



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR Y
QUIMIOINFORMÁTICA DE COMPUESTOS DERIVADOS DE
PIRIDINONA COMO POTENCIALES INHIBIDORES DE
TRANSCRIPTASA REVERSA DE VIH**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

VITE CARITINO HUGO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: José Fausto Rivero Cruz

VOCAL: Profesor: José Luis Medina Franco

SECRETARIO: Profesor: Ariana Elizabeth Vargas Castillo

1° SUPLENTE: Profesor: María Eugenia Mendoza Jasso

2° SUPLENTE: Profesor: Mario Alberto Díaz Ortiz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Cubículo 305, Edificio F, Facultad de Química UNAM

Circuito Interior S/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México.

ASESOR DEL TEMA:

José Luis Medina Franco

SUSTENTANTE:

Hugo Vite Caritino

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el proyecto 155029 al Dr. Daniel Chávez Velazco. También se agradece a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el proyecto PAIP 5000-9163 al Dr. José Luis Medina Franco, y al Programa Institucional de Nuevas Alternativas de Tratamiento para Enfermedades Infecciosas (NUATEI) del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM por el apoyo financiero.

Publicación

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en el trabajo:

Vite-Caritino H., Méndez-Lucio O., Reyes H., Cabrera A., Chávez D., Medina-Franco J.L.; Advances in the development of pyridinone derivatives as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, *RSC Advances* **2016**, 6, 2119-2130.

Índice

Palabras clave	iv
Siglas y Abreviaturas	iv
1. Introducción	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Acoplamiento molecular (<i>docking</i>)	2
1.3. <i>Consensus docking</i> y <i>consensus scoring</i>	2
1.4. Protein-Ligand Interaction Fingerprints (PLIFs).....	3
1.5. Objetivos	4
1.5.1. Objetivo general	4
1.5.2. Objetivos específicos	4
1.6. Hipótesis	5
2. Antecedentes	6
2.1. VIH y SIDA.....	6
2.1.1. Tratamiento actual	7
2.1.2. Transcriptasa reversa	8
2.1.3. Inhibidores de Transcriptasa Reversa.....	9
2.2. Inhibidores no-nucleosídicos de transcriptasa teversa	10
2.2.1. INNTRs aprobados para uso clínico	11
2.2.2. Superando la resistencia a los INNTRs	12
2.2.3. INNTRs en desarrollo pre-clínico y clínico	14
2.3. Derivados de piridin-2(1 <i>H</i>)-ona	14
2.3.1. Piridinonas de Merck.....	15
2.3.1.1. <i>Docking</i> con piridinonas de Merck.....	16
2.3.2. Desarrollo de híbridos de piridin-2(1 <i>H</i>)-ona con otros INNTRs..	16
.....	16
2.3.3. Estructuras cristalográficas del desarrollo posterior de híbridos de piridin-2(1 <i>H</i>)-ona con otros INNTRs.....	19

2.3.4.	Derivados de la 4-cicloalquinoxipiridin-2(1 <i>H</i>)-ona.....	22
2.3.5.	Desarrollo de híbridos piridin-2(1 <i>H</i>)-ona/TNK651	23
2.3.6.	Nueva generación de piridinonas con perfil de actividad mejorado	26
2.3.7.	Contribución de los métodos computacionales al desarrollo de derivados de piridin-2(1 <i>H</i>)-ona	28
3.	Procedimiento experimental.....	32
3.1.	Materiales	32
3.1.1.	Equipo de cómputo:	32
3.1.2.	Programas computacionales:	32
3.2.	Metodología	32
3.2.1.	Estructuras de TR utilizadas.....	33
3.2.2.	Mapas bidimensionales de interacción ligando-proteína para los compuestos co-cristalizados.....	33
3.2.3.	Compuestos de prueba	34
3.2.4.	Validación del protocolo de <i>docking</i>	34
3.2.3.1.	Preparación de las estructuras proteicas para su implementación con ICM.....	35
3.2.3.2.	Superposición de la estructura de las proteínas.....	36
3.2.3.3.	Superposición de los ligandos en el sitio de unión.....	36
3.2.3.4.	Re- <i>docking</i> de los ligandos co-cristalizados.....	36
3.2.5.	<i>Docking</i> de los compuestos de prueba	37
3.2.6.	<i>Consensus scoring</i>	38
3.2.7.	<i>PLIFs</i>	38
4.	Resultados y Discusión.....	39
4.1.	Obtención de los mapas bidimensionales de interacción ligando- proteína.....	39
4.2.	Validación del protocolo de <i>docking</i>	40
4.2.1.	Superposición de la estructura de las proteínas.....	40
4.2.2.	Superposición de los ligandos en el sitio de unión.....	42
4.2.3.	Re- <i>docking</i> de los compuestos co-cristalizados.....	43

4.3. <i>Docking</i>	45
4.4. <i>Consensus scoring</i>	45
4.5. Mapas bidimensionales de interacción de los compuestos de prueba	49
4.6. PLIFs	49
5. Conclusiones y perspectivas.....	51
6. Bibliografía	52
7. Apéndice	
7.1. Artículo - Advances in the development of pyridinone derivatives as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, <i>RSC Advances</i> 2016, 6, 2119-2130	
7.2. Cartel – “Estudios de <i>docking</i> molecular de inhibidores potenciales de transcriptasa reversa de VIH” – Simposio de Química Medicinal y Farmacéutica, Congreso Estudiantil Ciencia sin Fronteras en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.	

Palabras clave

Antirretrovirales, *docking*, piridinona, *PLIFs*, quimioinformática, SIDA transcriptasa reversa, VIH

Siglas y Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNcd	ADN de cadena doble
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNcs+	ARN de cadena simple en sentido positivo (5'→3')
CCR5	C-C receptor de quimiocinas tipo 5
ChEMBL	<i>Chemical Data Base of Bioactive Molecules with Drug-Like Properties of the European Molecular Biology Laboratory</i>
CoMFA	<i>Comparative Molecular Field Analysis</i>
CoMSIA	<i>Comparative Molecular Similarity Index analysis</i>
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Gp120	Glicoproteína transmembrana Gp120
Gp41	Glicoproteína transmembrana Gp41
HEPT	1-[(2-hidroxietoxi)metil]-6-(feniltio)timina
ICM	<i>Internal Coordinate Mechanics</i>
INNTR	Inhibidor no-nucleosídicos de transcriptasa reversa
INTR	Inhibidor nucleosídico de transcriptasa reversa

IS	Índice de Selectividad
ITR	Inhibidor de transcriptasa reversa
LT _h CD4+	Linfocito T cooperador (<i>cluster of differentiation 4</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDB	Protein Data Bank
PLIFs	<i>Protein-ligand interaction fingerprints</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
SAR	Relaciones estructura-actividad (<i>Structure-activity relationships</i>)
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
QSAR	<i>Quantitative Structure-activity relationships</i>
TAR	Terapia antirretroviral
TARGA	Terapia antirretroviral de gran actividad (<i>Highly activity antiretroviral therapy-HAART</i>)
TNK651	6-benzil-1-(fenilmetoximetil)-5-propan-2-ilpirimidin-2,4-diona
TR	Transcriptasa reversa
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
WT	Silvestre (<i>Wild Type</i>)

1.Introducción

1.1. Planteamiento del problema

El Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) provocado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), sigue siendo uno de los problemas más graves de salud pública en el mundo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) a finales de 2015 había 36.7 millones de personas infectadas con el VIH. En el mismo año, surgieron 2.1 millones de nuevas infecciones y 1.1 millones de personas murieron por causas relacionadas con el SIDA¹.

Los avances recientes en la terapia antirretroviral (TAR) han permitido que las personas VIH-positivas puedan vivir más tiempo y en mejor estado de salud; evitando además futuras transmisiones del virus hacia otras personas.² Actualmente se encuentran disponibles seis clases diferentes de fármacos para el tratamiento de infecciones por VIH los cuales son administrados en una terapia combinada conocida como terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA).

La transcriptasa reversa (TR) del VIH es una de las dianas moleculares más atractivas para el tratamiento del SIDA. Los inhibidores no-nucleosídicos de la TR (INNTR) se unen a un sitio alostérico de la enzima. Sin embargo, los INNTRs generan fácilmente mutaciones en el VIH dando lugar a diferentes niveles de resistencia a estos fármacos.

El diseño de nuevos fármacos INNTRs es de especial interés debido a sus características de alta selectividad y relativa baja toxicidad. Los nuevos inhibidores de este tipo representan alternativas potenciales a los INNTRs actualmente aprobados, los cuales continúan presentando problemas de resistencia y toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*.

1.2. Acoplamiento molecular (*docking*)

El *docking* molecular es un método computacional del diseño de fármacos asistido por computadora que se emplea para desarrollar modelos de interacción ligando-proteína³. El proceso de *docking* involucra la predicción de la conformación y orientación (*pose*) de un ligando dentro del sitio de unión seleccionado (*pocket*).⁴ Existen dos tipos principales de *docking* (1) rígido-flexible y (2) flexible-flexible, en el primer caso la estructura del receptor permanece estática y el ligando tiene la libertad de ajustarse al sitio de unión; en el segundo el receptor y el ligando tienen ciertos grados de libertad de movimiento dando lugar a una mejor predicción del modo de unión.^{5,6} Un paso complementario al *docking* es el *scoring* que consiste en la predicción de la actividad biológica de un compuesto mediante la evaluación de la fuerza de las interacciones ligando-proteína resultantes con la aplicación funciones especialmente diseñadas para este fin (*scoring functions*).⁴ El conocimiento de la estructura tridimensional de la TR, el blanco de acción de los INNTRs, ha permitido utilizar *docking* para el diseñar nuevos inhibidores potenciales con base en la estructura del receptor.⁷

1.3. *Consensus docking* y *consensus scoring*

Se han desarrollado varios programas computacionales para realizar *docking* molecular (DOCK, FlexX, GOLD, Autodock, GLIDE, ICM); estos cuentan con diferentes algoritmos y parámetros para realizar el *docking* y el *scoring*.⁵ Recientemente se ha aplicado una combinación de las diferentes estrategias de *docking* aplicadas individualmente por cada programa con la finalidad de obtener mejores predicciones. Un enfoque de este tipo es el *consensus docking* en el cual se toman un par de *poses* para un ligando en particular, obtenidas por dos diferentes programas de *docking* y se realiza una nueva evaluación de los resultados en base al

scoring obtenido en cada programa (*consensus scoring*) con la finalidad de mejorar la calidad de los resultados.⁸

1.4. Protein-Ligand Interaction Fingerprints (PLIFs)

Los PLIFs son modelos quimioinformáticos diseñados para “capturar una representación en una dimensión de las interacciones moleculares entre un ligando y una proteína”. Son de gran utilidad para caracterizar y describir a detalle las interacciones ligando-proteína de un grupo de compuestos y reconocer patrones y sitios de interacción entre los distintos ligandos con respecto a una misma proteína.⁹

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Proponer modelos de acoplamiento molecular automatizado (*docking*) de compuestos derivados de piridinona diseñados con la ayuda de métodos computacionales como potenciales inhibidores de TR de VIH.

1.5.2. Objetivos específicos

- Realizar una revisión bibliográfica sobre el desarrollo de los compuestos derivados de piridinona como INNTRs.
- Validar los protocolos de acoplamiento molecular automatizado de inhibidores potenciales de TR de VIH.
- Realizar estudios de quimioinformática y acoplamiento molecular de un grupo de compuestos seleccionados.
- Proponer modelos de *consensus docking* de los compuestos análogos de piridin-2(1*H*)-ona utilizando la estructura cristalográfica la TR de VIH.
- Caracterizar el espacio químico de los compuestos estudiados en referencia a otros inhibidores transcriptasa reversa de VIH conocidos y otros antivirales.

1.6. Hipótesis

Los estudios de quimioinformática y acoplamiento molecular automatizado de los compuestos derivados de piridin-2(1*H*)-ona seleccionados con la estructura cristalográfica de la TR del VIH-1, conducirán a definir los compuestos con mayor actividad potencial contra cepas nativas y mutantes del virus.

2. Antecedentes

2.1. VIH y SIDA

Los retrovirus son un tipo de virus cuyo material genético está compuesto por ARN de cadena simple en sentido positivo (ARNcs+), son conocidos como retrovirus debido a que codifican una enzima llamada TR, la cual convierte el ARNcs+ genómico del virus en ADN de cadena doble (ADNcd) el cual posteriormente se integra permanentemente al cromosoma del hospedero. El retrovirus humano de mayor importancia es el VIH. Existen dos tipos de VIH: VIH-1 y VIH-2. Ambos son agentes etiológicos del SIDA, sin embargo, el primero es considerado como el responsable de la epidemia mundial¹⁰. El VIH-1 puede permanecer en estado latente en la mayoría de los portadores y en condiciones favorables ataca y provoca muerte celular principalmente de los linfocitos T cooperadores CD4+ (LT_h CD4+), los cuales juegan un rol central en la capacidad del hospedero para montar una respuesta inmune ante una amplia gama de infecciones. Las dianas principales del VIH-1 son el receptor CD4 y el correceptor CCR5 que se encuentran en la superficie de las células del hospedero (predominantemente en los LT_h CD4+), moléculas a las cuales se une mediante las proteínas transmembranales virales Gp41 y Gp120 respectivamente¹⁰.

El SIDA está definido como una enfermedad en la cual un paciente positivo a anticuerpos contra VIH, tiene una cuenta de LT_h CD4+ menor a 200/ml o menor al 14% de los linfocitos totales. La consecuencia es una perturbación del equilibrio inmune que provoca la susceptibilidad a una serie de infecciones oportunistas virales, fúngicas y bacterianas; y puede dar lugar a la aparición de neoplasias malignas¹¹.

2.1.1. Tratamiento actual

El tratamiento estándar para pacientes infectados con VIH, conocido como TARGA, consiste en la administración simultánea y a largo plazo de tres o más fármacos anti-VIH de primera línea. Usualmente se utilizan dos INTRs en combinación con un INNTR, un inhibidor de proteasa (IP), o más recientemente con un inhibidor de integrasa (INI). Únicamente cuando la terapia con fármacos de primera línea falla se recomienda utilizar un inhibidor de la fusión Gp41 o un antagonista CCR5 (Tabla 1).

Tabla 1. Fármacos anti-VIH actualmente aprobados y recomendados en el TARGA pertenecientes a las seis clases diferentes de antirretrovirales¹⁰.

INTRs	INNTRs	IPs	INIs	Antagonista CCR5	Inhibidor de la fusión Gp41
Abacavir	Delavirdina	Atazanavir	Raltegravir	Maraviroc	Enfuvirtida
Didanosina	Efavirenz	Darunavir	Elvitegravir		
Emtricitabina	Etravirina	Fosamprenavir	Doluyegravir		
Lamivudina	Nevirapina	Indinavir			
Estavudina	Rilpivirina	Nelfiavir			
Tenofovir DF		Ritonavir			
Zidovudina		Saquinavir			
		Tipranavir			

Tabla 2. Algunas combinaciones de dosis fija de agentes antirretrovirales de una o más clases de fármacos anti-VIH.

Nombre comercial	Fármaco 1	Fármaco 2	Fármaco 3
Trizivir®	Abacavir	Lamivudina	Zidovudina
Atripla®	Efavirenz	Emtricitabina	Tenofovir DF
Complera®	Emtricitabina	Rilpivirina	Tenofovir DF
Truvada®	Emtricitabina	Tenofovir DF	
Epizom®	Abacavir	Lamivudina	
Combivir®	Lamivudina	Zidovudina	

2.1.2. Transcriptasa reversa

La TR del VIH-1 es una enzima contenida dentro del núcleo del virión y codificada en el gen *pol* del virus. Su función es convertir (transcribir) el ARNcs+ en ADN complementario (cADN), el cual es después convertido en ADNcd por la acción ADN polimerasa de la misma TR. El ARNcs+ viral es removido posteriormente del híbrido ARN-ADN resultante mediante la acción ARNasa de la misma enzima TR. El proceso completo es conocido como transcripción reversa.

Debido a la naturaleza altamente propensa a error de la TR del VIH-1, se presentan altos niveles de variación genética que le permiten al virus evolucionar rápidamente para evadir la respuesta inmune y adaptarse a las condiciones cambiantes en el hospedero. Otra consecuencia de la alta tasa de mutación del VIH-1 se asocia con la resistencia cruzada a diversas clases de fármacos antirretrovirales.

La TR es un heterodímero no simétrico que consta de dos subunidades: la p66 (con 560 residuos de aminoácidos) y la subunidad p51 (con 440 residuos de aminoácidos). La Figura 1 muestra una estructura tridimensional (3D) de la subunidad p66 de la TR cuya estructura 3D se ha comparado con una mano derecha con los dominios "dedos", "palma" y "pulgar". En esta analogía, los "dedos" corresponden a los aminoácidos 1-85 y 118-155; la "palma" está asociada con los residuos de aminoácidos 86-117 y 156-237; Y el "pulgar" con los residuos de aminoácidos 238-318. El dominio palma incluye el sitio activo de polimerasa (residuos de ácido aspártico 110, 185 y 186 marcados en rojo en la Figura 1).

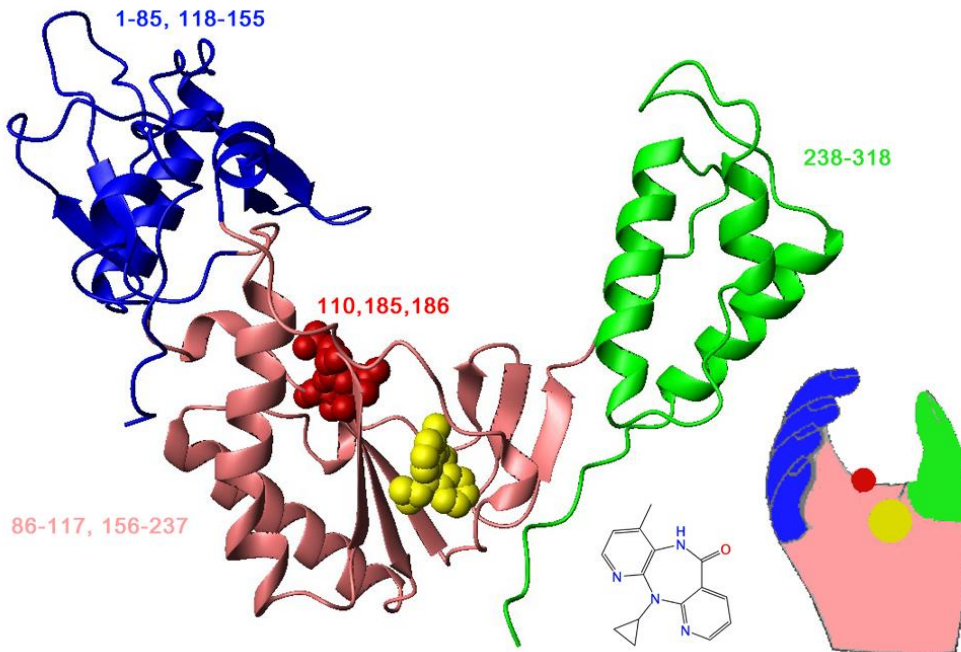


Figura 1. Representación esquemática de la estructura tridimensional del VIH-1 de la TR. Esta representación de cinta del dominio activo de la TR ilustra su estructura parecida a la forma de una mano, mostrando los dedos (azul), la palma (rosa) y el pulgar (verde). Los dedos corresponden a los aminoácidos 1-85 y 118-155; la palma se asocia con residuos de aminoácidos 86-117 y 156-237; y el pulgar con los residuos de aminoácidos 238-318. El sitio activo (Asp110, Asp185, Asp186 y), donde es elongado el ADN, se encuentra en la región de la palma. También es la posición del inhibidor de TR Nevirapina (amarillo) en el sitio de unión no nucleósido. Adaptado de http://www.psc.edu/science/Madrid/getting_a_grip_on_aids.html

2.1.3. Inhibidores de Transcriptasa Reversa

La TR es considerada una diana molecular fundamental en el TAR debido a que desempeña un papel clave en el ciclo de replicación del virus dentro del hospedero y utilizando como estrategia la inhibición de la TR se han desarrollado los ITRs. Existen dos clases de fármacos anti-TR: los inhibidores nucleosídicos de TR (INTR) y los inhibidores no-nucleosídicos de TR (INNTR). Los INTR son análogos de nucleósidos, que son fosforilados y convertidos a trifosfatos por las enzimas de la célula huésped. Este tipo de compuestos simulan al dNTP pero debido a que **carecen de un 3'-hidroxil** terminan prematuramente la síntesis de DNA. La Zidovudina (AZT) (Figura 2), fue el primer fármaco útil para tratar la

infección por VIH. Su relativa selectividad se debe a su afinidad por la TR del VIH-1 que es 100 veces mayor a que tiene por la ADN polimerasa del hospedero.¹² Sin embargo, la AZT frecuentemente presenta problemas de toxicidad que incluye malestar, náuseas y toxicidad en la médula ósea. Además genera resistencia relacionada a una o más mutaciones en el gen de la TR y ahora sólo se recomienda su uso en combinación mediante la TARGA.¹³

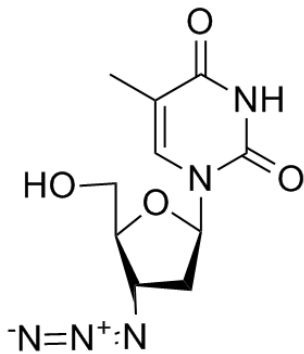


Figura 2. Estructura química de la AZT, un compuesto de didesoxi-nucleósido en el que el grupo 3'-hidroxi del residuo de azúcar ha sido reemplazado por un grupo azido. Esta modificación previene la formación de enlaces fosfodiéster que son necesarios para la terminación de las cadenas de ADN durante la transcripción reversa.

2.2. Inhibidores no-nucleosídicos de transcriptasa reversa

Contrario a los INTRs, los INNTRs son altamente selectivos hacia la TR del VIH-1 y por lo tanto, ejercen mínimos efectos secundarios. De hecho, los INNTRs siguen siendo un componente principal de la terapia anti-VIH.¹⁴

El dominio de palma de la estructura 3D de la TR (Figura 1) también incluye el sitio de unión (alostérico) para INNTRs que se encuentra a aproximadamente 10 Å de distancia del sitio catalítico (región amarilla en la Figura 1). Este sitio alostérico es de naturaleza hidrófoba. Se compone de dos residuos en la subunidad p51: Ile135 y Glu138, y de los siguientes residuos en la subunidad p66: Tyr181, Tyr188, Phe227, Trp229 y Try232 (aromático); Pro59, Leu100, Val106, Val179, Leu234 y Pro236 (hidrófobo) y Lys101, Lys103, Ser105, Asp132 y Glu224 (hidrófilo). Este sitio de unión no existe en la TR no unida a ligando, pero se crea tras la unión de un INNTR.

2.2.1. INNTRs aprobados para uso clínico

Actualmente existen cinco INNTRs aprobados para uso clínico que pueden agruparse en tres generaciones basadas en su perfil de actividad y aprobación (Tabla 1 y Figura 3A). La primera generación: Nevirapina (aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 1996), Delavirdina (aprobada en 1997) y Efavirenz (aprobado en 1998). Nevirapina y Efavirenz siguen siendo una parte importante del TARGA, en particular Efavirenz, que es el INNTR más utilizado. En general, la Delavirdina es mucho menos utilizada debido a su farmacocinética deficiente. La primera generación de INNTRs se caracteriza por una baja barrera genética a la resistencia (es decir, sólo una mutación es suficiente para reducir la eficacia de estos compuestos), por lo que usualmente se co-administran con al menos otros dos fármacos antirretrovirales de clase distinta a los INNTRs. La Etravirina, también administrada en combinación con otros fármacos antirretrovirales, fue el primer INNTR de próxima generación aprobado por la FDA en 2008. Este fármaco se caracterizó por conservar su actividad contra cepas mutantes. Rilpivirina fue el siguiente fármaco aprobado en 2011 por la FDA para uso clínico. Este fármaco pertenece a la misma clase química que la Etravirina (Figura 3A) pero tiene un mejor perfil de actividad contra cepas mutantes. Efavirenz y Rilpivirina son parte de las terapias de combinación Atripla y Complera (Tabla 2) que están entre las terapias más eficaces. Sin embargo, la mutación rápida del virus, los efectos secundarios y las propiedades farmacológicas no óptimas de los INNTRs actuales inducen a la necesidad de desarrollar nuevos INNTRs. Por ejemplo, la hepatotoxicidad y el sarpullido severo están asociados con el uso de Nevirapina. Efavirenz se asocia con efectos secundarios del sistema nervioso central (SNC) que a veces son difíciles de superar, especialmente en los primeros días de la administración. Se han observado reacciones de

hipersensibilidad y otros efectos adversos en el tratamiento con INNTRs de segunda generación.

