

Peptidomimetici kao inhibitori HIV-proteaze

Studen, Bosiljka

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:960607>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizma

Bosiljka Studen

6544/N

PEPTIDOMIMETICI KAO INHIBITORI HIV-PROTEAZE

ZAVRŠNI RAD

Modul: Organska kemija

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2015.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Nutricionizma

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za Organsku kemiju

PEPTIDOMIMETICI KAO INHIBITORI HIV-PROTEAZE

Bosiljka Studen, 6544/N

Sažetak: *Peptidomimetici oponašaju biološku aktivnost prirodnih peptida te unapređuju njihovu selektivnost, biodostupnost i funkcionalnost, zbog čega dizajn i sinteza peptidomimetika predstavljaju važno oruđe u pronalasku lijekova. Virus humane imunodeficijencije (HIV) uzročnik je Sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS). Definiranjem strukture i mehanizma djelovanja enzima HIV-proteaze, koji je odgovoran za razvoj virusa HIV-a, dizajniran je niz peptidomimetičkih lijekova kao inhibitora HIV-proteaze. Učinkovitost lijekova prve generacije ovisi o konformaciji aktivnog mjesta enzima, te opada ukoliko dođe do mutacije virusa, što je dovelo do razvoja druge generacije lijekova koji su manje osjetljivi na mutacije virusa. Danas se aktivno radi na dizajnu cikličkih inhibitora koji imaju povećanu potentnost lijeka, poboljšana farmakokinetička svojstva i djelovanje na mutirane sojeve virusa.*

Ključne riječi: *peptidomimetici, HIV, HIV-proteaza, inhibitori HIV-proteaze, ciklički inhibitori*

Rad sadrži: 30 stranica, 23 slike, 34 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je tiskan i u elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u: knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Lidija Barišić

Rad predan: rujan 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Organic Chemistry

PEPTIDOMIMETICS AS INHIBITORS OF HIV-PROTEASE

Bosiljka Studen, 6544/N

Abstract: *Peptidomimetics mimic the biological activity of natural peptides with improved selectivity, bioavailability and functionality which makes the design and synthesis of peptidomimetics a valuable tool in finding a cure for different diseases. Human immunodeficiency virus (HIV) is the causative agent of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Design of a series of peptidomimetic drugs, inhibitors of HIV-protease, was enabled by defining the structure and mechanism of action of the HIV-protease, enzyme that is responsible for the development of the HIV virus. The efficiency of the drugs of the first-generation is dependent on the conformation of the active site of the enzyme, and they lose on the inhibitory effect in case of mutation of the virus, leading to the development of second-generation drugs which are less sensitive to mutation of the virus. Today, great effort has been made in the design of cyclic inhibitors which have enhanced potency, improved pharmacokinetic properties and activity for the mutant strains.*

Keywords: *peptidomimetics, HIV, HIV-protease, inhibitors of HIV-protease, cyclic inhibitors*

Thesis contains: 30 pages, 23 figures, 34 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Lidija Barišić, Associate Professor

Thesis delivered: September, 2015

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Proteini.....	2
2.1.1. Građa i svojstva	2
2.1.2. Nepoželjna svojstva proteina.....	4
2.2. Peptidomimetici i njihova primjena	5
2.3. HIV i AIDS.....	6
2.3.1. HIV-1 virus.....	6
2.3.2. HIV-1 proteaza	7
2.3.2.1. Struktura HIV-1 proteaze	7
2.3.2.2. Mehanizam djelovanja katalitičkog mjesta HIV-proteaze	9
2.3.3. Inhibitori HIV-1 proteaze	10
2.3.3.1. Peptidomimetici kao inhibitori HIV-1 proteaze	13
2.3.3.2. Tipranavir (TPV)	16
2.3.3.3. Analozi Tipranavira (TPV).....	18
3. ZAKLJUČAK	25
4. POPIS LITERATURE	26

1. UVOD

Proteini su molekule koje imaju esencijalnu ulogu u brojnim biološkim procesima. Dio prirodnih proteina može se koristiti u terapijske svrhe, no većinu je potrebno prethodno modificirati. Modificiranjem peptidne strukture kao i pripremom spojeva koji oponašaju uređenu trodimenzijsku strukturu prirodnih peptida dobivaju se peptidomimetici. Peptidomimetici se odlikuju poboljšanim farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima iz čega proizlazi i njihova unaprijeđena biološka aktivnost. Kroz protekla dva desetljeća došlo je do značajnog napretka u razvoju peptidomimetika kao lijekova za različite bolesti, pa tako i virusne infekcije, među kojima je i HIV.

Virus humane imunodeficijencije (HIV) uzročnik je razvoja Sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS). Prevalencija oboljelih u svijetu prešla je u epidemiološke razmjere i smatra se jednim od vodećih svjetskih zdravstvenih problema. Ključnu ulogu u razvoju virusa HIV-a ima enzim HIV-proteaza, zbog čega su se mnogobrojna istraživanja usmjerila na definiranje njegove strukture i mehanizma njegova djelovanja. Stečene spoznaje intenzivno primijenjuju u dizajnu peptidomimetičkih lijekova kao inhibitora HIV-proteaze.

U ovom će radu biti obrazložene karakteristike prirodnih peptida i njihovih mimetika. Nadalje, opisat će se uporaba peptidomimetika kao inhibitora HIV-proteaze i navest će se primjeri kako odobrenih, tako i novih generacija lijekova koji se testiraju u borbi protiv HIV-a.

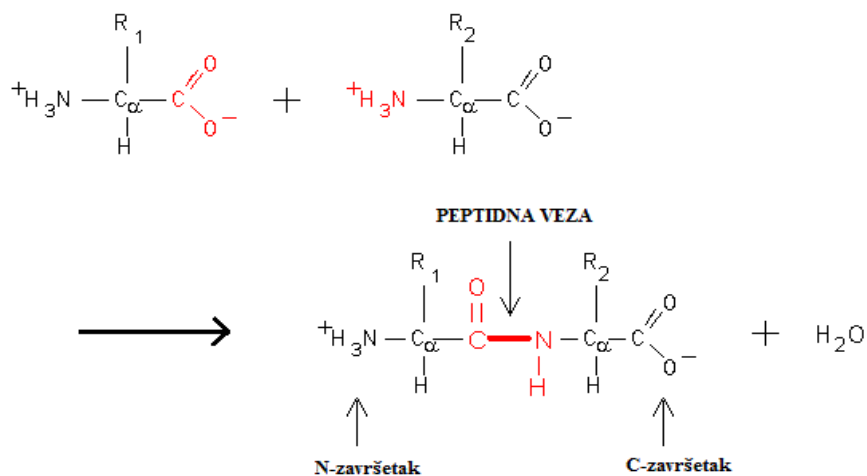
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Proteini

2.1.1. Građa i svojstva

Proteini, najsvestranije molekule u živim sustavima, obavljaju bitne funkcije u svim biološkim procesima. Djeluju kao katalizatori, prenose i pohranjuju ostale molekule, osiguravaju mehaničku potporu i imunosnu zaštitu, provode gibanje, prenose živčane impulse, te kontroliraju rast i diferencijaciju. Obavljanje tih funkcija omogućuju njihova sljedeća ključna svojstva:

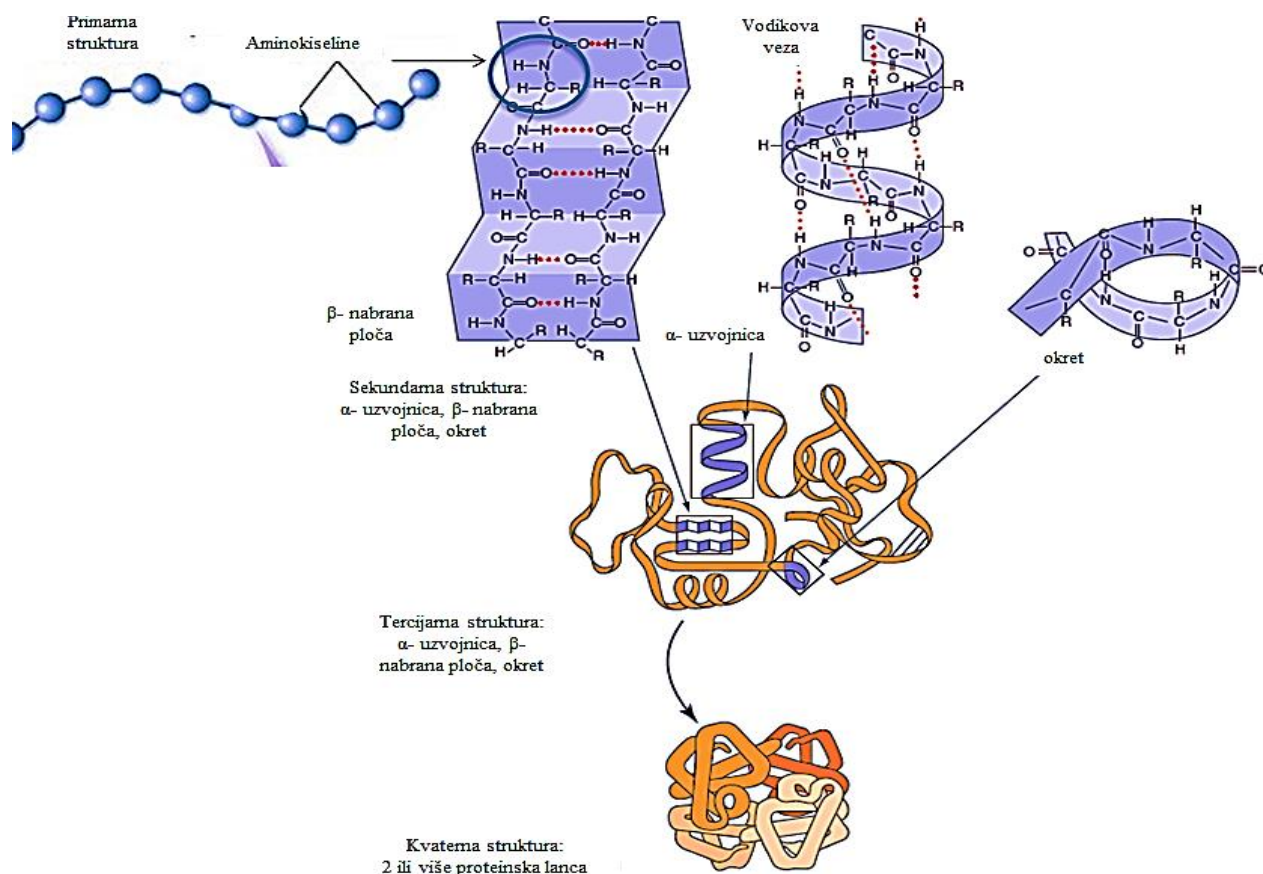
- Proteini su polimeri izgrađeni od monomernih jedinica - aminokiselina koje su međusobno povezane amidnom vezom (slika 1.)[1]. Proteinski se lanci spontano nabiru u trodimenzijske strukture, što izravno utječe na njihovu funkcionalnost.
- Proteini sadrže različite funkcijske skupine u bočnim ograncima (alkohole, tiole, tioetere, karboksilne kiseline, karboksamide). Većina tih skupina je kemijski reaktivna, a njihove kombinacije omogućuju proteinima široki spektar djelovanja.
- Proteini mogu djelovati međusobno ili s drugim biološkim makromolekulama tvoreći složene strukture. Proteini unutar tih nakupina mogu djelovati sinergistički i ostvarivati aktivnost koju inače ne pokazuju.
- Dok su neki proteini prilično kruti, drugi se odlikuju osjetnom fleksibilnošću. Rigidne jedinice mogu funkcionirati kao strukturni elementi, a djelomično fleksibilni proteini mogu djelovati kao šarke (panti), opruge ili poluge bitne za funkciju proteina [2].



