



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

SÍNTESIS DE NUEVOS INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

Realizado por Juan Francisco Sanz Raya.

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica.

Trabajo Fin de Grado. Modalidad experimental.

2016.



Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia

TRABAJO FIN DE GRADO

Titulación: Grado en Farmacia.

Título del trabajo: Síntesis de nuevos inhibidores de la actividad del virus de la Hepatitis C.

Nombre del estudiante: Juan Francisco Sanz Raya.

Lugar y fecha de presentación: Facultad de Farmacia. Sala Juntas. Viernes, 8 de julio de 2016.

Departamento en el que se realiza: Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia.

Nombre de los tutores: Fernando Iglesias Guerra y José Ignacio Candela Lena.

Tipología del proyecto: Trabajo experimental.

Resumen

La realización de un estudio detallado de la virología del virus de las Hepatitis C permitió comprender por qué la proteína NS3 es una de las dianas terapéuticas más estudiadas para el diseño de fármacos antivirales de acción directa. Se trata de una proteína esencial para el desarrollo de la infección que, aunque su función principal es contribuir a la fragmentación de la poliproteína viral, cumple además otras funciones que contribuyen al desarrollo de la forma crónica de la infección, convirtiéndose en una diana terapéutica de especial interés. A partir de una revisión de distintos trabajos ya realizados en nuestro Departamento y la información consultada en artículos publicados por otros autores, se planteó de forma razonada el diseño de una pequeña quimioteca de compuestos que pudieran tener actividad significativa y se procedió a su síntesis. Se trata de distintos derivados de N-fenilureas obtenidos a partir de un derivado de 2-metilpiperazina con unas características estructurales que ya habían demostrado ser útiles para el diseño de fármacos anti-VHC. Se obtuvieron cuatro productos finales sintetizados a partir de un compuesto de partida que se había sintetizado previamente. Los distintos productos fueron obtenidos y purificados de forma adecuada y se caracterizaron mediante la medición de su punto de fusión. Aplicando técnicas de espectrometría de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y MS se comprobó que los productos obtenidos coincidían con los planteados de forma teórica. Los procedimientos realizados se contextualizaron en la situación actual, evidenciando la importancia de todo el trabajo realizado en relación con las necesidades actuales con respecto al tratamiento de la Hepatitis C, y con el objetivo que se plantea hoy en día de forma más inmediata: disminuir el coste de los tratamientos anti-VHC de acción directa. Finalmente se procedió a la medición de la actividad de los productos obtenidos.

Palabras clave: Hepatitis C, proteína NS3, antivirales de acción directa, 2-metilpiperazina.

Índice

1 – Introducción	5
1.1 - Planteamiento de la proteína no estructural 3 (NS3) como objetivo	7
1.2 – Estructura de la proteína NS3	10
1.3 – Diseño de inhibidores de la proteína NS3	11
1.4 – Antecedentes	12
2 - Objetivo	13
3 - Metodología	14
3.1 – Métodos generales	14
3.2 – Síntesis de 1-[2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetil]-3-metilpiperazina	15
3.3. Obtención de derivados de 4-[2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metilpiperazina	16
3.3.1 - Síntesis de 4-[2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metil-1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil]piperazina	16
3.3.2 - Síntesis de 4-[2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metil-1-[(4-metilfenil)aminocarbonil]piperazina	17
3.3.3 - Síntesis de 1-[(4-acetilfenil)aminocarbonil]-4-[2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metilpiperazina	18
3.3.4 - Síntesis de 4-[2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metil-1-[(4-metoxifenil)aminocarbonil]piperazina	19
3.4.- Metodología utilizada para medir la actividad inhibitoria de los productos finales sintetizados	20
4 – Resultados y discusión	21
4.1 - Síntesis química	24
4.2 – Análisis de los resultados obtenidos	25
5 – Conclusiones	26
6 - Bibliografía	28

1 – Introducción

Desde su descubrimiento en 1989 (Abdus y Akimitsu, 2013; Douam y cols., 2016; Saadeldin y Nabil, 2016), el virus de la Hepatitis C (VHC) lleva siendo objeto de estudio durante un periodo de tiempo inferior a 30 años. Pertenece a la familia *Flaviviridae*, a la que pertenecen también el virus de la *Fiebre Amarilla*, el *Dengue* y el *virus del Nilo Occidental*. Aunque compone su propio género (*Hepacivirus*), el VHC, como otros miembros de su familia, es un virus encapsulado. En el interior de su envoltura lipídica se localiza una nucleocápsida de forma icosaédrica, la cual se compone de unas proteínas que se encuentran en interacción con el genoma. Se trata de un virus de ARN de cadena simple con polaridad positiva (Malcolm y cols., 2006).

Como es característico de los virus de ARN, carece de corrección de lectura de la ARN polimerasa, lo que contribuye a una gran variedad genética (Xi-Jing y cols., 2016; Bertino y cols., 2016), que genera aproximadamente $10^{-5} - 10^{-4}$ errores/nucleótido/ciclo de replicación (Saadeldin y Nabil, 2016). Actualmente se diferencian 7 genotipos (con una divergencia aproximada del 30% de su secuencia, y denominados mediante un número del 1 al 7) y más de 90 subtipos en total (Abdus y Akimitsu, 2013) (con una divergencia del 20% de su secuencia, y denominados con una letra precedida por el número del genotipo al que pertenecen – 1a, 1b, etc.) (Scheel y Rice, 2013). Su distinción se realiza a partir de las secuencias de sus proteínas estructurales. Esta variedad genética da lugar a una distribución geográfica y una susceptibilidad al tratamiento diferentes.

Se transmite principalmente por vías parenterales a través de transfusiones sanguíneas, abuso de drogas, inyecciones contaminadas y procedimientos médicos (Saadeldin y Nabil, 2016; Dierley y cols., 2016). De forma natural, su infección solo se produce en humanos y en chimpancés y sus síntomas iniciales no son muy característicos (fiebre, orina turbia, ictericia...), pudiendo incluso cursar en algunos casos como una infección aguda asintomática que se elimina espontáneamente del organismo. Infecta aproximadamente al 3% de la población mundial, y es la causa de 350 000 muertes en todo el mundo cada año, siendo considerada una de las principales causas de fallo hepático, cáncer hepatocelular y trasplantes de hígado. Actualmente se considera uno de los mayores problemas de salud (Maan y van der Meer, 2016).

Hasta 2011, el tratamiento del VHC se basaba en la administración conjunta de PEG-interferón α (PEG-INF α) y ribavirina (Xi-Jing y cols., 2016; Bertino y cols., 2016; McGivern y cols., 2015). Aunque su mecanismo no está del todo esclarecido, se piensa que PEG-INF α induce un alto número de genes (denominados *IFN-stimulated genes*) con propiedades antivirales, desencadenando múltiples mecanismos inespecíficos de ataque sobre el virus; mientras que ribavirina es un análogo de guanosina con actividad contra diversos virus tanto de ARN como de ADN, cuyo mecanismo más aceptado es una inhibición de la ARN polimerasa-ARN dependiente vírica (Maan y van der Meer, 2016; Dierley y cols., 2016). Esta combinación normalmente se asocia a la producción de muchos efectos adversos, como síntomas gripales, depresión y citopenias, lo que constituía un gran problema para los pacientes, ya que, además, la terapia tenía baja probabilidad de producir una respuesta antiviral adecuada (Zhang, 2016). Por ello, como parte del tratamiento, era especialmente importante la terapia psicológica para evitar el incumplimiento o abandono terapéutico.

El éxito conseguido en el desarrollo de inhibidores de la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) inició el desarrollo de los primeros antivirales de acción directa contra el VHC (Xi-Jing y cols., 2016). Se trataba de pequeñas moléculas (McGivern y cols., 2015) que actuaban directamente sobre proteínas virales esenciales para el desarrollo de la infección (Noell y cols., 2015; Zhang, 2016; Bertino y cols., 2016; McGivern y cols., 2015). Así, en 2011, boceprevir y teleprevir fueron los primeros antivirales de acción directa introducidos en la terapia anti-VHC; y, desde 2014, diversos antivirales directos (sofosbuvir, simeprevir, daclatasvir, etc.) han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) y la EMA (*European Medicines Agency*) (González-Grande y cols., 2016). En un comunicado reciente, la Sociedad Española de Patologías Digestivas (SEPD) asegura que alrededor de 51 000 enfermos de Hepatitis C ya han recibido los nuevos medicamentos antivirales de acción directa en España (dato recogido por la edición digital de 20Minutos del 11 de abril de 2016).

