



**Universitat Ramon Llull**

## TESI DOCTORAL

Títol	Disseny i síntesi de noves quimioteques de potencials inhibidors d'entrada del VIH
Realitzada per	Laia Ros i Blanco
en el Centre	IQS
i en el Departament	Química Orgànica
Dirigida per	Dr. Jordi Teixidó i Closa i Dr. José I. Borrell Bilbao







Als meus pares i germà.

A l'avi, sempre present.

Al record dels que ens falten.

A en G.



So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,  
man muss sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen  
das Möglichste getan hat.

*Italienische Reise, 1787*  
*Wolfgang von Goethe, 1749-1832*





## **Breus reflexions i agraïments**

Posar-se a escriure una pàgina tan difícil com aquesta és gairebé tant repte com va ser començar la tesi. Ara que sembla que aquesta etapa comença a tenir un final, després de molt temps i la motxilla plena, trobar la paraula adient per crear uns paràgrafs tan sentits com realment es viuen no té res de fàcil. Espero, tot i la por de deixar-me algú a qui la manca d'uns mots pugui doldre, saber reflectir el que serà, segur, més que un recull de sensacions momentànies.

He de començar, sens dubte, pels meus pares, amb qui he viscut les grans experiències de la vida. Per totes les oportunitats, pels esforços, pel vostre suport, per les sorpreses. Per tot allò que poques vegades he pogut agrair-vos i que mai us agrairé prou. Gràcies per una caixa plena de moments que m'han fet créixer en tots sentits.

A en Xavier, més que un germà, per la confiança i l'estimació; perquè sempre sabrem que l'altre hi serà, pel que calgui, quan calgui. Per fer-me descobrir què és compartir, en tots els sentits, i en qualsevol moment i perquè no necessitem paraules. Perquè la teva il·lusió és un exemple de lluita per allò hom desitja; mai no defalleixis.

A en Roger, per tot allò que no puc descriure. Per ser-hi, per escoltar-me, per entendre'm, pel teu suport incondicional i els teus sacs de paciència. Per tot el que hem viscut i el que encara no coneixem. Per fer-me tocar de peus a terra i volar de tant en tant, com la nena que tant m'agrada ser. Gràcies per donar-me la mà en aquest camí tan difícil,  $\tau^2 = \frac{1}{\omega} \theta$  !

A l'avi, aquella espelma sempre present que no deixa d'il·luminar un camí que no pot tornar-se fosc. Un petó per a tots, us trobem a faltar.

A tota la meva família, propera, llunyana i la que serà, per la curiositat de saber "com va" i "quant queda" (cada dia un dia menys ☺). Gràcies pel vostre recolzament, ànims, somriures, notícies i al·lucinacions amb el que faig. Espero seguir tenint la capacitat de sorprendre-us.

Als amics: tan de bo no es perdi mai l'amistat, perquè el món encara ha de descobrir què és. Especialment als Pessigollers, per les trobades, les excursions, les sorpreses i tot el que espero que vindrà, perquè us fa tanta il·lusió com a mi. Als Pompeu, inclosa la més "pitinconeta", perquè m'ha encantat reprendre el contacte que tant enyorava. Segur que tindrem motius per fer-lo més intens encara. Gràcies, sobretot, a la Laiona i en Toni, pel vostre suport en tot, per l'enveja i la referència. Perquè el cercle de la vida no deixi de fer-nos emocionar plegats. A l'Àstrid i l'Oriol, ja m'impacienta conèixer en Josep. Espero que no perdem la il·lusió de buscar forats; ànims tant pels nous projectes com pels que han d'acabar.

I a aquells amics que, per motius diversos, hem començat a veure menys però que recordo més que sovint. Espero que acabar etapes ens ajudi a recuperar les estones perdudes. Un record als amics de Mataró, als companys de Diaula, als antics ESB, a en Marc, la Digna i tota la colla de ballarines... La propera vegada que organitzem quelcom segur que tinc notícies: us les dec.

Una etapa important tant en fets com en temps l'he viscuda al que, per nosaltres, sempre serà "el Químic". El meu més sincer agraïment als meus directors de tesi, tant per les estones amb barret de directors, com de professors o d'amics. Hem compartit tantes coses que se'm fa difícil triar-ne alguna. A en Jordi, pels grans moments a dins i fora de l'IQS, per les lletres i el suport. A l'Iñaki per la gran oportunitat de descobrir la docència amb totes les lletres, i per creure-me'n capaç. Gràcies també en

aquest sentit, a la Direcció i al Deganat de l'IQS per la confiança durant aquell temps: segur que no el podré oblidar. Igualment, un agraïment al Dr. Batllori, pel recolzament en la responsabilitat d'un servei que sempre em fa aprendre, i a la Sònia i en Robert, pel que han representat. Em faltarien, de la casa, molts i molts noms: des de la Recepció i fins a més d'un de la Facultat d'Economia: caldrien pàgines per tothom.

Fent balanç, aquesta tesi hagués estat molt difícil sense finançament, motiu pel qual vull agrair d'una banda a l'IQS per la beca predoctoral de què vaig gaudir durant els anys 2006-2007, i de l'altra el suport econòmic de la Generalitat de Catalunya amb la concessió d'una beca FI-B 2008-2010. Igualment, un agraïment també a la Fundació La Marató i el Ministeri de Ciència i Economia, per les subvencions que han permès tirar endavant un projecte prometedor i que, al seu torn, ens ha permès formar-nos i divulgar la recerca feta durant els darrers anys.

Arribo així als que compartiran amb mi que *La ciència és curiositat i naturalesa humana el preguntar. La dificultat és obtenir resposta*. No voldria deixar-me ningú, però gràcies a tots els companys de laboratori amb els quals he compartit hores de bon matí i de tard al vespre, tant si ha estat un dies com tota una pila d'anys, als que ja no hi són i als que encara defensen el castell. Especialment a la Miri i en Llorenç, perquè sense vosaltres aquest treball no hauria estat possible, us desitjo el millor.

Igual de companys han sabut ser també tots els alumnes amb qui he treballat. Des del laboratori de 5è durant tres anys o els dels diferents 3r de tres anys més, fins als, qui sap, potser futurs estudiants de l'IQS que m'han escoltat en xerrades i campus d'estiu. Gràcies per fer-me descobrir el que realment més m'apassiona i per incloure'm en els vostres grups com una més. És un orgull, de debò.

No puc acabar sense citar als meus companys actuals, que s'il·lusionen tant com jo per un dia que cada vegada veig més a prop. A l'Oficina de Recerca en particular i a tot el Rectorat de la URL en general, un agraïment sincer per haver-me acollit en un entorn amb tant caliu i perquè és fantàstic treballar amb tan bon ambient.

I perquè són un trosset de mi, a la música i la dansa, perquè sense elles, els sentiments serien freds i les paraules, inútils. Per acompanyar-me, tothora, arreu. Perquè cada nota ens convida a ser un xic més forts, més grans, més feliços. Per ensenyar-me que la perseverança i la superació també són virtuts que es poden aprendre i per obligar-me, sempre, a tirar endavant.

*Però per sobre la llàgrima de cada estel, regna el gran somriure de la lluna.*

Laia Ros i Blanco

Maig 2011

## Sumari

El programa de la síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA o sida) de les Nacions Unides va estimar a finals de 2008 que més de 33 milions de persones arreu del món vivien amb el virus de la immunodeficiència humana (VIH). En l'estudi de les dianes terapèutiques contra l'agent etiològic de la sida s'han validat com a tals els coreceptors CXCR4 i CCR5 d'unió i fusió del virus a la cèl·lula hoste. Actualment hi ha un inhibidor d'entrada i un de fusió per al tractament de la infecció per aquest retrovirus, tot i que cap d'ells inhibeix el coreceptor CXCR4. Això, unit a la capacitat del virus de desenvolupar resistència als fàrmacs actuals, fa necessària la cerca de noves famílies de compostos que hi facin front.

El Grup d'Enginyeria Molecular (GEM) de l'IQS ha descrit prèviament una quimioteca combinatòria d'anàlegs de l'AMD3100, el cap de sèrie més actiu, formats per unitats estructurals polinitrogenades (que consisteixen en un heterocicle nitrogenat, un seguit de baules metilèniques i un grup amina primària terminal) unides a un espaiador *p*-xililènic. La selecció d'aquesta quimioteca va dur a la identificació d'un nou candidat amb dos centres quirals amb activitat submicromolar contra el VIH. Aquest treball presenta diverses modificacions estructurals sobre ambdós caps de sèrie, en la cerca de nous inhibidors potencials del coreceptor d'entrada CXCR4.

En primer lloc, per tal de rebaixar la basicitat de l'AMD3100, s'han substituït els seus anells ciclàmics per sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics, en la síntesi dels quals es té molta experiència en el GEM. La baixa solubilitat en dissolvents comuns d'alguns dels compostos obtinguts es presenta com un greu inconvenient per al seu desenvolupament com a fàrmac.

D'altra banda, tenint en compte el disseny racional descrit anteriorment al grup de recerca, s'amplia la quimioteca amb l'objectiu d'avaluar l'efecte de la distància entre àtoms de nitrogen i la presència de major impediment estèric entre l'espaiador aromàtic i el nitrogen que hi està directament unit. Tot i que no s'ha aconseguit millorar l'activitat del cap de sèrie, els compostos obtinguts presenten activitats prou satisfactòries. Igualment, s'obtenen els tres estereoisòmers del cap de sèrie amb activitat submicromolar i se n'avalua l'activitat antiviral per separat.

Finalment, es duu a terme un disseny *de novo* de fàrmacs basat en l'estructura per buscar nous candidats que permetin obrir la porta a altres famílies de compostos amb activitat anti-VIH, a través de l'enumeració de la quimioteca virtual, la selecció i la posterior síntesi.



## Sumario

El programa del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA o sida) de las Naciones Unidas estimó a finales de 2008 que más de 33 millones de personas en todo el mundo vivían con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En el estudio de las dianas terapéuticas contra el agente etiológico del sida se han validado como tales los correceptores CXCR4 y CCR5 de unión y fusión del virus a la célula huésped. Actualmente existe un inhibidor de entrada y uno de fusión para el tratamiento de la infección por este retrovirus, aunque ninguno de ellos inhibe el correceptor CXCR4. Ello, unido a la capacidad del virus de desarrollar resistencia a los fármacos actuales, hace necesaria la búsqueda de nuevas familias de compuestos que le hagan frente.

El *Grup d'Enginyeria Molecular* (GEM) del IQS ha descrito previamente una quimioteca combinatoria de análogos del AMD3100, el candidato más activo, formados por unidades estructurales polinitrogenadas (que consisten en un heterociclo nitrogenado, una serie de eslabones metilénicos y un grupo amina primaria terminal) unidas a un espaciador *p*-xililénico. La selección de esta quimioteca llevó a la identificación de un nuevo candidato con dos centros quirales con actividad submicromolar contra el VIH. Este trabajo presenta diversas modificaciones estructurales sobre ambos candidatos, en la búsqueda de nuevos inhibidores potenciales del correceptor de entrada CXCR4.

En primer lugar, para rebajar la basicidad del AMD3100, se han substituido sus anillos ciclámicos por sistemas pirido[2,3-*d*]pirimidínicos, en la síntesis de los cuales se tiene mucha experiencia en el GEM. La baja solubilidad en disolventes comunes de algunos de los compuestos obtenidos se presenta como un grave inconveniente para su desarrollo como fármaco.

Por otra parte, teniendo en cuenta el diseño racional descrito anteriormente en el grupo de investigación, se amplía la quimioteca con el objetivo de evaluar el efecto de la distancia entre átomos de nitrógeno y la presencia de mayor impedimento estérico entre el espaciador aromático y el nitrógeno que está directamente unido a él. Aunque no se ha conseguido mejorar la actividad de la estructura de referencia, los compuestos obtenidos presentan actividades satisfactorias. Asimismo, se obtienen los tres estereoisómeros del candidato con actividad submicromolar y se evalúa la actividad antiviral por separado.

Finalmente, se lleva a cabo un diseño *de novo* de fármacos basado en la estructura para buscar nuevos candidatos que permitan abrir la puerta a otras familias de compuestos con actividad anti-VIH, a través de la enumeración de la quimioteca virtual, la selección y la posterior síntesis.



## Summary

The Joint United Nations Programme on Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) estimated in 2008 that more than 33 million people around the world lived with the human immunodeficiency virus (HIV). HIV cell fusion and entry coreceptors CXCR4 and CCR5 have been validated as targets for therapeutic intervention. Nowadays, there is one entry and one fusion inhibitor available for the treatment of this retrovirus infection, although none of them inhibits CXCR4 coreceptor. Due to this fact, added to the virus' capacity of developing resistance to actual drugs, the search of new families of compounds facing up to these situations becomes necessary.

The *Grup d'Enginyeria Molecular* (GEM) at IQS previously described a combinatorial library of analogues of the currently most active lead AMD3100, whose polinitrogenated building block consisted of a nitrogen-containing heterocycle, a saturated chain spacer and a terminal primary amine group, bonded to a *p*-xylylene spacer. Library selection led to the identification of a new lead with two chiral centres and submicromolar activity against HIV. This work presents various structural modifications on both leads, looking for new potential CXCR4 inhibitors.

First of all, in order to reduce basicity of AMD3100, cyclam rings were substituted by pyrido[2,3-*d*]pyrimidinic systems, whose synthesis has been widely studied at GEM. Low solubility in common solvents of some of the obtained compounds remains as a great inconvenience for their development as a drug.

Furthermore, regarding the rational design previously described by the research group, the library has been expanded with the aim of evaluating the effect of the distance between nitrogen atoms and the steric effects between the linker and the nitrogen atom directly connected to it. Although biological activities do not improve the lead's one, the obtained compounds present interesting activities. Moreover, the three stereoisomers of the lead compound with submicromolar activity have been synthesised and their activity has been evaluated separately.

Finally, a *de novo* structure based drug design has been carried out looking for new hits allowing to identify new families of compounds with anti-HIV activity, by enumeration of the virtual library, selection of candidates and their synthesis.





# Índex

Abreviatures .....	1
<b>0. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>5</b>
0.1. El sistema immunitari .....	7
0.2. El VIH.....	10
0.2.1. Història d'una nova malaltia.....	11
0.2.2. Els retrovirus.....	12
0.2.3. Estructura i genoma del VIH .....	14
0.2.4. Cicle de replicació del VIH .....	16
0.2.5. Receptors i coreceptors d'entrada .....	20
0.3. Malaltia i tractament .....	23
0.3.1. La sida .....	23
0.3.2. Estat actual de la pandèmia .....	25
0.3.3. Teràpia antiretroviral actual.....	27
0.3.4. El futur immediat.....	33
0.4. El projecte de la sida al GEM .....	38
0.4.1. Un projecte finançat des dels inicis .....	38
0.4.2. Una recerca amb bons resultats.....	39
0.4.3. Una línia amb molta història .....	43
0.5. Objectius.....	45
<b>1. SÍNTESI DE DERIVATS PIRIDO[2,3-<i>D</i>]PIRIMIDÍNICS .....</b>	<b>47</b>
1.1. Disseny de síntesi.....	49
1.2. Síntesi dels 2-metoxi-6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropirido-3-carbonitrils 18 .....	51
1.3. Síntesi dels espaiadors.....	53
1.3.1. Síntesi dels espaiadors sulfurats.....	53
1.3.2. Síntesi dels espaiadors nitrogenats .....	55
1.4. Síntesi de sistemes pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidínics de referència.....	57
1.5. Síntesi dels sistemes bis(pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidínics).....	58
1.5.1. Síntesi dels bisadductes amb espaiadors sulfurats .....	58
1.5.2. Síntesi de bisadductes 43 .....	61
1.5.3. Estabilitat de l'espaiador sulfurat.....	63
1.5.4. Síntesi dels bisadductes amb espaiadors nitrogenats .....	64
1.5.5. Síntesi del diiodur de <i>N,N'</i> -bis(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -imidazole-2-il)-1,4-bis(aminometil)benzè (39-2HI) .....	67
1.6. Síntesi dels monoadductes .....	68
1.6.1. Síntesi dels monoadductes amb espaiadors sulfurats.....	68
1.6.2. Síntesi dels monoadductes amb espaiadors nitrogenats .....	69
1.7. Resum .....	69

<b>2. MODIFICACIONS DEL CAP DE SÈRIE ANTERIORMENT DESCRIT AL GEM .....</b>	<b>71</b>
2.1. Disseny de síntesi .....	73
2.2. Ampliació de la quimioteca descrita al GEM .....	77
2.2.1. Selecció de compostos .....	78
2.2.2. Síntesi de reactius de partida .....	81
2.2.3. Síntesi dels acoblaments simètrics seleccionats .....	82
2.2.4. Síntesi dels acoblaments asimètrics seleccionats .....	88
2.3. Síntesi dels estereoisòmers del cap de sèrie descrit al GEM .....	92
2.3.1. Síntesi dels dos enantiòmers de l'amina 5{8} .....	94
2.3.2. Síntesi dels tres estereoisòmers de la diamina 2{8,8} .....	95
2.4. Avaluació de l'activitat antiviral de l'ampliació de la quimioteca .....	96
2.5. El futur del cap de sèrie 2{8,8} .....	101
2.6. Resum .....	102
<b>3. DISSENY DE NOVO DE POTENCIALS INHIBIDORS DEL CORECEPTOR CXCR4 .....</b>	<b>103</b>
3.1. Generació de noves famílies de compostos .....	105
3.2. Quimioteca virtual de nous possibles inhibidors de CXCR4 .....	106
3.3. Síntesi de compostos amb heterocicles aromàtics .....	112
3.4. Síntesi de compostos amb dues baules metilèniques .....	113
3.4.1. Disseny de síntesi .....	113
3.4.2. Síntesi de les amides halogenades 93{y} .....	114
3.4.3. Alquilació de les amides halogenades 93{y} .....	117
3.4.4. Reducció de les amides 92{3,y} .....	119
3.5. Síntesi de compostos amb quatre baules metilèniques .....	120
3.5.1. Síntesi de les amides halogenades 96 .....	121
3.5.2. Alquilació del 4-bromobutirat d'etil (107) .....	123
3.5.3. Síntesi d'amides 95 .....	125
3.5.4. Reducció de les amides 95{x,y} a les amines objectiu 84{x,y} .....	128
3.6. Avaluació de l'activitat antiviral dels compostos derivats del disseny <i>de novo</i> .....	129
3.7. Resum .....	131
<b>4. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>133</b>
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>233</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>239</b>

## Abreviatures

Ac	anticòs
ACN	acetonitril
Ag	antigen
Ar	anell aromàtic
AZT	azidotimidina
<i>b</i>	<i>bending</i> , flexió
BMS	<i>borane dimethylsulfide complex</i> , complex de borà en dimetilmercaptà
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
br	<i>broad signal</i> , senyal ample
BTHF	complex de borà en tetrahidrofuran
CC <sub>50</sub>	<i>cytotoxic concentration</i> , concentració citotòxica
CD	<i>cluster designation</i> , denominació de grup
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cs	<i>complex signal</i> , senyal complex
Cys	cisteïna
DABCO	diazabicciclo[2.2.2]octà
dd	doblet de doblets
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfòxid
DNA	àcid desoxirribonucleic
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> , DNA de doble cadena
EC <sub>50</sub>	<i>effective concentration</i> , concentració efectiva
ee	excés enantiomèric
EFV	efavirenz
EGFR	<i>epithelial growth factor receptor</i> , receptor del factor de creixement epitel·lic
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , assaig per immunoabsorció lligat a enzims
ESI-TOF	<i>electrospray ionization-time of flight</i> , ionització per electrospai-temps de vol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GEM	Grup d'Enginyeria Molecular
gp	glicoproteïna
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> , receptor acoblat a proteïna G
HCCA	àcid $\alpha$ -ciano- <i>p</i> -hidroxicinnàmic
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> , antigen leucocitari d'histocompatibilitat
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> , espectrometria de masses d'alta resolució
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum correlation</i> , espectroscòpia de correlació heteronuclear d'un sol quanta
HTLV	<i>human T-cell lymphotropic virus</i> , virus limfotròpic humà de cèl·lules T
HTS	<i>high-throughput screening</i> , cribratge d'alt rendiment
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> , Comitè Internacional de Taxonomia dels Virus
IP	inhibidor de la proteasa
IR	infraroig
ITI	inhibidor de la transcriptasa inversa
ITIAN	inhibidor de la transcriptasa inversa anàleg de nucleòsid
ITINAN	inhibidor de la transcriptasa inversa no anàleg de nucleòsid

J	constant d'acoblament
LAV	<i>lymphadenopathy-associated virus</i> , virus associat a la limfadenopatia
LBDD	<i>ligand based drug design</i> , disseny de fàrmacs basat en els lligands
LOO	<i>leave one out</i>
M	molar
[M] <sup>+</sup>	ió molecular
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i> , ionització per desorció d'una matriu assistida per làser-temps de vol
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , complex d'histocompatibilitat principal
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i> , proteïna inflammatòria dels macròfags
mp	<i>melting point</i> , punt de fusió
mRNA	RNA missatger
MS	<i>mass spectrometry</i> , espectrometria de masses
MTT	bromur de 3-(4,4-dimetiltiazole-2-il)-2,5-difeniltetrazole
mw	calefacció per microones
m/z	relació massa/càrrega
v	freqüència de vibració
NCE	<i>new chemical entity</i> , nova entitat química
NK	<i>natural killer</i> , cèl·lules assassines
NVP	nevirapina
OEA	<i>organic elemental analysis</i> , anàlisi elemental orgànica quantitativa
pàg.	pàgina
PCC	<i>pyridinium chlorochromate</i> , clorocromat de piridina
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , reacció en cadena de la polimerasa
PCT	<i>patent cooperation treaty</i> , tractat de cooperació en matèria de patents
pK <sub>a</sub>	constant d'acidesa
ppm	parts per milió
PRALINS	<i>Program for Rational Analysis in Silico</i>
QSAR	<i>quantitative structure-activity relationship</i> , relació quantitativa d'estructura-activitat
R <sup>2</sup>	coeficient de correlació
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i> , (quimiocina) regulada per activació, expressada i secretada per limfòcits T normals
RNA	àcid ribonucleic
SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i> , síndrome respiratòria aguda greu
SBDD	<i>structure based drug design</i> , disseny de fàrmacs basat en l'estructura
SDF	Servei de Disseny de Fàrmacs
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1</i> , factor derivat de cèl·lules estromals
SN2	substitució nucleòfila bimolecular
soln	<i>solution in CHCl<sub>3</sub></i> , dissolució en CHCl <sub>3</sub>
ssRNA	<i>single stranded RNA</i> , RNA de cadena senzilla T <sub>C</sub> <i>cytotoxic cell</i> , limfòcit T citotòxic
st	<i>stretching</i> , tensió
TARGA	teràpia antiretroviral de gran activitat
T <sub>C</sub>	<i>T cytotoxic cell</i> , limfòcit T citotòxic
T <sub>D</sub>	<i>delayed hypersensitivity T cell</i> , limfòcit T d'hipersensibilitat retardada
T <sub>H</sub>	<i>T helper cell</i> , limfòcit T ajudant o col·laborador
THF	tetrahidrofur
TLC	<i>thin-layer chromatography</i> , cromatografia de capa prima
TMS	<i>tetramethylsilane</i> , tetrametilsilà
T <sub>S</sub>	<i>T suppressor cell</i> , limfòcit T supressor

TSPNa	<i>sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimethylsilyl)propionate</i> , propionat sòdic de 2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimetilsilil)
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i> , programa pel VIH/sida de les Nacions Unides
VIB	virus de la immunodeficiència bovina
VIF	virus de la immunodeficiència felina
VIH	virus de la immunodeficiència humana
VIS	virus de la immunodeficiència dels simis
vDNA	DNA víric
vRNA	RNA víric



# 0. INTRODUCCIÓ

---





## 0.1. El sistema immunitari

La natura, l'entorn en què vivim, és plena de perills. Com podem protegir-nos de tantes amenaces? De quins mecanismes de defensa disposa el nostre organisme per desfer-se dels seus agressors més petits, d'aquells que no es veuen a simple vista? El sistema immunitari, tan complex com el sistema nerviós<sup>1</sup>, és capaç de diferenciar allò que és propi d'allò que és aliè, reaccionar front a estímuls estranys i fins i tot recordar-los en cas d'una exposició posterior. Aquest apartat vol ser tan sols una petita incursió en la complexitat dels sistemes de defensa del nostre organisme, per entendre posteriorment com afecta en ells el virus de la immunodeficiència humana (VIH).

Els patògens més comuns són bacteris, virus i paràsits<sup>2</sup>, front a les infeccions dels quals l'organisme pot defensar-se de forma específica o inespecífica (Figura 0.1, pàg.9). Les barreres inespecífiques actuen en primer lloc, ràpidament i indiscriminada, contra una gran varietat de cossos estranys. Entre aquestes defenses es troben barreres físiques o mecàniques, com la pell (penetrable a través de talls o abrasions), les membranes mucoses del tracte digestiu o el tracte respiratori, i els cilis d'aquest últim. Hi ha també barreres químiques com els sucus gàstrics, i s'hi podrien incloure les condicions fisiològiques de pH o temperatura (la febre s'ha associat a una reducció de l'activitat patogènica i la intensificació de la resposta immunitària adaptativa<sup>3</sup>). En una resposta secundària i encara inespecífica, durant les hores primerenques de la infecció, el **sistema immunitari innat** pot actuar mitjançant fagòcits macròfags.

Si els invasors aconsegueixen superar les barreres no específiques, el sistema immunitari els pot detectar i eliminar tot activant les defenses específiques. Aquestes, conegudes com a **sistema immunitari adquirit o adaptatiu**, estan formades per una gran varietat de limfòcits, cadascun dels quals actua contra un patògen concret.

Totes les cèl·lules del sistema immunitari provenen de les cèl·lules mare pluripotents de la medul·la òssia, les quals es diferencien en resposta a quimiocines vàries en dues línies fonamentals de leucòcits o glòbuls blancs (Taula 0.1, pàg.8).

La **diferenciació limfoide** dona lloc als limfòcits, els quals viatgen a través del sistema limfàtic, que bescanvia cèl·lules i fluids amb el sistema circulatori. El sistema limfàtic pot monitorar així l'estat de l'organisme quant a antígens (Ag) mitjançant els receptors de superfície específics dels limfòcits. Aquests es classifiquen segons l'òrgan en què maduren en limfòcits (o cèl·lules) B, limfòcits (o cèl·lules) T i cèl·lules assassines (*natural killers*, NK)<sup>2,4</sup>. Els limfòcits B (que suposen al voltant d'un 15% del total dels limfòcits) es diferencien en limfòcits B de memòria (disposats davant d'una segona exposició de l'organisme a l'Ag) i els limfòcits B efectors (també anomenats cèl·lules plasmàtiques o plasmòcits),

essent aquests últims productors d'anticossos (Ac) específics contra els Ag reconeguts. D'altra banda, els limfòcits T (que maduren al tim) són parcialment diferenciables entre si en funció dels receptors que expressen en superfície. Els limfòcits T ajudants o col·laboradors (*T helper cell*,  $T_H$ ), que representen més d'un 70% de limfòcits T, expressen el receptor CD4 i tenen una funció reguladora. Els limfòcits T citotòxics (*T cytotoxic cell*,  $T_C$ ) expressen el receptor CD8 a l'igual que els limfòcits T supressors (*T suppressor cell*,  $T_S$ )<sup>4</sup>.

**Taula 0.1** Classificació dels leucòcits segons la seva diferenciació cel·lular

DIFERENCIACIÓ MIELOIDE		
<b>fagòcits mononuclears</b>	Degraden microorganismes	
monòcits	Circulen en sang. Migren a teixits i es desenvolupen en macròfags tissulars	
macròfags	Acumulats en teixits i especialitzats, alerten a les cèl·lules $T_H$ de la presència de patògens tot presentant l'antigen (Ag) en superfície a través de l'MHC-II	
<b>granulòcits polimorfonuclears</b>	Destruïxen microorganismes. Relacionats amb la química d'inflamacions i al·lèrgies	
neutròfils	Fonts d' $\alpha$ -defensines. Fagocítics. Durant la inflamació, es desplacen pels capil·lars per destruir els microbis dels teixits	
eosinòfils	Fagocítics. Escampen compostos químics a cèl·lules i microbis danyosos propers. Exaltats en al·lèrgies i infeccions parasitàries	
basòfils	Cèl·lules sanguínies. Escampen compostos químics a microbis danyosos propers. Importants en respostes al·lèrgiques i inflamatòries	
mastòcits	Similars als basòfils, però sense ser cèl·lules sanguínies	
plaquetes	Fragments cel·lulars, també actives en les defenses immunològiques. Relacionades amb la cura de ferides	
<b>cèl·lules dendrítiques</b>	Es troben en alguns òrgans limfàtics. Mostren Ag i estimulen cèl·lules T durant la resposta immunitària	
DIFERENCIACIÓ LIMFOIDE		
<b>limfòcits</b>	Viatgen a través del sistema limfàtic, que bescanvia cèl·lules i fluids amb el sistema circulatori per permetre que el primer monitoritzi l'estat de l'organisme quant a Ag	
limfòcits B	Suposen un 15% del total dels limfòcits. En contacte amb l'Ag, s'activen i diferencien	immunitat humoral
<i>limfòcits B de memòria</i>	Disposats davant d'una segona exposició de l'organisme a l'Ag	
<i>limfòcits B efectors (cèl·lules plasmàtiques o plasmòcits)</i>	Reconeixement de l'Ag per la codificació de receptors de superfície específics. Secretors d'anticossos (Ac) solubles específics	
limfòcits T	Suposen un 85% del total dels limfòcits. Maduren al tim i migren a altres teixits. Reconeixen l'Ag però no secreten Ac. Són parcialment diferenciables pels receptors de superfície que expressen	immunitat cel·lular
<i>limfòcits T ajudants o col·laboradors (<math>T_H</math>)</i>	Funció reguladora: estimulen els limfòcits B a produir Ac, estimulen la fagocitosi, activen altres limfòcits T,... Expressen el receptor de superfície CD4	
<i>limfòcits T citotòxics (<math>T_C</math>)</i>	Destruïxen les cèl·lules infectades per agents intracel·lulars a través d'apoptosi (mort cel·lular programada), físicament (lisant la paret cel·lular) o químicament (per secreció de compostos tòxics). Expressen el receptor CD8	
<i>limfòcits T supressors (<math>T_S</math>)</i>	Redueixen les respostes de les cèl·lules $T_C$ i B. Expressen en superfície el receptor CD8	
<i>limfòcits T d'hipersensibilitat retardada (<math>T_D</math>)</i>	Implicats en certes respostes al·lèrgiques	
cèl·lules assassines ( <i>NK</i> )	No expressen receptors d'Ag. Són activades pels interferons, que també inhibeixen la replicació vírica, per eliminar (via apoptosi) les cèl·lules hostatgeres de virus	

D'altra banda, la **diferenciació mioide** dona lloc als fagòcits mononuclears i als granulòcits polimorfonuclears. Els primers, inicialment monòcits, circulen per la sang i migren fins als teixits per

acumular-se, desenvolupar-se i convertir-se en macròfags especialitzats (macròfags tissulars). Ja madurs, degraden els microorganismes per presentar els Ag en superfície, a través del complex d'histocompatibilitat principal (*major histocompatibility complex*, MHC) de classe I i II (MHC-I i MHC-II, respectivament) de la seva superfície, convertint-se així en macròfags activats. Els granulòcits destrueixen els microorganismes i estan estretament relacionats amb la química de les inflamacions i les al·lèrgies<sup>2,4</sup> (Figura 0.1).