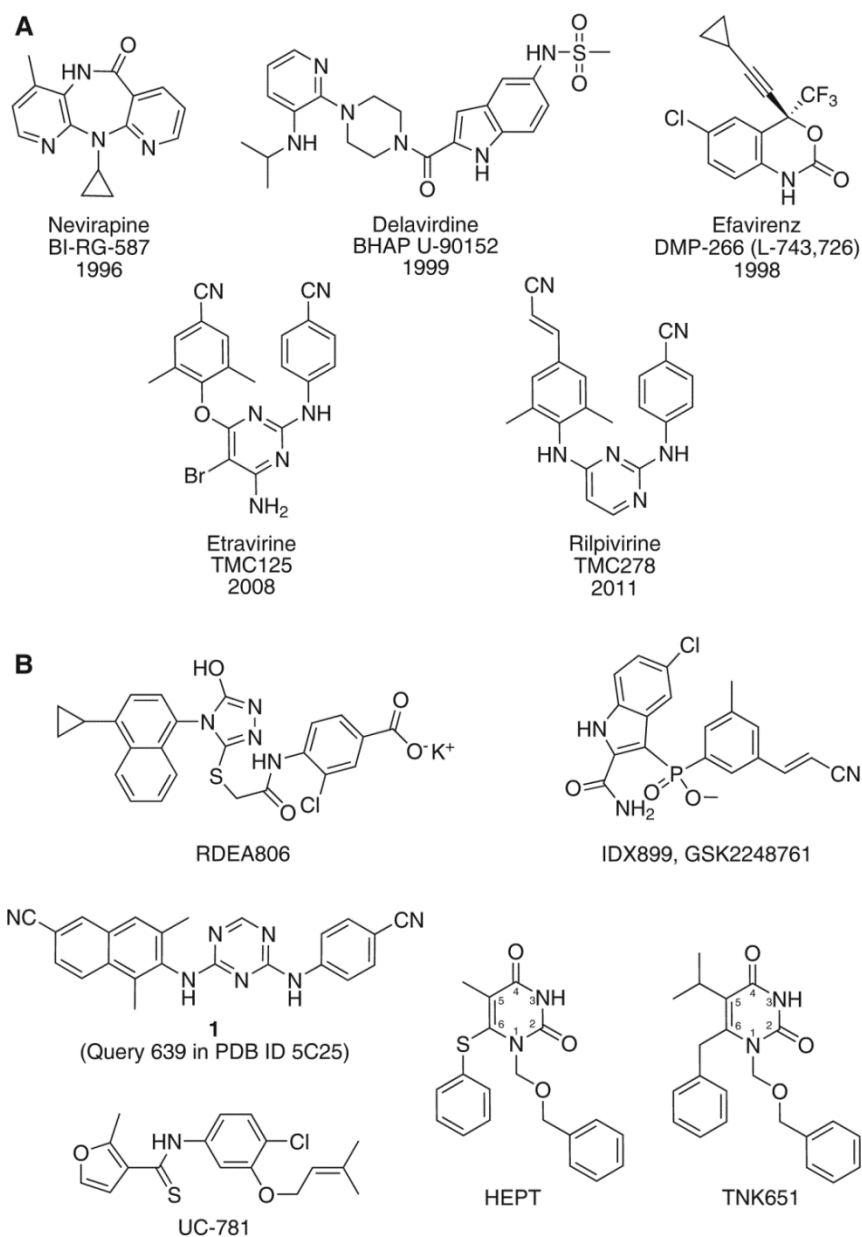


Figura 3. Estructuras químicas de los derivados de piridin-2(1*H*)-ona representativos analizados en este trabajo. La numeración del anillo piridinona se muestra en la estructura de L-345516. El perfil de actividad de los compuestos seleccionados contra de tipo salvaje y cepas mutantes se resume en la Tabla 3.

2.2.2. Superando la resistencia a los INNTRs

Como se ha comentado por Das *et al.*, es deseable que un INNTR interfiera con la replicación de cepas resistentes y preserve la potencia durante largos períodos de tiempo.¹⁵ Las mutaciones asociadas con la resistencia a INNTRs están situadas dentro del sitio de unión a INNTRs, casi todos los

residuos en la cavidad pueden mutar y la mayoría de ellos pueden conferir resistencia.¹⁶ Ejemplos de las mutaciones observadas son L100I, K101E, V106A, K103N, V179D, Y181C, Y188L, G190A y E138K en la subunidad p51. Dos de las mutaciones más relevantes desde el punto de vista clínico son K103N y Y181C. En particular, la mutación K103N da un nivel casi uniforme de resistencia cruzada a la mayoría de los INNTRs. Béthune publicó una extensa revisión de mutaciones comunes asociadas con la resistencia a los INNTRs y su impacto en la susceptibilidad del VIH-1 a los INNTRs.¹⁴

Las mutaciones eliminan las interacciones clave (farmacofóricas) de la TR con el INNTR, o afectan el tamaño/forma del sitio de unión evitando que el INNTR se una adecuadamente. Específicamente, las mutaciones Y181C o Y188L causan la pérdida de interacciones de apilamiento de anillos aromáticos; las mutaciones L100I o G190A/S están asociadas con impedimento estérico y las mutaciones V106A o V179D modifican las interacciones hidrófobas. También se ha comentado que la mutación K103N podría inducir resistencia mediante la estabilización de la forma no unida de TR.¹⁷

Durante el diseño y desarrollo de INNTRs con actividad mejorada contra mutantes resistentes se ha observado que la flexibilidad conformacional y la adaptabilidad posicional juegan un papel importante para conservar la actividad contra cepas mutantes. Un ejemplo es el desarrollo de la Etravirina (Figura 3A), una diarilpirimidina o derivado DAPY, mediante estructuras cristalográficas y estudios de modelado molecular se reveló la flexibilidad de torsión de ciertos enlaces químicos en la estructura estratégicamente localizados, además de la capacidad de la molécula para adaptar su posición y orientación, están asociados con una potencia conservada contra una amplia gama de TRs de VIH-1 resistentes a fármacos. Esto se ejemplifica por las estructuras de alta resolución del

análogo Rilpivirina (Figura 3A) unida a TR de VIH-1 WT y a dobles mutantes K103N/Y181C y L100I/K103N. La Rilpivirina inhibe a las mutantes de TR K103N, Y181C y K103N/Y181C a concentraciones $CE_{50} < 1 \text{ nM}$. Se concluyó que las estructuras cristalográficas (PDB IDs: 2ZD1, 3BGR y 2ZE2, respectivamente) dieron una comprensión del papel de la flexibilidad del inhibidor para compensar las mutaciones para resistencia a fármacos.¹⁸

2.2.3. INNTRs en desarrollo pre-clínico y clínico

Las estructuras químicas de los INNTRs son muy diversas y comprenden más de 50 familias de moléculas. Li *et al.* publicó un artículo realizando una revisión actualizada de recientes INNTRs¹⁹ destacando las clases químicas discutidas en la literatura de patentes de 2011 a 2014. Además de los fármacos aprobados para uso clínico (Figura 3A), otros compuestos están en desarrollo clínico como el triazol RDEA806 Y el fosfoindol IDX899 (GSK2248761) (Figura 3B).

Las arilaminoazinas bicíclicas son ejemplos de una de las clases de compuestos en desarrollo (preclínico). Extensos estudios de relaciones estructural-actividad (SAR), complementados con análisis estructural, han conducido recientemente a dos compuestos con potencia sub-10 nM frente a VIH-1 WT y Variantes virales clínicamente relevantes (compuesto 1 en la Figura 3B). Los compuestos también mostraron una citotoxicidad y solubilidad aceptables, mejor que la Rilpivirina.

2.3. Derivados de piridin-2(1H)-ona

Entre la diversidad química de los INNTRs, las 6 piridin-2(1H)-onas representan una clase de compuestos potencialmente buenos candidatos a fármacos. Esta familia química ha evolucionado a partir de los INNTRs

típicos que inicialmente eran inactivos frente a cepas mutantes, hacia avanzadas generaciones con un perfil de actividad mejorado frente a mutantes clínicamente relevantes. La Figura 4 muestra las estructuras químicas de moléculas representativas de esta clase.

2.3.1. Piridinonas de Merck

Los derivados de piridin-2(1*H*)-ona como INNTRs se reportaron por primera vez en 1991. Estos compuestos se identificaron a partir de un programa de cribado (*screening*) en Merck. Uno de los primeros inhibidores potentes y selectivos de la TR del VIH-1 de esta clase tenía un anillo de ftalidimida y la molécula (L-345,516) era hidrolíticamente inestable. Un amplio programa de optimización llevó al desarrollo de grupos de compuestos que pasaron a ensayos clínicos. Los compuestos representativos son las piridinonas L-697,661, L-697,639 y L-696,229 de Merck (Figura 4). Sin embargo, el surgimiento de resistencia obstaculizó su posterior desarrollo. En particular, la rápida aparición de cepas de VIH-1 que contenían las mutaciones Y181C, Y188L y K103N resistentes a fármacos llevó finalmente al abandono del desarrollo clínico de las piridinonas de Merck. Sin embargo, el anillo de piridin-2(1*H*)-ona permaneció como núcleo básico para su optimización ulterior.

Como parte de la optimización temprana de las piridinonas Merck se acumuló una cantidad importante de información SAR. Por ejemplo, para la serie de piridinonas de Merck, 5-etil/6-metilo fue la mejor combinación de grupos alquilo en las posiciones C-5 y C-6. Esta combinación óptima fue el punto de partida para desarrollar nuevos derivados con perfil de resistencia mejorado.

2.3.1.1. Docking con piridinonas de Merck

Durante el desarrollo inicial de los derivados de piridin-2(1*H*)-ona como INNTRs se realizaron simulaciones computacionales para ayudar en la elucidación de las SAR a nivel estructural. Es de notar que no existían estructuras cristalográficas de la TR unidas a esta clase de inhibidores. El acoplamiento flexible de piridinonas Merck con una serie de estructuras cristalográficas de TR co-cristalizadas con otros INNTRs indicó que las piridinonas adoptan la conformación clásica mariposa de varios otros INNTRs. Los modelos de acoplamiento también indicaron que el grupo NH lactámico forma el enlace de hidrógeno "firma" con Lys101 que tienen muchos INNTRs. Los resultados también sugirieron que el anillo de benzoxazol de compuestos tales como L-697,661 y L-696,229 (Figura 4) formaba interacciones aromáticas con Tyr181. Por lo tanto, los modelos de acoplamiento proporcionaron un fundamento basado en la estructura para reemplazar el anillo de benzoxazol con otro residuo estructural.²⁰

2.3.2. Desarrollo de híbridos de piridin-2(1*H*)-ona con otros INNTRs

En 1995 se publicaron los resultados de la síntesis de híbridos con HEPT (1-[(2-hidroxietoxi)metil]-6-(feniltio)timina) y análogos como TNK65120 (ambas estructuras en la Figura 3B) como una de las primeras modificaciones de las piridinonas de Merck para mejorar el perfil de actividad frente a mutantes resistentes a fármacos. El diseño híbrido se basó en la comparación y la sustitución de la estructura de la piridin-2(1*H*)-ona con el anillo de pirimidina central del HEPT; si la 3-4 NH lactama del anillo de pirimidina de TNK651 (Figura 3B) se superpone con la NH lactama del anillo de piridin-2(1*H*)-ona (Figura 3A), el bencilo en C-6 de TNK651 (o 6-feniltio de HEPT) es equivalente a la posición C-4 del anillo de piridin-2(1*H*)-ona (Figura 4). Las estructuras cristalográficas de TR en complejo con TNK651 revelaron la importancia del grupo bencilo en el C-6 para

potenciar las interacciones con el sitio de unión. Esta combinación dio lugar a la nueva subclase 4-(ariltio)-piridin-2(1*H*)-onas. Otras investigaciones SAR en el 2000 llevaron al desarrollo de las 4-bencilpiridin-2(1*H*)-onas.

Uno de los primeros compuestos potenciales candidatos a fármaco de la subclase 4-bencilo fue el compuesto **2** (Figura 4 y Tabla 3). Además de tener un grupo 3,5-dimetilbencilo en C-4, esta molécula se caracteriza por tener un grupo dimetilamino en C-3, un grupo etilo en C-5 del anillo de piridinona y un grupo metilo en C-6. La 4-bencilpiridin-2(1*H*)-ona **2** mostró una fuerte inhibición de la TR recombinante del VIH-1 y la inhibición nanomolar de una cepa de VIH-1 resistente a Nevirapina. Debe observarse que el 5-etil en las posiciones C-5 y C-6 de las piridinonas de Merck influyó en gran medida en el desarrollo de la primera serie de híbridos piridin-2(1*H*)-ona/HEPT. Como se describe a continuación, la mejora adicional pero independiente del HEPT que dio lugar al TNK65120 orientó el diseño de otros híbridos de piridin-2(1*H*)-ona/HEPT con diferentes sustituyentes, en particular en el C-6. Curiosamente, durante el desarrollo inicial de las 4-(ariltio)-piridin-2(1*H*)-onas y 4-bencilpiridin-2(1*H*)-onas, no se reportaron estudios de acoplamiento con estructuras cristalográficas de TR disponibles hasta ese momento.

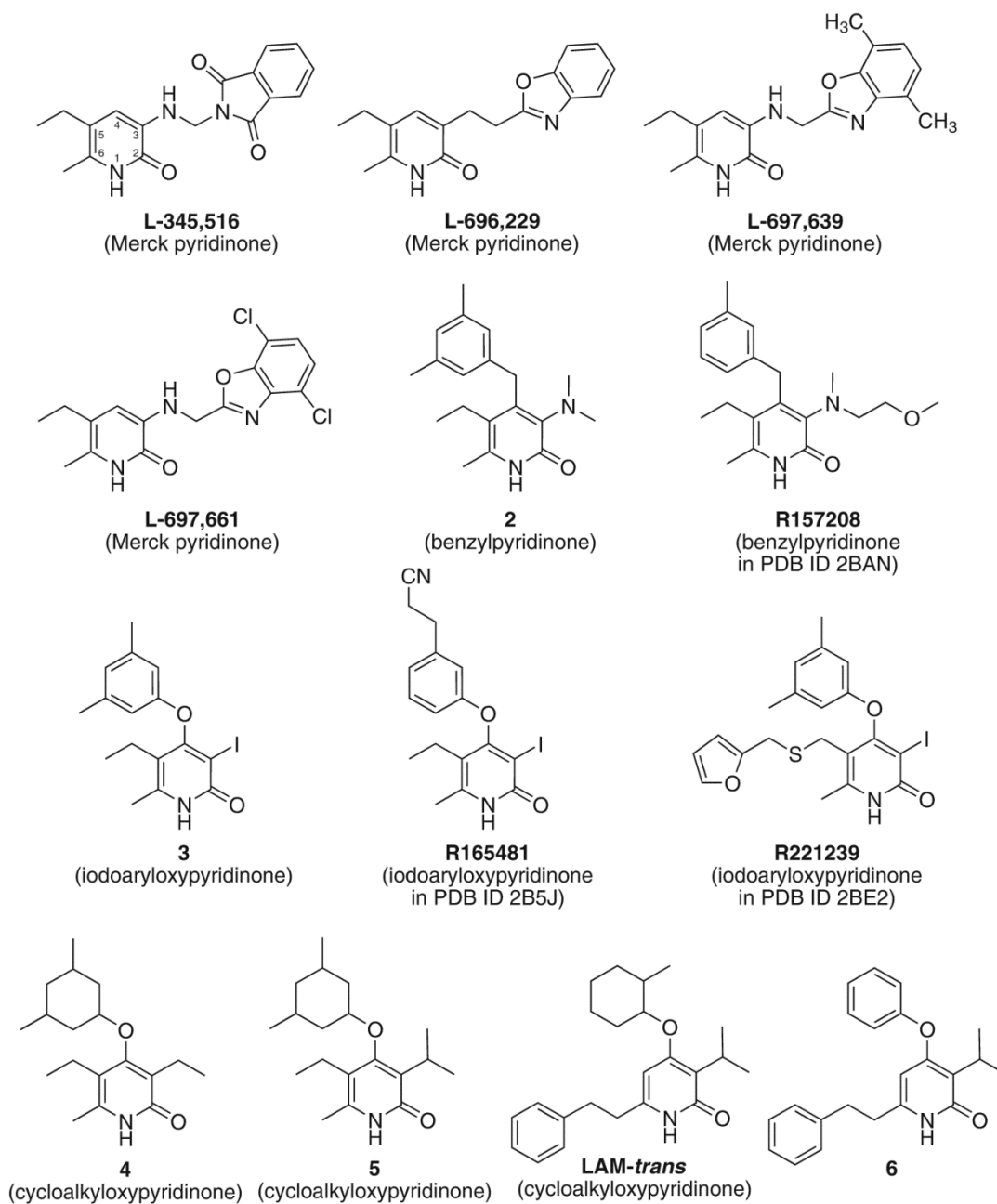


Figura 4. Estructuras químicas de los derivados de piridin-2(1*H*)-ona representativos analizados en este trabajo. La numeración del anillo piridinona se muestra en la estructura de L-345,516. El perfil de actividad de los compuestos seleccionados contra de tipo silvestre y cepas mutantes se resume en la Tabla 1.

2.3.3. Estructuras cristalográficas del desarrollo posterior de híbridos de piridin-2(1H)-ona con otros INNTRs

Durante los años siguientes Benjahad *et al.* continuaron la exploración de las SAR de las 4-ariltiopiridinonas y benzilpiridinonas. Uno de los compuestos que surgieron fue la benzilpiridinona R157208 (Figura 4). Una característica estructural particular de este compuesto es un sustituyente N-3. El perfil de actividad *in vitro* de este compuesto se resume en la Tabla 3. Un perfil extenso de actividad en dobles mutantes es detallado completamente en Benjahad *et al.*²¹ R157208 mostró un perfil de actividad aceptable frente a cepas mutantes clínicamente relevantes, comparable a la de Efavirenz. Sin embargo, en el estudio SAR otros análogos relacionados con la estructura de R157208, mostraron un mejor perfil global, comparable al de la molécula original. En ese trabajo se llegó a la conclusión de que la sustitución en el extremo N-3 es muy sensible a la actividad. En particular, aumentando el volumen estérico en este retiene una influencia negativa sobre la actividad.

Una contribución notable de un amplio esfuerzo del estudio SAR fue la generación de una estructura cristalográfica de R157208 en complejo con TR WT publicado primero en Benjahad *et al.*²¹ y luego analizado más a fondo en Himmel *et al.*²² La estructura co-cristalizada reveló que el sustituyente 4-bencil tiene interacciones con la cavidad hidrófoba formada por los residuos Tyr188 y Trp229. El grupo en el C-3, es decir la 3-(2-metoxietil) metilamina, hace que las interacciones sean principalmente con la Tyr181.

Tabla 3. Perfil de actividad de compuestos seleccionados derivados de piridinona e INNTRs de referencia de otras clases químicas frente a TR de HIV-1 de tipo silvestre y mutante.

Compuesto	CI ₅₀ TR (μM)	CE ₅₀ (μM) WT TR	CE ₅₀ (μM) K103N	CE ₅₀ (μM) Y181C	CE ₅₀ (μM) K103N/Y181C	CE ₅₀ (μM) L100I/K103N	IS ^a
2	0.02	0.0002 ⁺	NA	NA	NA	NA	>5000
3	ND	0.0013 ⁺	0.003	0.020	0.040	0.020	9000
4	ND	<0.001	0.005*	0.015*	0.107*	0.081*	>67000
5	ND	<0.001	0.002*	0.006*	0.105*	0.044*	>82000
6	0.089	0.0563	ND	ND	ND	ND	3467
R157208	ND	0.001 ⁺	0.079	0.794	10	0.794	10000
R165481	ND	0.0008	0.001	0.004	0.004	0.008	ND
R221239	ND	0.002	0.001	0.005	0.005	0.032	ND
LAM-trans	0.003	0.036	0.075	0.190	ND	ND	3177
Nevirapina	4.65 ^b	0.190 ^b	>10 ^c	>10 ^c			1074 ^b
Efavirenz ^d		0.001	0.039	0.002	0.04	>10	
Etravirina ^d		0.002	0.001	0.006	0.005	0.01	
Rilpivirina ^d		0.0004	0.0003	0.0001	0.0008	0.008	

+ Línea celular LAI

* (Células TZM-bl)

^a Índice de selectividad: proporción de citotoxicidad (CC₅₀) a CE₅₀

^b Infección HIV-1_{SF33} en líneas celulares TZM-bl

^d Valores de CE₅₀ en μM

Casi al mismo tiempo que se publicó la estructura cristalográfica de la TR del VIH-1 en unión con R157208, Himmel *et al.* publicaron otras dos estructuras cristalográficas de TR de VIH-1 unida a las piridin-2(1*H*)-onas R165481 y R221239 (Figura 4). Estas dos moléculas pertenecen a la subclase 3-yodo-4-ariloxipiridinona (IOPY). Curiosamente, uno de los compuestos líder anteriores de la subclase IOPY, el compuesto 3 (Figura 4 y Figura 3), fue desarrollado inicialmente con el objetivo de desarrollar una ruta sintética para introducir una amplia variedad de sustituyentes en C-3. Inesperadamente, el compuesto 3 se convirtió en un compuesto líder con

un perfil de actividad potencial como fármaco contra varias cepas mutantes resistentes a fármacos, como se muestra en la Tabla 3.

La Tabla 4 resume la información cristalográfica disponible para piridin-2(1*H*)-onas unidas a TR de VIH-1. Otras estructuras seleccionadas se muestran para comparación.

R165481 y R221239 se caracterizan por la sustitución del yodo en C-3, en contraste con el grupo 3-(2-metoxietil)metilamino de R157208 (Figura 4). Al igual que R157208, los compuestos R165481 y R221239 tienen actividad nanomolar o sub-nanomolar con la TR WT pero diferentes actividades contra cepas resistentes a fármacos. La Tabla 3 resume el perfil de actividad contra WT y cepas mutantes representativas. Más información sobre la actividad se presenta en Himmel *et al.*²² Es de destacar que las estructuras cristalográficas de los dos compuestos co-cristalizados que tienen un átomo de yodo en C-3 no hacen amplios contactos con Tyr181. De hecho, el perfil de actividad fuerte de R165481 y R221239 contra mutantes se puede atribuir en parte a la interacción del átomo de yodo C-3 con el oxígeno de la cadena principal del carbonilo de la Tyr188. También se concluyó en este estudio que el sustituyente acrilonitrilo en el C-4 del anillo fenoxilo de R165481 interactúa más con residuos conservados del sitio de unión para INNTRs. Estas observaciones ayudaron a proporcionar una explicación racional de la actividad mejorada de R165481 contra TR WT y variantes resistentes a fármacos. R221239 se caracteriza además por tener un conector flexible a un anillo furano en C-6 que hace que favorables las interacciones con Val106, Phe227, y Pro236.

Tabla 4. Estructuras Cristalográficas de TR de HIV-1 co-cristalizadas con derivados de piridinona y otros INNTRs representativos discutidos en el presente trabajo.

PBD ID	Descripción	Resolución (Å)	INNTR Co-cristalizado
2BAN	WT HIV-1 RT/ATP	2.95	R157208
2B5J	WR HIV-1 TR	2.90	R165481
2BE2	WT HIV-1 TR	2.43	R221239
1RT2	WT HIV-1 TR	2.55	TNK651
1FKP	Mutante K103N en complejo con Nevirapina	2.9	Nevirapina
1JLA	Mutante Y181C en complejo con TNK-651	2.5	TNK651

2.3.4. Derivados de la 4-cicloalquinoxipiridin-2(1H)-ona

Las SAR de la posición C-4 del anillo de piridinona fueron exploradas en gran medida mediante el uso de diversos sustituyentes que incluyen ariltio, ariloxi, o bencilo. En 2009, Le Van *et al.* reportaron una nueva serie de derivados de la 2-4-cicloalquinoxipiridin(1H)-ona.¹⁷ Los mejores compuestos fueron 4 y 5 (Figura 4). Estos dos compuestos mostraron una alta potencia contra la TR de VIH-1 WT y una serie de mutantes simples y dobles. Además, ambas moléculas mostraron baja toxicidad. El perfil de actividad antiviral se resume en la Tabla 3. El *docking* de las piridinonas recién sintetizadas con una estructura co-cristalizada de TR unida a TNK651 (PDB ID: 1RT2, Tabla 4) mostró el modo de unión esperado que se caracteriza por las siguientes interacciones: el grupo NH lactámico forma un enlace de hidrógeno con la Lys101 y el grupo C-4 se encuentra en el sitio hidrofóbico interactuando con la Tyr181, Tyr188, Phe227, y Trp229. En ese modelo de unión, los sustituyentes C-5 apuntan hacia la Try181. El grupo C-3 está cerca de la Pro236, que es la región más flexible del sitio alostérico. El *docking* del compuesto **4** con WT y mutantes K103N sugirió que este compuesto y otros derivados estructurales activos contra cepas mutantes muestran actividad debido a su capacidad de adoptar un

modo de unión diferente con el sitio de unión mutado. Por ejemplo, el carbonilo del anillo de piridinona está cerca del grupo amida de la Asn103 que sugiere una interacción electrostática favorable con la mutante K103N.¹⁷

2.3.5. Desarrollo de híbridos piridin-2(1H)-ona/TNK651

En 2013 Li *et al.* publicaron sobre el desarrollo de nuevos compuestos basados en un diseño híbrido de las piridinonas de Merck (Figura 4) y TNK651 (Figura 3B), previamente planteado por los mismos autores.²³ La nueva serie de 2-piridin-(1H)-onas se caracteriza por un grupo cicloalquiloxi en C-4 con diversos sustituyentes en C-3 y C-6. Durante el diseño de los nuevos compuestos se planteó la hipótesis de que incluir un anillo saturado en C-4 podría aumentar la flexibilidad de la molécula que se sabe que es característica deseable para conservar la potencia con cepas resistentes a fármacos. También se planteó la hipótesis de que la inclusión de un grupo metilo al anillo en el C-4 podría mejorar las interacciones con el residuo conservado W229 y, al mismo tiempo, la reducción de las interacciones de apilamiento π - π con la Y181. Los sustituyentes en C-6 fueron elegidos en base a la comparación con la estructura y la información de las SAR disponibles para TNK651. En particular, se propuso que un sustituyente con una cadena lateral larga con relación a esta posición se podría extender en un túnel que conecta el sitio alostérico los catalíticos rodeados por la Pro236 y Tyr318. Estas interacciones son conocidas por favorecer la afinidad con la TR de VIH-1 WT y cepas mutantes clínicamente relevantes. El compuesto con el mejor perfil de actividad fue LAM-*trans*, el cual tiene un grupo isopropilo en C-3, un ciclohexilo sustituido en C-4 y feniletilo en el C-6 de la cadena lateral (Figura 4). Esta molécula mostró una $CI_{50}=0,003 \mu\text{M}$ en un ensayo de

inhibición enzimática, una $CE_{50}=0.036 \mu\text{M}$, y citotoxicidad $CC_{50}=114.38\mu\text{M}$ (Tabla 3). El índice de selectividad correspondiente (IS) fue 3177, que fue significativamente mejor que para Nevirapina en las mismas condiciones de ensayo. Por otra parte, LAM-*trans* mostró una fuerte inhibición de las mutaciones simples K103N y Tyr181C con una CE_{50} de $0.075 \mu\text{M}$ y $0.190 \mu\text{M}$, respectivamente. En particular, se observó que la configuración del grupo ciclohexilo sustituido en C-4 tuvo un impacto dramático en la actividad antiviral, en particular contra cepas mutantes. Este es un buen ejemplo de un "activity cliff" (en particular un activity cliff 3D), es decir, compuestos con estructura similar pero gran diferencia en el perfil de actividad.^{24,25} La alta sensibilidad del perfil de actividad a la configuración de la molécula puede estar asociada con la flexibilidad del sitio de unión.