Los tratamientos más eficaces actuales consisten en la combinación de PEG-INF α o ribavirina en terapias dobles o triples con antivirales directos. En la búsqueda de la optimización del tratamiento, el objetivo actual en investigación es una terapia que permita la exclusión de PEG-INF α (Maan y van der Meer, 2016; Tamori y cols., 2016; González-Grande y cols., 2016; Noell y cols., 2015). Cada una de estas modificaciones en la elección de tratamiento ha venido acompañada de una manera más profunda de entender determinados aspectos de su virología.

1.1 - Planteamiento de la proteína no estructural 3 (NS3) como objetivo

De acuerdo con el conocimiento actual, el VHC se transmite principalmente a través de sangre, e inicia su ciclo en un nuevo hospedador una vez que alcanza su liberación al torrente sanguíneo. En su circulación, inmediatamente se asocia con componentes de LDL (*Low Density Lipoprotein*) y VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) y se estructura como una partícula lipoviral con forma circular, quedando en su superficie las glicoproteínas de la envoltura y en su interior la nucleocápsida en un ambiente hidrófobo. La nucleocápsida tiene forma icosaédrica y se compone de unas proteínas denominadas en la bibliografía *core proteins* que interactúan con el ARN genómico viral.

Una vez que la lipopartícula viral llega a la superficie del hepatocito, se producen una sucesión de interacciones que culminan con su endocitosis. Interacciona primero de forma inespecífica con glicosaminoglicanos y receptores de LDL (denominados *syndecans*), seguido de la unión a receptores más específicos incluidos el SR-B1 (*Scavenger Receptor B1*) y la proteína TST CD81 (*Tetraspanin Protein CD81*) (Scheel y Rice, 2013; Xi-Jing y cols., 2016). El complejo formado por la lipopartícula viral y estos factores de entrada migra hacia las zonas de unión celular entre los hepatocitos (uniones de tipo *tight junctions* o uniones estrechas), donde establece otras interacciones con las proteínas claudina 1 y ocludina, que permiten su entrada en la célula por endocitosis mediada por unión a clatrina (Scheel y Rice, 2013; Xi-Jing y cols., 2016).

Tras su liberación en el citosol, la vesícula envuelta en clatrina se une a la proteína motor dineína, que la transporta sobre los microtúbulos para llegar al área del retículo endoplásmico. Aquí, se produce una acidificación de la superficie de la vesícula, que se piensa que es permitida por una interacción entre CD81 y E2 que hace posible su activación en medio ácido (Scheel y Rice, 2013). Esta acidificación induce cambios conformacionales de las glicoproteínas de la envoltura viral, que hacen que interactúen con la membrana endosomal, llevando a la fusión de las membranas viral y endosomal (Xi-Jing y cols., 2016). Esta fusión es seguida de la liberación por la nucleocápsida del ARN genómico desnudo al citosol. Se trata de una cadena de 9600 nucleótidos de longitud, que contiene una región no traducible-5' (*5'-NTR*) que constituye el sitio de unión al ribosoma (*internal ribosome entry site, IRES*) (Abdus y Akimitsu, 2013; Saadeldin y Nabil, 2016)

La unión de las subunidades de un ribosoma al ARN vírico es el punto de partida de la traducción de una única poliproteína. Una secuencia señal, localizada al comienzo de la

poliproteína traducida, permite al ribosoma ser captado por un translocón sobre la membrana del retículo endoplásmico. La traducción puede así seguir adelante, dando lugar a una poliproteína de una longitud aproximada de 3000 aminoácidos, que es escindida por proteasas celulares y virales en diez proteínas maduras (Zhang, 2016), que quedan sobre la membrana del retículo endoplásmico. La cadena peptídica inicia su separación en proteínas individuales a partir de un extremo, por acción de proteasas celulares, originando en primer lugar y de forma sucesiva las proteínas estructurales, que se corresponden con la proteína *core* y las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2. Estas proteínas son las que formarán la partícula viral; a continuación, son escindidas p7 (Xi-Jing y cols., 2016) y NS2, que son requeridas para la liberación de las partículas virales tras la replicación (Maan y van der Meer, 2016; Douam y cols., 2016); hasta este punto, la fragmentación de la poliproteína tiene lugar por acción de proteasas celulares, pero a continuación la proteína NS3, junto a su cofactor NS4A, da lugar a su propio origen, así como al de las proteínas no estructurales que forman el complejo de replicación gracias a su actividad autoproteasa (Bertino y cols., 2016) y serin-proteasa: NS3/4A, NS4B, NS5A y NS5B, encargadas de la replicación del ARN viral; otra pequeña proteína codificada es denominada F (*frame shift*) o ARFP (*Alternative Reading Frame Protein*), pero su función es aún desconocida (Abdus y Akimitsu, 2013; Maan y van der Meer, 2016)

Las proteínas de replicación del VHC, junto a otros factores celulares, inducen una reorganización de la membrana del retículo endoplásmico, recubriéndose a ellas mismas mediante una envaginación en forma de vesícula de doble membrana. Estas vesículas se agrupan formando un área denominada *membranous web* (o red membranosa), que representa el lugar de replicación del ARN viral (Scheel y Rice, 2013). El proceso de replicación es catalizado por la actividad ARN polimerasa-ARN dependientes de NS5B, que actúa junto con otras proteínas no estructurales (NS3/4A, NS4B, NS5A), así como varios factores celulares. Un paso esencial para la síntesis de ARN es su interacción con la proteína ciclofilina A de la célula hospedadora para formar el complejo de replicación (Scheel y Rice, 2013). Tras la síntesis de una doble cadena de ARN intermediaria, la cadena negativa es utilizada como modelo para generar múltiples cadenas de ARN positivas (Dierley y cols., 2016), que serán utilizadas para traducción y replicación o empaquetadas para formar las nuevas nucleocápsidas (Bertino y cols., 2016). La constante proliferación de copias de ARN viral continúa en una tasa diaria estimada de un billón de copias.

Se piensa que el siguiente proceso es iniciado en la superficie de los cuerpos lipídicos, que constituyen una diana para las proteínas de la nucleocápsida. Se asume que una red de proteínas NS5A deposita el ARN viral en las proteínas *core* para su ensamblado en

nucleocápsidas. Las nucleocápsidas se recubren a continuación de una membrana derivada del retículo endoplásmico en una zona donde E1 y E2 se acumulan junto con p7, NS2 y factores celulares (incluyendo ApoE). E1, E2 y ApoE quedan entonces en el exterior de esta membrana, mientras que p7 y NS2 se piensa que permiten un proceso de gemación (que parece pertenecer a la maquinaria de síntesis de las VLDL) que da lugar a la lipopartícula viral final, la cual queda libre en el citoplasma. Finalmente, las lipopartículas son transportadas a la superficie celular en vesículas por mecanismos de secreción celular y liberadas de la célula por exocitosis para llegar al torrente sanguíneo. Además, en el hígado, es probable que ocurra una transmisión directa del virus de célula a célula (Xi-Jing y cols., 2016), lo cual daría sentido a la dificultad para su neutralización (Scheel y Rice, 2013).

A partir de esta visión global del ciclo del virus, se hace evidente que la proteína NS3 haya sido considerada como una diana terapéutica clave (McGivern y cols., 2015) para el desarrollo de fármacos antivirales. No solo por su contribución a la escisión de la poliproteína viral para dar lugar a los componentes de replicación, sino también porque desempeña una función de alteración de la señalización antiviral celular, que contribuye al desarrollo de la forma crónica de la infección (Douam y cols., 2016; McGivern y cols., 2015). En concreto, fragmenta las proteínas de señalización antiviral mitocondrial MAVS (*Mitochondrial Antiviral Signaling Protein*) y TRIF (*Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β*) para evadir la respuesta de la inmunidad innata por bloqueo de la activación de la expresión de los genes codificadores de interferones a través de las vías del gen inducido por ácido retinoico 1 (RIG-1) y del receptor tipo Toll 3 (TLR3), un mecanismo explicado con detalle por Xiao-Dong Li y cols. (Li y cols., 2005). Además, McGivern y cols. asignan a la proteasa NS3 un papel primordial durante el ensamblado o maduración de la partícula viral por un mecanismo que todavía se desconoce (McGivern y cols., 2015). Todo ello convierte a esta proteína en una diana terapéutica especialmente atractiva para el desarrollo de fármacos antivirales de acción directa.

La multifunción señalada de esta proteína no es sorprendente. Dado que las proteínas no estructurales del VHC son las encargadas de coordinar el ciclo completo del virus, es evidente que muchas de ellas deben ser multifuncionales para ser capaces de dar lugar a la complejidad de sus diferentes etapas. Esto por tanto debe ser considerado a la hora de diseñar nuevos antivirales de acción directa, ya que puede ser una forma de atacar al virus en diferentes puntos clave del desarrollo de la infección. Sobre esta idea trabajan en la actualidad investigadores como McGivern y cols. (McGivern y cols., 2015) utilizando técnicas de ensayo-múltiple para examinar el ciclo del virus con detalle.