Slika 1. Nastajanje peptidne veze [1].

Redoslijed aminokiselina određen je genetskim kodom za pojedini polipeptid. Nakon sinteze, polipeptidni lanac zauzima jedinstvenu trodimenzijsku strukturu [3] Proteinska 3D-struktura precizno je definirana, pri čemu razlikujemo četiri strukturne razine (slika 2.)[4]:

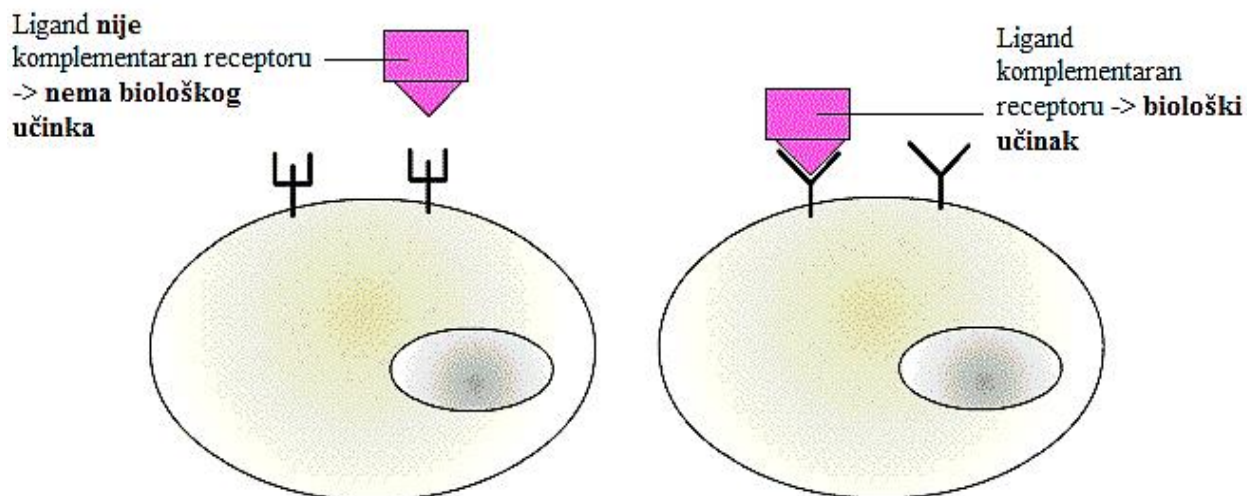
- I. Primarna struktura je slijed kovalentno povezanih aminokiselina unutar jednog polipeptidnog lanca koji definira biološku funkciju proteina.
- II. Sekundarna struktura se ostvaruje nekovalentnim interakcijama između aminokiselinskih ostataka koji su međusobno blizu u linearnom slijedu. Elementi sekundarne strukture su α -uzvojnica, β -nabrana ploča i okreti.
- III. Tercijarna struktura predstavlja prostorni odnos aminokiselinskih ostataka koji su međusobno udaljeni u linearnom slijedu i stabilizirani nekovalentnim vezama.
- IV. Kvaterna struktura se javlja kod oligomera i karakterizira je nekovalentno povezivanje dvaju ili više podjedinica (proteinskih lanaca) koje mogu biti iste ili različite.



Slika 2. Prikaz strukturnih razina proteina [4].

2.1.2. Nepoželjna svojstva proteina

Proteini i peptidi su esencijalni za organizam zbog niza funkcija koje obavljaju, a koje su uvjetovane zauzimanjem konformacije koja je komplementarna receptoru ne samo strukturno (veličinom i oblikom) već i drugim svojstvima (naboj, hidrofobna/ hidrofilna svojstva) (slika 3.)[4]

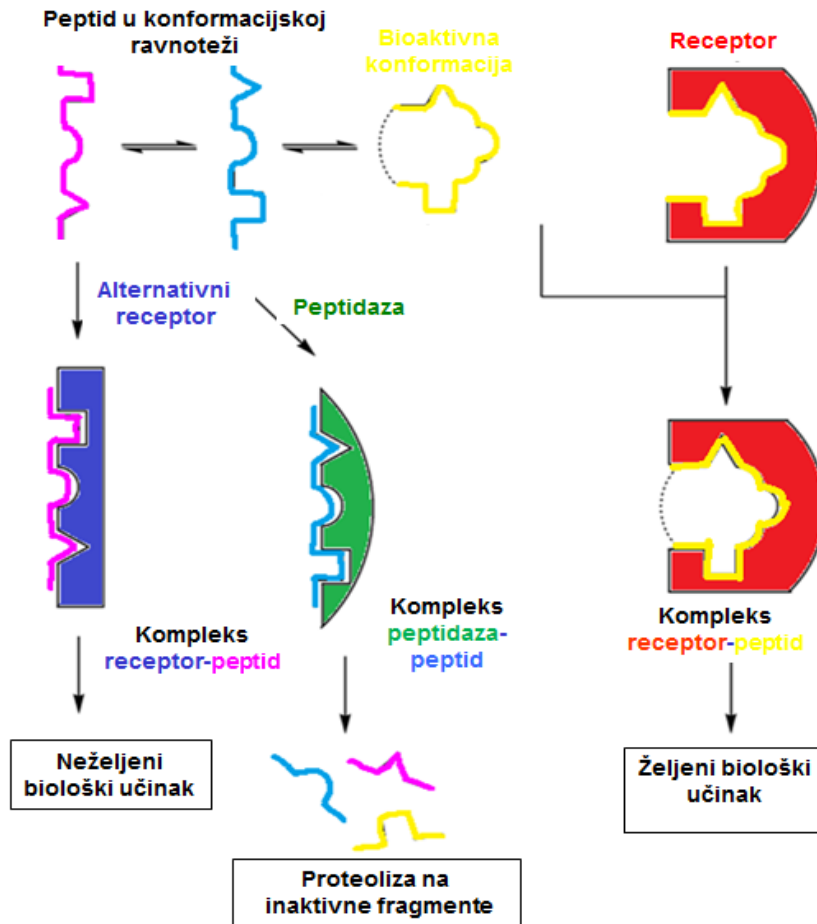


Slika 3. Komplementarnost liganda i receptora kao preduvjet za biološku aktivnost [4].

Unatoč velikom biološkom potencijalu ne koriste se u terapijske svrhe iz nekoliko razloga (slika 4.) [5]:

- velika fleksibilnost omogućuje njihovu interakciju s brojnim receptorima što može dovesti do neželjenih nuspojava,
- podložni su djelovanju proteolitičkih enzima što uzrokuje njihovu razgradnju i gubitak biološke aktivnosti,
- velika molarna masa i polarnost otežavaju njihov prolazak kroz stanične membrane, itd.

Da bi se povećala stabilnost i selektivnost peptida, njihove se strukture modificiraju u cilju „zaključavanja“ nativne konformacije, pri čemu nastaju peptidomimetici [6].



Slika 4. Fleksibilnost peptida koja dovodi do različitih bioloških učinaka [4].

2.2. Peptidomimetici i njihova primjena

Peptidomimetik se definira kao spoj čija su sekundarna strukturalna svojstva analogna prirodnom peptidu zbog čega može oponašati njegovu biološku funkciju [4], [7], [8], [9], [10] odnosno kao spoj koji kao ligand može oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora [7]. U osnovi razlikujemo mimetike glavnog lanca, mimetike aminokiselinskih bočnih ogranaka i mimetike s modificiranim glavnim lancem i bočnim ograncima.

Posljedice strukturalnih modifikacija na biološku aktivnost izvedenih peptidomimetika [11] su sljedeće:

- konformacijski ograničene strukture minimiziraju vezivanje na neželjene receptore, istovremeno povećavajući afinitet za ciljani receptor,
- reduciran je stupanj enzimske degradacije,

- uvođenje hidrofobnih ostataka i(li) zamjena amidne veze rezultira olakšanim transportom kroz stanične membrane.

Tijekom posljednja dva desetljeća zabilježen je uspjeh u primjeni peptidomimetika kao inovativnih lijekova u liječenju virusnih infekcija zahvaljujući modifikacijama pomoću kojih se prevladavaju ograničenja peptidnih lijekova (niska oralna apsorpcija i brza proteolitička razgradnja bez ostvarivanja poželjnog biološkog učinka). Trenutno se na tržištu nalazi devet lijekova na bazi peptidomimetikâ koji se primjenjuju za liječenje AIDS-a. Ti su peptidomimetički spojevi usmjereni na inhibiciju enzima HIV-proteaze koja ima ključnu ulogu u razvoju virusa HIV-a.

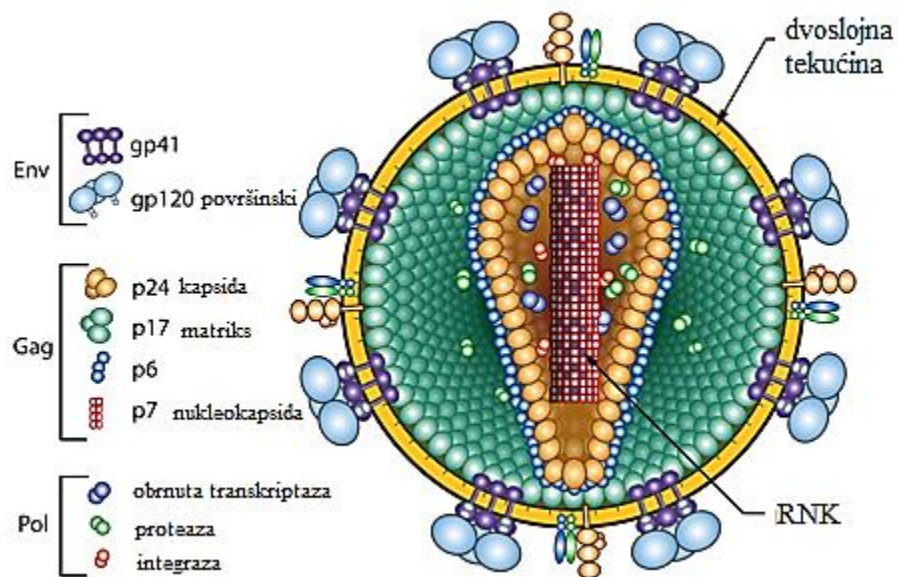
2.3. HIV i AIDS

1981. godine Američki centar za kontrolu bolesti (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) po prvi put izvijestio je o Sindromu stečene imunodeficijencije (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS), a dvije godine kasnije otkriveno je da je uzročnik AIDS-a infekcija retrovirusom humane imunodeficijencije (HIV) [12]. Termin *imunodeficijencija* u imenu virusa upućuje na način njegova djelovanja, usmjeren na slabljenje imunološkog sustava. Ukoliko se infekcija virusom HIV-a ne liječi kroz određeno vremensko razdoblje, ovisno o stanju u kojem se nalazi imunološki sustav prilikom infekcije virusom HIV-a dolazi do razvoja Sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS), gdje termin *sindrom* označava skupinu simptoma.

Od prvih zabilježenih slučajeva do danas, broj oboljelih u svijetu porastao je do epidemioloških razmjera. Procijenjeno je da je trenutno zaraženo oko 33 milijuna ljudi, te da se oko 2,7 milijuna novih HIV-infekcija javlja svake godine [12].