Li *et al.* también reportaron el *docking* de LAM-*trans* y análogos estructurales, es decir, compuestos con un átomo de yodo en C-3, con una estructura co-cristalizada de TR unida a TNK651 (Tabla 4). Los modelos de *docking* apoyaron la hipótesis de que el feniletilo en C-6 interactúa con la Tyr318 y Pro236. El *docking* de un análogo con un átomo de yodo en C-3 también confirmó la hipótesis de un enlace de halógeno con el oxígeno del carbonilo de la Tyr188. Como era de esperarse, en los modelos de *docking*, el sustituyente 2 metil-ciclohexilo en C-4 se orienta hacia la subcavidad hidrofóbica formada por los residuos Tyr188, Phe227, y Trp229. EL compuesto LAM-*trans* también se acopló con estructuras cristalográficas de dos mutantes de TR, K103 y Y181C respectivamente. De acuerdo con los datos experimentales, los resultados del *docking* mostraron que se perdieron algunas de las interacciones proteína-ligando detectadas con la forma nativa. Sin embargo, algunas interacciones clave con el sitio de unión permanecieron; esto explica en parte la actividad de LAM-*trans* contra cepas mutantes. Por ejemplo, el enlace de hidrógeno con la Lys101 se conservó en el modelo de *docking* con la mutante Y181C. También con

la mutante Y181C, se conservaron las interacciones del grupo feniletilo C-6 con la Tyr318 y Pro236. Con ambas mutantes, el anillo ciclohexilo de las LAM-*trans* interaccionó con el sitio hidrófobo formado por la Tyr188 y Trp229.

Con base en la estructura química de LAM-trans (Figura 5) en 2015 Cao *et al.* Publicaron la exploración de las SAR modificando las posiciones 3 y 4 del anillo de la piridin-2(1*H*)-ona manteniendo constante un 6-feniletilo en el C-6 de la cadena lateral.²⁶ En la posición C-3 los autores evaluaron las SAR de los halógenos I y Br, y dos sustituyentes con carácter estérico o lipófilos: isopropilo y N,N-dimetilo. Una de las ideas de incluir halógenos en C-3 era favorecer una unión halógena con el oxígeno carbonilo del residuo Tyr181. En la posición C-4 Cao *et al.* exploraron las SAR en anillos saturados y aromáticos con oxígeno, azufre y enlazadores de nitrógeno (O, S, NH) que tienen diferente electronegatividad en sitio de unión. De los 16 compuestos sintetizados, el grupo isopropilo en C-3 y fenilo en C-4 mostraron la mejor actividad inhibidora para TR de VIH-1 en un ensayo de inhibición enzimática. El compuesto **6** con un ligante de oxígeno (Figura 4) también mostró la mejor actividad antiviral en un ensayo basado en células con una CE₅₀=0.056 μ M, y citotoxicidad CC₅₀=195.2 μ M. El IS (3467) fue mejor que el valor obtenido para la Nevirapina en las mismas condiciones del estudio. Los estudios de *docking* de un análogo estrechamente relacionado de **6** pero con un enlace de azufre con una estructura co-cristalizada de TR unida a TNK651 (Tabla 4) mostraron la conformación de unión prevista caracterizado por dos interacciones notables, a saber: la interacción de enlace de hidrógeno del grupo NH de la anillo de la 2-piridin(1*H*)-ona con el oxígeno del esqueleto de la Lys101, e interacciones apilamiento π - π del grupo fenilo en el C-4 con la Tyr188. El compuesto acoplado mostró un modo de unión comparable a la posición del ligando co-cristalizado. Además el posterior *docking* de un análogo

estructural de **6**, pero con un átomo de yodo en C-3 también apoya la hipótesis de un enlace halógeno con el oxígeno del carbonilo de la Tyr188. Queda pendiente el probar la actividad del compuesto **6** contra cepas mutantes resistentes a fármacos.

2.3.6. Nueva generación de piridinonas con perfil de actividad mejorado

Inspirados por el éxito en el diseño de los híbridos piridin-2(1*H*)-ona/HEPT, en conjunto con estudios de *docking* y análisis estructural de los modos de unión predichos de las piridinonas de Merck con las estructuras cristalográficas de los INNTRs como UC-781 (Figura 3B), en 2007 Medina-Franco *et al.* diseñaron *in silico* híbridos piridin-2(1*H*)-ona/UC-781.³ Una molécula representativa propuesta en este estudio fue el compuesto 7 (Figura 5A). Contrario a introducir un sustituyente con un anillo aromático en C-4, en ese estudio se propuso agregar un sustituyente alifático en la misma posición. El sustituyente alifático debía ser capaz, al menos en un principio, de interactuar con los residuos conservados, tales como Trp229. Además, las instauraciones en el sustituyente alifático que aún podrían hacer que el las interacciones π - π aromáticas con la Tyr181 pero tales interacciones deben ser menos significativas en comparación con las interacciones π - π aromáticas de las piridinonas Merck predecesoras. A partir de este diseño, Chávez *et al.* diseñaron y sintetizaron una serie de compuestos tales como DH-6, DH-7, DH-10, DH-11, y DH-13 (Figura 5A)²⁷. Estos compuestos se caracterizan por tener un sustituyente alifático en la posición C-4 y diferentes grupos polares en el C-3.

2.3.7. Contribución de los métodos computacionales al desarrollo de derivados de piridin-2(1H)-ona

A pesar de que el diseño *de novo* basado en la estructura de diferentes andamios de INNTRs es un reto (debido al mecanismo de ajuste inducido de estos compuestos), el modelado molecular y el análisis computacional han jugado un papel clave en los esfuerzos multidisciplinarios para desarrollar INNTRs, por ejemplo, para el desarrollo de fármacos comercializados como Etravirina y Rilpivirina. A la luz de estas aplicaciones exitosas, diversas estrategias computacionales siguen formando parte de equipos multidisciplinarios para diseñar compuestos anti-VIH. Por ejemplo, Tarasova *et al.* recientemente publicaron los estudios QSAR de dos grandes bases de datos de Thomson Reuters, Integrity y ChEMBL, con datos de actividad para la inhibición de la TR del VIH-1.²⁸ El propósito de este trabajo se centró en el desarrollo de métodos para evaluar la viabilidad del uso de estas grandes bases de datos para el modelado QSAR. En un trabajo independiente pero también reciente, Kurczyk *et al.* publicaron un cribado virtual basado en el ligando de 1,5 millones de compuestos comercialmente disponibles para identificar nuevos quimiotipos con actividad anti-VIH-1.²⁹ Los primeros pasos del cribado virtual se centraron en los inhibidores de la integrasa del VIH. Los autores de ese trabajo identificaron dos nuevos quimiotipos con potencial actividad antirretroviral y buenos candidatos para iniciar un programa de optimización de compuestos *hit*. Un tercer ejemplo reciente es el diseño *in silico de novo* de nuevos NNRTIs utilizando un enfoque de modelado bio-molecular. Métodos computacionales han ayudado a avanzar en el desarrollo de derivados de piridin-2(1H)-ona. Como se discutió anteriormente, los estudios computacionales han contribuido a proporcionar hipótesis que explican la actividad de las piridinonas Merck y

de compuestos de nuevo diseño contra cepas WT y mutantes. La mayoría de los estudios implican *docking*, utilizando varios programas

Tabla 5. Estudios computacionales representativos para el desarrollo de derivados de piridinona

Estudio	Enfoque computacional	Resultados principales
<i>Docking</i> flexible de piridinonas de Merck seleccionadas	<i>Docking</i> con Autodock utilizando estructuras cristalograficas de TR unidas a INNTRs diferentes a las piridinonas.	Las piridinonas adoptan una conformación en forma de mariposa en el sitio de unión para INNTR; el grupo NH lactámico forma el enlace de hidrógeno firma con la Lys101; el anillo benzoxazol de la L-697,661 y la L-696,229 forman interacciones con la Tyr181.
<i>Docking</i> y QSAR de 40 piridinonas de Merck	3D-QSAR, CoMFA y CoMSIA y <i>docking</i> con Autodock.	Hipótesis: el anillo benzoxazol de las piridinonas de Merck está implicado en la pérdida de la actividad tras la mutación en la Y181.
QSAR de 40 piridinonas de Merck y <i>virtual screening</i>	2D-QSAR, <i>k Nearest Neighbor</i> y <i>docking</i> con Autodock.	Los derivados de tipo pirazolo[3,4-d]pirimidina y fenotiazina fueron identificados como INNTRs lider.
QSAR de 72 3-aminopiridin-2(1H)-onas	2D-QSAR utilizando un novedoso índice de conectividad excéntrica aumentada	El 80.6 % de las piridin-2(1H)-onas de la base de datos fueron predichas correctamente.
<i>Docking</i> y QSAR de 178 4-benzil/benzoil piridin-2-onas	3D-QSAR, CoMFA y CoMSIA y <i>docking</i> con Autodock utilizando PDB IDs 2BAN (WT), 3MED (K103N), 1JKH (Y181C), 2YNF (Y188L).	Las posiciones C-3, C-4 y C-6 del anillo de piridinona fueron esenciales para un amplio espectro de actividad anti-TR de HIV-1. Un campo electronegativo entre la piridinona y la mitad arilo es un requisito común para la actividad. Fueron diseñados compuestos virtuales.
<i>Docking</i> de 4 y análogos estructurales	<i>Docking</i> con GOLD utilizando PDB ID 1RT2 (WT), y mutante K103N (PDB ID no revelado). Posterior minimización de energía del complejo.	Orientación de unión esperada: el grupo NH lactámico forma un enlace de hidrógeno con la Lys101; el grupo C-4 es ubicado en el sitio hidrofóbico (Tyr181, Tyr188, Phe227, y Trp229). El grupo C-3 es cercano a la Pro236. 4 puede adoptar modos de unión alternativos con WT (el C-3 o C-6 cerca de la Pro236). En K103N, el carbonilo del anillo de la piridinona puede hacer interacciones favorables con el grupo amida de la Asn.
<i>Docking</i> de LAM-trans y análogos estructurales	<i>Docking</i> con Autodock Vina utilizando PDB IDs: 1RT2 (WT), 1FKP (mutante K103N resistente), y 1JLA (mutante Y181C resistente).	Hipótesis: el feniletil en el C-6 forma interacciones con la Tyr318 y la Pro236. Modelos de <i>docking</i> con cepas mutantes mostraron un menor número de interacciones con el sitio de unión pero algunas interacciones clave permanecieron sin cambios.
<i>Docking</i> de dos compuestos de la familia de la 6-feniletil piridinona	<i>Docking</i> con GOLD utilizando PDB ID 1RT2 (WT).	Orientación de unión esperada, similar al ligando co-cristalizado TNK651 (enlace de hidrógeno con la Lys101 y <i>pi-stacking</i> con la Tyr188). <i>Docking</i> de un análogo con un átomo de yodo en el C-3 respalda la hipótesis de un enlace halógeno con oxígeno carbonilo de la Tyr188.

computacionales, con la estructura cristalográfica de ambos de tipos de cepas WT y mutantes. La Tabla 5 resume los estudios computacionales representativos incluyendo los principales resultados.

Además de acoplamiento molecular, también otros métodos han contribuido a entender el SAR de conjuntos de datos de compuestos de manera retrospectiva o prospectiva. Por ejemplo, en 2004, Medina-Franco *et al.* reportaron análisis SAR cuantitativos en tres dimensiones (3D-QSAR) de 40 piridinonas de Merck.³⁰ En ese estudio, el acoplamiento molecular se utilizó como una estrategia para alinear a las estructuras para realizar análisis comparativos de campos moleculares (CoMFA) y análisis comparativos de similitud molecular (CoMSIA). Los modelos 3D-QSAR, en combinación con el *docking*, apoyaron la hipótesis de que la interacción entre el anillo de benzoxazol de las piridinonas Merck con la Tyr181 juegan un papel muy importante para estabilizar el complejo. El resultado de ese estudio proporcionó ideas para diseñar nuevos derivados de piridin-2 (1*H*)-ona con potencial actividad con cepas mutantes.

Un año más tarde, en 2005, se publicó un estudio 2D-QSAR para más de 40 piridinonas de Merck utilizando el método de "k vecinos más cercanos".³¹ Se emplearon los modelos QSAR más prometedores para cribar la base de datos del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. Los derivados de la pirazolo[3,4-*d*]pirimidina (como NSC11635) y tipo fenotiazina (NSC 127) fueron identificados como compuestos líderes para INNTRs. Las moléculas fueron objeto de *docking* para explorar el modo de unión. Los resultados del *docking* apoyaron la actividad potencial de las moléculas como *hit*.³¹

En 2006 Bajaj *et al.* desarrollaron un nuevo descriptor llamado índice de conectividad excéntrico aumentado para desarrollar modelos QSAR-2D para un conjunto de datos de 72 3-aminopiridin-2(1*H*)-onas. Los autores concluyeron que el nuevo descriptor produce mejores resultados que otros

descriptores utilizados anteriormente. En total, 80.6% de los compuestos del conjunto de datos fueron predichos correctamente por el modelo.³²

Más recientemente, en 2013 Debnath *et al.* publicaron estudios QSAR-3D (CoMFA y CoMSIA) de 178 4-bencilo/benzoilo piridin-2(1*H*)-onas usando la actividad de la TR de VIH-1 WT y tres mutantes: K103N, Y181C y Y188L. Para ello se estudió la alineación molecular (es decir, posibles conformaciones bioactivas) tomadas de estructuras cristalográficas y *docking*. A partir de los modelos CoMFA y CoMSIA se concluyó que las posiciones C-3, C-4 y C-6 del anillo de la piridinona eran muy importantes para una actividad anti-TR de VIH-1 de amplio espectro. También se concluyó que un campo electronegativo entre los residuos de la piridinona y el anillo es un requisito común para las actividades. Con base en los estudios de QSAR-3D y *docking*, los autores diseñaron compuestos con actividad mejorada contra las cepas WT y mutantes K103N, Y181C y Y188L. Un ejemplo es la molécula VC1 (Figura 5).³³

Las piridin-2(1*H*)-onas representan una clase estructural muy importante en desarrollo como INNTRs. Los estudios de análisis basado en la estructura, QSAR y *docking*, en combinación con los enfoques de química farmacéutica y cribado biológico, han jugado un papel clave en los esfuerzos multidisciplinarios para desarrollar compuestos derivados de la piridin-2(1*H*)-ona como una clase de potenciales candidatos a buenos fármacos de tipo INNTR. La nueva generación de compuestos están siendo diseñados en base a: 1) el conocimiento acumulado de la SAR de las piridin-2(1*H*)-onas; 2) los requisitos conocidos de flexibilidad del ligando para adaptarse al sitio de unión mutado; y 3) la característica deseable de las interacciones favorables con los residuos conservados. Estas nuevas clases podrían entrar en etapa de desarrollo clínico para el tratamiento del SIDA.

3. Procedimiento experimental

3.1. Materiales

3.1.1. Equipo de cómputo:

Computadora DELL INSPRON TOWER 7810 con tarjeta gráfica Nvidia GeForce GT 610 y sistema operativo Ubuntu 12.04 LTS 64-bit.

3.1.2. Programas computacionales:

- *Internal Coordinate Mechanics* (ICM) Pro 3.8-4 - Molsoft LLC.
- Autodock 4.2 - The Scripps Research Institute.
- DataWarrior 4.2.2 – Openmolecules.org.
- *Molecular Operating Environment* (MOE) 2014 - Chemical C. Group Inc.

3.2. Metodología

El procedimiento experimental se llevó a cabo en dos fases principales: la primera parte consta del *docking* (rígido-flexible) y el *scoring* de los compuestos de prueba mediante el software ICM y Autodock de forma independiente. La segunda parte se conforma por el *consensus scoring* que se realizó con DataWarrior y por el análisis quimioinformático de los PLIFs con ayuda de MOE. Previo a la realización del *docking* se realizó la validación de los protocolos mediante el re-*docking* de los compuestos co-cristalizados originales (Tabla 6) tal como se muestra en la Figura 6.

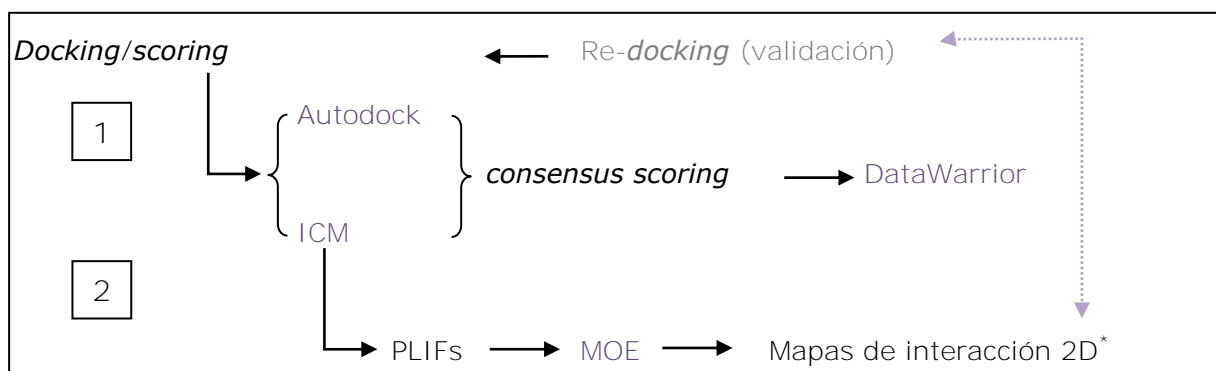
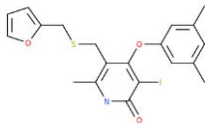
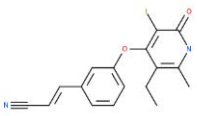
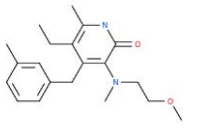








Figura 6. En este diagrama se representa esquemáticamente el flujo del procedimiento experimental, las fases principales de la metodología y el software utilizado en cada parte del proceso. *Los mapas 2D de interacción ligando-proteína fueron realizados para los compuestos co-cristalizados originales y con los compuestos de prueba con mayor scoring.

3.2.1. Estructuras de TR utilizadas

Tabla 6. Características de las estructuras tridimensionales de las proteínas co-cristalizadas con ligandos análogos de piridinonas utilizadas para el *docking*.²²

Código PDB	2BE2	2B5J	2BAN
Descripción	Estructura cristalizada de la TR del VIH-1 en complejo con R221239	Estructura cristalizada de la TR del VIH-1 en complejo con JANSSEN-R165481	Estructura cristalizada de la TR del VIH-1 en complejo con JANSSEN-R157208
Ligando co-cristalizado			
	4-(3,5-dimetilfenoxi)-5-(furan-2-ilmetilsulfanilmetil)-3-yodo-6-metilpiridona	5-etil-3-[(2-metoxietil)metilamino]-6-metmetilbenzil)piridin-2(1H)-ona	(2e)-3-{3-[(5-etil-3-yodo-6-metil-2-oxo-1,2dihidropiridin-4-il)oxi]fenilacrilonitrilo
Método	Rayos-X	Rayos-X	Rayos-X
Resolución	2.43Å	2.90Å	2.95Å
Nombre y color clave de las moléculas para este trabajo	 2BE2: Proteína 1 (amarillo)  R221239: Ligando co-cristalizado 1 (naranja)	 2B5J: Proteína 2 (azul claro)  R165481: Ligando co-cristalizado 2 (azul profundo)	 2BAN: Proteína 3 (verde claro)  R157208: Ligando co-cristalizado 3 (verde intenso)

3.2.2. Mapas bidimensionales de interacción ligando-proteína para los compuestos co-cristalizados

Con la finalidad de elucidar las interacciones importantes entre el ligando y los residuos cercanos al sitio de unión, se realizaron los mapas bidimensionales de interacción con el ligando.³⁴ Se utilizó el programa MOE 2014.³⁵ Dichos mapas de interacción se compararon posteriormente con los resultantes de los compuestos de prueba. La Figura 8 muestra un ejemplo de un mapa de interacción con el ligando obtenidos en esta fase. Los parámetros para la generación de los mapas 2D con MOE 2014 fueron:

H-bond: -0.5 kcal/mol (energy cutoff)
Cutoff: 4.5 angstroms (Maximum distance)

3.2.3. Compuestos de prueba

Para realizar los estudios de *docking* y quimioinformática se utilizaron 32 distintos compuestos derivados de piridinona y de quinolona. Los compuestos de prueba utilizados fueron tomados de los trabajos publicados por Reyes *et al*^{27,36} y Cabrera *et al*.^{37,38} En la Figura 7 se muestran como ejemplo seis estructuras de los compuestos.

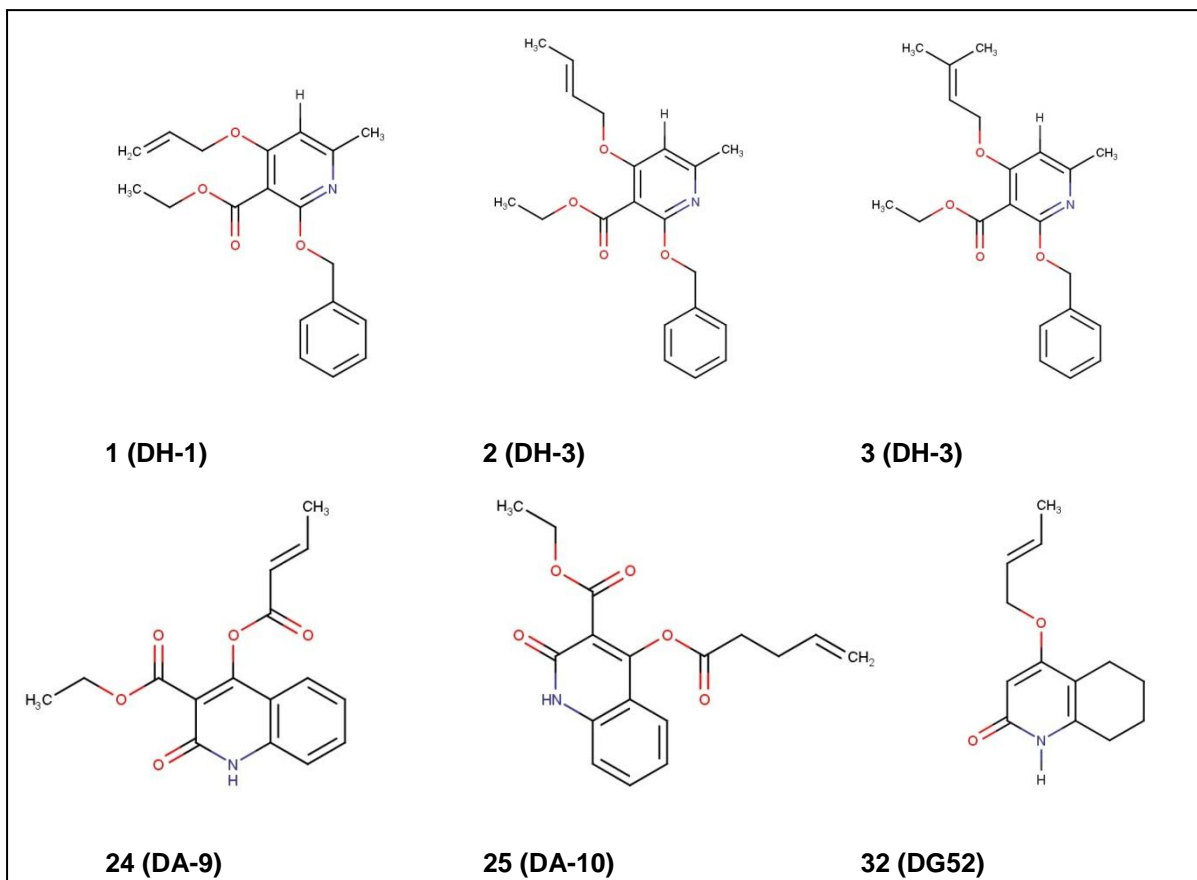


Figura 7. Estructura química de seis compuestos representativos a los cuales se les realizó *docking*.