1.2 – Estructura de la proteína NS3

Aunque la actividad proteasa ha sido el principal foco del desarrollo de los actuales antivirales diseñados para la inhibición de la proteína NS3, se trata de una proteína bifuncional, con un dominio proteasa N-terminal y un dominio helicasa C-terminal diferenciados y conectados por un dominio de enlace (Kolhway y cols., 2014), denominado en la bibliografía *flexible linker* (unión flexible), consecuencia de la función que se cree que desempeña en la regulación de la conformación de la proteína completa.

El dominio helicasa tiene actividad NTPasa y desenrollante en dirección 3'-5', es decir, ARN desenrollante ATP-dependiente 3'-5'. Esta actividad es esencial para la síntesis del ARN del VHC, y al igual que el dominio proteasa, estudios genéticos y bioquímicos han implicado el dominio NS3 helicasa en el ensamblado del virus, independientemente de su papel en la síntesis del ARN (McGivern y cols., 2015).

Los dos dominios pueden ser separados y estudiados en cuanto a su actividad enzimática de forma *in vitro* (McGivern y cols., 2015), pero su unión formando la proteína completa ha mostrado una fuerte influencia en sus propiedades individuales (Abdus y Akimitsu, 2013). Así, el dominio helicasa aislado une ADN como sustrato preferente, pero la presencia del dominio proteasa en la proteína completa altera su selectividad de sustrato e intensifica la unión y el efecto desenrollante sobre el ARN; de forma inversa, se ha demostrado que el dominio helicasa estimula la actividad proteasa en el contexto de la proteína completa.

Un estudio reciente (McGivern y cols., 2015) ha demostrado que la región de unión que conecta los dos dominios no se requiere para las funciones helicasa o proteasa, pero tiene una importancia crítica para la replicación e infectividad. Los datos obtenidos le asignan un papel tanto en la modulación de la conformación de la proteína completa como en la mediación de interacciones entre NS3 y otras proteínas virales o celulares durante el ciclo viral. De hecho, se identificó una nueva clase de inhibidor alostérico helicasa/proteasa, utilizando unas técnicas que en la bibliografía se denominan *fragment-based screening* y *structure-guided design*, que se une en la interfaz de los dominios helicasa y proteasa de NS3 a una región que se ha propuesto como moduladora de las actividades de los dos dominios de la enzima *in vivo*.

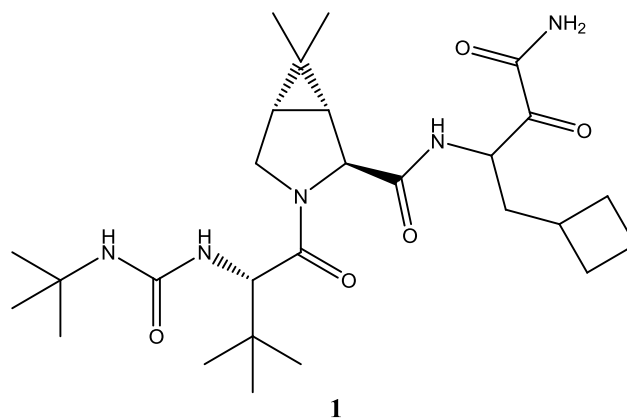
1.3 – Diseño de inhibidores de la proteína NS3

A pesar del conocimiento de las dos principales actividades que presenta la proteína NS3, los fármacos que inhiben el dominio proteasa han alcanzado un desarrollo mucho más avanzado. La estructura de la helicasa NS3 ha sido bien caracterizada, pero el desarrollo conseguido de sus inhibidores ha sido menor y de forma más lenta (Abdus y Akimitsu, 2013).

La helicasa NS3 es una diana más compleja de alcanzar, como se evidencia por el hecho de que ningún inhibidor de helicasa ha sido aprobado para su uso clínico hasta el momento. El principal responsable es su toxicidad (Abdus y Akimitsu, 2013), ya que su actividad NTPasa, es común a muchas otras proteínas celulares. Por ello, la búsqueda de inhibidores debe centrarse en su unión a sitios no conservados en las enzimas celulares, para evitar así la alteración de las actividades ATPasa y GTPasa celulares.

En cuanto al dominio proteasa, tras su identificación en 1993, la primera determinación de su estructura atómica en 1996 (Malcolm y cols., 2006) reveló que se trata de una serin-proteasa de estructura tipo barril- β que contiene una hendidura polidentada de unión a sustrato que genera su especificidad, en la que la interacción enzima-sustrato se produce por puentes de hidrógeno, y se complementa por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas. Se procedió entonces a la identificación de un inhibidor basado en su mecanismo de acción a partir de péptidos naturales, una estrategia con precedentes en la literatura para el desarrollo de inhibidores potentes y selectivos de serin-proteasas.

Tras estudiar diversas moléculas electrofílicas con escaso éxito, a partir del análisis de la fragmentación de la unión NS5A-NS5B por la proteasa NS3 finalmente se identificó una potente α -cetoamida que presentaba una cinética de inhibición de unión lenta, descrita con detalle por B. A. Malcolm (Malcolm y cols., 2006), que sugería la verdadera inhibición basada en su mecanismo de acción: un ataque nucleofílico por el grupo hidroxilo de la serina del sitio activo. Este primer inhibidor proporcionó el punto de partida para un proceso de diseño prolongado en el tiempo, el cual, tras diversas modificaciones dio lugar a un actual candidato terapéutico, boceprevir (**1**).

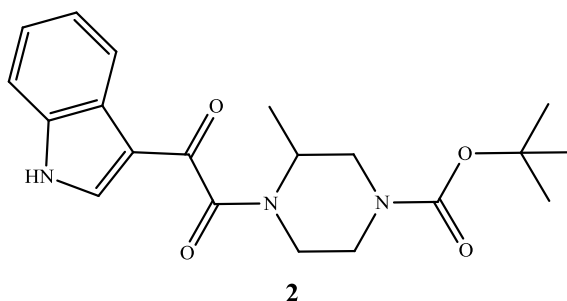


El análisis de su cinética (Malcolm y cols., 2006) concluyó que se trataba de una inhibición reversible, que suprime la actividad proteolítica y previene la formación de nuevos replisomas, dando lugar a una disminución de la carga de ARN viral en el citoplasma.

A partir de aquí, y hasta hoy, una de las vías más estudiadas en la lucha contra el VHC es la optimización de la estructura del boceprevir, en las que se mantiene el grupo α -cetoamida necesario en ella para la inhibición de la proteasa.

1.4 – Antecedentes

Este trabajo se engloba en una línea de investigación que se desarrolla actualmente en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, el diseño y síntesis de nuevos compuestos que puedan ser candidatos a presentar actividad anti-VHC de acción directa. La síntesis en el Departamento de una quimioteca de compuestos que tenían como núcleo la 2-metilpiperazina arrojó como resultado que un compuesto con la estructura **2**, logró una inhibición de la proteasa NS3/NS4A del 70%.



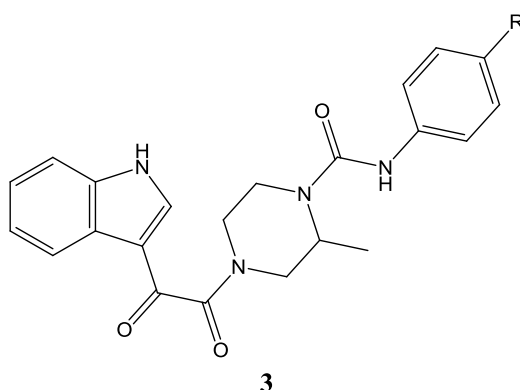
Este y otros experimentos anteriores demuestran la utilidad del núcleo de 2-metilpiperazina para diseñar y sintetizar compuestos en los que un grupo α -cetoamida es introducido en la molécula mediante una reacción de acilación con cloruro de 2-(1*H*-indol-3-il)-

2-oxoacetilo; por otro lado, algunos trabajos ya realizados postulan que compuestos con estructuras de tipo urea contribuyen a la inhibición de la proteasa NS3. Esto último es también apoyado por otros autores, que estudian la inhibición de la proteasa NS3 por compuestos con estructuras tipo urea o tiourea (Yang y cols., 2013; Li y cols., 2012; Kazmierski y cols., 2012; Bogen y cols., 2010; Chen y cols., 2009; Vendeville y cols., 2008).

Tras un estudio de los distintos aspectos desarrollados sobre el conocimiento actual del virus de la Hepatitis C y las dos consideraciones anteriores sobre los trabajos consultados, se procede al desarrollo de este Trabajo Fin de Grado experimental.