2.3.1. HIV-1 virus

HIV-1 virus spada u porodicu Retroviridae, te posjeduje diploidni RNK genom. Tri osnovna gena za viralnu replikaciju su *gag*, *pol* i *env* (slika 5.)[13]. *Gag* kodira za strukturne, *pol* za enzimske, a *env* za transmembranske proteine virusa. Proteini kodirani navedenim genima predstavljaju ključni faktor virulencije *in vivo*.



Slika 5. Građa HIV-1 virusa [13].

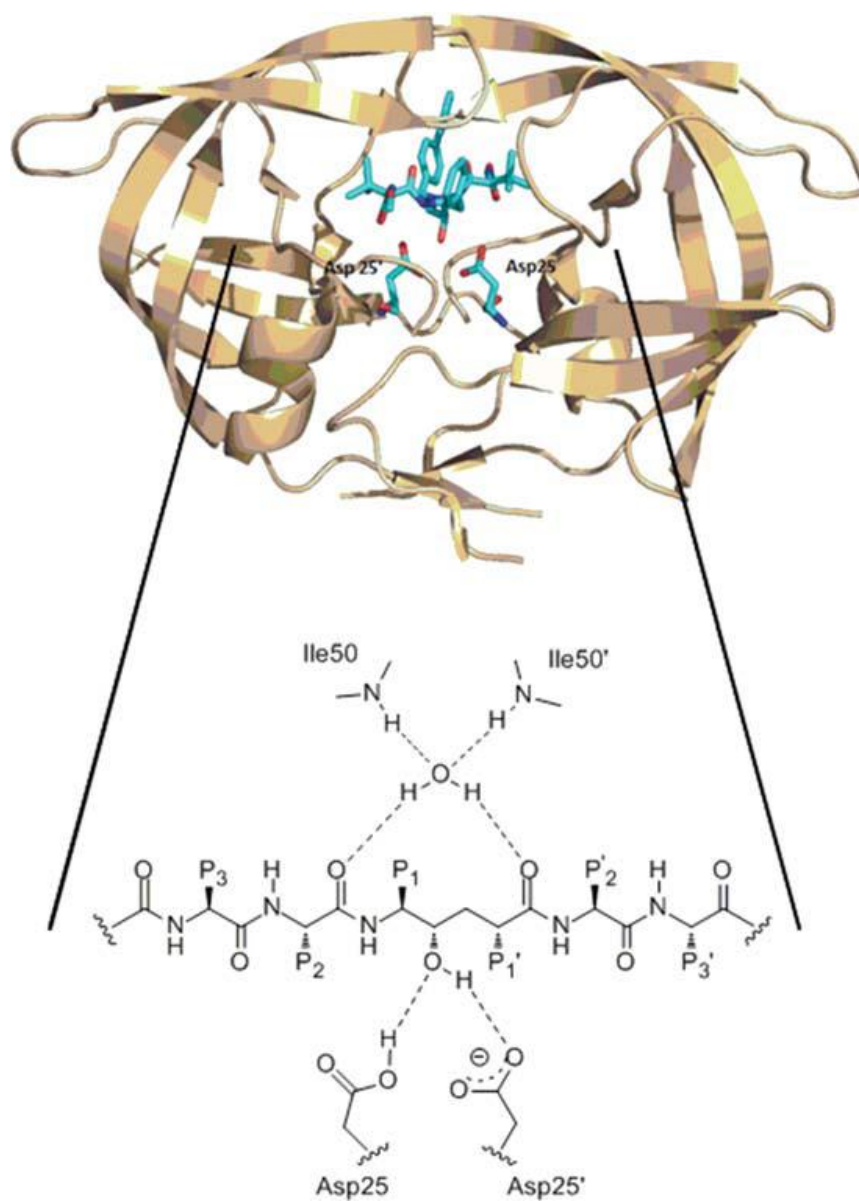
2.3.2. HIV-1 proteaza

HIV-proteaza kodirana *pol* genom HIV-1 virusa ima ključnu ulogu u fazi sazrijevanja samog virusa. Supstrati HIV-proteaze su *gag* prekursor nazvan p55 kojeg cijepa na četiri strukturna proteina, te *gag-pol* poliprotein kojeg prevodi u enzime integrazu, transkriptazu i samu proteazu. Virusna proteaza sposobna je za automatsko aktiviranje pomoću intramolekulskog cijepanja. Zbog svoje ključne uloge u sazrijevanju samog virusa HIV-a, HIV-1 proteaza predstavlja važnu metu u borbi protiv tog virusa.

2.3.2.1. Struktura HIV-1 proteaze

HIV-1 proteaza pripada hidrolazama koje su odgovorne za cijepanje peptidnih veza u proteinima, te endopeptidazama koje hidroliziraju unutarnje peptidne veze i na taj način sudjeluju u stvaranju dvaju ili više peptidnih fragmenata. Struktura HIV-proteaze, objavljena po prvi put 1989., prikazuje dimer koji se sastoji od dvije jednake monomerne jedinice. Svaka monomerna jedinica sastoji se od 99 aminokiselina s Asp25 u katalitičkom mjestu. Glavni strukturni dijelovi prikazani su na slici 6.[12]:

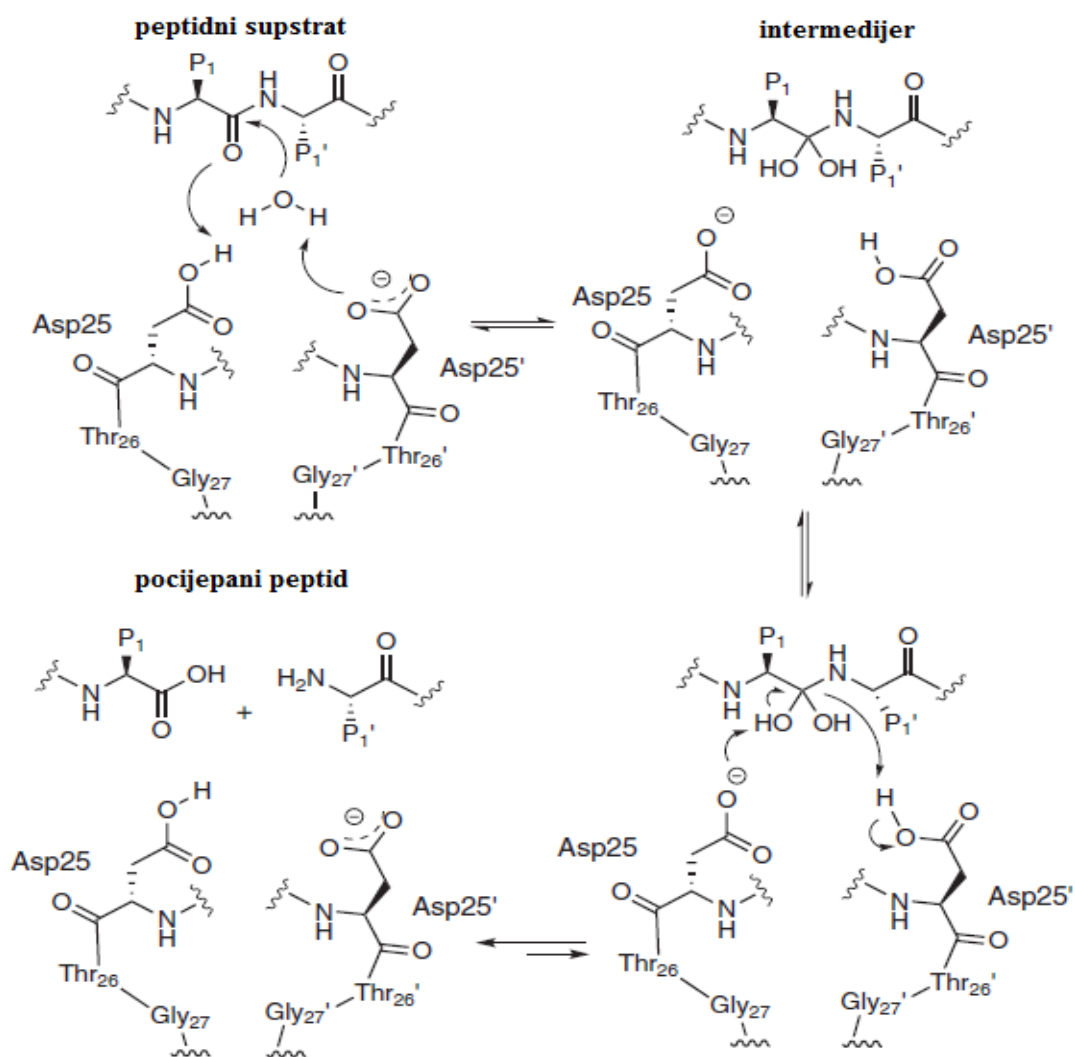
- lepršava (engl. flap) regija koja se sastoji od dvije antiparalelne β -nabrane ploče; omogućuje ulazak supstrata u katalitičko mjesto i otpuštanje nastalih produkata. Njezini se Ile50 i Ile50' ostatci preko molekule vode povezuju sa supstratom i na taj način osiguravaju dodatnu stabilizaciju kompleksa supstrat-enzim,
- jezgra koja se sastoji od β -nabrane ploče i okarakterizirana je prisustvom Asp25 i Asp25' u katalitičkom mjestu,
- krajnja domena.



Slika 6. Struktura HIV-proteaze i enzim/inhibitor interakcija [12].

2.3.2.2. Mehanizam djelovanja katalitičkog mjesta HIV-proteaze

Opći mehanizam hidrolize peptidne veze zasniva se na nukleofilnom napadu hidroksidnog iona koji nastaje aktivacijom molekule vode, a koja je vodikovim vezama vezana s Asp-ostacima u katalitičkom mjestu HIV-proteaze (slika 7.)[12].

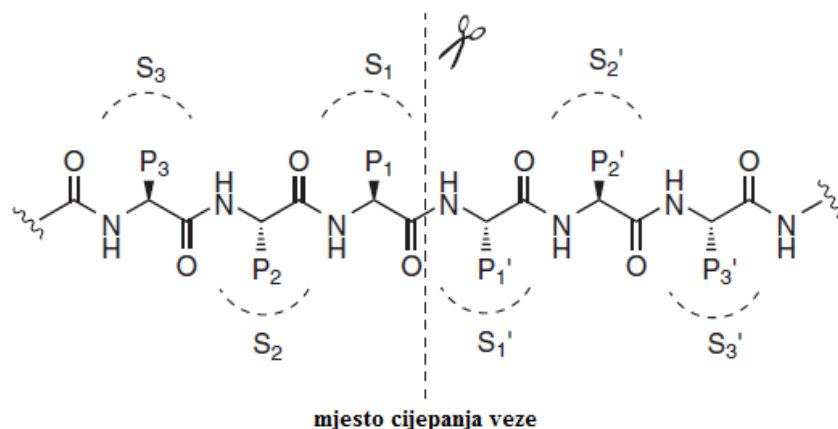


Slika 7. Katalitički mehanizam HIV-proteaze [12].