3.2.4. Validación del protocolo de *docking*

El acoplamiento molecular se llevó a cabo de forma independiente con los programas ICM³⁹ y Autodock.⁴⁰ Se comenzó con la validación del protocolo de *docking* mediante el siguiente procedimiento:

- a) Superposición de las estructuras cristalográficas originales de la TR para comparar la similitud entre estructuras proteicas (Figura 9) y revisar el ajuste inducido por el ligando en el sitio de unión para INNTRs (Figura 10). En esta etapa también se buscó determinar cuál de las tres estructuras de la TR era la más adecuada como receptor para realizar posteriormente el *docking* de los compuestos de prueba.
- b) Re-*docking* de los tres ligandos co-cristalizados con las estructuras de los tres receptores (Tabla 6).

El primer paso se llevó a cabo únicamente con ICM y el re-*docking* se realizó con ICM y Autodock. En este escrito no se muestran los procedimientos ni resultados obtenidos con Autodock debido a que no hay diferencias al comparar los resultados con los obtenidos mediante ICM.

3.2.4.1. Preparación de las estructuras proteicas para su implementación con ICM

Con la finalidad de trabajar adecuadamente con las estructuras proteicas de la TR y poder aplicar adecuadamente las herramientas que ofrece el entorno de ICM, se requirió la preparación⁴¹ de cada una de las estructuras cristalográficas en formato PDB y convertirlas en un formato propio del programa ICM aplicando los siguientes parámetros:

Delete wáter

Guess formal charges in ligands

Optimize hydrogens

Optimize His,Pro,Asn,Gln,Cys

Las optimizaciones en la estructura proteica incluyeron la rotación de los grupos amida en Gln/Asp y **el cambio en la histidina de Hia a Hie**. Por otra parte también se agregaron átomos pesados (C y N) e hidrógenos (H) faltantes en residuos de distintos aminoácidos.

3.2.4.2. Superposición de la estructura de las proteínas

En esta fase se compararon las coordenadas espaciales de las estructuras tridimensionales de la TR de forma pareada, tomando a la estructura de mayor resolución (PDB ID: 2BE2) como referencia y utilizándola como objeto fijo para la superposición estructural; es decir dejando fijas las coordenadas de 2BE2 y trasladando (superponiendo) las coordenadas de 2B5J o 2BAN. También se realizó la superposición simultánea de las tres estructuras tomando nuevamente a 2BE2 como el objeto fijo. La finalidad de llevar a cabo este procedimiento fue revisar las diferencias entre cada una de las estructuras de TR. Este proceso se realizó con ICM y con el mismo se midió el RMSD (*weighted iterative superposition*)⁴² entre ambas cadenas de la TR y sólo entre una de ellas en ambos casos mediante el método del carbono alfa y del *backbone*; sin considerar a los ligandos.

3.2.4.3. Superposición de los ligandos en el sitio de unión

En esta fase se superpusieron las tres estructuras proteicas con sus respectivos ligandos co-cristalizados con énfasis en los residuos en contacto con cada ligando. Esto se hizo para identificar si existe un ajuste inducido en la conformación del sitio de unión debido a la estructura de un ligando en particular y compararla con otro de ellos utilizando la estrategia *Maximum common substructure mode*.^{43,44}

3.2.4.4. Re-docking de los ligandos co-cristalizados

Se evaluó la capacidad de los algoritmos de *docking* de ICM y Autodock para reproducir la conformación de cada ligando co-cristalizado en su respectivo sitio de unión (*re-docking*). Este proceso fue realizado separando el ligando co-cristalizado de la respectiva estructura de la TR en cada caso. Posteriormente se realizó la predicción de la *pose* de cada ligando empleando las respectivas estrategias de *docking* por cada

programa. Los resultados de las predicciones computacionales contra los resultados experimentales se compararon utilizando el parámetro RMSD que fue calculado con un *script* dentro de ICM.⁴⁵

Para el re-*docking* de los tres compuestos co-cristalizados y el *docking* de los 32 compuestos de prueba el sitio de unión de INNTRs con ICM se aplicó la función *Pocket Finder* del programa.^{46,47} La Figura 11 muestra una representación de la superficie del sitio de unión determinado por ICM. Las características del sitio de unión para el receptor 2BE2 son las siguientes:

```
Receptor:      2BE2
Volume (Å):    511.8
Area (Å):      470.7
Residues:      24: P95, L100, K101, K102, K103, S105, V106, V108, V179, Y181,
                Y188, V189, G190, Q222, K223, E224, P225, F227, L228, W229,
                L234, H235, P236, Y318.
```

El *docking* con Autodock 4.2 se realizó mediante la línea de comandos utilizando las siguientes características para el sitio de unión:

```
Gridcenter      51.54,-26.88,27.24
Npts             50,50,50
```

Así mismo durante el re-*docking* de los tres compuestos co-cristalizados y el *docking* de los 32 compuestos de prueba con Autodock 4.2 fueron aplicados los siguientes parámetros:

```
ga_num_evals    25000000
ga_pop_size     150
ga_run          10
```

3.2.5. **Docking de los compuestos de prueba**

El *docking* de los 32 compuestos de prueba se realizó utilizando la estructura 2BE2 como receptor y se aplicaron los mismos parámetros que durante la validación del protocolo de *docking* tanto con ICM como con Autodock. También se realizó un análisis de las diferentes *poses* obtenidas con énfasis en las de mayor puntaje (*scoring*).

3.2.6. **Consensus scoring**

Posterior a análisis de las diferentes conformaciones obtenidas de forma independiente por cada programa utilizado, se realizó el **consensus docking** utilizando la interfaz gráfica de ICM. Se trasladaron las coordenadas de las conformaciones de cada compuesto obtenidas con Autodock para su comparación con las conformaciones obtenidas con ICM. Para lo anterior se realizó la superposición de las proteínas y el ligando mediante el método del **backbone**. En la Figura 12 se muestran algunos ejemplos de la comparación entre las conformaciones obtenidas con cada programa. Para realizar la interpretación de los resultados se realizó una tabla con las diferentes conformaciones obtenidas para cada compuesto, el scoring obtenido por cada programa y el RMSD entre las dos conformaciones del compuesto utilizando el método **maximum common substructure mode**. Para la representación gráfica de los resultados se utilizó el programa DataWarrior⁴⁸ para realizar un completo gráfico (Figura 14) en el cual se representaron cuatro parámetros distintos: scoring de ICM (eje *x*), **scoring** de Autodock (eje *y*), RMSD (color) y el **consensus scoring** (tamaño). El último parámetro se calculó como el promedio de ambos valores de puntaje (**score**) auto-escalados.

3.2.7. **PLIFs**

Con el programa MOE se generaron los PLIFs para los compuestos de prueba representativos por sus características de interacción con residuos similares y para los ligandos co-cristalizados para referencia, utilizando una representación visual de **“códigos de barras”**. En la Figura 16 se muestra una representación detallada de los PLIFs para los compuestos más relevantes y en la Figura 17 los diagramas indicando las partes de la estructura que interaccionan con cada residuo en el sitio de unión.

4. Resultados y Discusión

4.1. Obtención de los mapas bidimensionales de interacción ligando-proteína

En Himmel *et al.*²² se describen las interacciones ligando-proteína entre las tres estructuras cristalográficas de la TR y su respectivo ligando co-cristalizado a una distancia menor a 4.0 Å entre los residuos de la proteína y los del ligando. En la Figura 8a se muestran estas interacciones para el ligando R221239.

En el presente trabajo se realizaron los mapas bidimensionales de interacción ligando-proteína mediante MOE con una distancia de 4.5 Å, en la Figura 8b se muestra el mapa para R221239. Comparando los resultados de la literatura y los experimentales, se observó que todas las interacciones importantes son también obtenidas con MOE. Por lo tanto a manera de validación se determinó que este programa sería capaz de predecir las interacciones que ocurren entre la TR y los compuestos de prueba resultantes del *docking*. De esta forma se puede determinar la potencia relativa de los 32 compuestos y si estos tienen actividad contra cepas mutantes.

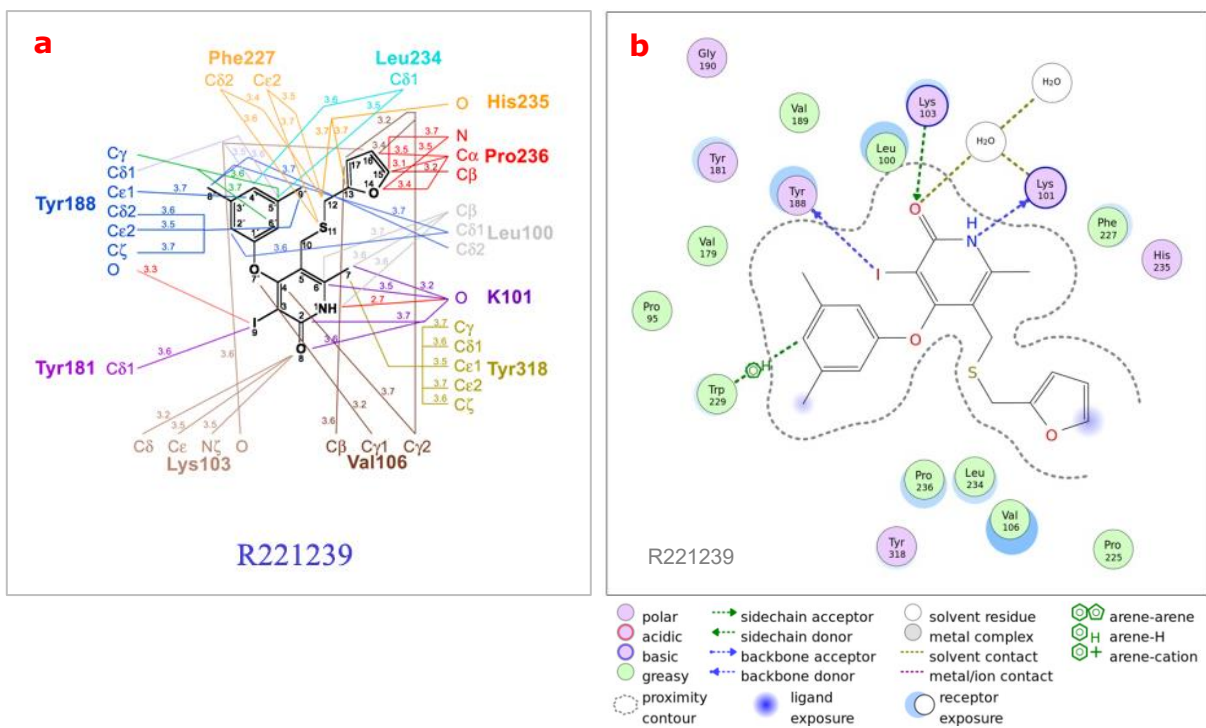


Figura 8. a) Contactos entre los residuos de la TR para el ligando co-cristalizado R221239. **b)** Mapa bidimensional de interacción ligando-proteína para el mismo ligando obtenido con MOE. Debajo de esta figura se muestra una explicación de cada color y simbología utilizados por el programa para los distintos parámetros.

4.2. Validación del protocolo de *docking*

4.2.1. Superposición de la estructura de las proteínas

Los resultados obtenidos en la superposición de las estructuras cristalográficas de TR mediante ICM se muestran en la Tabla 7 y Figura 9. En la Matriz RMSD se pudo observar que las estructuras son muy parecidas entre sí debido a que se obtuvieron valores de RMSD muy pequeños ($<1 \text{ \AA}$) al realizar la superposición entre las estructuras. También se estableció que la mejor estructura para realizar el re-*docking* de los tres ligandos co-cristalizados y el *docking* de los 32 compuestos de prueba era la estructura 2BE2; al no existir diferencias significativas entre estructuras se prefirió escoger la estructura de mayor resolución (2.43 \AA).

Tabla 7. Valores de RMSD obtenidos mediante la superposición de las tres estructuras de TR, las estructuras de las filas se tomaron como el objeto fijo.

Matriz RMSD	Carbono α		Backbone		
	2B5J	2BAN	2B5J	2BAN	
Cadenas p66 y p51	2BE2	0.329	0.482	0.323	0.475
	2B5J	-	0.250	-	0.247
Sólo cadena p66	2BE2	0.322	0.542	0.320	0.530
	2B5J	-	0.313	-	0.310

Mediante la superposición de las tres estructuras cristalográficas de TR se observó de forma gráfica que dichas macromoléculas son muy similares. En la Figura 9 se observa que estas tres estructuras se encuentran alineadas de forma que prácticamente una se sobrepone con las otras las diferencias entre ellas son pequeñas. Lo anterior respalda la elección de la estructura 2BE2 como receptor para el re-*docking* de los tres ligandos co-cristalizados y el *docking* de los 32 compuestos de prueba.

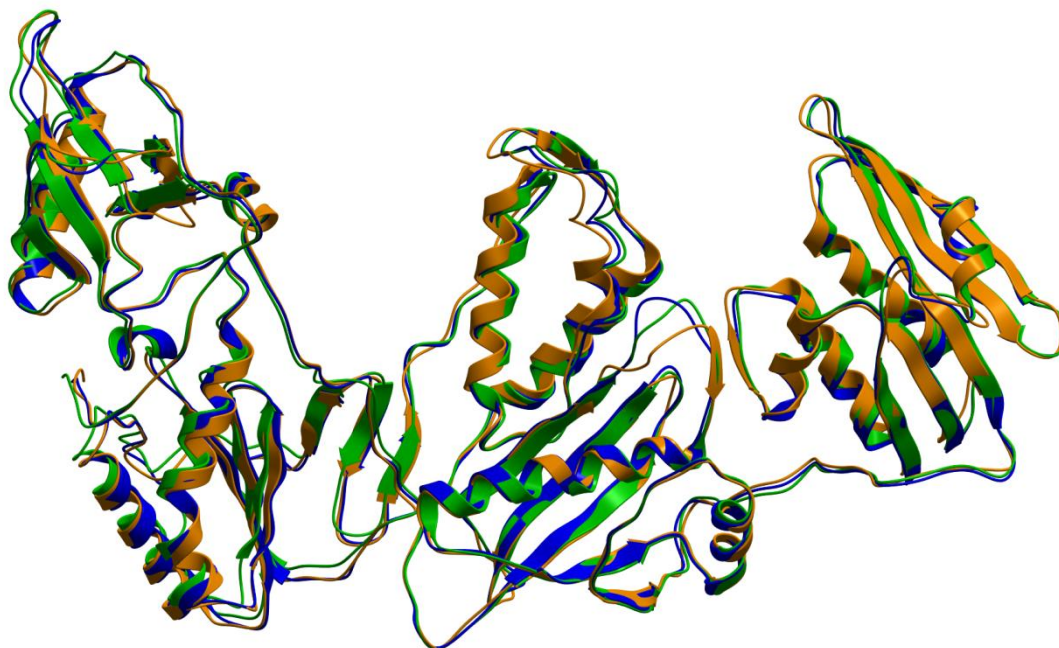


Figura 9. Superposición de la cadena a (p66) de las tres estructuras cristalográficas de TR mediante el método *backbone*, 2BE2 (naranja), 2B5J (azul) y 2BAN (verde). No se muestran los ligandos.

4.2.2. Superposición de los ligandos en el sitio de unión

Para complementar el estudio de las características de las tres estructuras cristalográficas de TR y sus respectivos ligandos co-cristalizados, se realizó nuevamente una superposición estructural simultánea incluyendo a los ligandos co-cristalizados. Analizando la conformación y orientación espacial dentro del sitio de unión de estos tres distintos ligandos, se detectaron similitudes entre dichos compuestos ya que todos presentaban la **orientación característica de "mariposa"**. Además, los grupos químicos comunes se encontraron dirigidos hacia los mismos residuos proteicos (Figura 10). Sin embargo, se observó un ajuste inducido dentro del sitio de unión debido a los distintos sustituyentes de cada ligando que modifican ligeramente las interacciones y los puntos de contacto con los residuos del *pocket*. Lo anterior es relevante al momento de realizar *docking* en este trabajo. Estos resultados reafirmaron la elección de 2BE2 como estructural cristalográfica para realizar el *docking* de los compuestos de prueba.

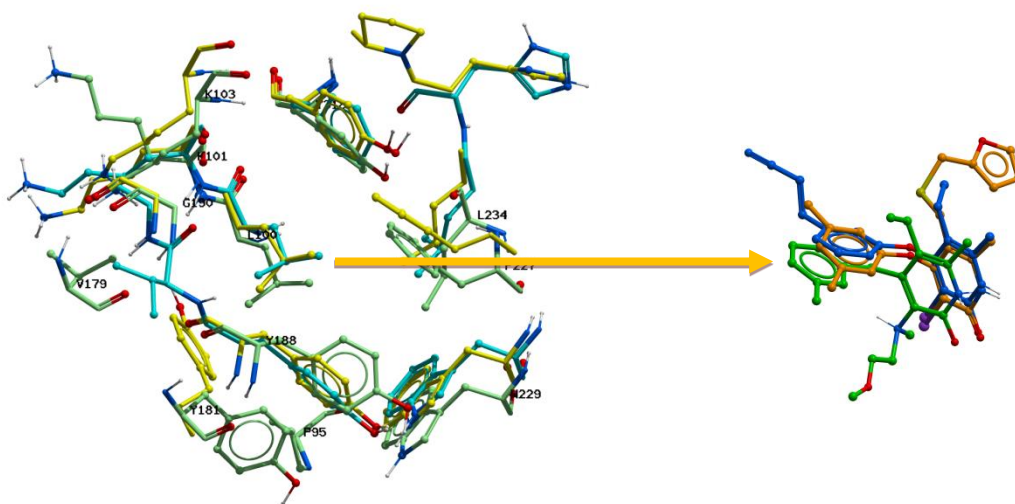


Figura 10. Conformación y orientación de los tres ligandos co-cristalizados en el sitio de unión. La comparación se hace mediante la superposición de la cadena p66 de cada estructura y su respectivo ligando R221239 (naranja), R165481 (azul) y R157208 (verde). Para mayor claridad, los ligandos se muestran por separado a la derecha de la figura.

4.2.3. **Re-docking de los compuestos co-cristalizados**

Como se mencionó anteriormente el re-*docking* se realizó utilizando como receptor a la cadena p66 de la estructura 2BE2. Esta estructura tiene además la característica de identificar fácilmente el sitio de unión formado por todos los residuos de aminoácidos de importancia reportados en la literatura⁴⁹. Mediante el programa ICM se generó una representación gráfica de la superficie del sitio de unión para INNTRs (Figura 11) en la cual se observa la cavidad que es formada y la forma en la que ajusta el ligando co-cristalizado, R221239.

Los resultados del re-*docking* fueron satisfactorios ya que tanto ICM como Autodock fueron capaces de predecir la conformación de los tres ligandos co-cristalizados tanto en su receptor original (*docking* directo) como en el re-docking sobre 2BE2 (*docking* cruzado) para los dos ligandos no co-cristalizados sobre dicho receptor. En la Figura 12-A se muestran las conformaciones obtenidas mediante el *re-docking* sobre 2BE2 para los tres ligandos co-cristalizados; se pudo observar que las predicciones fueron muy cercanas a los resultados cristalográficos. Esto se midió para cada ligando mediante el RMSD entre la conformación cristalográfica y la conformación obtenida en el *re-docking*. Finalmente en la Figura 12-B se muestran las conformaciones de las superposiciones (obtenidas mediante el proceso descrito en 4.2.2) de los 3 ligandos que se obtuvieron mediante *re-docking*; se muestra como referencia la superposición de los mismos ligandos provenientes de las estructuras cristalográficas. En conjunto, estos comprenden la validación de los protocolos de *docking* con ICM u Autodock utilizados en este trabajo. Los mismos protocolos fueron utilizados en el *docking* de los 32 compuestos de prueba.

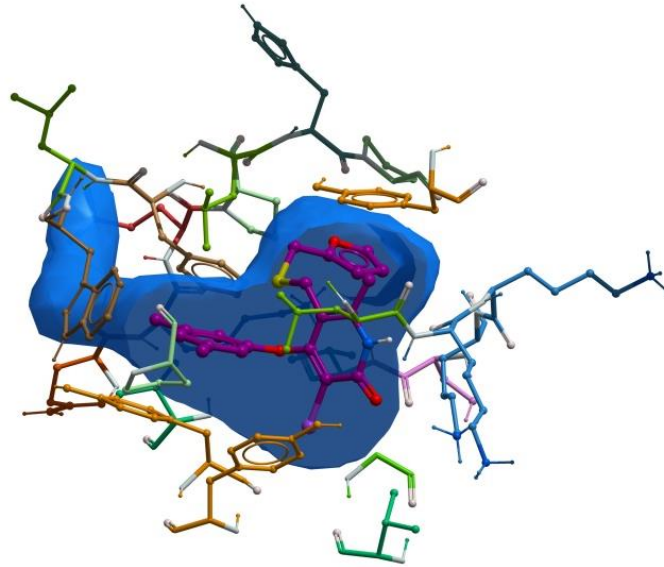


Figura 11. Superficie del sitio de unión para INNTRs generada con ICM para la estructura 2BE2.

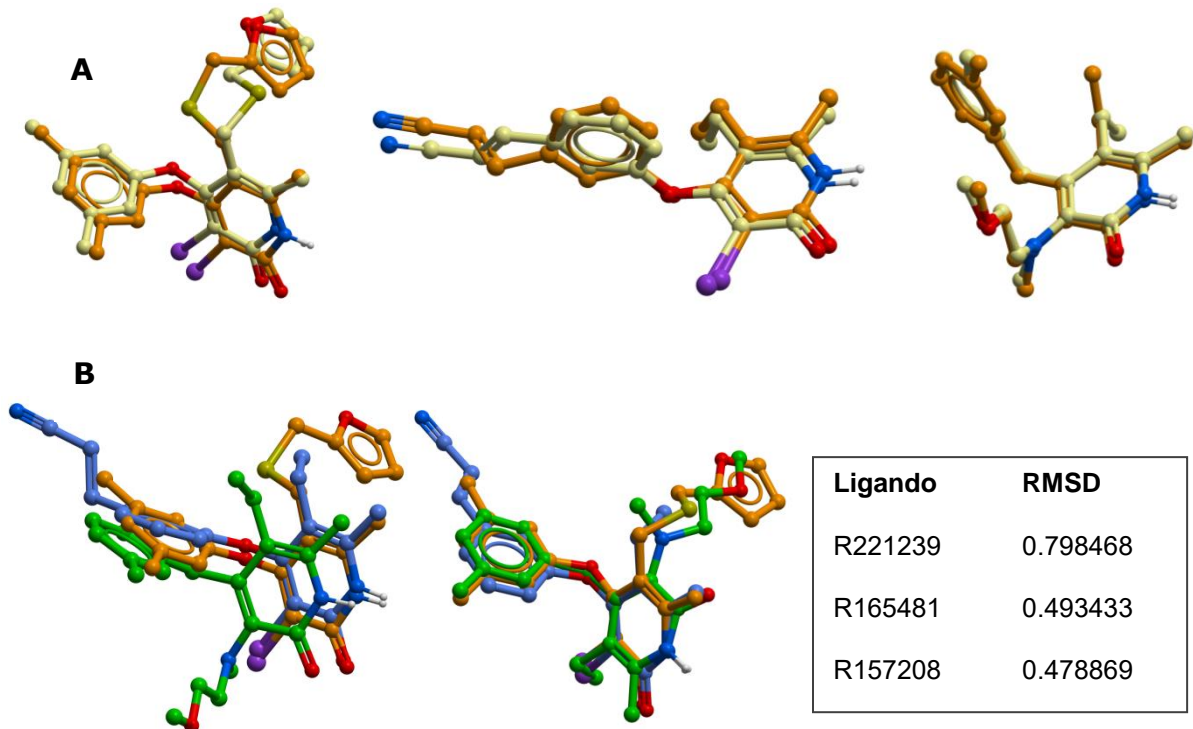


Figura 12. **A)** Superposición de las conformaciones de los ligandos co-cristalizados vs. la conformación obtenida mediante el *re-docking* con ICM de dichos ligando tomando como receptor a la estructura de 2BE2. De izquierda a derecha: R221239, R165481 y R157208. En el cuadro de la esquina superior derecha se muestran los resultados del RMSD para cada ligando. **B)** Izquierda: superposición de las conformaciones de los 3 ligandos tomados de las estructuras cristalográficas. Derecha: superposición de las conformaciones obtenidas mediante el *re-docking* con ICM de los mismos tres ligandos utilizando la estructura de 2BE2: R221239 (naranja), R165481 (azul) y R157208 (verde).

4.3. **Docking**

La Tabla 7 resume los resultados del docking realizado con ICM y Autodock para 32 compuestos utilizando la estructura 2BE2. Como referencia, la tabla incluye los resultados del docking de los 3 ligandos co-cristalizados. Con la ayuda de la interfaz gráfica de ICM se buscaron las conformaciones consenso, es decir las conformaciones que fueron determinadas de forma muy similar con ambos programas (y cuyas diferencias se midieron con el RMSD). A pesar de que no todas las conformaciones consenso coincidieron con las de más alto scoring; un análisis de las características de dichas conformaciones y sus interacciones con los residuos del sitio de unión sirvieron para encontrar las conformaciones más probables de acuerdo al tipo de ligando. Al realizar el docking de los 32 compuestos se identificaron cinco grupos que tienen un modo de unión muy similar entre ellos. Algunos de estos grupos con estructura química similar tienen una conformación parecida a la las piridinonas co-cristalizados (Figura 13).

