puntuales aumentando la solubilidad y manteniendo tanto la estructura secundaria como la actividad de los péptidos.

## Bibliografía

- (1) Gallo, R. C.; Sarin, P. S.; Gelmann, E. P.; Robert-Guroff, M.; Richardson, E. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, *220*, 865-867.
- (2) Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, *220*, 868-871.
- (3) UNAIDS/WHO *AIDS epidemic update*, 2006.
- (4) Hoffmann, C.; Rockstroh, J. K.; Kamps, B. S. *HIV Medicine 2006*; Flying Publisher: Paris, Cagliari, Wuppertal, 2006; 826.
- (5) Pommier, Y.; Johnson, A. A.; Marchand, C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, *4*, 236-248.
- (6) Dorr, P.; Westby, M.; Dobbs, S.; Griffin, P.; Irvine, B. et al. 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.* **2005**, *49*, 4721-4732.
- (7) FUZEON Injection Instructions: <http://www.fuzeon.com/pdfs/pii.pdf>.
- (8) Earl, P. L.; Doms, R. W.; Moss, B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1990**, *87*, 648-652.
- (9) Yang, X.; Kurteva, S.; Ren, X.; Lee, S.; Sodroski, J. Stoichiometry of envelope glycoprotein trimers in the entry of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **2005**, *79*, 12132-12147.
- (10) Gallaher, W. R.; Ball, J. M.; Garry, R. F.; Griffin, M. C.; Montelaro, R. C. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1989**, *5*, 431-440.
- (11) Earl, P. L.; Doms, R. W.; Moss, B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1990**, *87*, 648-652.



- (12) Sougrat, R.; Bartesaghi, A.; Lifson, J. D.; Bennett, A. E.; Bess, J. W. et al. Electron tomography of the contact between T cells and SIV/HIV-1: implications for viral entry. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e63.
- (13) Feng, Y.; Broder, C. C.; Kennedy, P. E.; Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **1996**, *272*, 872-877.
- (14) Alkhatib, G.; Combadiere, C.; Broder, C. C.; Feng, Y.; Kennedy, P. E. et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **1996**, *272*, 1955-1958.
- (15) Barbouche, R.; Miquelis, R.; Jones, I. M.; Fenouillet, E. Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of two disulfide bonds of HIV envelope glycoprotein 120 occurs post-CXCR4 binding and is required for fusion. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 3131-3136.
- (16) Eckert, D.; Kim, P. S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 777-810.
- (17) Chan, D. C.; Fass, D.; Berger, J. M.; Kim, P. S. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **1997**, *89*, 263-273.
- (18) Mkrtchyan, S. R.; Markosyan, R. M.; Eadon, M. T.; Moore, J. P.; Melikyan, G. B. et al. Ternary complex formation of human immunodeficiency virus type 1 Env, CD4, and chemokine receptor captured as an intermediate of membrane fusion. *J. Virol.* **2005**, *79*, 11161-11169.
- (19) Lu, M.; Blacklow, S. C.; Kim, P. S. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 1075-1082.
- (20) Lu, M.; Kim, P. S. A trimeric structural subdomain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1997**, *15*, 465-471.
- (21) Eckert, D. M.; Kim, P. S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 777-810.
- (22) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Molec. Graphics* **1996**, *14*, 33-38.
- (23) Schiffer, M.; Edmundson, A. B. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* **1967**, *7*, 121-135.
- (24) Kilby, J. M.; Eron, J. J. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 2228-2238.
- (25) Schacker, T.; Coombs, R. W.; Collier, A. C.; Zeh, J. E.; Fox, I. et al. The effects of high-dose recombinant soluble CD4 on human immunodeficiency virus type 1 viremia. *J. Infect. Dis.* **1994**, *169*, 37-40.
- (26) Kuritzkes, D. R.; Jacobson, J.; Powderly, W. G.; Godofsky, E.; DeJesus, E. et al. Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1. *J. Infect. Dis.* **2004**, *189*, 286-291.
- (27) Bell, T. W.; Anugu, S.; Bailey, P.; Catalano, V. J.; Dey, K. et al. Synthesis and structure-activity relationship studies of CD4 down-modulating cyclotriazadisulfonamide (CADA) analogues. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1291-1312.
- (28) Cummins, J. E., Jr.; Guarner, J.; Flowers, L.; Guenthner, P. C.; Bartlett, J. et al. Preclinical testing of candidate topical microbicides for anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and tissue toxicity in a human cervical explant culture. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2007**, *51*, 1770-1779.
- (29) Mayer, K. H.; Karim, S. A.; Kelly, C.; Maslankowski, L.; Rees, H. et al. Safety and tolerability of vaginal PRO 2000 gel in sexually active HIV-uninfected and abstinent HIV-infected women. *Aids* **2003**, *17*, 321-329.
- (30) Tagat, J. R.; McCombie, S. W.; Nazareno, D.; Labroli, M. A.; Xiao, Y. et al. Piperazine-based CCR5 antagonists as HIV-1 inhibitors. IV. Discovery of 1-[(4,6-dimethyl-5-pyrimidinyl)carbonyl]- 4-[4-[2-methoxy-1(R)-4-(trifluoromethyl)phenyl]ethyl-3(S)-methyl-1-piperaz inyl]- 4-methylpiperidine (Sch-417690/Sch-D), a potent, highly selective, and orally bioavailable CCR5 antagonist. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2405-2408.