2 - Objetivo

Este Trabajo Fin de Grado se ha iniciado con una exhaustiva revisión bibliográfica con el propósito de entender por qué la proteasa NS3 es una de las dianas más estudiadas y ensayadas del VHC para, a partir de ahí, contribuir en la búsqueda de nuevos inhibidores. Siguiendo en la misma línea de investigación mencionada anteriormente de nuestro grupo trabajo del Departamento, el objetivo de este trabajo experimental sigue siendo diversificar el número y tipo de compuestos disponibles que puedan ser utilizados para ensayar actividad anti-VHC de acción directa por inhibición de la proteasa NS3/4A. En concreto, este trabajo experimental centra su objetivo en el estudio de derivados de 2-metilpiperazina, en el que el nitrógeno en posición 4 es el que contiene el grupo α -cetoamida en forma de radical 2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetilo unido formando un enlace tipo amida; y el nitrógeno en posición 1 es utilizado para introducir un grupo urea en la molécula con derivados de fenilisocianato (**3**).



Se ha conseguido así generar nuevas variables de diversidad estructural de este tipo de compuestos, como la influencia de la orientación del núcleo de 2-metilpiperazina, cuando es el nitrógeno en posición 4 el que forma el grupo α -cetoamida; la influencia de la formación de

dicho grupo a partir de un derivado de indol; y de la influencia de la formación de un grupo urea en el nitrógeno en posición 1 a partir de diferentes derivados de fenilisocianato.

El objetivo final perseguido, el cual aún no ha sido concluido, es diseñar compuestos que puedan tener actividad directa significativa, y que puedan ser sintetizados a partir de productos comerciales mediante una ruta sintética sencilla y con altos rendimientos. Tomando como referencia que actualmente se dispone de combinaciones de fármacos que alcanzan una inhibición de la proteasa superior al 90%, nuevas investigaciones de este tipo serán requeridas para optimizar las estructuras para las que se obtengan resultados positivos. De esta forma, se contribuye al principal objetivo actual de la lucha contra el VHC: disminuir el coste de los fármacos de acción directa, ya que, actualmente, su alto coste hace que estos tratamientos sean inaccesibles para la mayoría de pacientes en todo el mundo, e incluso en los países más desarrollados se considera necesario priorizar los tratamientos con estos fármacos para limitar su impacto inmediato en los presupuestos de salud (Maan y van der Meer, 2016).

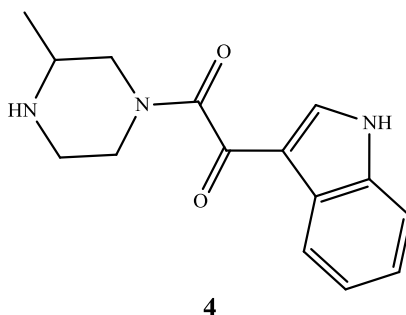
3 - Metodología

3.1 – Métodos generales

Para los procesos de síntesis, todos los reactivos, disolventes y materiales de partida necesarios fueron obtenidos a partir de proveedores comerciales y utilizados sin purificar; las evaporaciones realizadas fueron efectuadas en rotavapor, a presión reducida y a temperatura entre 37 y 39°C; las reacciones fueron monitorizadas por cromatografía en capa fina (CCF), en soportes de aluminio Kieselgel 60 F254 (E. Merck), utilizándose detector UV para su visualización y ácido fosfomolibdico como revelador; las purificaciones fueron realizadas mediante cromatografía de columna (CC), utilizando Sílica Gel 60 (E. Merck); y los rendimientos obtenidos proceden de los productos una vez purificados.

Para la caracterización de los compuestos obtenidos, los puntos de fusión fueron medidos en un Aparato Stuart Melting Point SMP 10; los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) fueron realizados a 25°C en el Servicio de Resonancia Magnética Nuclear del CITIUS, con un espectrómetro Bruker AV500, a 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C ; los Espectros de Masa (MS) fueron realizados en el Servicio de Espectrometría de Masas del CITIUS con un espectrómetro Orbitrap ELITE: Espectrómetro de masas híbrido de trampa iónica-orbitrap capaz de adquirir con resolución superior a 240000, con fuentes de ionización ESI, APCI y nanoESI.

3.2 – Síntesis de 1-[2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetil]-3-metilpiperazina

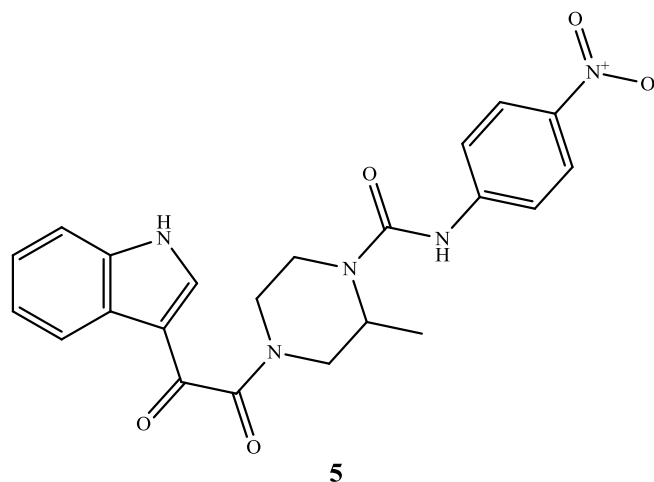


Sobre una disolución de 2-metilpiperazina (0,5 g; 5,0 mmol) en diclorometano (170 mL) enfriada a 0°C, se añadió gota a gota una disolución del cloruro de 2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetilo (1,0 g; 5,0 mmol) y piridina (0,8 mL; 10,0 mmol) en diclorometano (30 mL). Una vez terminada la adición, se dejó reaccionar hasta que la CCF indicó que todo el producto de partida había reaccionado. Se procesó el producto obtenido evaporando el disolvente en rotavapor y se purificó por CC (el eluyente utilizado fue AcOEt-Hexano 3:1). Se obtuvieron 596 mg (2,2 mmol) de **4** como un producto sólido ligeramente anaranjado. El rendimiento del proceso fue de 43,9%.

El punto de fusión obtenido para este compuesto fue de 134-135°C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): 10.2 (sa, 1H, NH), 8.3 (m, 1H, Ar-H), 7.7 (d, 1H, *J*=2.7 Hz, Ar-H), 7.4-7.2 (m, 3H, Ar-H), 4.5 (m, 1H, piperazina-H), 3.7 (m, 1H, piperazina-H), 3.2-2.7 (m, 5H, piperazina-H), 2.5 (d, 1H, *J*=12.8 Hz), 1.1 (d, 3H, *J*=6.3 Hz, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, δ ppm): 185.8, 166.4, 136.7, 135.6, 125.1, 124.3, 123.3, 121.9, 114.5, 112.1, 53.3, 50.7, 46.2, 41.8, 19.5. HRMS (ESI⁺) calculado para C₁₅H₁₈O₂N₃ (M+H) 272.1394; encontrado, 272.1388.

3.3. Obtención de derivados de 4-[2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metilpiperazina

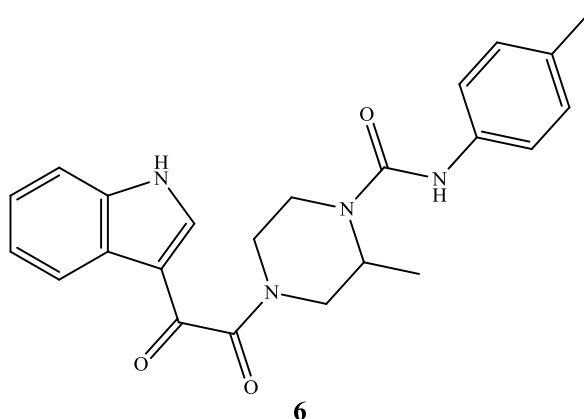
3.3.1 - Síntesis de 4-[2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metil-1-[(4-nitrofenil)aminocarbonil]piperazina



Sobre una disolución de **4** (80 mg; 0,3 mmol) en diclorometano (10 mL) en agitación y a temperatura ambiente se añadió 4-nitrofenilisocianato (72,7 mg; 0,4 mmol) y se dejó reaccionar hasta que la CCF indicó que todo el producto de partida había reaccionado. Se procesó el producto obtenido evaporando el disolvente en rotavapor y se purificó mediante CC (el eluyente utilizado fue AcOEt-Hexano 3:1). Se obtuvieron 125 mg (0,3 mmol) de **5** en forma de sólido amarillento. El rendimiento del proceso fue 97,3%.