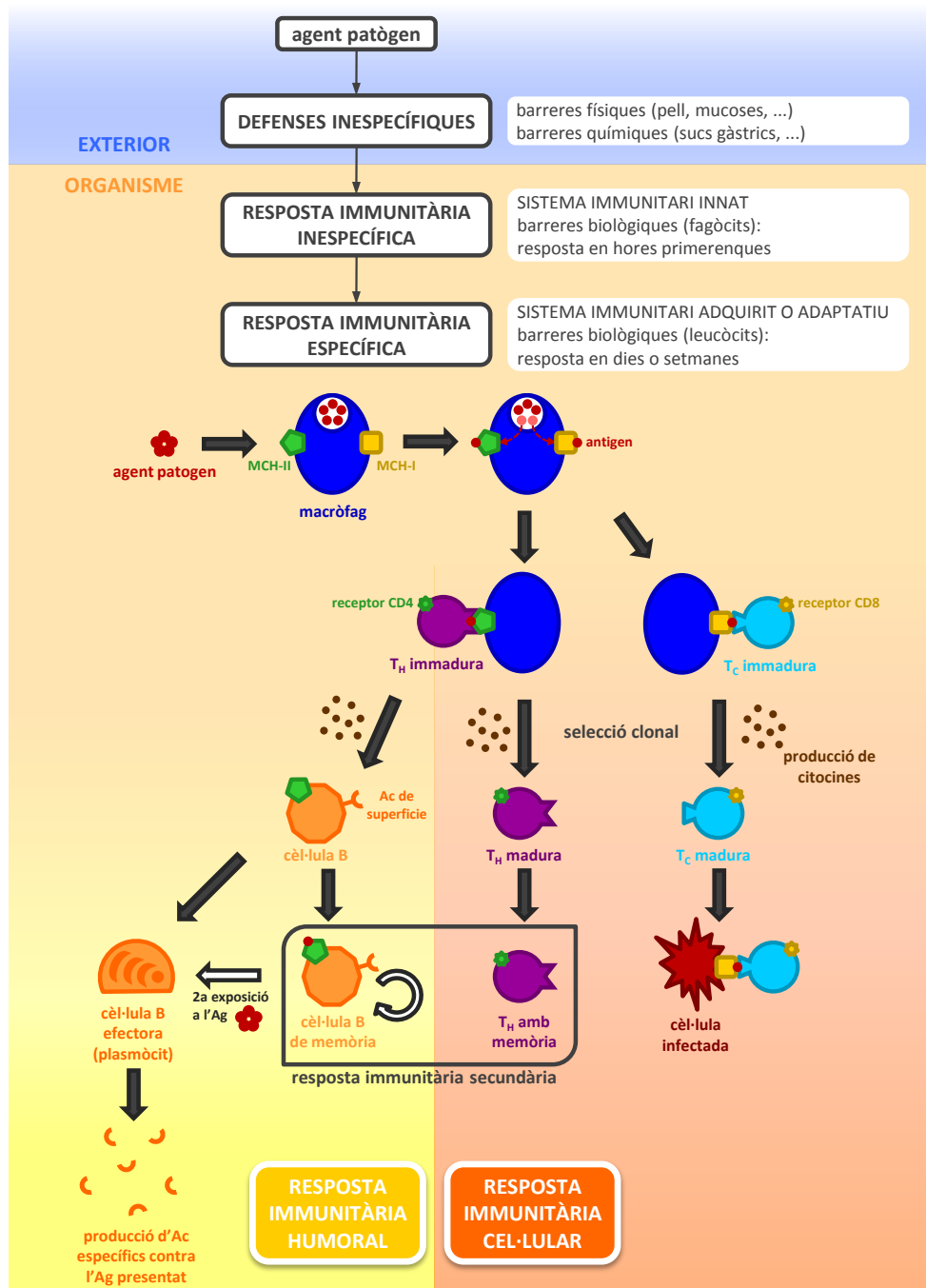


Figura 0.1 Esquema dels sistemes de defensa de l'organisme

L'MHC és un conjunt de proteïnes amb funcions principalment immunològiques, els gens de les quals estan situats (en l'espècie humana) al braç curt del cromosoma sis. Tradicionalment, l'MHC es

divideix en les regions de classe I, II i III. Els gens de l'MHC-I i l'MHC-II codifiquen els antígens leucocitaris d'histocompatibilitat (*human leukocyte antigen*, HLA) de classe I i II i tenen com una de les funcions més importants la presentació d'antígens (per tal que el sistema immunitari pugui detectar què passa a l'interior de les cèl·lules sense entrar-hi, i discriminar propi d'aliè o potencialment perillós). L'MHC-I es troba pràcticament en totes les cèl·lules somàtiques (en els limfòcits, de l'ordre de  $10^5$  receptors per cèl·lula<sup>3</sup>) i serveix per presentar Ag de cèl·lules pròpies alterades als limfòcits  $T_C$ . L'MHC-II, que difereix de l'MHC-I en la seva estructura<sup>5</sup>, es troba només en cèl·lules del sistema immunitari que fagociten antígens i els presenten a limfòcits  $T_H$  (macròfags fagòcits i limfòcits B madurs, entre d'altres)<sup>6</sup>. La principal finalitat de l'MHC-II és garantir l'autotolerància del sistema immunitari (per tal que no ataquin les cèl·lules del propi organisme). Finalment, els gens de l'MHC-III codifiquen diversos components del sistema complement (un conjunt de proteïnes que interaccionen entre sí, acaben lisant les cèl·lules i desencadenen reaccions inflammatòries locals) i el control de les inflamacions<sup>1</sup>.

La resposta immunitària específica s'activa un cop l'agent patògen ha aconseguit superar totes les barreres anteriors (Figura 0.1, pàg. 9). La **resposta immunitària cel·lular** s'inicia amb la fagocitosi de l'antigen per part d'un macròfag i la presentació en superfície de l'epítop que el defineix a través de l'MHC. Quan una cèl·lula  $T_C$  immadura s'uneix al complex de MHC-I amb l'Ag, madura i identifica l'Ag igualment presentat en cèl·lules infectades, per destruir-les a través de la secreció de perforina<sup>1</sup>.

De la mateixa manera, el reconeixement del complex format per l'MHC-II i l'Ag per part d'una cèl·lula  $T_H$  immadura, duu a la maduració del limfòcit  $T_H$  i a la secreció de citocines (veure apartat 0.2.5, pàg. 20) que estimulen la proliferació de limfòcits B i  $T_C$ <sup>2,4</sup>. D'aquests, la selecció clonal fa proliferar preferentment aquells limfòcits que reconeixen l'antigen<sup>1</sup>. A més, les citocines segregades atrauen macròfags i granulòcits fins al lloc de la infecció. Així doncs, tot i que els limfòcits T reconeixen els Ag però no produeixen Ac, tenen una funció reguladora imprescindible per forçar la resposta immunitària específica més adient.

Els limfòcits B són els principals responsables de la **resposta immunitària humoral** (Figura 0.1, pàg. 9), efectiva contra infeccions bacterianes i fases extracel·lulars d'infeccions víriques<sup>1</sup>. L'adquisició de receptors de superfície específics permet als limfòcits B de memòria reconèixer els Ag i especialitzar-se en la secreció d'un Ac soluble concret contra un Ag determinat<sup>1,2,4</sup>. Així, en una segona exposició a l'agent patògen, el limfòcit B el reconeix, fagocita el complex i en presenta l'epítop sobre l'MHC-II, per activar la diferenciació a plasmòcits que secretin els Ac solubles contra l'Ag (els quals es diferencien dels Ac de superfície de les cèl·lules B de memòria per l'absència de la cua hidròfoba que els uneix a la membrana cel·lular). L'Ag marcat pels Ac solubles és destruït per macròfags<sup>7</sup> o per l'activació del sistema de complement<sup>1</sup>.

La denominació de grup (*cluster designation*, CD) permet actualment l'agrupació dels anticossos monoclonals de característiques similars. Igualment, tal com ja s'ha comentat, també la major part dels limfòcits T poden classificar-se segons expressin en la seva superfície el receptor CD4 (CD4+, majoritàriament limfòcits  $T_H$ ) o el receptor CD8 (CD8+, principalment limfòcits  $T_C$ )<sup>8,9</sup>.

## 0.2. EL VIH

El terme virus engloba un munt d'entitats infeccioses microscòpiques formades per un paquet ben acoblat de genoma, proteïnes, i de vegades membranes cel·lulars, que han assolit un grau de versatilitat estructural i funcional molt major que el de qualsevol organisme de naturalesa cel·lular. Es tracta de paràsits moleculars que envaeixen amb èxit qualsevol tipus d'hoste cel·lular amb l'únic

objectiu de perpetuar-se, doncs són incapaços de generar l'energia necessària o dur a terme qualsevol procés metabòlic.

Els virus s'uneixen a les cèl·lules hostes mitjançant receptors específics que determinen el que s'anomena tropisme del virus cap a un determinat tipus de cèl·lula o teixit (veure apartat 0.2.5, pàg. 20). Tot i la gran diversitat de virus i tipus de cèl·lules hostes, en el cicle de replicació d'un virus hi ha sempre quatre etapes bàsiques: infecció (penetració del virió o del seu àcid nucleic a la cèl·lula hoste), replicació (expressió del genoma víric), maduració (unió de tots els components vírics nous sintetitzats) i sortida dels nous virions, tot sovint de manera que la cèl·lula hoste es lisa. El virus s'ha d'aprofitar dels processos metabòlics cel·lulars per a la síntesi de proteïnes, doncs en general, el seu genoma conté tan sols les instruccions necessàries per endinsar-se a la cèl·lula i per a la síntesi, una vegada dins, dels seus propis components<sup>10-12</sup>.

### 0.2.1. Història d'una nova malaltia

En l'últim quart del segle XX, els avenços en la medicina havien portat a gran part de les societats dels països industrialitzats a pensar erròniament que les malalties epidèmiques causades per microorganismes (incloent-hi els virus) ja no els suposaven cap amenaça. L'any 1979, emperò, Robert Gallo i col·laboradors van descobrir el primer retrovirus humà: el virus limfotrópic humà de cèl·lules T de tipus u (*human T-cell lymphotropic virus class I*, HTLV-I), causant d'una leucèmia inusual de les cèl·lules T dels adults. Només dos anys després, s'aïllà l'HTLV-II<sup>13</sup>.

Al juny de 1981, els *Centers for Disease Control and Prevention* dels Estats Units d'Amèrica identificaren en joves pacients de Los Angeles cinc casos de pneumònia per *Pneumocystis carinii* i altres infeccions inusuals<sup>14,15</sup>. En aquell temps, un nou cas d'aquesta malaltia suposava una raresa per si sola, però encara més els diversos casos de sarcoma de Kaposi i altres complicacions oportunistes que es van declarar durant els següents mesos a Nova York i Califòrnia<sup>15-18</sup>.

El fet que la majoria d'afectats presentés un important dèficit immunològic associat a la resposta cel·lular i caracteritzat per la disminució de limfòcits CD4+<sup>15,18,19</sup>, dugué a partir de l'any següent a acceptar l'existència d'una nova malaltia, que es va anomenar Síndrome de la Immunodeficiència Adquirida (SIDA o sida)<sup>17</sup>.

L'aplicació del mètode epidemiològic mitjançant el model persona-espai-temps va permetre plantejar una hipòtesi de la causa i començar a aplicar, amb dificultats d'acceptació, les primeres mesures preventives, abans de conèixer la naturalesa biològica de l'agent etiològic de la nova malaltia<sup>10</sup>. Les característiques epidemiològiques de l'agent infeccios i els casos descrits en heroïnòmans, homosexuals o hemofílics, així com el fet que fongs i bacteris no poguessin travessar els filtres que s'empraven en la purificació sanguínia durant les transfusions, apuntava a un virus que es transmetés per via sanguínia i sexual<sup>16-19,21</sup>. L'únic agent conegut fins al moment que era capaç d'infectar cèl·lules T era el retrovirus causant de la leucèmia de cèl·lules T en adults; i un altre retrovirus, el virus de la leucèmia felina, podia causar immunodepressió associada a limfomes i leucèmies, fent sospitar que l'agent etiològic de la sida també pertanyeria a aquesta família de paràsits<sup>16</sup>.

La caracterització de la transcriptasa inversa dels retrovirus uns anys abans<sup>13,19</sup> permeté que Françoise Barré-Sinoussi, Claude Chermann i Luc Montagnier (de l'Institut Pasteur a París) aïllessin l'any 1983 un retrovirus a partir de limfòcits T d'un pacient amb limfadenopatia generalitzada, al qual anomenaren virus associat a la limfadenopatia (*lymphadenopathy-associated virus*, LAV), doncs era diferent de l'HTLV-I. Un any després, el grup de Robert Gallo descrigué l'HTLV-III.

Finalment, es va descobrir que l'LAV i l'HTLV-III corresponien a un sol virus, agent etiològic de la sida<sup>19</sup>. Des de l'any 1984 s'anomena Virus de la Immunodeficiència Humana tipus u (VIH-1) i el seu

descobriments va atorgar a Françoise Barré-Sinoussi i Luc Montagnier la meitat del Premi Nobel de Medicina l'any 2008<sup>22</sup>. La caracterització genètica del virus va permetre demostrar a finals de 1984 que pertany a la família dels lentivirus i dugué al desenvolupament d'un test biològic per a la determinació de la infecció per VIH l'any següent, basat en la detecció d'Ac contra el VIH, però no el propi virus<sup>16,17,23</sup>.

El 1986, el grup d'investigadors de Montagnier descobrí el VIH-2, el genoma del qual difereix en un 60% amb el VIH-1, però té una similitud de vora el 75% amb el virus de la immunodeficiència dels simis (VIS). El VIH-2 és menys patogènic que el VIH-1 (evoluciona més lentament cap a la destrucció del sistema immunitari, i la transmissió vertical -de mare a fill- és, en general, menys probable), tot i que ambdós són causants de la mateixa malaltia. Mentre el VIH-1 es considera el responsable de l'epidèmia a nivell mundial, el VIH-2 infecta bàsicament la població de l'Àfrica oriental i és estrany fora d'aquesta regió.

### 0.2.2. Els retrovirus

El Comitè Internacional de Taxonomia dels Virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) en fa una classificació jeràrquica segons caràcters distintius com propietats físiques (morfologia, tipus de genoma) i biològiques (mode de replicació, hostes, patogènesi). Aquesta classificació agrupava els virus, l'any 2009, en sis grans ordres (i aquests en famílies, subfamílies, gèneres i espècies) segons l'antecessor comú del qual evolucionaven, cosa que dificulta encara avui dia l'ordenació de la gran majoria de famílies<sup>24,25</sup>.

Alternativament, la classificació dels virus de Baltimore, presentada per primer cop l'any 1971, és més senzilla i està àmpliament acceptada, tot i que la morfologia vista al microscopi electrònic va servir com a criteri classificatori a principis dels anys 1970. En ella, els virus es categoritzen en set grans grups segons el tipus d'àcid nucleic del seu genoma i els seus intermedis de replicació (Figura 0.2, Taula 0.2)<sup>12,26-28</sup>.

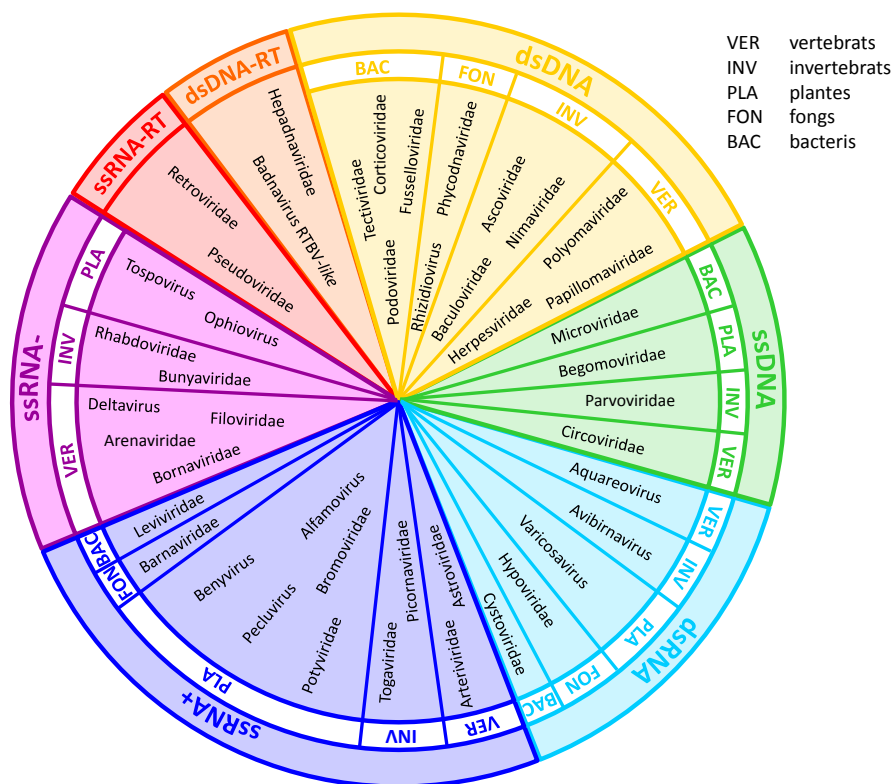


Figura 0.2 Classificació dels virus segons Baltimore

Taula 0.2 Classificació dels virus de Baltimore

grup	genoma	intermedi de replicació	descripció	exemples
<b>VIRUS AMB GENOMA I INTERMEDIS DE REPLICACIÓ DE DNA</b>				
I	DNA	DNA	Virus de DNA bicatenari (dsDNA)	Adenovirus, herpes, verola
II	DNA	DNA	Virus de DNA monocatenari (ssDNA)	Paràsits de plantes i insectes, bacteriòfags
<b>VIRUS AMB GENOMA I INTERMEDIS DE REPLICACIÓ DE RNA</b>				
III	RNA	RNA	Virus d'RNA bicatenari (dsRNA)	Rotavirus, virus de la llengua blava
IV	RNA	RNA	Virus d'RNA monocatenari i polaritat positiva (ssRNA+)	Hepatitis C, febre aftosa, coronavirus (SARS)
V	RNA	RNA	Virus d'RNA monocatenari i polaritat negativa (ssRNA-)	Xarmpió, galteres, ràbia, Ebola
<b>VIRUS AMB GENOMA DE RNA I INTERMEDIS DE REPLICACIÓ DE DNA</b>				
VI	RNA	DNA	Retrovirus: virus d'RNA monocatenari i polaritat positiva (ssRNA+)	VIH, virus de la immunodeficiència dels simis, felina o bovina (VIS, VIF, VIB, respectivament)
<b>VIRUS AMB GENOMA DE DNA I INTERMEDIS DE REPLICACIÓ DE RNA</b>				
VII	DNA	RNA	Pararetrovirus: genoma circular de DNA bicatenari parcial	Hepatitis B

Cap grup de virus ha atret tant l'atenció dels científics en els darrers anys com els retrovirus (*retroviridae*), probablement degut al seu cicle de replicació característic. Conformen el sisè grup de la classificació de Baltimore (virus amb genoma d'RNA i intermedis de replicació de DNA), al qual pertany el VIH. Aquest grup s'ha dividit tradicionalment en tres subfamílies, basant-se principalment en la patogenicitat: *oncovirinae* (virus associats a tumors malignes), *lentivirinae* (associats a desordres inflamatoris i degeneratius progressius) i *spumavirinae* (sense patogenicitat associada)<sup>29,30</sup>.

Tenint en compte la gran varietat d'*oncovirinae* descoberts, les classificacions més modernes agrupen els retrovirus segons la seva organització genòmica: els retrovirus simples codifiquen tan sols

els gens estructurals *gag*, *pol* i *env*, mentre que els considerats complexos contenen també altres gens amb funcions reguladores o auxiliars. En aquest darrer grup s'inclouen tant alguns dels *oncovirinae* com les subfamílies tradicionals dels *lentivirinae* i els *spumavirinae*<sup>27,30</sup>. El VIH pertany als *lentivirinae*, subfamília de retrovirus complexos responsables d'una gran varietat de malalties neurològiques i immunològiques<sup>29</sup>, i caracteritzats per la possibilitat d'estar-se a l'organisme en forma latent durant períodes de temps molt llargs.

La morfologia dels virions és molt similar en tots els retrovirus: un cop fora de la cèl·lula infectada, els virions madurs presenten una membrana lipídica (amb proteïnes de la cèl·lula hoste) envoltant una nucleocàpsida proteica que conté dues còpies idèntiques d'RNA víric (vRNA) monocatenari unides entre sí de manera no covalent, les quals oscil·len entre les 8 i les 12 kilobases. La nucleocàpsida conté també la transcriptasa inversa (o retrotranscriptasa) i altres possibles enzims vírics<sup>23,25,27,29</sup>.

Tots els organismes vius segueixen el dogma central de la biologia per a la perpetuació i l'expressió del seu genoma (Figura 0.3). El material genètic emmagatzemat en forma de DNA es replica en la reproducció cel·lular i es transcriu a còpies complementàries d'RNA (missatger, mRNA) quan cal expressar algun dels gens. Cadascun d'aquests processos requereix d'un conjunt d'enzims catalitzadors anomenats polimerases. La traducció de l'mRNA i modificacions post-traduccionals duen a la síntesi de la proteïna codificada.

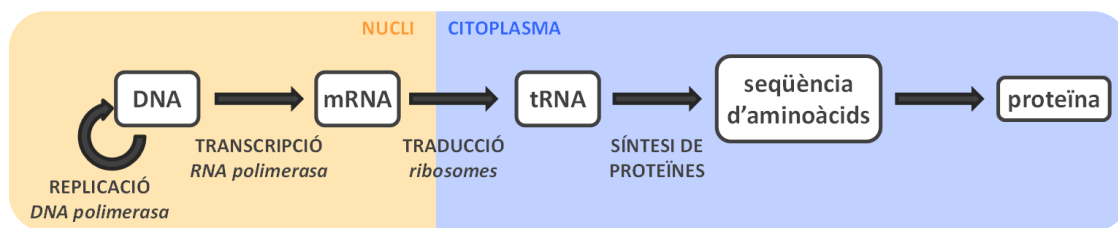


Figura 0.3 Dogma central de la biologia

El gran tret diferenciador dels retrovirus és la seva capacitat única d'invertir la primera etapa de l'esquema<sup>1,7,10</sup>: la transcriptasa inversa (un enzim descobert independentment per D. Baltimore i H. Temin l'any 1970<sup>17</sup> i pel qual reberen el Premi Nobel de Medicina cinc anys després<sup>22</sup>) transcriu l'RNA del genoma al DNA que s'integra al nucli de l'hoste. Per completar el seu cicle de replicació, als retrovirus els cal integrar-se en el genoma de la cèl·lula hoste mitjançant l'enzim víric integrasa per poder-se transcriure. El cicle de replicació té bàsicament dues grans fases<sup>30</sup>:

1. El virus es fixa a un receptor específic de la superfície de la cèl·lula hoste i penetra al citoplasma. La transcriptasa inversa genera una doble cadena de DNA retrovíric (provirus) a partir de l'RNA víric (vRNA), la qual s'integra al genoma de la cèl·lula infectada, on roman indefinidament.
2. Amb l'expressió del nou genoma se sintetitzen nous elements virals que s'ajunten per formar una nova partícula vírica o virió, el qual s'allibera a través de la membrana cel·lular, tot incorporant a l'embolcall del virus nombroses proteïnes de la membrana de la cèl·lula hoste, que permetran que el sistema immunitari no el reconegui com a antigen.

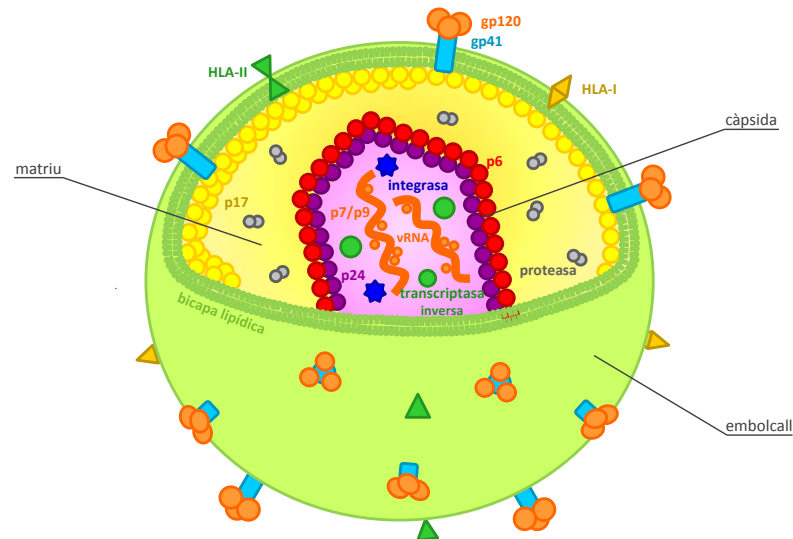
### 0.2.3. Estructura i genoma del VIH

Els virions madurs del VIH tenen una morfologia esfèrica d'entre 100 i 120 nm de diàmetre i consten bàsicament de tres capes concèntriques: l'embolcall, la matriu i la càpsida (Figura 0.4). La capa més externa o embolcall està formada per una bicapa lipídica d'origen cel·lular entre la qual s'insereixen



72 espícules formades per una unitat transmembrana (la glicoproteïna viral gp41<sup>Nota</sup>, essencial en la fusió entre el virus i la membrana cel·lular) i trímers de la proteïna de superfície gp120, que actua en el reconeixement del receptor específic CD4. L'embolcall conté també les proteïnes de membrana HLA-I i HLA-II, preses de les cèl·lules hostes i que protegeixen el virió del sistema immunitari<sup>12,31,32</sup>.

A la matriu, la proteïna estructural p17 recobreix la capa interna de l'embolcall, mentre l'enzim víric proteasa s'hi troba dispers. A la part més interna del virió, la càpsida de forma cònica, formada per les proteïnes p6 i p24, conté el vRNA unit a dues proteïnes de baix pes molecular (p7 i p9) i els enzims vírics transcriptasa inversa i integrasa<sup>27,31</sup>. Tanmateix, cal remarcar que la transcriptasa inversa no esdevé enzimàticament activa fins a la penetració del virió<sup>30</sup>.



**Figura 0.4** Estructura d'un virió madur de VIH

El genoma del VIH en els virions és RNA de cadena senzilla format per dues còpies idèntiques de 9,2 kb de polaritat positiva (*positive single stranded RNA*, ssRNA+), mentre que la seva forma persistent és el DNA bicatenari integrat en les cèl·lules infectades (provirus)<sup>31</sup>. En el material genètic dels virions es poden distingir quatre regions principals<sup>25,31,33,34</sup> (Taula 0.3):

1. La regió reguladora LTR (*long terminal repeat*, repetició terminal llarga), una seqüència genètica repetitiva que es troba en els dos extrems de la cadena d'RNA, és necessària per a la integració del provirus en el DNA de la cèl·lula hoste.
2. Els gens essencials *gag* (*group-specific antigen*) i *pol* (*polymerase*) codifiquen dos precursors poliproteics. La proteïna precursora Gag (p55) ha d'ésser processada per la proteasa vírica per obtenir les proteïnes més petites p17 (proteïna de la matriu), p6 i p24 (proteïnes estructurals de la càpsida), i p7. Pel que fa al precursor Gag-Pol, la seva autocatàlisi rendeix tant algunes proteïnes estructurals com els tres enzims vírics (la proteïna p10 de la proteasa, la p51 i la p66 de la transcriptasa inversa i la p32 de la integrasa).
3. El gen estructural *env* (*envelope*) codifica la glicoproteïna gp160 que, digerida per un enzim cel·lular, rendeix la unitat transmembrana gp41 i la proteïna de superfície gp120. Durant el transport, la precursora gp160 oligomeritza en dímers, trímers o tetràmers<sup>25</sup>.
4. Diversos gens accessoris que regulen i coordinen la latència i expressió del material genètic integrat a la cèl·lula. Aquests gens, productors de les proteïnes reguladores

<sup>Nota</sup> el nombre en el nom d'aquestes i d'altres proteïnes indica la seva massa en kilodaltons

corresponents, són: *vpr* (coordina el transport del contingut de la càpsida des del citoplasma al nucli cel·lular), *nef* (codifica la proteïna Nef, que regula la retrotranscripció i la infectivitat), *tat* (essencial en la replicació vírica, doncs controla la velocitat amb què s'inicia la transcripció del provirus a través de la producció d'mRNA), *rev* (dirigeix el transport selectiu i processament de l'mRNA al citoplasma), *vpu* (en les soques de VIH-1, promou la degradació de molècules CD4 durant l'etapa post-traduccional), *vpx* (equivalent al gen *vpu* per a les soques de VIH-2) i *vif* (responsable de la producció de virions madurs altament infecciosos, promou la degradació de DNA<sup>35</sup>). Cal remarcar que els gens *tat* i *nef* són els únics que diferencien el genoma del VIH del de la resta de retrovirus animals i els que el fan, probablement, el més complex de tots<sup>21</sup>.

Taula 0.3 Genoma del VIH

gen	precursor	proteïna	funció
<b>GENS ESTRUCTURALS</b>			
<i>gag</i>	p55	p17	Proteïna de la matriu
	processada per proteasa vírica	p6, p24	Proteïnes estructurals de la càpsida
		p7	Ribonucleoproteïna associada al vRNA
<i>pol</i>	Gag-Pol autocatàlisi	p10	Proteasa: enzim víric que processa les proteïnes víriques que formen l'estructura dels virions
		p51, p66	Transcriptasa inversa: retrotranscripció del genoma víric
		p32	Integrasa: integració del genoma viral retrotranscrit
<i>env</i>	gp160 processada per proteasa cel·lular	gp41	Unitat transmembrana, interacció amb coreceptors, fusió de les membranes de virus i cèl·lula
		gp120	Proteïna de superfície, unió a receptor primari CD4
<b>GENS REGULADORS</b>			
<i>vpr</i>	--	VPr	Transport del contingut de la càpsida del citoplasma al nucli cel·lular, accelerador del cicle de replicació vírica
<i>nef</i>	--	Nef	Regulació de retrotranscripció i infectivitat
<i>tat</i>	--	Tat	Control de la velocitat d'inici de transcripció
<i>rev</i>	--	Rev	Direcció del transport selectiu i processament de l'RNA
<i>vpu, vpx</i>	--	Vpu, Vpx	Degradació de molècules CD4 i alliberament de virions
<i>vif</i>	--	Vif	Maduració i infectivitat víriques

#### 0.2.4. Cicle de replicació del VIH

Després d'entrar a l'organisme per alguna de les vies de transmissió conegudes (parenteral, sexual o vertical), el VIH arriba a les cèl·lules limfoides. Amb això comença un seguit de processos, conegut com a cicle de replicació del VIH, que es pot dividir en dues grans fases: la fase primerenca comprèn la infecció pròpiament dita, des de la unió del virus a la cèl·lula fins a la integració del seu genoma en el de la cèl·lula hoste; la fase tardana comprèn les etapes de replicació, maduració i sortida (Figura 0.5).

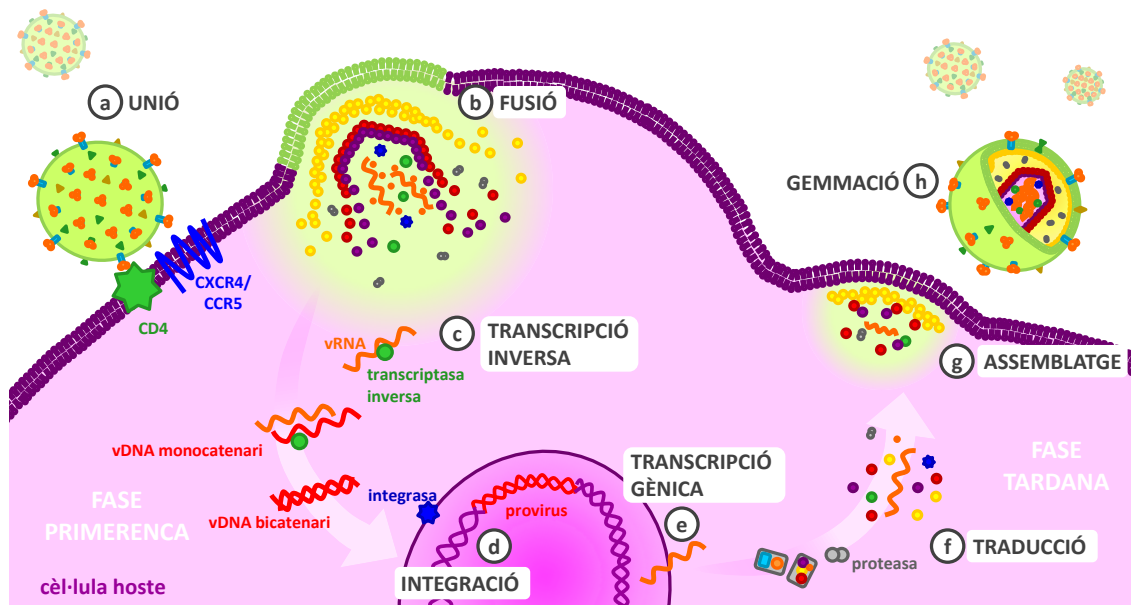


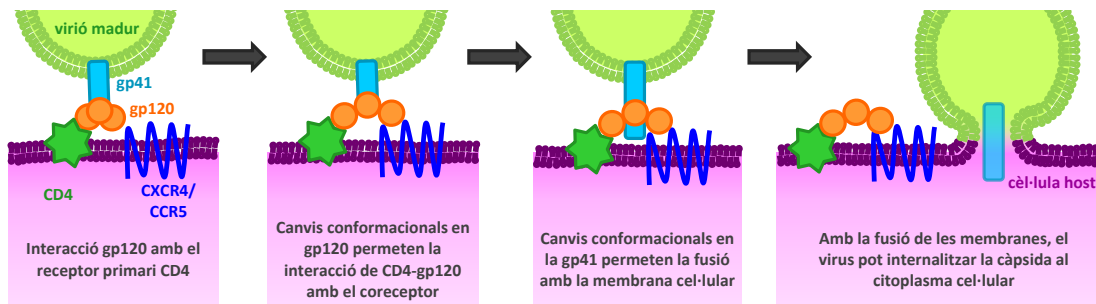
Figura 0.5 Cicle de replicació del VIH

#### 0.2.4.a. Reconeixement virus-cèl·lula: Unió

El procés d'entrada d'un retrovirus a la cèl·lula hoste és el primer pas del cicle de replicació viral. S'inicia amb la unió de les glicoproteïnes víriques de superfície a un receptor específic de la superfície cel·lular, a partir de la qual es provoquen diversos canvis conformacionals en les glicoproteïnes víriques que permeten la posterior fusió de les membranes lipídiques i la introducció del material genètic del paràsit en el citoplasma de l'hoste<sup>36</sup>.

El VIH infecta bàsicament els limfòcits T col·laboradors, que tenen una funció essencial en la regulació de l'activitat d'altres cèl·lules del sistema immunitari i presenten el receptor CD4 a les seves membranes plasmàtiques. Aquest receptor de superfície, una glicoproteïna transmembrana de 58 kDa i 433 aminoàcids, pertanyent a la superfamília de les immunoglobulines<sup>37</sup>, fou el primer receptor retroviral identificat, mitjançant l'ús d'Ac monoclonals<sup>17,38,39</sup>. La seva estructura tridimensional va ser publicada l'any 1990<sup>40,41</sup>.