Dvije molekule asparaginske kiseline prisutne su u katalitičkom mjestu u protoniranom ili deprotoniranom obliku. Deprotonirani Asp25'-ostatak ponaša se kao baza prihvaćajući proton iz molekule vode, pri čemu nastaje nukleofilni hidroksidni ion koji napada karbonilni kisik iz

peptidne veze. Asp25-ostatak ponaša se kao kiselina donirajući proton pri tvorbi tetraedarskog intermedijara. Posljednji korak katalize uključuje Asp25-ostatak koji predaje proton amidnoj skupini peptidnog supstrata što dovodi do cijepanja peptida. Pri tomu Asp25'-ostatak preuzima proton i vraća se u početnu konfiguraciju

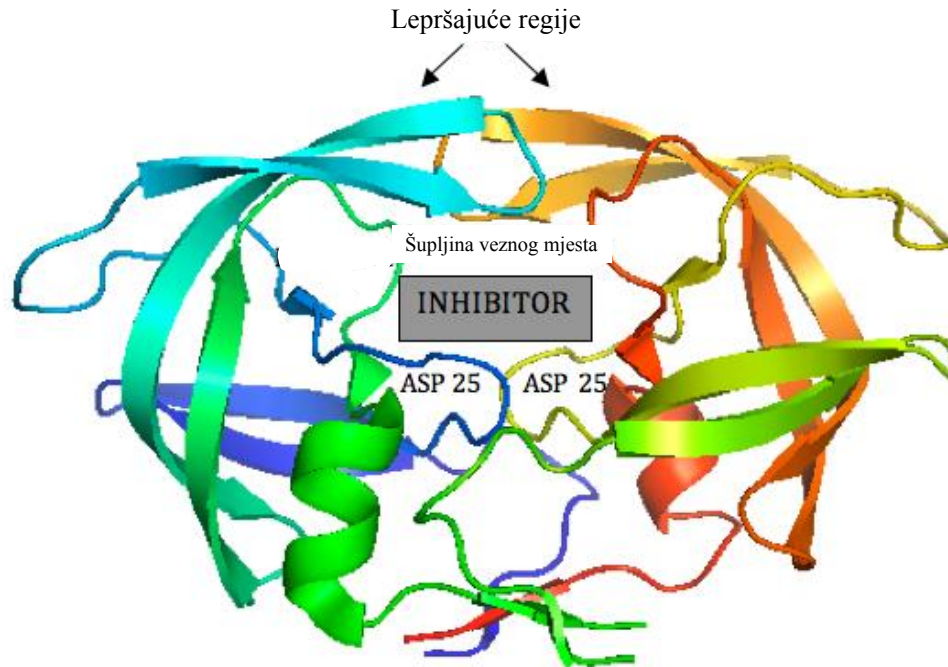
Specifičnost proteaze osigurava se hidrofobnim regijama za vezanje supstrata ili inhibitora. Hidrofobne regije obilježene su Schechter i Berger notacijom (slika 8.)[12] gdje se oznakom P i P' obilježavaju aminokiselinski bočni ogranci C- i N-terminusa peptidnog supstrata, dok se odgovarajuća regija enzima označava sa S i S'. P1 i P1' predstavljaju susjedne aminokiseline u odnosu na peptidnu vezu koja se cijepa, nakon njih slijede P2 i P2', itd. Prateće oznake za regije proteaze su S1/S1', S2/S2' i S3/S3', budući da HIV-proteaza ima 4 regije za vezanje supstrata ili inhibitora.



Slika 8. Mjesta za vezanje peptidnog supstrata [12].

2.3.3. Inhibitori HIV-1 proteaze

Inhibitori HIV-1 proteaze dizajnirani su tako da budu strukturno komplementarni šupljini veznog mjesta. Dvije lepršajuće regije na vrhu strukture dovoljno su fleksibilne da omoguće ulazak inhibitora, dok su dva Asp-ostatka u aktivnom mjestu odgovorna za hidrolitičku aktivnost enzima. (slika 9.)[14] Zahvaljujući poznavanju strukture, funkcije i mehanizma djelovanja HIV-1 proteaze, omogućen je pronalazak odgovarajućeg inhibitora [15(a),(b)]. Danas se koristi kombinacija od 20 protoretroviralnih lijekova za borbu protiv HIV-a. Devet odobrenih terapij onemogućuje sudjelovanje HIV-1 proteaze u sazrijevanju samog virusa.



Slika 9. Shema vezanja inhibitora u aktivno mjesto HIV-1 proteaze [14].

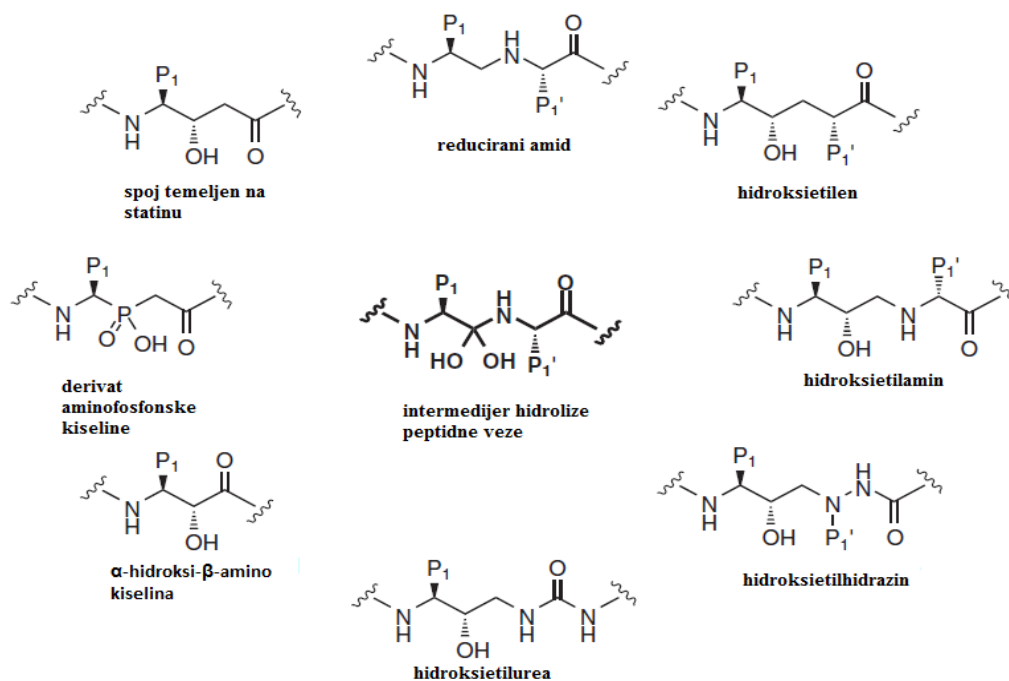
Najučinkovitijom metodom liječenja pokazala se kombinacija jednog ne-nukleozidnog RT-inhibitora (RT, reverzna transkriptaza) i dvaju nukleozidnih RT-inhibitora, te dvaju ne-nukleozidnih RT-inhibitora i dvaju proteaznih inhibitora. Posljedica ovih terapijskih tretmana kod osoba zaraženih HIV-om je povećanje ukupnog broja CD_4^+ stanica (bijele krvne stanice koje štite od infekcije slanjem signala koji aktivira imunološki sustav) i znatno smanjenje koncentracije viralne RNA, što u konačnici za pacijenta znači veću kontrolu nad bolešću i poboljšanu kvalitetu života. Problem koji se javlja je rezistencija na pojedine lijekove prilikom virusne replikacije. Pojavu rezistencije HIV-1 na lijekove omogućuju dvije ključne karakteristike:

- visoka stopa virusne infekcije,
- visoka učestalost mutacija tijekom virusnog replikacijskog ciklusa [16].

Kombinacijom lijekova smanjuje se rezistencija, zahvaljujući učinkovitijem suzbijanju viralne replikacije u usporedbi s učinkom postignutim uporabom pojedinačnih inhibitora.

Ukoliko dođe do pojave rezistencije, ona se manifestira kroz izmjenu nekoliko aminokiselina kako u katalitičkom mjestu tako i u regijama vezanja supstrata, što znači da proteaza ima smanjeni afinitet prema inhibitoru, te može povećati učestalost virusnog replikacijskog ciklusa.

Termodinamičke studije pokazuju da inhibitori prve generacije [Indinavir (IDV), Ritonavir (RTV), Saquinavir (SQV)], zahvaljujući svojoj hidrofobnosti ostvaruju interakcije s katalitičkim mjestom, ovisno o njegovoj konformaciji. Međutim, svega nekoliko mutacija dovodi do značajnog smanjenja inhibicijskog potencijala, uslijed čega se razvija rezistencija na lijekove. Inhibitori druge generacije [Atazanavir (ATV), Lopinavir (LPV), Tipranavir (TPV)], suprotno inhibitorima prve generacije, zadržavaju sposobnost vezanja i inhibicije bez obzira na moguće mutacije. Početnu fazu razvoja inhibitora predstavljaju analozi prijelaznog stanja aspartatne proteaze. Opća strategija razvoja analoga prijelaznog stanja aspartatne proteaze razvijena je u razdoblju od 1972. do 1983. godine [17]. Glavni dizajn inhibitora aspartatne proteaze temelji se na mimikriji prijelaznog stanja kojeg tvori enzim tijekom katalitičkog mehanizma [18]. Većina poznatih inhibitora analozi su peptidnih supstrata koje karakterizira prijelazno stanje (izoster) s vezom koja se ne može hidrolizirati na mjestima P_1/P_1' za razliku od normalne amidne veze. (slika 10.)[12]



Slika 10. Izosteri (analozi prijelaznog stanja) koji se koriste u dizajnu inhibitora

HIV-1 proteaze [12].

2.3.3.1. Peptidomimetici kao inhibitori HIV-1 proteaze

Peptidni inhibitori HIV-1 proteaze imaju nisku bioiskoristivost, brzo se izlučuju putem žuči, te induciraju nuspojave kao što je lipodistrofija [19]. Osim toga, pojava rezistentnih sojeva patogena zahtjeva nove inhibitore koji pokazuju različit uzorak interakcije s ciljanim proteinom [20]. Kako bi se poboljšala farmakokinetička i farmakodinamička svojstva, veliki je trud uloženi u razvoj novih inhibitora aspartatne proteaze smanjene proteinske prirode na osnovi strukturnih informacija prikupljenih uporabom inhibitora izvedenih iz prirodnih peptida.

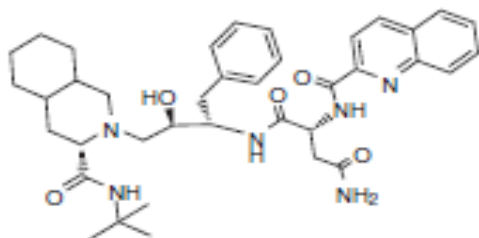
Inhibitori HIV-1 proteaze razvijeni su uzimajući u obzir hidrolitički mehanizam djelovanja proteaze i strukturu samog enzima, te mogu biti podijeljeni u dvije grupe (slika 11.)[12]:

- I. inhibitori prve generacije - peptidomimetici koji pokazuju sličnost sa supstratom: Saquinavir (SQV), Ritonavir (RTV), Indinavir (IDV), Nelfinavir (NFV) i Amprenavir (APV),
- II. inhibitori druge generacije: Fosamprenavir (FPV), Lopinavir (LPV), Atazanavir (ATV), Darunavir (DRV) i Tipranavir (TPV).

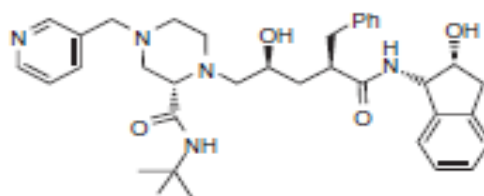
Inhibitori prve generacije dizajnirani su tako da oponašaju tetraedarsko prijelazno stanje koji se formira tijekom cijepanja peptidne veze.