4.4. **Consensus scoring**

Para considerar los valores de puntaje (scoring) de ICM y Autodock se combinaron los valores obteniendo el promedio. Debido a que las magnitudes de los valores de **score** de ambos programas es diferente, primero se auto-escalaron los valores (restando, para cada uno, el valor promedio y luego dividiendo por la desviación estándar). Al valor promedio se le llamó **consensus score** (puntaje consenso), tal cual se menciona en el punto 3.2.6. El valor de **consensus score** para cada compuesto se reporta en la Tabla 7. Para analizar los resultados de **docking** de los 32 análogos de piridinona se realizó una gráfica con el programa DataWarrior (Figura 14). En este gráfico cada punto representa a un compuesto. Para cada uno se grafica cuatro parámetros: 1) **scoring** de ICM (coordenadas en eje *x*), 2) **scoring** de Autodock (coordenadas en eje *y*) (ambos **scores** en valor

absoluto), 3) RMSD entre las conformaciones obtenidas con cada programa (color del punto) y 4) el *consensus score* (tamaño del punto). Al analizar el modo de unión y la ubicación de cada compuesto en el gráfico se observó que los compuestos con modos de unión muy similares se encuentran muy cercanos entre sí en la gráfica. También se observó que los compuestos con modos de unión similares a los análogos de piridinona co-cristalizados tuvieron valores superiores al valor promedio de cada uno de los valores de *scoring* de cada programa.

Tabla 8. Resultados del *docking* con ICM y Autodock de los 32 compuestos de prueba y re-*docking* de los tres compuestos co-cristalizados. Se reportan los valores de RMSD y *consensus scoring*.

Compuesto	Autodock		ICM		RMSD	Consensus scoring
	Scoring	Corrida	Scoring	Conformación		
1	-8.36	7	-41.01	1	1.72279	5.32
2	-8.68	15	-41.70	2	0.532786	5.49
3	-9.37	10	-43.69	1	0.634986	5.87
4	-5.95	15	-45.38	2	2.18055	4.45
5	-6.32	6	-50.02	3	0.779878	4.80
6	-5.97	8	-41.24	2	2.32778	4.29
7	-6.62	4	-48.63	1	2.142970	4.88
8	-7.14	11	-24.79	24	0.754496	4.13
9	-6.60	18	-29.08	23	2.143496	4.44
10	-6.23	6	-29.79	21	1.716500	4.93
11	-6.89	5	-42.47	2	0.496339	4.74
12	-7.22	9	-31.69	2	1.628684	4.44
13	-6.68	8	-42.83	3	2.142150	4.66
14	-6.91	10	-40.45	1	0.717973	4.67
15	-7.32	18	-29.45	1	1.319479	4.40
16	-7.82	5	-8.23	8	2.486832	3.74
17	-7.42	16	-36.15	2	0.960021	4.71
18	-7.37	10	-40.47	1	2.233763	4.87
19	-7.63	19	-36.09	1	2.079428	4.80
20	-8.61	16	-4.18	4	2.530691	3.92
21	-7.39	16	-27.63	2	0.482208	4.35
22	-8.50	14	-9.84	13	1.616311	4.11
23	-8.69	6	-9.71	13	1.500066	4.18
24	-8.17	3	-35.22	1	0.512902	5.00
25	-8.33	15	-43.49	1	2.390454	5.48
26	-8.48	8	-28.01	4	1.064658	4.68

Compuesto	Autodock		ICM			Consensus scoring
	Scoring	corrida	Scoring	Conformación	RMSD	
27	-7.89	6	-35.32	6	1.923166	8.88
28	-10.31	16	-41.83	2	1.051935	6.20
29	-10.86	17	-38.80	3	1.042511	6.32
30	-7.69	5	-47.73	3	1.215844	5.30
31	-8.17	1	-50.73	3	1.902972	5.63
32	-8.18	4	-57.58	1	2.641663	5.92
33 (R221239)	-7.45	18	-39.68	1	2.07773	4.87
34 (R165481)	-8.19	18	-45.62	1	2.032862	5.43
35 (R157208)	-8.73	7	-45.34	1	1.939946	5.66

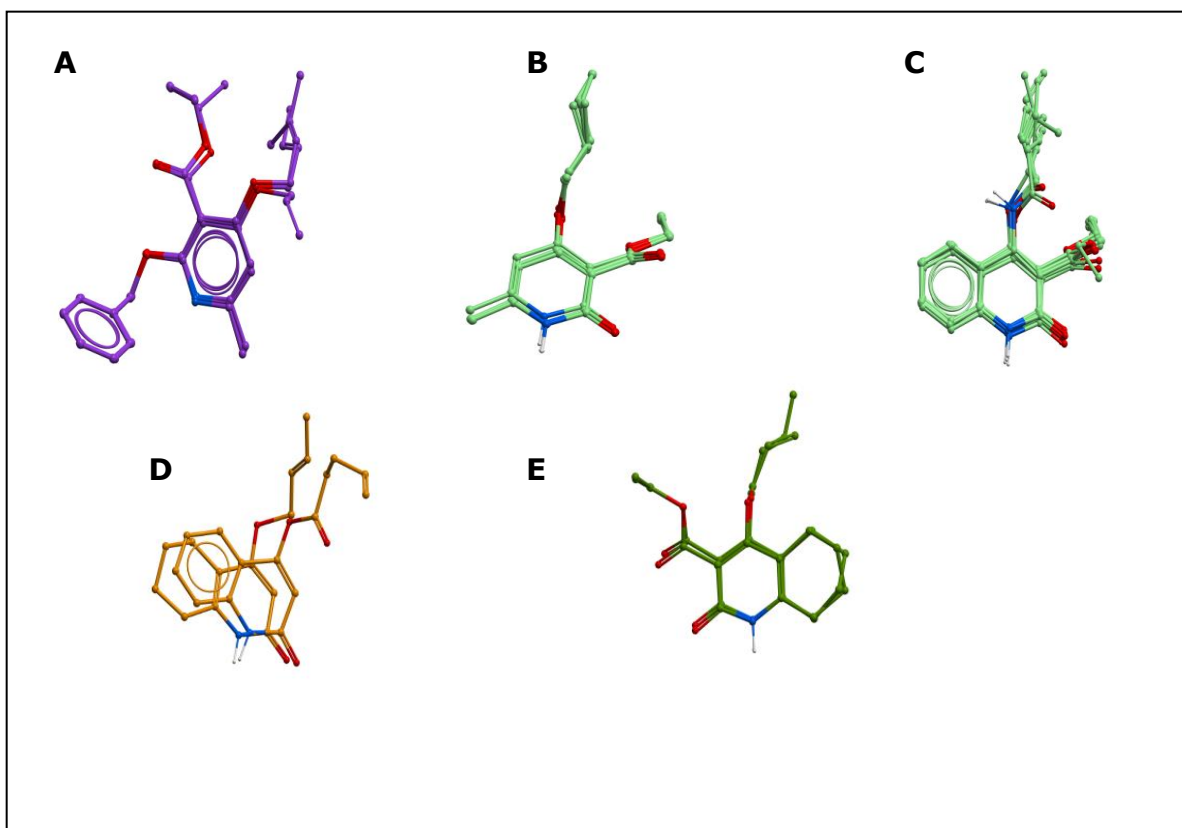


Figura 13. Conformación de ligandos representativos en el sitio de unión después del *docking* y agrupación de acuerdo a la similitud de los modos de unión. A) ligandos 1, 2 y 3 B) 4, 5, 6, y 7 C): 18, 19, 24, 25, 33 y 35 D) 30 y 31 E) 27 y 32. Para claridad visual no se muestra las coordenadas de la estructura de la TI.

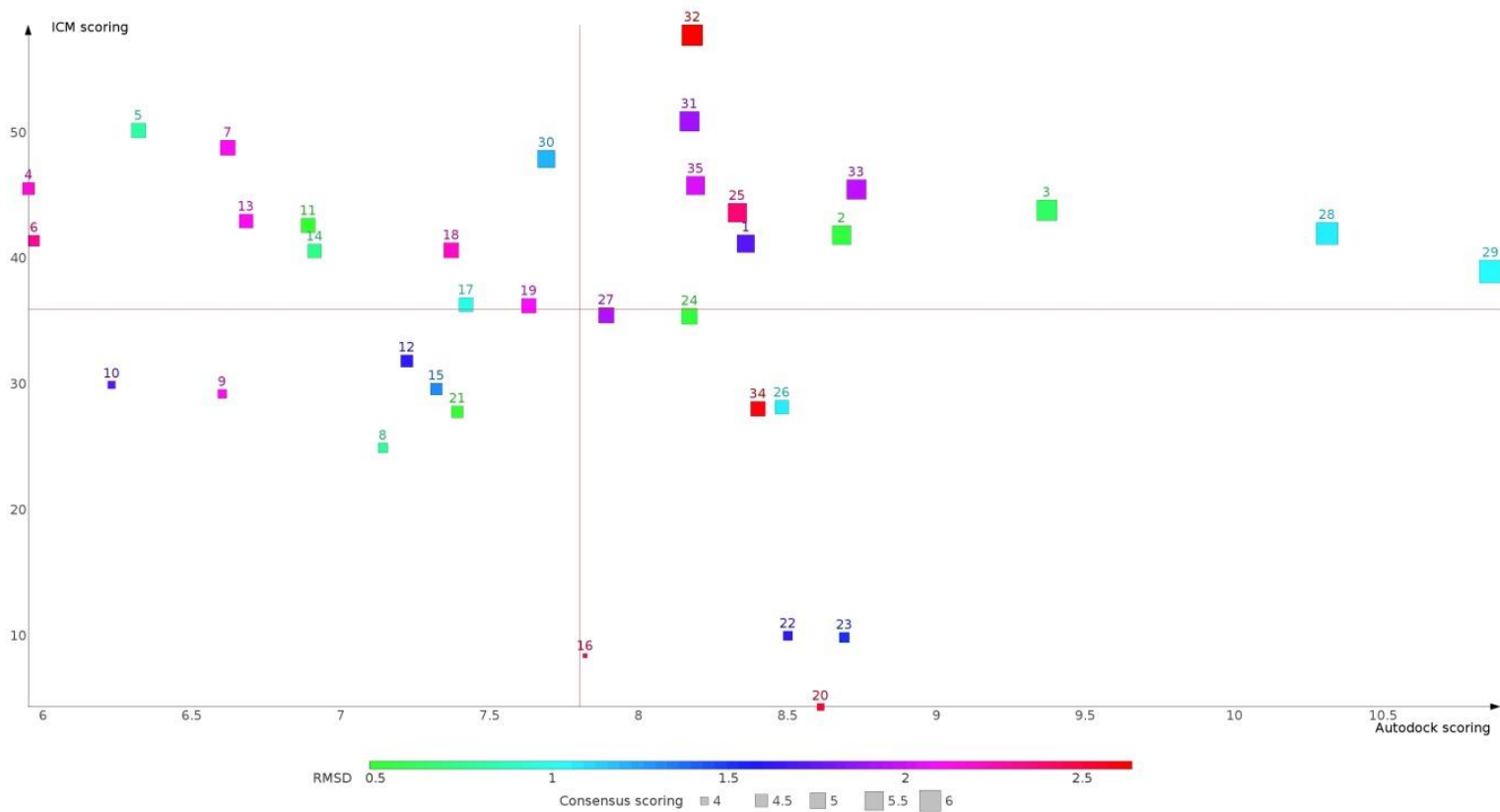


Figura 14. Se grafica en X el *scoring* de Autodock y en Y el *scoring* de ICM de los 32 compuestos a los cuales se les realizó el *docking*. Los puntos se colorean en escala continua de acuerdo al valor del RMSD y el tamaño de los marcadores de acuerdo al valor del *consensus scoring*. En rojo se muestran las dos líneas del promedio de los valores del *scoring* obtenidos con ICM y Autodock, respectivamente.

4.5. Mapas bidimensionales de interacción de los compuestos de prueba

Para las conformaciones resultantes del *docking* de los compuestos de prueba se realizaron los mapas bidimensionales de interacción ligando-receptor con MOE (Figura 15). Al comparar estos mapas con los elaborados para los ligandos co-cristalizados (Figura 8a), se pudo observar que las interacciones en el sitio de unión se dan con residuos de aminoácidos muy similares pero con diferentes residuos de cada molécula y formando diferentes tipos de interacciones.

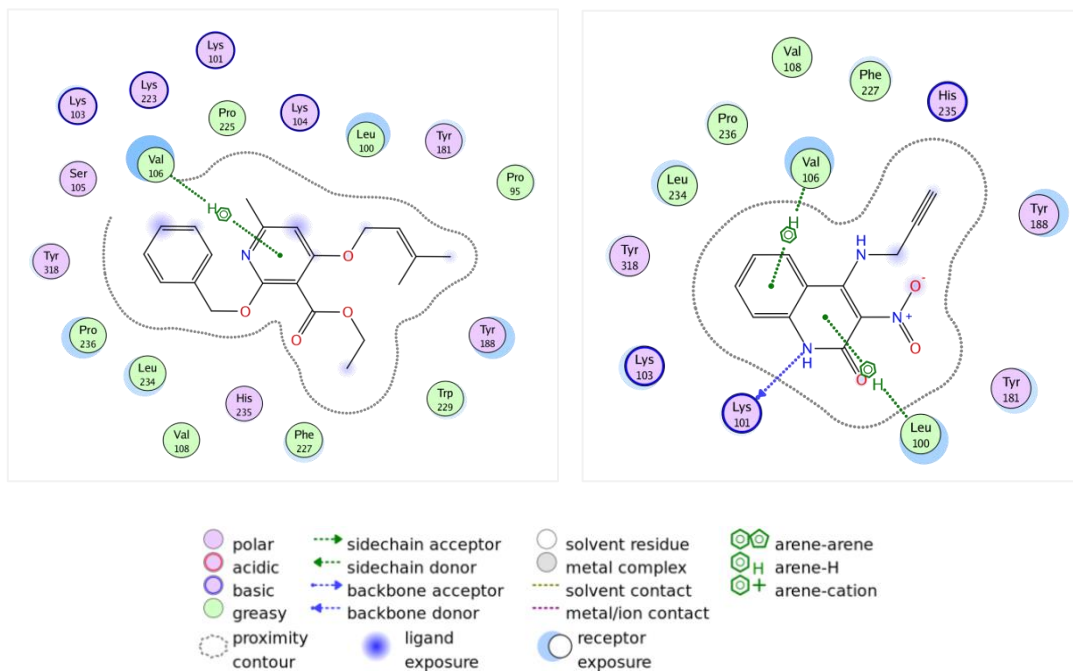


Figura 15. Mapas bidimensionales de interacción ligando-receptor para los compuestos **3** a la izquierda y **24** a la derecha.

4.6. PLIFs

Los PLIFs generados para los compuestos de prueba representativos que se muestran en la Figura 16 muestran interacciones conservadas con los residuos Leu100, Lys101, Lys103, Val106, Tyr181, Tyr188, Leu235, His235 y Tir318. Además de observan otras interacciones para cada ligando o grupo de ligandos. Al comparar los compuestos de prueba con los compuestos co-cristalizados se puede observar que estos últimos presentan mayor número de interacciones, sin embargo, las interacciones imprescindibles para la actividad anti-TR de los compuestos es con los residuos conservados Pro236 y Tyr181 (marcados en azul en la Figura 16).

Figura 16. Interacción de los ligandos con los diferentes residuos del sitio de unión. Se indica únicamente si hay o no interacción con un residuo.

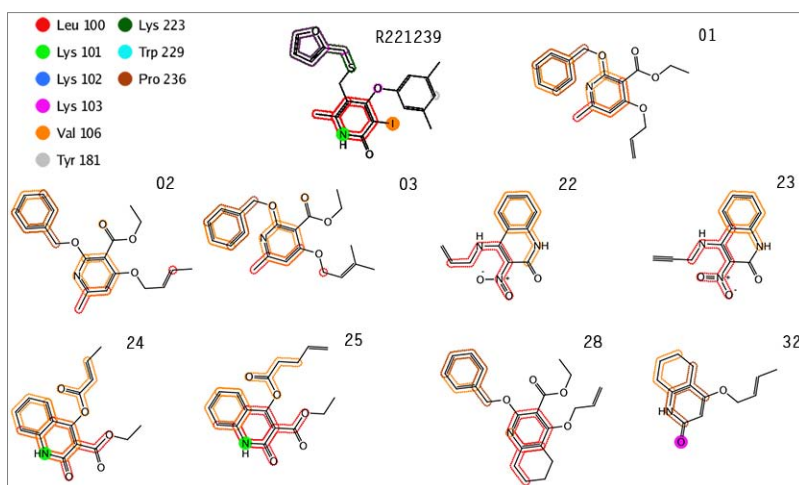
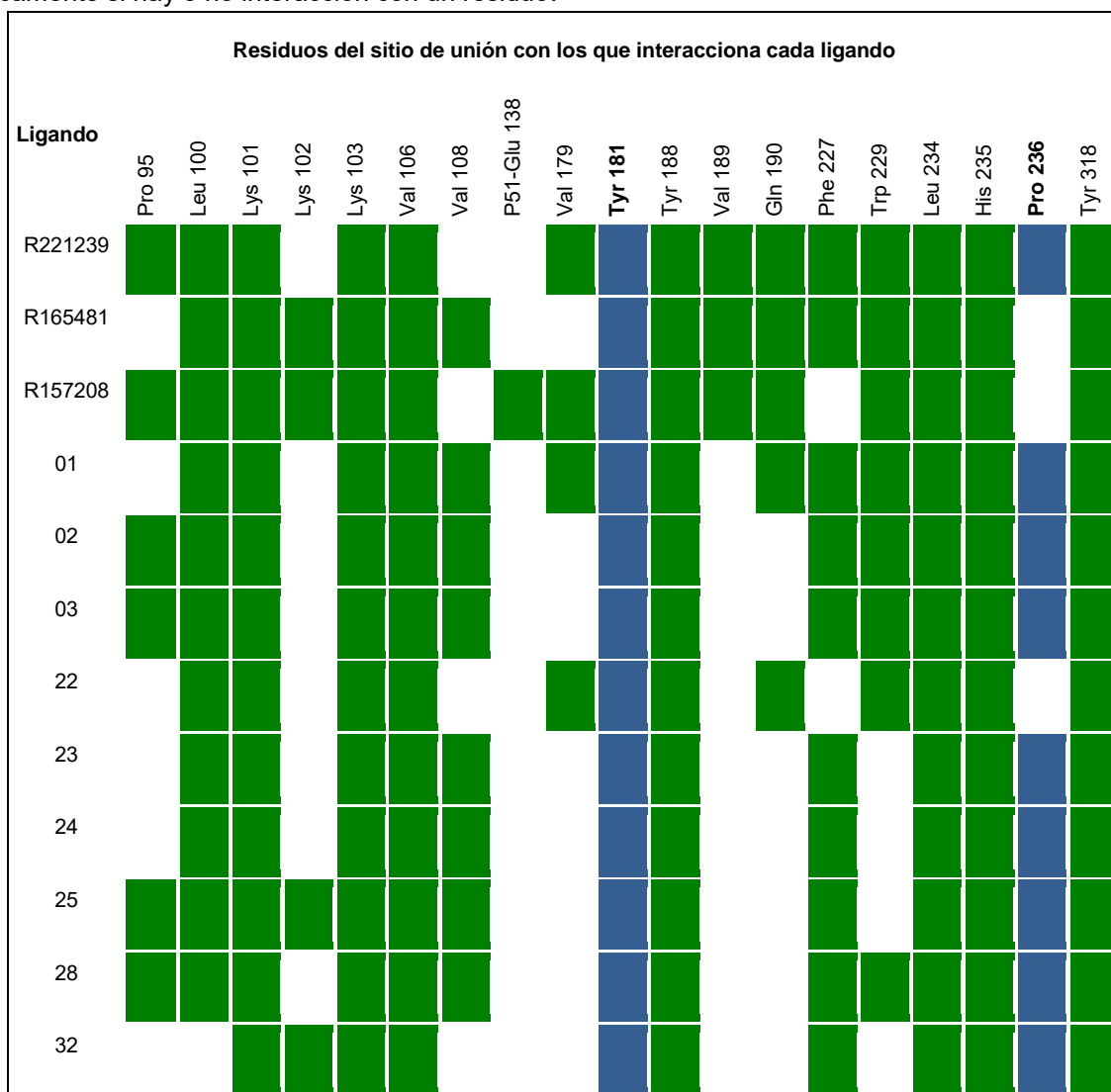


Figura 17. PLIFs de compuestos seleccionados los cuales tienen un modo de unión similar a los compuestos co-cristalizados y además altos valores de *scoring*.

Finalmente se observó mediante los PLIFs y mediante los mapas 2D de interacción con el ligando generados con el programa MOE 2014 (Figura 17), que los compuestos analizados y con mejor *consensus scoring* muestran también una interacción con residuos conservados en cepas mutantes, lo cual en teoría tiene como consecuencia que estos compuestos puedan ser activos contra cepas resistentes a INNTRs.

5. Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo se realizó una extensa revisión bibliográfica sobre los INNTRs con especial atención en el desarrollo de compuestos derivados de piridinona. Estos compuestos tienen características atractivas como potenciales INNTRs. Se seleccionó un grupo de 32 compuestos relacionados con piridinonas que están siendo sintetizados por un grupo de investigación. El objetivo fue analizar su perfil de acomplamiento molecular y quimioinformático de dichos compuestos. Los protocolos de acomplamiento con Autodock e ICM se validaron exitosamente con tres estructuras cristalográficas de piridinonas. Se lograron reproducir las posiciones de los ligandos en la estructura cristalográfica correspondiente. Con los resultados de validación se seleccionó a la estructura cristalográfica de TR de VIH-1 con código PDB ID: 2BAN como la más representativa para este estudio. Con los protocolos de Autodock e ICM validados se hizo el *docking* rígido-flexible para los 32 compuestos. Los análisis de *docking* consenso y PLIFs llevaron a la selección de nueve moléculas con las probabilidades más altas de mostrar actividad biológica: compuestos **1**, **2**, **3**, **5**, **18**, **19**, **24**, **25** y **32**. Estos compuestos tienen prioridad para ser sintetizados y evaluados biológicamente.

Para complementar y dar sustento al trabajo computacional, se deben realizar las pruebas biológicas. En dichas pruebas se espera que los

compuestos que dieron mejor *scoring* y que tienen un modo de unión similar a los compuestos co-cristalizados con TR presenten también actividad anti-TR muy alta. Si los resultados son positivos se podrían llegar a optimizar los compuestos para que pasen a otra etapa del desarrollo de fármacos. También hay posibilidad de desarrollar un modelo del farmacóforo el cual se pretende permita encontrar compuestos anti-TR con una actividad, especialmente efectivos contra cepas mutantes de VIH-1.

6. Bibliografía

1. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS(UNAIDS). Regional Statistics — 2015. 18–25 (2016).
2. Pustil, R. Global AIDS. *Aids* 17 Suppl 4, S3-11 (2016).
3. Medina-Franco, J. L., Martínez-Mayorga, K., Juárez-Gordiano, C. & Castillo, R. Pyridin-2(1H)-ones: A promising class of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *ChemMedChem* 2, 1141–1147 (2007).
4. Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 3, 935–949 (2004).
5. Chen, H., Lyne, P. D., Giordanetto, F., Lovell, T. & Li, J. On evaluating molecular-docking methods for pose prediction and enrichment factors. *J. Chem. Inf. Model.* 46, 401–15 (2006).
6. Totrov, M. & Abagyan, R. Flexible ligand docking to multiple receptor conformations: a practical alternative. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 178–184 (2008).
7. Medina-Franco, J. L., Fernández-de Gortari, E. & Naveja, J. J. Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora. *Educ. Química* 26, 180–186 (2015).
8. Feher, M. Consensus scoring for protein-ligand interactions. *Drug Discov. Today* 11, 421–428 (2006).

9. Medina-Franco, J. L., Méndez-Lucio, O. & Martinez-Mayorga, K. *The interplay between molecular modeling and chemoinformatics to characterize protein-ligand and protein-protein interactions landscapes for drug discovery. Advances in protein chemistry and structural biology* 96, (2014).
10. Kenneth Ryan, C. George Ray, Nafees Ahmad, W. L. D. *Sherrys Medical Microbiology*. (Mc Graw Hill Medical, 2014).
11. Castro, K. G. *et al.* 1993 revised classification system for hiv infection and expanded surveillance case definition for aids among adolescents and adults. *Clin. Infect. Dis.* 17, 802–810 (1993).
12. Skowron, G. & Ogden, R. *Reverse Transcriptase Inhibitors in HIV/AIDS Therapy*. (Humana Press, 2007).
13. Cihlar, T. & Ray, A. S. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antiviral Research* 85, 39–58 (2010).
14. de Béthune, M.-P. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: A review of the last 20 years (1989–2009). *Antiviral Res.* 85, 75–90 (2010).
15. Das, K., Lewi, P. J., Hughes, S. H. & Arnold, E. Crystallography and the design of anti-AIDS drugs: conformational flexibility and positional adaptability are important in the design of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 88, 209–231 (2005).
16. Das, K. & Arnold, E. HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 2. *Curr. Opin. Virol.* 3, 119–128 (2013).
17. Le Van, K. *et al.* New pyridinone derivatives as potent HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J. Med. Chem.* 52, 3636–3643 (2009).
18. Fang, C. *et al.* Two-dimensional infrared spectra reveal relaxation of the nonnucleoside inhibitor TMC278 complexed with HIV-1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1472–1477 (2008).
19. Li, X. *et al.* Novel HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: a patent review (2011-2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* 24, 1199–1227 (2014).