La unió comença amb la interacció de la superfície glicoproteica del virus, concretament el tercer i quart dominis conservats de la gp120, amb el receptor CD4 de la membrana plasmàtica de la cèl·lula<sup>31,36,38,42</sup> (Figura 0.6). Es creu que aquesta proteïna de la superfície cel·lular és específica, i àdhuc que l'afinitat de la gp120 viral pel receptor CD4 és superior que l'afinitat pel seu lligand natural, un component de l'MHC-II<sup>36</sup>. A banda, s'ha demostrat que l'eliminació de l'hidrat de carboni de la gp120 purificada redueix significativament la unió de la proteïna vírica al receptor CD4<sup>12</sup>. Val a dir que, tot i que les principals cèl·lules amb aquest receptor són els limfòcits T<sub>H</sub> i els macròfags CD4+, altres cèl·lules que el tenen en superfície també poden ser infectades. Les interaccions del VIH-1 amb el CD4 no es limiten a aquesta primera etapa d'unió, sino que tant interaccions intracel·lulars com en la superfície de la cèl·lula persisteixen al llarg de la infecció, fet que pertorba la funció principal del CD4 com a coreceptor per a l'activació de limfòcits T<sup>37</sup>.



**Figura 0.6** Canvis conformacionals en les proteïnes involucrades permeten la unió i fusió del VIH a la cèl·lula

A més del receptor específic CD4, al qual s'han d'unir forçosament tots els subtipus de VIH, la infecció de les cèl·lules T requereix la interacció del complex gp120-CD4 amb un coreceptor<sup>36-38</sup>. S'han identificat *in vivo* dos receptors de quimiocines (CXCR4 i CCR5) amb aquesta funció (veure apartat 0.2.5, pàg. 20). La interacció de la gp120 del virus amb el receptor cel·lular primari CD4 provoca canvis conformacionals en la gp120 que en deixen al descobert una regió abans amagada, la qual pot interaccionar electrostàticament amb el coreceptor<sup>31,43</sup>.

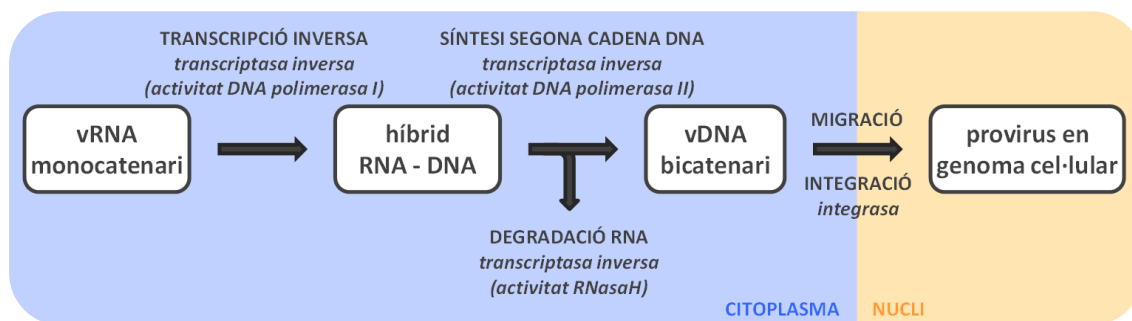
Aquest complex procés en dues etapes (unió al receptor i al coreceptor) proveeix al VIH d'una bona estratègia per protegir els seus epítops, altament conservats, del sistema immunitari humoral<sup>39</sup>.

**0.2.4.b. Entrada del VIH a la cèl·lula: Fusió**

La fusió té lloc entre les bicapes lipídiques de l'embolcall víric i la membrana de la cèl·lula hoste. La unió del complex gp120-CD4 al coreceptor CXCR4 o CCR5 provoca canvis conformacionals addicionals en la gp41, que permeten la fusió de la coberta del virus amb la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste. La proteïna transmembrana gp41 s'insereix a la membrana cel·lular i permet la internalització de la càpsida i l'alliberament del seu interior al citoplasma cel·lular<sup>35,38,44</sup> (Figura 0.6).

**0.2.4.c. Síntesi de DNA víric lliure o no integrat: Transcripció inversa**

Al citoplasma comença la replicació del retrovirus per transcripció inversa. L'enzim víric que catalitza aquesta etapa és un heterodímer amb dues subunitats (p66 i p51), cadascuna de les quals conté un domini polimerasa i la primera presentant també una activitat ribonucleasa H (RNasaH). La transcriptasa inversa es troba cristal·litzada en entorns varis, per la qual cosa se'n disposa d'una estructura ben definida. L'activitat DNA polimerasa I catalitza la síntesi d'una cadena de DNA monocatenari complementària a l'RNA de cadena senzilla. Un cop transcrit i format l'híbrid RNA-DNA, l'activitat polimerasa II catalitza la síntesi d'una segona cadena complementària de DNA, convertint el DNA monocatenari generat anteriorment en una molècula de DNA víric bicatenari (vDNA). Simultàniament, l'activitat RNasaH catalitza la degradació de la cadena d'RNA monocatenari<sup>7,23,30,34,35,38</sup>.



**Figura 0.7** Transcripció inversa

La transcriptasa inversa és molt propensa a cometre errors (un de cada  $10^5$  nucleòtids, molt lluny de l'un de cada  $10^9$  nucleòtids errats de forma natural per les DNA polimerases), la qual cosa comporta una elevada taxa de mutació i gran variabilitat<sup>32,45</sup>. A més, cal tenir en compte que el VIH té dues còpies del seu RNA en cada virió i que la transcriptasa inversa va canviant d'una a l'altra cadena durant la retrotranscripció. Conseqüentment, si les dues cadenes d'RNA víric no són genèticament idèntiques en un virió, la recombinació gènica pot comportar encara més variabilitat genètica<sup>46-52</sup>. Tot plegat dificulta els tractaments antiretrovirals i el desenvolupament de possibles vacunes. Finalment, a causa de la ràpida evolució en un individu infectat, el VIH pot desenvolupar fàcilment resistència als fàrmacs que el malalt pren per combatre'l.

#### **0.2.4.d. Infecció del genoma cel·lular: Integració**

En la següent etapa de migració, el vDNA es trasllada fins al nucli cel·lular, on la integrasa catalitza un seguit d'esdeveniments per integrar el genoma viral al cromosoma de la cèl·lula hoste, i es converteix així permanentment en part del seu genoma<sup>31,38</sup>. La integració, que procedeix segons un seguit de passos molt similars en tots els retrovirus, es pot donar en diferents punts del genoma de l'hostatger, tot i que s'ha suggerit que algunes interaccions amb altres proteïnes podrien dirigir la integrasa cap a regions específiques<sup>34</sup>.

El genoma víric integrat, anomenat provirus, roman latent (de manera que no es produeixen alteracions patològiques) fins que la cèl·lula T específica infectada s'activa com a resposta del sistema immunitari a antígens, citocines o altres virus. Aquesta activació comporta l'expressió del genoma viral. Tot i això, part del vDNA format també pot persistir al citoplasma en un estadi de latència preintegració, i integrar-se al genoma cel·lular amb el pas del temps i com a conseqüència d'estímuls sobre l'hostatger<sup>31</sup>.

#### **0.2.4.e. Expressió del genoma víric: Transcripció gènica**

Integrat al genoma cel·lular, el provirus es replica cada vegada que la cèl·lula ho fa amb el seu DNA. Tot i que l'activitat transcripcional basal és relativament baixa, la síntesi d'mRNA augmenta considerablement en presència de la proteïna transactivadora Tat.

L'activació cel·lular porta, doncs, a l'expressió del genoma viral i aquesta a la transcripció gènica. Els diferents gens estructurals del virus sintetitzen més d'una trentena d'mRNA que codifiquen tant els precursors estructurals com les diferents proteïnes reguladores del nou virió<sup>53</sup>. Per a la sortida d'aquest RNA del nucli és clau la proteïna Rev que interacciona amb la maquinària d'exportació nuclear de la cèl·lula i permet el transport d'RNA no empalmat o només parcialment empalmat fins al citoplasma cel·lular<sup>38</sup>.

#### **0.2.4.f. Síntesi de proteïnes víriques: Traducció**

El vRNA ha de tornar al citoplasma cel·lular per processar-se en transcrits de diferents mides, en els quals són fonamentals les proteïnes Tat i Rev. La traducció de l'RNA comporta la síntesi de nombroses còpies dels precursors de les diferents proteïnes víriques: la p55, la proteïna Gag-Pol i la glicoproteïna precursora gp160.

La p55 processada rendeix les proteïnes estructurals codificades pel gen *gag* (p17, p6, p24 i p7), mentre el gen *pol* dona lloc als tres enzims vírics (transcriptasa inversa, integrasa i proteasa). D'altra banda, la síntesi de les proteïnes de l'embolcall del virus (gp41 i gp120) es produeix al reticle endoplasmàtic de la cèl·lula hoste a partir de la glicosilació de la gp160, abans d'ésser transportades a la superfície de la cèl·lula<sup>31</sup>.

#### **0.2.4.g. Formació de nous virions: Assemblatge**

L'expressió de les proteïnes estructurals de la càpsida i la matriu és generalment suficient per a l'assemblatge correcte i l'alliberament de noves partícules virals no infeccioses (sense vRNA). El processament dels precursors a través de la proteasa vírica i diversos canvis conformacionals són crítics, tanmateix, per a l'obtenció de virions madurs amb capacitat infecciosa.

Aquest procés, anomenat maduració, sol ocórrer a la membrana cel·lular durant l'assemblatge, encara que també pot tenir lloc després de la gemmació de les noves partícules víriques<sup>54</sup>. Tenint en compte que l'assemblatge i la maduració han d'estar ben coordinats, tots els factors que influeixin en l'activitat de la proteasa poden tenir grans efectes sobre la producció de nous virions<sup>34</sup>.

L'assemblatge de les diferents proteïnes víriques del VIH, com en tots els lentivirus, té lloc a la membrana cel·lular<sup>38</sup>, tot i que alguns grups han demostrat que, en alguns casos i menys freqüentment, també pot tenir lloc en compartiments intracel·lulars<sup>35</sup>. És especialment freqüent en zones riques en colesterol i glicolípid, que potencien la unió a la membrana i les interaccions proteïna-proteïna, a més d'afavorir la transmissió cèl·lula-cèl·lula i augmentar la infectivitat<sup>54</sup>. En el cas del VIH, el precursor p55 és essencial en l'assemblatge, doncs s'uneix a la membrana cel·lular als pocs minuts de la seva síntesi i permet l'associació de la proteïna p17 de la matriu amb el domini citoplasmàtic de la proteïna transmembrana gp41<sup>55</sup>. Posteriorment, promou interaccions amb altres precursors i estimula la gemmació del nou virió.

A més, és essencial per a l'assemblatge i posterior gemmació que minvi el nombre de proteïnes CD4 en el citoplasma cel·lular, doncs aquestes podrien interaccionar amb les noves proteïnes víriques gp120 recent sintetitzades. Durant les primeres etapes de la infecció, la proteïna Nef accelera la degradació tant de molècules CD4 citoplasmàtiques com d'HLA-I i HLA-II de la superfície cel·lular. Més endavant, la proteïna precursora gp160 s'uneix als nous CD4 i la Vpu indueix a la degradació del receptor, per alliberar el precursor i permetre'n la maduració<sup>31,37</sup>.

#### **0.2.4.h. Sortida de nous virions: Gemmació**

La unió correcta de les proteïnes en la darrera etapa del cicle reproductiu del VIH forma el nou virió. Inicialment es creia que la gemmació seria un procés espontani, però s'ha determinat que hi ha senyals específics que promouen l'alliberament de les noves partícules víriques en un gran nombre de retrovirus<sup>38</sup>. Amb la darrera maduració del virió, aquest incorpora a l'embolcall algunes de les proteïnes de membrana de la cèl·lula hoste, que li serviran per protegir-se del sistema immunitari, a més de les proteïnes víriques gp120 i gp41. Malgrat alguns virus sense embolcall (com ara els adenovirus) passen directament a través de la membrana citoplasmàtica, sense causar dany a la cèl·lula hoste, hi ha molts virus vegetals i animals que maten la cèl·lula hoste i, en lissar-se aquesta, queden alliberats. La multiplicació del VIH, com en els retrovirus oncogènics, no és lítica, i no té com a conseqüència directa la mort cel·lular, tot i que sí indirecta.

Als 30 minuts de la infecció, s'ha suprimit l'expressió d'uns 500 gens cel·lulars i se n'han activat 200. En hores, l'mRNA de la cèl·lula hoste s'ha substituït en gran mesura per mRNA víric. El virus ha incapacitat la cèl·lula per generar energia i per reparar el mal del DNA que li ha causat: la mort cel·lular és irremeiable.

#### **0.2.5. Receptors i coreceptors d'entrada**

Tot i ser condició necessària, la proteïna transmembrana CD4 que actua com a receptor primari del VIH no és suficient per a l'entrada del virus a la cèl·lula hoste. Tal com ja s'ha comentat, la fusió

cèl·lula-virus requereix la interacció del complex gp120-CD4 amb un coreceptor que, en condicions normals, és receptor de quimiocines, un tipus de citocines.

Les citocines són proteïnes amb funció reguladora, de baix pes molecular (entre 6 i 14 kDa), secretades per diferents tipus cel·lulars en resposta a estímuls diversos, que afecten el comportament d'aquestes mateixes cèl·lules o el d'altres. Generalment produeixen una resposta inflamatòria caracteritzada per l'augment del flux sanguini local i la permeabilitat entre sang i teixits, de manera que augmenta el nombre de cèl·lules del sistema immunitari que arriben al lloc de la infecció (això produeix, com a efecte secundari, l'augment de la temperatura corporal associat a la febre)<sup>2,3</sup>. S'anomena limfocines a les citocines secretades per limfòcits i monocines a aquelles que produeixen els monòcits, mentre que el terme interleucines, més general, es refereix a les citocines secretades per leucòcits.

Les **quimiocines**, formades per un conjunt de 70 a 100 aminoàcids i 8 a 12 kDa, són citocines caracteritzades per la presència de residus de cisteïna (Cys) contigus o propers, que estimulen el moviment dels leucòcits i regulen la migració cel·lular des de la sang fins als teixits inflamats<sup>36,56</sup>. La gran família de les quimiocines es divideix en subfamílies seguint criteris estructurals i genètics, segons la posició dels residus cisteïna propers a l'extrem N-terminal: la subfamília CC no té cap aminoàcid entre els dos residus de Cys, la CXC en té un i la CX3C, tres, mentre la subfamília C té un sol residu Cys proper a l'extrem N-terminal de la proteïna<sup>43,56</sup>.

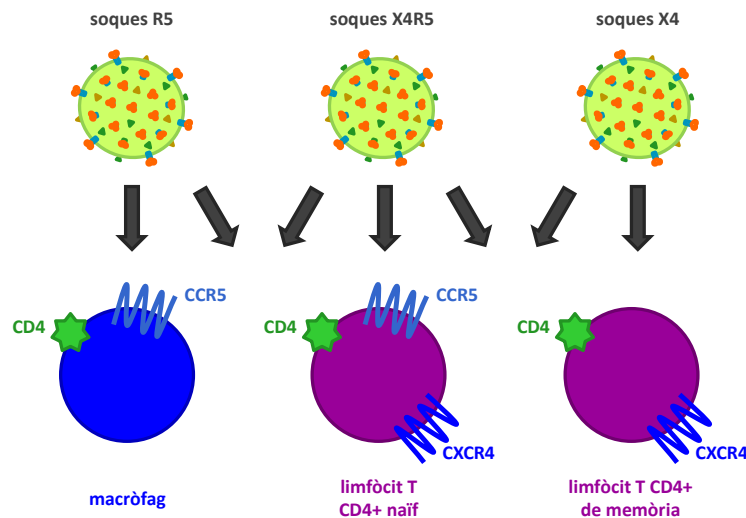
Les quimiocines interactuen amb la cèl·lula a través de receptors acoblats a proteïnes transmembrana cel·lulars (*G protein-coupled receptor*, GPCR), amb set dominis transmembrana, la família més gran de proteïnes de membrana que codifica el genoma humà, amb gairebé un miler de membres. La principal dificultat de la recerca en el camp de les GPCR és la manca d'estructures cristal·litzades resoltes de què es disposa, de manera que cal obtenir models computacionals dels coreceptors per homologia amb la rodopsina bovina, estructura publicada l'any 2000 com la primera GPCR de mamífer resolta<sup>57</sup>. No fou fins al 2007, ja en el transcurs d'aquesta tesi doctoral, que es resolgué la primera GPCR humana, el receptor adrenèrgic  $\beta_2$ <sup>58,59</sup>. A l'octubre de 2010, es publicà també l'estructura elucidada del coreceptor CXCR4<sup>60</sup>.

Tot i que es coneixen més de quaranta quimiocines diferents, hi ha tan sols 19 receptors de quimiocines humans coneguts. El genoma dels receptors CXCR coincideix en un 36-77%, mentre la subfamília CCR comparteix 46-89% de la seqüència d'aminoàcids. Les especificitats d'aquells s'encavalquen, malgrat que amb diferents afinitats. Així, algunes quimiocines CC com la MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* ) poden unir-se a diversos receptors, de la mateixa manera que alguns receptors accepten més d'una quimiocina diferent<sup>56</sup>.

Els receptors de quimiocines CXCR4 i CCR5 són els principals coreceptors en la infecció per VIH-1<sup>39,61,62</sup>. Els mecanismes moleculars pels quals faciliten la fusió del VIH-1 amb la cèl·lula no s'han acabat d'elucidar, però impliquen la formació d'un complex heterotrimèric de les proteïnes de l'embolcall del VIH-1 (gp120), el receptor CD4 i el coreceptor de la membrana cel·lular<sup>31,43,56,60</sup>.

El tipus de cèl·lules infectades pel VIH-1 varia entre soques i s'anomena **tropisme cel·lular**, determinat principalment pel llaç V3 de la gp120 i en segon terme per la regió V1/V2<sup>38,39,56,62-64</sup>. Aquelles soques capaces de replicar-se en monòcits macròfags es classificaren inicialment com a soques M-tròpiques (tot i que també poden infectar cèl·lules T) i poden ser inhibides per certes quimiocines CC. D'altra banda, particularment les soques que s'han fet créixer amb cèl·lules limfoides, infecten limfòcits T però no monòcits o macròfags i s'anomenen soques T-tròpiques. La identificació dels coreceptors necessaris per a l'entrada del virus a les cèl·lules va permetre desenvolupar un altre sistema de classificació més precís: aquelles soques que empren només el coreceptor CCR5 (bàsicament les anteriorment anomenades soques M-tròpiques) s'anomenen soques R5, les que utilitzen el coreceptor CXCR4 s'anomenen X4 (majoritàriament equivalents a les soques T-tròpiques) i aquelles soques que són

capaces d'infectar la cèl·lula hoste mitjançant qualsevol dels dos coreceptors amb la mateixa eficiència s'anomenen soques duals o R5X4<sup>36,39,65-67</sup> (Figura 0.8).



**Figura 0.8** Cèl·lules infectades segons el tipus de soca vírica

El coreceptor CXCR4, d'uns 46 kDa, s'expressa en multitud de teixits i tipus cel·lulars. Tan sols interacciona amb la quimiocina CXCL12, que atreu als limfòcits i també és coneguda com a factor derivat de cèl·lules estromals (*stromal cell-derived factor-1*, SDF-1)<sup>36,60</sup>. El fet que la CXCL12 endògena inhibís l'entrada del VIH-1 a la cèl·lula el va validar com a diana terapèutica<sup>68,69</sup>. Actualment, està esdevenint una diana cada vegada més interessant, sobretot tenint en compte que, a més de ser coreceptor d'entrada del VIH, regula la localització i guiatge de leucòcits i cèl·lules mare canceroses, i està estretament relacionat amb la progressió del càncer (creixement, metastasi i neovascularització)<sup>70,71</sup>.

Bleul i col·laboradors demostraren que el CCR5 és el coreceptor necessari en l'entrada de soques R5 en les primeres etapes de la infecció o la fase asimptomàtica, atès que certs lligands naturals d'aquesta proteïna (RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ) són capaços d'inhibir eficientment la infecció de cèl·lules T per aquelles soques, amb les quals sol iniciar-se la infecció i que es transmeten sexualment<sup>39,43,72</sup>. Un 50-60% dels pacients infectats desenvolupen, en aproximadament cinc anys, soques capaces d'utilitzar el coreceptor CXCR4, bé sigui simultàniament amb el CCR5 (soques R5X4) o exclusivament (soques X4). De la mateixa manera, la quimiocina CXCL12, lligand natural del CXCR4, també ha demostrat inhibir la infecció per soques X4 del VIH-1, però no per soques R5 o duals (R5X4)<sup>31,36,56</sup>.

El fet de trobar individus exposats al VIH que no s'infectaven tot i haver-se trobat sovint en situacions de risc va fer pensar en la possibilitat que existís una resistència natural a la infecció per VIH, probablement de naturalesa genètica. L'any 1996 es descobrí en els gens que expressen el receptor CCR5 una mutació que provoca la manca de part de la proteïna en la superfície cel·lular (CCR5- $\Delta$ 32) i que confereix resistència a la infecció per la inhibició de la unió cèl·lula-virus, fet que reforçà la importància dels coreceptors d'entrada per al VIH-1<sup>36,56,73</sup>. De la mateixa manera, hi ha individus que s'infecten però que mai arriben a desenvolupar la sida. Entre els principals factors que s'hi contemplen hi ha la infecció per virus menys virulents o la secreció d'alguna proteïna antiviral per part dels seus anticossos CD8<sup>31</sup>.

Diversos estudis han demostrat que, en medis sense CCR5 o molt rics en inhibidors d'aquest coreceptor, les soques R5 són capaces d'adaptar-se amb canvis petits per infectar les cèl·lules a través del coreceptor CXCR4. En cultius on el CCR5 es troba menys inhibit, les soques R5 persisteixen en emprar-lo com a coreceptor, tot fent la infecció més eficaç<sup>74,75</sup>.



## 0.3. Malaltia i tractament

### 0.3.1. La sida

La infecció pel VIH provoca una immunodeficiència progressiva per l'afectació qualitativa i quantitativa de les cèl·lules que ataca. Tot i que pot infectar diferents tipus de cèl·lules, té una atracció especial o tropisme pels macròfags tissulars i els limfòcits CD4+<sup>17</sup>, marcador que actua al mateix temps com a receptor primari o específic del virus.

Des del descobriment de l'agent etiològic de la sida s'ha pogut comprovar que la infecció per VIH és molt més complexa de com es pensava inicialment i els mecanismes que duen a la patogènesi de la sida encara no es comprenen completament avui en dia<sup>19</sup>. La disminució de la resposta cel·lular es fa palesa amb símptomes clínics que apareixen fins i tot anys després de l'exposició a l'agent infecciós<sup>17</sup>. En aproximadament el 50% dels casos, la infecció primària roman asimptomàtica, mentre que l'altra meitat dels pacients desenvolupa símptomes gripals<sup>31</sup>. De fet, el nombre de limfòcits T activats (els únics que permeten la replicació completa del virus) és probablement un factor limitant en la infecció inicial, després del primer contacte amb les cèl·lules dendrítiques. Òbviament, inflamacions i coinfeccions (de bacteris o virus) podrien augmentar el nombre de limfòcits activats i augmentar el risc d'infecció per VIH<sup>21</sup>. Tanmateix, un gran nombre de factors dependents de l'hoste i les fases inicials de la malaltia són crítics en la progressió de la infecció en diferents individus<sup>19,76</sup>.

A l'inici de la infecció, durant la fase presimptomàtica, el virus es replica principalment en els teixits limfàtics, aprofitant l'interval de temps que el sistema immunitari necessita per donar resposta. Tècniques de biologia molecular n'han permès calcular l'elevat índex de replicació: en un individu afectat es produeixen diàriament entre  $10^9$  i  $10^{10}$  partícules virals (una cèl·lula infectada genera de  $10^4$  a  $10^5$  partícules virals al dia), fet que provoca la destrucció diària de  $10^7$  a  $10^8$  limfòcits CD4 (s'estima que al voltant de l'1% de limfòcits CD4 són infectats diàriament pel VIH). Cal tenir en compte que la protecció dinàmica del sistema immunitari crea només  $10^7$  nous limfòcits diaris, amb una rotació aproximada de 10 dies<sup>3</sup>.

La replicació viral activa determina la possibilitat de quantificar la virèmia o càrrega viral d'un pacient, expressada en còpies de RNA per mil·lilitre, que pot arribar en alguns casos fins a  $10^8$  còpies de vRNA per mil·lilitre de plasma<sup>31</sup>. Més endavant, la resposta immunitària cel·lular i la conseqüent síntesi d'anticossos específics duu la càrrega vírica en plasma a nivells menors segons el pacient, i a la infecció crònica. Tot i que la velocitat de replicació disminueix, persisteix en alguns nodes limfàtics, fet que fa disminuir, lentament però progressiva, el nombre de limfòcits T, tant CD4+ com CD8+ (Figura 0.9)<sup>21,31,77</sup>. La resposta immunitària humoral específica té poca repercussió en el control de la infecció.

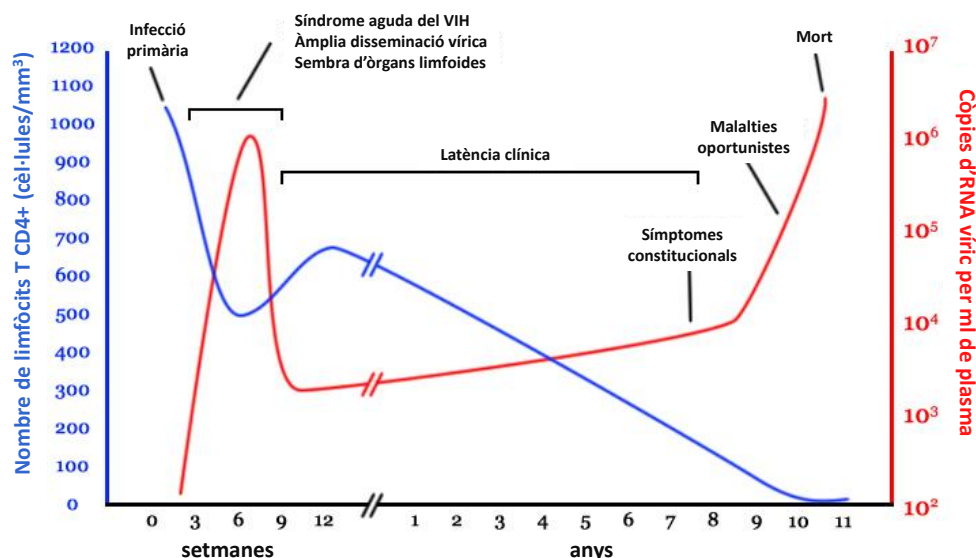


Figura 0.9 Progressió pròpia de la infecció per VIH (adaptat de Pantaleo <sup>77</sup>)

La destrucció indirecta del sistema immunitari pot tenir causes diverses:

- La mort cel·lular programada o apoptosi fou descrita en la infecció per VIH l'any 1991 pel grup de Luc Montagnier <sup>12,78</sup>.
- L'estrès oxidant, causat pel desequilibri entre la producció d'espècies reactives de l'oxigen i la capacitat de l'organisme d'eliminar-les, provoca una ràpida degradació de lípids i proteïnes cel·lulars, així com la carbonilació d'alguns dels seus aminoàcids <sup>79,80</sup>.
- S'ha demostrat que la resposta dels limfòcits T<sub>C</sub> controla la replicació viral mitjançant l'alliberament de proteases i perforina que duen a la lisi de la cèl·lula infectada <sup>31</sup>.
- L'alliberament massiu de virus recentment formats o la gemmació simultània de nombroses partícules víriques pot esquinçar la membrana cel·lular i produir danys irreparables <sup>12</sup>.
- La formació de sincicis per la fusió d'una cèl·lula infectada amb altres cèl·lules adjacents que no ho estan <sup>81</sup>.

Sense tractaments antiretrovirals i amb la constant replicació del VIH, el nombre de limfòcits esdevé perillosament baix en una mitjana de 8-10 anys. Els primers símptomes de la infecció són generalment altres infeccions oportunistes, que ja poden trobar-se a l'organisme de forma latent (Figura 0.9).

El conjunt de símptomes, malalties i infeccions associades a la immunodeficiència provocada per la infecció per VIH es coneix com a Síndrome de la Immunodeficiència Adquirida (SIDA o sida). La definició de casos d'aquesta malaltia ha variat al llarg dels anys des que al 1982 en foren reconeguts els primers pacients. Segons els *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dels Estats Units d'Amèrica, des de l'any 1993 l'estat dels pacients infectats per VIH es classifica segons la subpoblació de limfòcits CD4+ i les seves dades clíniques (Taula 0.4). Malgrat que la càrrega viral és un paràmetre important tant per al pronòstic com per al seguiment del tractament antiretroviral, no es té en compte en la classificació <sup>82,83</sup>. Així, es diu que un pacient és seropositiu quan es troba en la fase aguda (categoria clínica A) o crònica (categoria clínica B). Tenint en compte que totes les categories són excloents, el pacient s'ha de classificar en la més avançada possible, de manera que es diu que té sida si ha patit o pateix alguna de les malalties que la defineixen (categoria clínica C), sense altres causes possibles d'immunodeficiència (terapèutica, neoplàstica o congènita) <sup>83</sup>: candidasi traqueal, bronquial, pulmonar o esofàgica, retinitis per citomegalovirus, sarcoma de Kaposi, limfoma de Burkitt,

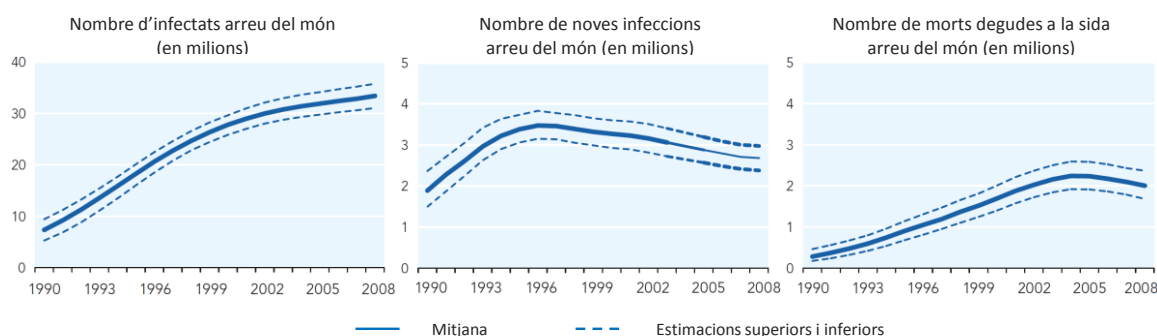
immunoblàstic, cerebral primari o altres limfomes equivalents, pneumònia per *P. carinii*, pneumònia recurrent (més de dos episodis a l'any) o leucoencefalopatia multifocal progressiva, entre d'altres.

**Taula 0.4** Classificació de la infecció pel VIH en adolescents i adults

		Categories clíniques		
		A fase asimptomàtica	B fase simptomàtica	C malaltia indicativa de sida
Categories immunològiques (valors normals en adults: $800 \leq$ limfòcits $CD4/mm^3 \leq 1300$ ) <sup>4</sup>	$\geq 500 CD4/mm^3$ ( $\geq 29\%$ )	A1	B1	C1
	$200 \leq CD4/mm^3 < 500$ (14-28%)	A2	B2	C2
	$CD4/mm^3 < 200$ (< 14%)	A3	B3	C3

### 0.3.2. Estat actual de la pandèmia

La depressió immunològica causada per la malnutrició, els abusos de drogues i l'augment de coinfeccions han potenciat probablement l'emergència de la sida com una epidèmia global<sup>21</sup>. Ben entrat el segle XXI no hi ha cap país del món sense casos d'infecció per VIH, per la qual cosa es parla ja de pandèmia, els efectes de la qual posen en perill el desenvolupament i l'equilibri socioeconòmic de moltes regions del món. Tot i els grans progressos que s'han fet en el coneixement en profunditat de l'agent etiològic de la sida i en el desenvolupament de noves teràpies antiretrovirals, el nombre total d'infectats arreu del món no para de créixer (Figura 0.10).



**Figura 0.10** Evolució de la pandèmia de la sida arreu del món (adaptat de UNAIDS<sup>84</sup>)

El programa de la sida de les Nacions Unides (UNAIDS) va estimar el desembre de 2008 que el nombre total de persones que vivien amb el VIH arreu del món arribava als 33,4 milions, més d'un 20% més que l'any 2000, i destacava que al voltant del 67% dels infectats, uns 22,4 milions, es trobaven a l'Àfrica subsahariana<sup>84</sup>. A Espanya, la prevalença l'any 2007 s'estimava en un 0,5% de la població adulta (d'entre 15 i 49 anys), el segon país Europeu just per sota de Suïssa, amb un 0,6% (Figura 0.11).

Malgrat els esforços que es dediquen per al control de la malaltia, s'estima que l'any 2008 es pogueren atribuir directament a la infecció 2,0 milions de morts, tan sols un 10% menys que set anys abans. El nombre total de morts, des del primer cas diagnosticat l'any 1981, supera ja els 25 milions.

L'impacte internacional de l'epidèmia queda demostrat pel fet que l'any 2008, 2,7 milions de persones contraguessin la infecció per VIH en tot el món. S'estima que el gairebé mig milió de noves infeccions en nens menors de 15 anys es produïren durant l'embaràs, el part o la lactància.