Izoster hidroksi-etil-amin koristio se u razvoju SQV koji je 1995. odobren kao inhibitor HIV-proteaze. Prilikom dizajna ovog inhibitora uzeta je u obzir specifičnost proteaze u prepoznavanju Pro ostatka na P_1' položaju i Phe-Asn dipeptida na drugoj strani molekule, te su pobočni izosteri za Phe i Asn i dekahidro-izokvinolin (kao mimetik Pro) odabrani kao popratni fragmenti hidroksi-etil-amina, centralnog nehidrolizirajućeg dijela intermedijara. Dvije godine kasnije pojavljuje se NFV koji također sadrži dekahidro-izokvinolin kao izoster Pro.

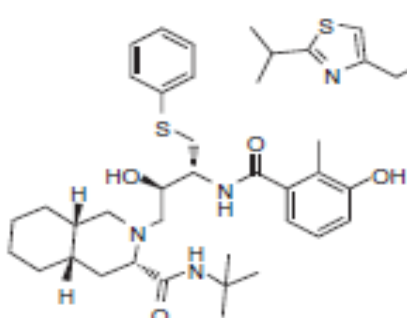
prva generacija



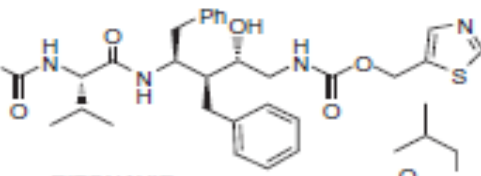
SAQUINAVIR



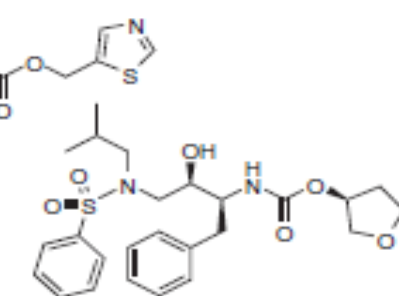
INDINAVIR



NELFINAVIR

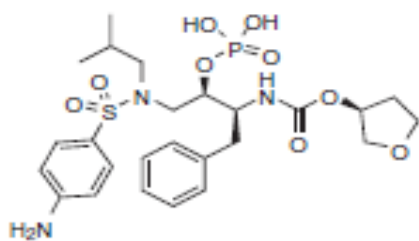


RITONAVIR

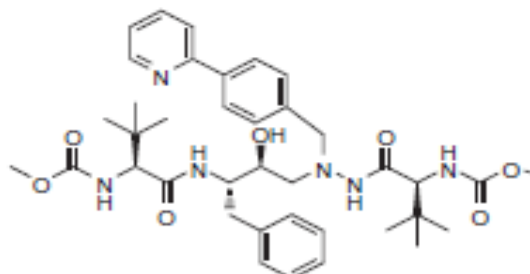


AMPRENAVIR

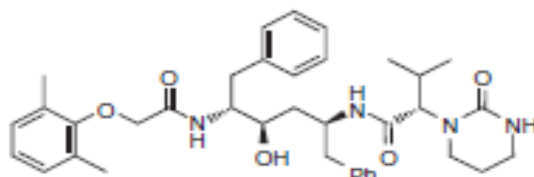
druga generacija



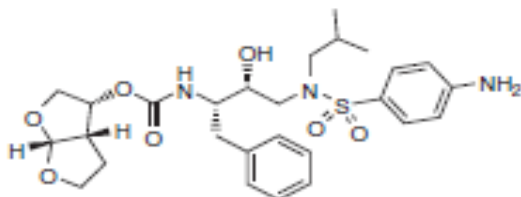
FOSAMPRENAVIR



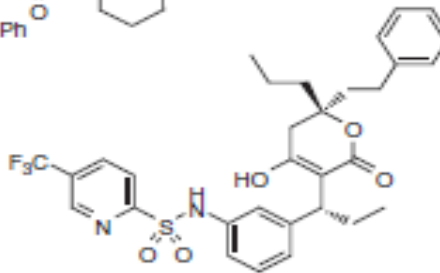
ATAZANAVIR



LOPINAVIR



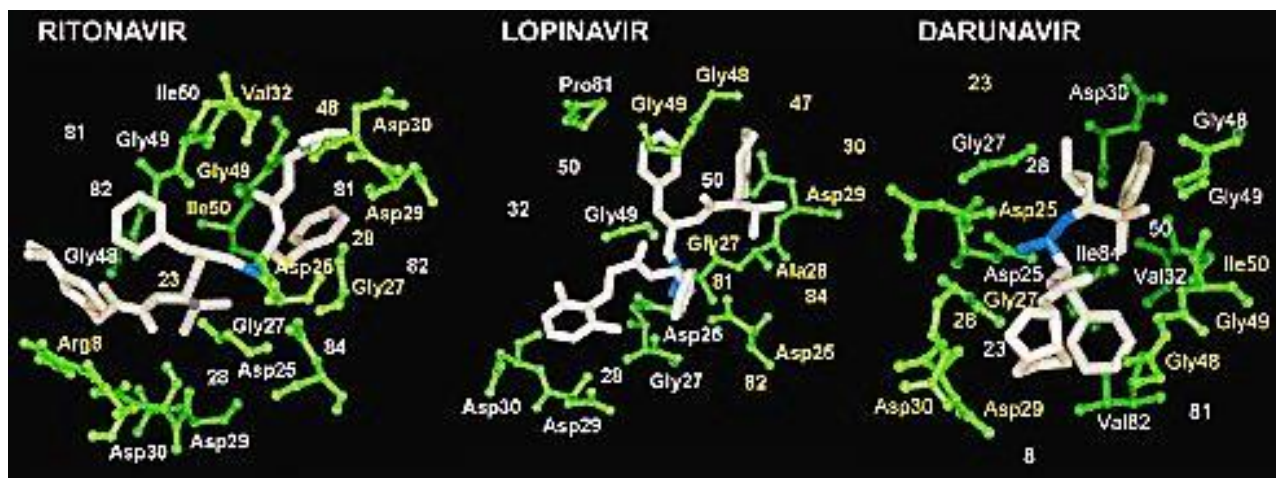
DARUNAVIR



TIPRANAVIR

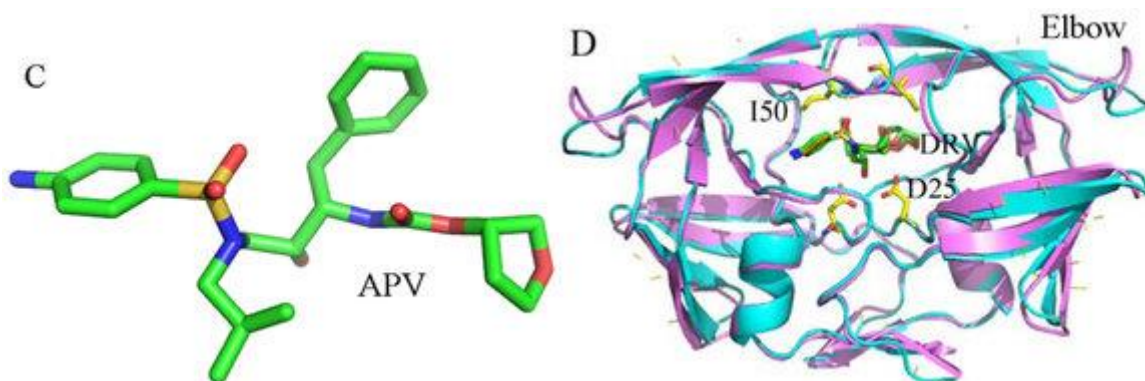
Slika 11. 1. i 2. generacija inhibitora HIV-1 proteaze [12].

Vezivanje nekih od spomenutih inhibitora u vezno mjesto HIV-proteaze prikazano je na slici 12 [21].



Slika 12. Vezanje Ritonavira, Lopinavira i Darunavira u aktivno mjesto HIV-1 proteaze [21].

1999. APV, prikazan na slici 13.[22], odobren je kao inhibitor HIV-proteaze sa sličnim mehanizmom vezanja kao SQV, te inovativnim sulfonamidom na P₂' položaju. Sulfonamid na P₂' položaju pokazao se kao ključan element u interakciji s molekulom vode u „flap“ regiji, u interakciji sa S₂' položajem i za poboljšanu topljivost u vodi.



Slika 13. Struktura Amprenavira (APV) i Darunavira (DRV) [22].

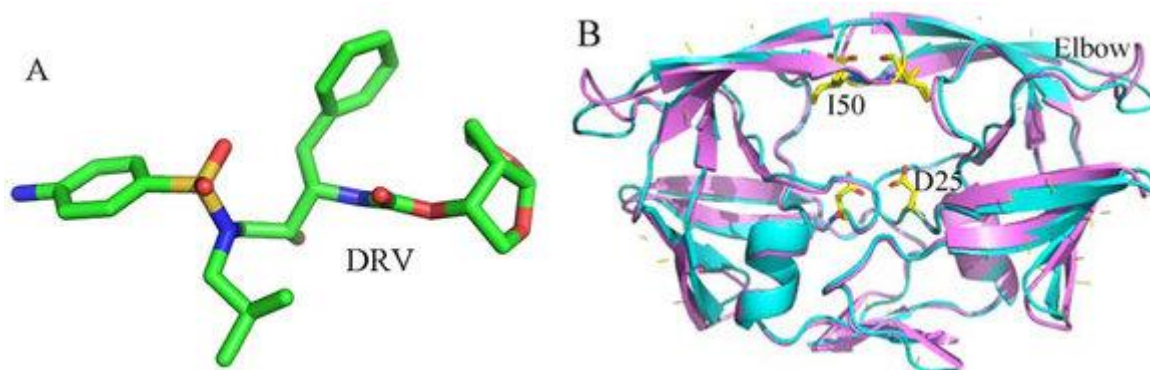
RTV strukturno se razlikuje od drugih inhibitora, budući da je prilikom njegova dizajna u obzir uzeta C₂-simetrija proteaze. Odobren je 1996. godine i koristi se u kombinaciji s drugim

lijekovima kao „pojačivač“, djelujući inhibitory na jetrin P-450 citokrom i na taj način omogućuje održavanje povećane koncentracije pojedinih lijekova.

Prva generacija lijekova pokazala je određene nedostatke: pojava rezistencije virusnih sojeva, toksičnost i nisku farmakokinetiku, što zahtjeva previsok unos dnevnih doza lijeka. Pokušaji rješenja spomenutih problema doveli su do razvoja lijekova druge generacije koji imaju poboljšana svojstva, kao što su povećana potentnost lijeka, djelovanje na mutirane sojeve virusa, te poboljšana farmakokinetička svojstva

2003. odobreni su ATV i FPV. FPV je pokazao bolju topivost i potrebu za manjom dnevnom dozom za razliku od APV-a. DRV i TPV, odobreni 2006., izazvali su veliki interes zbog svojih sposobnosti djelovanja na mutirane vrste HIV-virusa.

DRV je dizajniran na osnovi strukture APV-a (slika 13.) zamjenom furanskog prstena na P₂ poziciji sa bicikličkim bis-tetrahidrofuran sustavom. (slika 14.)[22] Ova grupa pokazala je bolju sposobnost vezanja liganda na poziciju S₂ zbog dodatnih vodikovih veza između dva atoma kisika u bicikličkom sustavu [23]. Poboljšana interakcija između enzima i inhibitora uzrokovala je poboljšanje inhibicijskog učinka (10³) u odnosu na inhibitore prve generacije.