20. Medina-Franco, J. L. *et al.* Flexible docking of pyridinone derivatives into the non-nucleoside inhibitor binding site of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorganic Med. Chem.* 12, 6085–6095 (2004).
21. Benjahad, A. *et al.* 4-Benzyl and 4-benzoyl-3-dimethylaminopyridin-2(1H)-ones: In vitro evaluation of new C-3-amino-substituted and C-5,6-alkyl-substituted analogues against clinically important HIV mutant strains. *J. Med. Chem.* 48, 1948–1964 (2005).
22. Himmel, D. M. *et al.* Crystal structures for HIV-1 reverse transcriptase in complexes with three pyridinone derivatives: A new class of non-nucleoside inhibitors effective against a broad range of drug-resistant strains. *J. Med. Chem.* 48, 7582–7591 (2005).
23. Li, A. *et al.* Novel Pyridinone Derivatives As Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) with High Potency against NNRTI-Resistant HIV-1 Strains. *J. Med. Chem.* 56, 3593–3608 (2013).
24. Maggiora, G. M. On Outliers and Activity Cliffs Why QSAR Often Disappoints. *J. Chem. Inf. Model.* 46, 1535 (2006).
25. Medina-Franco, J. L., Navarrete-Vázquez, G. & Méndez-Lucio, O. Medicinal Chemistry Activity and property landscape modeling is at the interface of chemoinformatics and medicinal chemistry. *Futur. Med. Chem* 7, 1197–1211 (2015).
26. Cao, Y. *et al.* Synthesis and biological evaluation of pyridinone analogues as novel potent HIV-1 NNRTIs. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 149–159 (2015).
27. Reyes, H. Síntesis de Híbridos de piridinona-UC781 y Análogos para Estudios de Acoplamiento Molecular y Evaluación de la Replicación del VIH-1. (Instituto Tecnológico de Tijuana, 2014).
28. Tarasova, O. A. *et al.* QSAR Modeling Using Large-Scale Databases: Case Study for HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* 55, 1388–1399 (2015).
29. Kurczyk, A. *et al.* Ligand-Based Virtual Screening in a Search for Novel Anti-HIV-1 Chemotypes. *J. Chem. Inf. Model.* 55, 2168–2177 (2015).
30. Medina-Franco, J. L., Rodríguez-Morales, S., Juárez-Gordiano, C., Hernández-Campos, A. & Castillo, R. Docking-based CoMFA and CoMSIA studies of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of the pyridinone derivative type. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 18, 345–360 (2004).

31. Medina-Franco, J. L., Golbraikh, A., Oloff, S., Castillo, R. & Tropsha, A. Quantitative Structure--activity Relationship Analysis of Pyridinone HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors using the k Nearest Neighbor Method and QSAR-based Database Mining. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 19, 229–242 (2005).
32. Bajaj, S., Sambhi, S. S., Gupta, S. & Madan, A. K. Model for Prediction of Anti-HIV Activity of 2-Pyridinone Derivatives Using Novel Topological Descriptor. *QSAR Comb. Sci.* 25, 813–823 (2006).
33. Debnath, U., Verma, S., Jain, S., Katti, S. B. & Prabhakar, Y. S. Pyridones as NNRTIs against HIV-1 mutants: 3D-QSAR and protein informatics. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 27, 637–654 (2013).
34. Clark, A. M. 2D Structure Depiction in MOE. 1107–1123 (2005).
35. CCG. Molecular Operating Environment - MOE. (2014).
36. Reyes, H., Aguirre, G. & Chávez, D. 4-Hydroxy-6-methylpyridin-2(1*H*)-one. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online* 69, o1534–o1534 (2013).
37. Cabrera, A. Diseño, Síntesis y Modelado Molecular de Híbridos de Quinolona-UC781. (Instituto Tecnológico de Tijuana, 2015).
38. Cabrera, A., Miranda, L. D., Reyes, H., Aguirre, G. & Chávez, D. Crystal structure of ethyl 2,4-dichloroquinoline-3-carboxylate. *Acta Crystallogr. Sect. E Crystallogr. Commun.* 71, o939 (2015).
39. Molsoft L.L.C. Internal Coordinate Mechanics - ICM Pro. (2015).
40. Forli, W., Halliday, S., Belew, R. & Olson, A. AutoDock Version 4.2. *Citeseer* 1–66 (2012).
41. Word, J. M., Lovell, S. C., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. Asparagine and glutamine: using hydrogen atom contacts in the choice of side-chain amide orientation. *J. Mol. Biol.* 285, 1735–1747 (1999).
42. Damm, K. L. & Carlson, H. a. Gaussian-weighted RMSD superposition of proteins: a structural comparison for flexible proteins and predicted protein structures. *Biophys. J.* 90, 4558–4573 (2006).
43. Kawabata, T. Build-up algorithm for atomic correspondence between chemical structures. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 1775–1782 (2011).
44. Raymond, J. W. & Willett, P. Maximum common subgraph isomorphism algorithms for the matching of chemical structures. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 16, 521–533 (2002).

45. Neves, M. a. C., Totrov, M. & Abagyan, R. Docking and scoring with ICM: the benchmarking results and strategies for improvement. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 26, 675–686 (2012).
46. An, J., Totrov, M. & Abagyan, R. Pocketome via comprehensive identification and classification of ligand binding envelopes. *Mol. Cell. Proteomics* 4, 752–761 (2005).
47. Kufareva, I., Ilatovskiy, A. V. & Abagyan, R. Pocketome: An encyclopedia of small-molecule binding sites in 4D. *Nucleic Acids Res.* 40, (2012).
48. Sander, T., Freyss, J., Von Korff, M. & Rufener, C. DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J. Chem. Inf. Model.* 55, 460–473 (2015).
49. Benjahad, A. *et al.* 4-Benzyl and 4-Benzoyl-3-dimethylaminopyridin-2 (1H) -ones : **In Vitro Evaluation of New C-3-Amino-Substituted and C-5 , 6-Alkyl-Substituted Analogues** against Clinically Important HIV Mutant Strains. *In Vitro* 2, 1948–1964 (2005).

7. Apéndice

7.1. Artículo - Advances in the development of pyridinone derivatives as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, *RSC Advances* 2016, 6, 2119-2130

CrossMark
click for updatesCite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 2119

Advances in the development of pyridinone derivatives as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors†

Hugo Vite-Caritino,^a Oscar Méndez-Lucio,^b Héctor Reyes,^c Alberto Cabrera,^c Daniel Chávez^c and José L. Medina-Franco^{*a}

Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) are part of a structurally diverse family with distinct features attractive for the treatment of AIDS that continues to be a major health problem. NNRTIs are highly selective to HIV-1 reverse transcriptase and have, in general, high selectivity and lower toxicity than other anti-AIDS drugs. However, non-optimal pharmaceutical properties and resistance mutations highlight the need to continue identifying and developing novel NNRTIs. Derivatives of pyridin-2(1*H*)-one are promising NNRTs under pre-clinical development. Herein, we survey the evolution of the pyridin-2(1*H*)-one class over the past 25 years: from the first generation of compounds with weak inhibitory activities against mutant strains to advanced generations with improved activity profiles against clinically relevant mutants. Crystallographic structures, structure-based and ligand-based computational analysis, and medicinal chemistry efforts have worked in synergy to develop this important chemical class. We also discuss recent trends and future directions that can further improve the activity of pyridin-2(1*H*)-ones against clinically relevant mutant strains.

Received 3rd December 2015
Accepted 16th December 2015

DOI: 10.1039/c5ra25722k

www.rsc.org/advances

1. Introduction

Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) continues to be a major health problem. According to the World Health Organization WHO, in 2014 there were 36.9 million people living with the human immunodeficiency virus (HIV). In the same year, there were 2.0 million new infections and 1.2 million people died from AIDS.¹ Drugs available today for the treatment of HIV-1 infections can be classified into the following classes: reverse transcriptase (RT) inhibitors: nucleoside (nucleotide) (NRTIs) and non-nucleoside (NNRTIs); HIV protease inhibitors, integrase inhibitors, a fusion inhibitor (to prevent the fusion of the viral envelope with the host-cell membrane), and a C-C chemokine receptor type five (CCR5) inhibitor (to block the interaction of the virus with this receptor at the host cell).² These drugs are administered through the Highly Active Antiretroviral Therapy or HAART in various combinations and administration schedules. Current

treatments require the combination of at least two or three active drugs from at least two different classes. For instance, Atripla and Complera are combinations of two NRT inhibitors and one NNRTI. HAART has been helpful to reduce the viral loads in patients, reducing the incidence of opportunistic infections and death in AIDS patients. However, treatments eventually fail due to the emergence of resistance. Resistance is primarily associated with the development of mutations in RT, integrase, and HIV protease.

In this paper we survey the progress on the development of NNRTIs with a special emphasis on the pyridine-2(1*H*)-one chemical class. Pyridinone derivatives were one of the first chemical classes to be investigated as anti-HIV compounds. Similar to other NNRTIs, due to the emergence of resistance, several groups around the globe have been working on the optimization of pyridinone derivatives using a wide range of experimental and computational tools. This manuscript is organized in five sections. After this introduction, a brief overview of the structure of RT is presented in Section 2. Section 3 discusses the current status of NNRTIs including the major strategies that are being pursued to overcome resistance. It is also presented an overview of the chemical classes that are being developed. Section 4 describes the development and current status of pyridine-2(1*H*)-one derivatives as NNRTIs. Contributions of computational methods to develop pyridin-2(1*H*)-one derivatives and current trends to further develop this chemical class are also discussed. Finally, concluding remarks are presented in Section 5.

^aFacultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Mexico City 04510, Mexico. E-mail: medinajl@unam.mx; jose.medina.franco@gmail.com; Tel: +52-55-5622-3899 ext. 44458

^bUnilever Centre for Molecular Science Informatics, Department of Chemistry, University of Cambridge, Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW, UK

^cCentro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana, Apdo. Postal 1166, 22500, Tijuana, B.C., Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ra25722k

2. Reverse transcriptase (RT)

HIV-1 RT is a non-symmetric heterodimer that has a p66 subunit (with 560 amino acid residues) and a p51 subunit (with 440 amino acid residues). At the time of writing (November 2015) there were more than 200 crystallographic structures of HIV RT in the Protein Data Bank (PDB).³ These structures include wild-type (WT) and mutant enzymes; for more detail see Table S1 in the ESI.† Interestingly, 197 of these structures were co-crystallized with a ligand, being nevirapine and rilpivirine the most common ligands (with 21 and 14 structures, respectively). On the other hand, only 27 structures were crystallized in the free state or in complex with DNA.

A three-dimensional (3D) structure of RT is shown in Fig. 1. The 3D structure of the p66 unit has been compared to a right hand with a “fingers”, “palm” and “thumb” domain.⁴ In this analogy, the “fingers” correspond to amino acids 1–85 and 118–155; the “palm” is associated with amino acid residues 86–117 and 156–237; and the “thumb” with amino acid residues 238–318. The palm domain includes the polymerase active site (aspartic acid residues 110, 185, and 186 marked in red in Fig. 1).² The palm domain also includes the binding (allosteric) site of the NNRTIs that is located about 10 Å away from the catalytic site (for example, see yellow region in Fig. 1). This allosteric site is hydrophobic in nature. It is comprised of two residues in the p51 subunit: Ile135 and Glu138; and the following residues in the p66 subunit: Tyr181, Tyr188, Phe227, Trp229, and Try232 (aromatic); Pro59, Leu100, Val106, Val179, Leu234, and Pro236 (hydrophobic) and Lys101, Lys103, Ser105, Asp132, and Glu224 (hydrophilic). This binding site is non-existing in the unbound RT but it is created upon binding of a NNRTI. Upon binding of a NNRTI, the sidechains of Tyr181

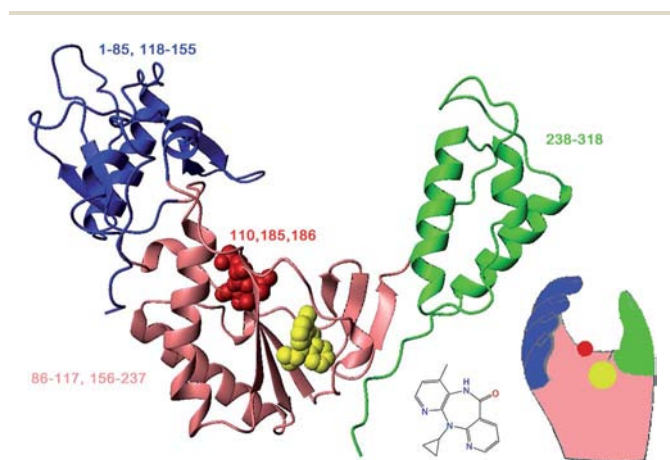


Fig. 1 Schematic representation of the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase (RT). This ribbon representation of the RT active domain illustrates its hand-like structure, showing fingers (blue), palm (pink) and thumb (green). The fingers correspond to amino acids 1–85 and 118–155; the palm is associated with amino acid residues 86–117 and 156–237; and the thumb with amino acid residues 238–318. The active site (Asp110, Asp185, and Asp186), where DNA is elongated, is in the palm region. It is also the position of the RT inhibitor nevirapine (yellow) in the non-nucleoside binding pocket. Adapted from http://www.psc.edu/science/Madrid/getting_a_grip_on_aids.html.

and Tyr188 rotates toward the catalytic site. In turn, this rotation shifts the position of the three catalytic aspartic acid residues by ~ 2 Å. These conformational modifications are thought to be the basis of the inhibitory effect against the enzyme.² Different techniques continue to be applied to elucidate the role and movement of amino acid residues upon binding of NNRTIs. For instance, a recent NMR study identified a correlation between ^{13}C shifts of the M230 resonance of HIV-RT with the activity of nevirapine, delavirdine, efavirenz, dapivirine, etravirine, and rilpivirine.⁵

Despite the broad availability of structural information for RT, docking-based virtual screening has only led to few novel lead compounds with improved potency compared to known compounds. This fact has been associated, at least in part, with the induced fit mechanism that uses the NNRTIs to bind RT.⁶ However, there are examples that clearly show that docking-based virtual screening is useful to uncover compounds with improved activity against mutant strains.^{7,8}

3. Non-nucleoside HIV-1 RT inhibitors

Contrary to NRTIs, NNRTIs are highly selective toward the HIV-1 RT enzyme and therefore, exert minimum side-effects. Indeed, NNRTIs continue to be a major component of anti-HIV therapy.²

3.1. NNRTIs approved for clinical use

There are five NNRTIs approved for clinical use which can be grouped in three generations based on their activity profile and approval (Fig. 2A). The first generation: nevirapine (approved by the USA Food and Drug Administration, FDA in 1996), delavirdine (approved in 1997) and efavirenz (approved in 1998). Nevirapine and efavirenz continue to be an important part of HAART, in particular efavirenz which is the most extensively used NNRTI. Overall, delavirdine is much less used because of its poor pharmacokinetics. The first generation of NNRTIs is characterized by a low genetic barrier to resistance (*i.e.* only one mutation is enough to reduce the efficacy of these compounds), hence they are usually co-administered with at least two other non-NNRTI antiretroviral drugs. Etravirine, also administered in combination with other antiretroviral drugs, was the first next generation NNRTI to be approved by the FDA in 2008. This drug was characterized by retaining activity against mutant strains.² Rilpivirine was the next drug approved in 2011 by the FDA for clinical use. This drug belongs to the same chemical class of etravirine (Fig. 2A) but has a better activity profile against mutant strains (*vide infra*). Efavirenz and rilpivirine are part of the combination therapies Atripla and Complera which are amongst the most effective therapies. However, the rapid mutation of the virus, side effects, and not optimal pharmacological properties of current NNRTIs prompts the need to develop novel NNRTIs. For instance, hepatotoxicity and severe rash are associated with the use of nevirapine. Efavirenz is associated with CNS side effects that are sometimes difficult to overcome, especially in the first days of administration.²

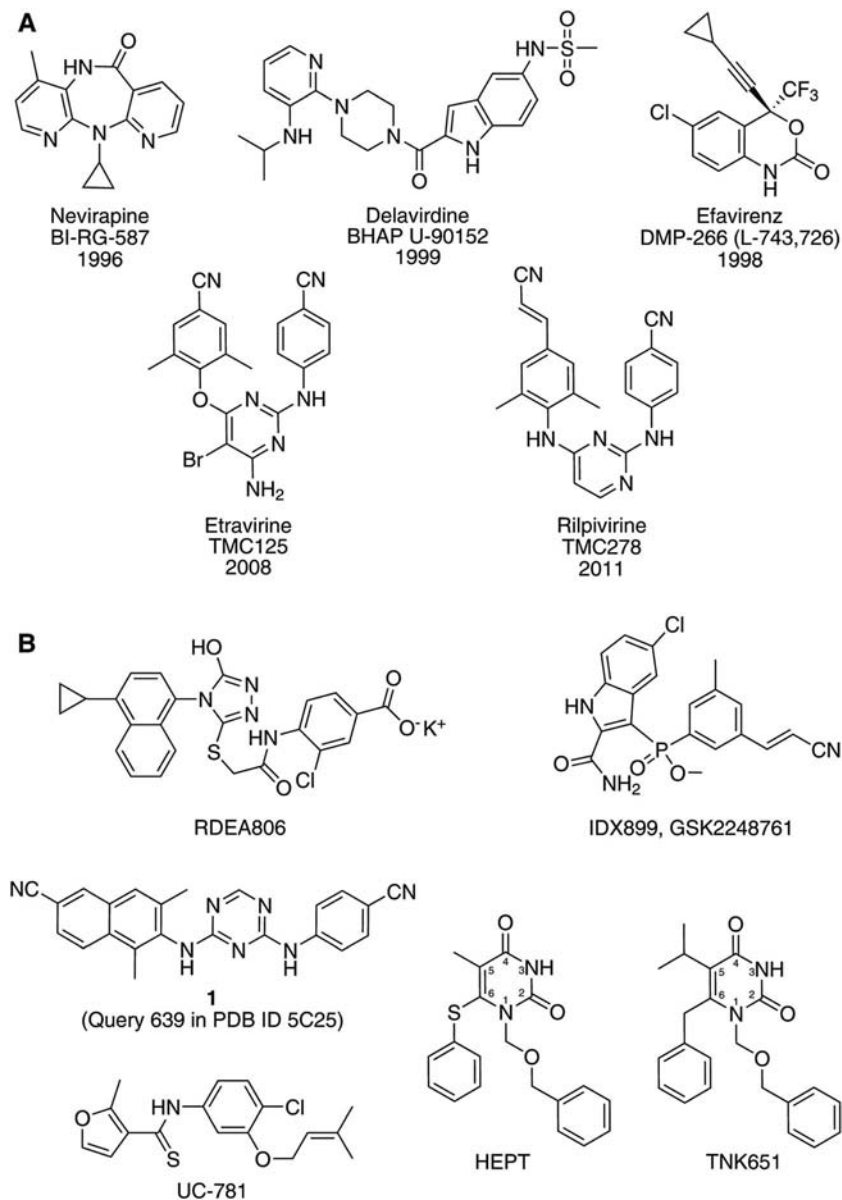


Fig. 2 Chemical structures of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors: (A) approved for clinical use (including year of approval); (B) examples of other reference inhibitors discussed in the manuscript including compounds under development.

Hypersensitivity reactions or other adverse effects have been observed with the treatment of second generation NNRTIs.⁶

3.2. The challenge: overcoming drug resistance

As commented by Das *et al.*, it is desirable that a NNRTI blocks the replication of resistant viral strains and preserve the potency for extended periods of time.⁹ Mutations associated with resistance to NNRTIs are located within the non-nucleoside binding pocket (as mentioned above, this binding pocket is approximately 10 Å away from the nucleoside binding site). As recently reviewed, almost all of the residues in the binding pocket can mutate and the majority of them can confer resistance to NNRTIs.¹⁰ Examples of the mutations observed are L100I, K101E, V106A, K103N, V179D, Y181C, Y188L, G190A, and E138K

in p51. Two of the most clinically relevant mutations are K103N and Y181C. In particular, the K103N mutation gives an almost uniform level of cross-resistance to most NNRTIs. Béthune published a rich review of common mutations associated with NNRTIs resistance and their impact on the susceptibility of HIV-1 to NNRTIs.²

Mutations either eliminate key (pharmacophoric) interactions with the small-molecule inhibitor, or affect the size/shape of the binding pocket preventing the inhibitor from a suitable binding. Specifically, mutations Y181C or Y188L cause loss of aromatic ring stacking interactions; mutations L100I or G190A/S are associated with steric hindrance, and mutations V106A or V179D modify hydrophobic interactions.¹⁰ Also, it has been commented that the K103N mutation might induce resistance by stabilizing the unbound form of RT.¹¹

During the design and development of NNRTIs with improved activity against resistance mutants it has been observed that conformational flexibility and positional adaptability play an important role to retain activity against mutant strains.⁹ For instance, during the development of etravirine (Fig. 2A), a diarylpyrimidine or DAPY derivative, crystallographic structures and molecular modeling studies revealed that the torsional flexibility of certain chemical bonds in the structure strategically located, plus the ability of the molecule to adapt its position and orientation, are associated with a retained potency against a wide range of drug-resistant HIV-RTs.⁹ This is exemplified by the high-resolution structures of the analogue rilpivirine (Fig. 2A) bound to WT, and double mutants K103N/Y181C and L100I/K103N HIV-RT.¹² Rilpivirine inhibits K103N, Y181C, and K103N/Y181C RT mutants at an EC₅₀ < 1 nM. Authors of that work concluded that the crystallographic structures (*i.e.*, PDB IDs: 2ZD1, 3BGR, and 2ZE2, respectively) gave an understanding of the role of the flexibility of the inhibitor to compensate for drug-resistance mutations.¹²

3.3. Compound classes under (pre-clinical and clinical) development

The chemical structures of NNRTIs are highly diverse comprising more than 50 families of molecules. Li *et al.* published an excellent paper with a recent review of NNRTIs⁶ highlighting the chemical classes discussed in the patent literature from 2011 to 2014. In addition to drugs approved for clinical use (*vide supra*, Fig. 2A) other compounds are in clinical development such as the triazole RDEA806 and the phosphindole IDX899 (GSK2248761) (Fig. 2B). The development of the pyrazole lersivirine (UK-453061) was discontinued in 2013.

Bicyclic arylaminoazines are examples of one of the compound classes under (pre-clinical) development.¹³ Extensive structural-activity relationships (SAR) studies coupled with structure-based analysis have recently led to two compounds with sub-10 nM potency against WT and clinically relevant viral variants of HIV-1 (compound **1** in Fig. 2B).¹⁴ The compounds also showed acceptable cytotoxicity and solubility better than rilpivirine. Of note, a crystallographic structure of **1** is available (ligand query 639 in PDB ID: 5C25).

4. Progress on the development of pyridin-2(1H)-one derivatives

Among the chemically diverse NNRTIs, including the classes discussed by Li *et al.* (*vide supra*),⁶ pyridin-2(1H)-ones represent a promising class. This chemical family has evolved from typical NNRTIs that were initially inactive against mutant strains, to advanced generations with improved activity profile against clinically relevant mutants. The evolution of pyridin-2(1H)-one chemical class as NNRTIs is discussed in this section. Fig. 3 shows the chemical structures of representative molecules discussed. Note that, in contrast to the patent review paper published by Li *et al.*, the current paper is focused on one major class, pyridinone derivatives. As discussed

below, the present review spans nearly 25 years of development of this major structural class of NNRTIs since the first reports in 1991 to the time of writing this manuscript. In addition, herein we discuss not only patent literature but scientific journals as well.

4.1. The beginnings: Merck pyridinones

Pyridin-2(1H)-one derivatives as NNRTIs were first reported in 1991.¹⁵ These compounds were identified from a screening program at Merck. One of the first potent and selective HIV-1 RT inhibitor of this class had a phthalidimide ring and the molecule (L-345-516) was hydrolytically unstable. An extensive optimization program led to the development of compounds that moved into clinical trials.^{16–18} Representative compounds are the Merck pyridinones L-697,661, L-697-639, and L-696-229 (Fig. 3). However, the emergence of resistance hampered their further development. In particular, the fast emergence of drug-resistant HIV strains containing the Y181C, Y188L, and K103N mutations in RT ultimately led to the abandonment of the clinical development of the Merck pyridinones. However, as discussed in detail in the next sections, the pyridin-2(1H)-one ring remained as basic core for further optimization.

As part of the early optimization of the Merck pyridinones an important amount of SAR information was accumulated. For instance, for this series of Merck pyridinones the best combination of alkyl groups at the C-5 and C-6 positions was 5-ethyl/6-methyl. This optimal combination for these series was taken as a starting point to develop new derivatives with improved resistance profile.