Segons les darreres dades epidemiològiques, la propagació global del VIH assolí els valors més elevats l'any 1996, amb 3,5 milions de noves infeccions. Congruentment, tenint en compte l'interval de temps entre l'exposició i la fase simptomàtica, el pic de morts arreu del món s'esdevingué l'any 2004, amb 2,2 milions de morts. En global, sembla que l'epidèmia s'ha estabilitzat en la majoria de regions, tot i que la prevalença continua augmentant a l'Europa Oriental i l'Àsia Central a causa de les noves infeccions.

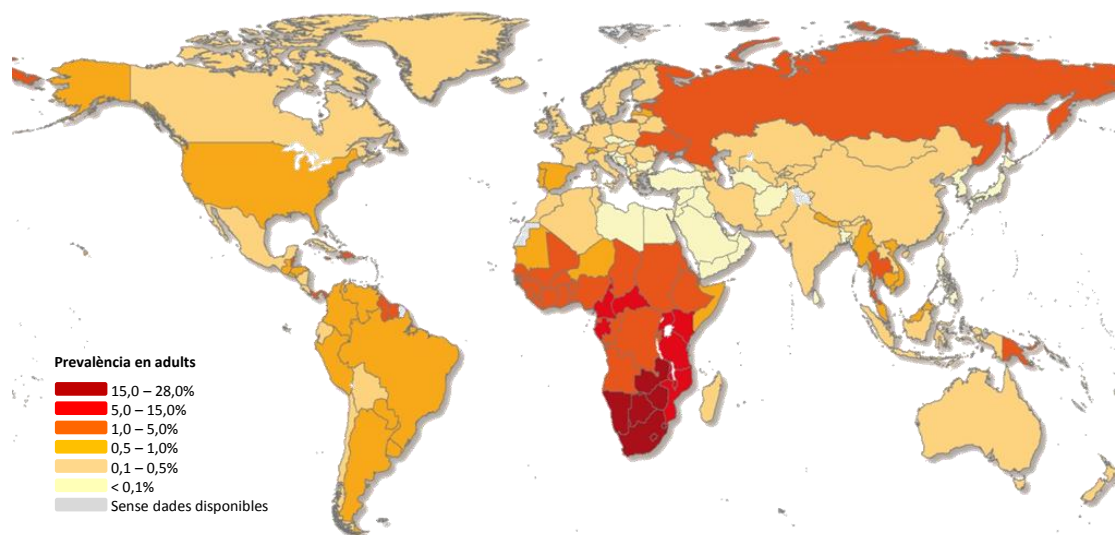


Figura 0.11 Prevalença de la infecció per VIH en adults l'any 2007 <sup>85</sup>

En una època de màxima globalització i mobilitat, la resposta a aquesta pandèmia ha d'ésser també global i coordinada. L'epidèmia de la sida confirma, en aquest sentit, la creixent diferència entre el nord i el sud. Cal recordar, emperò, que els tractaments sols no aturaran la pandèmia i que, per tant, la prevenció, el diagnòstic precoç i el tractament han d'anar tots en la mateixa direcció. És per això que les Nacions Unides s'han plantejat com a objectius prioritaris fins al 2011 la reducció de la transmissió del VIH per via sexual, la prevenció de la mort de mares i la infecció de nounats, assegurar el tractament als infectats pel VIH, la prevenció de la mort per tuberculosi dels infectats i la protecció dels drogodependents front a la infecció. A més, es pretenen minimitzar lleis, polítiques i pràctiques socials discriminatòries que impossibilitin respostes efectives contra la sida, encoratjar als joves de protegir-se contra el virus i augmentar la protecció social d'aquells afectats pel VIH.

La dificultat més gran en el tractament de la malaltia rau en el diagnòstic precoç. Des del punt de vista social, és fonamental saber al més aviat possible si una persona està infectada pel VIH. Una anàlisi de sang permet el diagnòstic eficient mitjançant mètodes directes, que detecten la presència del virus o algun dels seus components, com la prova de l'Ag de la proteïna vírica p24 o la prova de la reacció en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR); o mètodes indirectes, els quals detecten els Ac que genera l'organisme com a resposta a la presència del virus en sang, com ara testos ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) o Western Blots. Tanmateix, com que l'organisme triga uns tres mesos en produir Ac contra el VIH pot succeir que, si la prova indirecta es realitza al cap de pocs dies d'haver contret la infecció, surti negativa. En aquests casos s'aconsella aplicar mètodes directes o repetir les proves més endavant <sup>86</sup>.

Malgrat s'han aconseguit progressos importants en la prevenció de noves infeccions i la disminució de morts anuals directament relacionades amb la sida, les malalties relacionades amb ella romanen com una de les principals causes globals de mort dels infectats i es preveu que continuïn com una causa global significativa de mortalitat prematura. Cal també tenir en compte que l'epidèmia està

evolucionant: en països de l'Europa de l'Est i l'Àsia Central, on l'epidèmia es transmetia anys ençà per via parenteral, actualment es propaga cada vegada més per via sexual.

Els majors èxits s'han aconseguit darrerament en la prevenció i l'accés al tractament antiretroviral, el qual ha demostrat un gran benefici socioeconòmic<sup>87-89</sup>. La cobertura de serveis per a la prevenció de la transmissió del VIH de mare a fill va augmentar un 35% en quatre anys, situant-se al 2008 en un 45%, i ha permès el descens de noves infeccions entre els menors de 15 anys. A més, els grans esforços de governs i multinacionals realitzats per a la millora de l'accés al tractament antiretroviral estan tenint impactes sense precedents: l'any 2003, només un 7% dels infectats dels països en desenvolupament tenia accés als fàrmacs necessaris, mentre que al 2008 hi hagué una cobertura global del 42%. Especialment alta (48%) va ser la cobertura a l'Est i Sud de l'Àfrica<sup>84</sup>.

Els obstacles contra la prevenció i el control de la pandèmia de la sida no es troben solament en la naturalesa de l'agent etiològic, sinó també en la de les societats d'arreu. Pobresa i discriminació exclouen els més necessitats d'informació i tractament, en països on les infraestructures de salut pública es troben sobrepassades per altres malalties infeccioses. A més, en minvar la mà d'obra per l'augment de la mortalitat dels habitants en edat de treballar, es desestabilitza l'economia de molts països ja afeblits per la pobresa i la inestabilitat política.

En societats industrialitzades, els afectats pel VIH són els que tenen més impacte en la lluita contra la infecció. Els propis pacients es converteixen en els canals actius d'informació per a la prevenció.

L'educació resulta clau, doncs, per fer sentir i tractar allò que sovint es voldria deixar oblidat en el silenci.

### **0.3.3. Teràpia antiretroviral actual**

Les principals dianes terapèutiques consideren totes les fases del cicle biològic del virus de manera que, com a mínim en teoria, es podria procurar bloquejar, disminuir o anul·lar cadascuna de les etapes clau del cicle de replicació del VIH (Figura 0.12).

Existeixen diferents subtipus de VIH, que predominen en regions geogràfiques diverses. A més, també hi ha variacions considerables entre els subtipus; de fet, un mateix individu infectat pot ser portador de més d'una variant, car la transcriptasa inversa té una taxa de mutació força elevada<sup>21</sup>. El gran nombre d'errors en el DNA –provinent de l'RNA víric– que s'integra al cromosoma de l'hoste, dificulta el tractament i el desenvolupament de vacunes. Així mateix, la ràpida evolució del virus el permet fer-se resistent als fàrmacs que s'usen per tractar-lo. Una altra dificultat rau en els efectes secundaris sobre l'hoste de manera que, per evitar-los, cal que els fàrmacs siguin específics contra els enzims vírics i no contra el mecanisme de replicació.

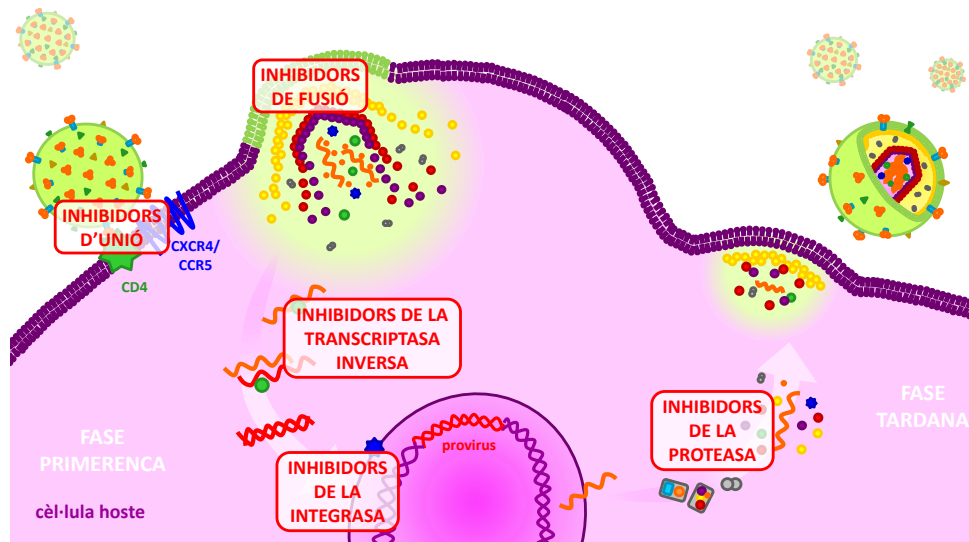


Figura 0.12 Possibles dianes terapèutiques

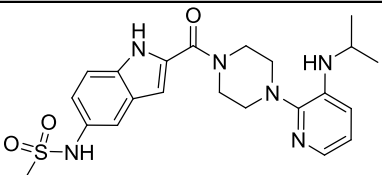
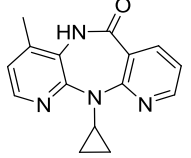
Les primeres teràpies aplicades anaven dirigides als enzims específics produïts pel VIH: transcriptasa inversa i proteasa, probablement perquè se'n coneixia l'estructura cristal·lina.

La transcriptasa inversa fou una de les primeres dianes en la recerca de fàrmacs antiretrovirals que actuessin en les etapes primerenques de la infecció. Els **inhibidors de la transcriptasa inversa** (ITI) tenen avui en dia força èxit en la prevenció de la infecció vertical (el tractament amb AZT de dones en estat que donen a llum per cesària, disminueix el risc d'infecció del nadó a un 1%)<sup>4</sup>. Els ITI poden ser anàlegs de nucleòsid (ITIAN), similars a alguna de les bases adenina, citosina, guanina o timina que formen el DNA, però prou diferents com per bloquejar-ne la síntesi; o no anàlegs de nucleòsid (ITINAN). El primer fàrmac aprovat per a la lluita contra la sida, ja al 1987, fou l'azidotimidina (AZT, també anomenada zidovudina), un ITIAN molt eficient en estudis *in vitro*<sup>90</sup>, que s'havia desenvolupat vint anys abans com a anticancerígen<sup>91</sup>. Malgrat que són menys potents que els no anàlegs de nucleòsid i els inhibidors de la proteasa, els ITIAN han estat sempre claus en el tractament antiretroviral i segueixen formant part de la teràpia estàndard. La principal limitació d'aquests fàrmacs és la necessitat de tres fosforilacions cel·lulars consecutives, essent especialment difícil la formació de l'anàleg monofosfatat. És per això que alguns ITIAN de nova generació contenen el primer grup fosfat necessari. Actualment hi ha vuit fàrmacs d'aquesta família aprovats per la *Food and Drug Administration* (FDA) dels EUA (Taula 0.8), obtinguts tant per modificacions en la part glicosídica com en la base nitrogenada<sup>92,93</sup>.

Els ITINAN foren introduïts al 1996 amb l'aprovació per la FDA de la nevirapina. Presenten potents activitats contra el VIH-1 i formen part dels tractaments inicials més utilitzats. Aquests compostos inhibeixen la transcriptasa inversa per la unió no competitiva a una regió al·lostèrica propera al centre actiu. L'ús d'ITINAN de primera generació (nevirapina i delavirdina) va dur a un ràpid desenvolupament de resistència, especialment quan s'utilitzaven com a monoteràpia, motiu pel qual es desenvoluparen els fàrmacs de segona generació, entre ells l'etravirina. Actualment hi ha quatre ITINAN aprovats per la FDA (Taula 0.5)<sup>92,93</sup>.

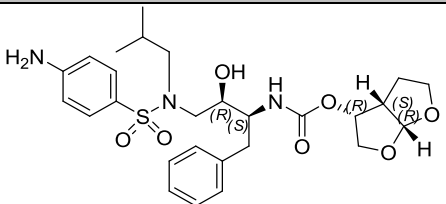
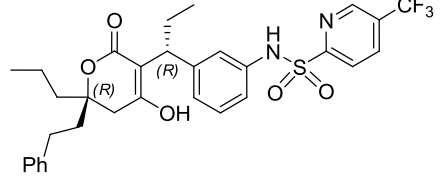
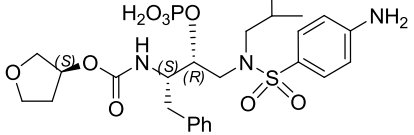
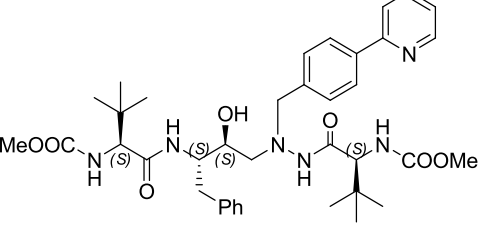
**Taula 0.5** Fàrmacs aprovats per la FDA (fins octubre 2010) que actuen sobre la transcriptasa inversa

fàrmac; data d'aprovació	estructura química	nom comercial	laboratori fabricant
<b>INHIBIDORS DE LA TRASCRIPTASA INVERSA ANÀLEGS DE NUCLEÒSID (ITIAN)</b>			
Emtricitabina, FTC; 2/7/2003		Emtriva®	Gilead Sciences
Tenofovir, TDF; 26/10/2001		Viread®	Gilead Sciences
Abacavir, ABC; 17/12/1998		Ziagen®	GlaxoSmithKline
Lamivudina, 3TC; 17/11/1995		Epivir®	GlaxoSmithKline
Stavudina, d4T; 24/6/1994		Zerit®	Bristol-Myers Squibb
Zalcitabina, ddC; 19/6/1992		Hivid®	Hoffmann-La Roche
Didanosina, ddl; 9/10/1991		Videx® EFG (3/12/2004)	Bristol-Myers Squibb Barr Laboratories
Zidovudina, ZDV (abans Azidotimidina, AZT); 19/3/1987		Retrovir® EFG (19/9/2005)	GlaxoSmithKline Aurobindo Pharma, Roxane Laboratories
<b>INHIBIDORS DE LA TRASCRIPTASA INVERSA NO ANÀLEGS DE NUCLEÒSID (ITINAN)</b>			
Etravirina, TMC125; 18/6/2008		Intelence®	Tibotec Therapeutics
Efavirenz, EFV; 17/9/1998		Sustiva®	Bristol-Myers Squibb

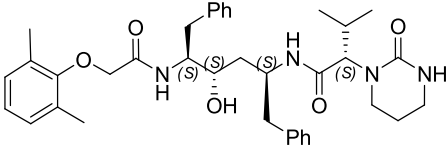
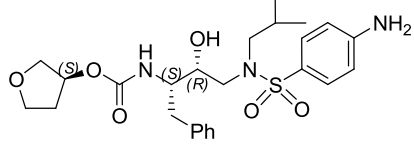
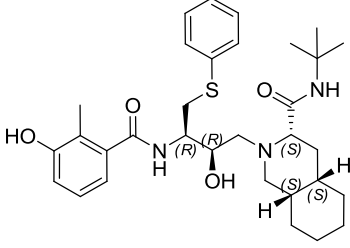
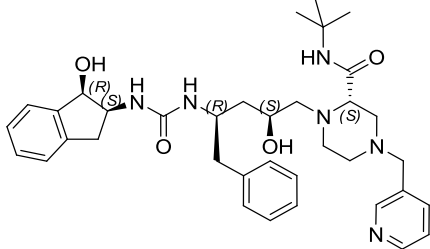
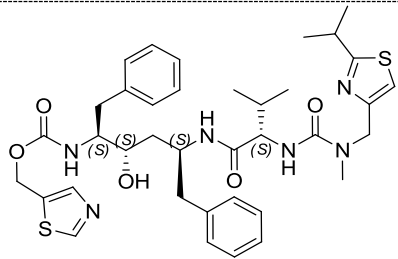
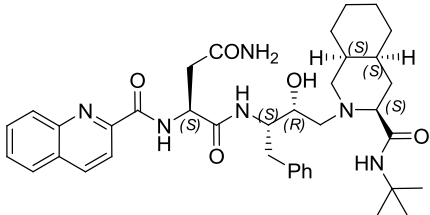
fàrmac; data d'aprovació	estructura química	nom comercial	laboratori fabricant
Delavirdina, DLV; 4/4/1997		Rescriptor®	Pfizer
Nevirapina, NVP; 2176/1996		Viramune®	Boehringer Ingelheim

Durant la darrera dècada del segle XX, el tractament amb ritonavir, un **inhibidor de la proteasa** (IP), va permetre disminuir significativament la càrrega vírica dels pacients i augmentar el recompte de cèl·lules CD4, la qual cosa demostrava la capacitat regenerativa de la població d'aquest tipus de cèl·lules<sup>16</sup>. Des de l'aprovació del primer IP l'any 1995 se n'han aprovat fins a nou d'altres que, tot i tenir el mateix mecanisme d'acció, presenten diferències importants quant a farmacocinètica, eficàcia i efectes secundaris<sup>90</sup> (Taula 0.6). Actualment, combinacions d'ITI i IP són l'estratègia de tractament inicial estàndard<sup>93,94</sup>.

**Taula 0.6** Fàrmacs aprovats per la FDA (fins octubre 2010) inhibidors de la proteasa vírica (IP)

fàrmac; data d'aprovació	estructura química	nom comercial	laboratori fabricant
Darunavir; 23/6/2006		Prezista®	Tibotec Therapeutics
Tipranavir, TPV; 22/6/2005		Aptivus®	Boehringer Ingelheim
Fosamprenavir, f-APV, FPV, GW433908; 20/10/2003		Lexiva®	GlaxoSmithKline, Vertex Pharmaceuticals
Atazanavir, ATV; 20/6/2003		Reyataz®	Bristol-Myers Squibb



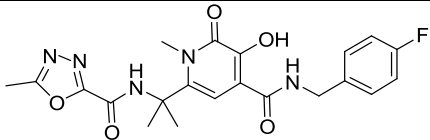
fàrmac; data d'aprovació	estructura química	nom comercial	laboratori fabricant
Lopinavir, LPV; 15/9/2000		Kaletra®	Abbott Laboratories
Amprenavir, APV; 15/4/1999		Agenerase®	GlaxoSmithKline
Nelfinavir, NFV; 14/3/1997		Viracept®	Agouron Pharmaceuticals
Indinavir; V; 1373/1996		Crixivan®	Merck
Ritonavir, RTV; 1/3/1996		Norvir®	Abbott Laboratories
Saquinavir, SQV; 6/12/1995		Invirase®, Fortovase®	Hoffmann-La Roche

A partir de 1996, el tractament simultani amb una combinació de tres inhibidors de diferents etapes del cicle de replicació víric (ITIAN, ITINAN i IP) va alterar el transcurs de l'epidèmia, doncs dificultava la mutació del virus per desenvolupar resistències<sup>95</sup>. La **teràpia antiretroviral de gran activitat (TARGA)** s'utilitza des de llavors per tractar a pacients amb elevades càrregues víriques i nivells baixos de CD4+ per evitar les infeccions oportunistes que poden arribar a ser letals en aquest estadi. La sida s'ha convertit així en una infecció crònica però tolerable, en què el nivell de partícules víriques en plasma arriba a ser indetectable, però sense assolir la cura: com que la teràpia actua sobre la producció activa de nous virions i no sobre l'etapa de latència, tan bon punt s'interromp el tractament, el virus torna a multiplicar-se ràpidament i el sistema immunitari torna a patir-lo<sup>95</sup>. De fet, s'han trobat formes latents tant de soques salvatges com de soques resistents fins i tot durant la TARGA<sup>93</sup>. Dissortadament,

aquest tractament no està exempt d'efectes secundaris indesitjables a llarg termini (alguns dels quals afecten avui en dia a poblacions d'edat avançada que fa anys que reben el tractament) de manera que no s'acostuma a recomanar fins que no es presenten símptomes clars de desenvolupar la malaltia. El moment òptim per a l'inici de la TARGA roman en controvèrsia, doncs les millores en els pacients infectats són similars tant si es tracten durant la infecció primerenca com en la fase crònica de la malaltia. Òbviament, tot i que sembla poc raonable endarrerir la teràpia antiretroviral fins que s'ha arribat a una immunodeficiència severa i possiblement irreversible, no s'ha pogut determinar amb total seguretat si la progressió de la infecció per VIH-1 es pot alterar amb la intervenció immediata<sup>89,96,97</sup>.

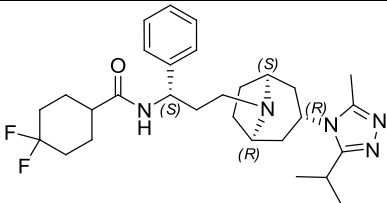
El tercer enzim víric, la integrasa, és activa com a oligòmer (probablement tetràmer), podent-se dividir el monòmer en tres dominis<sup>34</sup>. La seva estructura cristal·logràfica es va descriure per primer cop al 1994<sup>98</sup> i va permetre la identificació de nous inhibidors. Tenint en compte que no presenta homòleg cel·lular directe, no s'esperen gaires efectes secundaris amb aquesta família de fàrmacs, que de moment només conté el raltegravir, aprovat al 2007<sup>90</sup> (Taula 0.7).

**Taula 0.7** Inhibidor de la integrasa (II) aprovat per la FDA (fins a l'octubre 2010)

fàrmac; data d'aprovació	estructura química	nom comercial	laboratori fabricant
Raltegravir, MK0518; 12/10/2007		ISENTRESS®	Merck

Tot i que la unió i fusió del virus a la cèl·lula han estat àmpliament validades com a dianes terapèutiques<sup>99-102</sup>, són les darreres per a les quals s'han trobat inhibidors. El primer fou l'Enfuvirtide (comercialitzat com Fuzeon®), un pèptid de 36 aminoàcids, aprovat per la FDA l'any 2003, que inhibeix la fusió de la membrana cel·lular amb l'embolcall del virus per la interacció amb la gp41. Entre els seus inconvenients es troben els efectes secundaris de la injecció subcutània, dos cops al dia, amb què s'administra a causa de la ràpida eliminació, a més del cost de producció d'un pèptid de 5 kDa com és aquest<sup>92</sup>. L'agost de 2007 es va aprovar el Maraviroc (Selzentry®), un inhibidor del coreceptor CCR5 i per tant del reconeixement i unió del virus a la cèl·lula<sup>90,103</sup>. Malauradament, poc temps després de la seva aprovació s'ha demostrat per ambdós fàrmacs el desenvolupament de resistència per part del virus, bàsicament per la substitució d'alguns aminoàcids de la gp41 (en el cas de l'inhibidor de la fusió Enfuvirtide) o de la gp120 (en l'inhibidor de la unió, Maraviroc)<sup>90</sup> (Taula 0.8).

**Taula 0.8** Fàrmacs inhibidors de les etapes extracel·lulars aprovats per la FDA (fins octubre 2010)

fàrmac; data d'aprovació	estructura química	nom comercial	laboratori fabricant
Maraviroc; 6/8/2007		Selzentry®	Pfizer
Enfuvirtide, T-20; 13/3/2003	pèptid de 36 aminoàcids, de seqüència YTSLIHSLIE ESQNQQEKNE QELLELDKWA SLWNWF	Fuzeon®	Hoffmann-La Roche, Trimeris

Amb tot, actualment es disposa de vint-i-cinc fàrmacs aprovats per la FDA, dirigits a cinc grans dianes terapèutiques: la unió del virus a la cèl·lula hoste, la fusió de les membranes i els tres enzims vírics transcriptasa inversa, integrasa i proteasa. A més, s'han aprovat també diverses combinacions de dosi fixa de dos o tres inhibidors dirigits a minimitzar el desenvolupament de resistències a un fàrmac concret. El principal objectiu de la teràpia antiretroviral actual és minimitzar la replicació vírica fins a nivells inferiors a 50 còpies d'RNA/ml (el mínim detectable amb els assajos biològics de què es disposa), així com l'augment del recompte de cèl·lules CD4+ amb els mínims efectes secundaris <sup>89</sup>.

Tanmateix, el desenvolupament de multiresistències i la transmissió de soques resistents limiten l'eficàcia a llarg termini dels tractaments actuals. D'altra banda, els pacients han de prendre un gran nombre de medicaments, fet que dificulta el compliment i afavoreix el fracàs terapèutic. Així doncs, cal trobar combinacions de fàrmacs amb menors toleràncies i efectes secundaris, més efectives i més simples, potenciant la recerca d'inhibidors de dianes terapèutiques alternatives, amb l'objectiu d'eradicar la infecció <sup>31,88,89</sup>.

### 0.3.4. El futur immediat

Més de dues dècades després de l'aprovació per a l'ús clínic del primer fàrmac antiretroviral, la sida s'ha convertit, com a mínim en els països més desenvolupats, en una malaltia crònica, amb millores significatives pel que fa a la qualitat i l'esperança de vida. Tanmateix, tenir la impressió que la pandèmia de la sida s'ha resolt o, si més no, s'ha estabilitzat i és controlable, seria un greu error que podria suposar una barrera per al progrés en un futur immediat. Com a exemple, encara no disposem de vacunes ni de cap antisèptic tòpic que protegeixi contra les transmissions. En realitat, queda molt camí per recórrer i molts dels reptes que encara no s'han superat podrien suposar també una gran oportunitat.

Tot i que estratègies de prevenció tals com els microbicides i la profilaxi antiretroviral s'exploren àmpliament com a alternatives <sup>89</sup>, un gran repte pendent de resoldre és que l'eradicació real del VIH-1 no pot assolir-se amb les eines de què disposem actualment. La latència viral (tant pre- com post-integració) no està ni molt menys resolta i el provirus integrat en cèl·lules T amb memòria, cèl·lules dendrítiques o macròfags és un reservori de virus incontrolat. D'altra banda, el desenvolupament de resistència als fàrmacs i l'augment de la diversitat genètica del VIH no és fàcil de resoldre <sup>95</sup>.

El paradigma actual de la teràpia antiretroviral recau en els enzims vírics, però cal aprofitar l'oportunitat de poder trobar més agents contra altres dianes que lluitin envers l'emergència de soques resistents a fàrmacs, àdhuc d'aquells subtipus de VIH abans inusitats que prevalen cada vegada més. Entre les noves dianes terapèutiques que es plantegen es troben <sup>88,92,104,105</sup>:

- Els microdominis lipídics de les membranes cel·lulars: diversos estudis han demostrat que molts virus, incloent el VIH-1, utilitzen raïls lipídics (regions de les membranes cel·lulars riques en lípids saturats i colesterol) com a plataformes per a l'entrada i l'assemblatge dels virions.
- L'alliberament de l'interior de la nucleocàpsida al citoplasma cel·lular: tot i que es desconeix la seqüència exacta d'esdeveniments previs a la transcripció inversa, és un camp de recerca molt actiu.
- La inhibició de l'activitat RNasaH de la transcriptasa inversa, per a la qual encara no hi ha fàrmacs aprovats.
- La integració del vDNA en el genoma cel·lular, per a la qual només hi ha un inhibidor aprovat.

- Altres etapes del cicle de replicació que no s'han explorat fins a l'actualitat per desconeixement en profunditat, com són l'assemblatge i maduració dels nous virions o les proteïnes accessòries (Vif, Vpu, Nef).

Les teràpies gèniques han sorgit darrerament com una nova possibilitat d'inhibir la replicació del VIH, tot dissenyant cèl·lules CD4+ que resisteixin la infecció, com sembla el cas de la teràpia HGTV43 d'Enzo Biochem, M87o d'EUFETS AG o les modificacions genètiques que duu a terme Cell Genesys, totes en fase clínica I. Ja en fase clínica II es troba la teràpia gènica Mifepristone (també VGX410 o RU486) de Viral Genomix.

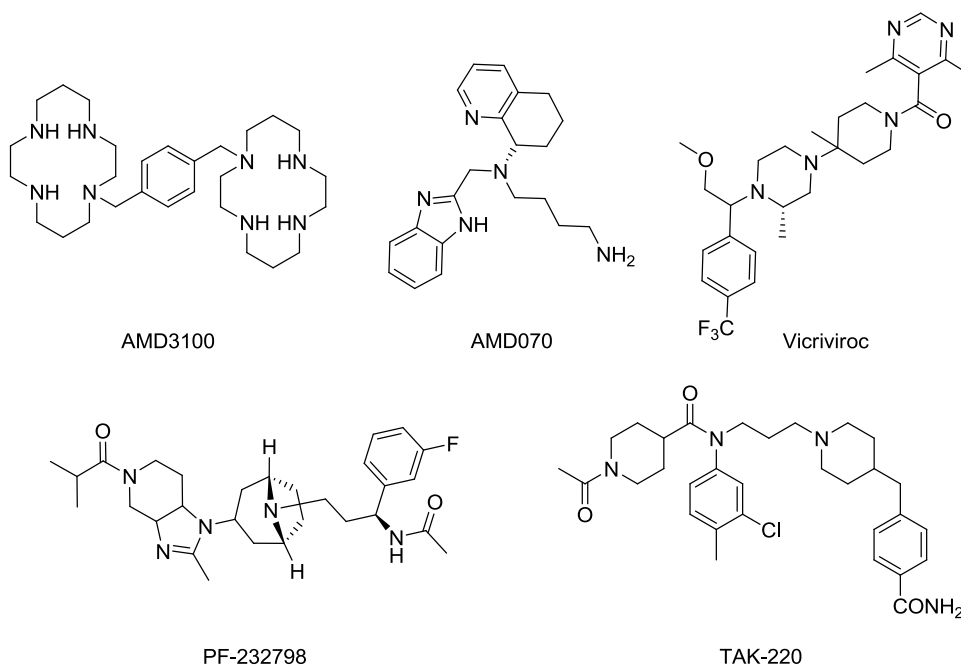
Una altra possibilitat interessant és intentar actuar directament sobre els virions infecciosos, inhibint per exemple la unió a la cèl·lula a través del bloqueig de les espícules de gp120 i gp41. Nombrosos pèptids sintètics derivats de la gp41 es van emprar en estudis preliminars per al desenvolupament d'una vacuna contra el VIH, però no es dissenyaren com a inhibidors de la fusió. Agents antivirals dirigits a les proteïnes víriques seran, en termes generals, més específics i menys tòxics, amb un espectre d'activitat menor, però també facilitaran la resistència vírica. Johnson & Johnson està desenvolupant en aquest sentit l'RRz2 un ribozim (fragment d'RNA que pot actuar com a enzim) que neutralitza el gen *tat*, igual que BI201 (BioInvent), un anticòs del qual s'ha aturat el desenvolupament clínic. El VRX496 de VIRxSYS, un vector antiviral que inhibeix la replicació del VIH, es troba actualment en fase clínica II<sup>93,106</sup>.

Tenint en compte la baixa variabilitat de la càpsida vírica, fàrmacs que actuessin sobre ella podrien ser efectius durant períodes de temps molt llargs<sup>107</sup>. Amb aquest objectiu es desenvolupen tractaments que actuïn sobre les proteïnes del tipus dits de zinc que la mantenen unida, com la teràpia gènica SB-728-T de Sangamo BioSciences (actualment en fase clínica I) i l'azodicarbonamida (ADA), que va arribar a fase clínica II. Tanmateix, les proteïnes dits de zinc són molt freqüents per establir les estructures terciàries o quaternàries de les proteïnes, de manera que es poden preveure importants efectes secundaris.

Pel que fa a l'actuació sobre el cicle de replicació vírica, les etapes extracel·lulars resulten extremadament interessants per a la quimioteràpia contra el VIH, especialment per aquells pacients que mostren resistència als tractaments habituals<sup>90,100,107-110</sup>: un inhibidor de la unió o fusió impediria que el DNA províric s'integrés al genoma cel·lular, la qual cosa previndria la proliferació de la infecció. Cal tenir en compte que el receptor primari CD4 emprat en l'etapa d'unió no pot inhibir-se totalment, doncs és essencial per al reconeixement de l'MHC-II per part dels limfòcits T<sub>H</sub> durant la resposta immunitària cel·lular. La cerca de nous inhibidors de la unió o fusió ha de passar, doncs, per molècules petites que interaccionin amb els coreceptors CXCR4 o CCR5 (o una combinació d'antagonistes d'ambdós), que ja s'han validat com a dianes terapèutiques<sup>68,69,99,100</sup>. De fet, els lligands naturals dels receptors de quimiocines s'han estudiat com a potents inhibidors competitiu en la unió del VIH a les cèl·lules hostes que expressen el coreceptor adequat: la CXCL12 com a inhibidor del CXCR4 i el RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) i l'MIP-1 $\alpha$  per al coreceptor CCR5<sup>111,112</sup>. Tot i que aquestes molècules podran tenir un gran espectre d'acció i el virus difícilment podrà desenvolupar-hi resistència, poden presentar algun problema de toxicitat associada, tenint en compte la importància reguladora de les citocines<sup>92</sup>.