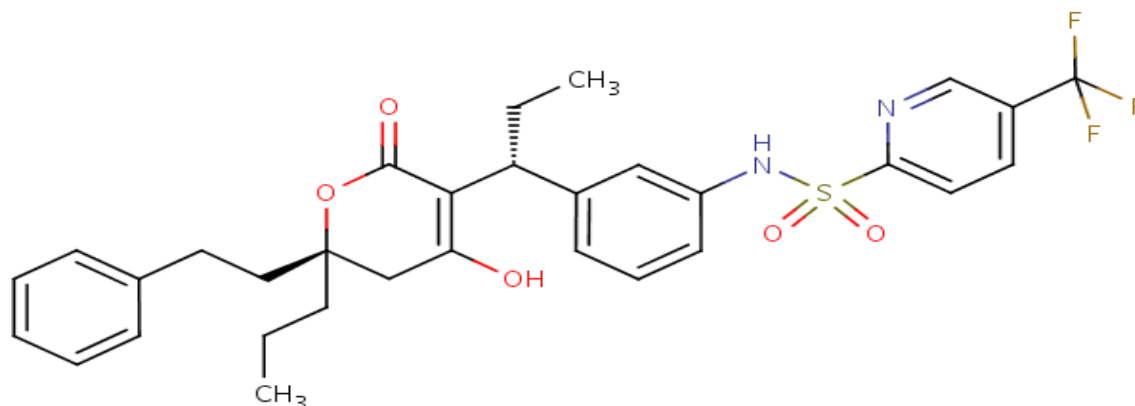
Slika 14. Struktura Darunavira (DRV) [22].

2.3.3.2. Tipranavir (TPV)

Uvođenje cikličkog kalupa pri dizajnu novih peptidomimetika odličan je način smanjenja fleksibilnosti i osiguravanja rigidnijih struktura inhibitora. Dipeptidni izosteri zamijenjeni su s centralnim cikličkim kalupom dizajniranim tako da se za aktivno mjesto enzima veže preko

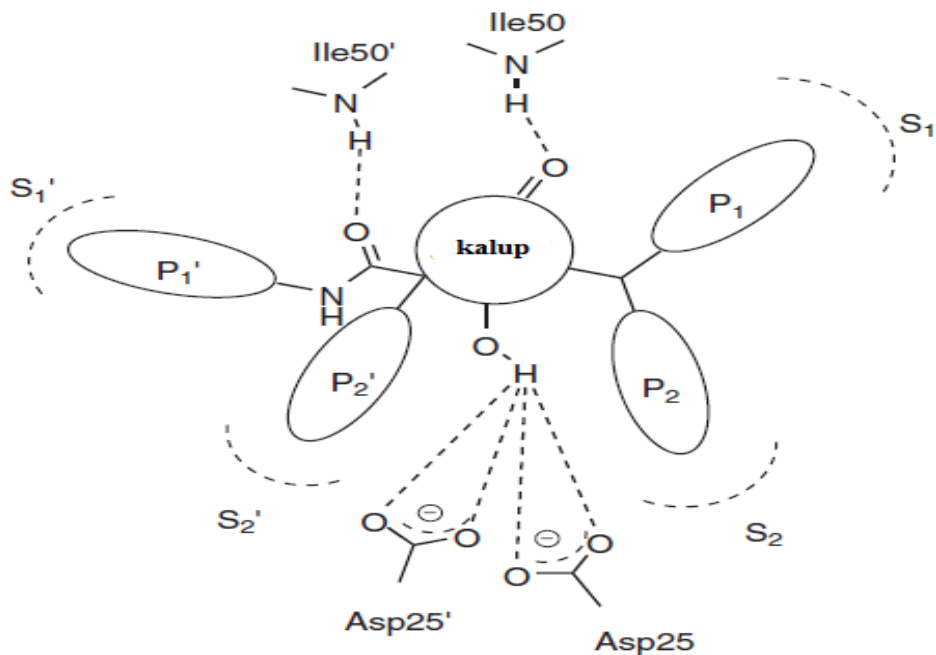
različitih funkcijskih skupina koje ulaze u interakciju s Asp u aktivnom mjestu i ostatcima koji pripadaju lepršavoj (engl. flap) regiji.

TPV, odobreni inhibitor HIV-1 proteaze, najpoznatiji je ciklički inhibitor aspartatne proteaze koji je na tržištu od 2005. (slika 15.)[24].



Slika 15. Struktura Tipranavira (TPV) [25].

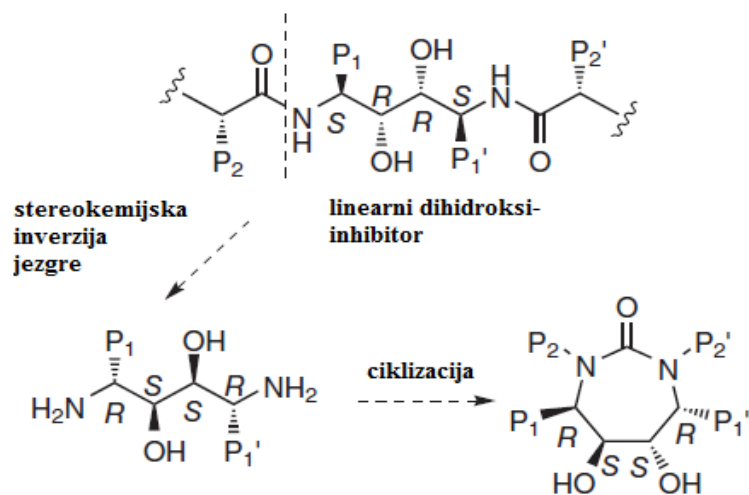
Riječ je o nepeptidnoj strukturi koja se na potpuno nov način veže s enzimom što povećava inhibitorno djelovanje i otpornost na rezistenciju virusa. Glavna karakteristika TPV-a je zamjena hidroksi-etil-amino grupe s centralnim kalupom - pionskim prstenom zaduženim za interakciju s enzimom. Molekula TPV-a može ući u interakciju pomoću mreže vodikovih veza isključivo s osnovnim dijelovima proteaze, te na taj način osigurati inhibitorno djelovanje i na mutirane vrste virusa [26.] Način vezanja TPV na proteazu je jedinstven: hidroksilna skupina na poziciji 4 simetrično ulazi u interakciju s oba Asp u aktivnom mjestu, a karbonilna skupina zamjenjuje molekulu vode u interakciji s „flap“ regijom tako da vodikovim vezama veže amidnu skupinu Ile50 i Ile50'. Upravo jedinstveni način vezanja omogućuje inhibitorno djelovanje TPV-a prema mutiranom virusu jer osnovni dio „flap“ regije, kojeg čine vodikovim vezama vezane amidne skupine, ne podliježe mutaciji (slika 16.)[12]



Slika 16. Vežanje TPV-a u aktivnom mjestu HIV-proteaze [12].

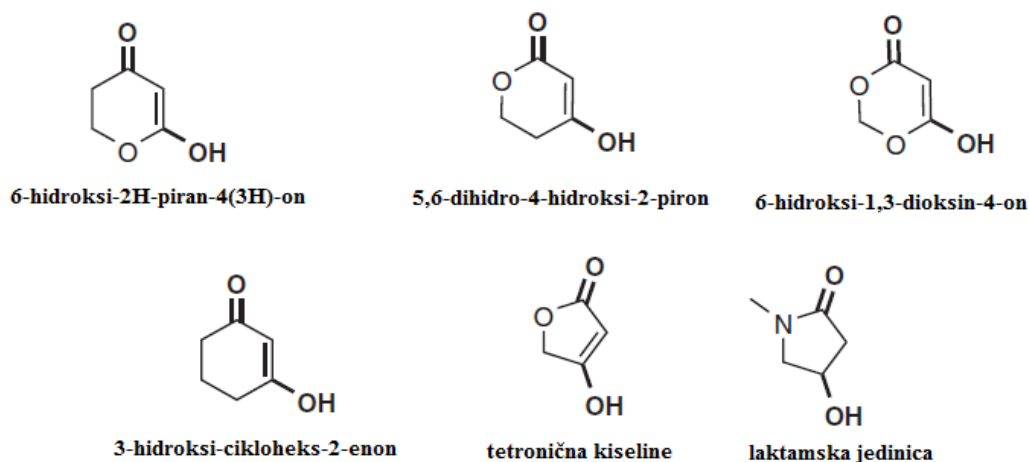
2.3.3.3. Analizi Tipranavira (TPV)

Prvi uspješan primjer uvođenja heterocikličke strukture u peptidomimetičke inhibitore HIV-1 proteaze je TPV. Nakon efikasnog TPV-a, pojavio se niz cikličkih spojeva koji se sastoje od polarne funkcionalne skupine koja se vodikovim vezama veže za aspartatne ostatke proteaze i sa Ile50 i Ile50' ili sličnim hidrofobnim ostacima koji se javljaju prilikom mutacije. Kod dizajna nekih od cikličkih peptidomimetika kao inhibitora proteaze, pozornost se usmjerila na C₂-simetriju enzima kao okosnicu inhibitora. Osnova za dizajn cikličkih inhibitora je poznavanje stereokemije, te konformacije linearnih inhibitora kako bi se postigao što vjerniji ciklički inhibitor nove generacije, čiji pristup vidimo na slici 17. Ciklički inhibitori nove generacije pokazuju još bolja svojstva što se tiče bioiskoristivosti, topljivosti, smanjenja peptidne prirode, te otpornosti prema mutacijama.



Slika 17. Dizajn cikličkih inhibitora HIV-proteaze [12].

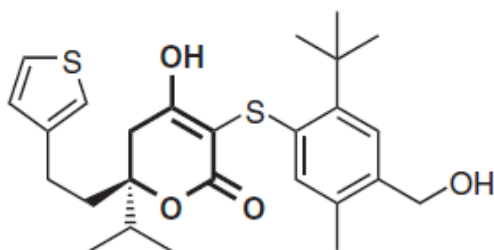
Postoji niz derivata TPV-a prikazanih na slici 18. koji se koriste u dizajnu lijekova za tretman HIV-obojejenih pacijenata gdje su funkcionalne skupine koje ulaze u interakciju s enzimom masno otisnute. Da bi se dobio učinkovit inhibitor HIV-proteaze, mnogo truda je uloženo u razvoj novih molekula kao gradivnih jedinica inhibitora: supstituirani pironi, 6-hidroksi-1,3-dioksin-4-on, 3-hidroksi-cikloheks-2-enon skupina, tetronična kiselina i laktamska jedinica, od kojih svi imaju donor i akceptor vodika u 1,3- položaju, te nalikuju kalupu samog TPV-a. Kristalografija X-zrakama omogućila je otkriće novog načina vezanja za aktivno mjesto enzima, karakteristično za TPV, a koje se razlikuje od od sada poznatog vezanja specifičnog za analoge prijelaznog stanja.



Slika 18. Derivati TPV-a [12].