El punto de fusión obtenido para este compuesto fue de 141-142°C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): 12.3 (s, 1H, NH), 9.2 (s, 1H, Ar-H), 8.3-8.1 (m, 4H, Ar-H), 7.7 (m, 2H, Ar-H), 7.5 (m, 1H, Ar-H), 7.3 (m, 2H, Ar-H), 4.6-2.9 (m, 7H, piperazina-H), 1.2 (d, 3H, *J*=6.7 Hz, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, ppm): 185.7, 166.6, 153.9, 147.3, 140.9, 137.4, 136.9, 126.3, 124.6 (2C), 123.6, 122.6, 120.9, 118.5 (2C), 113.1, 112.6, 49.3, 46.3, 40.4, 38.8, 14.8. HRMS (ESI⁺) calculado para C₂₂H₂₁O₅N₅Na (M+Na) 458.1435; encontrado, 458.1423.

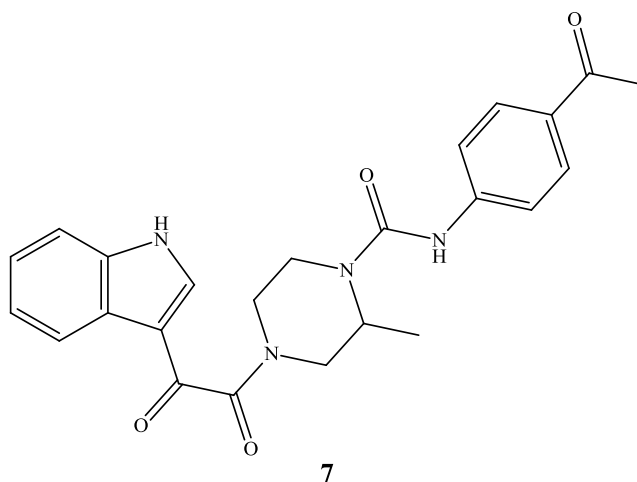
3.3.2 - Síntesis de 4-[2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metil-1-[(4-metilfenil)aminocarbonil]piperazina



Sobre una disolución de **4** (80mg; 0,3 mmol) en diclorometano (10 mL) en agitación y a temperatura ambiente, se añadió 4-metilfenilisocianato (59,0 mg; 0,4 mmol) y se dejó reaccionar hasta que la CCF indicó que la reacción había terminado. Se procesó el producto obtenido evaporando el disolvente en rotavapor y se purificó mediante CC (el eluyente utilizado fue AcOEt-Hexano 3:1). Se obtuvieron 113 mg (0,3 mmol) de **6**, con aspecto de sólido de color amarillo. El rendimiento del proceso fue del 94,9%.

El punto de fusión obtenido para este compuesto fue de 139-140°C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): 12.3 (s, 1H, NH), 8.4 (d, 1H, *J*=2.2 Hz, NH), 8.2 (d, 1H, *J*=2.9 Hz, Ar-H), 8.1 (t, 1H, *J*= 7.6 Hz, Ar-H), 7.6-7.5 (m, 1H, Ar-H), 7.3-7.2 (m, 4H, Ar-H), 7.0 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, Ar-H), 4.6-2.9 (m, 7H, piperazina-H), 2.2 (s, 3H, CH₃-Ar), 1.1 (d, 3H, *J*=6.7 Hz, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, ppm): 185.8, 166.6, 154.8, 137.7, 137.4, 136.9, 130.7, 128.6 (2C), 124.9, 123.6, 122.5, 120.9, 120.0 (2C), 183.1, 112.6, 49.4, 46.1, 40.5, 38.5, 20.3, 14.7. HRMS (ESI⁺) calculado para C₂₃H₂₄O₃N₄Na (M+Na) 427.1741; encontrado, 427.1728.

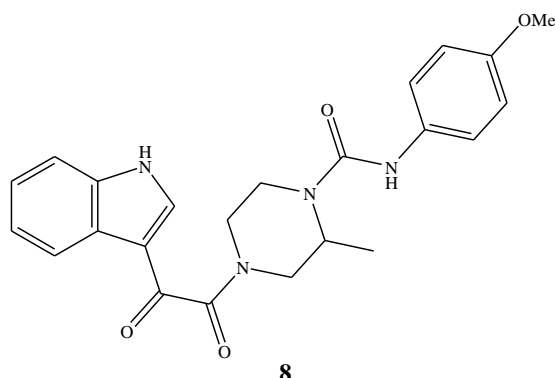
3.3.3 - Síntesis de 1-[(4-acetilfenil)aminocarbonil]-4-[2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metilpiperazina



Sobre una disolución de **4** (100mg; 0,4 mmol) en diclorometano (10 mL) en agitación y a temperatura ambiente se añadió 4-acetilfenilisocianato (89,2mg; 0,6 mmol) y se dejó reaccionar hasta que la CCF indicó que la reacción había terminado. Se procesó el producto obtenido evaporando el disolvente en rotavapor y se purificó mediante CC (el eluyente utilizado fue AcOEt-Hexano 3:1). Se obtuvieron 130 mg (0,3 mmol) de **7**, con aspecto de sólido de color verde. El rendimiento del proceso fue del 81,6%.

El punto de fusión obtenido para este compuesto fue de 139-140°C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): 12.3 (s, 1H, NH), 9.0 [s (1H, NH)], 8.2 (s, 1H, Ar-H), 8.1 (t, 1H, *J*=7.1 Hz, Ar-H), 7.9 (d, 2H, *J*=8.9 Hz, Ar-H), 7.6 (d, 2H, *J*=8.9 Hz, Ar-H), 7.5 (m, 1H, Ar-H), 7.3 (m, 2H, Ar-H), 4.7-2.9 (m, 7H, piperazina-H), 2.5 (s, 3H, CH₃CO), 1.1 (d, 3H, *J*=6.7 Hz, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, ppm): 196.3, 185.8, 166.6, 154.2, 151.8, 145.2, 143.9, 137.0, 129.4 (2C), 124.9, 123.6, 122.6, 121.0, 117.4 (2C), 113.1, 112.6, 49.3, 46.2, 40.5, 38.7, 26.3, 14.8. HRMS (ESI⁺) calculado para C₂₄H₂₄O₄N₄Na (M+Na) 455.1690; encontrado, 455.1678.

3.3.4 - Síntesis de 4-[2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetil]-2-metil-1-[(4-metoxifenil)aminocarbonil]piperazina



Sobre una disolución de **4** (92 mg; 0,3 mmol) en diclorometano (10 mL) en agitación y a temperatura ambiente se añadió 4-metoxifenilisocianato (75,9 mg; 0,5 mmol) y se dejó reaccionar hasta que la CCF indicó que la reacción había terminado. Se procesó el producto obtenido evaporando el disolvente en rotavapor y se purificó mediante CC (el eluyente utilizado fue AcOEt). Se obtuvieron 110 mg (0,3 mmol) de **8**, con aspecto de sólido de color blanco. El rendimiento del proceso fue del 77,3%.

El punto de fusión obtenido para este compuesto fue de 136-137°C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): 12.3 (s, 1H, NH), 8.4 (s, 1H, NH), 8.2 (s, 1H, Ar-H), 8.1 (t, 1H, *J*=7.5 Hz, Ar-H), 7.5 (m, 1H, Ar-H), 7.3-7.2 (m, 4H, Ar-H), 6.8 (d, 2H, *J*=9.1 Hz, Ar-H), 4.6-2.9 (m, 7H, piperazina-H), 3.7 (s, 3H, CH₃O), 1.1 (d, 3H, *J*=6.7 Hz, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, ppm): 185.8, 166.5, 154.6, 137.4, 136.8, 133.2, 124.9, 123.6, 122.5, 121.8 (2C), 120.9, 119.8, 113.5 (2C), 113.1, 112.6, 55.1, 49.4, 45.9, 40.5, 38.4, 14.7. HRMS (ESI⁺) calculado para C₂₃H₂₄O₄N₄Na 443.1690; encontrado, 443.1678.

3.4.- Metodología utilizada para medir la actividad inhibitoria de los productos finales sintetizados

El procedimiento se realizará utilizando SensoLyte® 520 HCV Protease Assay Kit *Fluorimetric*; y VHC-proteasa NS3/4A recombinante altamente activa (NCBI Accession: AF054247, compuesta de 216 aminoácidos (22,7 kDa) con dominio proteasa NS3 y un fragmento de la proteína NS4A fusionada a su extremo N-terminal) (Cat#61017) y utilizando el siguiente protocolo:

Se toma una concentración de 10 µM de cada inhibidor sintetizado, diluido previamente en DMSO. El buffer de reacción debe contener 1M de ditioneitol (DTT); y el volumen de reacción es de 50 µl.