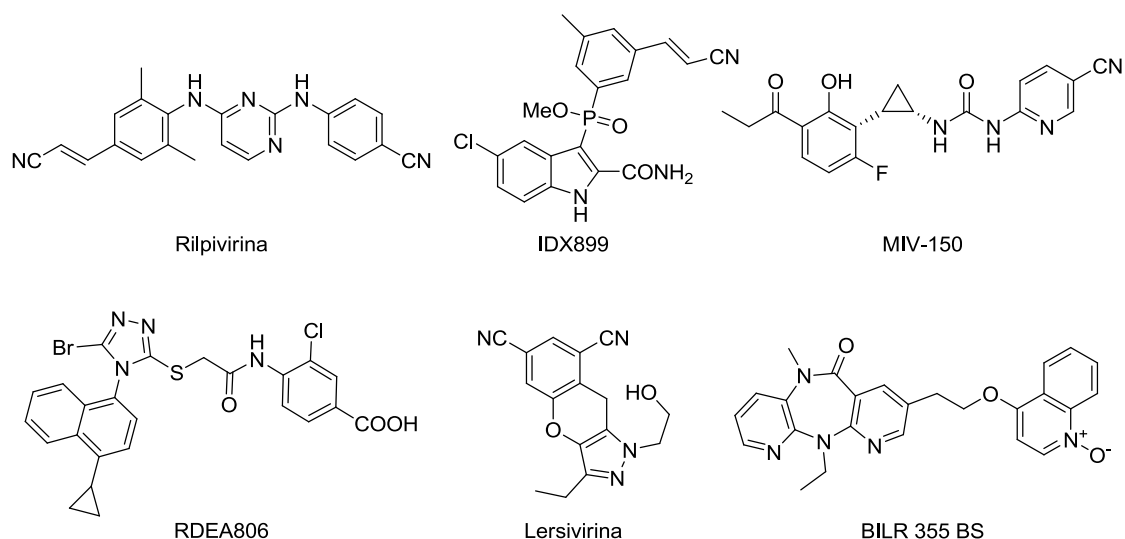
L'ibalizumab (TNX-355) de Tanox està en fase clínica II des de l'any 2006 i és un anticòs monoclonal que inhibeix la unió del virus al receptor cel·lular primari CD4<sup>100,109</sup>. Un altre anticòs monoclonal, el PRO140 dirigit al coreceptor CCR5 superà satisfactòriament la fase clínica I l'any 2007 i es troba actualment en fase clínica II. El biclicam AMD3100, el prototip dels antagonistes de CXCR4, ha demostrat inhibir a concentracions nanomolars les etapes prèvies a la fusió i s'ha investigat posteriorment com a agent anticancerígen amb el nom de plerixafor<sup>113-115</sup>. Tot i que el desenvolupament de diversos inhibidors d'aquest coreceptor ha estat aturat per hepatotoxicitat,

l'AMD070 de Genzyme, un candidat oralment biodisponible, es troba actualment en fase clínica II, amb resultats satisfactoris. El vicriviroc (Schering-Plough) és un inhibidor del CCR5 actualment en fase clínica III, del qual s'espera l'aprovació com a fàrmac properament <sup>92,116</sup>. El TAK-220 de Takeda Pharmaceuticals i PF-232798 (Pfizer), en desenvolupament, semblen candidats prometedors <sup>100,109</sup>, el segon amb biodisponibilitat oral demostrada <sup>101,102,117</sup>. El Cenicriviroc (Tobira Therapeutics), un altre antagonista del CCR5 oralment biodisponible, també està donant bons resultats en fase clínica II <sup>118</sup>.



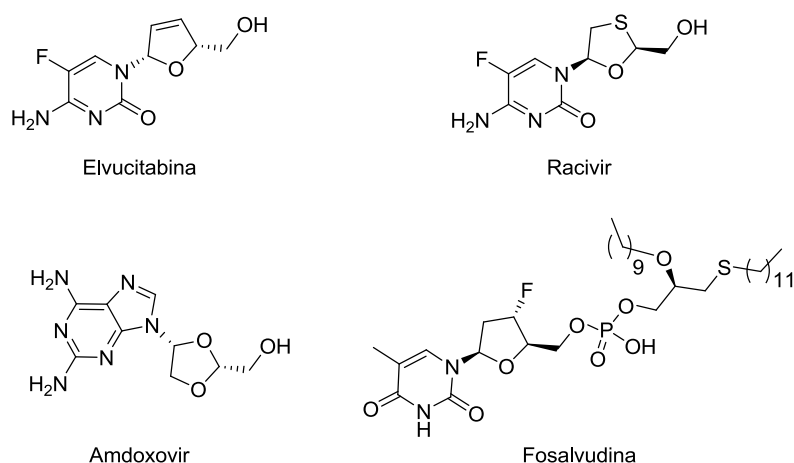
**Figura 0.13** Antagonistes dels coreceptors CXCR4 i CCR5 en desenvolupament

Els assajos clínics de diversos ITINAN han estat interromputs a causa dels seus perfils de farmacocinètica, eficàcia o toxicitat, però hi ha candidats varis en fases clíniques avançades (Figura 0.14). La rilpivirina (Tibotec) es presenta com una bona alternativa a l'efavirenz per al tractament inicial, doncs té menys efectes secundaris associats i bona biodisponibilitat, i es troba actualment en fase clínica III <sup>89,92,116</sup>. L'RDEA806 pertany a la família dels triazoles i entrà en fase clínica IIb a finals de l'any 2009. Al novembre del mateix any començaren les fases clíniques II de l'IDX899 desenvolupat per Idenix Pharmaceuticals, un fosfoindole amb perfils de toleràncies similars als altres ITINAN de segona generació. La lersivirina de Pfizer també es troba actualment en fase clínica II, així com l'MIV-150 (Medivir Pharma) i el BILR 355 BS <sup>92</sup>.



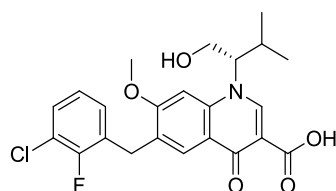
**Figura 0.14** ITIAN en desenvolupament a l'octubre 2010

Pel que fa als ITIAN de segona generació, l'apricitabina d'Avexa Pharmaceuticals arribà a fases clíniques III amb molt bons perfils, fins i tot front a soques resistents als ITIAN actualment aprovats. Sorprenentment, el seu desenvolupament s'aturà al maig del 2010, a causa del temps i els diners necessaris per a la possible aprovació del fàrmac, així com l'elevada dosi necessària en cas de combinar-se amb altres fàrmacs ja aprovats i la dificultat de determinar-ne l'efectivitat en combinació<sup>89,119</sup>. Koronis va portar fins a fase clínica II el KP-1461, un profàrmac d'ITIAN que duu a la mort vírica a causa d'un excés de mutacions en el vRNA<sup>120-122</sup>. L'elvicitabina, desenvolupada per Achillion Pharmaceuticals, és un dels candidats actualment en fase II i no presenta efectes secundaris notables. L'amdoxovir, fruit de la recerca universitària, es troba en desenvolupament clínic per RFS Pharma i els efectes adversos que s'han identificat proven de minimitzar-se a través de profàrmacs. En el mateix estadi es troben la fosalvudina i el racivir, que és una mescla racèmica.



**Figura 0.15** ITIAN en fases clíniques a l'octubre de 2010

Provant d'inhibir l'enzim víric integrasa es troben actualment en fase clínica III dues molècules petites: l'elvitagravir de Tibotec<sup>89,90,106,109,116</sup> i el GSK1265744 (ViiV Healthcare). Essent una diana terapèutica que només disposa d'un fàrmac aprovat, és un camp amb molts possibles candidats. Actualment s'ha interromput el desenvolupament clínic de L870810 de Merck i l'S1360 (també GW810781) de GlaxoSmithKline.



Elvitegravir

**Figura 0.16** Inhibidor de la integrasa en fase clínica III, de Tibotec

Finalment, dos fàrmacs inhibidors de la maduració, Bevirimat (de Myriad Pharmaceuticals) i Vivecon (de Myriad Genetics), tot i haver-se interromput el seu desenvolupament, van arribar a fases clíniques<sup>106</sup>.

**Taula 0.9** Resum de fàrmacs antiretrovirals en desenvolupament (octubre 2010)

fàrmac	desenvolupament clínic	laboratori
<b>TERÀPIES GÈNIQUES</b>		
HGTV43	I	Enzo Biochem
M87o	I	EUFETS AG
Modificacions genètiques en cèl·lules CD4+	I	Cell Genesys
Mifepristone (VGX410, RU486)	II	Viral Genomix
<b>INHIBIDORS DELS VIRIONS</b>		
RRz2	II	Johnson & Johnson
VRX496	II	VIRxSYS
<b>INHIBIDORS DE PROTEÏNES DITS DE ZINC</b>		
SB-728-T	I	Sangamo BioSciences
HPH116 (ADA)	II	H-Phar
<b>INHIBIDORS LES FASES EXTRACEL·LULARS DEL CICLE DE REPLICACIÓ</b>		
Ibalizumab (CD4)	II	Tanox
AMD070 (CXCR4)	II	Genzyme
PRO140 (CCR5)	II	Progenics Pharmaceuticals
TAK-220 (CCR5)	II	Takeda Pharmaceuticals
PF-232798 (CCR5)	II	Pfizer
Cenicriviroc	II	Tobira Therapeutics
Vicriviroc (CCR5)	III	Schering-Plough
<b>INHIBIDORS DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA</b>		
MIV-150 (ITINAN)	II	Medivir Pharma
BILR 355 BS (ITINAN)	II	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals
IDX899 (ITINAN)	II	Idenix Pharmaceuticals
Lersivirina (ITINAN)	II	Pfizer
RDEA806 (ITINAN)	II	Ardea BioSciences
Rilpivirina (ITINAN)	III	Tibotec
Elvucitabina (ITIAN)	II/III	Achillion Pharmaceuticals
Amdoxovir (ITIAN)	II	RFS Pharma
Fosalvudina (ITIAN)	II	Heidel Pharma
Racivir (ITIAN)	II/III	Pharmasset
KP-1461 (ITIAN)	II	Koronis
<b>INHIBIDORS DE LA INTEGRASA (II)</b>		
GSK1265744	II	ViiV Healthcare
Elvitegravir	III	Tibotec
GSK1349572	III	ViiV Healthcare

## 0.4. El projecte de la sida al GEM

El Grup d'Enginyeria Molecular (GEM) fou creat l'any 1998 a través de l'IQS i per la Universitat Ramon Llull (URL) com un grup de recerca multidisciplinari en l'àmbit de la Química Mèdica, la Biomedicina i la Fotobiologia, amb l'objectiu de donar resposta, des de la perspectiva molecular, a les necessitats tecnològiques i de formació del sector químic i afins. Forma part de la xarxa IT (actualment l'agència ACCIÓ) des de l'any 2000 i va ser reconegut per la Generalitat de Catalunya com a Grup de Recerca Consolidat l'any 2005<sup>123</sup>.

### 0.4.1. Un projecte finançat des dels inicis

Amb la Química Combinatòria i una malaltia global en ment, el Laboratori de Disseny Molecular del GEM va començar el desenvolupament d'un programari propi per a la creació i selecció de quimiotèques combinatòries virtuals (*Program for Rational Analysis in Silico*, PRALINS), prenent com a base de dades de compostos amb activitat biològica un conjunt d'anàlegs de l'HEPT (un ITINAN), fet que va obrir el camí a la recerca contra la sida<sup>124-126</sup>. L'aplicació de PRALINS sobre les quimiotèques dissenyades al GEM en aquest camp ha donat com a resultat diversos treballs en els darrers anys<sup>127-130</sup> i l'obtenció de projectes tant nacionals com europeus (SAF i COST).

El finançament extern a l'IQS pel que fa al projecte de la sida al GEM començà l'any 2003 gràcies a la Fundació La Marató de TV3, que va ser creada l'any 1996 per la Corporació Catalana de Mitjans Audiovisuals per fomentar i promoure la recerca biomèdica d'excel·lència. En la desena edició del programa La Marató de TV3 (16 de desembre de 2001), la Fundació va dedicar el programa a la sida, reconeguda com la pitjor epidèmia del segle XX. El programa va recollir més de 774 milions de pessetes, equivalents a més de 4,5 milions d'euros actuals<sup>131</sup>. Gairebé 4 milions d'euros es van dedicar a finançar 21 projectes de recerca biomèdica, els resultats dels quals es van fer públics en el VIII Simpòsium Fundació La Marató de TV3 l'any 2007.

El projecte presentat en col·laboració entre el GEM i el Laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa de l'Hospital Germans Trias i Pujol, fou un dels projectes destacats que rebé finançament de la Marató d'aquell any (Projecte 020931). Amb el títol *Disseny, síntesi i avaluació antiviral de nous compostos anti-VIH* el projecte presentat havia de permetre al grup consolidar-se com a centre de referència per al cribratge i l'avaluació de fàrmacs antiretrovirals, donant gran importància a la recerca d'inhibidors de l'entrada del VIH a les cèl·lules hostes a través de la unió del virus als coreceptors cel·lulars CXCR4 i CCR5.

En la part computacional d'aquest projecte s'obtingué un model per als coreceptors i se'n va predir el lloc i el mode d'unió de diferents compostos<sup>132,133</sup>. El cribratge virtual de diverses quimiotèques de compostos amb activitat coneguda va dur a la validació dels models. A més, el projecte permeté continuar amb el desenvolupament del programari PRALINS, tot implementant-hi diferents mètodes de selecció i algorismes d'optimització<sup>124,128</sup>. Pel que fa a la part sintètica, els bons resultats de la recerca duta a terme als laboratoris del GEM foren ja palesos des de poc després d'iniciar-se aquest camp a l'IQS (veure apartat 0.4.2).

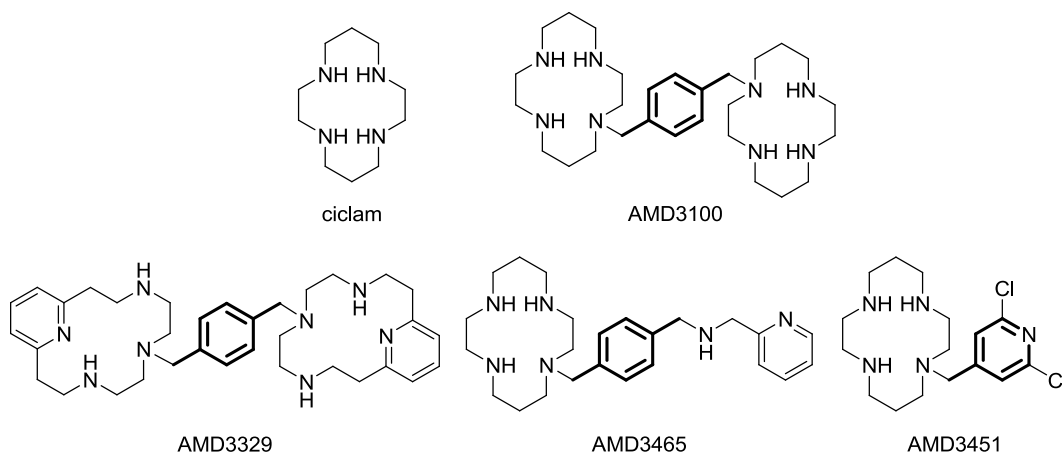
A finals de l'any 2007, acabat el finançament atorgat per la Fundació La Marató de TV3, el Ministeri d'Educació i Ciència va concedir al GEM el projecte *Diseño y síntesis de nuevos inhibidores de entrada del VIH* (SAF2007-63622-C02), amb el qual es podia continuar la recerca en aquest camp. Recentment, s'ha aconseguit l'aprovació del Ministeri de Ciència i Innovació per al projecte coordinat amb el Laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa *Programa de investigación antiviral VIH-VHC: diseño y síntesis de antivirales potenciales* (SAF2010-21617-C02).



El seguit de projectes aprovats, tant inicialment per la Fundació La Marató de TV3 com més tard pels ministeris espanyols demostren no només l'interès científic de la recerca duta a terme als laboratoris del GEM sinó també la qualitat dels resultats obtinguts i la satisfactòria coordinació amb el Laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa, amb els quals no s'ha deixat de col·laborar fins a l'actualitat per a l'avaluació de l'activitat antiviral dels compostos sintetitzats al laboratori.

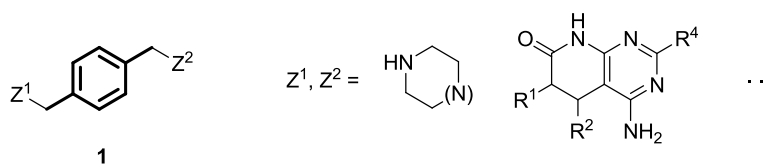
#### 0.4.2. Una recerca amb bons resultats

En la cerca de nous inhibidors dels coreceptors d'entrada, el projecte de la sida al GEM començà prenent com a cap de sèrie de referència l'AMD3100, un derivat del ciclam, descrit per primer cop a principis dels anys noranta del segle XX<sup>134</sup>. Tot i presentar molt bons valors d'activitat, el desenvolupament clínic d'aquest antagonista del CXCR4 es va interrompre a causa de la baixa biodisponibilitat oral i cardiotoxicitat, associades a l'elevada basicitat dels dos macrocicles ciclàmics de l'estructura, que es troben protonats a pH fisiològic<sup>135,136</sup>. L'AMD3100, que presenta els dos anells polinitrogenats separats per un espaiador *p*-xililènic, és el biciclám amb major activitat anti-VIH: la seva concentració per al 50% d'inhibició efectiva (*effective concentration 50*, EC<sub>50</sub>) oscil·la entre 1 – 10 ng/ml. Posteriorment s'han estudiat altres sistemes simètrics i asimètrics de la mateixa família amb activitat antiviral, com l'AMD3329, l'AMD3465 o el monociclám AMD3451 (Figura 0.17)<sup>71,108,137-139,139-144</sup>.



**Figura 0.17** Diversos compostos de la família dels ciclams amb activitat anti-VIH

Tenint en compte que la majoria d'aquests sistemes presenten la mateixa estructura genèrica **1**, amb dos sistemes polinitrogenats separats per un espaiador *p*-xililènic (Figura 0.18), i amb l'objectiu de reduir la basicitat dels heterocicles, al GEM es plantejà la possibilitat de substituir aquests últims per heterocicles més petits (morfolines, piperidines o piperazines, per exemple), amines comercials o, fins i tot, els bicicles de pirido[2,3-*d*]pirimidines, en la síntesi dels quals es té molta experiència (veure apartat 0.4.3).



**Figura 0.18** Estructura genèrica **1** de la família de ciclams i possibles substituents dels anells ciclàmics

El disseny d'una quimioteca combinatòria de compostos polinitrogenats no ciclàmics, però mantenint les característiques estructurals de l'AMD3100 (un mínim de dos àtoms de nitrogen a cada costat de l'espaiador *p*-xililènic i similitud en la distància entre àtoms de nitrogen), demostrà que els vuit àtoms de nitrogen presents en el biciclám no són necessaris per a la inhibició del coreceptor CXCR4<sup>145,146</sup>. L'anàlisi retrosintètica de la quimioteca (Figura 0.19) plantejà plausible la síntesi de diamines **2** a partir de les diïmines **3**, que es podrien desconectar en tereftaldehid (**4**) i dos equivalents d'amina **5** (Figura 0.20). Cas de voler-se obtenir les diamines **2** asimètriques, es podria partir del monoacetal dietílic **6**.

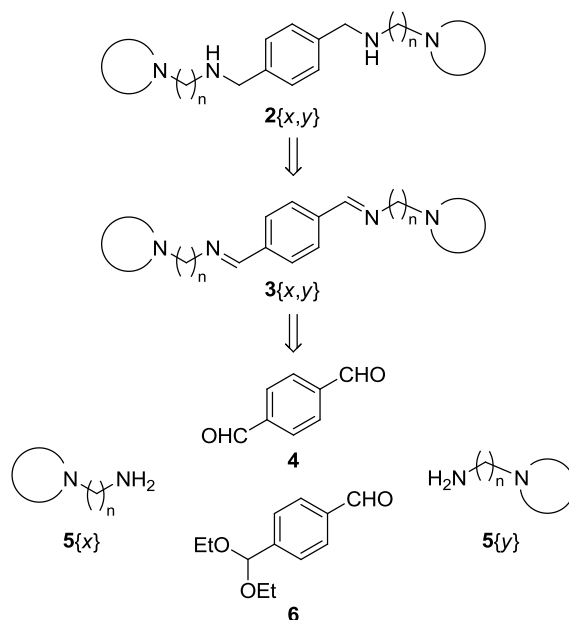


Figura 0.19 Anàlisi retrosintètica de les diamines **2**

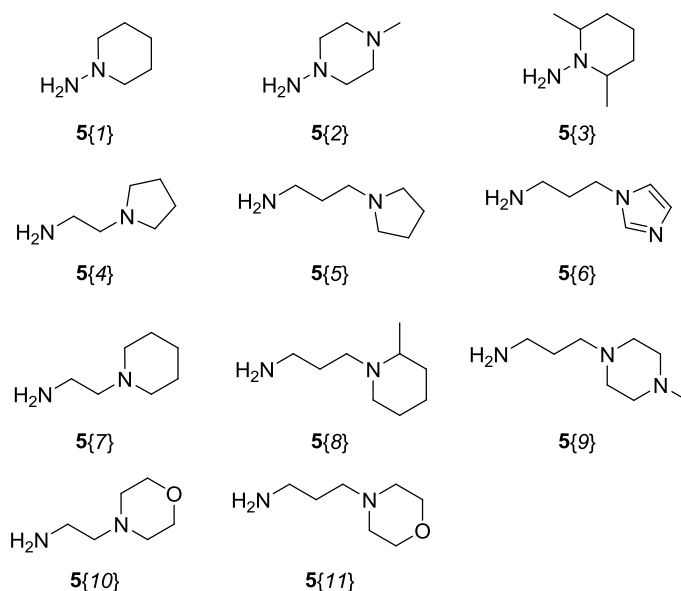
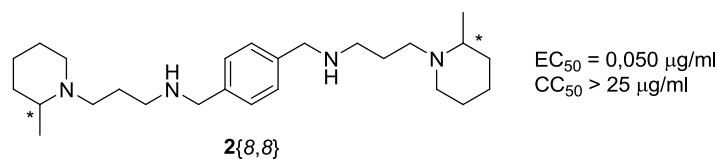


Figura 0.20 Compostos emprats com a amines **5** en la primera quimioteca d'anàlegs de l'AMD3100 del GEM

El cribratge de diamines **2** basat en una primera selecció en diversitat de la quimioteca permeté trobar compostos prometedors, amb activitats antivirals de 0,9 – 18 µg/ml. A partir d'aquests, la síntesi

dels compostos de noves seleccions, ara focalitzades, dugué a la diamina **2{8,8}** ( $EC_{50} = 0,008 \mu\text{g/ml}$ ), amb activitat anti-VIH del mateix ordre que l'AMD3100 i sense citotoxicitat a la màxima concentració assajada de  $25 \mu\text{g/ml}$ . En posteriors avaluacions de l'activitat del compost **2{8,8}** s'han determinat valors al voltant de  $0,050 \mu\text{g/ml}$ , que es prendrà com a referència en aquest treball

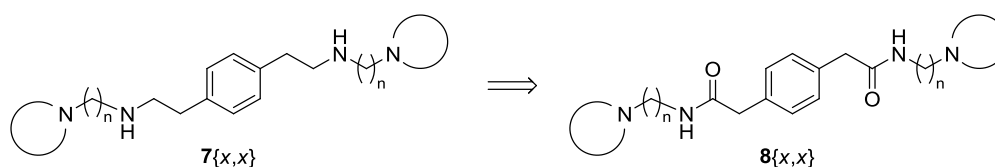


**Figura 0.21** Diamina més activa identificada amb l'aproximació del GEM

Liotta i col·laboradors publicaren l'any 2007 la síntesi d'una família de compostos anàlegs a l'AMD3100 amb una estratègia similar a la proposada al GEM però més general, doncs els sistemes polinitrogenats emprats en aquest estudi no es restringeixen a amines comercials **5**. El compost més actiu de la seva quimioteca, on dues unitats de 2-aminopiridina es troben separades per l'espaiador *p*-xililènic, causa major inhibició del coreceptor CXCR4 que l'AMD3100 però és poc actiu en assajos en cultius cel·lulars per a la determinació de la propagació del VIH<sup>135</sup>.

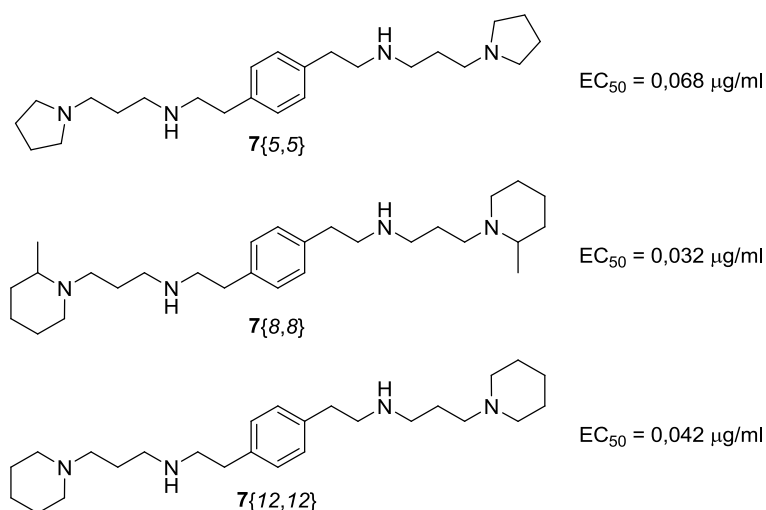
Tota la família de diamines **2** amb potencial activitat antiviral fou patentada l'any 2006<sup>147</sup>. Després de l'ampliació a PCT, la patent va ser llicenciada a Janus Development S.L., per tal de seguir el possible desenvolupament preclínic del cap de sèrie (compost **2{8,8}**). Cal remarcar que aquest compost presenta dos centres quirals i que, per tant, qualsevol intent de desenvolupar-lo com a fàrmac requerirà l'obtenció dels tres estereoisòmers (els dos enantiòmers **2{8S,8S}** i **2{8R,8R}** així com la forma meso **2{8S,8R}**) i l'avaluació corresponent de la seva activitat antiviral per separat. Aquest serà un dels objectius del present treball.

Seguint amb aquest plantejament, recentment s'ha obtingut al GEM una família d'anàlegs simètricament disubstituïts (**7{x,x}**), amb dues baules metilèniques entre l'espaiador aromàtic i l'àtom de nitrogen<sup>130</sup> (Figura 0.22).



**Figura 0.22** Segona família anàlegs de l'AMD3100 obtinguda al GEM

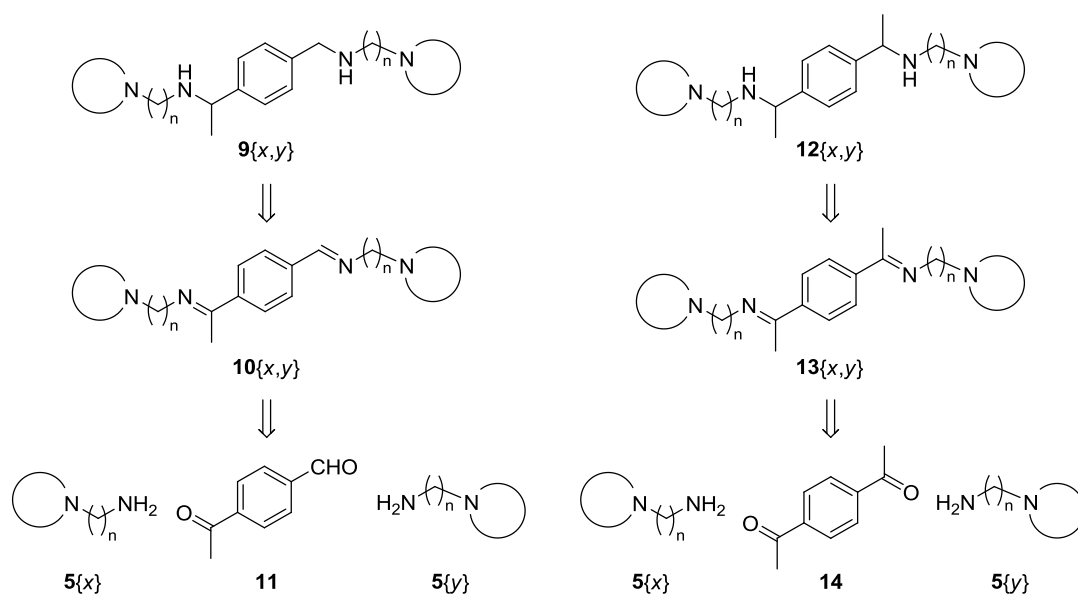
Al conjunt d'amines comercials de partida **5{4}** - **5{11}** s'afegí la **5{12}**. Les diamides **8{x,x}** precursors han resultat no ser actives o presentar valors d' $EC_{50}$  no inferiors als  $2,0 \mu\text{g/ml}$ , mentre que els compostos objectiu d'estructura **7{x,x}** són, en línies generals, força més actius<sup>130</sup>. Destaquen especialment les diamines **7{5,5}**, **7{8,8}** i **7{12,12}**, amb activitats anti-VIH només un ordre de magnitud inferiors a les del cap de sèrie AMD3100 (Figura 0.23).



**Figura 0.23** Diamines **7** amb major activitat antiviral obtingudes recentment al GEM

Tenint present que l'efecte de la distància entre els dos nitrògens més propers a l'anell benzènic sembla mínim, resulta interessant avaluar la repercussió de la separació entre els dos àtoms de nitrogen que hi ha a un mateix costat de l'anell aromàtic. Així doncs, es planteja com a objectiu d'aquest treball la síntesi i avaluació antiviral de diamines **2** amb quatre baules metilèniques entre els dos nitrògens provinents de les amines **5**.

D'altra banda, es vol estudiar l'efecte estèric d'un substituent metílic sobre les posicions benzíliques de les diamines **2**. Aprofitant l'aminació reductora de l'estratègia sintètica citada anteriorment (Figura 0.19), es fixa com a objectiu d'aquesta tesi doctoral la síntesi i avaluació antiviral de noves diamines amb estructura general **2**{x,y}, **9**{x,y} i **12**{x,y}, a partir dels precursors tereftaldehid (**4**), *p*-acetilbenzaldehyd (**11**) i *p*-acetilacetofenona (**14**), i on les amines **5**{x} de partida tinguin tant tres ( $n = 3$ ) com quatre ( $n = 4$ ) baules metilèniques entre els dos àtoms de nitrogen (Figura 0.24).



**Figura 0.24** Noves diamines objectiu, per a l'estudi de l'efecte estèric d'un substituent metílic en la posició benzílica

### 0.4.3. Una línia amb molta història

Fa més de tres dècades, Victory i col·laboradors van descriure l'obtenció de pirido[2,3-*d*]pirimidines en tan sols dues etapes sintètiques a través d'un carbonitril (**18**) format a partir d'un èster  $\alpha,\beta$ -insaturat (**15**) i malononitril (**16**) en NaOMe/MeOH. La presència del grup metoxi altament reactiu en els carbonitrils intermedis **18** els fa substrats excel·lents per a la substitució nucleòfila o condensació posterior, de manera que és fàcil obtenir a partir d'ells sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics **21** per reacció amb sistemes amidínics **20**<sup>148</sup> (Figura 0.25).

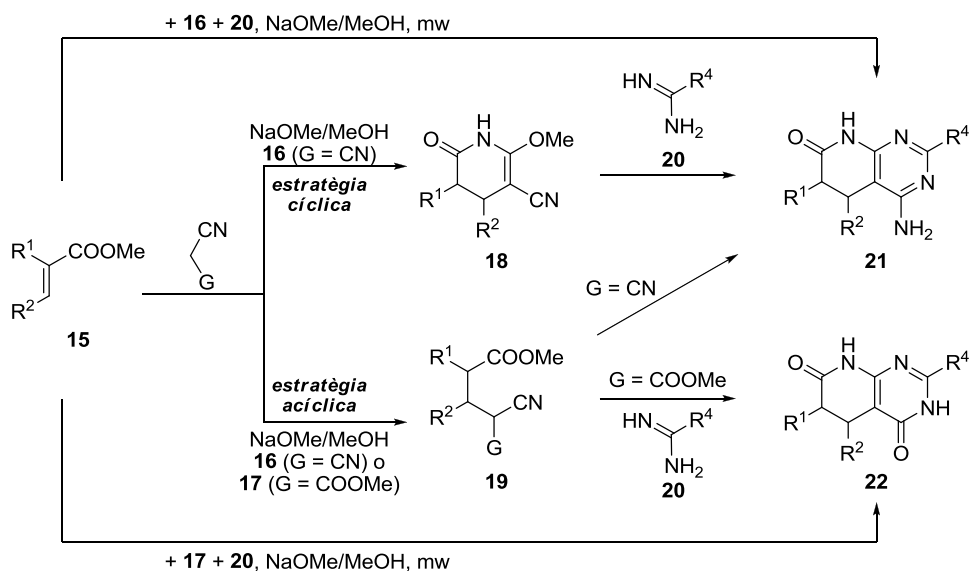


Figura 0.25 Estratègies sintètiques per a l'obtenció de sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics **21** i **22**

Els sistemes **21**, la síntesi dels quals es descrigué inicialment a través de la via cíclica, també poden obtenir-se mitjançant una estratègia acíclica que passa per la formació de l'adducte de Michael **19** per tractament del mateix èster  $\alpha,\beta$ -insaturat **15** amb malononitril (**16**) o cianoacetat de metil (**17**) i l'addició posterior del sistema amidínic **20**. Com a millora a la primera via, aquesta segona permet obtenir pirido[2,3-*d*]pirimidines tant 4-amino com 4-oxo substituïdes (**21** i **22**, respectivament).