4.1.1 Docking studies with Merck pyridinones. During the early development of pyridin-2(1H)-one derivatives as NNRTIs computational simulations were conducted to aid in the rationalization of the SAR at the structural level. Of note, there were not available crystallographic structures of RT bound to this class of inhibitors. Flexible docking of Merck pyridinones with a series of crystallographic structures of RT co-crystallized with other NNRTIs¹⁹ indicated that the pyridinones adopt the classical butterfly-like conformation of several other NNRTIs. The docking models also indicated that the lactam NH group forms the “signature” hydrogen bond with Lys101 that many NNRTIs have. Results also suggested that the benzoxazol ring of compounds such as L-697,661 and L-696,229 (Fig. 3) made aromatic interactions with Tyr181. Therefore, the docking models provided a structure-based rationale to replace the benzoxazol ring with other structural moiety as further elaborated in the next section.¹⁹

4.2. Early development of pyridin-2(1H)-one hybrids with other NNRTIs

In 1995, the synthesis of hybrids with HEPT and analogues such as TNK651 (ref. 20) (Fig. 2B) was published as one of the first modifications of the Merck pyridinones to improve their activity profile against drug-resistant mutants. The hybrid design was based on the comparison and replacement of the pyridin-2(1H)-one scaffold with the central pyrimidine ring of HEPT; if the 3–4 NH lactam of the pyrimidine ring of TNK651 (Fig. 2B) is

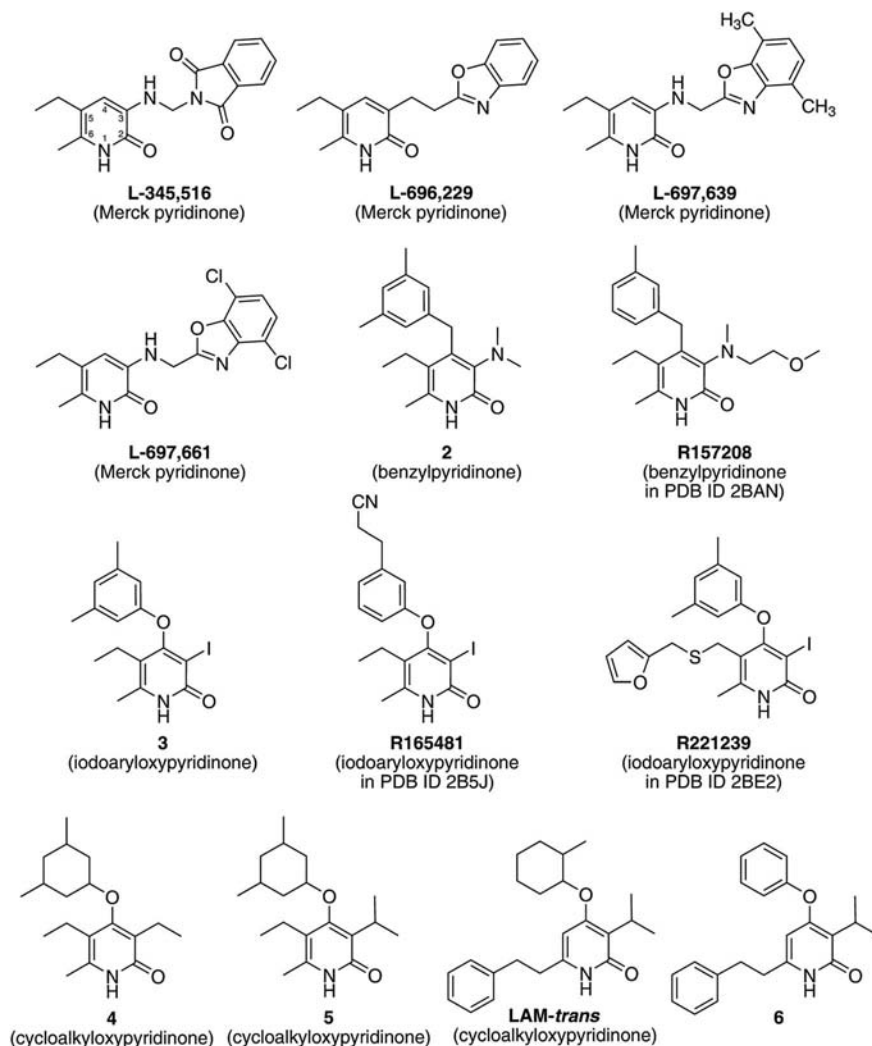


Fig. 3 Chemical structures of representative pyridin-2(1H)-one derivatives discussed in this work. The numbering of the pyridinone ring is shown in structure L-345,516. The activity profile of selected compounds against wild-type and mutant strains is summarized in Table 1.

overlapped with the NH lactam of the pyridin-2(1H)-one ring (Fig. 3A), the C-6 benzyl of TNK651 (or 6-phenylthio of HEPT) is equivalent to the C-4 position of the pyridin-2(1H)-one ring (Fig. 3). Notably, crystallographic structures of RT in complex with TNK651 revealed the significance of the C-6 benzyl group to enhance the interactions with the binding site.²⁰ This combination gave rise to the new sub-class 4-(arylthio)-pyridin-2(1H)-ones.²¹ Further SAR investigation led in 2000 to the development of 4-benzyl-pyridin-2(1H)-ones.²²

One of the first most promising compounds in the 4-benzyl subclass was compound 2 (Fig. 3 and Table 1). In addition to have a 3,5-dimethyl benzyl group at C-4, this molecule is characterized by having a dimethyl amino group at C-3, an ethyl group at C-5 of the pyridinone ring, and methyl group at C-6. The 4-benzyl-pyridin-2(1H)-one 2 showed a strong inhibition of recombinant HIV-1 RT and nanomolar inhibition of an HIV-1 resistant strain to nevirapine.²² Of note, the optimal 5-ethyl/6-methyl combination at the C-5 and C-6 positions of the Merck pyridinones (*vide supra*) largely influenced the development of the first series of pyridin-2(1H)-one/HEPT

hybrids. As discussed below, the additional but independent improvement of HEPT that gave rise to TNK651 (ref. 20) guided the design of other pyridin-2(1H)-one/HEPT hybrids with different substituents, in particular at C-6 (*vide infra*). Interestingly, during the early development of 4-(arylthio)-pyridin-2(1H)-ones²¹ and 4-benzyl-pyridin-2(1H)-ones,²² no docking studies were reported with crystallographic structures of RT available at that time.

4.3. Further development of pyridin-2(1H)-one/NNRTIs hybrids: crystallographic structures

During the next few years Benjahad *et al.* continued the exploration of the SAR of 4-arylthiopyridinones and benzylpyridinones.^{23,24} One of the compounds that emerged from such extensive SAR exploration was the benzylpyridinone R157208 (ref. 24) (Fig. 3). A particular structural feature of this compound is an N-3 motif. The *in vitro* activity profile of this compound is summarized in Table 1. An extensive activity profile across double mutants is fully detailed in Benjahad *et al.*²⁴ R157208

Table 1 Activity profile of selected pyridinone derivatives and reference NNRTIs from other chemical classes against wild-type and mutant HIV-1 RTs

Compound	IC ₅₀ RT (μM)	EC ₅₀ (μM) WT RT	EC ₅₀ (μM) K103N	EC ₅₀ (μM) Y181C	EC ₅₀ (μM) K103N/Y181C	EC ₅₀ (μM) L100I/K103N	SI ^f	Ref.
2	0.02	0.0002 LAI cell line	NA	NA	NA	NA	>5000	22
3	NA	0.0013 LAI cell line	0.003	0.020	0.040	0.020	9000	26
4	NA	<0.001	0.005 (TZM-bl cells)	0.015 (TZM-bl cells)	0.107 (TZM-bl cells)	0.081 (TZM-bl cells)	>67 000	11
5	NA	<0.001	0.002 (TZM-bl cells)	0.006 (TZM-bl cells)	0.105 (TZM-bl cells)	0.044 (TZM-bl cells)	>82 000	11
6	0.089	0.0563	NA	NA	NA	NA	3467	30
R157208	NA	0.001 LAI cell line	0.079	0.794	10	0.794	10 000	24
R165481	NA	0.0008	0.001	0.004	0.004	0.008	NA	25
R221239	NA	0.002	0.001	0.005	0.005	0.032	NA	25
LAM-trans	0.003	0.036	0.075	0.190	NA	NA	3177	27
Nevirapine	4.65 ^b	0.190 ^b	>10 ^c	>10 ^c	NA	NA	1074 ^b	
Efavirenz ^d	0.001	0.001	0.039	0.002	0.04	>10		
Etravirine ^d	0.002	0.002	0.001	0.006	0.005	0.01		
Rilpivirine ^d	0.004	0.004	0.0003	0.0001	0.0008	0.008		

^a Selectivity index: ratio of cytotoxicity (CC₅₀) to EC₅₀. ^b HIV-1_{STR33} infection in TZM-bl cell lines taken from ref. 30. ^c Taken from ref. 27. ^d EC₅₀ values in μM taken from ref. 12.

showed an acceptable activity profile against mutant strains relevant in the clinic, comparable to that of efavirenz. In the SAR study other analogues related to the structure of R157208, however, showed an overall better profile, comparable to that of the parent molecule. In that work was concluded that substitution at the N-3 is very sensitive to the activity.²⁴ In particular, augmenting the steric bulk at this motif has a negative influence on the activity.

A notable contribution of that extensive SAR effort was the generation of a crystallographic structure of R157208 in complex with WT RT first published in Benjihad *et al.*²⁴ and then further analyzed in Himmel *et al.*²⁵ The co-crystal structure revealed that the 4-benzyl substituent make interactions with the hydrophobic pocket formed by residues Tyr188 and Trp229. The group at C-3, namely, the 3-(2-methoxyethyl)methylamino, makes interactions primarily with Tyr181.

Almost simultaneously that the crystallographic structure of HIV-1 RT complexed with R157208 was published²⁴ Himmel *et al.* released two additional crystallographic structures of HIV-1 RT bound to the pyridin-2(1*H*)-ones R165481 and R221239 (Fig. 3).²⁵ These two molecules belong to the 3-iodo-4-aryloxy-pyridinone-IOPY-subclass.²⁶ Interestingly, one of the previous lead compounds from the 3-iodo-4-aryloxy-pyridinone sub-class, compound 3 (Fig. 3 and Table 1), was initially developed with the goal of developing a synthetic route to introduce a broad variety of substituents at C-3. Unexpectedly, compound 3 became a lead compound itself with a promising activity profile against several drug-resistant mutant strains as shown in Table 1.²⁶

Table 2 summarizes the crystallographic information available for pyridin-2(1*H*)-ones bound to HIV-1 RT. Other selected structures are shown for comparison.

R165481 and R221239 are characterized by an iodine substitution at C-3, in contrast to the 3-(2-methoxyethyl)methylamino group of R157208 (Fig. 3). Similar to R157208, compounds R165481 and R221239 have nanomolar or sub-nanomolar activity with the WT RT but different activities with drug-resistant strains. Table 1 summarizes the activity profile against WT and representative mutant strains. Further activity information is presented at Himmel *et al.*²⁵ Of note, the crystallographic structures of the two co-crystal compounds that have an iodine atom at C-3 do not make extensive contacts with Tyr181. Indeed, the strong activity profile of R165481 and R221239 against mutants can be attributed in part to the interaction of the C-3 iodine atom with the main-chain carbonyl oxygen of Tyr188. It was also concluded in that study that the acrylonitrile substituent on the C-4 phenoxy ring of R165481 further interacts with conserved residues of the NNRT binding pocket. These observations helped to provide a rational explanation of the improved activity of R165481 with WT RT and drug-resistance variants. R221239 is further characterized by a flexible linker to a furan ring at C-6 that makes favorable interactions with Val106, Phe227, and Pro236. It was hypothesized that these interactions also provide a structural basis to rationalize its binding to mutant strains.²⁵

Table 2 Crystallographic structures of HIV-1 RT co-crystallized with pyridinone derivatives and other representative NNRTIs discussed in the manuscript

PBD ID	Description	Resolution (Å)	Co-crystallized NNRTI	Reference
2BAN	Wild-type HIV-1 RT/ATP	2.95	R157208	25
2B5J	Wild-type HIV-1 RT	2.90	R165481	25
2BE2	Wild-type HIV-1 RT	2.43	R221239	25
1RT2	Wild-type HIV-1 RT	2.55	TNK651	20
1FKP	K103N mutant in complex with Nevirapine	2.9	Nevirapine	42
1JLA	Y181C mutant complex with TNK-651	2.5	TNK651	43

4.4. 4-Cycloalkoxy-pyridin-2(1H)-one derivatives

As discussed above, the SAR of the C-4 position of the pyridinone ring was largely explored using a number of substituents including arylthio, aryloxy, or benzyl.^{22,24} In 2009, le Van *et al.* reported a novel series of 4-cycloalkoxy-pyridin-2(1H)-one derivatives.¹¹ The best compounds were **4** and **5** (Fig. 3). These two compounds showed high potency with WT HIV-1 RT and a series of single and double mutants. In addition, both molecules showed low toxicity. The antiviral activity profile is summarized in Table 1. Molecular docking of the newly synthesized pyridinones with a co-crystal structure of RT bound to TNK651 (PDB ID 1RT2, Table 2) showed an expected binding mode characterized by the following interactions: the lactam NH group forms a hydrogen bond with Lys101 and the C-4 group is located in the hydrophobic pocket interacting with Tyr181, Tyr188, Phe227, and Trp229. In that binding model, the C-5 substituent points towards Trp181. The C-3 group is close to Pro236 which is the most flexible region of the allosteric pocket. Docking of compound **4** with WT and K103N mutants suggested that this compound and other structural derivatives active against mutant strains show activity because their ability to adopt a different binding mode with the mutated binding pocket. For example, the carbonyl of the pyridinone ring is close to the amide group of Asn suggesting a favorable electrostatic interaction with the K103N mutant.¹¹

4.5. Development of pyridin-2(1H)-one/TNK651 hybrids

In 2013 Li *et al.* published the design of novel compounds²⁷ based on a hybrid design of the Merck pyridinones (Fig. 3) and TNK651 (Fig. 2B) previously designed by the same authors (*vide supra*).²⁰ The new series of pyridin-2(1H)-ones were characterized by a cycloalkoxy group at C-4 with diverse substituents at C-3 and C-6. During the design of the new compounds it was hypothesized that including a saturated ring at C-4 could increase the molecular flexibility of the molecule that is known

to be desirable feature to retain potency with drug resistance strains (*vide supra*). It was also hypothesized that including a methyl group at the ring at C-4 could enhance the interactions with the conserved residue W229 and, at the same time, reducing the π - π stacking interactions with Y181. The substituents at C-6 were chosen based on the comparison with the structure and SAR information available for TNK651. In particular, it was proposed that a substituent with a relative long side chain at this position could extend into a tunnel that connects the allosteric with the catalytic sites surrounded by Pro236 and Tyr318. These interactions are known to favor the affinity with WT HIV-1 and clinically relevant mutant strains. The compound with the best activity profile was LAM-*trans* that has an isopropyl group in C-3, a substituted cyclohexyl at C-4 and phenylethyl at the C-6 side chain (Fig. 3). This molecule showed an $IC_{50} = 0.003 \mu\text{M}$ in an enzyme-based assay, an $EC_{50} = 0.036 \mu\text{M}$, and cytotoxicity $CC_{50} = 114.38 \mu\text{M}$ (Table 1). The corresponding selectivity index (SI) was 3177, that was significantly better than the SI for nevirapine under the same assay conditions.²⁷ Furthermore, LAM-*trans* showed strong inhibition of the single mutations K103N and Tyr181C with EC_{50} of $0.075 \mu\text{M}$ and $0.190 \mu\text{M}$, respectively. Notably, it was observed that the configuration of the substituted cyclohexyl group at C-4 had a dramatic impact in the antiviral activity, in particular for the mutant strains. This is a good example of an 'activity cliff' (in particular a 3D activity cliff) *i.e.*, compounds with similar structure but large difference in the activity profile.^{28,29} The high sensitivity of the activity profile to the configuration of the molecule can be associated with the flexibility of the binding pocket and, overall, to the induced-fit mechanism of the NNRTIs (*vide supra*).

Li *et al.* also reported docking studies of LAM-*trans* and structural analogues *i.e.*, compound with iodine atom at C-3, with a co-crystal structure of RT bound to TNK651 (Table 2). Docking models supported the hypothesis that the phenylethyl at C-6 makes interactions with Tyr318 and Pro236. Docking of the analogue with an iodine atom at C-3 also confirmed the hypothesis of a halogen bond with the carbonyl oxygen of Tyr188. As expected, in the docking models, the 2'-methyl-cyclohexyl substituent at C-4 is oriented towards the hydrophobic sub-pocket formed by the residues Tyr188, Phe227, and Trp229. Compound LAM-*trans* was also docked with crystallographic structures of two mutant forms of RT, K103 and Y181C. In agreement with the experimental data, docking results showed that some of the protein-ligand interactions detected with the native form were lost.²⁷ However, some key interactions with the binding pocket remained; this explained in part the activity of LAM-*trans* with mutant strains. For example, the hydrogen bond with Lys101 was conserved in the docking model with the Y181C mutant. Also with the Y181C mutant, the interactions of the C-6 phenylethyl group with Tyr318 and Pro236 were preserved. With both mutants, the cyclohexyl ring of LAM-*trans* made interactions with the hydrophobic pocket formed by Tyr188 and Trp229.²⁷

Based on the chemical structure of LAM-*trans* (Fig. 3) in 2015 Cao *et al.* published the exploration of the SAR modifying positions 3 and 4 of the pyridin-2(1H)-one ring keeping constant

a 6-phenylethyl at the C-6 side chain.³⁰ At position C-3 authors evaluated the SAR of halogens I and Br, and two substituents with steric or lipophilic character: isopropyl and the *N,N*-dimethyl. One of the ideas to including halogens at C-3 was to favor an halogen bond with the carbonyl oxygen of the Tyr181 residue. At position C-4 Cao *et al.* explored the SAR with saturated and aromatic rings with oxygen, sulfur and nitrogen linkers (O, S, NH) that have different electronegativity into the bridging site.³⁰ Out of 16 synthesized compounds, the isopropyl group at C-3 and phenyl group at C-4 yielded the best HIV-1 RT inhibitory activity in an enzyme-based assay. Compound **6** with an oxygen linker (Fig. 3) also showed the best antiviral activity in a cell-based assay with an $EC_{50} = 0.056 \mu\text{M}$, and cytotoxicity $CC_{50} = 195.2 \mu\text{M}$. The SI (3467) was better than the value obtained for nevirapine under the assay conditions of the study. Docking studies of a closely related analogue of **6** but with a sulfur linker with a co-crystal structure of RT bound to TNK651 (Table 2) showed the expected binding conformation characterized by two notable interactions, namely: hydrogen bond interaction of the NH group of the pyridine-2(1*H*)-one ring with the backbone oxygen of Lys101 and π -stacking interactions of the C-4 phenyl group with Tyr188. The docked compound showed a comparable binding mode as the position of the co-crystal ligand. Further docking of a structural analogue of **6**

but with iodine atom at C-3 also supported the hypothesis of a halogen bond with the carbonyl oxygen of Tyr188.³⁰ It remains to test the activity of compound **6** with resistant mutant strains.

4.6. Toward new generations of pyridinones with potential improved activity profile

Inspired by the successful design of pyridin-2(1*H*)-one/HEPT hybrids along with docking studies and structural analysis of the predicted binding modes of the Merck pyridinones with the crystallographic structures of NNRTIs such as UC-781 (Fig. 2B), in 2007 Medina-Franco *et al.* designed *in silico* pyridin-2(1*H*)-one/UC-781 hybrids. A representative molecule proposed in that study was compound **7** in Fig. 4A.³¹ In contrast to introduce a substituent with an aromatic ring at C-4, in that study was proposed the strategy of including an aliphatic substituent at the same C-4 position. The aliphatic substituent should be able, at least in principle, to make interactions with conserved residues such as Trp229. In addition, instaurations in the aliphatic substituent could still make the π - π aromatic interactions with Tyr181 but such interactions should be less significant as compared to the π - π aromatic interactions of the parent Merck pyridinones.¹⁹ Based on this approach, Chávez *et al.* designed and synthesized a series of compounds such as DH-6, DH-7,

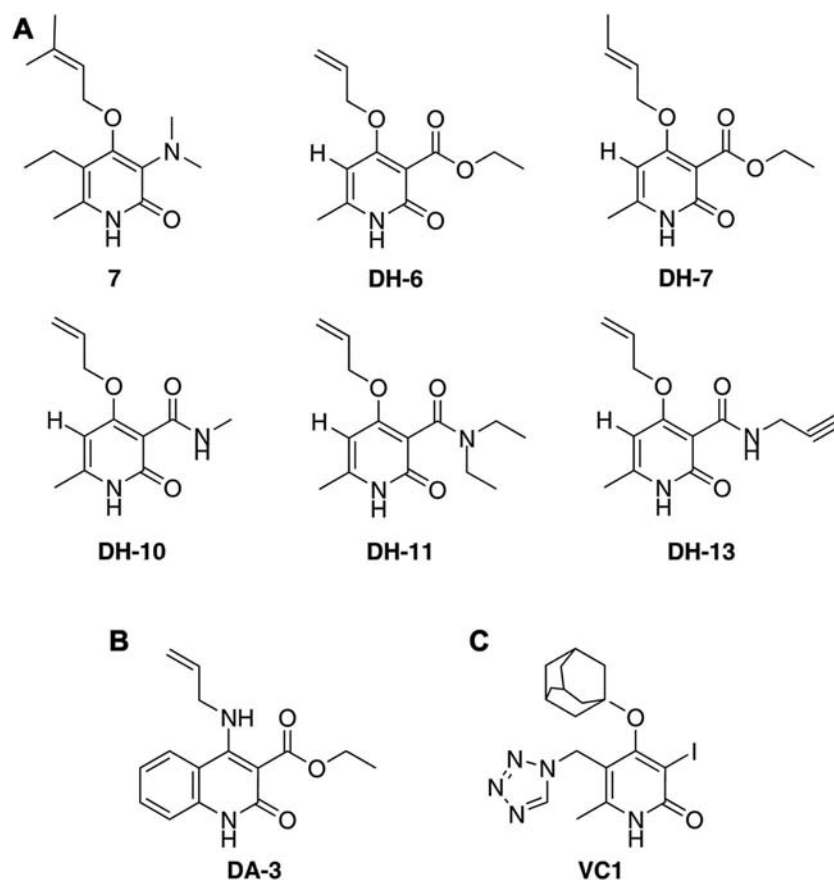


Fig. 4 Chemical structures of representative newly designed pyridine-2(1*H*)-ones and related compounds with potential activity against wild-type and mutant strains. (A) Pyridin-2(1*H*)-one/UC-781 hybrids designed by a structure-based approach. (B) Quinolone/UC-781 hybrid designed by a structure-based approach. (C) 3-Iodo-pyridin-2(1*H*)-one designed by 3D-QSAR and docking. See text for details.

Table 3 Representative computational studies towards the development of pyridinone derivatives

Study	Computational approaches	Major outcomes	Ref.
Flexible docking of selected Merck pyridinones	Docking with Autodock using crystallographic structures of RT bound to NNRTIs different from pyridinones	The pyridinones adopt a butterfly-like conformation in the NNRTI binding pocket; the lactam NH group forms the signature hydrogen bond with Lys101; the benzoxazol ring of L-697,661 and L-696,229 make aromatic interactions with Tyr181	19
Docking and QSAR of 40 Merck pyridinones	3D-QSAR, CoMFA and CoMSIA and docking with Autodock	Hypothesis: the benzoxazole ring of Merck pyridinones is implicated in the loss of activity upon mutation of Y181	38
QSAR of 40 Merck pyridinones and virtual screening	2D-QSAR, <i>k</i> nearest neighbor and docking with Autodock	Derivatives of the pyrazolo[3,4- <i>d</i>] pyrimidine and phenothiazine type were identified as putative NNRTIs leads	39
QSAR of 72 3-aminopyridin-2(1 <i>H</i>)-ones	2D-QSAR using a novel augmented eccentric connectivity index	80.6% of the pyridin-2(1 <i>H</i>)-ones of the data set were correctly predicted	40
Docking and QSAR of 178 4-benzyl/benzoyl pyridin-2-ones	3D-QSAR, CoMFA and CoMSIA and docking with Autodock using PDB IDs 2BAN (WT), 3MED (K103N), 1JKH (Y181C), 2YNF (Y188L)	The C-3, C-4 and C-6 positions of the pyridinone ring were very important for a broad-spectrum anti-HIV-1 RT activity. An electronegative field between the pyridinone and aryl moieties is a common requirement for the activities. Virtual compounds were designed	41
Docking of 4 and structural analogues	Docking with GOLD using PDB ID 1RT2 (WT), and K103N mutant (no PDB ID disclosed). Further energy minimization of the complex	Expected binding orientation: the lactam NH group forms a hydrogen bond with Lys101; the C-4 group is located in the hydrophobic pocket (Tyr181, Tyr188, Phe227, and Trp229). The C-3 group is close to Pro236. 4 can adopt alternative binding modes with WT (<i>i.e.</i> , C-3 or C-6 close to Pro236). In K103N, the carbonyl of the pyridinone ring can make favorable interactions with the amide group of Asn	11
Docking of LAM- <i>trans</i> and structural analogues	Docking with Autodock Vina using PDB IDs: 1RT2 (WT), 1FKP (resistant K103N mutant), and 1JLA (resistant Y181C mutant)	Hypothesis: the phenylethyl at C-6 makes interactions with Tyr318 and Pro236. Docking models with mutant strains showed a less number of interactions with the binding pocket but some key interactions remained unchanged	27
Docking of two compounds of the 6-phenylethyl pyridinone family	Docking with GOLD using PDB ID 1RT2 (WT)	Expected binding conformation, similar to the co-crystal ligand TNK651 (hydrogen bond interaction with Lys101 and π -stacking with Tyr188). Docking of an analogue with iodine atom at C-3 supported the hypothesis of a halogen bond with the carbonyl oxygen of Tyr188	30

DH-10, DH-11, and DH-13 (Fig. 4A).³² These compounds are characterized by having an aliphatic substituent at C-4 position and different polar groups at C-3.