En una placa oscura para lectura de fluorescencia, se añade el buffer de reacción junto al inhibidor y la enzima (10 ng) en un volumen final de 25 µl. Se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos, tras los cuales, se añade el sustrato de reacción y se agita durante 60 segundos. Por último, se procede a medir la fluorescencia durante 1 hora, cada 5 minutos (λ emisión/ excitación: 490/520 nm).

Esta metodología será llevada a cabo en el Hospital Virgen de Valme por un equipo de médicos investigadores de enfermedades infecciosas.

4 – Resultados y discusión

En la actualidad, como afirman muchos autores a los que ya se ha hecho referencia, los tratamientos antivirales contra el VHC han experimentado una destacable revolución (Bertino y cols., 2016; Lam y cols., 2015), de forma que han conseguido un primer objetivo que se planteaba hasta 2011: conseguir erradicar la infección del organismo, incluso en los casos en los que la infección ya había entrado en su fase crónica (Kanda y cols., 2014). Actualmente existen guías de tratamiento de la infección, como la Guía de terapéutica antimicrobiana de Barcelona o la Guía de práctica clínica para el tratamiento de la Hepatitis C de la KALS (*Korean Association for the Study of the Liver*), en las que se recogen distintas combinaciones y pautas de tratamiento que utilizan fármacos de acción tanto directa como indirecta para el manejo de las distintas variables de la infección (distintos genotipos, con distinto estado de avance de la infección, en pacientes con distintas características o con determinadas complicaciones, co-infección con VIH, etc.) hasta el punto en que hoy en día podemos considerar que empieza a ser posible la erradicación de la infección. De hecho, así se publica en medios de comunicación actuales, según los cuales la lucha contra la Hepatitis C está prácticamente ganada gracias a Sovaldi (sofosbuvir), un medicamento comercializado desde 2013 para el que se han desarrollado pautas de administración que, en combinación con otros tratamientos (**tabla 1**), cura los siete genotipos del virus en el 90% de los pacientes por inhibición de la polimerasa NS5B (información recogida por la edición digital de 20Minutos del 19 de mayo del 2016) (**tabla 2**).

Sin embargo, siguiendo con información de la actualidad, este mismo medicamento protagoniza también noticias sobre lo que se considera como el principal problema actual. Según el informe 'Hepatitis C: el nuevo campo de batalla por el acceso a medicamentos esenciales', la segunda publicación de la serie *Innovación y acceso a medicamentos esenciales*, la producción de sofosbuvir para un tratamiento de tres meses costaría 101 dólares. El documento analiza el debate sobre el acceso a los medicamentos contra la Hepatitis C, tras la polémica generada por el elevado coste de Sovaldi, que en Estados Unidos multiplica por 832 su precio de coste, y en España es 277,5 veces mayor (información recogida por la edición digital de EIMundo del 19 de mayo de 2016).

Quedan por tanto muchos problemas por resolver y que tienen gran importancia en relación con los tratamientos actuales: reducir los efectos adversos que estos fármacos normalmente ocasionan. Anemia, insomnio, cefaleas, fatiga, irritabilidad y aumento de bilirrubina en sangre son producidos de forma muy frecuente (Zhang, 2016); conseguir

tratamientos que permitan excluir el uso de PEG-INF α y ribavirina (Abdus y Akimitsu, 2013); 130-150 millones de personas siguen infectadas en todo el mundo en la actualidad, y no todas ellas tienen acceso a tratamiento (González-Grande y cols., 2016); se necesitan avances médicos que permitan conocer los mecanismos de inducción de fallo hepático y cáncer de hígado, incluso en pacientes cuya infección ya había sido erradicada (Douam y cols., 2016; Xi-Jing y cols., 2016), y conseguir evitar su desarrollo; necesidad de modelos animales y sistemas in vitro útiles, eficaces y coste-efectivos que permitan ensayar los nuevos fármacos en investigación contra el VHC (Tamori y cols., 2016).

TIPO DE INFECCIÓN	TRATAMIENTO	DURACIÓN
Genotipos 1, 4, 5 ó 6	Sovaldi + ribavirina + PEG-INF alfa	12 semanas
	Sovaldi + ribavirina	24 semanas
Genotipo 2	Sovaldi + ribavirina	12 semanas
Genotipo 3	Sovaldi + ribavirina + PEG-INF alfa	12 semanas
	Sovaldi + ribavirina	24 semanas
En espera de trasplante hepático	Sovaldi + ribavirina	Hasta el trasplante hepático

Tabla 1. Medicamento(s) recomendado(s) para administración concomitante y duración del tratamiento para la terapia combinada con Sovaldi.

	Tasa SVR-12*
Genotipo	
Genotipo 1	90%
Genotipo 4, 5 ó 6	97%
Cirrosis	
No	93%
Sí	80%
Raza	
Negra	87%
Blanca	91%

*Sustained virological response: porcentaje de infectados en los que la carga de ARN viral permanece indetectable 12 semanas tras cesar el tratamiento.

Tabla 2. Resultados obtenidos en un ensayo abierto de un solo grupo en el que se evaluaron 12 semanas de tratamiento con sofosbuvir en combinación con PEG-INF α 2a y ribavirina en sujetos sin ningún tratamiento previo con infección por el VHC de genotipo 1, 4, 5 ó 6. Los sujetos tratados (n = 327) tenían una mediana de edad de 54 años (intervalo: 19 a 70); el 64 % de los sujetos eran varones; el 79 % eran blancos, el 17 % negros y el 14 % hispanos o latinos; el índice de masa corporal medio era de 29 kg/m² (intervalo: 18 a 56 kg/m²); el 78 % presentaban un ARN del VHC basal mayor que 6 log₁₀ UI/ml; el 17 % tenían cirrosis; el 89 % presentaban VHC de genotipo 1 y el 11 % presentaban VHC de genotipo 4, 5 ó 6.

De todos ellos, el objetivo más inmediato considerado en la actualidad es reducir el coste de los nuevos tratamientos antivirales de acción directa. A pesar de la eficacia de estos tratamientos, la gran mayoría de pacientes infectados por el VHC no tienen acceso a ellos debido a su alto coste (Saadeldin y Nabil, 2016; González-Grande y cols., 2016; Dierley y cols., 2016; Noell y cols., 2015; Zhang, 2016).

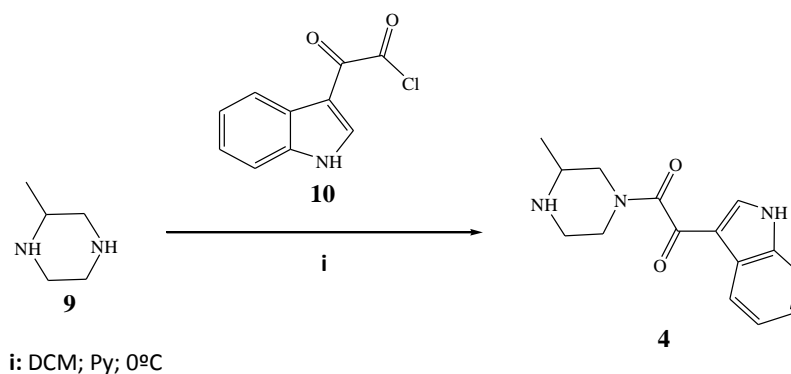
Una solución la encontramos en el desarrollo de anticuerpos coste-efectivos. Esta posibilidad se apoya en datos de un reciente estudio que ha demostrado que la administración pasiva de anticuerpos anti-E1/E2 o anti-claudina 1 puede curar la infección crónica por VHC en ratones modificados (Douam y cols., 2016). Muchas investigaciones actuales giran en torno a la prevención del VHC mediante el desarrollo de una vacuna coste-efectiva. Se trata de un reto muy exigente, dada la gran capacidad de mutación y de evasión de la respuesta inmune que presenta el VHC (la cual es diez veces mayor que en el VIH) (Abdus y Akimitsu, 2013; Saadeldin y Nabil, 2016).

Otra posibilidad, en línea al desarrollo de este trabajo, es la búsqueda de nuevos fármacos más eficaces que mantengan las características estructurales de los fármacos de referencia, pero que puedan ser sintetizados a un menor coste. Para ello, se diseñaron, sintetizaron y se caracterizaron cuatro productos finales (**5-8**). Estos cuatro productos tienen como estructura general, un *core* de 2-metil-piperazina con un grupo funcional cetoamida, presente en el Boceprevir y necesaria para inhibir la proteasa NS3.