La facilitat amb què poden obtenir-se sistemes bicíclics amb substituents varis encara es fa més palesa si s'empra la calefacció per microones (mw) en comptes de la calefacció per convecció (calefacció convencional)<sup>149-151</sup>. En honor a qui va iniciar el desenvolupament sintètic dels carbonitrils **18** a l'IQS, la reacció multicomponent que permet arribar a compostos **21** o **22** multifuncionalitzats, amb fins a tres centres de diversitat i amb rendiments moderats, s'ha anomenat reacció de Victory.

Amb l'objectiu d'augmentar la diversitat dels bicicles **21** i **22** obtinguts s'han descrit al GEM diferents metodologies. Pel que fa als substituents sobre l'anell pirimidínic es poden emprar sistemes **20** tant amidínics com guanidínics, que rendiran un substituent  $R^4$  carbonat o nitrogenat. La posició 4 del bicicle es pot obtenir fàcilment oxo o aminosubstituïda, a través de l'estratègia acíclica. Recentment s'ha publicat una via alternativa per obtenir les pirido[2,3-*d*]pirimidines 4-hidrosubstituïdes a través d'una estratègia acíclica amb 3,3-dimetoxipropanonitril i 2-arilacrilats substituïts<sup>152</sup>. D'altra banda, s'han descrit també les síntesis de compostos **21** i **22** amb substituents varis sobre les posicions 5 i 6 de l'anell piridònic, tant alifàtics com aromàtics. Amb tot, al GEM es té molta experiència en la síntesi d'estructures pirido[2,3-*d*]pirimidíniques amb diversos substituents i grups funcionals que permeten una gran varietat de dissenys.

Aquestes estructures resulten interessants per les activitats biològiques que se'ls ha associat: activitat antitumoral per a la inhibició de les dihidrofolat reductases o de tirosina cinases, així com activitat antiviral d'alguns anàlegs. La baixa solubilitat dels compostos pirido[2,3-*d*]pirimidínics en dissolvents comuns dificulta la purificació dels productes obtinguts per precipitació en el medi de reacció. La derivatització del nitrogen lactàmic n'augmenta la solubilitat, fet que corrobora que la insolubilitat és deguda a la formació de ponts d'hidrogen intermoleculars.

Recuperant l'estratègia de dissenyar sistemes polinitrogenats amb estructura genèrica **1** (Figura 0.18, pàg. 39) en aquest treball es planteja la possibilitat de sintetitzar potencials inhibidors d'entrada del VIH derivats dels bicicles **21**, menys bàsics que el ciclam. Ja que el *p*-dibromoxilè i el *p*-diaminoxilè són comercialment disponibles, es pretén sintetitzar els espaiadors bidentats *p*-xililènbisotiouroni (**23**) i *p*-xililèndiguanidini (**24**), que ja han estat descrits, per fer-los reaccionar com a sistemes **20** amb carbonitrils **18**, amb l'objectiu d'obtenir sistemes bis(pirido[2,3-*d*]pirimidínics) **25** i **26** (Figura 0.26).

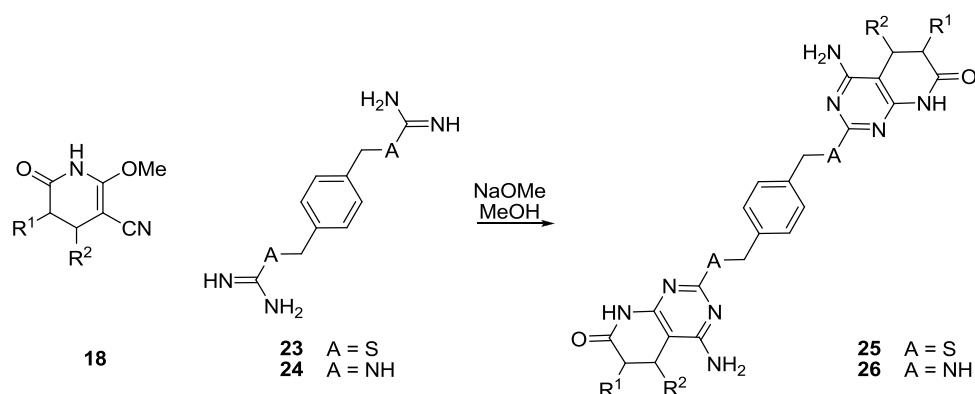


Figura 0.26 Espaiadors bidentats i sistemes bis(pirido[2,3-*d*]pirimidínics) objectiu

A més, compostos *p*-xililènics amb una sola unitat de ciclam com ara l'AMD3465 (Figura 0.17, pàg. 39) han demostrat ésser fins a deu vegades més actius com a antagonistes del CXCR4 que el mateix cap de sèrie<sup>143,144</sup>. D'altra banda, l'AMD3451, un derivat monociclàmic, es va mostrar antagonista dual en fases preclíniques. Tot plegat duu a pensar en la possibilitat d'obtenir espaiadors monodentats (**27** i **28**) i sistemes asimètricament substituïts amb un espaiador *p*-xililènic i unitats heterocícliques nitrogenades en la recerca de nous compostos amb potencial activitat antiviral (Figura 0.27).

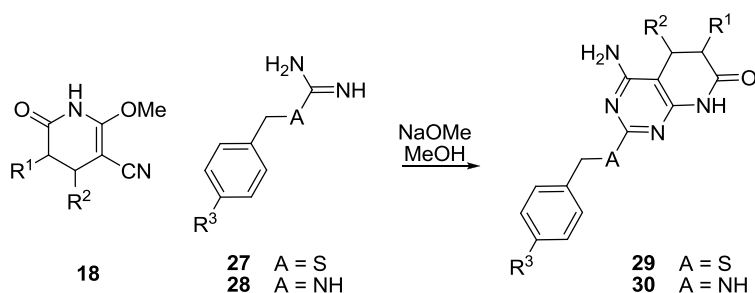


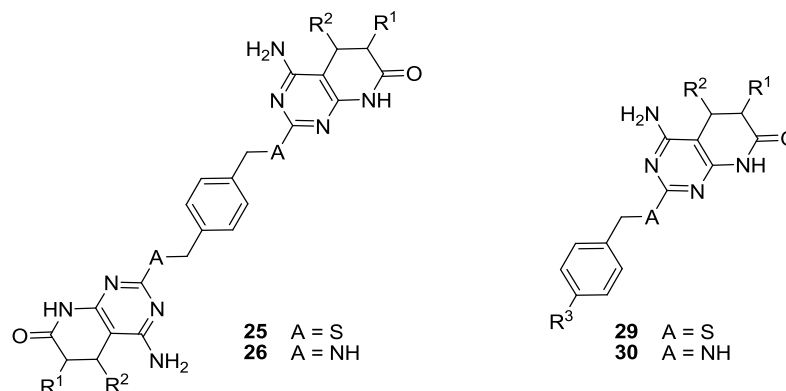
Figura 0.27 Sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics obtinguts amb espaiadors monodentats

Coneixedors de la facilitat del virus per desenvolupar resistència als fàrmacs actuals i havent explotat la família de compostos d'estructura general **1**, cal no oblidar la possibilitat d'aprofitar les eines del disseny molecular i els models dels coreceptors desenvolupats al GEM per a la proposta de noves estructures que puguin donar lloc a altres famílies de compostos potencialment actius contra la proliferació de l'agent etiològic de la sida.

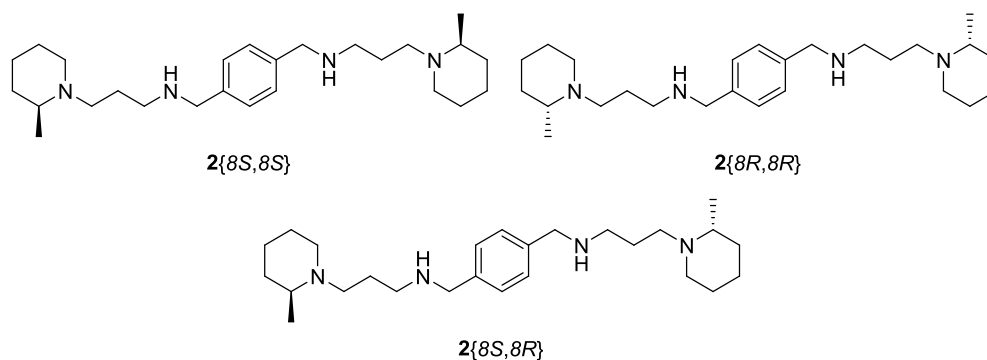
## 0.5. Objectius

Amb tota la informació presentada fins aquí, els objectius que es plantegen per a aquesta tesi doctoral són els següents:

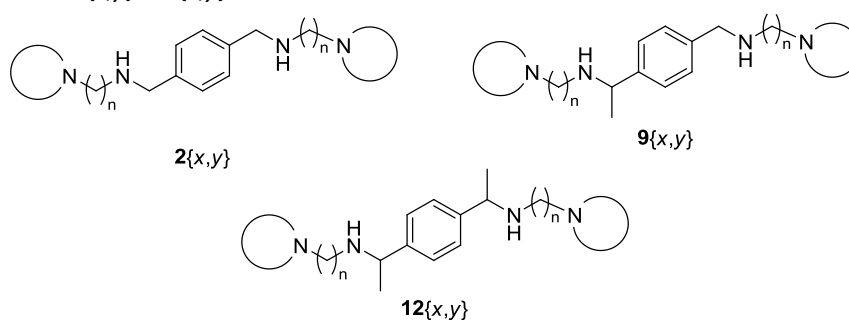
1. Síntesi de sistemes bis(pirido[2,3-*d*]pirimidínics) (**25** i **26**) i pirido[2,3-*d*]pirimidínics (**29** i **30**) per acoblament de 2-metoxi-6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropirido-3-carbonitrils **18** amb els espaiadors monodentats o bidentats corresponents com a potencials inhibidors d'entrada del VIH.



2. Síntesi dels tres estereoisòmers del compost **2{8,8}** i estudi dels valors de l'activitat antiviral en relació amb la seva estructura.



3. Disseny i síntesi d'anàlegs de l'AMD3100 **2{x,y}** que permetin avaluar l'efecte de la distància entre nitrògens a un mateix costat de l'espaiador *p*-xililènic sobre l'activitat antiviral. Igualment, estudi de l'efecte estèric d'un substituent metílic en la posició benzílica de l'espaiador sobre l'activitat inhibidora dels coreceptors d'entrada amb compostos d'estructura **9{x,y}** i **12{x,y}**.



4. Disseny, selecció i síntesi de noves estructures amb potencial activitat anti-VIH a partir de les eines del disseny *de novo*, basades en l'estructura del coreceptor d'entrada CXCR4 desenvolupada prèviament al GEM.



# **1. SÍNTESI DE DERIVATS PIRIDO[2,3-*D*]PIRIMIDÍNICS**

---



### 1.1. Disseny de síntesi

La cerca d'inhibidors dels coreceptors d'entrada al GEM pren com a cap de sèrie de referència l'AMD3100, el qual consta de dos anells polinitrogenats units per un espaiador *p*-xililènic i presenta activitat antiviral nanomolar ( $EC_{50} = 1 - 10$  ng/ml). Altres sistemes simètrics i asimètrics de la mateixa família amb bones activitats tenen l'estructura genèrica **1**, on sistemes polinitrogenats  $Z^1$  i  $Z^2$  variis es troben separats per un *p*-xilil. Un dels principals inconvenients de l'AMD3100 és la seva toxicitat, associada en part a l'elevada basicitat dels macrocicles ciclàmics, per la qual cosa s'ha plantejat com a primer objectiu d'aquest treball l'obtenció de sistemes d'estructura genèrica **1**, on els heterocicles polinitrogenats siguin estructures menys bàsiques com les pirido[2,3-*d*]pirimidines **21**, en la síntesi de les quals es té molta experiència al grup.

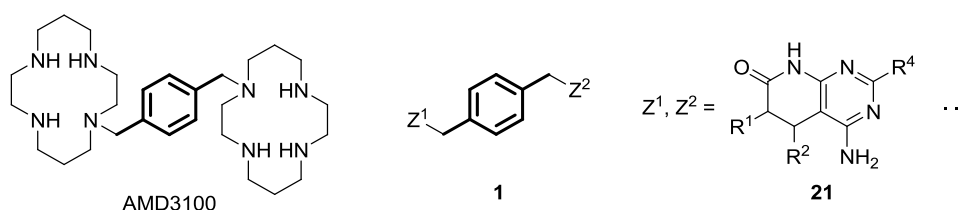
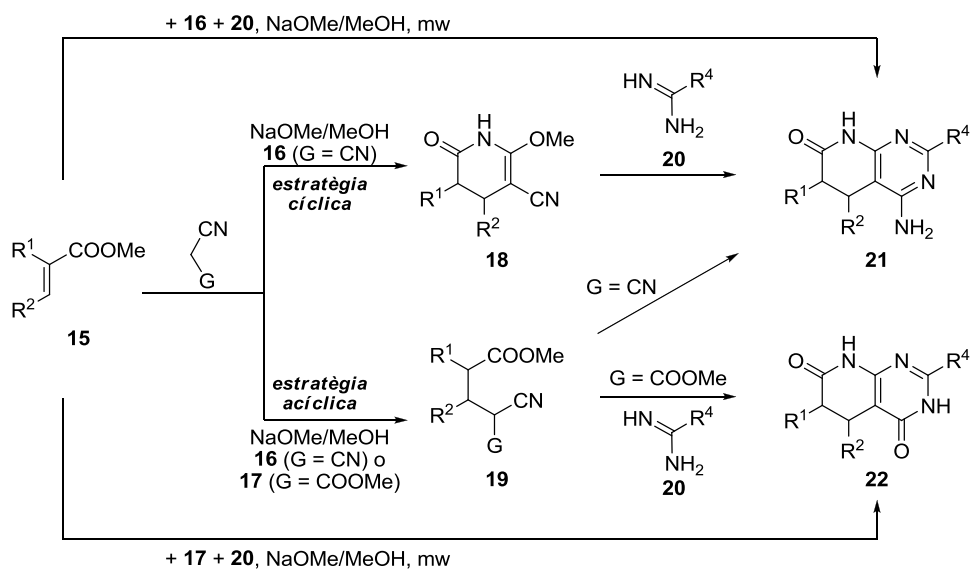


Figura 1.1 Justificació dels sistemes bis(piridopirimidínic) objectiu

La síntesi d'aquests sistemes s'ha descrit al GEM a través de vies simples (cíclica, acíclica i reacció *one pot*) (Figura 1.2)<sup>148-150,153-155</sup>. Les pirido[2,3-*d*]pirimidines 4-aminosubstituïdes **21** poden obtenir-se per la via cíclica a través d'un carbonitril **18** que prové de la ciclació d'un èster  $\alpha,\beta$ -insaturat (**15**) amb malononitril (**16**) en NaOMe/MeOH (obtingut per dissolució d'una quantitat coneguda de Na en MeOH). El posterior tractament de **18** amb un sistema **20**, típicament amidínic o guanidínic, rendeix els compostos bicíclics **21** desitjats. Els mateixos poden obtenir-se per la via acíclica, on **15** i **16** condensen en un adducte de Michael **19** que posteriorment reacciona amb el mateix sistema **20** anterior. Aquesta segona via és l'única que permet arribar fàcilment als sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínic 4-oxosubstituïts **22**, per la condensació tipus Michael de l'èster  $\alpha,\beta$ -insaturat **15** amb el cianoacetat de metil (**17**) en NaOMe/MeOH i posterior reacció amb un compost d'estructura **20** (Figura 1.2). La principal millora descrita en l'obtenció d'aquests bicicles és la reacció *one pot*, anomenada reacció de Victory en honor a qui va iniciar el desenvolupament sintètic dels carbonitrils **18** a l'IQS. La calefacció d'una mescla de l'èster  $\alpha,\beta$ -insaturat **15**, malononitril (**16**) o cianoacetat de metil (**17**) i el sistema **20** adient permet arribar fàcilment als bicicles piridopirimidínic amb una gran varietat de substituents. La calefacció per

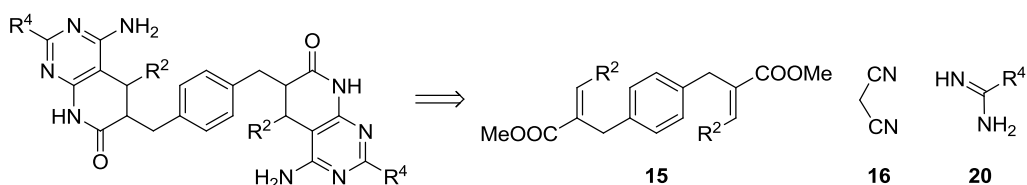
microones ha demostrat, a més de reduir el temps de reacció de 24 hores a uns minuts, augmentar els rendiments globals de reacció en la majoria de casos.



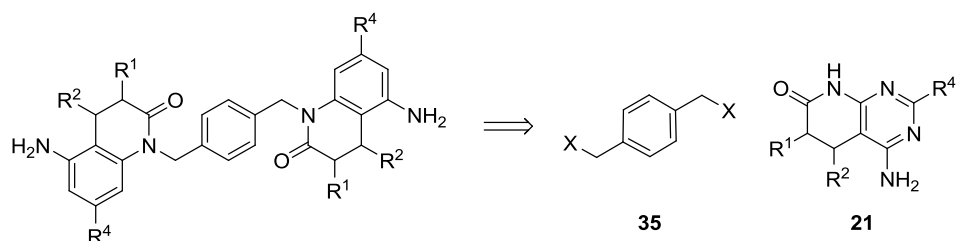
**Figura 1.2** Estratègies sintètiques per a l'obtenció de sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics

Així doncs, amb la idea d'obtenir compostos amb estructura general **1** que puguin actuar com a inhibidors dels coreceptors d'entrada del VIH, el repte sintètic que es planteja com a primer objectiu d'aquesta tesi doctoral és la síntesi de sistemes que continguin dues piridopirimidines separades per un espaiador *p*-xililènic. Es contempen bàsicament tres possibilitats:

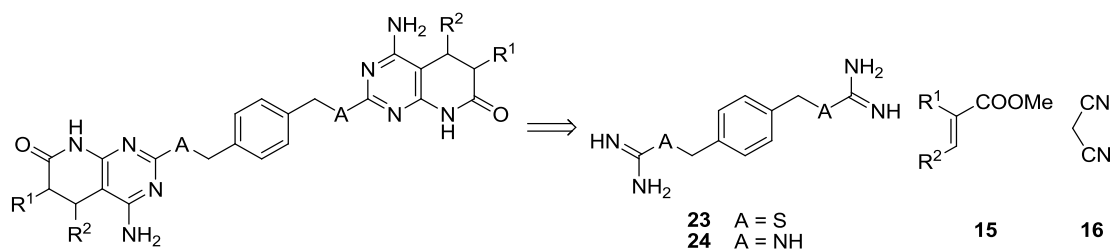
1. Unió de les piridopirimidines **21** a través de les posicions 5 o 6 (substituents  $R^2$  o  $R^1$ , respectivament). Això requeriria de la síntesi d'un espaiador **15** que contingués dos èsters  $\alpha,\beta$ -insaturats units a un grup *p*-xililènic.



2. Unió dels sistemes **21** pel nitrogen lactàmic. L'anàlisi retrosintètica duu a l'alquilació dels sistemes **21** amb un *p*-xilil dihalogenat.



3. Finalment, unió dels bicicles **21** a través de la posició 2 (substituent  $R^4$ ). Això suposaria la síntesi de l'espaiador *p*-xililènic derivatitzat amb unitats amidíniques, guanidíniques o similars, per fer-lo reaccionar amb malononitril (**16**) i els èsters **15** corresponents.



De les tres opcions, la primera implica el disseny d'una nova estratègia sintètica per a l'obtenció del dièster **15**, mentre que la segona opció es basa en l'alquilació dels nitrògens lactàmics dels sistemes piridopirimidínics **21**, derivatització que no s'havia estudiat encara en profunditat a l'inici d'aquesta tesi doctoral. Pel que fa a la tercera possibilitat, els espaiadors **23** i **24** han estat descrits a partir de *p*-xilè dibromosubstituint i de *p*-xililendiamina respectivament, els quals són comercialment disponibles. Això, afegit al fet que en el grup ja es tingui experiència en fer reaccionar sistemes amidínics o guanidínics **20** amb carbonitrils **18** o amb **15** i **16** per reacció *one pot* (Figura 1.2), suggereix la darrera alternativa com la més fàcilment abordable.

Compostos *p*-xililènics amb una sola unitat de ciclam han demostrat presentar tanta activitat com el cap de sèrie (o fins i tot més), per la qual cosa s'ha plantejat com a objectiu d'aquest primer capítol l'obtenció de bisadductes **25** i **26**, així com monoadductes **29** i **30**.

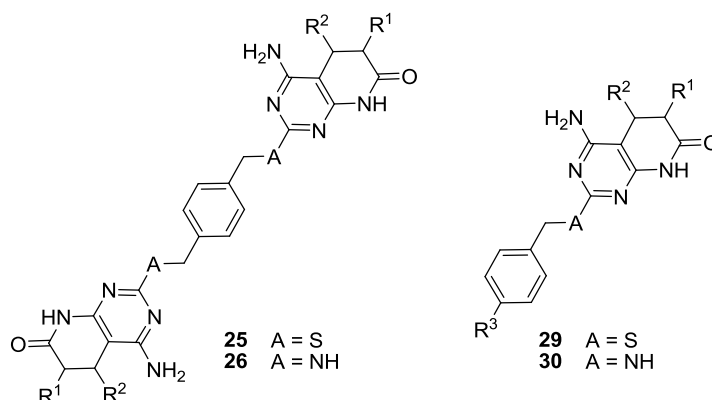
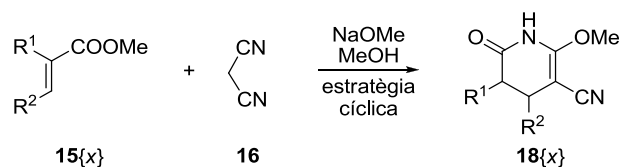


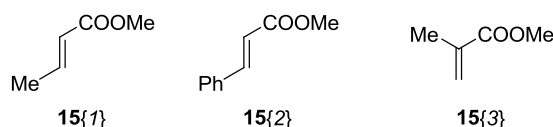
Figura 1.3 Derivats pirido[2,3-*d*]pirimidínics objectiu d'aquest primer capítol

## 1.2. Síntesi dels 2-metoxi-6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropirido-3-carbonitrils 18

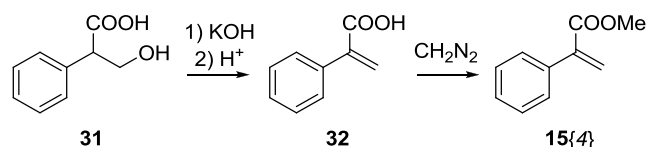
Tot i que el grup metoxil de **18** pot hidrolitzar fàcilment, la seva facilitat d'obtenció s'ha considerat motiu suficient per assajar inicialment l'obtenció dels compostos 4-aminopirido[2,3-*d*]pirimidínics desitjats a través de l'estratègia cíclica. Així doncs, els 2-metoxycarbonitrils **18** de partida s'obtindran en primer lloc per reacció de Michael i ciclació entre un èster metílic  $\alpha,\beta$ -insaturat **15** i malononitril (**16**), en medi metòxid sòdic/metanol.


 Figura 1.4 Síntesi dels carbonitrils **18** de partida

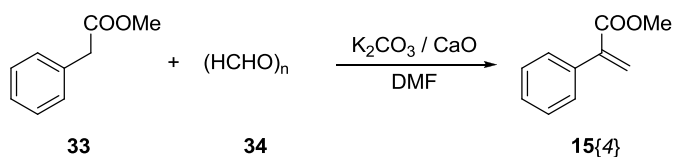
Per tal d'introduir certa diversitat en els productes finals, es pretén sintetitzar els carbonitrils **18**{1}-**18**{4} a partir dels èsters **15**{1}-**15**{4} corresponents, amb  $\text{R}^1$  i  $\text{R}^2 = \text{H}, \text{Me}, \text{Ph}$ . D'aquests, el crotonat de metil (**15**{1}), el cinamat de metil (**15**{2}) i el metacrilat de metil (**15**{3}) són comercialment disponibles. L'atropat de metil (**15**{4}), en canvi, s'ha d'obtenir experimentalment.


 Figura 1.5 Èsters metàlics  $\alpha,\beta$ -insaturats **15** comercialment disponibles

L'obtenció de **15**{4} partia anteriorment en el grup de l'àcid tròpic (**31**), el qual es deshidratava i s'esterificava posteriorment amb diazometà<sup>156</sup> (Figura 1.6).


 Figura 1.6 Síntesi de l'atropat de metil (**15**{4}) a partir de l'àcid tròpic (**31**)

Donat que aquesta via sintètica de dos passos només permetia l'obtenció de l'atropat de metil, es buscà una segona estratègia sintètica amb què diferents èsters metàlics poguessin sintetitzar-se a partir dels fenilacetats corresponents. Així, l'atropat de metil (**15**{4}) s'obté a partir del fenilacetat de metil (**33**) per tractament amb paraformaldehid (**34**) en dimetilformamida, en presència de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  i  $\text{CaO}$ , a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  durant dos dies<sup>155,157</sup> (Figura 1.7).


 Figura 1.7 Síntesi alternativa de l'atropat de metil (**15**{4})

L'èster metàlic **15**{4} s'obté finalment com un oli groc, amb un rendiment del 55% (de l'ordre del descrit, 61%) i amb dades espectroscòpiques que es corresponen amb les descrites<sup>155</sup>.

Una vegada es disposa dels quatre èsters  $\alpha,\beta$ -insaturats, es procedeix a la síntesi dels 2-metoxi-6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropirido-3-carbonitrils **18**, segons la reacció descrita a la Figura 1.4. Aquests s'obtenen amb rendiments moderats però de l'ordre dels descrits<sup>148,154,158-160</sup> (Taula 1.1), i amb un grau de puresa moderat, tot i que poden emprar-se talment en les següents etapes sintètiques. Cal remarcar que s'han omès les extraccions posteriors amb diclorometà descrites a les metodiques

originals<sup>156,161-163</sup>, car s'ha comprovat que no es millorava substancialment la puresa dels productes sintetitzats. De la mateixa manera, els carbonitrils no poden purificar-se per cromatografia de columna, doncs una lleugera humitat a la sílice pot provocar la hidròlisi àcida de l'èter metílic de la posició 2.

Taula 1.1 Rendiments de l'obtenció dels carbonitrils **18** a partir dels èsters  $\alpha,\beta$ -insaturats **15**

carbonitril	<b>18{1}</b>	<b>18{2}</b>	<b>18{3}</b>	<b>18{4}</b>
estructura				
rendiment experimental	53%	78%	42%	40%
rendiment descrit	60% <sup>161</sup>	61% <sup>156</sup>	49% <sup>158</sup>	50% <sup>155</sup>

### 1.3. Síntesi dels espaiadors

Un cop es disposa dels carbonitrils **18**, tenint en compte que l'obtenció de sistemes pirido[2,3-d]pirimidínics requereix de la reacció amb sistemes **20** (Figura 1.2, pàg. 50), cal obtenir derivats d'aquests últims que continguin l'espaiador *p*-xililènic, tant bidentats com monodentats, en forma de sal o d'amina lliure. Ja que es volen obtenir també derivats sulfurats, els sistemes **20** que s'empraran són els que es representen a la Figura 1.8.

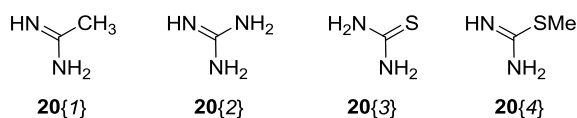


Figura 1.8 Sistemes **20** emprats en aquest treball

#### 1.3.1. Síntesi dels espaiadors sulfurats

En primer lloc es realitza una cerca bibliogràfica amb l'*SciFinder® Scholar 2004*<sup>164</sup>, que permet trobar descrita la síntesi del dibromur de *p*-xililenbisotiouroni (**23·2HBr**), per reacció de l' $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*p*-xilè (**35a**) amb tiourea (**20{3}**), en diferents dissolvents i amb rendiments de l'ordre del 90%<sup>165,166</sup>. Així mateix, es troba descrita l'obtenció del diclorur de *p*-xililenbisotiouroni (**23·2HCl**) a partir del *p*-xilè diclorosubstituint **35b** (Figura 1.9)<sup>167</sup>.

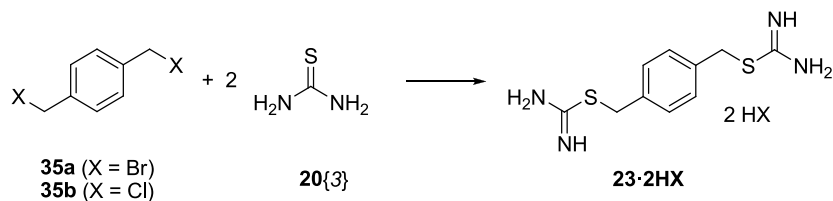


Figura 1.9 Síntesi descrita de l'espaiador *p*-xililenbisotiourenic **23**

Tenint en compte que **35b** no es troba comercialment disponible, es prova d'obtenir el dibromur de *p*-xililenbisotiouroni (**23·2HBr**) partint de **35a** i **20{3}**, en proporcions estequiomètriques en

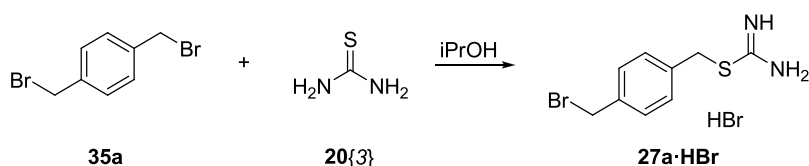
isopropanol, tal com descriuen D.M. Tal i S.J.D. Karlsh <sup>165</sup>. L'espaiador bidentat **23·2HBr**, un sòlid blanc insoluble en el medi de reacció, s'obté amb un rendiment del 96% (descriu <sup>165</sup>, 94%) i de puresa analítica.

Per tal d'obtenir l'espaiador sulfurat bidentat en forma d'amina lliure, es basifica amb NaOH 1M una dissolució aquosa de la sal **23·2HBr**. Després d'extreure la forma bàsica amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, asseca la fase orgànica i eliminar-ne el dissolvent a pressió reduïda, s'obté un sòlid blanc que s'enfosqueix a l'aire en poques hores, per la qual cosa es considera més convenient conservar-lo en forma de sal.

Pel que fa a les dades espectroscòpiques, l'espectre d'IR (KBr) de **23·2HBr** mostra les bandes característiques dels grups amino a 3284, 3234 i 3172 cm<sup>-1</sup> i vora 1653-1623 cm<sup>-1</sup> les tensions C=C aromàtiques i la tensió C=N. La tensió C-S no es pot emprar per a la caracterització de l'estructura, doncs es registra com una banda generalment feble a 600 – 700 cm<sup>-1</sup>. En l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O) es distingeixen el senyal dels protons aromàtics a 7,51 ppm i el del grup metilè a 4,44 ppm. L'espectre de <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) de la forma lliure de **23·2HBr**, obtinguda segons el procediment descrit anteriorment, ha permès observar els protons tiourènics a 6,28 ppm. L'espectre de <sup>13</sup>C-RMN desacoblant (75,5 MHz, D<sub>2</sub>O) mostra, entre d'altres, el carboni quaternari del grup tiourènica a 170,7 ppm.

Essent la síntesi de l'espaiador bidentat **23** tan senzilla i tenint en compte, tal com ja s'ha exposat anteriorment, que sistemes amb un sol grup polinitrogenat han demostrat ésser també actius <sup>112,113</sup>, es proposa la possibilitat d'obtenir un espaiador sulfurat monosubstituit. Així es podran sintetitzar posteriorment sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics amb un sol substituent benzilisotiouroni o fins i tot sistemes bis(pirido[2,3-*d*]pirimidínics) asimètricament substituïts.

Ja que en aquest cas no es troba cap síntesi descrita, es prova de realitzar la mateixa reacció que per a l'espaiador anterior, però emprant només un equivalent de tiourea (Figura 1.10).



**Figura 1.10** Possible síntesi de l'espaiador monodentat sulfurat **27a**

La reacció a reflux de l' $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*p*-xilè (**35a**) amb un equivalent de tiourea (**20{3}**) en isopropanol rendeix el compost disubstituit **23·2HBr**, tot i afegir la tiourea dissolta, gota a gota, en el medi de reacció. L'opció de dur a terme la reacció, a més, en un dissolvent més apolar, podria afavorir la formació de la sal monosubstituida; tanmateix també en 1-butanol s'obté bàsicament el producte disubstituit **23·2HBr**. Tan sols afegint tiourea gota a gota, sobre un excés de **35a** (1:3) en butanol, s'obté una mescla que conté l'espaiador monosubstituit **27a·HBr** i el dibromoxilè de partida **35a**, amb una proporció de 4:1, amb l'inconvenient afegit que el dissolvent, poc volàtil, resulta difícil d'eliminar. Tot i que es podria seguir amb ella, la mescla es desestima en favor de trobar una metòdica que permeti l'obtenció única d'un espaiador monosubstituit. Així doncs, resta trobar un reactiu asimètricament substituït, de manera que la reacció de substitució de l'halogen només es doni amb un equivalent de tiourea.