- (31) Maeda, K.; Nakata, H.; Koh, Y.; Miyakawa, T.; Ogata, H. et al. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J. Virol.* **2004**, *78*, 8654-8662.
- (32) Seto, M.; Aikawa, K.; Miyamoto, N.; Aramaki, Y.; Kanzaki, N. et al. Highly potent and orally active CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents: synthesis and biological activities of 1-benzazocine derivatives containing a sulfoxide moiety. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2037-2048.
- (33) Wild, C. T.; Shugars, D. C.; Greenwell, T. K.; McDanal, C. B.; Matthews, T. J. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1994**, *91*, 9770-9774.
- (34) Wild, C.; Dubay, J. W.; Greenwell, T.; Baird, T., Jr.; Oas, T. G. et al. Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1994**, *91*, 12676-12680.
- (35) Kliger, Y.; Shai, Y. Inhibition of HIV-1 entry before gp41 folds into its fusion-active conformation. *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 163-168.
- (36) Sugaya, M.; Hartley, O.; Root, M. J.; Blauvelt, A. C34, a membrane fusion inhibitor, blocks HIV infection of Langerhans cells and viral transmission to T cells. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 1436-1443.
- (37) Bolognesi, D. P.; Matthews, T. J.; Wild, C. T. Synthetic peptide inhibitor of HIV transmission. In *USPTO*; US patent 5464933: USA, 1995.
- (38) Liu, S.; Lu, H.; Niu, J.; Xu, Y.; Wu, S. et al. Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 11259-11273.
- (39) Reeves, J. D.; Miamidian, J. L.; Biscone, M. J.; Lee, F. H.; Ahmad, N. et al. Impact of mutations in the coreceptor binding site on human immunodeficiency virus type 1 fusion, infection, and entry inhibitor sensitivity. *J. Virol.* **2004**, *78*, 5476-5485.
- (40) Kliger, Y.; Gallo, S. A.; Peisajovich, S. G.; Munoz-Barroso, I.; Avkin, S. et al. Mode of action of an antiviral peptide from HIV-1. Inhibition at a post-lipid mixing stage. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 1391-1397.
- (41) Rimsky, L. T.; Shugars, D. C.; Matthews, T. J. Determinants of Human Immunodeficiency Virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J. Virol.* **1998**, *72*, 986-993.
- (42) Xu, L.; Pozniak, A.; Wildfire, A.; Stanfield-Oakley, S. A.; Mosier, S. M. et al. Emergence and evolution of enfuvirtide resistance following long-term therapy involves heptad repeat 2 mutations within gp41. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2005**, *49*, 1113-1119.
- (43) Lalezari, J. P.; Bellos, N. C.; Sathasivam, K.; Richmond, G. J.; Cohen, C. J. et al. T-1249 retains potent antiretroviral activity in patients who had experienced virological failure while on an enfuvirtide-containing treatment regimen. *J. Infect. Dis.* **2005**, *191*, 1155-1163.
- (44) Veiga, S. A.; Santos, N. C.; Loura, L. M. S.; Fedorov, A.; Castanho, M. A. R. B. HIV fusion inhibitor peptide T-1249 is able to insert or absorb to lipidic bilayers. Putative correlation with improved efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14758-14763.
- (45) T-1249 development hits a snag. *AIDS Clin Care* **2004**, *16*, 15.
- (46) Chinnadurai, R.; Rajan, D.; Munch, J.; Kirchoff, F. Human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to first- and second-generation fusion inhibitors and cytopathic in ex vivo human lymphoid tissue. *J. Virol.* **2007**, *81*, 6563-6572.
- (47) Davison, D. K.; Medinas, R. J.; Mosier, S. M.; Bowling, T. S.; Delmedico, M. K. et al. New fusion inhibitor peptides, TRI-999 and TRI-1144, are potent inhibitors of enfuvirtide and T-1249 resistant isolates. *XVI International AIDS Conference; Conference Reports for NATAP: Toronto, Canada, August 13 - 18, 2006.*