4.1 - Síntesis química

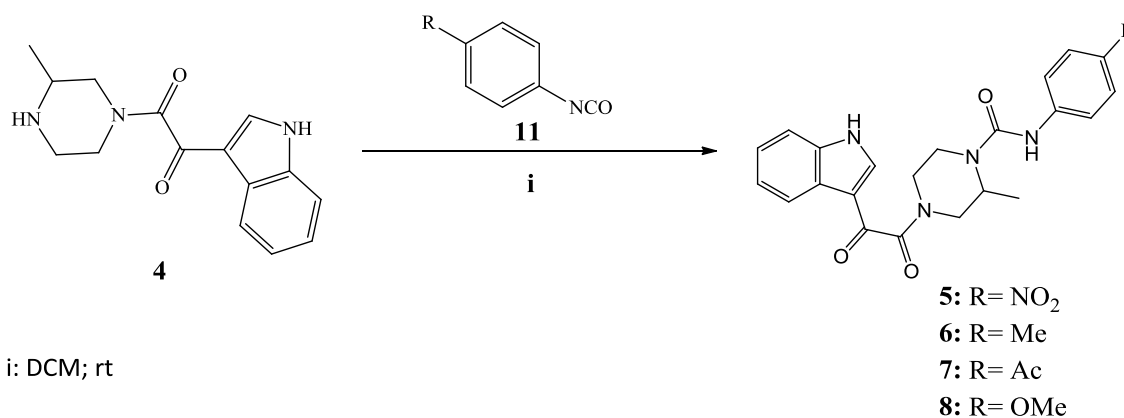
La metodología experimental consistió en la síntesis de diferentes derivados de 2-metilpiperazina con una función urea en posición 1 a partir de distintos derivados de fenilisocianatos *para*-sustituídos y una función cetoamida en posición 4. Estos procesos se basan en reacciones de acilación de los grupos amino de la molécula 2-metilpiperazina.

Para la síntesis del producto de partida **4**, la acilación se produce de forma selectiva en el nitrógeno 4 de la 2-metilpiperazina, ya que es el menos impedido estéricamente. Esta reacción se realiza a baja temperatura, y añadiendo una disolución del cloruro de 2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetilo gota a gota para favorecer la síntesis de un único producto (**Esquema 1**).



Esquema 1

La síntesis de los diferentes productos finales, consistió en la reacción de acilación del grupo amino libre con diferentes fenilisocianatos (**Esquema 2**).



Esquema 2

4.2 – Análisis de los resultados obtenidos

Las estructuras propuestas se corroboraron por los correspondientes espectros de ^1H RMN que presentan como señales características las debidas a los 7 protones del anillo de metilpiperazina entre 4,6 y 3 ppm, se aprecia en torno a 1,1 ppm la señal debida al grupo metilo del anillo de piperazina. Es de mencionar las señales encontradas entre 8,5-7,0 ppm correspondiente a los protones aromáticos del anillo de indol y de los sistemas *para*-disustituídos, así como las señales correspondientes a los protones de amina para el anillo de indol y de urea a 12 y 9 ppm respectivamente. En los espectros de ^{13}C RMN se aprecia la señal debida al grupo carbonilo de cetona del resto oxoacetil del anillo de indol a 185,8 ppm y las señales de los carbonilos de amida y urea a 166 y 154 ppm respectivamente, así como las señales correspondientes a los carbonos aromáticos entre 140 y 110 ppm, la señal debida al carbono del grupo CH del anillo de piperazina a 49 ppm y la señal debida al metilo en torno a 15 ppm. El compuesto **6** presenta además la señal correspondiente al carbono del grupo metilo aromático a 20,3 ppm. Asimismo, el compuesto **7** presenta además a 196,3 y 26,3 ppm las señales correspondiente al carbono carbonílico y al metilo del resto de metil cetona. Finalmente el compuesto **8** presenta a 55,1 ppm la señal correspondiente al carbono del metilo del grupo metoxilo.

Los resultados obtenidos de los procesos sintéticos (**Figura 1**) fueron satisfactorios, ya que los productos fueron obtenidos de forma pura y permitieron realizar las pruebas de caracterización de forma correcta.

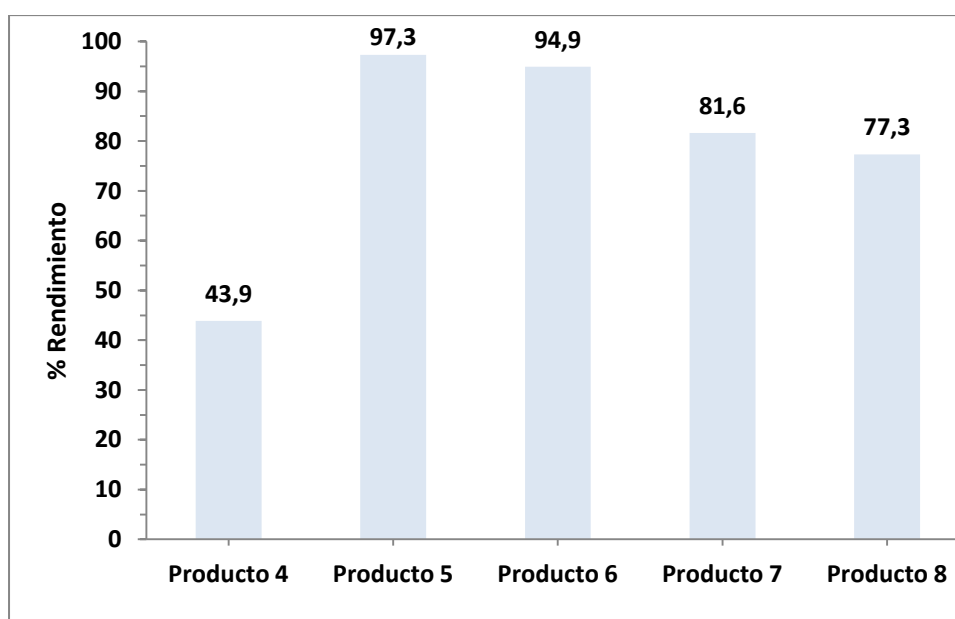


Figura 1. Resultados obtenidos de los procesos sintéticos.

El rendimiento representado para cada producto fue calculado tras la purificación del mismo. El producto **4** fue el obtenido en un rendimiento menor, debido a que procede de una reacción que daba lugar a dos productos principales, y, a pesar de las condiciones utilizadas (**Esquema 1**), fue obtenido con un rendimiento más bajo de lo esperado; los productos restantes (**5-8**) se esperaba que fueran obtenidos con alto rendimiento, ya que las reacciones de las que proceden daban lugar a un único producto. Aún así, los productos **7** y **8** se obtuvieron con un rendimiento inferior al 90%. Con una mejora de las técnicas y habilidades de trabajo en el laboratorio posiblemente se mejoren los resultados obtenidos en estos procesos.

5 – Conclusiones

En este Trabajo Fin de Grado se llevó a cabo una revisión de distintos aspectos sobre el conocimiento actual de la virología del VHC y el papel de la proteína NS3 aplicados al diseño de fármacos antivirales de acción directa, que puede resultar útil para las investigaciones que se realicen en este campo en un futuro; se completó de forma adecuada el proceso de diseño, síntesis y caracterización de cuatro compuestos (**5-8**) candidatos a presentar actividad anti-VHC de acción directa, que fueron puestos a disposición para la medición de su actividad; y se explicó la situación actual del tratamiento del VHC y los avances necesarios en los próximos años.

Actualmente Sovaldi (Sofosbuvir), considerado el fármaco más eficaz aprobado para el uso clínico, consigue una eficacia del 90% por inhibición de la polimerasa NS5B cuando se utiliza en combinación con antivirales de acción indirecta. En este trabajo se pone de manifiesto que esta eficacia también podría ser conseguida mediante la inhibición de la proteasa NS3 con compuestos de la estructura general **3** a un coste menor por la sencillez de su síntesis. Debido a la falta de tiempo no ha sido posible obtener los resultados de las pruebas biológicas de los compuestos finales sintetizados en este Trabajo Fin de Grado, pero puede resultar interesante la ampliación de este proyecto, trabajando sobre las posibles variables estructurales que presentan los compuestos sintetizados o incluso utilizando otras características estructurales que aún no hayan sido ensayadas con el fin de mejorar los resultados que se obtengan. Otras posibles extensiones de este trabajo, podrían ser realizadas con la información que proceda de nuevas investigaciones sobre las etapas del ciclo

del virus que aún no se conocen con exactitud, los avances médicos pendientes en cuanto a la prevención y el diagnóstico o con investigaciones sobre otros grupos funcionales que puedan ser utilizados en la búsqueda de actividad.