El reactiu comercialment assequible que es troba és l' $\alpha$ -cloro- $\alpha'$ -hidroxi-*p*-xilè (**36**), amb la qual cosa s'obtingria el clorur de 2-(*p*-hidroximetilbenzil)isotiuronium (**27b·HCl**) per reacció amb tiourea (**20{3}**). La reacció amb quantitats estequiòmriques rendeix un sòlid blanc cristal·lí, soluble en el dissolvent a temperatura ambient, però que cristal·litza fàcilment en refredar a 4 °C, amb un rendiment del 85% i de puresa analítica (Figura 1.11).



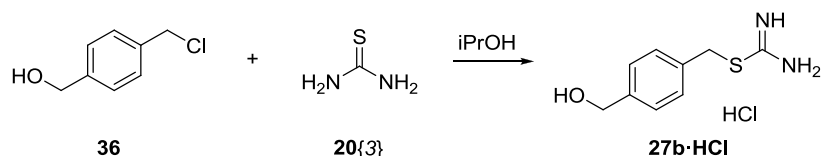


Figura 1.11 Obtenció del clorur de 2-(*p*-hidroximetilbenzil)isotiouroni (**27b·HCl**)

L'espectre d'IR (KBr) de l'espaiador **27b·HCl** mostra bandes molt amples al voltant de 3360-3270  $\text{cm}^{-1}$ , característiques de les tensions dels grups NH i OH, així com la tensió C-O del grup hidroxil a 1008  $\text{cm}^{-1}$ . Pel que fa a l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ), s'observen els multiplets de la substitució asimètrica de l'anell benzènic a 7,46 i 7,42 ppm, així com els dos metilens a 4,63 i 4,41 ppm. En l'espectre de  $^{13}\text{C}$ -RMN desacoblat (75,5 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) es distingeix a 170,9 ppm el carboni quaternari del grup tiourènic, així com el metilè de l'alcohol benzílic a 64,0 ppm i el del grup tiourènic a 35,5 ppm. Finalment, l'espectre de masses de baixa resolució (70 eV) mostra, entre d'altres, la pèrdua de tiourea a partir del catió molecular orgànic (a  $m/z = 121$ ) i posteriorment la pèrdua del grup  $-\text{CH}_2\text{OH}$  (a  $m/z = 91$ ).

### 1.3.2. Síntesi dels espaiadors nitrogenats

Una cerca bibliogràfica a la base de dades de l'*SciFinder® Scholar 2004* permet trobar nombroses referències on es descriu la síntesi de compostos guanidínics aromàtics a partir d'una amina aromàtica i tiourees substituïdes<sup>165,168-170</sup>, derivats halogenats i compostos guanidínics<sup>171</sup>, àdhuc a partir d'amines aromàtiques i cianamida<sup>168</sup>.

Així mateix, el grup de Hamilton descrigué l'any 2001 la síntesi de diiodur de *N,N'*-bis(3,4-dihidro-1*H*-imidazole-2-il)-*p*-xililendiamina (**39·2HI**) a partir de *p*-xililendiamina (**37**) i iodur de 2-metilmercapto-4,5-dihidroimidazole (**38**) en metanol, amb un rendiment superior al 50%<sup>169</sup> (Figura 1.12).

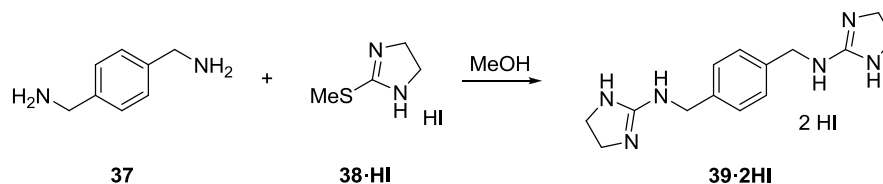


Figura 1.12 Síntesi descrita per al compost **39**

És per aquest motiu que el primer intent d'obtenir l'espaiador nitrogenat bidentat *p*-xililènbisguanidínic **24** es duu a terme escalfant a reflux durant més de cinc hores la *p*-xililendiamina (**37**) i el sulfat d'*S*-metiltiourea (**20{4}·1/2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**) emprant metanol com a dissolvent (Figura 1.13). Tanmateix, s'obté així un sòlid blanc que no resulta ser el producte desitjat, doncs l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN mostra una disubstitució diferencial de la diamina **37**. Així mateix, si la reacció es duu a terme en medi bàsic metàxid sòdic/metanol per tal d'activar les amines, la substitució torna a ser asimètrica.

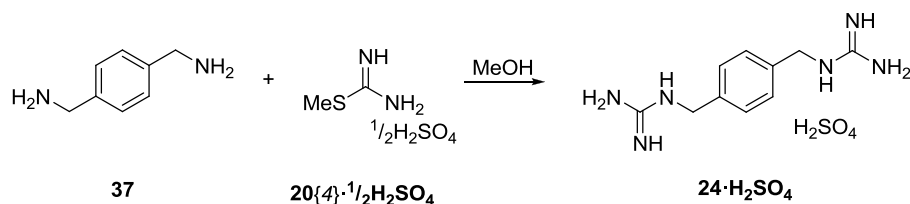
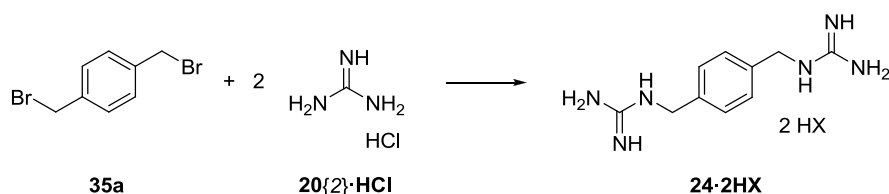


Figura 1.13 Síntesi de l'espaiador nitrogenat bidentat **24**

Cercant altres condicions de reacció per sistemes anàlegs, hom troba que alguns derivats de bis(aminobenzimidazole) han estat patentats com a inhibidors de canals de cations potassi en formulacions farmacèutiques<sup>168</sup>. Els compostos guanidínics necessaris en la síntesi de derivats de bis(aminobenzimidazole) es poden obtenir a partir d'amines aromàtiques i tiourees substituïdes, per calefacció a reflux d'una mescla 2:1 d'etanol:tetrahidrofuran. Així doncs, es prova de dur a terme la reacció de la Figura 1.13 segons les condicions de reacció de la patent citada. Quantitats estequiomètriques d'ambdós reactius duen bàsicament a l'obtenció del compost monosubstituït, mentre un excés de **20{4}** respecte **37** (2,5:1) afavoreix l'obtenció del compost disubstituït, malgrat que en tots els casos s'obté una mescla de sals difícils de separar.

Una nova opció fóra adaptar la metòdica d'obtenció de l'espaiador sulfurat bidentat **23**, fent reaccionar l' $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*p*-xilè (**35a**) amb el clorur de guanidini (**20{2}**), tot i que caldria veure si es formaria el clorur (contraanió de la guanidina) o el bromur (alliberat en la substitució nucleòfila de **35a**) de l'espaiador nitrogenat. Tanmateix, aquests no reaccionen en isopropanol com ho feia **35a** amb la tiourea (**20{3}**). El medi bàsic isopropòxid sòdic/isopropanol tampoc activa la guanidina perquè se substitueixi l'halogen de **35a**.



**Figura 1.14** Possible reacció de l' $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*p*-xilè (**35a**) amb el clorur de guanidini **20{2}·2HCl**

Finalment, la *p*-xililénbisguanidina **24** s'obté en forma de sulfat segons la reacció que es mostra a la Figura 1.13, seguint la patent de Licha i col·laboradors<sup>172</sup>, en què s'obtenen compostos guanidínics aromàtics a partir d'amines aromàtiques i tiourees substituïdes, emprant aigua com a dissolvent i a temperatura ambient. El producte desitjat s'aconsegueix amb rendiments superiors al 70% i de puresa analítica, amb l'inconvenient que cal eliminar el dissolvent a pressió reduïda, per arrossegar el metilmercaptà que s'allibera de la tiourea substituïda **20{4}**.

L'espectre d'IR (KBr) mostra bàsicament el grup guanidínic amb bandes relativament intenses a 3352 i 3279 cm<sup>-1</sup>, així com les tensions Csp<sup>2</sup>-H i Csp<sup>3</sup>-H entre 3029 i 2891 cm<sup>-1</sup>. Al voltant de 1600 cm<sup>-1</sup> s'observen les bandes corresponents als dobles enllaços C=C aromàtics i C=N guanidínics, sense poder-se assignar a tensions concretes. L'espectre de <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O) de **24·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** mostra només els protons aromàtics com un singlet a 7,37 ppm i el metilè com un altre singlet a 4,44 ppm, doncs la guanidina queda totalment deuterada. Tanmateix, l'espectroscòpia de <sup>13</sup>C-RMN (75,5 MHz, D<sub>2</sub>O) sí confirma la presència dels carbonis quaternaris guanidínics amb un senyal a 157,4 ppm. L'anàlisi elemental del sòlid blanc obtingut després d'una recristal·lització en aigua també concorda amb les dades esperades per a **24·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** (1:1).

Donat que l'espaiador sulfurat monodentat **27** no es va poder obtenir a partir del *p*-xilè dibromosubstituït **35a**, l'obtenció de l'espaiador nitrogenat monodentat **28** es planteja des d'un inici a partir d'un reactiu asimètricament substituït, com és la *p*-xililendiamina **40**, monoprotegida amb una unitat *tert*-butoxicarbonil (Boc). Així, s'espera obtenir el sulfat de 4-(guanidinometil)benzilcarbamat de *tert*-butil en les mateixes condicions de reacció que l'espaiador nitrogenat bidentat **24**. A més, la protecció de l'amina com a *tert*-butilcarbamat suporta una gran varietat de medis de reacció, de manera

que no es pateix per la desprotecció de l'amina durant l'acoblament amb la *S*-metiltiourea (**20{3}**) (Figura 1.15).

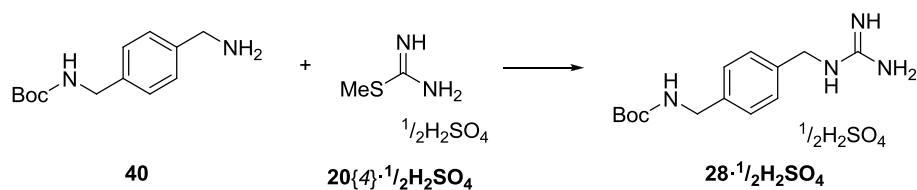


Figura 1.15 Obtenció de l'espaiador nitrogenat monodentat **28**

L'espaiador nitrogenat monodentat **28** s'obté, agitant a temperatura ambient durant 60 hores una mescla equimolar de **40** i **20{4}**· $\frac{1}{2}H_2SO_4$ , amb un rendiment del 40%, en forma de sòlid blanc.

L'espectre d'IR (KBr) mostra les tensions N-H a 3358 i 3335  $cm^{-1}$  i les tensions  $Csp^2-H$  i  $Csp^3-H$  entre 3051 i 2867  $cm^{-1}$ . Molt intensament destaca la banda de la tensió C=O a 1686  $cm^{-1}$ , amb la qual cosa les tensions dels grups guanídínics resulten difícils de distingir. L'espectre de  $^1H$ -RMN (300 MHz,  $D_2O$ ) permet distingir a 7,16 ppm els protons aromàtics, a 4,08 ppm el senyal del metilè benzílic amb l'amina Boc-protectada i a 1,38 ppm els metils del grup protector.

Donat que el reactiu de partida **40** és car i tenint en compte que el rendiment de la síntesi de l'espaiador nitrogenat monodentat **28** és tan sols del 40%, la síntesi de monoacoblaments amb l'espaiador **28** s'ha deixat per a posteriors treballs.

#### 1.4. Síntesi de sistemes pirido[2,3-d]pirimidínics de referència

En primer lloc, abans d'abordar la síntesi dels bisadductes objectiu, i per tal de conèixer l'evolució de la reacció d'acoblament, es reproduceix la síntesi, segons les metodiques descrites<sup>162,173</sup>, de les pirido[2,3-d]pirimidines **21{1,1}** i **21{1,2}**, representades a la Figura 1.16.

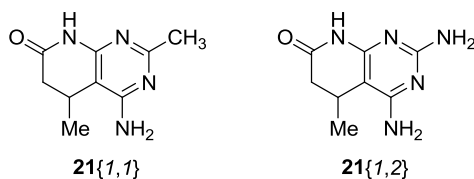


Figura 1.16 Sistemes piridopirimidínics **21**

La síntesi de sistemes pirido[2,3-d]pirimidínics **21** parteix d'una sal d'amidina (en el cas de **21{1,1}**) o de guanidina (per a l'obtenció de **21{1,2}**) i del carbonitril **18{1}** (Figura 1.17). Per al compost 2-metilsubstituint, el clorhidrat d'acetamidina (**20{1}·HCl**) s'escalfa a reflux en metòxid sòdic/metanol durant quinze minuts per tal d'alliberar-ne l'amidina, i posteriorment es filtra per eliminar el clorur sòdic format. Finalment, s'afegeix el carbonitril **18{1}** dissolt en metanol i la dissolució resultant es manté a reflux durant 24 hores. En aquest temps, la pirido[2,3-d]pirimidina **21{1,1}** precipita en el medi de reacció, de manera que les possibles impureses dels reactius o subproductes solubles s'eliminen per filtració al buit. El compost **21{1,1}** s'obté amb un rendiment del 15%, força menor que els descrits per altres vies sintètiques: la síntesi de **21{1,1}** està descrita per l'equip a partir de l'adducte de Michael (estratègia acíclica, Figura 1.2, pàg. 50) amb un rendiment del 72%<sup>173</sup> i per reacció *one pot*, partint del crotonat de metil (**15{1}**), malononitril (**16**) i clorhidrat d'acetamidina (**20{1}·HCl**), amb un rendiment del

98%<sup>149,150,155</sup>. Les dades espectroscòpiques del compost obtingut concorden amb les descrites<sup>149,150,155,173</sup>.

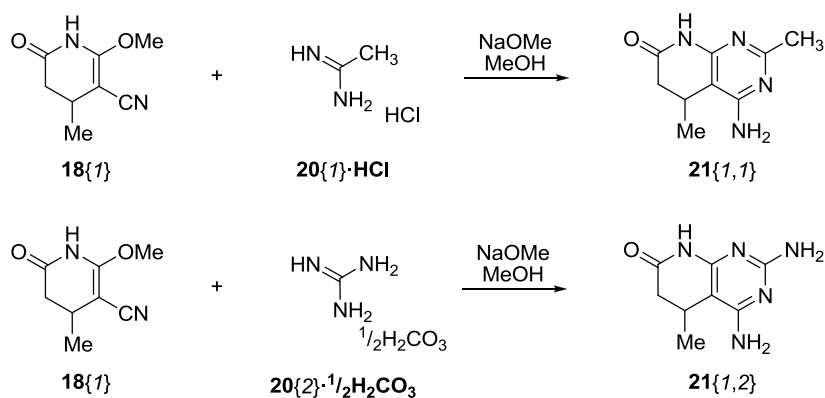


Figura 1.17 Síntesi dels sistemes **21** de referència

Pel que fa al compost d'estructura **21{1,2}**, la guanidina s'allibera a partir del seu carbonat (**20{2}·½H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**) i es fa reaccionar amb **18{1}** (Figura 1.17). El producte desitjat s'obté, igual que en el cas anterior, per filtració de la piridopirimidina insoluble formada en 24 hores de reflux en metòxid sòdic/metanol, amb un rendiment del 44% (descrit<sup>148</sup>, 87%). Un cop més, les dades espectroscòpiques de **21{1,2}** coincideixen amb les descrites anteriorment al grup<sup>173</sup>.

## 1.5. Síntesi dels sistemes bis(pirido[2,3-*d*]pirimidínics)

### 1.5.1. Síntesi dels bisadductes amb espaiadors sulfurats

Un cop coneguda la reacció i comprovada la reactivitat de **18{1}**, s'intenta l'acoblament de l'espaiador sulfurat bidentat **23** amb els carbonitrils **18{1}**-**18{4}** per obtenir els bisadductes **25{x,x}** respectius. Imitant les condicions de reacció de formació dels compostos **21**, s'allibera en un primer pas el grup tiourènic de l'espaiador **23·2HBr**, en medi metòxid sòdic/metanol abans d'afegir-hi el carbonitril corresponent (Figura 1.18).

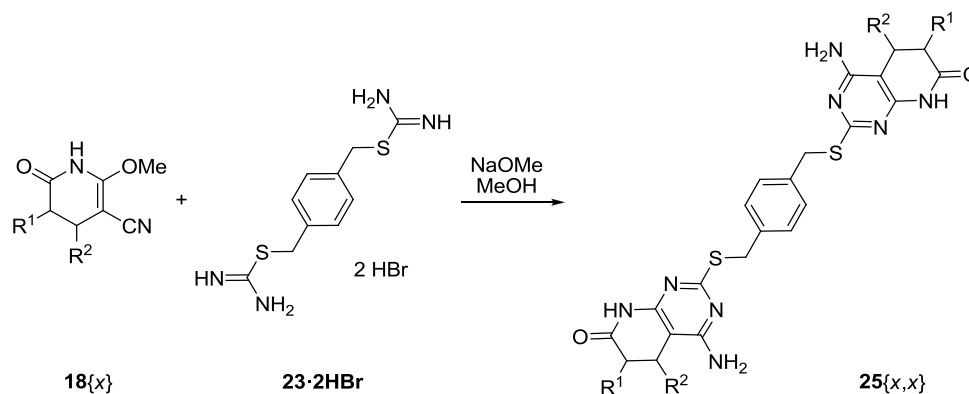


Figura 1.18 Síntesi dels sistemes bis(pirido[2,3-*d*]pirimidínics) **25**

En treballs anteriors<sup>148,155,162,173,174</sup> s'ha recomanat obtenir els sistemes piridopirimidínics a partir d'un excés de sistemes amidínics o guanidínics **20** respecte al carbonitril **18** emprat. Tot i que també s'assajarà, cal tenir present que en aquest cas sembla preferible que l'excés sigui de **18**, doncs és la millor forma d'afavorir el doble acoblament de l'espaiador bidentat.

Els primers intents es duen a terme amb proporcions estequiomètriques dels diferents reactius, tot i que posteriorment s'augmenta la proporció de **18:23** fins a 4:1, mantenint sempre la relació molar de NaOMe:**23** entre 2:1 i 3:1. Donades les quantitats i condicions de reacció el bromur sòdic format en alliberar-se els grups tiourènics de l'espaiador resulta soluble en el medi de reacció, tot i refredar la dissolució de **23·2HBr** en NaOMe/MeOH en bany de gel. És per això que, en general, s'ha considerat més adient no filtrar després d'aquesta etapa sinó rentar els possibles precipitats finals amb aigua, que solubilitza la sal sòdica formada i no el producte de reacció.

El cru de reacció s'ha mantingut a reflux entre un i cinc dies i en tots els casos s'han vist evolucions per cromatografia de capa prima (*thin-layer chromatography*, TLC). Tanmateix, sovint no s'han format compostos insolubles o bé els precipitats han resultat ser majoritàriament sals inorgàniques, probablement a causa d'un rentat no prou satisfactori amb aigua per eliminar el bromur sòdic format en el medi bàsic. En qualsevol cas, l'evolució per TLC mostra crus cada vegada més complexos, sense que cap dels reactius tingui una conversió completa.

En general, una proporció massa elevada de carbonitril **18** respecte a l'espaiador **23** dificulta el rentat posterior dels precipitats. Aquests s'han de rentar abundantment amb metanol per eliminar-ne l'excés de **18** i, tot i això, els seus espectres d'IR (KBr) sovint mostren una banda residual al voltant de 2180-2200 cm<sup>-1</sup> corresponent a la tensió del grup CN de **18**. És per aquest motiu que s'ha trobat com a millor proporció de carbonitril:espaiador la relació 3:1.

Pel que fa als bisadductes **25**{1,1}, **25**{2,2} i **25**{3,3} (Figura 1.19) semblen haver-se aconseguit finalment segons la reacció de la Figura 1.18 amb una proporció de **18**{x}:**23** de 3:1, durant cinc dies a reflux en metòxid sòdic/metanol i amb un rendiment que en cap cas no supera el 15%. El sòlid groguenc que precipita es filtra i es renta abundantment amb aigua per eliminar-ne el bromur sòdic i amb metanol per eliminar l'excés de carbonitril. El producte d'acoblament amb el carbonitril **18**{4} (R<sup>1</sup> = Ph) no s'ha obtingut amb cap dels procediments intentats amb els seus homòlegs.

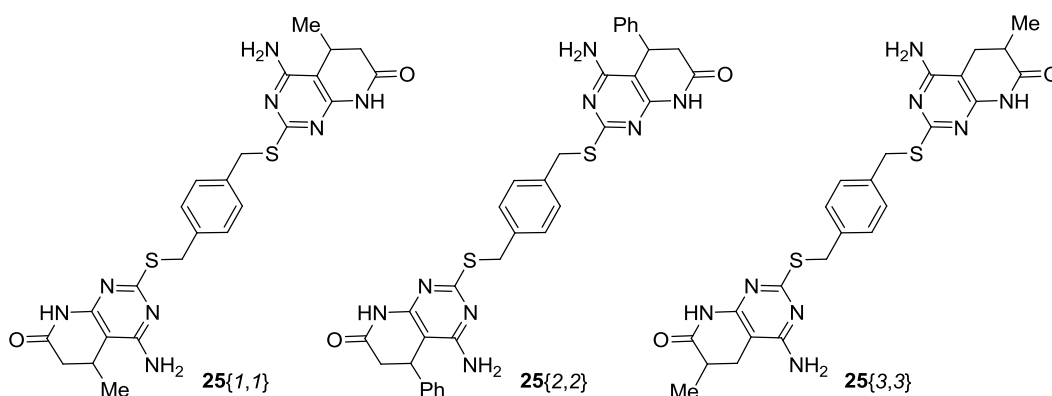


Figura 1.19 Bisadductes **25** obtinguts amb l'espaiador sulfurat bidentat

Tot i això, els productes d'acoblament obtinguts i aïllats **25**{1,1}, **25**{2,2} i **25**{3,3} amb els carbonitrils **18**{1}, **18**{2} i **18**{3}, respectivament, resulten en general massa insolubles per enregistrar-ne l'espectre de ressonància magnètica nuclear. És per aquest motiu que l'obtenció amb èxit dels bisadductes, els espectres d'IR (KBr) dels quals han demostrat no tenir excés de carbonitril com a

impuresa (per l'absència de bandes al voltant de  $2200\text{ cm}^{-1}$ ), només s'ha pogut corroborar per espectroscòpia de masses (MALDI-TOF, matriu HCCA), on es distingeix l'ió molecular amb la relació massa/càrrega esperada.

Val a dir que les pirido[2,3-*d*]pirimidines descrites<sup>148-151,154,155,162,173</sup> s'obtenen sempre per precipitació en el medi de reacció, per la qual cosa s'espera que els productes desitjats se separin del cru per filtració al buit. Tanmateix, donat que no es coneix amb precisió el  $\text{pK}_a$  de tots els protons àcids de la molècula, s'ha eliminat el dissolvent a pressió reduïda, s'ha dissolt el residu gomós en la mínima quantitat d'aigua i, finalment, la dissolució bàsica resultant s'ha acidulat amb àcid clorhídric 6 M. Generalment, s'obtenen mesclades complexes de reactius i subproductes de reacció. Només en el cas de **25**{3,3} es pot concloure que l'acidulació no és necessària, doncs a  $\text{pH} = 1$  s'obté el mateix sòlid groguenc insoluble que durant la reacció, amb pitjor rendiment. L'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN, que s'ha pogut enregistrar en algun dels casos, ha permès distingir la presència del bisadducte, mostrant un singlet deuterable a 6,74 ppm, assignable al grup  $\text{NH}_2$ ; un multiplet al voltant de 2,5 ppm, senyal dels sis protons alifàtics, i el doblet dels grups metil a 1,14 ppm.

S'ha intentat obtenir la sal soluble en aigua d'un àcid biocompatible (concretament el clorhidrat) de **25**{1,1} amb àcid clorhídric aquós en concentracions variables del 5% al 35% i amb àcid clorhídric 1,25 M en metanol, però els resultats obtinguts no han estat satisfactoris.

Malauradament, donada la seva insolubilitat en dissolvents comuns per a l'avaluació de l'activitat biològica ( $\text{H}_2\text{O}$ , DMSO), aquest compostos s'han de descartar com a nous possibles inhibidors d'unió i fusió del VIH.

La derivatització d'algunes pirido[2,3-*d*]pirimidines, com ara l'alquilació del nitrogen lactàmic, ha demostrat ésser una alternativa per augmentar-ne la solubilitat i biodisponibilitat<sup>152,175-177</sup>. Tot i no haver-se intentat en aquest treball, no es pot perdre de vista la possible derivatització de **18** abans de l'acoblament amb l'espaiador **23**.

Ja que les pirido[2,3-*d*]pirimidines **21**{1,1} i **21**{1,2} s'obtenen sense dificultats a partir del carbonitril **18**{1}, es prova d'obtenir **21**{1,3} i **21**{1,4} per reacció del mateix carbonitril **18** amb tiourea (**20**{3}) i *S*-metiltiourea (**20**{4}), respectivament (Figura 1.20). Es pretén deduir així la dificultat d'obtenir els bisadductes **25** per reacció dels carbonitrils **18** amb l'espaiador sulfurat bidentat **23**.

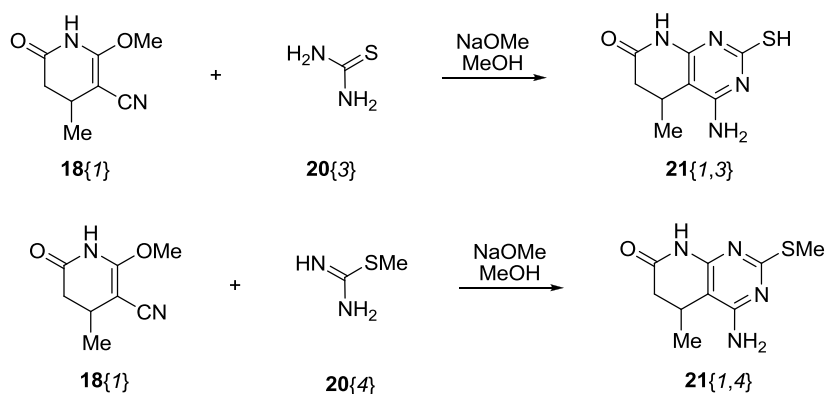


Figura 1.20 Obtenció de piridopirimidines 2-substituídes amb sofre

La síntesi de **21**{1,3} es troba descrita amb un rendiment del 53% a partir de l'adducte de Michael **19**{1} que resulta de fer reaccionar l'èster  $\alpha,\beta$ -insaturat **15**{1} amb malononitril (**16**) segons l'esquema

de la Figura 1.21<sup>173</sup>. Amb el 2-metoxicarbonitril **18**{1}, emperò, no s'aconsegueixen els productes d'acoblament, fet que explica en part la dificultat d'obtenció dels bisadductes **25** en condicions de reacció similars.

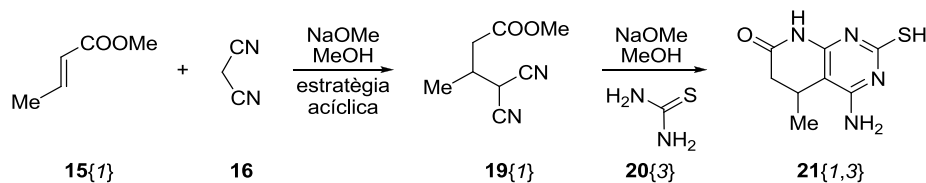


Figura 1.21 Síntesi de **21**{1,3} descrita

És possible que el medi metòxid sòdic/metanol sigui massa bàsic, car en l'intent d'obtenir **21**{1,4} es desprèn una forta olor a metilmercaptà, probablement a causa de la substitució nucleòfila del grup tiometoxil pel metòxid del medi.

Un cop més, s'ha provat de disminuir la polaritat del medi i augmentar el nivell tèrmic del reflux, emprant 1-butanol en comptes de metanol com a dissolvent de reacció, sense obtenir millores en els resultats.

La síntesi de sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics es troba descrita amb resultats molt satisfactoris mitjançant calefacció per microones<sup>149-151,155</sup>. És per això que s'intenta finalment l'obtenció dels bisadductes **25** escalfant una mescla del carbonitril **18**{1} i l'espaiador bidentat **23**·2HBr en metòxid sòdic/metanol a 70 °C amb microones, durant períodes de 30 minuts i fins a un total de 2,5 hores. Tanmateix, tampoc així s'ha aconseguit obtenir els productes esperats: no només no es formen els bisadductes, sinó que, a més, l'espaiador sulfurat bidentat **23** no és estable en les condicions de reacció emprades (veure apartat 1.5.3, pàg. 63).

### 1.5.2. Síntesi de bisadductes **43**

Vistes les dificultats d'obtenció de sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics amb els espaiadors i carbonitrils en estudi, es planteja l'obtenció d'altres heterocicles polinitrogenats més simples a partir del grup tiourènic de **23**. Tenint en compte que diverses pirimidines es troben descrites com a principis actius o intermedis amb diverses activitats biològiques<sup>178</sup>, sorgeix la possibilitat de fer reaccionar l'espaiador sulfurat bidentat **23** amb compostos 1,3-dicarbonílics **41** (Figura 1.22) o bé amb compostos carbonílics  $\alpha,\beta$ -insaturats com la metilvinilcetona (**42**) per rendir pirimidinones **43**, tal com es mostra en la Figura 1.23.

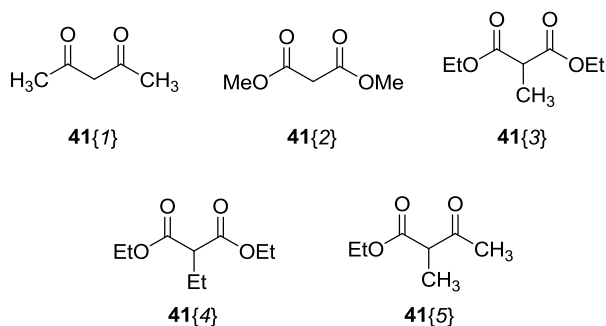


Figura 1.22 Sistemes 1,3-dicarbonílics emprats en la reacció amb l'espaiador **23**

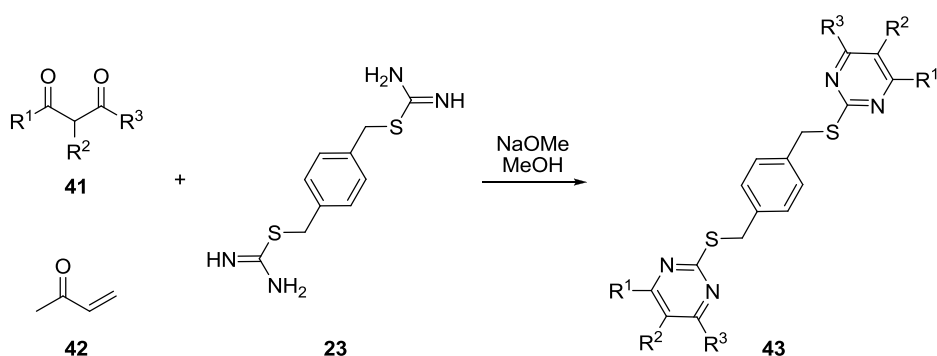


Figura 1.23 Obtenció d'adductes **43** amb compostos carbonílics

Tal com s'ha mostrat en les taules de fàrmacs aprovats per la FDA de la Introducció d'aquest treball (pàg. 29 i següents), moltes pirimidinones i pirimidindiones tenen activitat antiviral. I no només això, estructures 6-substituïdes han mostrat també activitat antifúngica, antitumoral i antitubercular, fet que augmenta la possibilitat de tenir-les en compte com a fàrmacs d'ampli espectre (activitat front a un ampli ventall de patògens)<sup>179</sup>.

Inicialment s'ha intentat la derivatització de l'espaiador sulfurat bidentat **23** amb acetilacetona **41**{1} en medi metòxid sòdic/metanol. Per tal de minimitzar la ionització en  $\alpha$  del compost dicarbonílic, aquest s'addiciona gota a gota sobre una dissolució de l'espaiador en el medi bàsic. Tanmateix, l'ús d'aquest procediment no porta a cap precipitat i el seguiment de la reacció per TLC no permet distingir-hi una evolució.

Pirimidinones amb un carbonil en les posicions 4 i 6 poden considerar-se també com a derivats de l'àcid barbitúric o tiobarbitúric (**44**) (Figura 1.24), de manera que es podria pensar en obtenir derivats de l'àcid tiobarbitúric per reacció d'alguns sistemes **41** amb l'espaiador sulfurat bidentat<sup>180,181</sup>. En aquests casos, els sistemes **41** seran de tipus èster, per tal d'aprofitar els grups sortints. Així doncs, s'ha provat de fer reaccionar una mescla estequiomètrica de l'espaiador **23** amb els compostos **41**{2}, **41**{3} i **41**{4}, a reflux durant 16 – 20 hores en medi bàsic, amb una addició lenta del reactiu **41** sobre la dissolució de l'espaiador sulfurat, per tal d'evitar la ionització en  $\alpha$  indesitjable.