Nakon niza istraživanja, derivati 5,6-dihidro-4-hidroksi-2-pirona identificirani su kao novi razred nepeptidnih inhibitora HIV-proteaze [27(a),(b)]. Kristalografska analiza X-zrakama pokazala je da kod ove serije spojeva dihidropironska središnja jezgra ima sličan način vezanja kao TPV, tj. vodikovim vezama se hidroksilna skupina veže za aspartatne ostatke u aktivnom mjestu, a karbonilni kisik sa Ile50/Ile50' ogrankom „flap“ regije, dok se hidrofobni supstituenti vežu sa S₁/S₁' i S₂/S₂' regijama. Iako je inhibitorski učinak *in vitro* u nanomolarnoj količini bio ohrabrujući, u kulturama stanica pokazalo se da ovi spojevi imaju nizak protuviralni učinak. Kako bi se povećao inhibitorski učinak dodane su polarne grupe dihidropironskom kalupu [28]. Rezultat daljnjih istraživanja i poboljšavanja strukture inhibitora u svrhu poboljšanja protuviralnog djelovanja je nova serija inhibitora koja ima obećavajuće rezultate na sub-nanomolarnoj razini. Da bi dobili još mjesta za vezanje i povećali inhibitorsko djelovanje, sintetiziran je niz spojeva sa različitim sulfonilnim skupinama na para-položaju C3 fenilnog supstituenta [29]. Kako bi se popunilo S₃' vezno mjesto enzima u obzir je uzet široki spektar različitih funkcijskih skupina kao što su: sulfonamidi, sulfoniluree, sulfonati i sulfamati, no inhibitorsko djelovanje nije pojačano. Neuspješnost navedenih postupaka može se objasniti s termodinamičkog aspekta: svaki dobitak na entalpiji vezanja dovodi do nepoželjnih entropija koje uzrokuju povećanje fleksibilnosti u spoju, što u ovom slučaju nije poželjno.

CI-1029 je spoj za koji su znanstvenici pokazali najviše interesa, te je podvrgnut modifikacijama s ciljem poboljšanja farmakokinetičkih svojstava kako bi postao kandidatom za novu generaciju lijekova protiv HIV-a [30]. Budući da amino skupina u fenil-etil lancu na C6 mjestu predstavlja mjesto za metabolički neželjene derivatizacije, bilo je nužno zamjeniti anilin s metabolički stabilnom skupinom. Testiran je niz heterocikličkih skupina kao supstituenata amino-fenilne skupine iz CI-1029 spoja. Najbolju bioiskoristivost i dobru antivirusnu djelotvornost pokazao je spoj koji posjeduje tiofen na C6-položaju (slika 19.).

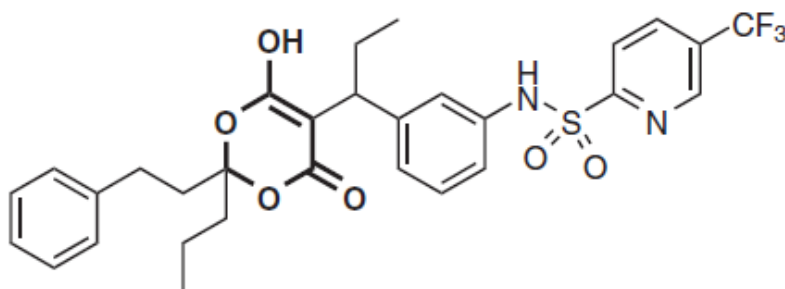


Slika 19. Spoj koji posjeduje tiofen na C6 položaju [12].

Sljedeći primjer u razvoju nove generacije cikličkih inhibitora po uzoru na TPV su 5,6-dihidro-4-hidroksi-3-tiosupstituirani pironi koji su razvijeni izmjenom 4-hidroksi-piran-2-on jezgre s heteroatomima u bočnom lancu supstituenta, te se pratila njihova interakcija s veznim mjestima enzima [31]. Rezultati su pokazali da se heteroatom sumpora i kisika na C6 položaju pironskog kalupa ne preklapaju sa S₂ položajem veznog mjesta enzima, iako etoksi-skupina u fenilnom prstenu povećava afinitet prema veznom mjestu enzima.

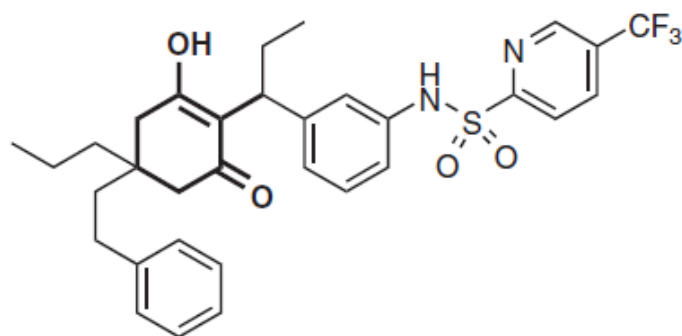
6-Hidroksi-1,3-dioksin-4-on predstavlja još jedan od cikličkih kalupa koji se koriste u dizajnu inhibitora koji strukturno nalikuju TPV-u [32]. Ovaj novi središnji ciklički kalup, zamišljen kao izoster 4-hidroksi-5,6-dihidropirona, ulazi u interakciju s aktivnim mjestom enzima na sličan način. U konačnici je dobiven novi niz 6-hidroksi-1,3-dioksin-4-on derivata na osnovi strukture TPV-a. Izvedena je modulacija meta-sulfonamidnog supstituenta u fenilnom prstenu na C5 položaju kalupa, dok je etilna skupina i C2 supstituent na kalupu zadržan.

Potencijal ovih novih spojeva u inhibiciji HIV-proteaze pokazao se obećavajućim, uključujući i spoj sa 6-hidroksi-1,3-dioksin-4-onskom jezgrom (slika 20.) koji ima iste supstituente kao TPV.



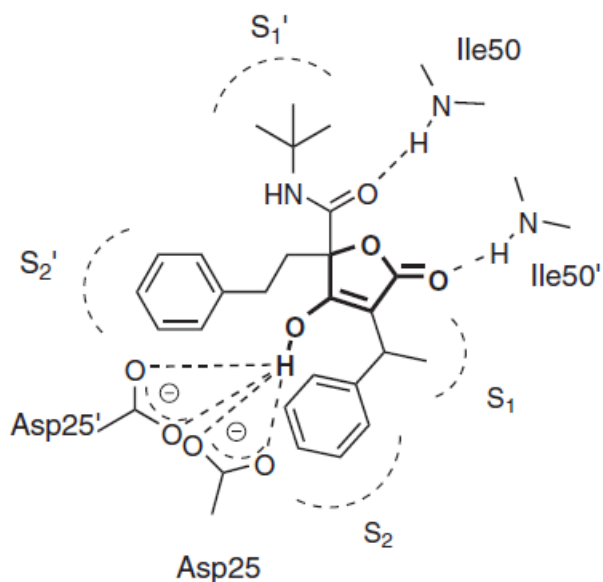
Slika 20. Analog TPV s 6-hidroksi-1,3-dioksin-4-onskom jezgrom [12].

Uklanjanjem heteroatoma iz središnjeg prstena spojeva baziranih na TPV-u, stvorena je nova vrsta kalupa zamjenom dihidropirona sa 1,3-cikloheksandionom. Na ovaj način je dobijen još jedan od novih cikličkih inhibitora prikazan na slici 21.



Slika 21. Ciklički inhibitor sa 1,3-cikloheksandionom [12].

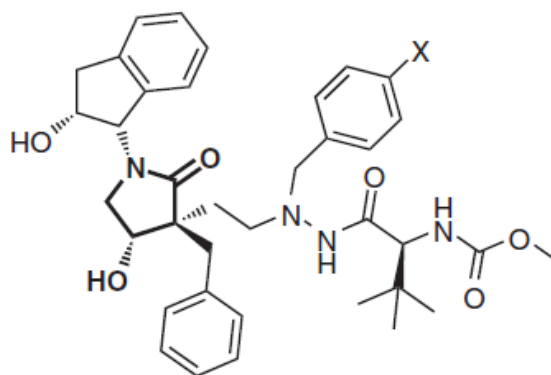
U nizu TPV-analoga se našao i spoj čiji središnji kalup čini tetronična kiselina, te molekule čije građevne jedinice čini 3-hidroksi-5-okso-2,5-dihidrofuran-2-karboksamid [33]. Ova središnja jezgra nalikuje 4-hidroksi-2-pironskoj jezgri, koja je opsežno korištena za dizajn specifičnih inhibitora HIV-proteaze, te ima iste glavne značajke prilikom interakcije s „flap“ regijom i katalitičkim aspartatima. Ova vrsta spojeva se pripravlja vrlo kratkom višekomponentnom sintezom koja se sastoji od kombinacije trokomponentne Passerinijeve reakcije s bazno kataliziranom Dieckmannovom kondenzacijom. Sintetizirana je nova skupina spojeva koji pokazuju inhibicijsko djelovanje na mikromolarnoj razini, te su provedene studije kako bi se detaljnije opisao način vezanja tih spojeva s aktivnim mjestom HIV-proteaze, što je prikazano na slici 22.



Slika 22. Vezanje inhibitora na osnovi tetronične kiseline u aktivno mjesto enzima [12].

Karbonilni kisik karboksamidne skupine ulazi u interakciju s amidnim dušikom Ile50, dok karbonilni kisik središnjeg kalupa uspostavlja vodikovu vezu s Ile50'. Hidroksilna skupina ulazi u interakciju s oba aspartata aktivnog mjesta enzima. Inhibitor dolazi u interakciju sa četiri unutarnje regije enzima, S₁/S₁' i S₂/S₂', na način da *tert*-butilna skupina karboksamida ulazi u interakciju sa S₁', feniletil skupina sa S₂', a fenilna i metilna skupina ulaze u interakciju sa S₂ i S₁ regijama.

Nakon razvoja ATV derivata, upotrebljavaju β-hidroksi-γ-laktamsku skupinu sa sekundarnim alkoholom na položaju 4 kako bi dobili konformacijski ograničen kalup koji oponaša prijelazno stanje [34]. Uvođenje laktamskog kalupa smanjuje se fleksibilnost i uzrokuje se premještanje hidroksilne skupine iz osnovne gradivne jedinice enzima, te na taj način osigurava više simetričnih vodikovih veza za interakciju sa aspartatima u aktivnom mjestu enzima. Provedeno je stereokemijsko skeniranje da bi se identificirali stereoisomeri koji pokazuju najbolji potencijal prema inhibitornom učinku na HIV-proteazu. Stereokemijska analiza je pokazala da (3R, 4S) i (3R, 4R) stereoisomeri pokazuju dobru sposobnost inhibicije, pod pretpostavkom da je orijentacija benzilne skupine na P1 položaju najvažnija strukturna karakteristika, tj. da ima najveći utjecaj na aktivnost. (slika 23.)



X = Br, K_i = 2.1 nM

X = 4-py, K_i = 0.4 nM

Slika 23. Struktura inhibitora s laktamskim kalupom [12].

U svrhu unapređenja provedena je funkcionalizacija s heteroaromatskom skupinom u *para*-položaju P₁' benzilne skupine, kao i modulacija duljine središnje razmaknice. Funkcionalizacija provedena na P₁' položaju pojačala je djelovanje inhibitora. Inhibitori čija se središnja razmaknica sastoji od dva ugljikova atoma imali su jače inhibitorno djelovanje u odnosu na spojeve s duljom središnjom razmaknicom. Analiza kristalne strukture najjačih inhibitora ovog niza spojeva pokazala je da nijedan od njih ne tvori simetrične veze s aspartatima u aktivnom mjestu enzima, te da dolazi do interakcije između molekule vode Ile50/Ile50' enzima s hidrazid-karbonilnim kisikom i karbonilnim kisikom laktamskog prstena. Razlika u vezanju inhibitora s dva ili tri ugljikova atoma u razmaknici očituje se razlikom u inhibitornoj moći.