En la actualidad, prácticamente todos los factores tanto virales como celulares que participan en el desarrollo de la infección del VHC se encuentran en investigación como posibles dianas farmacológicas. Para algunos de ellos, como las proteínas virales p7 o NS2 o la proteína celular ciclofilina A, aún no se han obtenido resultados significativos. Sin embargo, esto sí se ha conseguido para otras proteínas no estructurales, dando lugar a fármacos ya comercializados como ledipasvir y ombitasvir, que actúan por inhibición de la proteína de replicación NS5A; dasabuvir y sofosbuvir, que inhiben la polimerasa NS5B; o paritaprevir, que inhibe la proteasa NS3/4A. Actualmente y en un corto periodo de tiempo se esperan obtener grandes avances en el desarrollo de inhibidores de la entrada del virus en la célula (Xi-Jing y cols., 2016) así como en el desarrollo de la primera vacuna contra el VHC (Saadeldin y Nabil, 2016). Todo ello, junto a los grandes retos que se plantean desde otros campos como la medicina o la tecnología nos llevan a pensar que en los próximos años podemos asistir a grandes avances en la lucha contra esta enfermedad.

6 - Bibliografía

- ❑ Akihiro Tamori, Masaru Enomoto, Norifumi Kawada. Recent advances in antiviral therapy for chronic Hepatitis C. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016: 6841628.
- ❑ Andrew Kolhway, Nathan Pirakitikulr, Steve C Ding, Feng Yang, Dahai Luo, Brett D Lindenbach et al. The linker region of NS3 plays a critical role in the replication and infectivity of Hepatitis C virus. *J Virol.* 2014; 88(18): 10970-4.
- ❑ B A Malcolm, R Liu, F Lahser, S Agrawal, B Belanger, N Butkiewicz et al. SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of Hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(3): 1013-20.
- ❑ Bennett C Noell, Siddesh V Besur, Andrew S deLemos. Changing the face of Hepatitis C management – the design and development of sofosbuvir. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 2367-74.
- ❑ Bhawna Poonia, Shyam Kottlilil. Newer therapeutics for Hepatitis C. *Ann Transl Med.* 2016; 4(2): 31.
- ❑ Brian P Lam, Thomas Jeffers, Zahra Younoszai, Yousef Fazel, Zobair M Younossi. The changing landscape of Hepatitis C virus therapy: focus on interferon-free treatment. *Therap Adv Gastroenterol.* 2015; 8(5): 298-312.
- ❑ David R McGivern, Takahiro Masaki, William Lovell, Chris Hamlett, Susanne Saalau-Bethell, Brent Graham. Protease inhibitors block multiple functions of the NS3/4A protease-helicase during the Hepatitis C virus life cycle. *J Virol.* 2015; 89(10): 5362-70.
- ❑ Florian Douam, Qiang Ding, Alexander Ploss. Recent advances in understanding Hepatitis C [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Res.* 2016; 5. pii: F1000 Faculty Rev-131.
- ❑ Gaetano Bertino, Annalisa Ardiri, Maria Proiti, Giuseppe Rigano, Evelise Frazzetto, Shirin Demma et al. Chronic Hepatitis C: This and the new era of treatment. *World J Hepatol.* 2016; 8(2): 92-106.
- ❑ Gerson Dierley Keppeke, S John Calise, Edward KL Chan, Luis Eduardo C Andrade. Anti-rods/rings autoantibody generation in Hepatitis C patients during interferon- α /ribavirin therapy. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(6): 1966-74.
- ❑ J Richard Thompson. Emerging therapeutic options for the management of Hepatitis C infection. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(23): 7079-88.
- ❑ Kai Lin, Robert B Perni, Ann D Kwong, Chao Lin. VX-950, a novel Hepatitis C virus (HCV) NS3-4A protease inhibitor, exhibits potent antiviral activities in HCV replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(5): 1813-22.

- ❑ Kazi Abdus Salam, Atsushi Furuta, Naohiro Noda, Satoshi Tsuneda, Yuji Sekiguchi, Atsuya Yamashita et al. PBDE: Structure-activity studies for the inhibition of Hepatitis C virus NS3 helicase. *Molecules*. 2014; 19(4): 4006-20.
- ❑ Kazi Abdus Salam, Nobuyoshi Akimitsu. Hepatitis C virus NS3 inhibitors: Current and future perspectives. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 467869.
- ❑ Kevin X. Chen, Latha Nair, Bancha Vibulbhan, Weiyang Yang, Ashok Arasappan, Stephane L. Bogen et al. Second-generation highly potent and selective inhibitors of the hepatitis C virus NS3 serine protease. *J Med Chem*. 2009; 52(5): 1370-9.
- ❑ Kouka Saadeldin Abdelwahab, Zeinab Nabil Ahmed Said. Status of Hepatitis C virus vaccination: Recent update. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(2): 862-73.
- ❑ Kristi L Berger, Ibtissem Triki, Mireille Cartier, Martin Marquis, Marie-Josée Massariol, Wulf O Bocher et al. Baseline Hepatitis C virus (HCV) NS3 polymorphisms and their impact on treatment response in clinical studies of the HCV NS3 protease inhibitor faldaprevir. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(2): 698-705.
- ❑ Neliswa A Gogela, Ming V Lin, Jessica L Wisocky, Raymond T Chung. Enhancing our understanding of current therapies for Hepatitis C virus (HCV). *Curr HIV/AIDS Rep*. 2015; 12(1): 68-78.
- ❑ Rael Maan, Adriaan J van der Meer. Recent advances in managing chronic HCV infection: focus on therapy in patients with severe liver disease [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Res*. 2016; 5. pii: F1000 Faculty Rev-367.
- ❑ Rocío González-Grande, Miguel Jiménez-Pérez, Carolina González Arjona, José Mostazo Torres. New approaches in the treatment of Hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(4): 1421-32.
- ❑ Sandrine Vendeville, Magnus Nilsson, Herman de Kock, Tse-I Lin, Dmitry Antonov, Björn Classon et al. Discovery of novel, potent and bioavailable proline-urea based macrocyclic HCV NS3/4A protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008; 18(23): 6189-93.
- ❑ Stéphane L. Bogen, Ashok Arasappan, Francisco Velázquez, Melissa Blackman, Regina Huelgas, Weidong Pan et al. Discovery of potent sulfonamide P4-capped ketoamide second generation inhibitors of hepatitis C virus NS3 serine protease with favorable pharmacokinetic profiles in preclinical species. *Bioorg Med Chem*. 2010; 18(5): 1854-65.
- ❑ Tatsuo Kanda, Osamu Yokosuka, Masao Omata. Faldaprevir for the treatment of Hepatitis C. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(3): 4985-96.
- ❑ Tatsuo Kanda, Shingo Nakamoto, Masato Nakamura, Xia Jiang, Tatsuo Miyamura, Shuang Wu et al. Direct-acting antiviral agents for the treatment of chronic Hepatitis C virus infection. *J Clin Transl Hepatol*. 2014; 2(1): 1-6.

- ❑ Troels K H Scheel, Charles M Rice. Understanding the Hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med.* 2013; 19(7): 837-49.
- ❑ Tse-I Lin, Oliver Lenz, Gregory Fanning, Thierry Verbinnen, Frédéric Delouvroy, Annick Scholliers et al. In vitro activity and preclinical profile of TMC435350, a potent Hepatitis C virus protease inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(4): 1377-85.
- ❑ Vincenzo Summa, Steven W Ludmerer, John A McCauley, Christine Fandozzi, Christine Burlein, Giuliano Claudio et al. MK-5172, a selective inhibitor of Hepatitis C virus NS3/4A protease with broad activity across genotypes and resistant variants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(8): 4161-7.
- ❑ Wengang Yang, Yongnian Sun, Xiaohong Hou, Yongsun Zhao, Joanne Fabrycki, Dawei Chen et al. ACH-806, an NS4A antagonist, inhibits hepatitis C virus replication by altering the composition of viral replication complexes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(7): 3168-77.
- ❑ Wieslaw M. Kazmierski, Robert Hamatake, Maosheng Duan, Lois L. Wright, Gary K. Smith, Richard L. Jarvest et al. Discovery of novel urea-based hepatitis C protease inhibitors with high potency against protease-inhibitor-resistant mutants. *J Med Chem.* 2012; 55(7): 3021-6.
- ❑ Xianfeng Li, Yang Liu, Yong-Kang Zhang, Jacob J. Plattner, Stephen J. Baker, Wei Bu et al. Synthesis and antiviral activity of novel HCV NS3 protease inhibitors with P4 capping groups. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012; 22(24): 7351-6.
- ❑ Xiao-Dong Li, Lijun Sun, Rashu B Seth, Gabriel Pineda, Zhijian J Chen. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(49): 17717-22.
- ❑ Xi-Jing Qian, Yong-Zhe Zhu, Ping Zhao, Zhong-Tian Qi. Entry inhibitors: New advances in HCV treatment. *Emerg Microbes Infect.* 2016; 5:e3.
- ❑ Xingquan Zhang. Direct anti-HCV agents. *Acta Pharm Sin B.* 2016; 6(1): 26-31.