- (48) Bai, X.; Wilson, K. L.; Davison, D. K.; Medinas, R.; Freel, S. A. et al. Structural analysis of the fusion inhibitor TRI-1144 in complex with an HR1 containing the enfuvirtide resistance mutation N43D suggests a mechanism for activity against F1-resistan virus. *Antiviral. therapy.* **2007**, *12*, S136.
- (49) Otaka, A.; Nakamura, M.; Nameki, D.; Kodama, E.; Uchiyama, S. et al. Remodeling of gp41-C34 peptide leads to highly effective inhibitors of the fusion of HIV-1 with target cells. *Angew. Chem. Int .Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2937-2940.
- (50) Samanen, J.; Narindray, D.; Adams, W., Jr.; Cash, T.; Yellin, T. et al. Effects of D-amino acid substitution on antagonist activities of angiotensin II analogues. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 510-516.
- (51) Hong, S. Y.; Oh, J. E.; Lee, K. H. Effect of D-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 1775-1780.
- (52) Tugyi, R.; Uray, K.; Ivan, D.; Fellingner, E.; Perkins, A. et al. Partial D-amino acid substitution: Improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2005**, *102*, 413-418.
- (53) Haack, T.; González, M. J.; Sánchez, Y.; Giral, E. D-Amino acids in protein de novo design. II. Protein-diastereomerism versus protein-enantiomerism. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **1997**, *4*, 377-386.
- (54) Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput.Chem.* **2007**, *28*, 1145-1152.
- (55) Marqusee, S.; Baldwin, R. L. Helix stabilization by Glu...Lys+ salt bridges in short peptides of de novo design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1987**, *84*, 8898-8902.
- (56) Ghosh, T.; Garde, S.; García, A. E. Role of backbone hydration and salt-bridge formation in stability of  $\alpha$ -helix in solution. *Biophysic. J.* **2003**, *85*, 3187-3193.
- (57) Errington, N.; Doig, A. J. A phosphoserine-lysine salt bridge within an  $\alpha$ -helical peptide, the strongest  $\alpha$ -helix side-chain interaction measured to date. *Biochemistry* **2005**, *44*, 10449-10456.
- (58) Blanes-Mira, C.; Pastor, M. T.; Valera, E.; Fernández-Ballester, G.; Merino, J. M. et al. Identification of SNARE complex modulators that inhibit exocytosis from an  $\alpha$ -helix-constrained combinatorial library. *Biochem. J.* **2003**, *375*, 159-166.
- (59) Richardson, J.; Richardson, D. Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. *Science* **1988**, 1648-1652.
- (60) Joshi, H. V.; Meier, M. S. The effect of a peptide helix macrodipole on the pK<sub>a</sub> of an Asp side chain carboxylate. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12038-12044.
- (61) Gerber, D.; Quintana, F. J.; Bloch, I.; Cohen, I. R.; Shai, Y. D-enantiomer peptide of the TCR $\alpha$  transmembrane domain inhibits T-cell activation in vitro and in vivo. *Faseb J.* **2005**, *19*, 1190-1192.
- (62) Sakurai, K.; Chung, H. S.; Kahne, D. Use of a Retroinverso p53 Peptide as an Inhibitor of MDM2. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16288-16289.
- (63) Merrifield, R. B.; Juvvadi, P.; Andreu, D.; Ubach, J.; Boman, A. et al. Retro and retroenantio analogs of cecropin-melittin hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1995**, *92*, 3449-3453.
- (64) Chorev, M. The partial retro-inverso modification: a road traveled together. *Biopolymers* **2005**, *80*, 67-84.
- (65) Ferri, K. F.; Jacotot, E.; Blanco, J.; Este, J. A.; Zamzami, N. et al. Apoptosis Control in Syncytia Induced by the HIV Type 1-Envelope Glycoprotein Complex: Role of Mitochondria and Caspases. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1081-1092.
- (66) Lifson, J. D.; Reyes, G. R.; McGrath, M. S.; Stein, B. S.; Engleman, E. G. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* **1986**, *232*, 1123-1127.
- (67) Richman, D. D.; Bozzette, S. A. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J. Infect. Dis.* **1994**, *169*,