3. ZAKLJUČAK

- Da bi se povećala stabilnost i selektivnost peptida, njihove se strukture modificiraju u cilju „zaključavanja“ nativne konformacije, pri čemu nastaju peptidomimetici.
- Lijekovi protiv AIDS-a uključuju peptidomimetike koji su usmjereni na inhibiciju HIV-proteaze koja je odgovorna za replikaciju i sazrijevanje virusa HIV-a.
- U terapeutske svrhe odobreno je devet peptidomimetika, inhibitora HIV-proteaze.
- Tipranavir (TPV) je prvi ciklički inhibitor HIV-proteaze s poboljšanom bioiskoristivošću i antiviralnim djelovanjem.
- Osnovna karakteristika TPV-a je zamjena hidroksi-etil-amino grupe s pironskim prstenom zaduženim za interakciju s enzimom.
- Jedinstveni način vezanja omogućuje inhibitorno djelovanje TPV-a prema mutiranom virusu jer osnovni dio „flap“ regije ne podliježe mutaciji.
- Osnova za dizajn cikličkih inhibitora je poznavanje stereokemije, te konformacije linearnih inhibitora.
- Ciklički inhibitori nove generacije pokazuju bolju bioiskoristivost, topljivost, smanjenje peptidne prirode, te otpornost prema mutacijama HIV-virusa.
- Neke od novih molekula kao gradivnih jedinica inhibitora pokazuju veliki potencijal: supstituirani pironi, 6-hidroksi-1,3-dioksin-4-on, 3-hidroksi-cikloheks-2-enon skupina, tetronična kiselina i laktamska jedinica.

4. POPIS LITERATURE

- [1] MoBio (2015) Molecular Biology Web Book,
< <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch2B.htm>>. Pristupljeno 31. kolovoza 2015.
- [2] Stryer, L., (2013) Biokemija, 6. izd, Školska knjiga, Zagreb.
- [3] Walsh, G., (2001) Proteins: Biotechnology and Biochemistry, 1. izd., John Wiley&Sons, Ujedinjeno Kraljevstvo.
- [4] Barišić, L. (2014), Izv. prof. dr. sc. Lidija Barišić, Home Page, < http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organsku_kemiju/peptidni_mimetic_i_pseudopeptidi>. Pristupljeno 25. lipnja 2015.
- [5] Chakraborty, T.K., Ghos, S., Jayaprakash, S. (2002) Sugar Amino Acids and Their Uses in Designing Bioactive Molecules. *Curr. Med. Chem.* **9**, 421- 435.
- [6] Zorc, B. (2008) Peptidomimetici. *Farmaceutski glasnik* **64**, 113-121.
- [7] Giannis, A., Kolter, T. (1993) Peptidomimetics for Receptor Ligands- Discovery, Development and Medical Perspectives. *J. Agnew. Chem. In. Ed. Engl.* **32**, 1244-1267.
- [8] Gante, J. (1994) Peptidomimetics- Tailored Enzyme Inhibitors. *J. Angew. Chem. Int. Ed.* **33**, 1699-1720.
- [9] Kahn, M. (1993) Peptide Secondary Structure Mimetics: Recent Advances and Future Challenges. *Synlett.* **11**, 821-826.
- [10] Olson, G.L., Bolin, D.R., Bonner, M.P., Bos, M., Cook, C.M., Fry, D.C., Graves, B.J., Hatada, M., Hill, D.E. (1993) Concepts and Progress in the Development of Peptide Mimetics. *J. Med. Chem.* **36**, 3039-3049.

- [11] Provid Pharmaceuticals (2001) < <http://provid.com/peptide-mimetics.shtml>>. Pristupljeno 25.lipnja 2015.
- [12] Trabocchi, A., Guarna, A. (2014) Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry: The Art of Transforming Peptides in Drugs, 1.izd., John Wiley&Sons, Ujedinjeno Kraljevstvo.
- [13] Büchner, S.M., Sliva, K., Bonig, H., Völker, I., Waibler, Z., Kirberg, J., Schnierle, B.S. (2013) Delayed onset of graft-versus-host disease in immunodeficient human leucocyte antigen-DQ8 transgenic, murine major histocompatibility complex class II-deficient mice repopulated by human peripheral blood mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.* **173**, 355-364.
- [14] UCLA (2009) Department of Chemistry and Biochemistry, <http://people.mbi.ucla.edu/yeates/153AH_2009_project/sriphanlop.html>. Pristupljeno 25. kolovoza 2015.
- [15] (a) Ghosh, A.K., Kulkarni, S., Anderson, D.D., Hong, L., Baldrige, A., Wang, Y.F., Chumanevich, A.A., Kovalevsky, A.Y., Tojo, Y., Amano, M., Koh, Y., Tang, J., Weber, I.T., Mitsuya, H. (2009) Design, Synthesis, Protein-Ligand X-ray Structure, and Biological Evaluation of a Series of Novel Macrocyclic Human Immunodeficiency Virus-1 Protease Inhibitors to Combat Drug Resistance. *J. Med. Chem.* **52**, 7689-7705.
- (b) Jorge L. Martinez-Cajas, Mark A. Wainberg (2007) Protease inhibitor resistance in HIV-infected patients: Molecular and clinical perspectives. *Antiviral Res.* **76**, 203-221.
- [16] Clavel, F., Hance, A.J. (2004) HIV drug resistance. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1023-1035.
- [17] Rich, D.H., Bursavich, M.G. and Estiarte, M.A. (2002) Discovery of nonpeptide, peptidomimetic peptidase inhibitors that target alternate enzyme active site conformations. *Biopolymers* **66**, 115-125.
- [18] Leung, D., Abbenante, G. and Fairlie, D.P. (2000) Protease inhibitors: current status and future prospects. *J. Med. Chem.* **43**, 305-341.

- [19] Somadossi, J.P. (1999) HIV protease inhibitors: pharmacologic and metabolic distinctions. *AIDS* **13**, 29-40.
- [20] Wensing, A.M., van Maarseveen, N.M. and Nijhuis, M. (2010) Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiviral Res.* **85**, 59-84.
- [21] Menéndez-Arias, L., Tözsér, J. (2008) HIV-1 protease inhibitors: effects on HIV-2 replication and resistance. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 42-49.
- [22] Chen, J., Liang, Z., Wang, W., Yi, C., Zhang, S., Zhang, Q. (2014) Revealing origin of decrease in potency of Darunavir and Amprenavir against HIV-2 relative to HIV-1 protease by molecular dynamics simulations. *Scientific Reports* **4**, 1-2.
- [23] Ghosh, A.K., Dawson, Z.L. and Mitsuya, H. (2007) Darunavir, a conceptually new HIV-1 protease inhibitor for the treatment of drug-resistant HIV. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 7576-7580.
- [24] Turner, S.R., Strohbach, J.W., Tommasi, R.A., Aristoff, P.A., Johnson, P.D., Skulnick, H.I., Dolak, L.A., Seest, E.P., Tomich, P.K., Bohanon, M.J., Horng, M.M., Lynn, J.C., Chong, K.T., Hinshaw, R.R., Watenpaugh, K.D., Janakiraman, M.N., Thaisrivongs, S. (1998) Tipranavir (PNU-140690): a potent, orally bioavailable nonpeptidic HIV protease inhibitor of the 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone sulfonamide class. *J. Med. Chem.* **41**, 3467-3476.
- [25] AIDSinfo (2010) Service of the U.S. Department of Health and Human Services (HHS) <<https://aidsinfo.nih.gov/drugs/351/tipranavir/0/patient>>. Pristupljeno 25. kolovoza 2015.
- [26] Muzammil, S., Armstrong, A.A., Kang, L.W., Jakalian, A., Bonneau, P.R., Schmelmer, V., Amzel, L.M., Freire, E. (2007) Unique thermodynamic response of tipranavir to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease drug resistance mutations. *J. Virol.* **81**, 5144-5154.

[27] (a) J. V. N. Vara Prasad, Kimberly S. Para, Elizabeth A. Lunney, Daniel F. Ortwine, James B. Dunbar Jr., Donna Ferguson, Peter J. Tummino, Donald Hupe, Bradley D. Tait, (1994) Novel series of achiral, low molecular weight, and potent HIV-1 protease inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 6989-6990.

(b) Tait, B.D., Hagen, S., Domagala, J., Ellsworth, E.L., Gajda, C., Hamilton, H.W., Prasad, J.V., Ferguson, D., Graham, N., Hupe, D., Nouhan, C., Tummino, P.J., Humblet, C., Lunney, E.A., Pavlovsky, A., Rubin, J., Gracheck, S.J., Baldwin, E.T., Bhat, T.N., Erickson, J.W., Gulnik, S.V., Liu, B. (1997) 4-hydroxy-5,6-dihydropyrones. 2. Potent non-peptide inhibitors of HIV protease. *J. Med. Chem.* **40**, 3781-3792.

[28] Hagen, S.E., Prasad, J.V., Boyer, F.E., Domagala, J.M., Ellsworth, E.L., Gajda, C., Hamilton, H.W., Markoski, L.J., Steinbaugh, B.A., Tait, B.D., Lunney, E.A., Tummino, P.J., Ferguson, D., Hupe, D., Nouhan, C., Gracheck, S.J., Saunders, J.M., VanderRoest, S. (1997) Synthesis of 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as HIV-1 protease inhibitors: the profound effect of polarity on antiviral activity. *J. Med. Chem.* **40**, 3707-3711.

[29] Boyer, F.E., Vara Prasad, J.V., Domagala, J.M., Ellsworth, E.L., Gajda, C., Hagen, S.E., Markoski, L.J., Tait, B.D., Lunney, E.A., Palovsky, A., Ferguson, D., Graham, N., Holler, T., Hupe, D., Nouhan, C., Tummino, P.J., Urumov, A., Zeikus, E., Zeikus, G., Gracheck, S.J., Sanders, J.M., Vander Roest, S., Brodfuehrer, J., Iyer, K., Sinz, M., Gulnik, S.V. (2000) 5,6-Dihydropyran-2-ones possessing various sulfonyl functionalities: potent nonpeptidic inhibitors of HIV protease. *J. Med. Chem.* **43**, 843-858.

[30] Hagen, S.E., Domagala, J., Gajda, C., Lovdahl, M., Tait, B.D., Wise, E., Holler, T., Hupe, D., Nouhan, C., Urumov, A., Zeikus, G., Zeikus, E., Lunney, E.A., Pavlovsky, A., Gracheck, S.J., Saunders, J., Vander Roest, S., Brodfuehrer, J. (2001) 4-Hydroxy-5,6-dihydropyrones as inhibitors of HIV protease: the effect of heterocyclic substituents at C-6 on antiviral potency and pharmacokinetic parameters. *J. Med. Chem.* **44**, 2319-2332.

- [31] Sun, C.L., Pang, R.F., Zhang, H. and Yang, M. (2005) Design, synthesis, and biological evaluation of novel 4-hydroxypyronone derivatives as HIV-1 protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 3257-3262.
- [32] Lee, Y.S., Kim, S.N., Lee, C.K., Park, H. (2000) 6-Hydroxy-1,3-dioxin-4-ones as non-peptidic HIV protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 2625-2627.
- [33] Yehia, N.A., Antuch, W., Beck, B., Hess, S., Schauer-Vukasinović, V., Almstetter, M., Furer, P., Herdtweck, E., Dömling, A. (2004) Novel nonpeptidic inhibitors of HIV-1 protease obtained via a new multicomponent chemistry strategy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 3121-3125.
- [34] Wu, X., Ohrngren, P., Joshi, A.A., Trejos, A., Persson, M., Arvela, R.K., Wallberg, H., Vrang, L., Rosenquist, A., Samuelsson, B.B., Unge, J., Larhed, M. (2012) Synthesis, X-ray analysis, and biological evaluation of a new class of stereopure lactam-based HIV-1 protease inhibitors. *J. Med. Chem.* **55**, 2724-2736.