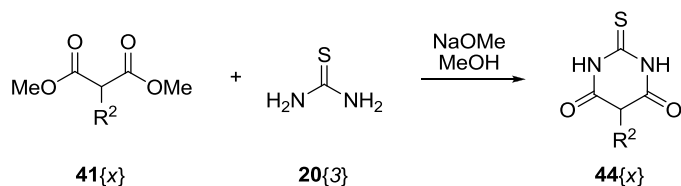


Figura 1.24 Síntesi bibliogràfica de l'àcid tiobarbitúric (**44**)

S'obtenen així olis lleugerament grocs en comptes dels sòlids insolubles esperats. Els espectres d'IR no mostren cap banda intensa al voltant de  $1650 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ , fet que fa pensar en l'obtenció, si de cas, del tautòmer endòlic que provoca l'aromatització de l'anell pirimidínic, tal com es representa a la Figura 1.23. Els espectres de  $^1\text{H-RMN}$  mostren un anell benzènic simètricament disubstituït, que tant podria ser de l'espaiador **23** sense reaccionar com del producte **43** desitjat, a més d'un gran nombre d'impureses. Finalment, els espectres de masses (ESI-TOF) no mostren ni l'ió molecular ni cap de les fragmentacions esperades. Així doncs, no es pot considerar aconseguida l'obtenció dels bisadductes **43**.



Havent trobat que l'espaiador **23** és inestable en el medi fort en què es troba (apartat 1.5.3, pàg. 63), s'ha intentat dur a terme la reacció en atmosfera de nitrogen, emprant etanol com a dissolvent i piperidina com a base més feble per alliberar el grup tiourènic, tal com descriu Mulwad<sup>178</sup>, sense millores apreciables.

D'altra banda, s'ha trobat descrita la síntesi en fase sòlida de pirimidinones i pirimidindiones 5,6-substituídes a partir d'una sal de tiouroni i un  $\beta$ -cetoèster<sup>179</sup>. És per aquest motiu que s'ha provat de fer reaccionar **23** amb un excés (1:3) de 2-metilacetoacetat d'etil (**41{5}**), escalfant a reflux durant 3 dies en una mescla d'aigua:etanol (1:1, v/v) i emprant hidròxid sòdic com a base per activar els grups tiourènics de l'espaiador. Tot i que el rendiment de la reacció de referència<sup>179</sup> és força elevat (72%) –cal tenir en compte que la síntesi en fase sòlida permet emprar grans excessos de reactius per desplaçar l'equilibri de la reacció- en aquest cas no s'ha obtingut producte.

El mateix acoblament també s'ha dut a terme en les condicions de reacció de la Figura 1.23 (pàg. 62), escalfant en un medi bàsic orgànic a reflux durant 16 hores. Malauradament, amb ambdós procediments només s'ha recuperat el disulfur **45** (Figura 1.25), producte de descomposició de l'espaiador (apartat 1.5.3).

En una nova cerca a l'*SciFinder® Scholar 2004* s'ha trobat també la síntesi de compostos pirimidínics a partir de compostos carbonílics  $\alpha,\beta$ -insaturats i clorur de benzilisotiouroni, emprant etanol com a dissolvent i piperidina com a base per augmentar la nucleofília del compost sulfurat<sup>178</sup>. En un tractament posterior, es fa precipitar el producte desitjat en medi àcid aquós. A partir de la reacció descrita, en què es fan reaccionar una calcona  $\alpha,\beta$ -insaturada i clorur de benzilisotiouroni, es manté a reflux durant 16 hores una mescla de l'espaiador sulfurat bidentat **23** i metilvinilcetona (**42**), en etanol amb una 5% (v/v) de piperidina. L'acció de la piperidina queda clarament palesa pel fet que el bromur **23·HBr**, altrament poc soluble en etanol, resulta molt soluble en el medi piperidínic. El seguiment de la reacció per TLC mostra certa evolució; després del tractament amb àcid clorhídric aquós, emperò, només s'obté una emulsió difícil de trencar i es recupera un 10% de l'espaiador **23**.

Cal remarcar, finalment, que amb el medi bàsic piperidínic en etanol no s'ha observat descomposició de l'espaiador **23**.

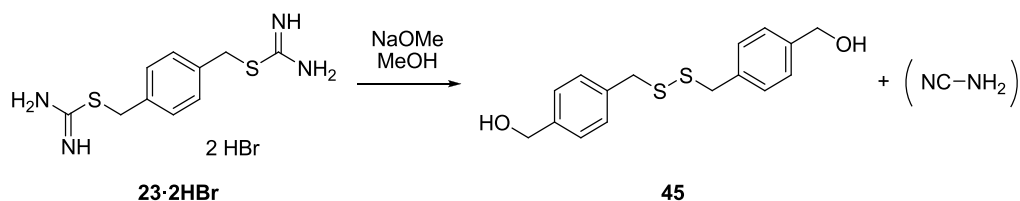
### 1.5.3. Estabilitat de l'espaiador sulfurat

Els clorurs de clorobenzilisotiouroni s'usen en forma de sal com a repel·lents de rosegadors<sup>166</sup>. Així mateix, els clorurs de benzilisotiouroni s'empren també en les purificacions d'aigües, doncs no són tòxics per als humans ni animals en general, a més de no ser corrosius i ser inodors, de manera que les possibles traces d'aquests compostos en les aigües tractades no tenen efectes nocius directes a la natura<sup>167</sup>. Cal remarcar que, en qualsevol dels usos que se'ls dóna, aquests tipus de compostos s'empren com a sal i no es derivatitzen més enllà.

La dificultat d'obtenir els compostos d'acoblament desitjats amb l'espaiador sulfurat, així com el fet que la reacció no sembla evolucionar per TLC tot i que es distingeixen fins a cinc taques en alguns casos, fa pensar en la possibilitat d'una baixa estabilitat de l'espaiador en el medi de reacció.

Per tal de corroborar aquesta hipòtesi, es manté a reflux en metòxid sòdic/metanol el dibromur **23·HBr** i se n'aïlla, passades 24 hores, petites quantitats d'un sòlid blanc. D'altra banda, s'aïlla de la reacció de l'espaiador **23** amb el malonat de dimetil (**41{2}**) descrita a l'apartat 1.5.2, un subproducte de

puresa analítica, el qual resulta correspondre's amb el sòlid blanc anterior. L'espectre de  $^1\text{H-RMN}$  mostra com l'espaiador ha descompost, rendint el disulfur **45**.



**Figura 1.25** Descomposició de l'espaiador sulfurat bidentat **23** en disulfur **45**

L'espectre d'IR de la impuresa aïllada permet establir la presència del grup hidroxil (tensió O-H a  $3344$  i  $3260\text{ cm}^{-1}$ , flexió C-O-H a  $1418\text{ cm}^{-1}$  i tensió C-O a  $1011\text{ cm}^{-1}$ ), a més de les tensions C=C aromàtiques de  $1511\text{ cm}^{-1}$  i la *p*-substitució aromàtica per la banda a  $834\text{ cm}^{-1}$ . L'espectre de  $^1\text{H-RMN}$  ( $d_6$ -DMSO, 300 MHz) de **45** mostra dos multiplets a 7,23 ppm i 7,26 ppm, corresponents als protons aromàtics. A 5,17 ppm destaca un triplet deuterable ( $^3J = 5\text{ Hz}$ ), corresponent a l'alcohol benzílic, i a 4,47 ppm el doblet del metilè amb el qual s'acobla, que perd la multiplicitat en deutar-se l'espectre. Finalment, el metilè unit al disulfur es mostra com un singlet perfecte a 3,73 ppm. L'espectre de masses mostra l'ió molecular  $[\text{M}^+]$  a  $m/z = 306$  i l'ió  $[\text{M}-185^+]$  a  $m/z = 121$ , que correspon a la pèrdua del disulfur ( $\text{HOCH}_2\text{-}p\text{-Ph-CH}_2^+$ ). L'anàlisi elemental obtinguda es correspon (considerant un marge d'error assumible del 0,4%) amb la calculada per a  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{S}_2$  (calculada: C 62,71%, H 5,92%, S 20,93%; obtinguda: C 62,83%, H 5,85%, S 20,82%). Finalment, l'espectre de  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $d_6$ -DMSO, 75,5 MHz) recolza l'estructura del disulfur **45** com la impuresa, tot mostrant dos carbonis quaternaris a 141,5 ppm i 135,4 ppm, els carbonis aromàtics a 128,9 ppm i 126,3 ppm, i els metilens a 62,6 ppm i 41,4 ppm.

Sobta, tanmateix, que la descomposició, substitució i acoblament amb una altra molècula d'espaiador només es doni per un costat, mentre per l'altre se substitueix el grup tiourènic per un hidroxil, possiblement per la pròpia humitat del dissolvent. Fóra possible que en dissolvents menys higroscòpics, com ara etanol o butanol, s'obtinguessin millors resultats. Tanmateix, ja s'ha comentat que els acoblaments no s'obtenen tot i intentar la reacció en butanol per disminuir la polaritat del medi de reacció i augmentar el nivell tèrmic a què s'arriba mantenint la reacció a reflux.

S'ha comprovat, emperò, que el grup tiourènic de l'espaiador sulfurat pot alliberar-se en medis bàsics orgànics menys forts (piperidina etanòlica), que podrien dificultar la descomposició de l'espaiador.

#### 1.5.4. Síntesi dels bisadductes amb espaiadors nitrogenats

Els acoblaments amb l'espaiador nitrogenat **24** s'han intentat, com per als espaiadors sulfurats, segons les condicions de reacció descrites per a l'obtenció de sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics<sup>148-151,153-155,162,173,182-186</sup>, seguint inicialment les que s'empren en la calefacció convencional de carbonitrils **18** amb guanidines substituïdes.

Donat que s'espera poder fer reaccionar l'espaiador nitrogenat bidentat per ambdues bandes, es mantenen a reflux mesclades de l'espaiador **24** i els carbonitrils **18**, amb un excés dels darrers (1:4), i amb una proporció de Na:espaiador de 3:1. Com per als bisadductes amb els espaiadors sulfurats, per evitar possibles pèrdues, es considera més adient no filtrar la sal sòdica que es forma amb el contraanió de l'espaiador en escalfar-lo en medi metòxid sòdic/metanol, sinó rentar el possible producte final amb aigua per eliminar-la.

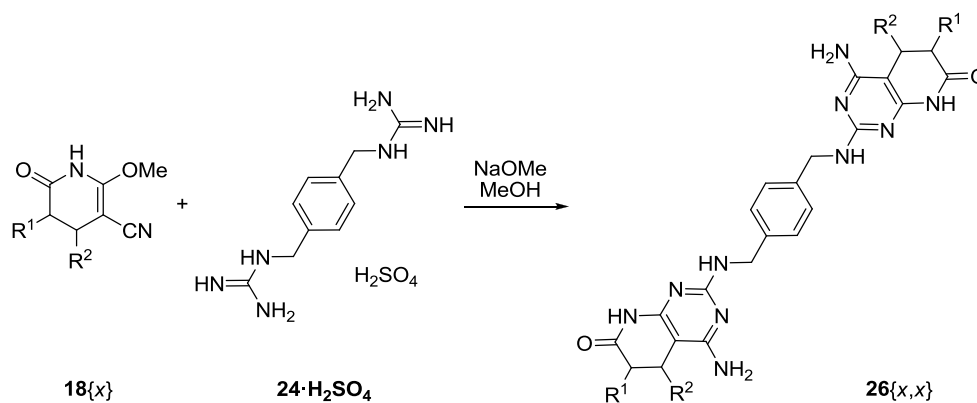


Figura 1.26 Obtenció dels bisadductes nitrogenats **26**

Tenint en compte que no s'obté cap precipitat després de quatre dies a reflux, i desconeixent realment la solubilitat i pK<sub>a</sub> de tots els protons àcids de les molècules en estudi, es procedeix segons s'ha descrit per als bisadductes amb l'espaiador sulfurat: s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i el residu gomós que en resulta es dissol en la mínima quantitat d'aigua, de manera que també queda dissolt el sulfat sòdic format en escalfar l'espaiador **24** en el medi bàsic inicial. La dissolució es neutralitza amb HCl (6 M), amb la qual cosa precipita un sòlid lleugerament colorat, per a les reaccions de **24** amb **18**{2} i **18**{3}, que es renta amb metanol fred. Cal anar amb cura i no acidular excessivament la dissolució, doncs a valors de pH < 6 comença a precipitar glutarimida (producte de la hidròlisi de l'èter metílic de **18**), i els sòlids que s'obtenen resulten més impurs.

Els bisadductes amb els carbonitrils **18**{1} i **18**{4}, tot i que també s'han intentat, no han donat precipitat ni durant la reacció, ni eliminant el dissolvent de reacció a pressió reduïda, dissolent el residu gomós en aigua i neutralitzant posteriorment.

Els espectres de <sup>1</sup>H-RMN (d<sub>6</sub>-DMSO, 300 MHz) dels bisadductes **26**{2,2} i **26**{3,3} mostren la formació dels compostos esperats, amb rendiments de l'ordre del 16% per a **26**{2,2} i del 52% (sense purificar) per a **26**{3,3} (Figura 1.27). Es distingeixen, per al primer, un singlet a 7,38 ppm per als protons aromàtics de l'espaiador i un multiplet a 7,26 ppm corresponent als hidrògens de l'anell aromàtic del carbonitril **18**{2}. Els tres senyals deuterables indiquen la formació del grup amino a partir del carbonitril i els NH lactàmics i de l'espaiador. L'espectre d'IR (KBr) també confirma l'absència de carbonitril **18**{2} (per la manca de bandes entre 2000 i 2200 cm<sup>-1</sup>) i la formació d'una amina primària a banda dels grups NH amb les tensions N-H a 3337, 3206 i 3106 cm<sup>-1</sup> i les tensions C=C i C=N entre 1628 i 1540 cm<sup>-1</sup>. Es confirma, per tant, la formació de l'acoblament desitjat.

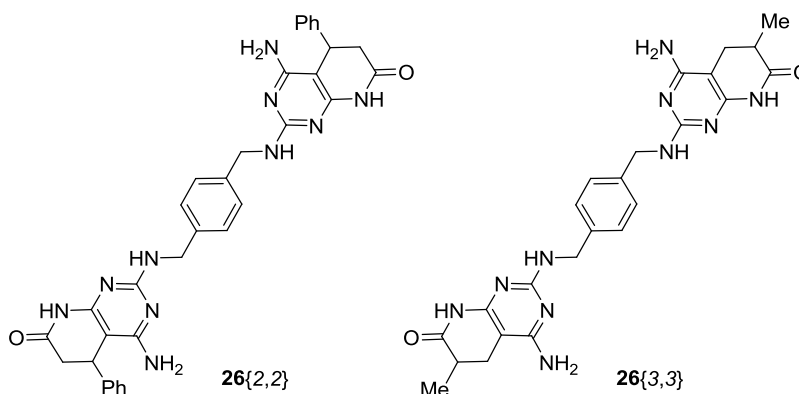


Figura 1.27 Bisadductes **26** obtinguts

En el cas de **26**{3,3} l'espectre d'IR mostra la presència del carbonitril **18**{3} com a impuresa, però també la formació de l'amina primària provinent de la ciclació sobre el carbonitril per les tensions simètrica i asimètrica del grup amino, a 3345 i 3220  $\text{cm}^{-1}$ . A més, la formació del bisadducte esperat queda palesa amb l'espectre de  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{d}_6\text{-DMSO}$ , 300 MHz) amb el senyal deuterable de l'amina primària a 6,79 ppm.

Donat que la síntesi de sistemes piridopirimidínics ha estat descrita també com una reacció *one pot*<sup>150</sup> (Figura 1.2, pàg. 50), es prova de partir de l'espaiador nitrogenat bidentat **24**, l'èster  $\alpha,\beta$ -insaturat **15** i malononitril (**16**), per a l'obtenció dels bisadductes **26** (Figura 1.28). S'aconsegueix així evitar l'etapa intermèdia d'obtenció del carbonitril **18**, que té l'inconvenient que pot hidrolitzar si no s'asseca bé. Es pretén també poder comparar els rendiments i pureses dels compostos obtinguts per ambdós mètodes.

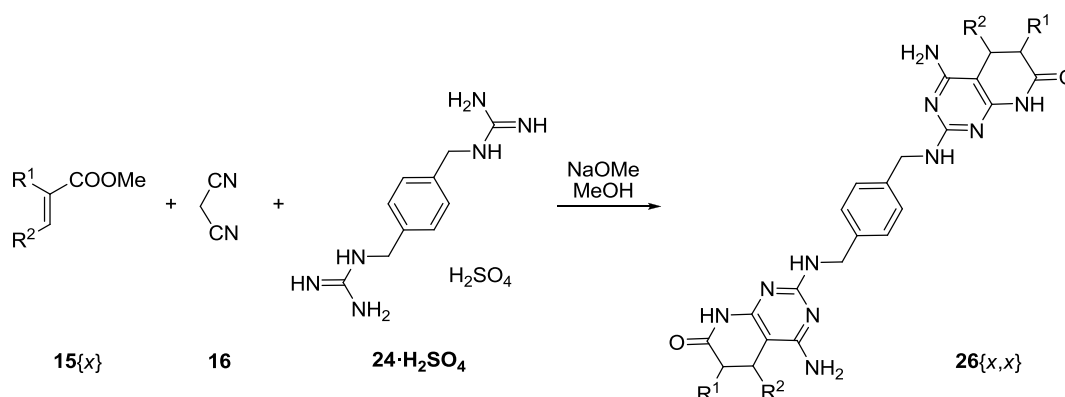


Figura 1.28 Síntesi dels bisadductes **26** per reacció *one pot*

Per això, s'escalfa a reflux una mescla dels tres components, amb una proporció **24**:**15**:**16** de 1:2,5:3, i amb un lleuger excés de sodi per crear el medi bàsic per reacció amb el dissolvent (2,5:1 de Na:espaiador **24**· $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). La sal sòdica, en aquests casos, sí s'ha filtrat després de mantenir a reflux l'espaiador seguint la metodologia original<sup>150</sup>, doncs ha precipitat visiblement. Els productes d'acoblament, que d'altra manera resultaven difícils d'obtenir insolubilitzats en el medi de reacció, han precipitat després de 24 hores. S'han aconseguit també per aquest mètode els acoblaments **26**{2,2} i **26**{3,3}, amb rendiments superiors als obtinguts per la síntesi seqüencial (Taula 1.2), com uns sòlids molt lleugerament colorats, després de rentar els precipitats amb aigua i metanol fred.

L'espectre d'IR (KBr) de **26**{2,2} obtingut per aquest procediment mostra en aquest cas una banda poc intensa a 2168  $\text{cm}^{-1}$ , indicant que hi ha una petita part de nitril com a impuresa i justificant la lleugera coloració, però també la formació de l'amina primària per les tensions N-H a 3341 i 3192  $\text{cm}^{-1}$ . L'espectre de  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{d}_6\text{-DMSO}$ , 300 MHz) torna a mostrar clarament un singlet superposat a un multiplet al voltant de 7,20 ppm, corresponents als dos tipus de protons aromàtics del bisadducte, i tres senyals deuterables, a banda dels protons metilènics de l'espaiador a 4,06 ppm i alifàtics del sistema bicíclic entre 2 i 3 ppm. A més, l'espectre de masses d'alta resolució mostra també la formació de l'ió  $[\text{M}+1]^+$ , amb una relació de m/z de 613,2763 (calculat: 613,2782).

Pel que fa al bisadducte **26**{3,3} obtingut per reacció *one pot*, l'espectre d'IR (KBr) mostra una banda poc intensa a 2192  $\text{cm}^{-1}$ , indicativa d'una petita quantitat de nitril com a impuresa; però la formació de l'amina primària, un cop més, queda clarament palesa per les tensions N-H a 3333 i 3197  $\text{cm}^{-1}$ . A l'espectre de  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{d}_6\text{-DMSO}$ , 300 MHz) es veuen de nou tres senyals deuterables, la *p*-substitució simètrica de l'espaiador amb un singlet a 7,05 ppm i un doblet de doblets a 2,6 ppm corresponent al protó en  $\alpha$  del carbonil, amb una constant d'acoblament que s'adiu amb la del doblet

que dóna el metil en  $\alpha$  del carbonil ( $^3J = 6$  Hz). L'espectre de masses d'alta resolució ha demostrat la formació de l'ió  $[M+1]^+$ , amb una  $m/z = 489,2455$  (calculat: 489,2469).

Per a **26**{4,4}, tot i que l'espectre de masses d'alta resolució mostra la formació de l'ió  $[M+1]^+$  ( $m/z$  experimental: 613,2772; calculat: 613,2788), l'espectre de  $^1\text{H-RMN}$  ( $d_6$ -DMSO, 300 MHz) no permet distingir-hi els senyals esperats.

En general, la puresa que s'observa als espectres dels bisadductes, obtinguts per reacció de l'espaiador **24** amb el carbonitril **18** o bé per reacció *one pot* és similar. Pel fet que en la síntesi seqüencial cal tenir en compte el rendiment d'ambdues etapes sintètiques (obtenció del carbonitril i síntesi del bicicle) per al càlcul del rendiment global, la síntesi *one pot* sembla que pot dur a majors rendiments (Taula 1.2).

Taula 1.2 Rendiments d'obtenció dels bisadductes **26**

bisadducte	rendiment amb carbonitril	rendiment <i>one pot</i>
<b>26</b> {2,2}	$0,53 \cdot 0,16 = 8\%$	27%
<b>26</b> {3,3}	$0,42 \cdot 0,52 = 22\%$	33%

S'ha enviat a avaluar l'activitat antiviral de **26**{3,3} obtingut per reacció *one pot*, el qual no ha mostrat activitat ni citotoxicitat a la concentració màxima assajada de 25  $\mu\text{g/ml}$ .

### 1.5.5. Síntesi del diiodur de *N,N'*-bis(3,4-dihidro-1*H*-imidazole-2-il)-1,4-bis(aminometil)benzè (**39**·2HI)

Tal com s'ha comentat en l'apartat 1.3.2 (pàg. 55), durant la cerca d'una metòdica per a l'obtenció de l'espaiador nitrogenat bidentat es trobà descrita la síntesi del diiodur de *N,N'*-bis(3,4-dihidro-1*H*-imidazole-2-il)-1,4-bis(aminometil)benzè (**39**·2HI), a partir de la *p*-xililendiamina **37** i el iodur de 2-metilmercapto-4,5-dihidroimidazolini (**38**·HI)<sup>169</sup>. Essent aquest producte d'estructura general **1** (Figura 0.13, pàg. 34), on dos sistemes cíclics polinitrogenats es troben separats per un espaiador *p*-xililènic, s'ha procedit a la síntesi de **39** com a possible molècula objectiu.

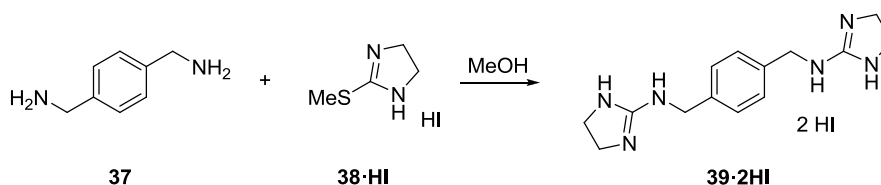


Figura 1.29 Obtenció del bisadducte **39**

Emprant, tal com descrit, un reflux de cinc hores en metanol, s'ha aconseguit un rendiment de reacció del 50% (descriu<sup>169</sup>, 55%) després de recristal·litzar. Tenint en compte que s'ha trobat com a millor procediment per a l'obtenció de l'espaiador nitrogenat bidentat l'agitació a temperatura ambient d'una mescla estequiòmica de la diamina **37** i la tiourea substituïda **20**{4}, emprant aigua com a dissolvent, es prova d'adaptar aquesta metòdica per a l'obtenció de **39**. S'ha aconseguit així augmentar el rendiment fins a un 64% després de la recristal·lització, obtenint el producte desitjat **39** com un sòlid blanc de puresa analítica. Cal esmentar que, en ambdós casos, una concentració de les aigües mare

permet aconseguir una segona fracció menys pura de producte, amb la qual es pot arribar fins a un 90% de rendiment.

L'espectre d'IR (KBr) obtingut per a **39** mostra una multiplicitat de bandes entre 3315 i 3132  $\text{cm}^{-1}$ , probablement deguda a les múltiples possibilitats d'associació, a més de les figures de *p*-substitució aromàtica de 1957 i 1847  $\text{cm}^{-1}$  i les tensions C=C i C=N de 1667 i 1605  $\text{cm}^{-1}$ . A l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz), que concorda amb les dades descrites<sup>169</sup>, s'observa la substitució simètrica de l'anell benzènic com un singlet a 7,39 ppm i els metilens xililènics a 4,46 ppm. Els grups metilènics del 4,5-dihidroimidazole originen, per tautomeria ràpida, un sol senyal singlet a 3,71 ppm. L'espectre de  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75,5 MHz) i l'anàlisi elemental orgànica quantitativa també es corresponen amb l'esperat.

Finalment, s'ha avaluat l'activitat antiviral de **39-2HI**, que no ha mostrat activitat ni toxicitat a la màxima concentració testada de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

## 1.6. Síntesi dels monoadductes

### 1.6.1. Síntesi dels monoadductes amb espaiadors sulfurats

Tenint en compte que per a l'obtenció dels bisadductes ha calgut un excés de carbonitril respecte a l'espaiador bidentat (relació molar **18:23** de 3:1), es considera aquest resultat adient per prendre'l com a referència en els primers intents de monoacoblaments **29**. Així, l'espaiador sulfurat monodentat **27b** s'ha fet reaccionar inicialment amb el carbonitril **18{1}**, durant tres dies a reflux i amb una relació molar **18{1}:27b** de 1,5:1 (Figura 1.30).

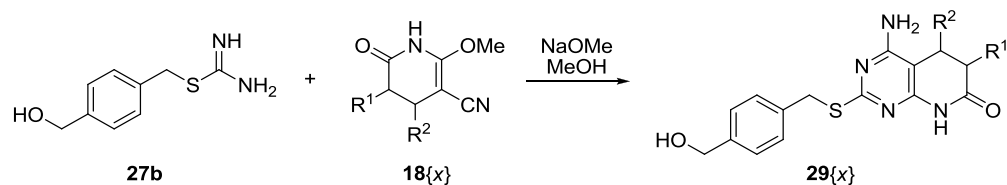
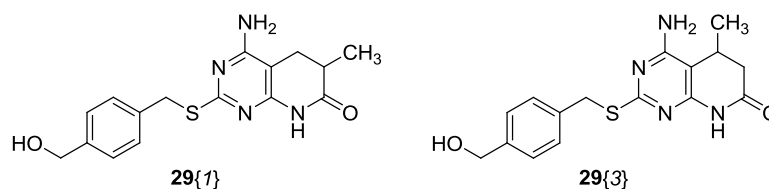


Figura 1.30 Obtenció de monoadductes **29**

D'altra banda, considerant que les piridopirimidines descrites s'obtenen a partir d'un excés del sistema amidínic respecte al carbonitril (relació molar **18:20** de 1:3)<sup>148-151,154,155,162</sup>, i tenint en la reacció objectiu les mateixes proporcions estequiomètriques, s'ha provat també de dur a terme l'acoblament amb aquest excés d'espaiador. Tanmateix, igual que en l'obtenció dels bisadductes **25{x,x}**, queda palès que la reacció es veu afavorida amb un excés de carbonitril **18{x}**, el qual pot eliminar-se fàcilment en rentar el producte insoluble en el medi de reacció amb metanol. Així, es troba que les proporcions que més afavoreixen l'obtenció de **29{x}** són de 1,5:2:1 de Na:**18:27b**.

Després de tres dies a reflux no s'aprecia la formació de cap precipitat en el medi de reacció, però un seguiment per TLC en mostra evolució. A causa de la presència de l'alcohol benzílic es creu en la possibilitat que els monoadductes **29** hi siguin com a mínim parcialment solubles. Per tant, igual que s'ha intentant en el cas dels bisadductes, s'elimina el dissolvent del cru de reacció a pressió reduïda. Seguidament, el residu gomós que s'obté es dissol en la mínima quantitat d'aigua i es neutralitza amb HCl diluït. L'excés de carbonitril que dona color als precipitats obtinguts es renta amb metanol fred. S'aconsegueixen així els monoadductes **29{1}** i **29{3}** (Figura 1.31) en forma de sòlids lleugerament acolorits, amb rendiments de l'ordre del 10%.

Figura 1.31 Monoadductes sulfurats obtinguts **29**

L'espectroscòpia d'IR (KBr) mostra la presència dels carbonitrils de partida **18{1}** i **18{3}** com a impureses en petites quantitats, amb una banda poc intensa de la tensió C≡N al voltant de 2200 cm<sup>-1</sup>. A més, s'observen les vibracions NH i NH<sub>2</sub> a 3250-3350 cm<sup>-1</sup>, la tensió del carbonil lactàmic al voltant de 1698 cm<sup>-1</sup> i la tensió de l'enllaç C-O de l'alcohol benzílic a 1012 cm<sup>-1</sup>. Als espectres de <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) s'observa la diferència magnètica dels dos protons sobre el C5 de la pirido[2,3-d]pirimidina en el cas de **29{1}** i sobre el C6 per a **29{3}**, que s'enregistren com dos dobles de dobles, amb una constant d'acoblament comuna i una de diferent, corresponent a l'acoblament amb el protó del carboni adjacent. A més, resulta si més no remarcable observar el senyal de l'alcohol benzílic com un triplet, a causa de l'acoblament amb els protons benzílics, mentre que aquesta multiplicitat desapareix amb la deuteració de l'espectre. Particularment, pel que fa a l'espectre de <sup>13</sup>C-RMN (75,5 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) de l'adducte **29{3}**, els carbonis quaternaris de l'anell piridopirimidínic format es registren a 160,7 ppm (carboni quaternari que sustenta el grup NH<sub>2</sub>), i a 155,7 ppm i 89,7 ppm (carbonis quaternaris pont del bicicle). L'obtenció dels monoadductes **29** també s'ha pogut corroborar per espectroscòpia de masses d'alta resolució (ESI-TOF), on es detecta l'ió molecular [M+1<sup>+</sup>] amb una relació m/z = 331,1223 per a **29{1}** i m/z = 331,1211 per a **29{3}** (calculat: 331,1223, en ambdós casos).

S'ha enviat a avaluar l'activitat antiviral del monoadducte **29{3}**, que no ha resultat actiu ni tòxic a la màxima concentració assajada (25 µg/ml).

Pel que fa a l'intent de monoacoblament amb el carbonitril **18{2}**, tot i que l'espectre d'IR mostra les bandes esperades segons els grups funcionals presents, no es pot considerar aconseguit, car l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN mostra incoherències en l'assignació de les integrals i en l'espectre de masses de baixa resolució no es registra l'ió molecular.

Així mateix, l'intent d'acoblament amb **18{4}**, encara que s'ha intentat, no s'ha aconseguit amb cap dels procediments descrits anteriorment.

### 1.6.2. Síntesi dels monoadductes amb espaiadors nitrogenats

Tal com ja s'ha comentat (veure apartat 1.3.2, pàg. 55), a causa de la baixa disponibilitat i rendiments en la síntesi del l'espaiador nitrogenat monodentat **28**, s'ha considerat adient deixar l'obtenció d'acoblaments amb aquest espaiador per a futurs treballs.

## 1.7. Resum

Els espaiadors sulfurats bidentat **23** i monodentat **27** poden obtenir-se fàcilment per reacció de *p*-xilens halogenats amb tiourea (**20{3}**) i amb rendiments satisfactoris. Els espaiadors nitrogenats

bidentat **24** i monodentat **28** s'han obtingut a partir de *p*-xililendiamines i *S*-metiltiourea (**20**{3}) amb rendiments més discrets.

S'han trobat com a millors condicions per a la reacció de l'espaiador bidentat **23** amb els carbonitrils **18**{*x*} les proporcions Na:**4**{*x*}:**23** de 2,5:3:1, escalfats a reflux en metanol durant 5 dies. L'acoblament, tanmateix, rendeix bisadductes **25**{*x,x*} molt insolubles difícils de purificar, l'estructura dels quals ha de corroborar-se en general mitjançant l'espectroscòpia d'IR i espectrometria de masses.

S'ha confirmat la descomposició dels espaiadors **23** i **27** en el medi de reacció en disulfur **45**, fet que explica la dificultat d'acoblament d'aquells amb els carbonitrils **18**.

Pel que fa als bisadductes nitrogenats, s'han obtingut **26**{2,2} i **26**{3,3} tant per reacció de l'espaiador amb els carbonitrils **18**{2} i **18**{3}, així com per reacció *one pot*, amb rendiments i pureses mínimaments superiors amb el segon procediment.

Les reaccions dels carbonitrils amb l'espaiador monodentat **27**{*x*} s'han dut a terme en les condicions de reacció trobades com a idònies amb l'espaiador bidentat. En aquests casos, l'obtenció dels monoadductes **29**{1}, **29**{3} s'ha pogut comprovar també per <sup>1</sup>H-RMN. S'ha provat de purificar, amb moltes dificultats, els compostos d'estructures **25**{*x,x*} i **29**{*x*}, per cromatografia de capa prima preparativa.

Donada la dificultat d'obtenció de l'espaiador nitrogenat monodentat **28** i l'elevat preu del reactiu per obtenir-lo, els acoblaments amb l'espaiador nitrogenat monodentat es podrien tenir en consideració per posteriors treballs.

S'ha obtingut el compost **39-2HI**, el rendiment d'obtenció del qual s'ha millorat respecte al descrit d'un 50% a un 60% canviant les condicions de reacció.

S'ha enviat a avaluar l'activitat antiviral de **26**{3,3}, **29**{3} i **39-2HI**, cap dels quals ha presentat activitat ni citotoxicitat a la màxima concentració testada de 25 µg/ml.