- 968-974.
- (68) Bergmann, M.; Ross, W. F. On proteolytic enzymes. X. The enzymes of papain and their activation. *J. Biol. Chem.* **1936**, *114*, 717-726.
- (69) Dong, X.; An, B.; Salvucci Kierstead, L.; Storkus, W. J.; Amoscato, A. A. et al. Modification of the amino terminus of a class II epitope confers resistance to degradation by CD13 on dendritic cells and enhances presentation to T cells. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 129-135.
- (70) Greenfield, N. J. Analysis of circular dichroism data. *Methods Enzymol.* **2004**, *383*, 282-317.
- (71) Brahms, S.; Brahms, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.* **1980**, *138*, 149-178.
- (72) Moffitt, W. Buscar. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1956**, *42*, 736-746.
- (73) Starzyk, A.; Barber-Armstrong, W.; Sridharan, M.; Decatur, S. M. Spectroscopic evidence for backbone desolvation of helical peptides by 2,2,2-trifluoroethanol: an isotope-edited FTIR study. *Biochemistry* **2005**, *44*, 369-376.
- (74) Ottiger, M.; Zerbe, O.; Guntert, P.; Wuthrich, K. The NMR solution conformation of unligated human cyclophilin A. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 64-81.
- (75) Anil, B.; Craig-Schapiro, R.; Raleigh, D. P. Design of a hyperstable protein by rational consideration of unfolded state interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3144-3145.
- (76) Zhou, N. E.; Kay, C. M.; Hodges, R. S. Synthetic model proteins. Positional effects of interchain hydrophobic interactions on stability of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2664-2670.
- (77) Fletcher, C. V. Enfuvirtide, a new drug for HIV infection. *The Lancet* **2003**, *361*, 1577-1578.
- (78) Patel, I. H.; Zhang, X.; Nieforth, K.; Salgo, M.; Buss, N. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug interaction potential of enfuvirtide. *Clin. Pharmacokinet.* **2005**, *44*, 175-186.
- (79) Schechter, I.; Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157-162.
- (80) Murzin, A. G.; Brenner, S. E.; Hubbard, T.; Chothia, C. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*.
- (81) Murzin, A. G.; Chandonia, J. M.; Andreeva, A.; Howorth, D.; Lo Conte, L. et al. SCOP: Structural Classification of Proteins: <http://scop.mrc-mb.cam.ac.uk/scop/data/scop.b.c.he.b.c.html>; 1.71 ed., 2006.
- (82) Radisky, E. S.; Lee, J. M.; Lu, C. J.; Koshland, D. E., Jr. Insights into the serine protease mechanism from atomic resolution structures of trypsin reaction intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2006**, *103*, 6835-6840.
- (83) Gráf, L.; Jancsó, A.; Szilágyi, L.; Hegyi, G.; Pintér, K. et al. Electrostatic complementarity within the substrate-binding pocket of trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1988**, *85*, 4961-4965.
- (84) Schmidt, A.; Jelsch, C.; Ostergaard, P.; Rypniewski, W.; Lamzin, V. S. Trypsin revisited: crystallography AT (SUB) atomic resolution and quantum chemistry revealing details of catalysis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 43357-43362.
- (85) Karlsson, R.; Ståhlberg, R. Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities. *Anal. Biochem.* **1995**, *228*, 274-280.
- (86) Fägerstam, L. G.; Frostell-Karlsson, A.; Karlsson, R.; Persson, B.; Ronnberg, I. Bioespecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J. Chromatogr.* **1992**, *597*, 397-410.
- (87) Clamp, J. R.; Hough, L. The periodate oxidation of amino acids with reference to studies on glycoproteins. *Biochem. J.* **1965**, *94*, 17-24.

- (88) Karlsson, R.; Roos, H.; Fägerstam, L. G.; Persson, B. Kinetic and Concentration Analysis Using BIA Technology. *Methods* **1994**, *6*, 99-110.
- (89) Khalifa, M. B.; Choulier, L.; Lortat-Jacob, H.; Altschuh, D.; Vernet, T. BIACORE data processing: an evaluation of the global fitting procedure. *Anal. Biochem.* **2001**, *293*, 194-203.