More recently Chávez *et al.* designed a series of quinolone/UC-781 hybrids. A representative compound is DA-3 in Fig. 4B. Similar to the pyridin-2(1*H*)-one/UC-781 hybrids, it is

proposed that an unsaturated substituent in C-4 position and a polar group at C-3 could be effective against resistant strains. The synthesis of several pyridin-2(1*H*)-one/UC-781 hybrids has been completed.^{33,34} It remains to test the cytotoxicity and antiviral activity of the newly designed compounds with WT and resistant strains available in the clinic. These biological

assays are in progress and are expected to be released in due course.

4.7. Contributions of computational methods to develop pyridin-2(1H)-one derivatives

Despite the fact structure-based *de novo* design of different scaffolds of NNRTIs is challenging (due to the induced fit mechanism of these compounds),⁶ molecular modeling and computational analysis have played a key role in the multidisciplinary efforts to develop NNRTs, for instance, to develop marketed drugs such as etravirine, and rilpivirine.⁹ In light of these successful applications, diverse computational strategies continue to be part of multidisciplinary teams to design anti-HIV compounds. For example, Tarasova *et al.* recently reported QSAR studies of two large databases, Thomson Reuters Integrity and ChEMBL, with activity data for HIV-1 RT inhibition. The purpose of that work was focused on method development in regards to assess the feasibility of using these large databases for QSAR modeling.³⁵ In a separate but also recent work, Kurczyk *et al.* published a ligand-based virtual screening of 1.5 million compounds commercially available to identify novel chemotypes with anti-HIV-1 activity. The first steps of the virtual screening were focused on inhibitors of HIV integrase. Authors of that work identified two novel chemotypes with promising antiretroviral activity and good candidates to initiate a hit optimization program.³⁶ A third recent example is the *in silico de novo* design of novel NNRTIs using a bio-molecular modelling approach.³⁷ Computational methods have helped to advance the development of pyridin-2(1H)-one derivatives. As discussed above, computational studies have contributed to provide hypothesis that explain the activity of Merck pyridinones and newly designed compounds against WT and mutant strains. Most of the studies involve molecular docking, using various software programs, with crystallographic structure of both wild-type and mutant strains. Table 3 summarizes representative computational studies including the major outcomes.

In addition to molecular docking, other methods have also contributed to understand the SAR of data sets of compounds in a retrospective or prospective manner. For instance, in 2004 Medina-Franco *et al.* reported three-dimensional quantitative SAR analyses (3D-QSAR) of 40 Merck pyridinones.³⁸ In that study, molecular docking was used as a strategy to align the structures for Comparative Molecular Field – CoMFA and Comparative Molecular Similarity Analysis – CoMSIA. The 3D-QSAR models, in combination with docking, supported the hypothesis that the interaction between the benzoxazole ring of Merck pyridinones with Tyr181 play an important role to stabilize the complex. Therefore, the outcome of that study provided insights to design novel pyridin-2(1H)-one derivatives with potential activity against mutant strains.³⁸

A year later, in 2005 it was published a 2D-QSAR study for more than 40 Merck pyridinones using a *k* nearest neighbor approach.³⁹ The most promising QSAR models were employed to screen the US National Cancer Institute database. Derivatives of the pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine (such as NSC11635) and

phenothiazine (NSC 127) type were identified as putative NNRTIs leads. Hit molecules were subject of molecular docking to explore the putative binding mode. Docking results supported the potential activity of the hit molecules.³⁹

In 2006 Bajaj *et al.* developed a novel descriptor called *augmented eccentric connectivity index* to develop 2D-QSAR models for a data set of 72 3-aminopyridin-2(1H)-ones. Authors concluded that the novel descriptor performed better than other previously used descriptors. A total of 80.6% of the compounds on that data set were correctly predicted by the model.⁴⁰

More recently, in 2013 Debnath *et al.* published a comprehensive 3D-QSAR (specifically, CoMFA and CoMSIA) study of 178 4-benzyl/benzoyl pyridin-2(1H)-ones using HIV-1 RT activity from WT and three mutants: K103, Y181C, and Y188L.⁴¹ For this studies the molecular alignment (*i.e.*, possible bioactive conformations) were taken from crystallographic structures and molecular docking. From the CoMFA and CoMSIA models was concluded that the C-3, C-4 and C-6 positions of the pyridinone ring were very important for a broad-spectrum anti-HIV-1 RT activity. It was also concluded that an electronegative field between the pyridinone and aryl moieties is a common requirement for the activities.⁴¹ Based on the 3D-QSAR and docking studies, authors designed compounds with putative activity against WT and mutant strains K103N, Y181C, and Y188L. One example is molecule VC1 (Fig. 4).

5. Conclusions

Pyridine-2(1H)-ones represent a major structural class under development as NNRTIs. Structure-based analysis, QSAR and docking studies, combined with medicinal chemistry approaches and biological screening have played a key role in the multidisciplinary effort to develop advance generations of pyridine-2(1H)-ones derivatives as a promising class of NNRTIs. Crystallographic structures of pyridine-2(1H)-ones are guiding the structure-based design of novel sub-classes with promising activity profile against mutant strains. An effective strategy to improve the activity profile of pyridinone derivatives has been the preparation of hybrids with other NNRTIs. Novel generations of compounds are being designed based on: (1) the accumulated knowledge of the SAR of pyridine-2(1H)-ones; (2) the known requirements of ligand flexibility to adapt to the mutated binding pocket; and (3) the desirable feature to make favorable interactions with conserved residues. Amongst the promising novel classes of compounds are pyridin-2(1H)-one/UC-781 and quinolone/UC-781 hybrids. These new classes may enter into clinical development for the treatment of AIDS.

List of abbreviations

3D-QSAR	Three-dimensional quantitative structure–activity relationships
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
CoMFA	Comparative molecular field analysis
CoMSIA	Comparative molecular similarity analysis

FDA	Food and Drug Administration
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HIV	Human immunodeficiency virus
NRTIs	Nucleoside reverse transcriptase inhibitors
NNRTIs	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors
PDB	Protein Data Bank
RT	Reverse transcriptase
SAR	Structure–activity relationships
SI	Selectivity index
WT	Wild-type

Acknowledgements

We thank *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* CONACyT Grant 155029 to DCV. We also thank the National Autonomous University of Mexico (UNAM) for grant PAIP 5000-9163 to JLMF and the institutional program *Nuevas Alternativas de Tratamiento para Enfermedades Infecciosas* (NUATEI) of the Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) UNAM for financial support. O. M.-L. acknowledges CONACyT (No. 217442/312933), the Cambridge Overseas Trust and the Secretariat of Public Education and the Mexican government for funding.

References

- 1 World Health Organization, HIV/AIDS, available at <http://www.who.int/hiv/data/en/>.
- 2 M.-P. de Béthune, *Antiviral Res.*, 2010, **85**, 75–90.
- 3 H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov and P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.*, 2000, **28**, 235–242.
- 4 L. Kohlstaedt, J. Wang, J. Friedman, P. Rice and T. Steitz, *Science*, 1992, **256**, 1783–1790.
- 5 R. Thammaphorn, M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, P. Boonsri, P. Saparpakorn, K. Choowongkorn, S. Techasakul, K. Kato and S. Hannongbua, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 15806.
- 6 X. Li, L. Z. Zhang, Y. Tian, Y. N. Song, P. Zhan and X. Y. Liu, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2014, **24**, 1199–1227.
- 7 S. E. Nichols, R. A. Domaol, V. V. Thakur, J. Tirado-Rives, K. S. Anderson and W. L. Jorgensen, *J. Chem. Inf. Model.*, 2009, **49**, 1272–1279.
- 8 A. Ivetac, S. E. Swift, P. L. Boyer, A. Diaz, J. Naughton, J. A. T. Young, S. H. Hughes and J. A. McCammon, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2014, **83**, 521–531.
- 9 K. Das, P. J. Lewi, S. H. Hughes and E. Arnold, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2005, **88**, 209–231.
- 10 K. Das and E. Arnold, *Curr. Opin. Virol.*, 2013, **3**, 119–128.
- 11 K. le Van, C. Cauvin, S. de Walque, B. Georges, S. Boland, V. Martinelli, D. Demonte, F. Durant, L. Hevesi and C. van Lint, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 3636–3643.
- 12 K. Das, J. D. Bauman, A. D. Clark, Y. V. Frenkel, P. J. Lewi, A. J. Shatkin, S. H. Hughes and E. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 1466–1471.
- 13 K. M. Frey, D. E. Puleo, K. A. Spasov, M. Bollini, W. L. Jorgensen and K. S. Anderson, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 2737–2745.
- 14 W.-G. Lee, K. M. Frey, R. Gallardo-Macias, K. A. Spasov, A. H. Chan, K. S. Anderson and W. L. Jorgensen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, **25**, 4824–4827.
- 15 M. E. Goldman, J. H. Nunberg, J. A. O'Brien, J. C. Quintero, W. A. Schleif, K. F. Freund, S. L. Gaul, W. S. Saari, J. S. Wai, J. M. Hoffman, P. S. Anderson, D. J. Hupe, E. A. Emini and A. M. Stern, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1991, **88**, 6863–6867.
- 16 W. S. Saari, J. S. Wai, T. E. Fisher, C. M. Thomas, J. M. Hoffman, C. S. Rooney, A. M. Smith, J. H. Jones and D. L. Bamberger, *J. Med. Chem.*, 1992, **35**, 3792–3802.
- 17 J. M. Hoffman, J. S. Wai, C. M. Thomas, R. B. Levin, J. A. O'Brien and M. E. Goldman, *J. Med. Chem.*, 1992, **35**, 3784–3791.
- 18 J. M. Hoffman, A. M. Smith, C. S. Rooney, T. E. Fisher, J. S. Wai, C. M. Thomas, D. L. Bamberger, J. L. Barnes and T. M. Williams, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 953–966.
- 19 J. L. Medina-Franco, S. Rodriguez-Morales, C. Juarez-Gordiano, A. Hernandez-Campos, J. Jimenez-Barbero and R. Castillo, *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, **12**, 6085–6095.
- 20 A. L. Hopkins, J. Ren, R. M. Esnouf, B. E. Willcox, E. Y. Jones, C. Ross, T. Miyasaka, R. T. Walker, H. Tanaka, D. K. Stammers and D. I. Stuart, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 1589–1600.
- 21 V. Dolle, E. Fan, C. H. Nguyen, A.-M. Aubertin, A. Kirn, M. L. Andreola, G. Jamieson, L. Tarrago-Litvak and E. Bisagni, *J. Med. Chem.*, 1995, **38**, 4679–4686.
- 22 V. Dollé, C. H. Nguyen, M. Legraverend, A.-M. Aubertin, A. Kirn, M. L. Andreola, M. Ventura, L. Tarrago-Litvak and E. Bisagni, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3949–3962.
- 23 A. Benjahad, K. Courté, J. Guillemont, D. Mabire, S. Coupa, A. Poncelet, I. Csoka, K. Andries, R. Pauwels, M.-P. de Béthune, C. Monneret, E. Bisagni, C. H. Nguyen and D. S. Grierson, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 5501–5514.
- 24 A. Benjahad, M. Croisy, C. Monneret, E. Bisagni, D. Mabire, S. Coupa, A. Poncelet, I. Csoka, J. Guillemont, C. Meyer, K. Andries, R. Pauwels, M.-P. de Béthune, D. M. Himmel, K. Das, E. Arnold, C. H. Nguyen and D. S. Grierson, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 1948–1964.
- 25 D. M. Himmel, K. Das, A. D. Clark, S. H. Hughes, A. Benjahad, S. Oumouch, J. Guillemont, S. Coupa, A. Poncelet, I. Csoka, C. Meyer, K. Andries, C. H. Nguyen, D. S. Grierson and E. Arnold, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 7582–7591.
- 26 A. Benjahad, J. Guillemont, K. Andries, C. H. Nguyen and D. S. Grierson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 4309–4312.
- 27 A. Li, Y. Ouyang, Z. Wang, Y. Cao, X. Liu, L. Ran, C. Li, L. Li, L. Zhang, K. Qiao, W. Xu, Y. Huang, Z. Zhang, C. Tian, Z. Liu, S. Jiang, Y. Shao, Y. Du, L. Ma, X. Wang and J. Liu, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 3593–3608.
- 28 G. M. Maggiora, *J. Chem. Inf. Model.*, 2006, **46**, 1535.
- 29 J. Medina-Franco, G. Navarrete-Vázquez and O. Méndez-Lucio, *Future Med. Chem.*, 2015, **7**, 1197–1211.
- 30 Y. Cao, Y. Zhang, S. Wu, Q. Yang, X. Sun, J. Zhao, F. Pei, Y. Guo, C. Tian, Z. Zhang, H. Wang, L. Ma, J. Liu and X. Wang, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, **23**, 149–159.

- 31 J. L. Medina-Franco, K. Martínez-Mayorga, C. Juárez-Gordiano and R. Castillo, *ChemMedChem*, 2007, **2**, 1141–1147.
- 32 H. Reyes, Síntesis de Híbridos de piridinona-UC781 y Análogos para Estudios de Acoplamiento Molecular y Evaluación de la Replicación del VIH-1, *Synthesis of pyridinone-UC781 Hybrids and Analogs for Molecular Docking Studies and Evaluation of HIV-1 Inhibitory Activity*, in *Centro de Graduados e Investigación en Química*, vol. PhD, Instituto Tecnológico de Tijuana, 2014.
- 33 A. Cabrera, L. D. Miranda, H. Reyes, G. Aguirre and D. Chavez, *Acta Crystallogr., Sect. E: Crystallogr. Commun.*, 2015, **71**, o939.
- 34 A. Cabrera, 2015, Diseño, Síntesis y Modelado Molecular de Híbridos de Quinolona-UC781, *Design, Synthesis and Molecular Modeling of Quinolone-UC781 hybrids*, in *Centro de Graduados e Investigación en Química*, vol. PhD, Instituto Tecnológico de Tijuana, 2015.
- 35 O. A. Tarasova, A. F. Urusova, D. A. Filimonov, M. C. Nicklaus, A. V. Zakharov and V. V. Poroikov, *J. Chem. Inf. Model.*, 2015, **55**, 1388–1399.
- 36 A. Kurczyk, D. Warszycki, R. Musiol, R. Kafel, A. J. Bojarski and J. Polanski, *J. Chem. Inf. Model.*, 2015, **55**, 2168–2177.
- 37 N. Jain, S. Gupta, N. Sapre and N. S. Sapre, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 14814–14827.
- 38 J. L. Medina-Franco, S. Rodriguez-Morales, C. Juarez-Gordiano, A. Hernandez-Campos and R. Castillo, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 2004, **18**, 345–360.
- 39 J. L. Medina-Franco, A. Golbraikh, S. Oloff, R. Castillo and A. Tropsha, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 2005, **19**, 229–242.
- 40 S. Bajaj, S. S. Sambhi, S. Gupta and A. K. Madan, *QSAR Comb. Sci.*, 2006, **25**, 813–823.
- 41 U. Debnath, S. Verma, S. Jain, S. Katti and Y. Prabhakar, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 2013, **27**, 637–654.
- 42 J. Ren, J. Milton, K. L. Weaver, S. A. Short, D. I. Stuart and D. K. Stammers, *Structure*, 2000, **8**, 1089–1094.
- 43 J. Ren, C. Nichols, L. Bird, P. Chamberlain, K. Weaver, S. Short, D. I. Stuart and D. K. Stammers, *J. Mol. Biol.*, 2001, **312**, 795–805.

7.2. Cartel – “Estudios de *docking* molecular de inhibidores potenciales de transcriptasa reversa de VIH” – Simposio de Química Medicinal y Farmacéutica, Congreso Estudiantil Ciencia sin Fronteras en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.



Estudios de Docking Molecular de Inhibidores Potenciales de Transcriptasa Inversa de VIH



Vite Caritino Hugo*, Cabrera Velásquez Alberto**, Chávez Velasco Daniel**, Medina Franco José Luis*

*Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México
**Centro de Graduados del Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana, B. C.

Antecedentes

La enzima transcriptasa inversa (TI) del VIH-1 tiene un rol clave en el ciclo replicativo del virus. Actualmente la TI es una de las dianas moleculares más atractivas para el tratamiento del SIDA. Existen dos clases de fármacos anti-TI, una de ellas son los inhibidores no-nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INNTIs). Los INNTIs son altamente selectivos y relativamente poco tóxicos debido a que se unen a un sitio alostérico de la cadena p66 de la enzima. Sin embargo, los INNTIs generan variables mutantes del virus con facilidad, provocando distintos niveles de resistencia a fármacos.

Objetivo

Proponer modelos de acoplamiento molecular (docking) de moléculas diseñadas con la ayuda de métodos computacionales como potenciales inhibidores TI de VIH-1.

Justificación

El desarrollo de nuevos INNTIs es de gran importancia ya que representan alternativas potenciales a los INNTIs actualmente aprobados, los cuales continúan presentando problemas de resistencia y algunos de ellos de toxicidad.

Metodología

- Se tomaron 3 estructuras experimentales de la TI de Protein Data Bank (2BE2, 2B5J y 2BAN), con diferentes ligandos piridinonas co-cristalizados (R221239, R165481 y R157208 respectivamente).
- Mediante una superposición de las 3 estructuras de la TR, se revisó el ajuste inducido mediante el programa ICM 3.4-8.
- Para validar el protocolo de docking se realizó un re-docking de los ligandos co-cristalizados con ICM.
- Se realizó el docking de 35 compuestos experimentales derivados de piridinona mediante ICM 3.4-8 y Autodock 4.2.
- Se realizó un análisis de las conformaciones y los scoring obtenidos en cada programa y se obtuvo una gráfica de consenso docking con DataWarrior.
- Se realizaron los Protein-Ligand Interaction Fingerprints y los mapas 2D de interacción con el ligando de algunos compuestos mediante MOE 2014.

Resultados

Tabla 1. Valores de RMSD obtenidos mediante la superposición de las 3 estructuras de la TR, las estructuras de las columnas se tomaron como el objeto fijo.

Matriz RMSD		Carbono alfa		Backbone	
		2B5J	2BAN	2B5J	2BAN
Cadenas p66 y p51	2BE2	0.329	0.482	0.323	0.475
	2B5J	-	0.250	-	0.247
Sólo cadena p66	2BE2	0.322	0.542	0.320	0.537
	2B5J	-	0.313	-	0.310

Figura 1. Superposición de las 3 estructuras de TR mediante backbone, la conformación del sitio de unión y de los ligandos se muestra por separado. 2BE2 (naranja), 2B5J (azul) y 2BAN (verde).

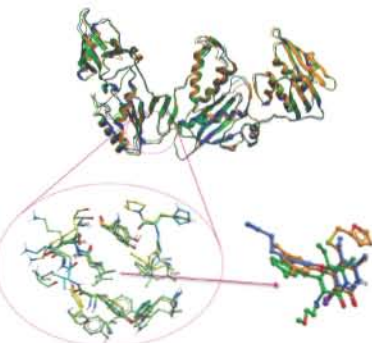


Figura 2. Conformación de los ligandos co-cristalizados (naranja) en el sitio de unión de su respectivo receptor y mediante re-cocking (amarillo). A: 2BE2-R221239, B: 2B5J-R165481 y C: 2BAN-R157208. D: conformación de los 3 ligandos superpuestos mediante re-docking únicamente sobre 2BE2.

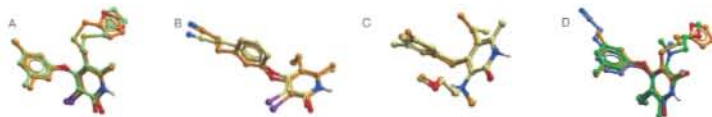
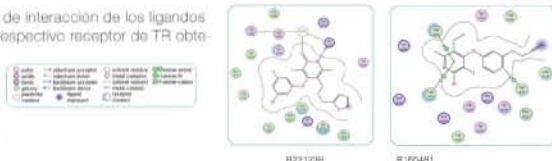


Figura 3. Diagramas 2D de interacción de los ligandos co-cristalizados con su respectivo receptor de TR obtenidos con MOE 2010.



Referencias

- Himmel, et al. (2005). Crystal structures for HIV-1 reverse transcriptase in complexes with three pyridinone derivatives: A new class of non-nucleoside inhibitors effective against a broad range of drug-resistant strains. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(24), 7582-7591.
- Medina-Franco, J.L. et al (2007) Pyridin-2(1H)-ones: A promising class of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *ChemMedChem* 2, 1141-1147.

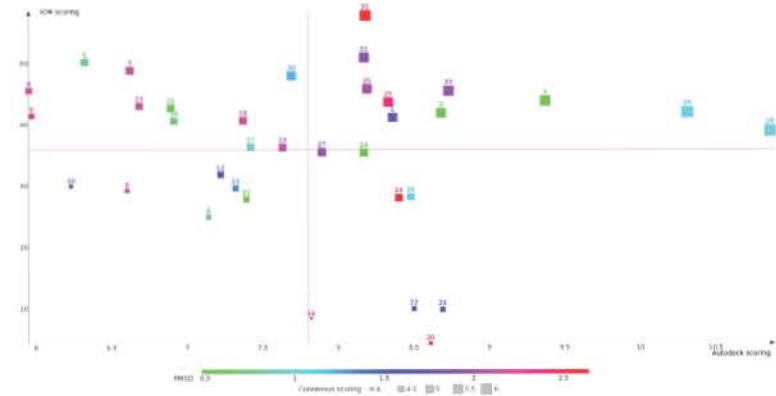


Figura 4. Gráfica del valor del scoring obtenido en Autodock contra el obtenido en ICM, el color de los puntos es de acuerdo al valor de RMSD de la conformación obtenida en los dos programas y el tamaño del punto es de acuerdo a un valor combinado (consensus scoring). En rojo se muestran las líneas correspondientes al promedio del scoring para cada eje.

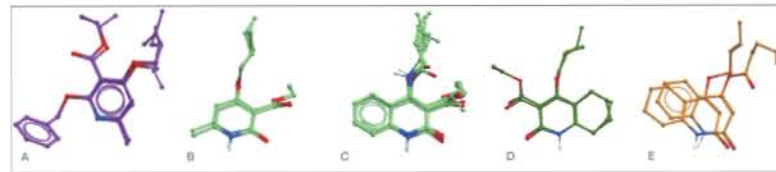


Figura 5. Conformación de algunos ligandos en el sitio de unión tras el docking y agrupación de acuerdo a la similitud de los postes. A: ligandos 1, 2 y 3 B: 4, 5, 6, y 7 C: 18, 19, 24, 25, 33 y 35 D: 30 y 31 E: 27 y 32. No se muestra el receptor.

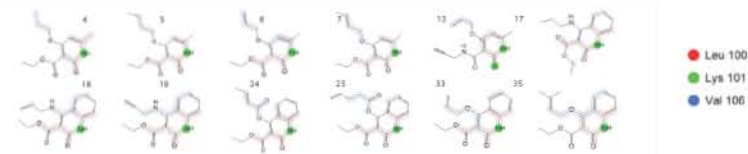


Figura 6. Protein-Ligand Interaction Fingerprints (PLIFs) de compuestos seleccionados los cuales tienen un modo de unión similar a las piridinonas co-cristalizadas y valores altos de consensus scoring.

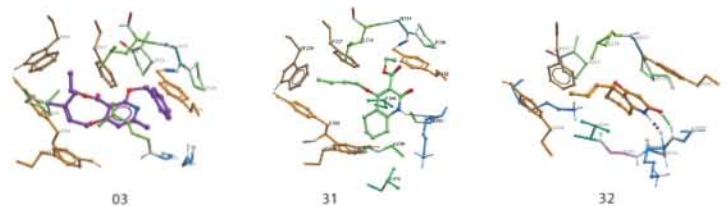


Figura 7. Conformación en el sitio de unión de algunos de los compuestos con mejores características

Conclusiones

- Las 3 estructuras de la TR estudiadas son muy similares entre sí, como lo muestran los resultados de RMSD tras una superposición estructural.
- Los 3 ligandos co-cristalizados derivados de piridinona adoptan una conformación muy similar en el sitio de unión para INNTIs e interactúan de forma muy similar con los residuos del sitio.
- Por sus características, la estructura de la cadena p66 de la TR 2BE2 es la más adecuada para realizar docking de ligandos análogos de piridinonas.
- Al realizar el consenso docking se observa que los ligandos con mejores características presentan una conformación similar a las piridinonas co-cristalizadas.
- Los ligandos experimentales con mejores características son: 1, 2, 3, 5, 18, 19, 24, 25, 33, 35 y por lo tanto deben tener prioridad para ser sintetizados y posteriormente ser estudiados en ensayos biológicos.

Agradecimientos

Este Trabajo es financiado con el apoyo PAIP 5000-9163 (JLMF) y proyecto CONACyT No. 155020 (DCV).